

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS



Biochemijos magistrantūros studijų programos II kurso studentė
Martyna KOPLŪNAITĖ

Magistrinis darbas

***N*⁴-Aminorūgštimis modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintezė ir
jų tyrimas**

Darbo vadovė
Dr. D. Tauraitė

Vilnius 2020

***N*⁴-Aminorūgštims modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintezė ir jų tyrimas**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos
ir biotechnologijos skyriuje

Martyna Koplūnaitė

Darbo vadovė:

Dr. Daiva Tauraitė

TURINYS

SANTRUMPŲ PAAIŠKINIMAI	1
ĮVADAS	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA	4
1.1. Nukleozidai, nukleotidai ir jų panaudojimas.....	4
1.2. Amidinio ryšio susidarymas.....	6
1.2.1. Amidų sintezė naudojant acilchloridus.....	7
1.2.2. Amidų sintezė naudojant rūgščių anhidridus	8
1.2.3. Amidų sintezė naudojant aktyvius esterius.....	10
1.3. Apsauginių grupių naudojimas	10
1.4. N^4 -(α -Aminoacil)citidinių persitvarkymas į N -(4-citidinil)aminorūgščių amidus	12
1.5. Nukleotidų sintezė.....	13
1.5.1. Sinezė per fosfordichloratinį tarpinį junginį.....	13
1.5.2. Sinezė per P(III) – P(V) tarpinius junginius	15
1.5.3. Sinezė per fosforamidatinį tarpinį junginį	16
1.5.4. Sinezė naudojant organinius pirofosfato reagentus	17
1.6. DNR polimerazės biotechnologijose.....	18
1.6.1. DNR padauginimas polimerazine grandinine reakcija	19
1.6.2. Izoterminis DNR padauginimas.....	21
1.6.3. Sekoskaitos technologijos.....	21
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS	23
2.1. N^4 -Acil-Boc-2'-deoksicitidinių sintezė.....	24
2.2. N -(4-(2'-Deoksicitidinil))acilamidų sintezė	27
2.3. N^4 -Aminorūgštėmis modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintezė	30
2.4. Biocheminiai tyrimai.....	34
2.4.1. Oligonukleotido pažymėjimas ^{33}P ir suldydymas su matrica	34
2.4.2. Pradmens prailginimo reakcijos.....	35
2.4.3. DNR fragmentų poliakrilamidinio gelio elektroforezė.....	36
3. REZULTATAI	36
3.1. N^4 -Acil-Boc-2'-deoksicitidinių sintezė.....	36

3.2.	<i>N</i> -(4-(2'-Deoksicitidinil))acilamidų sintezė	40
3.3.	<i>N</i> ⁴ -Aminorūgštimis modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintezė	43
3.4.	Pradmens prailginimo reakcijos	47
	IŠVADOS	51
	SUMMARY	52
	LITERATŪROS ŠALTINIAI	54

SANTRUMPŲ PAAIŠKINIMAI

APS – Amonio persulfatas
Boc – *tert*-butiloksikarbonil
Boc₂O – Di-*tert*-butildikarbonatas
BMR – Branduolių magnetinis rezonansas
DCC – *N,N'*-Dicikloheksilkarbodiimididas
DCU – *N,N'*-Dicikloheksilurėja
DMAP - *N,N*-Dimetilaminopiridinas
DMF – *N,N*-Dimetilformamidas
ddNTP – Dideoksinukleozido trifosfatas
dNTP – Deoksinukleozido trifosfatas
EDTA - Etilendiamintetraacto rūgštis
Fmoc - Fluorenilmetoksikarbonil
HBT - Hidroksibenzotriazolas
HPLC-MS – Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija
NHS – *N*-Hidroksisukcinimididas
NKS – Naujos kartos sekoskaita
PEX – Pradmens prailginimas
PFP – Pentafluorfenolis
PGR – Polimerazinė grandininė reakcija
PNK – Polinukleotidų kinazė
PNP – *p*-Nitrofenolis
SalPCl – Salicilfosforchloritas
TBA – Tributilaminas
TBAPP – Tributilamonio pirofosfatas
TBE – Tris/Boratas/EDTA
TdT - Terminalinė deoksinukleotidų transferazė
TEA - Trietilaminas
TEMED – Tetrametiletildiaminas

TLC – Plonasluoksne chromatografija

TMP – Trimetilfosfatas

IVADAS

Nukleotidai yra organinės molekulės, turinčios labai platų pritaikymą. Natūralūs nukleotidai yra DNR ir RNR monomerai, jie taip pat svarbūs ląstelės metabolizmui. Nukleozidų trifosfatai ATP, GTP, CTP ir UTP ląstelėje atlieka energijos pernašos funkciją, kuri reikalinga aminorūgščių, baltymų, ląstelės membranos sintezei ir t.t. Nukleotidai taip pat dalyvauja ląsteliniame signalo pernešime bei atlieka kofaktorių vaidmenį. Tad nieko nestebina, jog natūralūs bei modifikuoti nukleotidai yra plačiai tyrinėjami. Modifikuoti nukleotidai pasitelkiami įvairiems ląstelinės ir molekulinės biologijos eksperimentams. Šie junginiai naudojami kaip substratai polimerazėms, tiriami kaip fermentų slopikliai, taip pat žymimi fluorescencinėmis bei radioaktyviomis žymėmis.

Norint išsaugoti Watson-Crick porų susidarymą, nukleobazės dažniausiai modifikuojamos pirimidinų C5 ir 7-deazapurinų C7 pozicijose. Nukleotidų modifikacijos kitose pozicijose yra prasčiau ištirtos. Kol kas žinoma labai nedaug informacijos apie modifikacijas purinų N⁶ ir O⁶ bei pirimidinų O⁴ ir N⁴ pozicijas, tad šio darbo tikslas buvo susintetinti literatūroje neaprašytus N⁴ pozicijoje aminorūgštimis modifikuotus 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatus ir juos panaudoti biocheminiuose tyrimuose, tiriant minėtus junginius kaip substratus polimerazėms.

Tikslui pasiekti sudaryti šie uždaviniai:

- Blokuotomis aminorūgštimis modifikuotų 2'-deoksicitidino nukleozidų sintezė
- Deblokuotomis aminorūgštimis modifikuotų 2'-deoksicitidino nukleozidų sintezė
- Susintetintų nukleozidų fosforilinimas iki nukleozidų 5'-trifosfatų
- Susintetintų junginių biocheminiai tyrimai naudojant polimerazes

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nukleozidai, nukleotidai ir jų panaudojimas

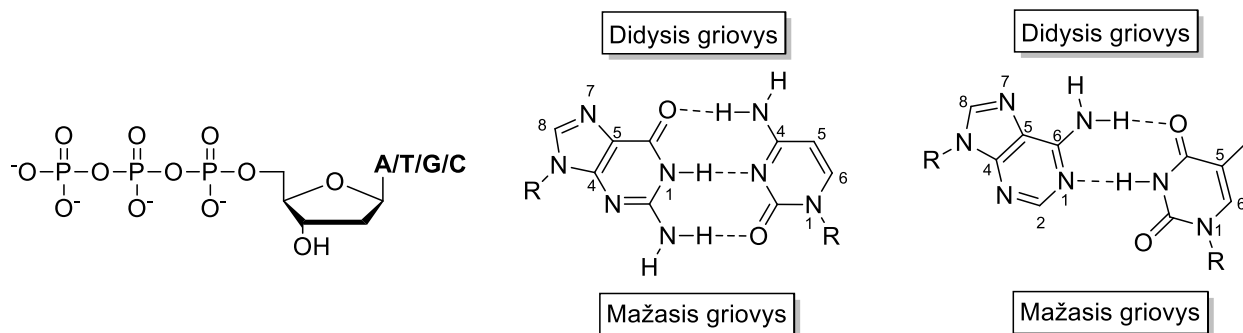
(2'-Deoksi)nukleozidai ir jų 5'-trifosfatai [(d)NTP] yra gyvybiškai svarbios biomolekulės, atliekančios funkcinius bei struktūrinius vaidmenis biologinėse sistemose. Polimerazės naudodamos natūralius (d)NTP sintetina nukleorūgštis tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, o adenozino 5'-trifosfatas (ATP) yra universali ląstelės valiuta¹. ATP yra pagrindinis energijos šaltinis ląstelinėms funkcijoms – dauguma reakcijų, vykstančių ląstelės viduje, priklauso nuo ATP hidrolizės². ATP taip pat atlieka ir svarbų alosterinį vaidmenį, reguliuodamas ląstelės metabolizmą^{3,4}. Cikliniai mononukleotidai (cAMP⁵ ir cGMP⁶) yra antriniai signalo nešikliai, o dinukleotidai atlieka kofaktorių vaidmenį^{7,8,9}.

Struktūriniai nukleozidų ir jų trifosfatų analogai pasižymi labai įvairiomis biologinėmis savybėmis. Šie junginiai naudojami kaip fermentų slopikliai¹⁰, substratai nukleotidus prisijungiantiems baltymams¹¹, žymimi radioaktyviomis¹² bei fluorescencinėmis¹³ žymėmis. Modifikuoti nukleozidų 5'-trifosfatai pasitelkiami aptamerų kūrimui, kurie naudojami terapijoje¹⁴, vaistų pernešimui¹⁵, diagnostikai¹⁶, funkicinei genomikai¹⁷ bei biojutikliams¹⁸. Taip pat žinoma, jog kai kurie nukleozidų bei nukleotidų analogai pasižymi priešvėžinėmis¹⁹ ir priešvirusinėmis²⁰ savybėmis. Priešvėžiniai nukleozidų analogai slopina ląstelinę DNR replikaciją ir reparaciją, o priešvirusiniai agentai - virusinio genomo replikaciją. Nukleozidų analogai yra neaktyvūs provaistai ir, norint juos paversti farmakologiškai aktyviomis trifosfatų formomis, reikalingas tarpląstelinis fosforilinimas^{21,22}. Nukleozidų analogai naudojami įvairių ligų gydymui. Azidotimidinas pasitelkiamas ŽIV gydymui ir prevencijai²³, pirimidinų nukleozidų analogai naudojami prieš piktybinius auglius²⁴, o purinų nukleozidų analogų imunoslopinančios savybės padeda išvengti atmetimo reakcijos po organų transplantacijos^{25,26}.

Dėl NTP vaidmens beveik visuose ląsteliniuose procesuose, nukleotidų analogai plačiai naudojami ląstelinės ir molekulinės biologijos tyrimuose. Fluorescenciškai žymėti nukleotidų analogai yra jautrūs zondai, tinkami tirti nukleorūgščių struktūrai, dinamikai ir sąveikoms^{27,28}. Didžiulis tokių zondų pliusas – struktūrinių ir cheminių savybių panašumas į natūralias nukleobazes. Palyginus su didesniais chromoforais, į oligonukleotidus įterpti žymėti nukleotidai nesukelia ryškių struktūrinių ar cheminių pakitimų, iškreipiančių matavimų duomenis.

DNR polimerazių katalizuojamas modifikuotų nukleotidų įjungimas yra svarbus daugybėje biotechnologinių sričių²⁹. Naujos kartos bei pavienių molekulių sekoskaita sukėlė molekulinės genetikos revoliuciją - modifikuotų dNTP panaudojimas įgalino pilną genomo sekos nuskaitymą, leidžiantį aptikti genetinius pakitimus, lemiančius įvairias ligas^{30,31}. Kita technologija, besiremianti chemiškai modifikuotais nukleotidais – *in vitro* aptamerų, pasižyminčių dideliu giminingumu ir specifiskumu taikiniui, atrinkimas (SELEX)³². Technologijos dėka galima aptikti įvairius ligai-specifinius biožymenis ir informaciją panaudoti diagnostikai bei gydymui^{33,34}.

Dažniausiai atliekamos nukleobazių modifikacijos yra pirimidinų C5 ir 7-deazapurinų C7 pozicijose, kadangi šios pozicijos nepaveikia Watson-Crick porų susidarymo ir lokalizuojasi didžiajame DNR duplekso griovyje (pav. 1), taip minimizuojant įtaką fermentiniam aktyvumui²⁹. Šiose pozicijose modifikuoti nukleotidai yra puikūs substratai pradmens prailginimo (PEX) reakcijoms bei polimerazinei grandininei reakcijai (PGR). Tam tikri dNTP, turintys modifikacijas minėtose pozicijose, yra dar geresni substratai šioms reakcijoms nei natūralūs nukleotidai^{35,36}.

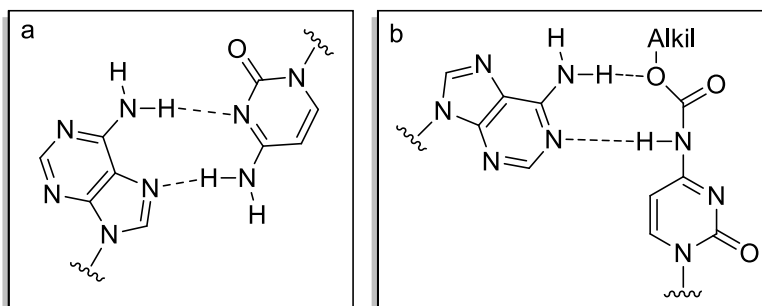


Pav. 1. 2'-Deoksinukleozidų 5'-trifosfatų struktūra ir jų sudaromos Watson-Crick bazių poros. Punktyrinė linija vaizduoja vandenilinius ryšius.

Nukleotidai, turintys pakaitus pirimidinų C6 ir purinų C8 pozicijose yra prastesni substratai polimerazėms^{37,38}. Nukleotidai su mažais pakaitais, pvz. 8-brom- ir 8-metil-dATP, yra tinkami substratai DNR polimerazėms, tačiau dNTP, turintys didesnes modifikacijas, pvz. 8-fenil, nėra įjungiami³⁹.

Modifikacijos kitose nukleobazių pozicijose, kaip purinų N^6 ir O^6 bei pirimidinų O^4 bei N^4 , yra ištirtos mažiau. Yra žinoma, jog O^4 -alkilintas timidinas ir O^6 -alkilintas guanozinas

sukelia mutagenines DNR pažaidas⁴⁰, o N^4 -acetilcitolinas aptinkamas keletame tRNR ir rRNR⁴¹. Tiriant 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų, N^4 pozicijoje turinčius įvairaus dydžio pakaitus: mažesnius (acetil-, heksil-) ir didesnius (nikotinoil-, acetilbenzoil-, benzoilbenzoil-), nustatyta, jog įvairios polimerazės (*Taq*, KF (exo-), TdT, Bsm, ϕ 29) geba junginius panaudoti kaip substratus ir sėkmingai juos įjungti į oligonukleotidus⁴². Pakaitai, esantys N^4 pozicijoje, neturi įtakos vandenilinių ryšių susidarymui ir tokie dNTP sėkmingai sudaro bazių poras su guaninu. Įdomu tai, jog N^4 -acil- ir N^4 -alkoksikarbonil-2'-deoksicitidino nukleotidai sudaro unikalias bazių poras su adeninu⁴³. Įprastai netinkamai suporuoti A ir C nukleotidai sudaro Wobble tipo vandenilinius ryšius⁴⁴ (Pav. 2a), o N^4 -alkoksikarbonil-2'-deoksicitidino trifosfatų atveju pastebimi vandeniliniai ryšiai, susidarantys tarp $C-4^{\text{NH}}$ ir $A-1^{\text{N}}$ bei $C-O^{\text{ester}}$ ir $A-6^{\text{NH}}$ (Pav. 2b).

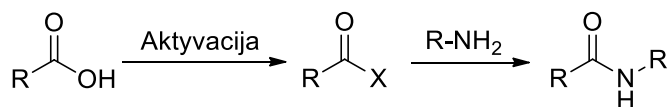


Pav. 2. a Adenino ir citozino sudaroma Wobble tipo bazių pora. **b** Adenino ir N^4 -alkoksikarbonil-citozino sudaroma bazių pora. Punktyrinės linijos vaizduoja vandenilinius ryšius.

1.2. Amidinio ryšio susidarymas

Amidinis ryšys plačiai aptinkamas tiek natūraliose, tiek sintetinėse molekulėse. Amidų funkcinė grupė jungia aminorūgštis ir įgalina baltymų molekulių susidarymą. Baltymai – itin svarbios biologinės molekulės, atsakingos už fermentinę katalizę, jie taip pat atlieka transportinę bei mechaninę funkcijas, suteikia imuninę apsaugą. Amidų svarba biologinėse sistemose nesibaigia, jie randami galybėje įvairių molekulių, įskaitant ir vaistus⁴⁵. Karboksamidai yra neutralios, stabilios molekulės, pasižyminčios tiek donorinėmis, tiek akceptorinėmis vandenilinio ryšio savybėmis⁴⁶.

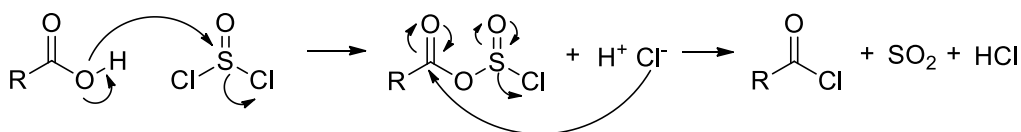
Gyvoose sistemose dauguma amidinių ryšių suformuoja ribosomos⁴⁷. Ilgi bei sudėtingi baltymai surenkami iš pavienių aminorūgščių, selektyviai aktyvuojant pasirinktą aminorūgštį ir prijungiant ją prie baltymo grandinės. Šį veiksmą koordinuoja daugybė makromolekulių, įskaitant mRNR, tRNR, aktyvuojančius fermentus bei kofaktorių. Deja, bet chemikai negali sau leisti dirbti pavienių molekulių lygmenyje, tad reikia naudoti metodus, įgalinančius dirbti su trilijonais molekulių. Amidiniai ryšiai įprastai formuojami sujungiant karboksirūgštis su aminais, tačiau šių junginių sąveika įprastomis sąlygomis nevyksta spontaniškai. Dažniausiai pirmasis amidinio ryšio sintezės žingsnis yra karboksirūgšties aktyvavimas, kuris atliekamas karboksirūgšties -OH grupę pakeičiant lengvai nueinančia grupe X (1 schema). Įprastai karboksirūgštys yra verčiamos rūgščių halogenanhidridais, anhidridais arba aktyviais esteriais. Tuomet aktyvuota karboksirūgštis paveikiama aminu susidarant amidui. Kiekvienu atveju svarbu pasirinkti tinkamą sintezės metodą, kuris leistų pasiekti optimalią išėigą, lemtų mažą pašalinių produktų susidarymą, pasižymėtų geru selektyvumu ir būtų ekonomiškąs.



1 Schema. Karboksirūgšties aktyvacija ir amidinio ryšio susidarymas.

1.2.1. Amidų sintezė naudojant acilchloridus

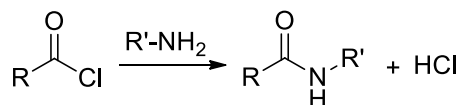
Vienas lengviausių būdų aktyvuoti karboksirūgštį – paversti ją acilchloridu. Įprastai tam naudojamas tionilchloridas (SOCl_2)⁴⁸, oksalilchloridas (COCl_2)⁴⁹, fosforo trichloridas (PCl_3)⁵⁰ ar fosforilchloridas (POCl_3)⁵¹. Žemiau pateikiama karboksirūgšties aktyvavimo tionilchloridu schema.



2 Schema. Acilchlorido formavimosi mechanizmas naudojant tionilchloridą.

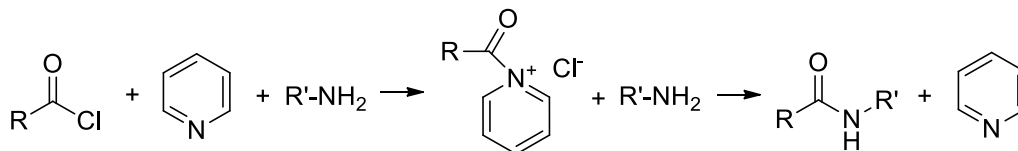
Pagrindinis chlorinančių reagentų naudojimo trūkumas – HCl formavimasis. Kai kurie substratai (pvz. Boc apsauginę grupę turintys aminorai) yra jautrūs rūgštims ir reikalauja nerūgštinių reakcijos sąlygų.

Susintetinus rūgšties chloridą, šis toliau paveikiamas norimu aminu ir gaunamas amidas (3 schema).



3 Schema. Rūgšties chlorido reakcija su aminu.

Tam, kad aminorai nereaguotų su HCl ir nesusidarytų neaktyvi HCl druska, reakcijos metu naudojama papildoma bazė. Įprastai tam pasirenkamas nenukleofilinis tretinis aminoras (TEA, Hünig bazė ar *N*-metilmorfolinas). Reakcijos dažnai pagreitinamos katalitiniu kiekiu piridino ar *N,N*-dimetilaminopiridino (DMAP)⁵². Katalitinis piridino vaidmuo pavaizduotas žemiau.

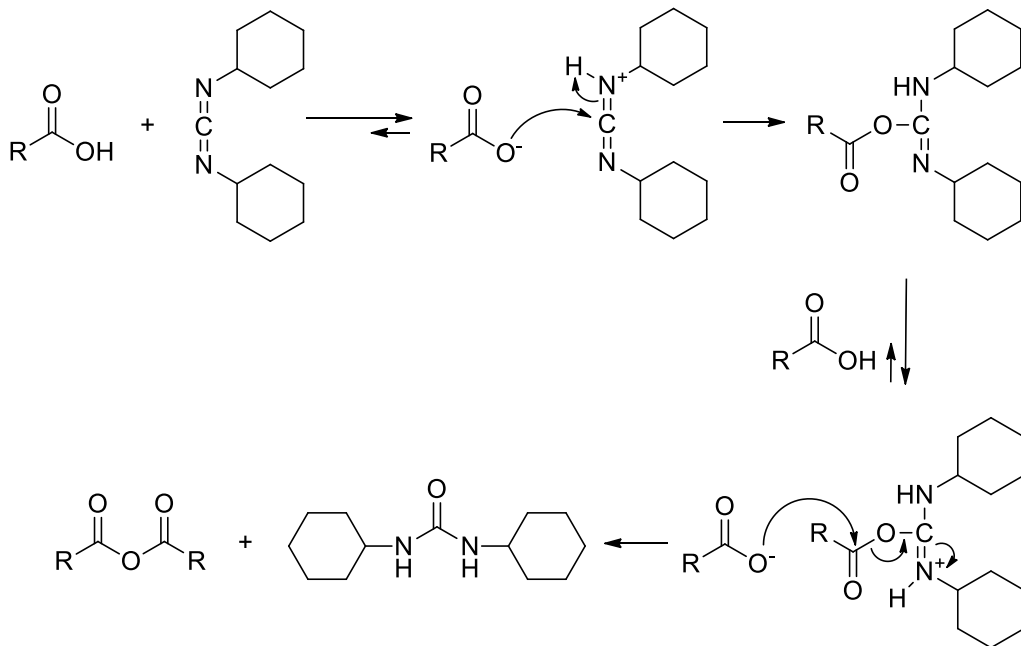


4 Schema. Piridino katalitinis vaidmuo amidinio ryšio formavimesi.

1.2.2. Amidų sintezė naudojant rūgščių anhidridus

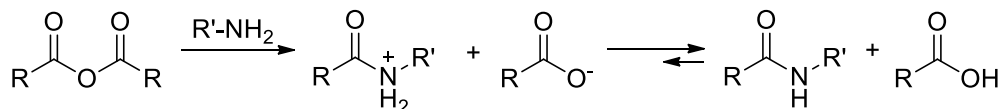
Anhidridai pasižymi geru reaktyvumu su įvairiais nukleofilais: alkoholiais, tioliais bei aminorais. Amidų sintezei naudojami tiek paprasti simetriški, tiek sudėtingesni, izourėjos ar fosforo rūgšties, anhidridai.

Simetriški anhidridai gaunami kaitinant norimą karboksirūgštį arba paveikiant dvi rūgšties molekules vienu dicikloheksilkarbodiimido (DCC) ekvivalentu⁵³ (5 schema).



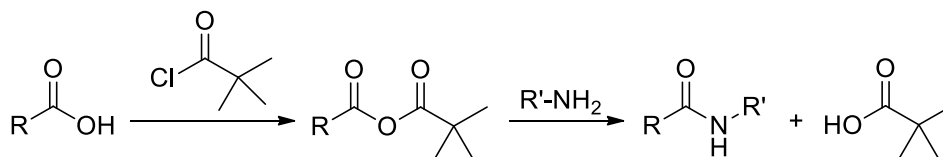
5 Schema. Simetrinio rūgšties anhidrido paruošimas naudojant DCC.

Gautas anhidridas paveikiamas norimu aminu ir susidaro amidas (6 schema). Reakcija nereikalauja papildomos bazės ir tinka peptidų sintezei. Pagrindinis trūkumas – sintezės metu sunaudojama tik pusė rūgšties, tad jeigu rūgštis yra brangi, tai gali būti problema.



6 Schema. Rūgšties anhidrido reakcija su aminu.

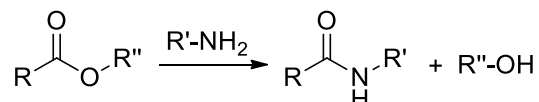
Norint išvengti rūgšties švaistymo, sukurti metodai, kurių metu gaunami mišrūs anhidridai⁵⁴, prie karboksirūgšties prijungiant pigesnius junginius, pvz. pivalio chloridą⁵⁵ (7 schema). Tačiau tokių reakcijų metu norima karboksirūgštis gali reaguoti su anhidridu susidarant simetriškam anhidridui. Taip pat, aminos gali reaguoti su bet kuria anhidrido karboniline grupe susidarant mišriems reakcijos produktams.



7 Schema. Amido sintezė naudojant pivalio anhidridą.

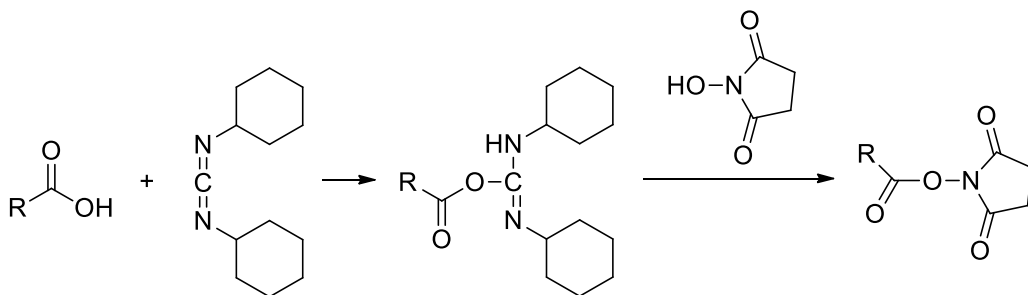
1.2.3. Amidų sintezė naudojant aktyvius esterius

Amidų sintezės metu karboksirūgštis neretai pirmiausia yra paverčiama aktyviu esteriu. Toks metodas yra patrauklus dėl keleto priežasčių. Aktyvūs esteriai dažniausiai yra stabilūs, tad išgryninus juos galima laikyti ilgą laiką, taip pat jie gerai reaguoja su įvairiais nukleofilais esant švelnioms sąlygoms (8 schema).



8 Schema. Aktyvaus esterio reakcija su aminu.

Aktyvių esterių sintezei pasitelkiami įvairūs alkoholiai: peptidų sintezei dažniausiai naudojamas hidroksibenzotriazolas (HBT)⁵⁶, *p*-nitrofenolis (PNP)⁵⁷ ir pentafluorfenolis (PFP)⁵⁸. PFP taip pat rekomenduojamas naudojant heterociklines rūgštis⁵⁹ ar Fmoc apsauginę grupę turinčias aminorūgštis⁶⁰. *N*-Hidroksisukcinimido (NHS) esteriai⁶¹ neretai pasirenkami dėl lengvo gryninimo, kurį lemia geras tirpumas vandenyje. Sukcinimidilesteriai gaunami reaguojant norimai karboksirūgščiai su DCC, kaip aprašyta anksčiau, tuomet gautas tarpinis esteris *in situ* reaguoja su NHS susidarant aktyvuotam NHS-esteriui (9 schema).



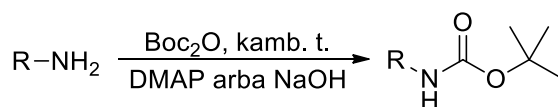
9 Schema. NHS-esterio susidarymas.

1.3. Apsauginių grupių naudojimas

Cheminės sintezės metu naudojant substratus, turinčius daugiau nei vieną funkcinę grupę, būtina apsaugoti grupes, kurių reakcijos yra nepageidaujamos. Tam pasitelkiamos apsauginės grupės. Reikia pasirinkti tokią apsauginę grupę, kuri atitiktų šiuos reikalavimus:

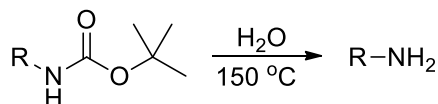
- Selektviai reaguotų tik su norima funkcinė grupe ir sudarytų stabilų junginį esant švelnioms sąlygoms.
- Selektviai pasišalintų, atkuriant pradinę funkcinę grupę.
- Turėtų minimalų papildomų funkcinų grupių kiekį, jog būtų išvengta pašalinių reakcijų.

Įprastai cheminės sintezės būdu formuojant amidinį ryšį ir substratais naudojant aminorūgštis, aminogrupės apsaugojimui naudojamas di-*tret*-butildikarbonatas (Boc_2O)⁶². Aminai paverčiami *N-tret*-Boc dariniais vykstant reakcijoms su Boc_2O terpėje esant organinės (pvz. DMAP⁶³) ar neorganinės (pvz. NaOH ⁶⁴) bazės. Reakcija atliekama kambario temperatūroje ir įprastai pasižymi puikia išeiga.



10 Schema. Aminogrupės apsaugojimas naudojant Boc_2O .

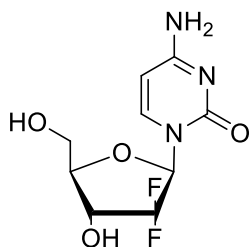
Egzistuoja daugybė metodų Boc apsauginės grupės pašalinimui. Dažnai naudojama rūgštinė aplinka: pasitelkiant CF_3COOH , HCl , HNO_3 ar H_2SO_4 , taip pat Lewis rūgštis (ZnBr_2 , BiCl_3 ir t.t.)^{65,66}. Kai kuriais atvejais naudojamos bazinės sąlygos⁶⁷. Tačiau verta paminėti, jog visi šie metodai turi trūkumų: reikalinga reakcijos mišinio neutralizacija, naudojami katalizatoriai gali būti brangūs. Norint išvengti minėtų bėdų, Boc apsauginės grupės pašalinimui galima naudoti vandenį^{68,69}. Yra žinoma, jog subkritis vanduo ($150 < T < 370$ °C; $0,4 < p < 22$ MPa) pasižymi gerokai didesne H^+ ir OH^- jonų koncentracija, nei kambario temperatūros vanduo, tad toks vanduo kai kuriose reakcijose gali pakeisti rūgštinį ar bazinį katalizatorių⁷⁰. Boc apsauginė grupė pašalinama substratą tirpinant vandenyje ir pakeliant reakcijos mišinio temperatūrą iki 150 °C (11 schema). Priklausomai nuo naudojamo substrato, reakcija trunka 0,5-4 val., o išeiga siekia 50-100 %.



11 Schema. Boc apsauginės grupės pašalinimas naudojant vandenį.

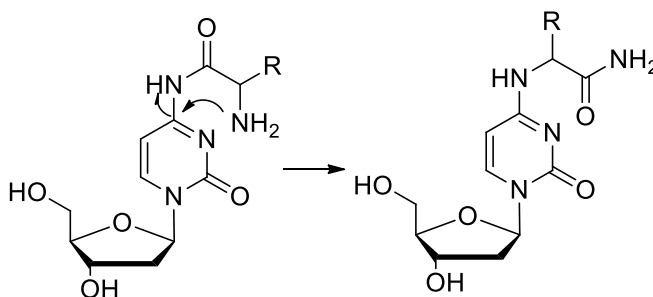
1.4. N^4 -(α -Aminoacil)citidinių persitvarkymas į N -(4-citidinil)aminorūgščių amidus

Kadangi nukleozidai ir jų analogai atlieka svarbų vaidmenį kaip priešvėžiniai⁷¹ ir priešvirusiniai⁷² agentai, kuriamos naujos strategijos pagerinti jų savybėms. Vienas tokių vaistų – gemcitabinas⁷³ (Pav. 3), skirtas gydyti krūtų, gimdos, kasos bei šlapimo pūslės vėžiui.



Pav. 3. Gemcitabinas.

Ieškant būdų sukurti stabilesnę vandenyje tirpią gemcitabino provaisto formą J. McCarthy su kolegomis susintetino keletą gemcitabino aminoacilamidų, prie gemcitabino prijungiant keletą skirtingų aminorūgščių⁷⁴. Sintezė buvo vykdoma užblokuojant aminorūgšties aminogrupę Boc apsaugine grupe, tuomet aminorūgštį prijungiant prie gemcitabino N^4 -aminogrupės ir galiausiai atliekant Boc apsauginės grupės pašalinimą. Pastebėta, jog pašalinus Boc grupę įvyksta molekulės persitvarkymas (12 schema). Laisva α -amino grupė atakuoja citidino 4-ąją poziciją, skyla ryšys tarp citozino bazės ir amidinio azoto atomo. Atlikus platesnius tyrimus padarytos išvados, jog pirminis N^4 -(α -aminoacil)-gemcitabinas persigrupuoja į N -(4-gemcitabinil)aminorūgšties amidą esant neutralioms ar švelniai bazinėms sąlygoms. Persitvarkymo reakcija vyksta tuomet, kai naudojama aminorūgštis turi pirminę ar antrinę aminogrupę, o esant žemam pH ar tretinei aminogrupei persitvarkymas nevyksta.



12 Schema. N^4 -(α -Aminoacil)citidinių persitvarkymo reakcija.

1.5. Nukleotidų sintezė

Kadangi nukleozidų 5'-trifosfatai (NTP) atlieka itin svarbų vaidmenį įvairiose biologinėse sistemose, šių junginių cheminei sintezei ir jos tobulinimui skiriama daug dėmesio. NTP sintezės metu pradiniais junginiais naudojami nukleozidai arba nukleozidų 5'-monofosfatai ir remiamasi P(III) ar P(V) tarpinių junginių susidarymu. Visais atvejais itin svarbu užtikrinti bevandenę aplinką, tam, kad būtų išvengta pašalinių produktų formavimosi. Net ir praėjus daugeliui metų nuo NTP atradimo, kol kas dar nėra sukurto vieno, universalaus, visiems nukleotidams tinkamo sintezės metodo. Trifosfatus dažnai sunku susintetinti, izoliuoti, charakterizuoti bei laikyti. Daugelyje NTP paruošimo metodų tenka kombinuoti nesuderinamus junginius: joninių krūvį turinčius reagentus (pvz. pirofosfatą) bei lipofilinius substratus (pvz. apsaugines grupes turinčius nukleozidus). Dėl šios priežasties sunku rasti reakcijai tinkamą tirpiklį. Susintetinti nukleozidų trifosfatai nėra itin stabilūs, jų skilimą greitina bazinė bei rūgštinė aplinka. Gryninant junginius iš mišinio, turinčio tiek hidrofilines, tiek hidrofobines priemaišas, reikia išskirti krūvį turintį, vandenyje tirpų junginį. Paprastai susintetinti nukleotidai yra gryninami naudojant jonų mainų (sorbentu naudojant DEAE-Sephadex A25, eliuentu - trietilamonio bikarbonatą ar ličio chloridą) bei atvirkščių fazių (C-18 kolonėlę eliuojant vandens/metanolio mišiniais) chromatografiją.

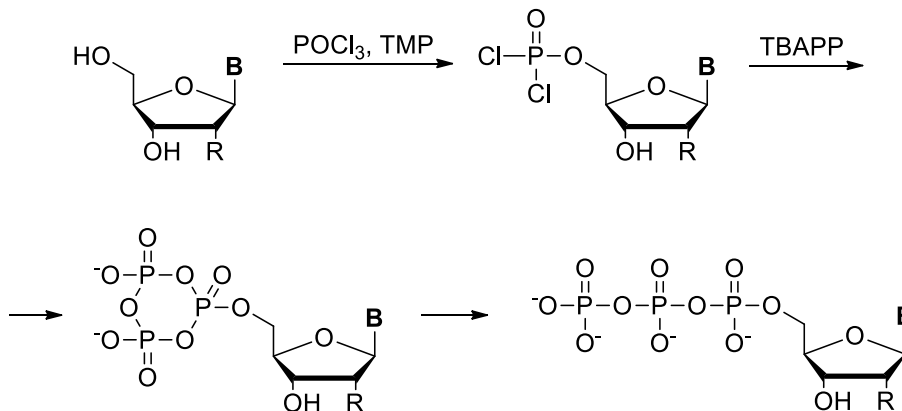
Nukleozidų trifosfatų ^{31}P BMR spektrai atliekami D_2O ir paprastai pasižymi trimis signalais ties -6, -11 ir -22 ppm, kurie atstoja γ , α ir β fosforo atomus, tačiau cheminių poslinkių vertėms įtakos turi terpės pH bei jonai.

Nukleozidų 5'-trifosfatų sintezei dažniausiai naudojami metodai, kurie remiasi fosfordichlorato, fosforamidato ar P(III) – P(V) tarpiniais junginiais.

1.5.1. Sinezė per fosfordichloratinį tarpinį junginį

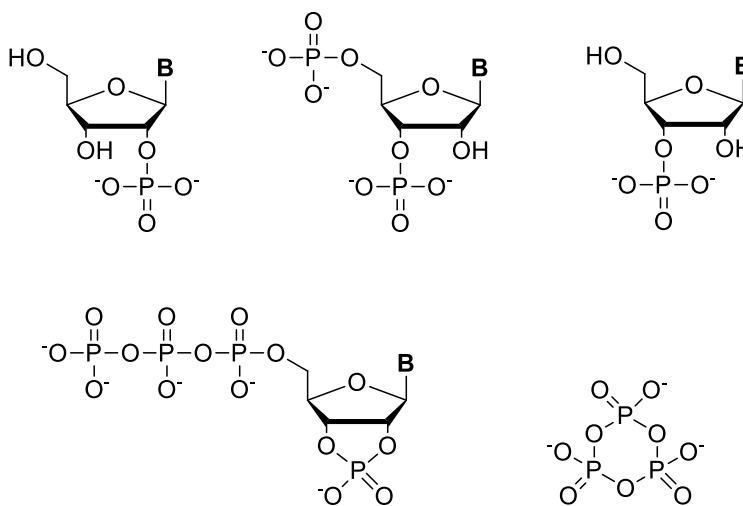
Yoshikawa protokolas⁷⁵ yra vienas iš pirmųjų ir vis dar vienas populiariausių nukleozidų trifosfatų sintezės metodų. Sinezė remiasi selektyvia neapsaugoto nukleozido 5'-monofosforilavimo reakcija trimetilfosfate (TMP) naudojant elektrofilinį fosforilchloridą (POCl_3). Reakcijos metu gaunamas itin reaktyvus fosfordichlorato tarpinis junginys, kuris *in situ*

yra paveikiamas tributilamonio pirofosfatu (TBAPP) sausame dimetilformamide (DMF). Gaunamas ciklinis trifosfatas galiausiai hidrolizuojamas iki norimo junginio.



13 Schema. 5'-Nukleotidų sintezė pagal Yoshikawa protokolą (B – modifikuota arba natūrali nukleobazė; R = H, OH arba modifikacija).

Didžiausias Yoshikawa metodo privalumas – paprastumas. Sintezė nereikalauja nukleozido ribozės hidroksigrupių apsaugojimo, kadangi naudojami trialkilfosfato tirpikliai nukreipia fosforilinimo reakciją vykti ties 5'-OH⁷⁶. Reakcijos vyksta greitai, metodas pritaikomas įvairiems modifikuotiems nukleozidams, turintiems pakaitų bazėje ar cukruje. Sintezės išeigos svyruoja nuo mažos iki vidutinės, priklausomai nuo naudojamo substrato. Tačiau stiprus elektrofilinis fosforo reagentas nėra tinkamas visiems nukleozidams, sintezės metu formuojasi daug pašalinių produktų (14 Schema)⁷⁷.

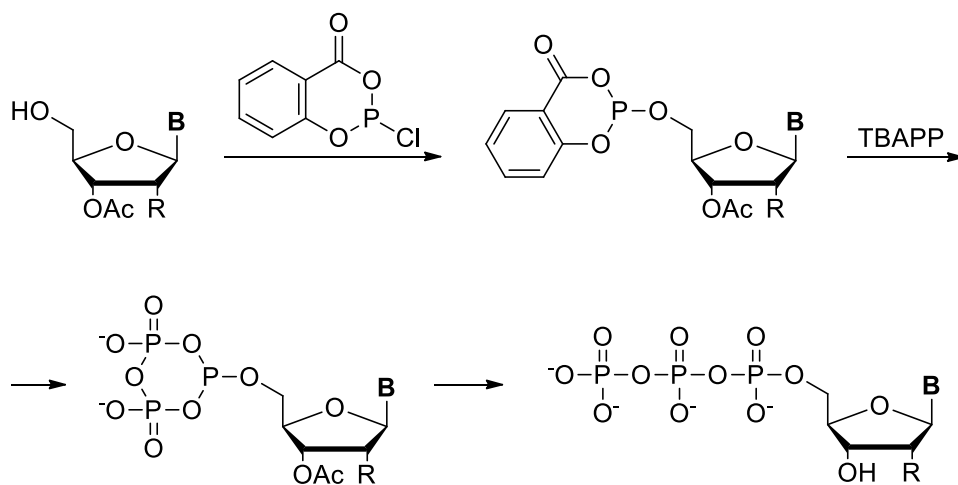


14 Schema. Yoshikawa sintezės metu susidarantys pašaliniai produktai (B – modifikuota arba natūrali nukleobazė).

Nuo sukūrimo metodui pritaikyta keletas pakeitimų. Vienas tokių – protonų kempinės (angl. *proton sponge*) panaudojimas pirmoje sintezės stadijoje padidina fosforilinimo greitį⁷⁸. Taip pat pastebėta, jog antrojoje reakcijos stadijoje naudojant acetonitrilą vietoj DMF išvengiama Vilsmeier-Haack reagento $[(\text{CH}_3)_2\text{NCHClPO}_2\text{Cl}_2]$ formavimosi, kuris susidaro vykstant reakcijai tarp DMF ir nesureagavusio POCl_3 . Vilsmeier kompleksas reaguoja su pirofosfatu bei ribozės 2'- ir 3'-OH grupėmis ir taip mažina galutinę sintezės išeigą⁷⁹. Verta paminėti, jog ribonukleozidų monofosforilinimo reakcijai nėra reikalinga bazė, o naudojant deoksiribonukleozidus kaip substratus, tinkamos bazės pasirinkimas yra itin svarbus⁸⁰.

1.5.2. Sinteze per P(III) – P(V) tarpinius junginius

„Vieno indo, trijų žingsnių“ metodas pagal Ludwig ir Eckstein⁸¹ vis dar yra vienas patikimiausių ir populiariausių modifikuotų nukleozidų trifosfatų sintezės būdų. Šios sintezės metu modifikuotas nukleozidas su apsaugotomis ribozės 2' ir 3'-OH grupėmis tirpinamas piridine ir paveikiamas salicilfosforchloritu (SalPCI), kuris reaguoja su laisva nukleozido ribozės 5'-hidroksilo grupe. Susidaręs aktyvuotas fosfito tarpinis junginys *in situ* paveikiamas TBAPP sausame dimetilformamide, išsiskiria salicilo rūgštis ir susiformuoja tarpinis ciklinis trifosfatas. Gautas trivalentis P_α atomą turintis junginys oksiduojamas jodu, ištirpintu piridine, hidrolizuojamas, susidaro nukleozido 5'-trifosfatas.

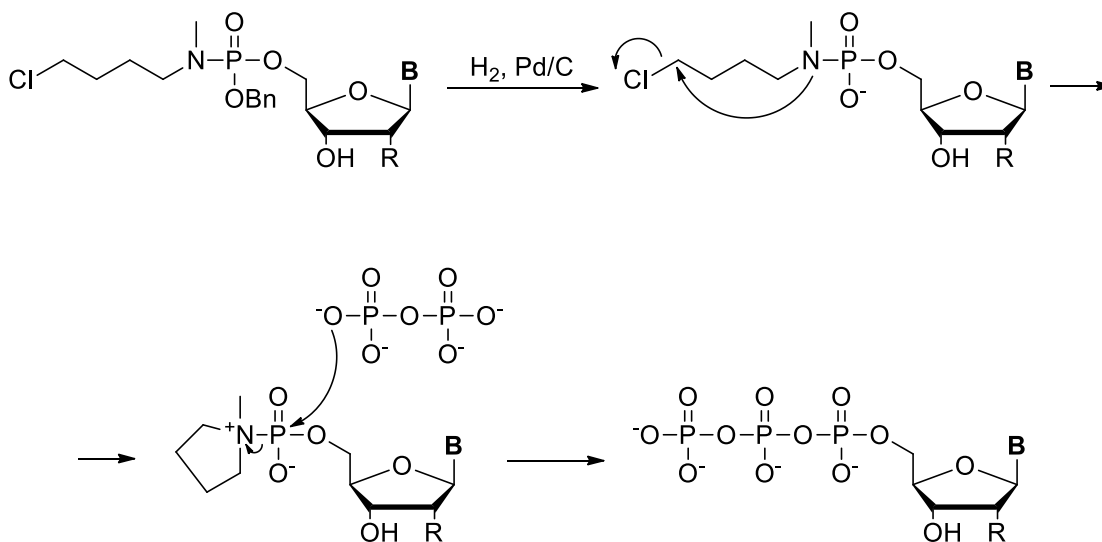


15 Schema. Nukleozidų 5'-trifosfatų sintezė pagal Ludwig-Eckstein (B – modifikuota arba natūrali nukleobazė; R = H, OH, OAc arba modifikacija).

Ludwig-Eckstein metodo metu susidaro mažiau pašalinių produktų nei sintezę atliekant pagal anksčiau aprašytą Yoshikawa protokolą, kas labai palengvina produkto gryninimą. Tačiau šis metodas trunka ilgiau, nes reikalauja nukleozido cukraus OH grupių apsaugojimo, o po sintezės apsaugines grupes reikia pašalinti. Atliekant reakcijas su citozino, guanino ir adenino nukleobazės turinčiais nukleozidais svarbu apsaugoti egzociklines aminogrupes, kad būtų išvengta pašalinių reakcijų⁸¹. Kaip ir Yoshikawa protokolais, Ludwig-Eckstein metodas yra tinkamas nukleozidams, turintiems modifikacijų tiek nukleobazėje, tiek ribozėje^{82,83}.

1.5.3. Sinteze per fosforamidatinį tarpinį junginį

Prieš tai aprašyti Yoshikawa ir Ludwig-Eckstein trifosfatų sintezės metodai turi nemažai trūkumų: mažos reakcijų išeigos, pašalinių produktų formavimasis, modifikuotų nukleozidų funkcinių grupių nesuderinamumas su stipriais elektrofiliniais fosforo reagentais ir t.t. Norint išvengti minėtų bėdų, 2004 m. Borch su kolegomis sukūrė alternatyvų nukleotidų sintezės metodą⁸⁴, kuris remiasi labai reaktyvaus fosforamidatinio cviterjono susidarymu (16 Schema).

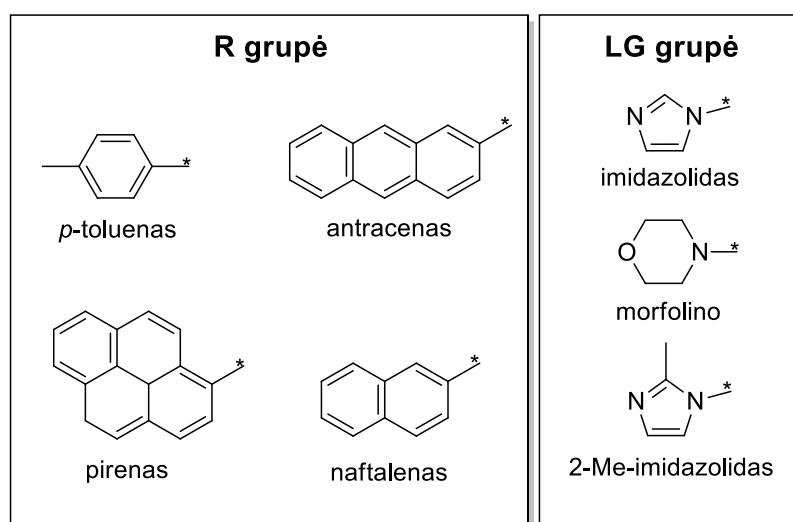
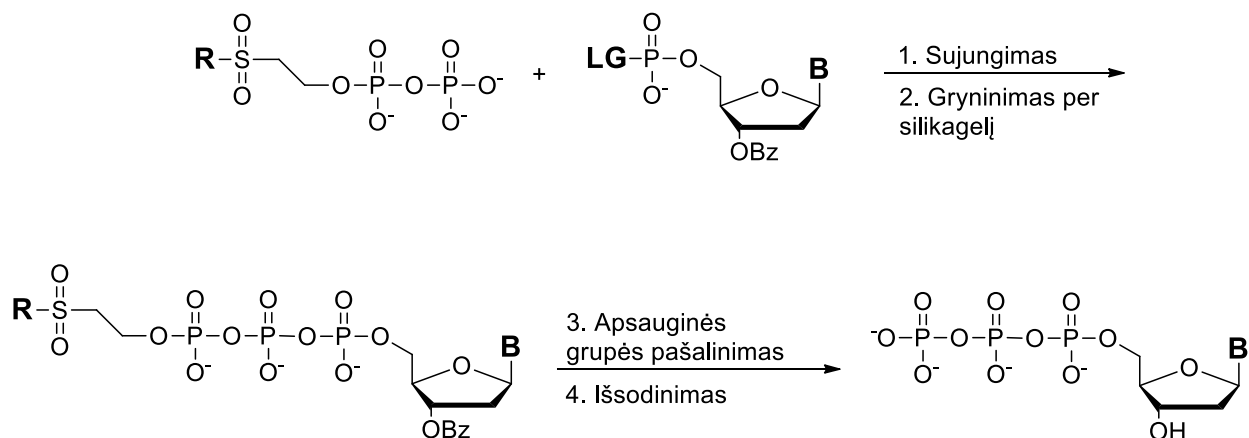


16 Schema. Nukleozidų 5'-trifosfatų sintezė pagal Borch (B – modifikuota arba natūrali nukleobazė; R = H, OH arba modifikacija).

Borch sintezės metu pirmiausia vykdoma pradinio junginio aktyvacija: *O*-benzil apsauginę grupę turintis nukleozidas hidrinamas paladžiu ant aktyvuotos anglies bevandeniame tetrahidrofurane kambario temperatūroje. Pasišalinant apsauginei grupei susiformuoja reaktyvus pirolidinio fosforamidato cviterjonas, kuris yra labai jautrus nukleofilinėms atakoms. Junginys *in situ* paveikiamas TBAPP, susidaro nukleozido trifosfatas. Metodas sėkmingai pritaikytas farneziltransferazės slopiklių⁸⁵ bei fosforamidatinių provaistų⁸⁶ sintezei, tačiau kol kas nėra plačiai naudojamas modifikuotų dNTP sintezei, nes pradinio junginio paruošimas užima nemažai laiko⁸⁶.

1.5.4. Sintezė naudojant organinius pirofosfato reagentus

Ieškant paprastesnių, universalių, daugelio nukleotidų sintezei tinkamų metodų, pritaikomų didesniems sintezės mastams, Jen-Yu Liao su kolegomis sukūrė naują natūralių ir modifikuotų nukleotidų sintezės metodą, kuris yra efektyvus bei nebrangus⁸⁷. Ši nukleotidų sintezė paremta naujai sukurtu P(V) organiniu pirofosfato reagentu, turinčiu per sulfoniletiljungtuką prijungtą didelę hidrofobinę grupę. Toks reagentas skatina P-O ryšio formavimąsi tarp α ir β fosfato pozicijų. Sintzei naudojamas aktyvuotas, stiprią nueinančią grupę turintis, nukleozido 5'-monofosfatas. Bendra sintezės schema pateikiama žemiau. Nukleotidų sintezės metu aktyvuotas nukleozido 5'-monofosfatas yra paveikiamas pirofosfato reagentu. Fosfodiesterinio ryšio formavimąsi skatina Lewis rūgštis - 10 mol. ekv. $ZnCl_2$. Reagentai maišomi dimetilformamide 3 val. kambario temperatūroje. Fosforilavimo reakcijos metu susidaro šiek tiek (1 – 2 %) pašalinių produktų, tarp jų – dinukleotidų difosfatai, kurie pašalinami gryninant junginį per silikagelį, eliuentu naudojant 10 % izopropanolio vandeninį tirpalą, turintį 1 % Hünig bazės. Išgrynintas nukleotidas toliau deblokuojamas – naudojant koncentruotą amonio hidroksidą nuo nukleotido (deoksi)ribozės pašalinama apsauginė grupė. Galiausiai junginys išsodinamas natrio druskos pavidalu naudojant įprastines sąlygas⁸⁸.



17 Schema. Nukleotidų sintezė naudojant organinius pirofosfato reagentus. R – prie pirofosfato per sulfoniletil-jungtuką prijungtas aromatinis pakaitas. LG – nukleozido 5'-monofosfato nueinanti grupė. B – natūrali ar modifikuota nukleobazė.

1.6. DNR polimerazės biotechnologijose

DNR polimerazės yra plačiai aptinkami fermentai, katalizuojantys DNR replikaciją gyvoje ląstelėje. Jų struktūra primena dešiniąją ranką, kurią sudaro delno, nykščio ir pirštų subdomenai. Delno domene, kuris yra homologiškas beveik visose 7 DNR polimerazių šeimose (A, B, C, D, X, Y, RT)⁸⁹, yra aminorūgščių liekanos, atsakingos už katalizę, o nykščio ir pirštų

subdomenai pasižymi labai įvairiomis savybėmis tarp skirtingų DNR polimerazių. Antriniai domenai, kaip 3'-5' egzonukleazinis ar 5'-nukleazinis, suteikia papildomų fermentinių funkcijų.

DNR polimerazės taip pat atlieka labai svarbų vaidmenį molekulinėje biologijoje ir biotechnologijoje. Šių fermentų dėka galimas DNR klonavimas, polimerazinė grandininė reakcija, DNR sekoskaita, vieno nukleotido polimorfizmą (angl. *single nucleotide polymorphism*) aptikimas, viso genomo padauginimas, sintetinė biologija bei molekulinė diagnostika. Visi šie metodai kliaujasi DNR polimerazių gebėjimu dauginti DNR seką ir gauti produktą, kuris yra identiškas pradinei molekulei.

Beveik visos charakterizuotos DNR polimerazės katalizuoja mononukleotidų įjungimą į DNR grandinę, naudodamos DNR matricą, kaip įjungimo gidą, tačiau matricos reikalavimas nėra universalus. Terminalinė deoksinukleotidų transferazė (TdT) pasižymi atsitiktinių nukleotidų įjungimu substratu naudojant tik viengrandę DNR^{90,91}. Šis fermentas geba panaudoti galybę įvairių substratų, kaip 2',3'-dideoksinukleotidai⁹², *p*-nitrofeniletiltrifosfatas⁹³, 2'-deoksi-L-ribonukleozidų 5'-trifosfatai⁹⁴ ir dinukleozidų 5',5'-tetrafosfatai⁹⁵. Dėl substratų, turinčių dideles modifikacijas, toleravimo TdT plačiai naudojama *in vivo* ir *in vitro* dvigrandžių DNR trūkių žymėjimui. Pavyzdžiui TUNEL⁹⁶ (angl. *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*) metodas remiasi TdT gebėjimu prie viengrandės DNR 3'-galų, atsirandančių DNR trūkių vietose, efektyviai įjungti biotinu žymėtą dUMP. Toks žymėtas dUMP nesunkiai vaizdinamas fluorescenciškai žymėtu avidinu ar streptavidinu ir leidžia įvertinti DNR trūkių vietas bei skaičių. Ši technologija naudojama apoptozės aptikimui. TdT taip pat naudojama kaip biokatalizatorius sintetinių oligonukleotidų 3'-galų žymėjimui radioaktyviais ar fluorescenciniais zondais^{97,98}. Tokie pažymėti oligonukleotidai gali būti sulydomi su komplementaria DNR grandine ir panaudoti nukleorūgščių metabolizmo tyrimams.

1.6.1. DNR padauginimas polimerazine grandinine reakcija

Devintajame dešimtmetyje sukurta polimerazinė grandininė reakcija (PGR)⁹⁹ sukėlė revoliuciją biotechnologijų lauke ir iki šiol yra viena iš svarbiausių DNR polimerazių pritaikymo vietų. PGR metu norima DNR seka yra padauginama eksponentiškai iš keleto ar net vienos unikalios matricos kopijos. Reakcija reikalauja specifinių trumpų DNR pradmenų, kurie yra

komplementarūs taikinio DNR riboms. Standartinei PGR pritaikius įvairius pakeitimus, sukurta daugybė skirtingiems tikslams tinkamų procedūrų: aukšto našumo (angl. *high-fidelity*) PGR, lizdinė (angl. *nested*) PGR, dauginė (angl. *multiplexed*) PGR, kiekybinė (angl. *quantitative*) PGR, atvirkštinės transkripcijos (angl. *reverse-transcription*) PGR, viso genomo padauginimas ir t.t. Reakcija dažnai sekama realiu laiku, naudojant dgDNR jautrius dažus¹⁰⁰ ar FRET zondus¹⁰¹ ir matuojant fluorescencijos intensyvumą kiekvieno ciklo metu. Padaugintos DNR kiekis proporcingas fluorescencijos intensyvumui, tad nebebūtina atlikti daug laiko užimančios agarozės gelio elektroforezės.

Skirtingi metodai reikalauja skirtingų DNR polimerazių savybių. Pavyzdžiui, patogenų aptikimui kiekybinės PGR (kPGR) metu yra svarbus didelis PGR selektyvumas ir jautrumas, o PGR, atliekama klonavimo tikslais, reikalauja didelio replikacijos tikslumo ir patenkinamos padauginimo išeiigos. Polimerazinėse grandininėse reakcijose naudojamos termostabilios DNR polimerazės: A šeimos polimerazės iš termofilinių bakterijų bei B šeimos polimerazės iš hipotermofilinių archėjų. A šeimai priklausanti Taq DNR polimerazė pasižymi aukštu PGR našumu ir dėl savo 5'-nukleazinio aktyvumo gali būti naudojama kPGR, naudojant fluorescenciškai pažymėtus hidrolizės zondus. B šeimos polimerazės, kaip pvz. Pfu, KOD ar Tgo, pasižymi puikiu termostabilumu ir aukštu našumu, kuriuos lemia šių polimerazių 3'-5'-egzonukleaziniai domenai, tačiau prailginimas vyksta lėtai.

Polimerazinėms grandininėse reakcijose efektyvumas gali būti pagerinamas modifikuojant DNR polimerazes. Prie DNR polimerazių prisegami DNR prisijungiantys domenai, kaip tioredoksiną prisijungiantis domenas¹⁰² ar spiralė-plaukų segtukas-spiralė (angl. *helix-hairpin-helix*) domenai¹⁰³. Prie Taq ir Pfu DNR polimerazių prijungus termostabilų SSo7d baltymą¹⁰⁴ buvo sukurta komercinė Phusion™ polimerazė. Dėl prasto DNR polimerazės selektyvumo gali būti padauginami netinkamai suporuoti pradmenys. Tai dažnai vyksta esant žemesnėms temperatūroms, tad DNR polimerazės modifikacija, blokuojanti polimerazės aktyvumą žemoje temperatūroje, pagerina PGR rezultatus. Šiuo metu naudojamas keletas „karšto-starto“ (angl. *“hot-start”*) metodų, padedančių išvengti nespecifinių reakcijų. Vienas tokių, Mg²⁺ jonų, kurie yra būtini fermentiniam aktyvumui, pridėjimas tik po pirmojo pašildymo ciklo. Tai galima atlikti rankiniu būdu arba naudojant magnio jonus, esančius karščiui neatspariame junginyje (pvz. amonio magnio fosfate)¹⁰⁵. Naudojant šį metodą, Mg²⁺ jonai tampa pasiekiamais tik reakcijos mišiniui pasiekus aukštą temperatūrą. Taip pat naudojami ir chemiškai užblokuoti pradmenys,

turintys vieną ar du termolabilius 4-okso-1-pentil-fosfotriesterius¹⁰⁶ 3'-galuose, neleidžiančius prailginti pradmenų esant kambario temperatūrai.

1.6.2. Izoterminis DNR padauginimas

DNR padauginimas esant izoterminėms sąlygoms yra PGR alternatyva, pritaikoma diagnostikai. Šis metodas nereikalauja termociklerio, yra pigus, paprastas naudoti ir geriau nei PGR toleruoja neišgrynintuose mėginiuose esančius slopiklius bei pasižymi tokiu pačiu ar net aukštesniu jautrumu ir patikimumu klinikinėje diagnostikoje^{107,108}. Dauguma izoterminio padauginimo metodų naudoja DNR polimerazes, replikacijos metu gebančias išstumti DNR grandinę, esančią pasroviui (angl. *downstream*), taip pašalinant poreikį terminei denatūracijai. Tokioms polimerazėms priklauso A šeimos Bst DNR polimerazė, pritaikoma kilpos-medijuojamai (angl. *loop-mediated*) izoterminei amplifikacijai (LAMP)¹⁰⁹ bei B šeimos ϕ 29 DNR polimerazei, kuri pasitelkiama dauginio pakeitimo (angl. *multiple displacement*)¹¹⁰ bei riedančio rato (angl. *rolling circle*) padauginime¹¹¹.

1.6.3. Sekoskaitos technologijos

DNR polimerazės jau daugybę metų naudojamos DNR sekoskaitos technologijose. DNR seka, naudojant fermentinius metodus, pirmą kartą nustatyta 1977 metais Sanger ir Coulson¹¹². *E. coli* DNR pol I Klenow fragmentas panaudotas pradmens prailginimo reakcijose su grandinės terminatoriais dideoksinukleotidais (ddNTP). Reakcijų metu gauti įvairaus ilgio DNR fragmentai frakcionuoti poliakrilamidinio gelio elektroforeze, juos atskiriant vienos bazės tikslumu ir taip nustatant visos DNR grandinės seką. Metodas patobulintas pradėjus naudoti Sekvenazę 2.0 – bakteriofago T7 DNR polimerazę su pašalintu egzozonukleaziniu aktyvumu, kuri ddNTP jungia beveik taip pat efektyviai kaip ir natūralius dNTP¹¹³. Fluorescencinius dažus turinčių grandinės terminatorių sukūrimas ir kapiliarinės elektroforezės panaudojimas supaprastino Sanger sekoskaitos procedūrą^{114,115}.

Grįžtami grandinės terminatoriai¹¹⁶, turintys pašalinamas chemines modifikacijas ties 3'-OH bei prie bazių prijungtus pašalinamus fluoroforus, stipriai pastūmėjo sekoskaitos technologiją į priekį ir padėjo sukurti naujos kartos sekoskaitos (NKS) metodus, pasižyminčius didesniu našumu ir greičiu. Viena tokių - Illumina technologija¹¹⁷, naudojanti fluorescencinius grįžtamus terminuojančius deoksiribonukleotidus. Metode naudojami trifosfatai turi 3'-O-azidometileno grupes, sustabdančias DNR sintezę po kiekvieno nukleotido įjungimo. Kad būtų įmanoma atskirti vieną nuo kito, visi keturi nukleotidai yra papildomai pažymimi pašalinamais fluoroforais. Nuskaičius įjungtą nukleotidą, 3'-O-azidometileno grupė bei fluoroforas chemiškai pašalinami ir atkūrus ribozės 3'-OH grupę vykdomi tolimesni nukleotidų įjungimai. Technologija naudoja modifikuotą 9°N DNR polimerazę, gebančią į DNR grandinę įjungti stipriai modifikuotos substratus¹¹⁸. Kitos NKS technologijos, kaip Ion Torrent ir 454 sekoskaita, naudoja natūralius dNTP substratus ir Bst DNR polimerazę, kuri pasižymi grandinės išstūmimu ir yra mažiau paveikiama antrinės DNR struktūros^{119,120}.

Trečiosios kartos sekoskaitos technologijos įgalina nuskaityti vienos DNR molekulės seką realiu laiku. Pacific Biosciences sukurtoje SMRT sekoskaitos technologijoje naudojami žymėtą terminalinį fosfatą turintys polifosfatai, kuriuos į DNR grandinę įjungia egzozonukleazinio aktyvumo neturinti φ29 DNR polimerazė¹²¹. Šios polimerazės variantas taip pat naudojamas ir nanoporų sekoskaitos technologijose¹²².

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

^1H ir ^{13}C BMR spektrai užrašyti Bruker Ascend 400 spektrometru. 400 MHz dažnis ^1H BMR, 100 MHz dažnis ^{13}C BMR. Cheminių poslinkių reikšmės pateiktos skalėje m. d. Medžiagų pavyzdžiai ruošti juos tirpinant D_2O arba DMSO-d_6 . ^1H BMR spektrų aprašymuose naudojami šie sutrumpinimai: s – singletas, d – dubletas, t – tripletas, q – kvartetas, p – kvintetas, dd – dubleto dubletas, ddq – dubleto dubleto kvartetas, td – tripleto dubletas, m – multiplietas.

Reakcijų eiga ir medžiagų grynumas buvo sekami plonasluoksne chromatografine (TLC) analize, naudojant aliuminio plokšteles, padengtas silikageliu (60 F₂₅₄ (Merck)). TLC mobilios fazės - CHCl_3 bei CHCl_3 ir MeOH mišinys (tūriniu santykiu 9:1 bei 5:1). Gryninant susintetintus produktus kolonėlinės chromatografijos būdu naudota silikageliu 60 (0,063-0,2 mm) (Merck) užpildoma kolonėlė. Eliuentai – CHCl_3 ir CHCl_3 bei MeOH mišiniai įvairiais tūriniais santykiais.

Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS) buvo atlikta naudojant sistemą, sudarytą iš CBM-20A valdymo bloko, dviejų LC-2020AD siurblių, SIL-30AC automatinių bandinių ėmiklio ir CTO-20AC kolonų termostato, naudojant SPD-M20A fotodiodų gardelės detektorius ir LCMS-2020 masių spektrometrą su ESI šaltiniu. Chromatografinis frakcionavimas atliktas naudojant YMC – Pack Pro C18, 150×3 mm kolonėlę, esant 40 °C temperatūrai, vandeninio 0,1 % skruzdžių rūgšties tirpalo ir acetonitrilo gradientu. Masių spektrai buvo užrašyti nuo 10 m/z iki 500 m/z, esant 350 °C temperatūrai ir ±4500 V įtampai (neutrali DL/Qarray įtampa), naudojant N_2 kaip purškiamąsias ir džiovinamąsias dujas. Masių spektrometrijos analizė buvo atlikta taikant tiek teigiamos, tiek neigiamos jonizacijos režimą. Duomenys analizuoti naudojant LabSolutions LC/MS programinę įrangą.

Susintetinti nukleotidai gryninti jonų mainų chromatografijos būdu, į sistemą sujungiant UV detektorius, saviraštį ir peristaltinį siurbį. Naudota XK-26 kolonėlė, pripildyta DEAE Sephadex A-25 sorbentu. Medžiagos eliuotos įvairių koncentracijų LiCl (0,1; 0,25; 0,5 M) vandeniniais tirpalais.

Atvirkščių fazių chromatografija atlikta, naudojant sistemą sudarytą iš 4 arba 12 g GRACE C18 kolonėlės, UV detektoriaus, saviraščio bei peristaltinio siurblio. Sistemos eliuentu naudotas vandens ir metanolio mišinio gradientas.

Susintetintų junginių kiekiams tirpale įvertinti ir molinių sugerties koeficientų apskaičiavimui atlikta tirpalų spektrofotometrinė analizė, naudojantis PerkinElmer Lambda 25 spektrofotometru bei 1 cm ilgio kiuvetes.

DNR biosintezės produktų elektroforezei naudoti: elektroforezės aparatas „BIO-RAD Protean™ II“ ir jo priedai, fotovaizdintuvas „FUJIFILM FLA-5100“ ir jo priedai, ekranas „FUJIFILM BAS GAUGE 2040“.

Visi darbams naudoti reagentai pirkti Merck, Sigma-Aldrich, Honeywell, Thermo Scientific arba susintetinti laboratorijoje.

Dėl paprastumo darbe pateikiami trivialūs, ne pagal IUPAC nomenklatūrą sudaryti, susintetintų junginių pavadinimai.

2.1. N⁴-Acil-Boc-2'-deoksicitidinių sintezė

Atitinkama aminorūgštis ištirpinama 24 ml 1:1 1,4-dioksano ir vandens mišinyje. Reakcijos mišinys dedamas ant magnetinės maišyklės, lėtai supilama 2 mol. ekv. NaOH (1 N) ir maišoma. Aminorūgščiai pilnai ištirpus reakcijos mišinys atvėsinaamas ledo vonelėje, įdedama 1,5 mol. ekv. di-*tert*-butildikarbonato (Boc₂O) ir maišoma 3 val. Reakcijoms naudotos aminorūgštys ir jų kiekiai pateikiami 1-oje lentelėje.

1 Lentelė. N⁴-Acil-Boc-2'-deoksicitidinių sintezei naudotos aminorūgštys ir jų kiekiai.

Nr.	Aminorūgštis	m, mg	n, mmol
1	Glicinas	500	6,66
2	L-Tirozinas	1207	6,66
3	L-Metioninas	994	6,66

Reakcijos mišinys nugarinamas vakuuminiu rotaciniu garintuvu iki kelių ml tūrio, parūgštinamas 10 % vandeniniu citrinos rūgšties tirpalu iki pH = 2,0 ir ekstrahuojamas su 150 ml, 50 ml, 50 ml ir 40 ml etilacetato. Surinktos etilacetato frakcijos sujungiamos, džiovinamos Na₂SO₄, filtruojamos ir nugarinamos rotaciniu garintuvu iki sausumo. Gauta *tert*-butiloksikarbonil (Boc) apsaugine grupe blokuota aminorūgštis tirpinama 30 ml etilacetato,

dedama ant magnetinės maišyklės, beriama 1,5 mol. ekv. *N*-hidroksisukcinimido (NHS) ir 1,5 mol. ekv. dicikloheksilkarbodiimido (DCC), maišoma kambario temperatūroje 1 parą. Susidariusios baltos nuosėdos nufiltruojamos, etilacetatas nugarinamas. Likusi Boc apsaugine grupe blokuota aktyvuota aminorūgštis tirpinama 8 ml dimetilformamido (DMF), beriama 1 mol. ekv. 2'-deoksicitidino ir maišoma kambario temperatūroje 5 paras. Reakcijai įvykus DMF nugarinamas rotaciniu garintuvu, produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu, užpildant kolonėlę 25 ml silikagelio, suspenduoto chloroforme. Gryninti pradeda chloroformu, po to – chloroformo ir metanolio mišiniais, palaipsniui didinant metanolio koncentraciją iki 15 %. Surinktos frakcijos su produktu nugarinamos vakuuminio rotaciniu garintuvu. Produktai (1 – 3) išskirti 34 – 53 % išeigomis. Cheminių reakcijų eiga ir chromatografinis atskyrimas stebėti plonasluoksne chromatografine (TLC) analize. Eliuentu naudotas chloroformo ir metanolio mišinys santykiu 5:1. Junginių struktūros patvirtintos atlikus BMR spektroskopinę ir HPLC-MS analizes. Išmatavus žinomų koncentracijų tirpalų UV sugertis apskaičiuoti junginių moliniai sugerties koeficientai.

***N*⁴-Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidinas (1)**

Gauta 1,361 g baltų kristalų (*M*= 384 g/mol), išeiga 53 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 385 [M+H]⁺, 383 [M-H]⁻. UV λ_{max} 246; 299 nm.

ε₂₄₆=15600 M⁻¹cm⁻¹, ε₂₉₉=7800 M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-*d*₆): δ = 1,39 (s, 9H, 3 CH₃); 1,98-2,08 (m, 1H, CH);

2,25-2,38 (m, 1H, CH); 3,54-3,70 (m, 2H, CH₂); 3,79 (d, 2H, *J*=6,1

Hz, CH₂); 3,87 (q, 1H, *J*=3,7 Hz, CH); 4,22 (dt, 1H, *J*=7,6 Hz; 3,8 Hz,

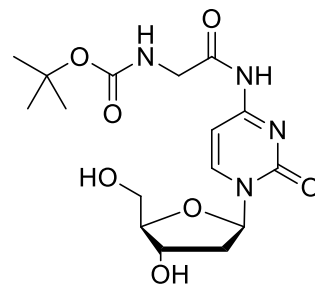
CH); 5,06 (t, 1H, *J*=5,2 Hz, OH); 5,28 (d, 1H, *J*=4,2 Hz, OH); 6,11 (t, 1H, *J*=6,3 Hz, CH); 7,09

(t, 1H, *J*=6,1 Hz, NH); 7,17 (d, 1H, *J*=7,4 Hz, CH); 8,35 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, CH); 10,87 (s, 1H,

NH).

¹³C BMR (DMSO-*d*₆): δ = 25,69; 28,63; 41,36; 44,60; 61,41; 70,36; 78,67; 79,64; 86,67; 88,39;

95,65; 154,86; 156,35.



***N*⁴-Tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidinas (2)**

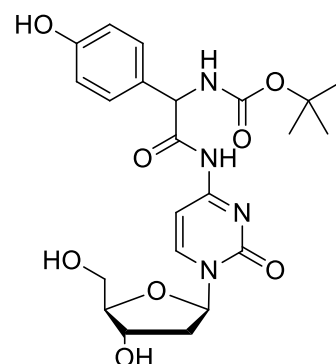
Gauta 1,715 g baltų kristalų (M= 490 g/mol), išeiga 53 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 491 [M+H]⁺, 489 [M-H]⁻. UV λ_{max} 248; 300 nm.

ε₂₄₈= 19300 M⁻¹cm⁻¹, ε₃₀₀=9700 M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,32 (s, 9H, 3 CH₃); 1,98-2,09 (m, 1H, CH); 2,22-2,35 (m, 1H, CH); 1,94 -2,16 (m, 2H, CH₂); 2,57-2,69 (m, 1H, CH); 2,78-2,92 (m, 1H, CH); 3,52-3,68 (m, 2H, CH₂); 3,87 (q, 1H, *J*=3,9 Hz, CH); 4,17-4,26 (m, 1H, CH); 4,26-4,38 (m, 1H, CH); 5,06 (t, 1H, *J*=5,3 Hz, OH); 5,28 (d, 1H, *J*=4,3 Hz, OH); 6,12 (t, 1H, *J*=6,3 Hz, CH); 6,65 (d, 1H, *J*=7,4 Hz, CH); 6,97-7,35 (m, 4H, 4 CH); 8,36 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, CH); 9,2 (s, 1H, NH); 11,09 (s, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 24,81; 28,60; 57,69; 61,40; 70,37; 78,72; 86,73; 88,41; 95,74; 115,28; 128,06; 130,74; 145,68; 154,87; 156,33; 162,74; 174,25.



***N*⁴-Metioninoil-Boc-2'-deoksicitidinas (3)**

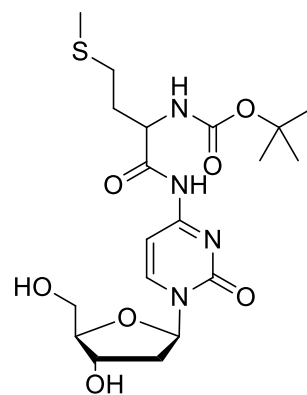
Gauta 1,025 g baltų kristalų (M= 458 g/mol), išeiga 34 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 459 [M+H]⁺, 457 [M-H]⁻. UV λ_{max} 246; 299 nm.

ε₂₄₆=15100 M⁻¹cm⁻¹, ε₂₉₉=8100 M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,30 (t, 2H, *J*=5,4 Hz, CH₂); 1,38 (s, 9H, 3 CH₃); 1,96-2,17 (m, 5H, CH₂ ir CH₃); 2,25-2,38 (m, 2H, CH₂); 2,60 (s, 1H, CH); 3,51-3,68 (m, 2H, CH₂); 3,87 (q, 1H, *J*=3,8 Hz, CH); 4,21 (ddq, 2H, *J*=12,7 Hz, 8,8 Hz, 4,2 Hz, CH₂); 5,06 (t, 1H, *J*=5,2 Hz, OH); 5,28 (d, 1H, *J*=4,3 Hz, OH); 6,11 (t, 1H, *J*=6,2 Hz, CH); 7,20 (d, 1H, *J*=7,4 Hz, CH); 7,25 (d, 1H, *J*=7,7 Hz, NH); 8,36 (d, 1H, *J*=7,4 Hz, CH); 10,95 (s, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 15,02; 25,70; 28,63; 30,25; 55,27; 61,38; 70,34; 78,84; 86,72; 88,41; 95,71; 145,69; 154,85; 156,03; 162,70; 173,23; 173,92.



2.2. *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))acilamidų sintezė

Atitinkamas *N*⁴-acil-Boc-2'-deoksicitidinas tirpinamas 10 ml vandens, dedamas į glicerolio vonelę ir virinamas 50 min. Reakcijoms panaudoti modifikuoti 2'-deoksicitidinių nukleozidai ir jų kiekiai pateikti 2-oje lentelėje.

2 Lentelė. *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))acilamidų sintezei naudoti junginiai ir jų kiekiai.

*Junginys 4 - *N*⁴-fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidinas - susintetintas kolegos T. Varno, remiantis aukščiau aprašyta metodika.

Nr.	Junginys	m, mg	n, mmol
5	<i>N</i> ⁴ -Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidinas	500	1,3
6	<i>N</i> ⁴ -Tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidinas	500	1,0
7	<i>N</i> ⁴ -Metioninoil-Boc-2'-deoksicitidinas	500	1,1
8	<i>N</i> ⁴ -Fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidinas*	515	1,1

Deblokavimo reakcijai įvykus, reakcijos mišinys nugarinamas vakuuminiu rotaciniu garintuvu iki 2 ml tūrio ir gryninamas atvirkščių fazių chromatografijos būdu, naudojant C18 kolonėlę. Gryninti pradama vandeniu, po to – vandens ir metanolio mišiniais, palaipsniui keliant metanolio koncentraciją iki 20 %. Surinktos frakcijos su produktu nugarinamos rotaciniu garintuvu. Produktai (5 – 8) išskirti 23 – 51 % išeigomis. Reakcijos eiga ir chromatografinis atskyrimas stebėti TLC analize. Eliuentu naudotas 1,4-dioksano, izopropanolio, vandens ir amonio hidroksido mišinys santykiu 4:2:2:1. Junginių struktūros patvirtintos atlikus BMR spektroskopinę ir HPLC-MS analizes. Išmatavus žinomų koncentracijų tirpalų UV sugertis apskaičiuoti junginių moliniai sugerties koeficientai.

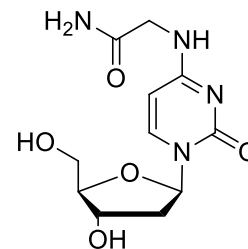
***N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))glicinamidas (5)**

Gauta 176 mg baltų kristalų (M= 284 g/mol), išeiga 48 %.

MS (ESI⁺): m/z 285 [M+H]⁺, 283 [M-H]⁻. UV λ_{\max} 273 nm. $\epsilon_{273}=11100$ M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,88-1,98 (m, 1H, CH₂); 2,05-2,13 (m, 1H, CH₂); 3,49-3,60 (m, 2H, CH₂); 3,70-3,79 (m, 1H, CH); 3,80-3,92 (m, 1H, CH₂); 4,04-4,17 (m, 1H, CH₂); 4,11-4,26 (m, 1H, CH); 4,87-4,99 (m, 1H, OH); 5,20 (d, $J=4,1$ Hz, 1H, OH); 5,90 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, CH=CH); 6,16 (t, $J=6,7$ Hz, 1H, CH); 7,07 (s, 1H, NH₂); 7,43 (s, 1H, NH₂); 7,74-7,89 (m, 1H, CH=CH); 7,83-7,95 (m, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 43,20; 49,06; 61,83; 70,87; 85,34; 87,66; 95,24; 140,42; 155,49; 163,90; 171,12.



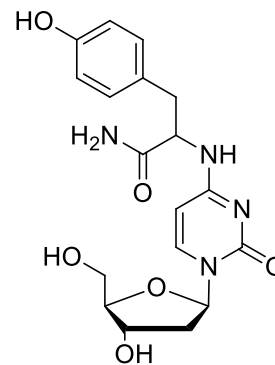
***N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))tirozinamidas (6)**

Gauta 183 mg baltų kristalų (M= 390 g/mol), išeiga 46 %.

MS (ESI⁺): m/z 391 [M+H]⁺, 389 [M-H]⁻. UV λ_{\max} 276 nm. $\epsilon_{276}=13500$ M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,88-1,96 (m, 1H, CH); 2,06-2,12 (m, 1H, CH); 2,51 (dt, 2H, $J=3,5$ Hz, 1,7 Hz, CH₂); 2,72 (dd, 1H, $J=13,8$ Hz, 9,5 Hz, CH); 2,95 (dd, 1H, $J=13,9$ Hz, 4,5 Hz, CH); 3,54 (dd, 2H, $J=10,0$ Hz, 4,7 Hz, CH₂); 3,75 (dd, 1H, $J=6,9$ Hz, 3,7 Hz, CH); 4,19 (dt, 1H, $J=6,0$ Hz, 3,1 Hz, OH); 4,57-4,72 (m, 1H, OH); 5,86 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, OH); 6,12 (t, 1H, $J=6,6$ Hz, CH); 6,64 (s, 2H, NH₂); 7,05 (d, 4H, $J=8,6$ Hz, 4 CH); 7,55 (s, 1H, NH); 7,73 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, CH); 7,81 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, CH).

¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 37,36; 40,78; 41,35; 55,27; 61,42; 61,82; 70,41; 70,85; 85,35; 86,62; 87,65; 88,37; 95,27; 95,69; 115,33; 128,49; 130,48; 140,38; 145,46; 155,34; 156,23; 163,61; 173,62.



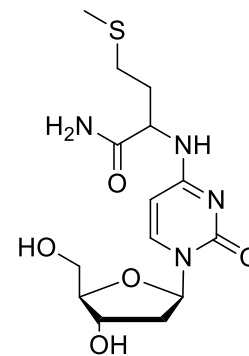
N*-**(4-(2'-Deoksicitidinil))metioninamidas (7)*

Gauta 210 mg baltų kristalų ($M = 358$ g/mol), išeiga 51 %.

MS (ESI⁺): m/z 359 [M+H]⁺, 357 [M-H]⁻. UV λ_{\max} 273 nm. $\epsilon_{273} = 11600$ M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆): $\delta = 1,79$ - $1,90$ (m, 1H, CH); $1,90$ - $2,03$ (m, 1H, CH); $2,05$ (s, 3H, CH₃); $2,43$ - $2,50$ (m, 1H, CH); $2,50$ - $2,55$ (m, 4H, 2 CH₂); $3,55$ (q, 2H, $J = 5,3$ Hz, CH₂); $3,77$ (q, 1H, $J = 3,7$ Hz, CH); $4,20$ (dq, 1H, $J = 6,7$ Hz, $3,3$ Hz, CH); $4,55$ (td, 1H, $J = 8,4$ Hz, $4,8$ Hz, OH); $5,00$ (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, OH); $5,22$ (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, CH); $5,90$ (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, CH); $6,15$ (t, 1H, $J = 6,7$ Hz, CH); $7,08$ (s, 1H, NH); $7,51$ (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, CH); $7,81$ (s, 2H, NH₂).

¹³C BMR (DMSO-d₆): $\delta = 15,09$; $30,10$; $32,38$; $40,80$; $52,87$; $61,83$; $70,87$; $85,37$; $87,67$; $95,31$; $140,50$; $155,38$; $163,73$; $173,56$.



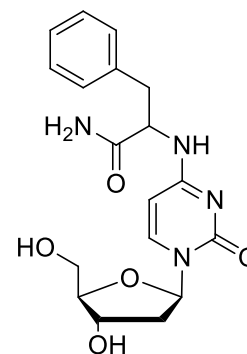
N*-**(4-(2'-Deoksicitidinil))fenilalaninamidas (8)*

Gauta 90 mg baltų kristalų ($M = 374$ g/mol), išeiga 23 %.

MS (ESI⁺): m/z 375 [M+H]⁺, 373 [M-H]⁻. UV λ_{\max} 276 nm. $\epsilon_{276} = 10900$ M⁻¹cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆): $\delta = 1,86$ - $1,97$ (m, 1H, CH); $2,05$ - $2,13$ (m, 1H, CH); $2,83$ (dd, $J = 9,7$ Hz, $13,8$ Hz, 1H, CH); $3,08$ (dd, $J = 13,8$ Hz, $4,3$ Hz, 1H, CH); $3,51$ (td, $J = 12,0$ Hz, $6,2$ Hz, 2H, CH₂); $3,72$ (dd, $J = 6,6$ Hz, $3,4$ Hz, 1H, CH); $4,13$ - $4,29$ (m, 1H, CH); $4,74$ (td, $J = 9,2$ Hz, $4,4$ Hz, 1H, CH); $5,01$ (s, 1H, OH); $5,25$ (s, 1H, OH); $5,89$ (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, CH); $6,13$ (dd, $J = 12,9$ Hz, $6,0$ Hz, 1H, CH); $7,14$ (s, 1H, NH); $7,29$ (dd, $J = 7,6$ Hz, $5,9$ Hz, 5 CH); $7,61$ (s, 1H, NH); $7,76$ (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, CH); $7,93$ (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆): $\delta = 38,12$; $40,51$; $54,94$; $61,83$; $70,79$; $85,28$; $87,64$; $95,30$; $126,74$; $128,51$; $129,63$; $138,50$; $140,47$; $155,32$; $163,66$; $173,54$.



2.3. *N*⁴-Aminorūgštims modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintezė

Atitinkamas aminorūgštimi modifikuotas 2'-deoksicitidino nukleozidas (1 - 8) 5 kartus nugarinamas vakuuminiu rotaciniu garintuvu su acetonitrilu. Sintzei naudoti modifikuoti nukleozidai pateikiami 3-ioje lentelėje.

3 Lentelė. *N*⁴-Modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintzei naudoti junginiai ir jų kiekiai.

*Junginys 4 - *N*⁴-fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidinas - susintetintas kolegos T. Varno, remiantis aukščiau aprašyta metodika.

Nr.	Junginys	m, mg	n, mmol
9	<i>N</i> ⁴ -Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidinas	145	0,38
10	<i>N</i> ⁴ -Tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidinas	126	0,26
11	<i>N</i> ⁴ -Metioninoil-Boc-2'-deoksicitidinas	143	0,31
12	<i>N</i> ⁴ -Fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidinas*	121	0,26
13	<i>N</i> -(4-(2'-Deoksicitidinil))glicinamidas	90	0,32
14	<i>N</i> -(4-(2'-Deoksicitidinil))tirozinamidas	100	0,26
15	<i>N</i> -(4-(2'-Deoksicitidinil))metioninamidas	110	0,31
16	<i>N</i> -(4-(2'-Deoksicitidinil))fenilalaninamidas	90	0,24

Į kolbą su nukleozidu pilama 1,5 ml trimetilfosfato (TMP), 6 mol. ekv. tributilamino (TBA). Kolba laikoma -20 °C temperatūroje 30 min. Kolbutė dedama ant magnetinės maišyklės, pridedama 3 mol. ekv. fosforilchlorido (POCl₃) ir maišoma 30 min. Į reakcijos mišinį pilama 7,5 mol. ekv. tributilamonio pirofosfato (TBAPP) (0,5 M acetonitrile), maišoma 10 min. Reakcija stabdoma į kolbą pridedant sotaus NaHCO₃ vandeninio tirpalo. NaHCO₃ pilama tiek, kad pH pasiektų 7. Reakcijos mišinys maišomas 1 val. laiko. Susidaręs produktas gryninamas jonų mainų chromatografijos būdu, užpildant kolonėlę DEAE Sephadex A-25 sorbento, suspenduoto 0,05 M LiCl vandeniniame tirpale. Gryninti pradeda 0,05 M vandeniniu LiCl tirpalu, palaipsniui keliant LiCl koncentraciją iki 0,3 M. Surinktos frakcijos nugarinamos rotaciniu garintuvu iki minimalaus tūrio, kuriame dar nesikristalina mišinyje esantis LiCl. Į mėgintuvėlį su 35 ml atšaldyto acetono ir metanolio mišinio, santykiu 4:1, supilamas reakcijos mišinys. Tirpalas centrifuguojamas 10 min 10 °C temperatūroje ties 3500 rpm. Supernatantas nupilamas, nuosėdos

suspenduojamos 15 ml 4:1 acetono ir metanolio mišinyje ir dar kartą centrifuguojamos. Supernatantas nupilamas, nuosėdos tirpinamos 10 ml vandens. Reakcijos mišinys nugarinamas rotaciniu garintuvu iki 2 ml tūrio ir gryninamas atvirkščių fazių chromatografijos būdu, naudojant C18 kolonėlę. Gryninti pradeda vandeniu, po to – vandens ir metanolio mišiniais, palaipsniui keliant metanolio koncentraciją iki 20 %. Surinktos frakcijos su produktu nugarinamos rotaciniu garintuvu iki sausumo. Produktas tirpinamas 700 µl deuterio vandens, pagal nukleozido molinį sugerties koeficientą spektroskopiškai nustatoma susintetinto produkto koncentracija. Produktai (9 – 16) išskirti 4 – 25 % išeigomis. Reakcijų eiga ir chromatografinis atskyrimas stebėti TLC analize. Eliuents naudoti šie tirpalai: 1,4-dioksano, izopropanolio, vandens ir amonio hidroksido mišiniai santykiais 4:2:2:1 bei 4:2:4:1. Junginių struktūros patvirtintos atlikus BMR spektroskopinę ir HPLC-MS analizes. Dėl to, jog tirpikliu naudotas deuterio vanduo, uždengiantis dalį ^1H BMR spektro signalų, darbe pateikiami tik ^{31}P BMR spektrai. Susintetintų trifosfatų ^1H ir ^{13}C BMR spektrai sutampa su pradiniais junginiais naudotų nukleozidų spektrais.

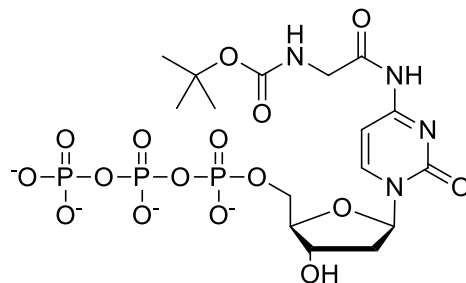
***N*⁴-Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas (9)**

Gauta 36 mg junginio ($M = 624$ g/mol), išeiga 16 %.

MS (ESI⁺): m/z 625 [M+H]⁺, 623 [M-H]⁻. UV λ_{max} 246;

299 nm. $\epsilon_{246} = 15600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{299} = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

^{31}P BMR (D₂O): $\delta = -22,29$ (t, $J = 18,7$ Hz, P _{β}); $-12,06$ (d, $J = 19,0$ Hz, P _{α}); $-9,77$ (d, $J = 14,2$ Hz, P _{γ}).



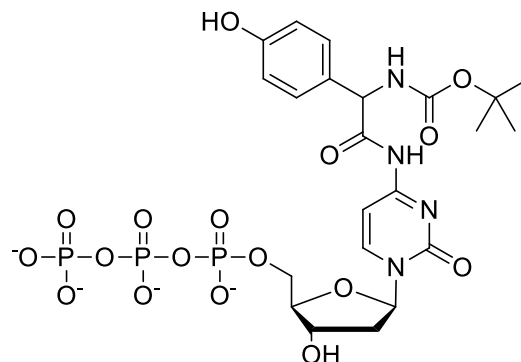
***N*⁴-Tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas (10)**

Gauta 20,1 mg junginio (M= 730 g/mol), išeiga 11 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 731 [M+H]⁺, 729 [M-H]⁻. UV λ_{max} 248;

300 nm. ε₂₄₈=19300 M⁻¹cm⁻¹, ε₃₀₀=9700 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -22,30 (t, *J*=18,2 Hz, P_β); -15,58 (d, *J*=19,0 Hz, P_α); -9,35 (d, *J*=18,7 Hz, P_γ).



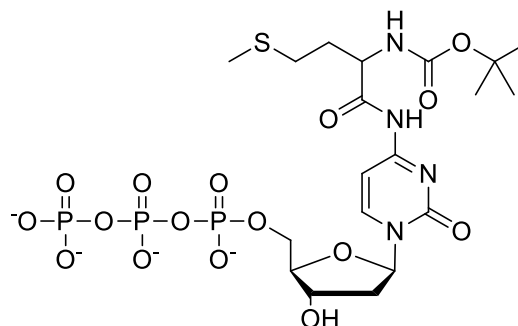
***N*⁴-Metioninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas (11)**

Gauta 698 mg junginio (M= 698 g/mol), išeiga 21 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 699 [M+H]⁺, 697 [M-H]⁻. UV λ_{max} 246;

299 nm. ε₂₄₆=15100 M⁻¹cm⁻¹, ε₂₉₉=8100 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -22,40 (t, *J*=16,5 Hz, P_β); -11,27 (d, *J*=19,1 Hz, P_α); -9,94 (d, *J*=17,4 Hz, P_γ).



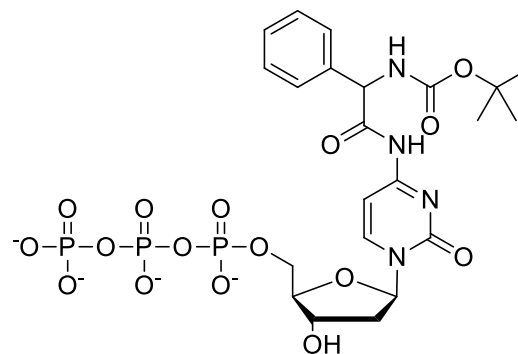
***N*⁴-Fenilalanoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas (12)**

Gauta 46,1 mg junginio (M= 714 g/mol), išeiga 25 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 715 [M+H]⁺, 713 [M-H]⁻. UV λ_{max} 247;

300 nm. ε₂₄₇=12400 M⁻¹cm⁻¹, ε₃₀₀=6600 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -21,90 (t, *J*=19,1 Hz, P_β); -11,10 (d, *J*=19,0 Hz, P_α); -8,62 (d, *J*=19,2 Hz, P_γ).



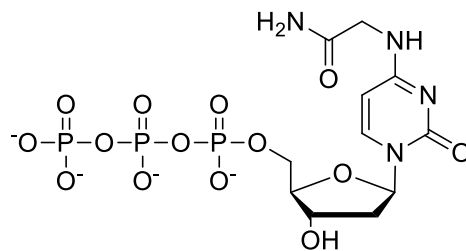
***N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))glicinamido 5'-trifosfatas (13)**

Gauta 9,4 mg junginio (M= 524 g/mol), išeiga 6 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 525 [M+H]⁺, 523 [M-H]⁻. UV λ_{max} 273

nm. ε₂₇₃=11100 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -20,52 (t, *J*=19,6 Hz, P_β); -10,94 (d, *J*=18,7 Hz, P_α); -7,37 (d, *J*=19,9 Hz, P_γ).



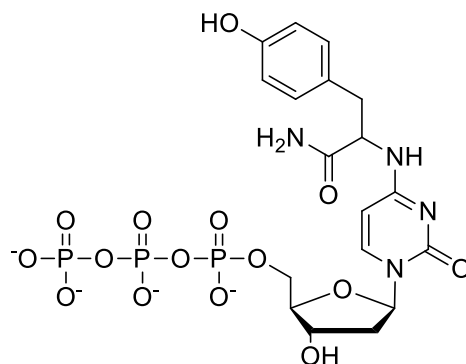
***N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))tirozinamido 5'-trifosfatas (14)**

Gauta 6,2 mg junginio (M= 630 g/mol), išeiga 4 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 631 [M+H]⁺, 629 [M-H]⁻. UV λ_{max} 276

nm. ε₂₇₆=13500 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -21,16 (t, *J*=19,4 Hz, P_β); -10,86 (d, *J*=19,0 Hz, P_α); -8,61 (d, *J*=20,1 Hz, P_γ).



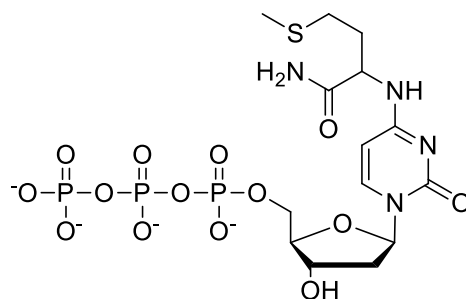
***N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))metioninamido 5'-trifosfatas (15)**

Gauta 17 mg junginio (M= 598 g/mol), išeiga 9 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 599 [M+H]⁺, 597 [M-H]⁻. UV λ_{max} 273

nm. ε₂₇₃=11600 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -20,93 (t, *J*=19,8 Hz, P_β); -10,88 (d, *J*=18,9 Hz, P_α); -7,92 (d, *J*=19,7 Hz, P_γ).



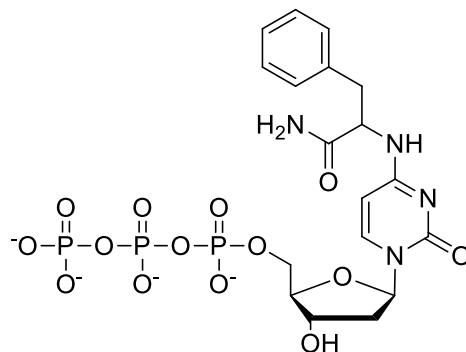
***N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))fenilalaninamido 5'-trifosfatas (16)**

Gauta 8,7 mg junginio (M= 614 g/mol), išeiga 6 %.

MS (ESI⁺): *m/z* 615 [M+H]⁺, 613 [M-H]⁻. UV λ_{max} 276

nm. ε₂₇₆=10900 M⁻¹cm⁻¹.

³¹P BMR (D₂O): δ = -20,85 (t, *J*=19,5 Hz, P_β); -11,95 (d, *J*=18,9 Hz, P_α); -7,92 (d, *J*=19,9 Hz, P_γ).



2.4. Biocheminiai tyrimai

Reakcijoms naudoti reagentai:

TBE (Tris/Boratas/EDTA) buferis - 89 mM Tris, 89 mM boro rūgšties, 2 mM EDTA, pH 8,3.

STOP tirpalas - 95 % formamido, 0,025% bromfenolio mëlïo, 0,025 % ksileno cianolio ir 0,5 mM EDTA.

T7promREZ - 5'-TAATACGACTCACTATAGGG*A*G*A-3', kur * yra fosfortioato modifikacija.

Temp^G - 5'-CCGGAATTGGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'.

φ29 buferis - 33 mM Trisacetato, 10 mM Mg-acetato, 66 mM K-acetato, 0,1 % Tween 20, 1 mM DTT (pH 7,9).

Denatūruojantis gelis - 15 % akrilamido-bisakrilamido (19:1), 8 M karbamido TBE buferyje.

2.4.1. Oligonukleotido pažymėjimas ³³P ir sulydymas su matrica

Sumaišomas reakcijos mišinys oligonukleotido 5'-galo žymėjimui: 0,5 μl T4 polinukleotidų kinazės (PNK) (10 U/μl), 1 μl 10x T4 PNK buferio, 3 μl [γ-³³P]-ATP (1 mCi), 1 μl T7promREZ oligonukleotido (100 μM) ir 4,5 μl vandens. Reakcija atliekama 37 °C

temperatūroje termomaišytuve purtant 30 min. Laikui praėjus, reakcija sustabdoma į mišinį pridedant 1 µl EDTA (0,5 M) ir mėginį palaikant 80 °C temperatūroje 10 min. Mėginys praskiedžiamas iki 30 µl tūrio ir gryninamas pagal gamintojo protokolą Zeba™ Spin Desalting Column (7K MWCO) nudruskinančia kolonėle. Gauta išgryninto žymėto oligonukleotido koncentracija 280 nM.

³³P atomu pažymėtas T7promREZ oligonukleotidas sulydomas su Temp^G matrica. Reakcijos mišinys sulydymui: 3,6 µl ³³P žymėto T7promREZ oligonukleotido (280 nM), 1,1 µl Temp^G matricos (100 µM), 5,3 µl vandens. Mėginys dedamas į 95 °C temperatūros termomaišytuvą, ten palaikomas 2 min. Termomaišytuvą išjungiamas, leidžiama mėginiui atvėsti iki 25 °C temperatūros. Reakcijos mišiniui pasiekus reikiamą temperatūrą, mėginys išimamas iš termomaišytuvo ir dedamas į ledus. Galutinė suhibridizuotos DNR koncentracija – 100 nM.

2.4.2. Pradmens prailginimo reakcijos

DNR grandinės prailginimo reakcijos atliktos su TdT ir φ29 polimerazėmis. Reakcijų, naudojant TdT, mišiniai: 0,5 µl TdT (20 U/µl), 2 µl 5x TdT buferio, 0,5 µl ³³P žymėto T7promREZ oligonukleotido (280 nM), 1 µl dCTP (100 µM) arba susintetinto N⁴-modifikuoto dCTP (100 µM) ir 6 µl vandens. Reakcijos vykdytos 30 min 37 °C temperatūroje ir sustabdytos į mišinius įpilant 20 µl STOP tirpalo.

Reakcijų su φ29 DNR polimeraze mišiniai: 0,35 µl φ29 (10 U/µl), 1 µl 10x φ29 buferio, 0,15 µl neorganinės pirofosfatazės (0,1 U/µl), 0,5 µl ³³P žymėto T7promREZ oligonukleotido, sulydyto su Temp^G matrica (100 nM), 1 µl dATP (100 µM), 1 µl dGTP (100 µM), 1 µl dTTP (100 µM), 1 µl dCTP (100 µM) arba susintetinto N⁴-modifikuoto dCTP (100 µM), 4 µl vandens. Reakcijos atliktos 30 min 30 °C temperatūroje ir sustabdytos į mėginius pridedant 20 µl STOP tirpalo.

2.4.3. DNR fragmentų poliakrilamidinio gelio elektroforezė

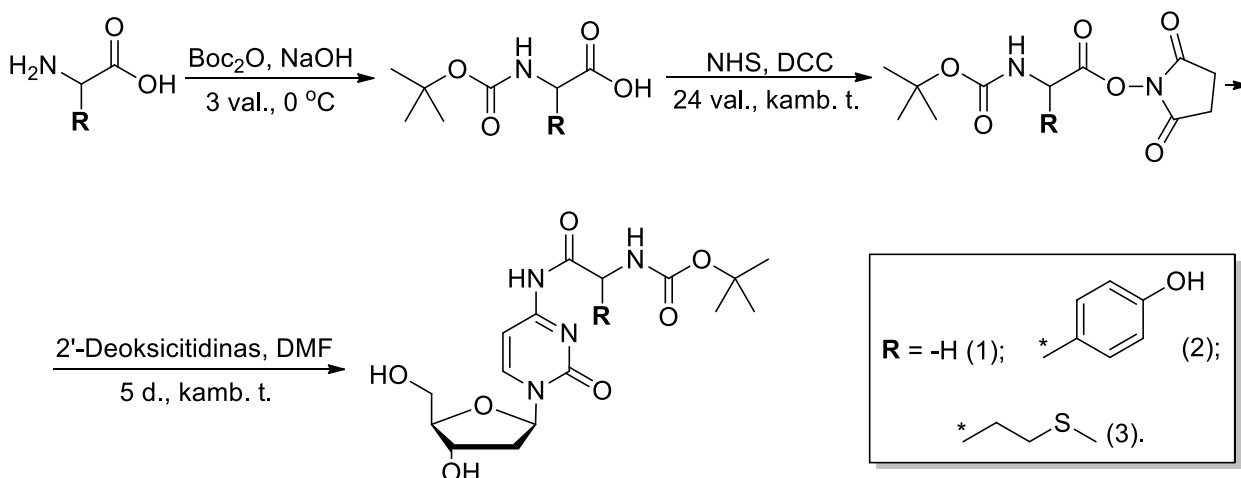
Į 25 ml denatūruojančio gelio įpilama 250 µl 10 % APS tirpalo ir 25 µl TEMED. Mišinys supilamas tarp nuvalytų gelio elektroforezės stiklų, įstatomos „šukos“. Geliui sustingus stiklai įstatomi į elektroforezės aparatą, užpildytą 1X TBE buferiu. „Šukos“ ištraukiamos, į šulinėlius supilami bromfenolio mėlio ir ksileno cianolio dažų mišiniai, 30 min leidžiama peforezė esant 600 V įtampai. Į gelio šulinėlius sunešami 2 min 95 °C temperatūroje atkaitinti mėginiai, elektroforezė leidžiama esant 200 V įtampai, o po 30 min – 600 V. Elektroforezė leidžiama tol, kol mėginiuose esantys dažai priartėja prie gelio apačios. Elektroforezei įvykus, gelis išimamas iš aparato, nuimamas viršutinis stiklas, gelis džiovinamas rankų džiovintuvu. Išdžiovintas gelis autoradiografuojamas specialiu FujiFilm ekranu 1-3 dienas. Gauti rezultatai vizualizuojami fotovaizdintuvu FujiFilm FLA-5100.

3. REZULTATAI

Magistro baigiamojo darbo metu susintetinta 15 junginių: 7 aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino nukleozidai ir 8 aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino nukleotidai. Junginių sintezių eiga atlikta remiantis žiniomis, rastomis literatūroje apie panašių junginių sintezes. Lentelėse pateikiami supaprastinti junginių pavadinimai, pilnus pavadinimus galima rasti eksperimentinėje dalyje. Susintetinti junginiai panaudoti pradmens prailginimo reakcijoms su TdT ir φ29 DNR polimerazėmis.

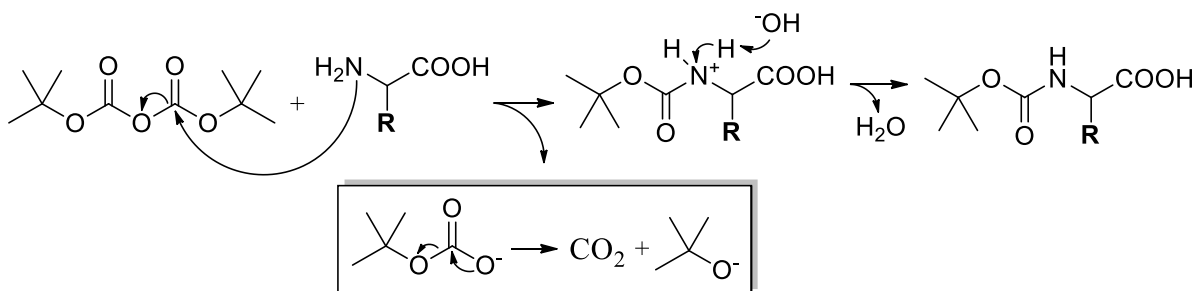
3.1. *N*⁴-Acil-Boc-2'-deoksicitidinių sintezė

Blokuotomis aminorūgštimis modifikuotų deoksicitidino nukleozidų sintezė atliekama trimis etapais. Bendra sintezės schema pateikiama žemiau:



18 Schema. N^t -Acil-Boc-2'-deoksicitidinų sintezės etapai.

Pirmiausia vykdomas pasirinktos aminorūgšties amino grupės blokavimas Boc apsaugine grupe. Reakcijos mechanizmas pateikiamas 19 schemeje. Aminorūgšties amino grupė atakuoja karbonilinę Boc_2O anglį, susidaro protonizuotą amino grupę turinti 2-((*tret*-butiloksikarbonil)amino)alkilrūgštis, pašalinama *tret*-butilkarbonatas. Bazė nuo protonizuoto amino pasiima vandenilį, susidaro vandens molekulė ir Boc apsaugine grupe blokuota aminorūgštis. *tret*-Butilkarbonatas skyla į CO_2 ir *tret*-butoksida.

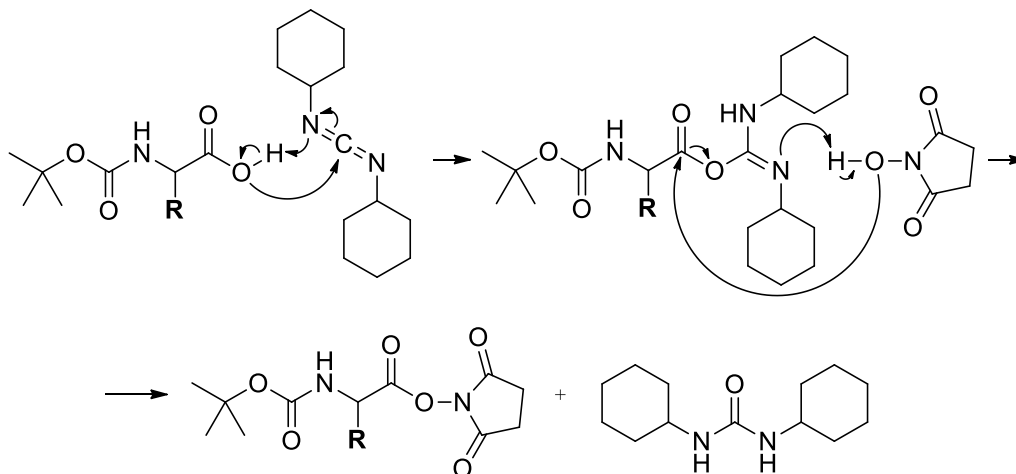


19 Schema. Boc apsauginės grupės prijungimo prie aminorūgšties amino grupės mechanizmas.

Reakcijai įvykus, mišinys nugarinamas vakuuminio rotaciniu garintuvu iki kelių ml tūrio, parūgštinamas citrinos rūgštimi iki $\text{pH} = 2,0$ ir ekstrahuojamas etilacetatu. Sujungtos etilacetato frakcijos džiovinamos Na_2SO_4 , filtruojamos ir nugarinamos iki sausumo.

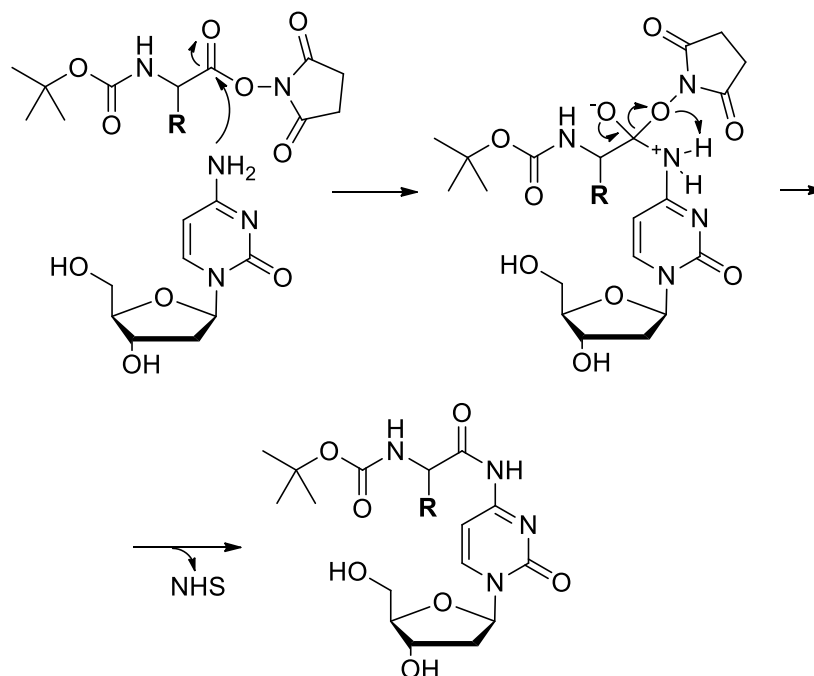
Toliau vykdoma aminorūgšties karboksigrupės aktyvavimo reakcija. Gauta Boc apsaugine grupe blokuota aminorūgštis tirpinama etilacetate, pridedama NHS ir DCC, maišoma 24 val. kambario temperatūroje. Reakcijos mechanizmas pateikiamas 20 schemeje. Pirmiausia

vyksta reakcija tarp Boc apsaugine grupe blokuotos aminorūgšties karboksigrupės ir DCC, susidaro nestabilus labai reaktyvus *O*-dicikloheksilurėjos esteris, kuriam toliau reaguojant su NHS susiformuoja stabilesnis blokuotos aminorūgšties NHS-esteris bei šalutinis produktas – *N,N'*-dicikloheksilurėja (DCU). DCU nufiltruojama, etilacetatas nugarinamas.



20 Schema. Blokuotos aminorūgšties karboksigrupės aktyvavimo reakcija.

Gauta aktyvuotą karboksigrupę turinti blokuota aminorūgštis tirpinama DMF, pridedama 2'-deoksicitidino ir maišoma kambario temperatūroje 5 paras. Modifikuoto 2'-deoksicitidino sintezės metu citozino N^4 aminogrupės azoto atomas atakuoja aktyvuotos aminorūgšties karbonilinę anglį, įvykstant 21 schemeje pavaizduotam persitvarkymui susidaro modifikuotas 2'-deoksicitidino nukleozidas ir NHS.

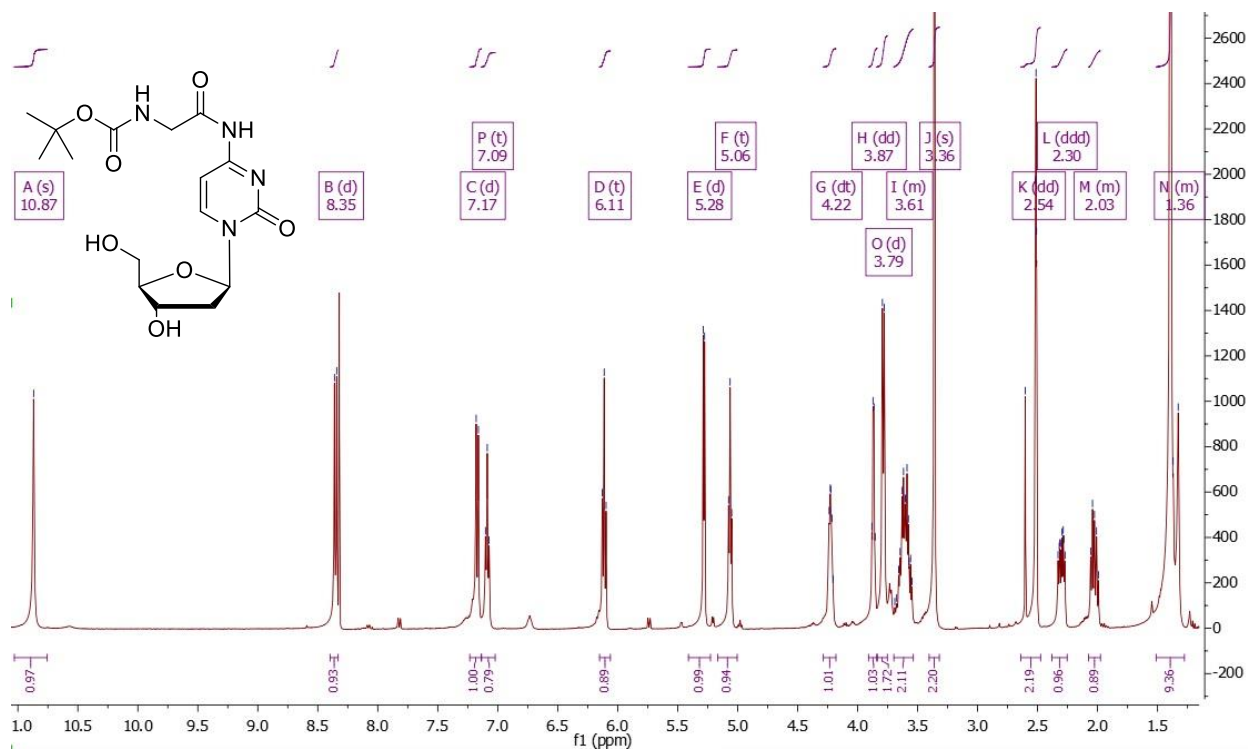


21 Schema. Aktyvuotos aminorūgštis reakcija su 2'-deoksicitidinu.

Reakcijai įvykus DMF nugarinamas, susidaręs produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos būdu, gryninimo eigą stebint TLC analize. Eliuentu naudojamas chloroformo ir metanolio mišinys: didėjant eliuojamų medžiagų poliškumui atitinkamai keliama metanolio koncentracija nuo 0 % iki 15 %. Surinktos frakcijos nugarinamos. Blokuotomis aminorūgštimis modifikuotų 2'-deoksicitidino nukleozidų sintezei naudotos aminorūgštys: glicinas, L-tirozinas ir L-metioninas. 4-oje lentelėje pateikiami susintetinti nukleozidai ir reakcijų išeigos. Junginių struktūros patvirtintos atlikus BMR spektroskopinę ir HPLC-MS analizes. Žemiau pateikiamas N^4 -glicinoil-Boc-2'-deoksicitidino ^1H BMR spektras.

4 lentelė. Susintetinti N^4 -Acil-Boc-2'-deoksicitidino nukleozidai.

Nr.	Panaudota aminorūgštis	Produktas	m, g	Išeiga, %
1	Glicinas	N^4 -Gly-Boc-2'-dC	1,361	53
2	L-Tirozinas	N^4 -Tyr-Boc-2'-dC	1,715	53
3	L-Metioninas	N^4 -Met-Boc-2'-dC	1,025	34

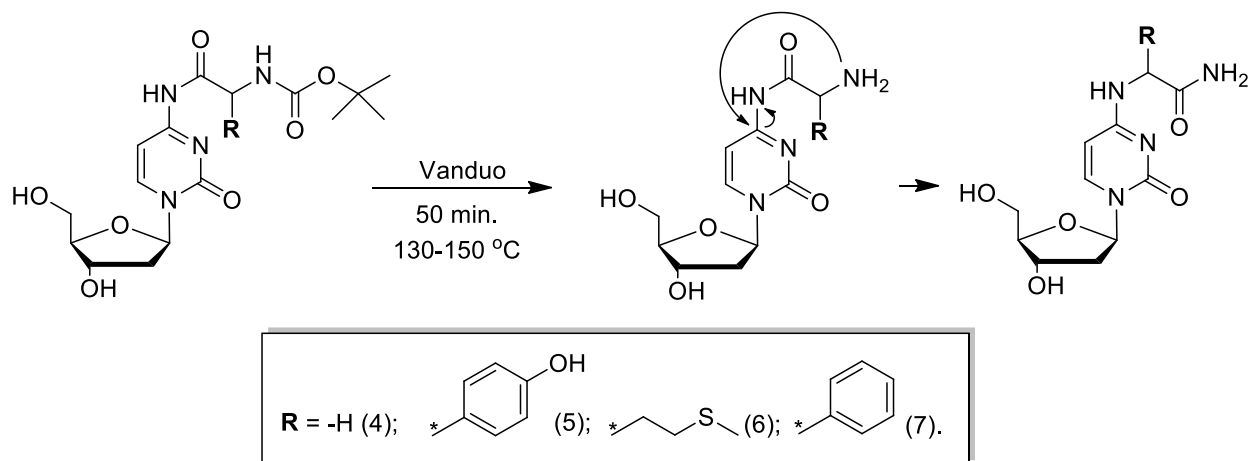


Pav. 4. N^4 -Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidino ^1H BMR spektras.

3.2. N -(4-(2'-Deoksicitidinil))acilamidų sintezė

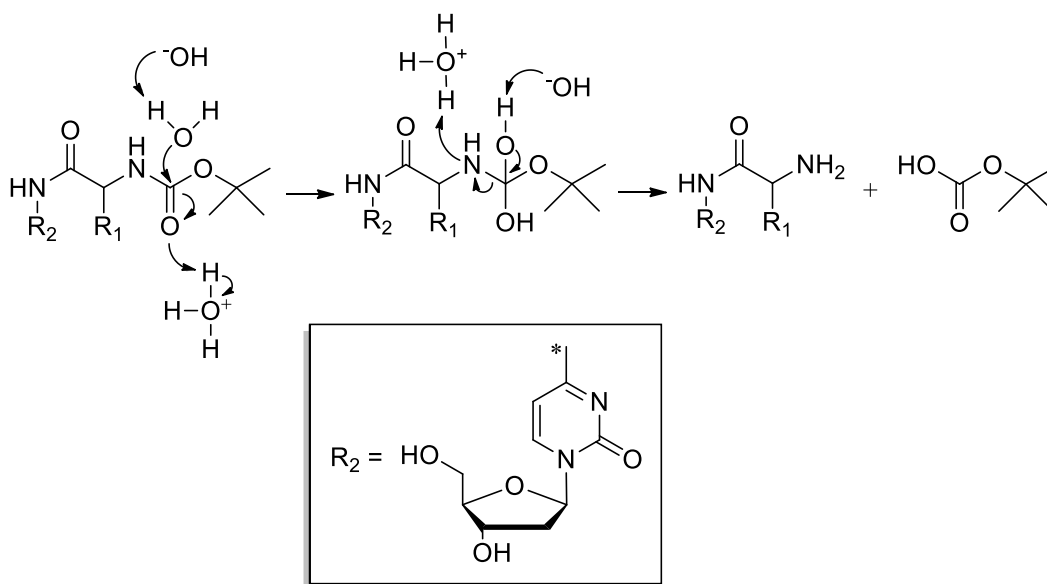
N^4 -Acil-Boc-2'-deoksicitidino deblokavimo reakcija atliekama vienu etapu, pasirinktą blokuotą modifikuotą nukleozidą tirpinant vandenyje ir virinant glicerolio vonelėje 50 min.

Bendra reakcijos schema pateikiama žemiau.



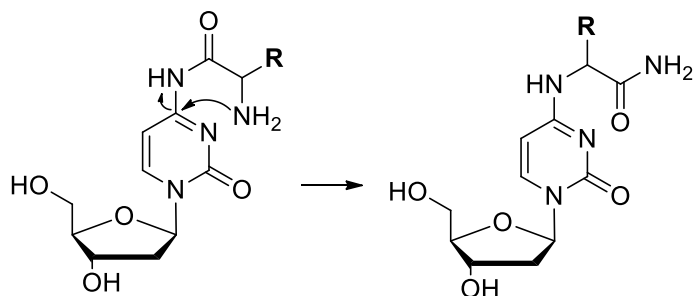
22 schema. N -(4-(2'-Deoksicitidinil))acilamidų sintezė.

Reakcija remiasi vandens molekulių gebėjimu jonizuotis aukštoje temperatūroje. Vandens temperatūrai pasiekus 130-150 °C, dalis molekulių jonizuojasi į OH^- ir H_3O^+ jonus, kurie katalizuoja deblokavimo reakciją, kaip pavaizduota schemeje žemiau. Karbonilinis anglies atomas protonizuojamas hidronio jono, tuomet hidroksido jonas atakuoja vandens molekulę, kurios deguonies atomas prisijungia prie karbonilinės anglies ir gaunamas tarpinis diolis. Hidroksido jonas deprotonuoja vieną iš hidroksigrupių, susidarant vandens molekulei. Deprotonuotas deguonies atomas sudaro dvigubą ryšį su šalia esančiu anglies atomu, skyla N-C ryšys, susiformuoja pirminę aminogrupę turintis junginys bei *tert*-butiloksikarboksirūgštis.



23 Schema. Vandens katalizuojama deblokavimo reakcija.

Reakcijos metu susidaręs pirminis aminas nėra galutinis produktas, iškart vyksta junginio persitvarkymas, kaip pavaizduota schemeje 24. Laisva α -aminogrupė vykdo nukleofilinę ataką į 4-oje pozicijoje esančią citozino bazės anglį, skyla N-C ryšys ir susiformuoja *N*-(4-(2'-deoksicitidinil))acilamidas.

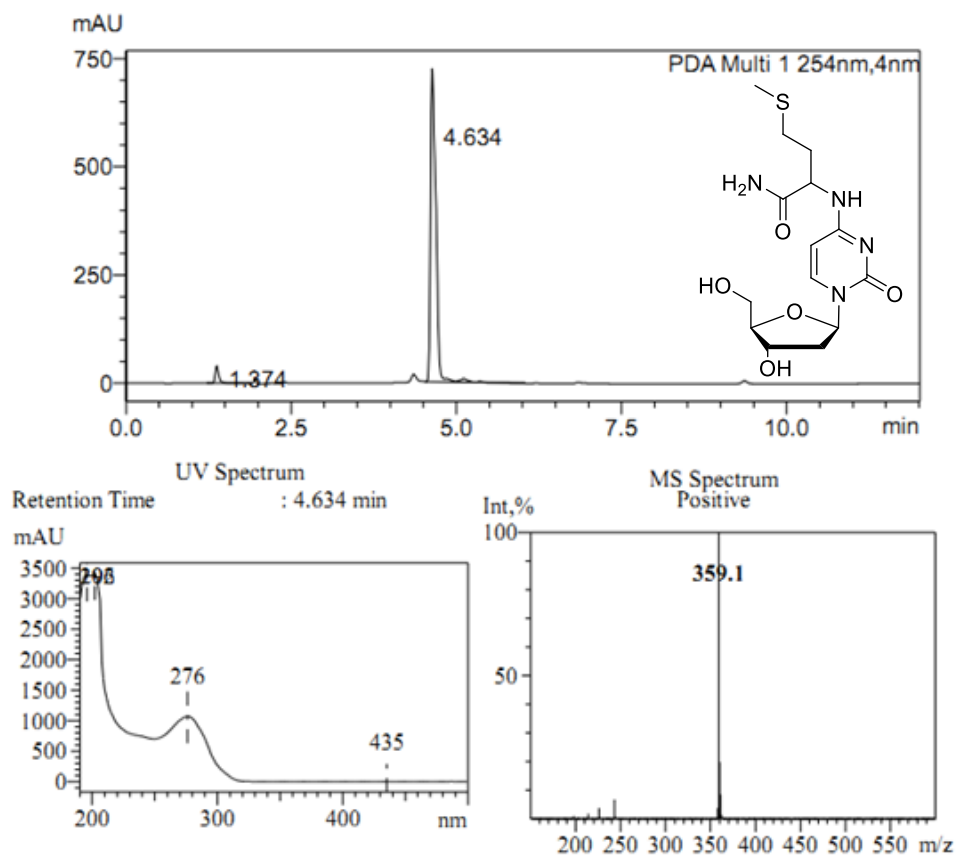


24 Schema. Deblokavimo reakcijos metu vykstantis persitvarkymas.

Reakcijai įvykus mišinys nugarinamas vakuuminio rotaciniu garintuvu iki kelių ml tūrio ir gryninamas atvirkščių fazių kolonėlinės chromatografijos būdu, gryninimo eigą stebint TLC analize. Eliuentu naudojamas vandens ir metanolio mišinys, pradedant gryninimą tik su vandeniu ir baigiant su 20 % metanolio vandeniniu tirpalu. Surinktos frakcijos nugarinamos iki sausumo. Deblokavimo reakcijos atliktos su *N*⁴-glicinoil-, *N*⁴-tirozinoil-, *N*⁴-metioninoil- ir *N*⁴-fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidinais. 5-oje lentelėje pateikiami gauti nukleozidai ir deblokavimo reakcijų išeigos. Junginių struktūros patvirtintos atlikus BMR spektroskopinę ir HPLC-MS analizes. Pav. 5 pateikiama *N*-(4-(2'-deoksicitidinil))metioninamido HPLC-MS analizė. Sulaikymo laikas 4,634 min. MS (ESI⁺): *m/z* 359,1 [M+H]⁺. UV λ_{max} 276 nm.

5 lentelė. Susintetinti *N*-(4-(2'-deoksicitidinil))acilamidai.

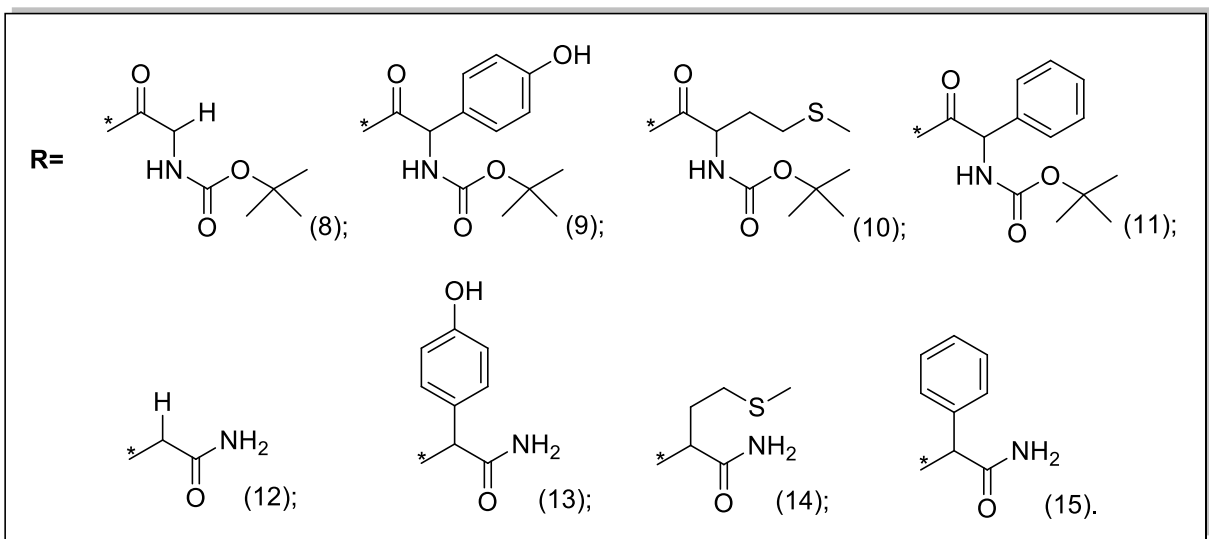
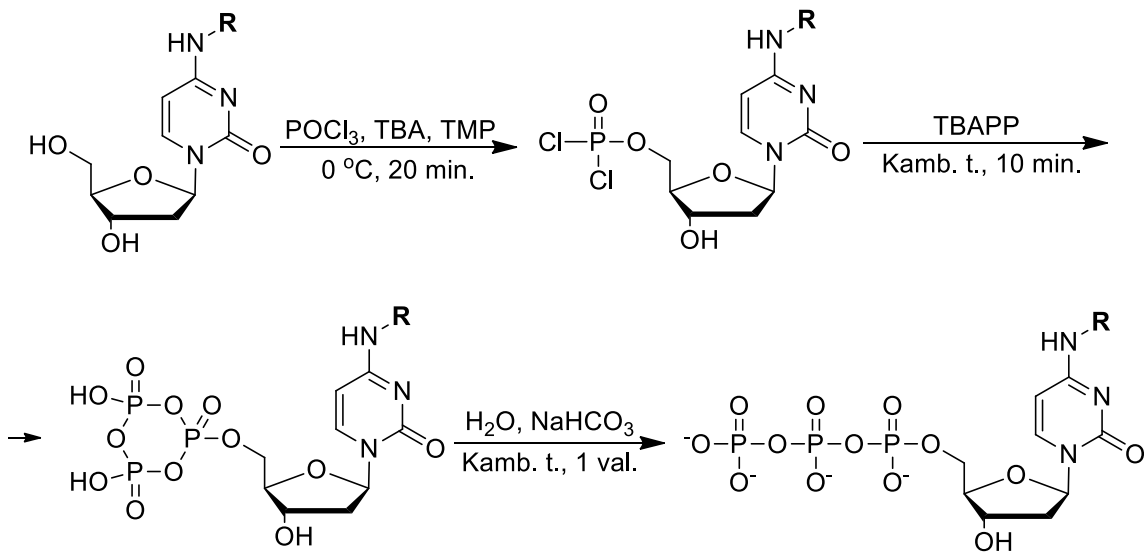
Nr.	Panaudotas nukleozidas	Produktas	m, mg	Išeiga, %
5	<i>N</i> ⁴ -Gly-Boc-2'-dC	<i>N</i> ⁴ -Gly-2'-dC	176	48
6	<i>N</i> ⁴ -Tyr-Boc-2'-dC	<i>N</i> ⁴ -Tyr-2'-dC	183	46
7	<i>N</i> ⁴ -Met-Boc-2'-dC	<i>N</i> ⁴ -Met-2'-dC	210	51
8	<i>N</i> ⁴ -Phe-Boc-2'-dC	<i>N</i> ⁴ -Phe-2'-dC	90	23



Pav. 5. *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))metioninamido HPLC-MS analizė.

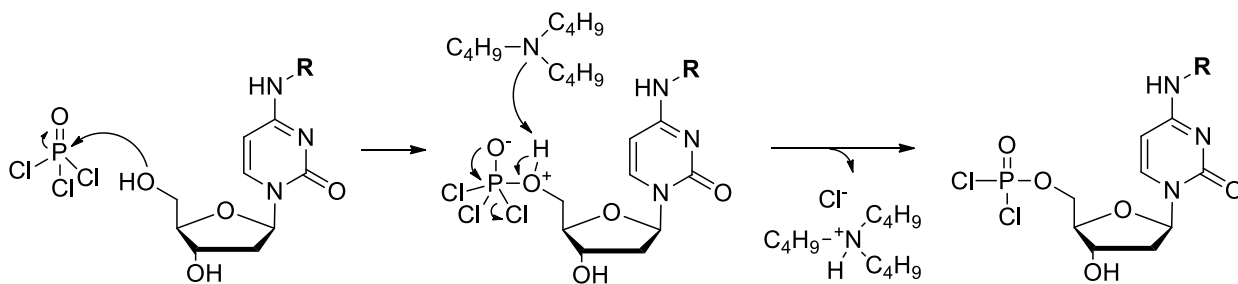
3.3. *N*⁴-Aminorūgštis modifikuotų 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatų sintezė

Trifosfatų sintezę sudaro trys etapai: monofosforilinimo reakcija, pirofosfato prijungimas ir hidrolizė. Bendra sintezės schema pateikiama žemiau.



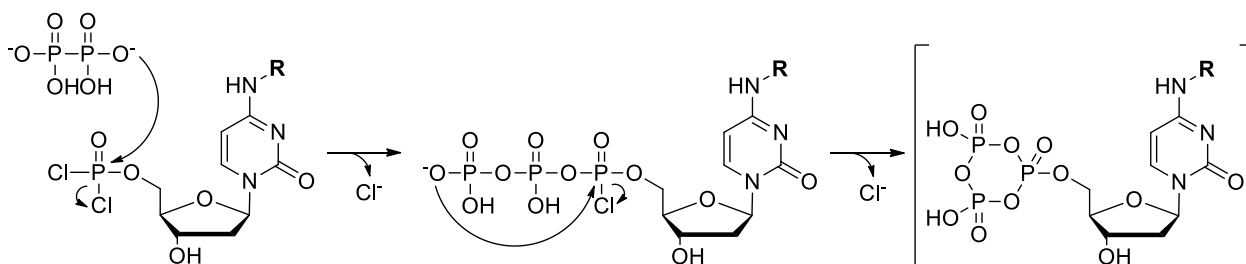
25 Schema. Nukleozidų 5'-trifosfatų sintezės etapai.

Monofosforilavimo reakcijos metu pasirinktas modifikuotas nukleozidas (1-8), ištirpintas atšaldytame TBA ir TMP mišinyje, paveikiamas fosforilchloridu. Nukleozido 5'-OH grupės deguonies atomas atakuoja fosforilchlorido fosforo atomą, skyla dvigubas P=O ryšys, tributilaminas deprotonuoja 5'-OH, nuskyla chlorido jonas, atsikuriant dvigubam ryšiui tarp P ir O atomų susidaro tarpinis fosfodichlorato tarpinis junginys (26 schema). Išsiskyrusi druskos rūgštis yra neutralizuojama tributilaminu.



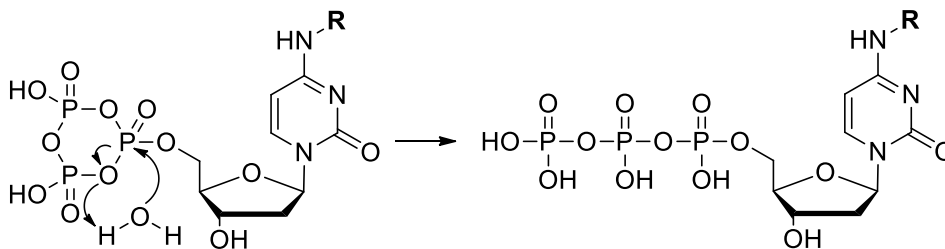
26 Schema. Modifikuoto nukleozido reakcija su POCl_3 .

Gautas tarpinis junginys *in situ* paveikiamas tributilamonio pirofosfatu. Reakcijos metu du pirofosfato deguonies atomai atakuoja tarpinio fosfodichlorato fosforo atomą, atskyla du chloro jonai, susiformuoja ciklinis trifosfatas (27 schema).



27 Schema. Susidariusio tarpinio fosfodichlorato reakcija su tributilamonio pirofosfatu.

Galiausiai ciklinis trifosfatas hidrolizuojamas (28 schema). Reakcijos mišinio pH neutralizuojamas NaHCO_3 vandeniniu tirpalu. Prie γ -fosforo atomo esantis deguonies atomas prisijungia vandenilį iš vandens molekulės, o vandens molekulės deguonies atomas jungiasi prie α -fosforo atomo, susiformuoja linijinis nukleozido 5'-trifosfatas.



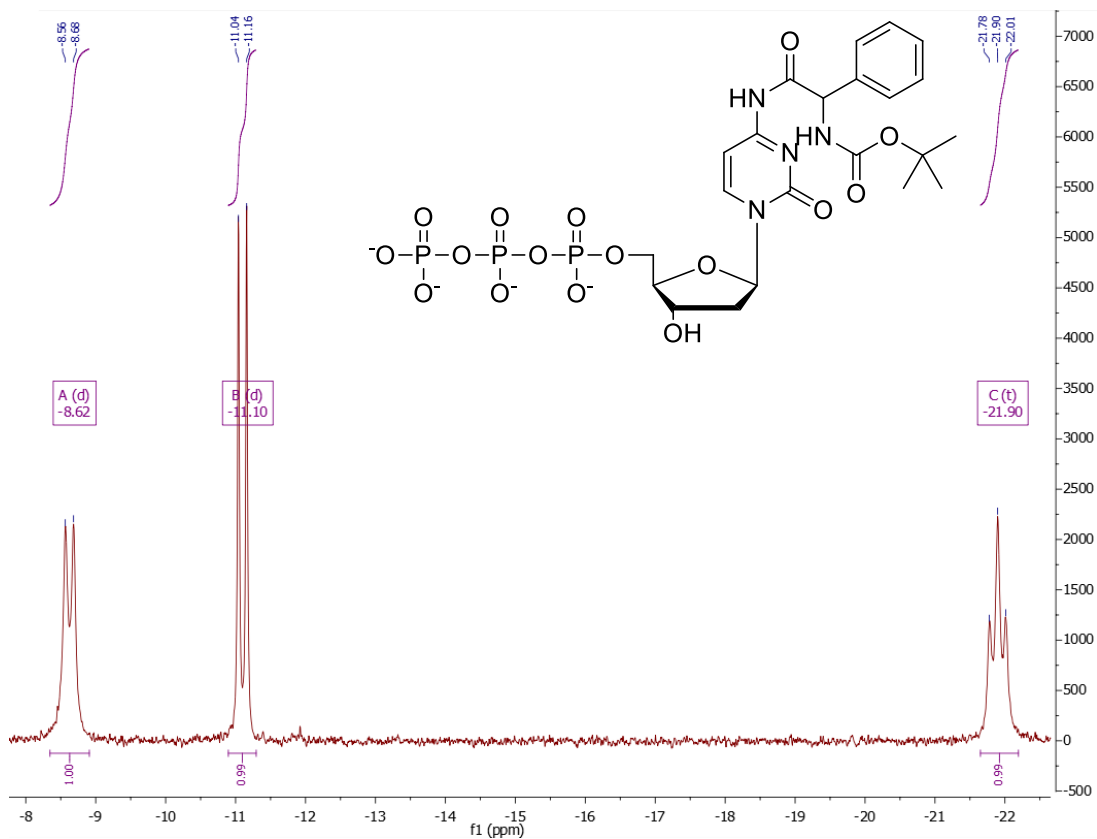
28 Schema. Ciklinio trifosfato hidrolizė.

Produktas gryninamas jonų mainų chromatografijos būdu, gryninimo eigą stebint TLC analize. Eliuojama naudojant vandeninį LiCl tirpalą, palaipsniui keliant LiCl koncentraciją nuo

0,05 M iki 0,3 M. Surinktos frakcijos su produktu nugarinamos, LiCl išsodinamas atšaldytu acetono-metanolio tirpalu ir gryninama atvirksčių fazių kolonėliniu metodu. Frakcijos su produktu nugarinamos, gauti junginiai ištirpinami vandenyje. Susintetinti nukleozidų 5'-trifosfatai ir jų kiekiai pateikiami lentelėje žemiau. Junginių stuktūros patvirtintos atlikus BMR spektroskopinę ir HPLC-MS analizes, gauti kiekiai apskaičiuoti pagal molinius sugerties koeficientus. Šeštame paveikslėlyje pavaizduotas N^4 -fenilalanoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfato ^{31}P BMR spektras.

6 Lentelė. Susintetinti modifikuoti nukleozidų 5'-trifosfatai.

Nr.	Panaudotas nukleozidas	Produktas	m, mg	Išėiga, %
9	N^4 -Gly-Boc-2'-dC	N^4 -Gly-Boc-2'-dCTP	36	15
10	N^4 -Tyr-Boc-2'-dC	N^4 -Tyr-Boc-2'-dCTP	20	11
11	N^4 -Met-Boc-2'-dC	N^4 -Met-Boc-2'-dCTP	45	21
12	N^4 -Phe-Boc-2'-dC	N^4 -Phe-Boc-2'-dCTP	46	25
13	N^4 -Gly-2'-dC	N^4 -Gly-2'-dCTP	10	6
14	N^4 -Tyr-2'-dC	N^4 -Tyr-2'-dCTP	6	4
15	N^4 -Met-2'-dC	N^4 -Met-2'-dCTP	17	9
16	N^4 -Phe-2'-dC	N^4 -Met-2'-dCTP	9	6



Pav. 6. N^4 -Fenilalanoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfato ^{31}P BMR spektras.

3.4. Pradmens prailginimo reakcijos

Susintetinus N^4 -modifikuotus nukleotidus tirta, ar šie junginiai gali būti įjungti į oligonukleotidus, atliekant DNR sekos prailginimo reakcijas. Pradmens prailginimo reakcijoms panaudoti žinomų sekų DNR fragmentai:

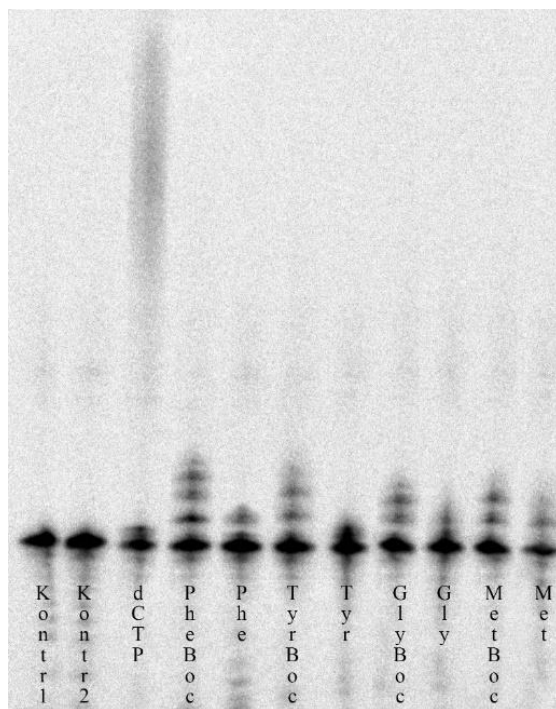
- T7promREZ - 5'-TAATACGACTCACTATAGGG*A*G*A-3', kur * yra fosfortioato modifikacija.
- Temp^G - 3'-ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGGTTAAGGCC-5'.

Reakcijoms pasitelktos dvi polimerazės – TdT ir $\phi 29$.

TdT yra X šeimos DNR polimerazė, nereikalaujanti DNR matricos ir pasižyminti atsitiktinių nukleotidų prijungimu prie DNR 3'-OH galo. Oligonukleotido prailginimo reakcijos su TdT atliktos naudojant T7promREZ pradmenį ir susintetintus N^4 -modifikuotus 2'-

deoksicitidino nukleotidus. Žemiau pateikiamas pradmens prailginimo reakcijų su TdT poliakrilamidinio gelio elektroforezės atvaizdas. Takeliuose matoma:

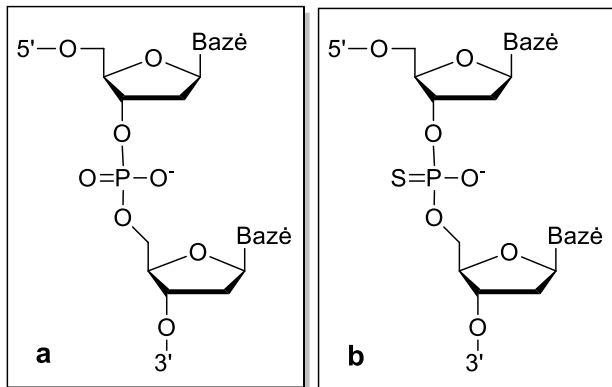
- Kontr1 - Neigiama kontrolė, kur yra ^{33}P žymėtas T7promREZ oligonukleotidas ir TdT buferis.
- Kontr2 - Neigiama kontrolė, kur yra ^{33}P žymėtas T7promREZ oligonukleotidas, TdT buferis ir dCTP.
- dCTP – Teigiama kontrolė, kur yra 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- PheBoc - N^4 -Fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- Phe - N -(4-(2'-Deoksicitidinil))fenilalaninamido 5'-trifosfatas.
- TyrBoc - N^4 -Tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- Tyr - N -(4-(2'-Deoksicitidinil))tirozinamido 5'-trifosfatas.
- GlyBoc - N^4 -Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- Gly - N -(4-(2'-Deoksicitidinil))glicinamido 5'-trifosfatas.
- MetBoc - N^4 -Metioninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- Met - N -(4-(2'-Deoksicitidinil))metioninamido 5'-trifosfatas.



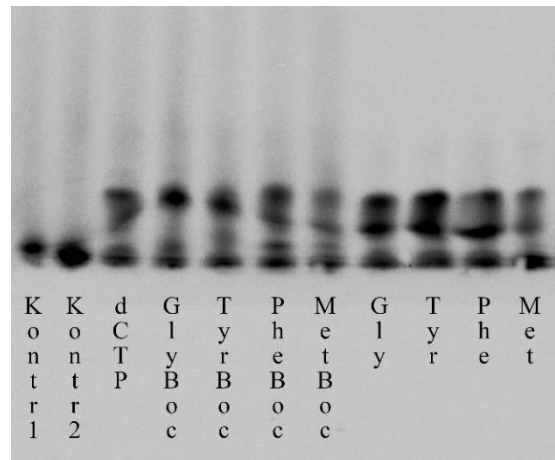
Pav. 7. Pradmens prailginimo reakcijų su TdT poliakrilamidinio gelio atvaizdas.

Lyginant neigiamą kontrolę su vaizdais takeliuose, kuriuose naudoti nukleotidai, galima padaryti išvadas, kokie nukleotidai buvo geriausiai įjungiami į DNR grandinę. Kadangi TdT pradžios prailginimo reakcijai nereikalauja DNR matricos, teoriškai galimas begalinis nukleotidų įjungimas į oligonukleotidą. Žiūrint į trečiąjį takelį, kuriame yra dCTP, matomas šleifas, kuris tai ir patvirtina – substratu naudojant dCTP gauta daug įvairaus ilgio DNR fragmentų. Iš literatūrinių duomenų žinoma, jog TdT geba į oligonukleotidą įjungti įvairias modifikacijas turinčius nukleotidus. Gautas poliakrilamidinio gelio elektroforezės atvaizdas tai patvirtina. Gelyje matoma, jog TdT geriausiai į oligonukleotidą jungė blokuotomis aminorūgštimis modifikuotus 2'-deoksicitidino nukleotidus. PheBoc nukleotidas į DNR grandinę buvo įjungtas 3 kartus iš eilės, TyrBoc, GlyBoc ir MetBoc – po 2 kartus. Kiek prasčiau į oligonukleotidą įjungiami deblokuotomis aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatai. Visi nukleotidai (Phe, Tyr, Gly bei Met) į DNR grandinę buvo įjungiami tik vieną kartą. Norint geriau suprasti, kodėl Boc apsauginę grupę turintys modifikuoti 2'-deoksicitidino nukleotidai yra geresni TdT substratai oligonukleotido pratęsimo reakcijai, reikėtų atlikti platesnius tyrimus.

DNR polimerazė $\phi 29$ priklauso B šeimai ir atlieka nuo DNR matricos priklausomą oligonukleotido prailginimo reakciją. Ši polimerazė taip pat pasižymi 3'→5' egzozonukleaziniu aktyvumu, tad norint išvengti pradžios degradacijos, pasirinktas T7promREZ oligonukleotidas, turintis fosfortioatines modifikacijas 3' gale (Pav. 8b). Matrica pasirinktas 35-ių nukleotidų ilgio DNR fragmentas Temp^G. Reakcijų metu naudoti ne tik susintetinti N⁴-modifikuoti nukleotidai, bet ir papildomi dATP, dGTP bei dTTP. Maksimaliai į DNR seką galima įjungti 12 nukleotidų, 6 iš jų gali būti modifikuoti dCTP.



Pav. 8. a Fosfodiesterinis ryšys. **b** Fosfortioatinis ryšys.



Pav. 9. Pradžios prailginimo reakcijų su $\phi 29$ poliakrilamidinio gelio atvaizdas.

Pav. 9. pateiktas oligonukleotido T7promREZ prailginimo reakcijos su ϕ 29 DNR polimeraze poliakrilamidinio gelio atvaizdas atlikus elektroforezę. Takeliuose pateikta:

- Kontr1 - Neigiama kontrolė, kur yra ^{33}P žymėtas T7promREZ oligonukleotidas ir ϕ 29 buferis.
- Kontr2 - Neigiama kontrolė, kur yra ^{33}P žymėtas T7promREZ oligonukleotidas, Temp^G matrica, ϕ 29 buferis, dATP, dGTP, dTTP ir dCTP.
- dCTP – Teigiama kontrolė, kur yra dATP, dGTP, dTTP ir dCTP.
- GlyBoc - *N*⁴-Glicinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- TyrBoc - *N*⁴-Tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- PheBoc - *N*⁴-Fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- MetBoc - *N*⁴-Metioninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas.
- Gly - *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))glicinamido 5'-trifosfatas.
- Tyr - *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))tirozinamido 5'-trifosfatas.
- Phe - *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))fenilalaninamido 5'-trifosfatas.
- Met - *N*-(4-(2'-Deoksicitidinil))metioninamido 5'-trifosfatas.

Trečiajame (teigiamos kontrolės) takelyje turėtų matytis pilno ilgio produktas, tačiau matoma, jog buvo įjungti tik du dCTP nukleotidai. DNR polimerazė ϕ 29 į oligonukleotidą sėkmingai įjungė visus susintetintus modifikuotus 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatus, tačiau dėl prastos gelio kokybės teigti, kurie nukleotidai buvo įjungiami geriau, o kurie prasčiau, neįmanoma. Norint įvertinti, kurie nukleotidai yra geresni substratai ϕ 29 polimerazei, bandymą reikėtų pakartoti.

IŠVADOS

Magistrinio darbo metu susintetinta 15 naujų, mokslinėje literatūroje neaprašytų junginių.

1. Trijų stadijų sintezės metu gauti 3 Boc apsaugine grupe blokuotomis aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino nukleozidai: N^4 -glicinoil-Boc-2'-deoksicitidinas, N^4 -tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidinas ir N^4 -metioninoil-Boc-2'-deoksicitidinas.
2. Atlikus susintetintų nukleozidų deblokavimo reakcijas buvo gauti dar 4 deblokuotomis aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino nukleozidai: N -(4-(2'-deoksicitidinil))glicinamidas, N -(4-(2'-deoksicitidinil))tirozinamidas, N -(4-(2'-deoksicitidinil))metioninamidas bei N -(4-(2'-deoksicitidinil))fenilalaninamidas.
3. Susintetinti modifikuoti nukleozidai panaudoti nukleotidų sintezei. Pagal Yoshikawa protokolą susintetinti 8 nauji nukleozidų trifosfatai - 4 Boc apsaugine grupe blokuotomis aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatai: N^4 -glicinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas, N^4 -tirozinoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas, N^4 -metioninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas, N^4 -fenilalaninoil-Boc-2'-deoksicitidino 5'-trifosfatas bei 4 deblokuotomis aminorūgštimis modifikuoti 2'-deoksicitidino 5'-trifosfatai: N -(4-(2'-deoksicitidinil))glicinamido 5'-trifosfatas, N -(4-(2'-deoksicitidinil))tirozinamido 5'-trifosfatas, N -(4-(2'-deoksicitidinil))metioninamido 5'-trifosfatas, N -(4-(2'-deoksicitidinil))fenilalaninamido 5'-trifosfatas.
4. Atlikus pradžios prailginimo reakcijas su DNR polimerazėmis TdT ir $\phi 29$ nustatyta, jog fermentai substratais geba panaudoti visus susintetintus nukleotidus. TdT į oligonukleotidą geriau jungia Boc apsauginę grupę turinčius nukleotidus, nei deblokuotus junginius. DNR polimerazė $\phi 29$ visus modifikuotus 2'-deoksicitidinus į DNR grandinę įjungia, tačiau norint išsiaiškinti, kurie substratai yra geriausi, bandymus reikia pakartoti.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Synthesis and Study of N^4 -Amino Acid Modified 2'- Deoxycytidine 5'-Triphosphates

Martyna Koplūnaitė

SUMMARY

Nucleoside 5'-triphosphates [(d)NTPs] play an essential role in many biological processes. Natural (d)NTPs act as monomers for polymerase-mediated nucleic acid synthesis both *in vivo* and *in vitro*. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is the primary energy source for cellular functions. Cyclic mononucleotides such as cAMP and cGMP serve as intracellular signaling molecules. Dinucleotides such as nicotinamide adenine dinucleotide and flavin adenine dinucleotide are enzyme cofactors in many biochemical reactions. Due to the broad range of applications of (d)NTPs they are widely studied. Modified (d)NTPs are used in various cellular and molecular biology experiments. These compounds are utilized as substrates for polymerases, studied as inhibitors for enzymes, they are also often labelled with fluorescent or radioactive probes and are applied in the fields of therapeutics and diagnostics.

Most often nucleobases are modified at the positions C5 of pyrimidines and C7 of 7-deazapurines. This ensures correct Watson-Crick base pairing and minimal enzymatic interference. Little is known about modifications at the positions N^6 and O^6 of purines and N^4 and O^4 of pyrimidines thus the aim of this study was to synthesize N^4 -amino acid modified

nucleoside 5'-triphosphates and study them as substrates for DNA polymerases. To achieve this goal the following tasks have been formed:

- To synthesize Boc-protected N^4 -amino acid modified 2'-deoxycytidine nucleosides.
- To synthesize deprotected N^4 -amino acid modified 2'-deoxycytidine nucleosides.
- To phosphorylate N^4 -modified 2'-deoxycytidine nucleosides into nucleoside 5'-triphosphates.
- To investigate the synthesized nucleotides as substrates for enzymatic DNA synthesis.

In total 15 new and uncharacterized compounds were synthesized, three of which were N^4 -acyl-Boc-2'-deoxycytidines (1-3) and four of which were N -(4-(2'-deoxycytidinyl))acylamides (5-8) (compound 4 (N^4 -phenylalaninoyl-Boc-2'-deoxycytidine) was synthesized by colleague T. Varnas). All of the compounds were phosphorylated into nucleoside 5'-triphosphates using Yoshikawa procedure and used as substrates for DNA polymerase-mediated deoxynucleic acid synthesis. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) incorporated all of the synthesized nucleotides (9-16) into DNA, the best substrates being N^4 -acyl-Boc-2'-deoxycytidine 5'-triphosphates. Likewise, DNA polymerase ϕ 29 successfully utilized all of the compounds for primer extension reactions but to determine which of the substrates were the best additional experiments have to be made.

Literatūros šaltiniai

- 1 Skulachev, V. P. The Laws of Cell Energetics. *European Journal of Biochemistry* **208**, 203-209 (1992).
- 2 Bennun, A. Hypothesis for Coupling Energy Transduction with ATP Synthesis or ATP Hydrolysis. *Nature New Biology* **233**, 5-8 (1971).
- 3 Ranson, N. A., Clare, D. K., Farr, G. W., Houldershaw, D. & Horwich, A. R. Allosteric Signaling of ATP Hydrolysis in GroEL-GroES Complexes. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 147-152 (2006).
- 4 Shimon, L., Hynes, G. M., McCormack, E. A., Wilison, K. R. & Horovitz, A. ATP-Induced Allostery in the Eukaryotic Chaperonin CCT Is Abolished by the Mutation G345D in CCT4 that Renders Yeast Temperature-Sensitive for Growth. *Journal of Molecular Biology* **377**, 469-477 (2008).
- 5 Musheshe, N., Schmidt, M. & Zaccolo, M. cAMP: From Long-Range Second Messenger to Nanodomain Signalling. *Trends in Pharmacological Sciences* **39**, 209-222 (2018).
- 6 Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. Bacterial Second Messengers, cGMP and c-di-GMP, in a Quest for Regulatory Dominance. *The EMBO Journal* **32**, 2421-2423 (2013).
- 7 Joosten, V. & Berkel, W. J. v. Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 195-202 (2007).
- 8 Macheroux, P., Kappes, B. & Ealick, S. E. Flavogenomics - A Genomic and Structural View of Flavin-Dependent Proteins. *FEBS Journal* **278**, 2625-2634 (2011).
- 9 Gossmann, T. I. *et al.* NAD(+) Biosynthesis and Salvage - A Phylogenetic Perspective. *FEBS Journal* **279**, 3355-3363 (2012).
- 10 Menendez-Arias, L., Alvarez, M. & Pacheco, B. Nucleoside/Nucleotide Analog Inhibitors of Hepatitis B Virus Polymerase: Mechanism of Action and Resistance. *Current Opinion in Virology* **8**, 1-9 (2014).
- 11 Hirao, I. *et al.* An Unnatural Hydrophobic Base Pair System: Site-Specific Incorporation of Nucleotide Analogs into DNA and RNA. *Nature Methods* **3**, 729-735 (2006).
- 12 Schowalter, D. B. & Sommer, S. S. The Generation of Radiolabeled DNA and RNA Probes with Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* **177**, 90-94 (1989).

- 13 Anderson, J. P., Angerer, B. & Loeb, L. A. Incorporation of Reporter-Labeled Nucleotides by DNA Polymerases. *BioTechniques* **38**, 257-264 (2005).
- 14 Lao, Y., Phua, K. K. L. & Leong, K. W. Aptamer Nanomedicine for Cancer Therapeutics: Barriers and Potential for Translation. *ACS Nano* **9**, 2235-2254 (2015).
- 15 Chen, K. *et al.* Advances in the Development of Aptamer Drug Conjugates for Targeted Drug Delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **9**, Epub 1438 (2016).
- 16 Fraser, L. A. *et al.* A Portable Microfluidic Aptamer-Tethered Enzyme Capture (APTEC) Biosensor for Malaria Diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics* **100**, 591-596 (2018).
- 17 Liang, C. *et al.* Tumor Cell-Targeted Delivery of CRISPR/Cas9 by Aptamer-Functionalized Lipopolymer for Therapeutic Genome Editing of VEGFA in Osteosarcoma. *Biomaterials* **147**, 68-85 (2017).
- 18 Zhang, M. *et al.* An Aptamer Biosensor for Leukemia Marker mRNA Detection Based on Polymerase-Assisted Signal Amplification and Aggregation of Illuminator. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **411**, 139-146 (2019).
- 19 Maeda, K. *et al.* A Nucleoside Anticancer Drug, 1-(3-C-Ethynyl- β -D-Ribopentofuranosyl)Cytosine, Induces Depth-Dependent Enhancement of Tumor Cell Death in Spread-Out Bragg Peak (SOBP) of Proton Beam. *PLOS ONE* **11**, Epub0166848 (2016).
- 20 Cavaliere, A., Probst, K. C., Westwell, A. D. & Slusarczyk, M. Fluorinated Nucleosides as an Important Class of Anticancer and Antiviral Agents. *Future Medicinal Chemistry* **9**, 1809-1833 (2017).
- 21 Schutter, C. D., Ehteshami, M., Hammond, E. T., Amblard, F. & Schinazi, R. F. Metabolism of Nucleosides and Nucleotides Prodrugs. *Current Pharmaceutical Design* **23**, 6984-7002 (2017).
- 22 Gollnest, T. *et al.* Membrane-Permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues. *Angewandte Chemie* **55**, 5255-5258 (2016).
- 23 Sirivolu, V. R. *et al.* Clicking 3'-Azidothymidine into Novel Potent Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Medicinal Chemistry* **56**, 8765-8780 (2013).
- 24 Robak, T. New Nucleoside Analogs for Patients with Hematological Malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **20**, 343-359 (2011).

- 25 Bernabeu-Wittel, M. *et al.* Infections in Renal Transplant Recipients Receiving Mycophenolate Versus Azathioprine-Based Immunosuppression. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**, 173-180 (2002).
- 26 Wagner, M. *et al.* Mycophenolic Acid Versus Azathioprine as Primary Immunosuppression for Kidney Transplant Recipients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **12**, CD007746 (2015).
- 27 Barhate, N., Cekan, P., Massey, A. P. & Sigurdsson, S. T. A Nucleoside That Contains a Rigid Nitroxide Spin Label: A Fluorophore in Disguise. *Angewandte Chemie* **46**, 2655-2658 (2007).
- 28 Riedl, J., Pohl, R., Rulisek, L. & Hocek, M. Synthesis and Photophysical Properties of Biaryl-Substituted Nucleos(t)ides. Polymerase Synthesis of DNA Probes Bearing Solvatochromic and pH-Sensitive Dual Fluorescent and ¹⁹F NMR Labels. *Journal of Organic Chemistry* **77**, 1026-1044 (2012).
- 29 Hottin, A. & Marx, A. Structural Insights into the Processing of Nucleobase-Modified Nucleotides by DNA Polymerases. *Accounts of Chemical Research* **49**, 418-427 (2016).
- 30 Bentley, D. R. *et al.* Accurate Whole Human Genome Sequencing Using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* **456**, 53-59 (2008).
- 31 Harris, T. D. *et al.* Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome. *Science* **320**, 106-109 (2008).
- 32 Wang, T., Chen, C., Larcher, L. M., Barrero, R. A. & Veedu, R. N. Three Decades of Nucleic Acid Aptamer Technologies: Lessons Learned, Progress and Opportunities on Aptamer Development. *Biotechnology Advances* **37**, 28-50 (2019).
- 33 Zhou, W. *et al.* A New Small Cell Lung Cancer Biomarker Identified by Cell-SELEX Generated Aptamers. *Experimental Cell Research* **382**, Epub111478 (2019).
- 34 Bing, T., Zhang, N. & Shanguan, D. Cell-SELEX, an Effective Way to the Discovery of Biomarkers and Unexpected Molecular Events. *Advanced Biosystems* **3**, Epub1900193 (2019).
- 35 Kielkowski, P., Fanfrlik, J. & Hocek, M. 7-Aryl-7-deazaadenine 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates (dNTPs): Better Substrates for DNA Polymerases than dATP in Competitive Incorporations. *Angewandte Chemie* **53**, 7552-7555 (2014).

- 36 Bergen, K. *et al.* Structures of KlenTaq DNA Polymerase Caught While Incorporating C5-Modified Pyrimidine and C7-Modified 7-Deazapurine Nucleoside Triphosphates. *Journal of American Chemical Society* **134**, 11840-11843 (2012).
- 37 Hofler, K., Sarac, I. & Meier, C. Synthesis of C8-*N*-Arylamine-Modified 2'-Deoxyguanosine-5'-Triphosphates and Their Effects on Primer Extension by DNA Polymerases. *ChemBioChem* **16**, 2046-2053 (2015).
- 38 Boge, N. *et al.* Synthesis of DNA Strands Site-Specifically Damaged by C8-Arylamine Purine Adducts and Effects on Various DNA Polymerases. *Chemistry: A European Journal* **14**, 11194-11208 (2008).
- 39 Cahova, H. *et al.* Synthesis of 8-Bromo-, 8-Methyl- and 8-Phenyl-dATP and Their Polymerase Incorporation into DNA. *Organic and Biomolecular Chemistry* **6**, 3657-3660 (2008).
- 40 Basu, K. & Essigmann, J. M. Site-Specifically Alkylated Oligodeoxynucleotides: Probes for Mutagenesis, DNA Repair and the Structural Effects of DNA Damage. *Mutation Research* **233**, 189-201 (1990).
- 41 Stern, L. & Schulman, L. H. The Role of the Minor Base *N*⁴-Acetylcytidine in the Function of the *Escherichia coli* Noninitiator Methionine Transfer RNA. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 6132-6139 (1978).
- 42 Jakubovska, J., Tauraitė, D., Birštonas, L. & Meškys, R. *N*⁴-Acyl-2'-Deoxycytidine-5'-Triphosphates for the Enzymatic Synthesis of Modified DNA. *Nucleic Acids Research* **46**, 5911-5923 (2018).
- 43 Kobori, A., Miyata, K., Ushioda, M., Seio, K. & Sekine, M. A New Method for the Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Containing 4-*N*-Alkoxy-carbonyldeoxycytidine Derivatives and Their Hybridization Properties. *Journal of Organic Chemistry* **67**, 476-485 (2002).
- 44 Nedderman, A. N. R., Stone, M. J., Lin, P. K. T., Brown, D. M. & Williams, D. H. Base Pairing of Cytosine Analogues with Adenine and Guanine in Oligonucleotide Duplexes: Evidence for Exchange Between Watson–Crick and Wobble Base Pairs Using ¹H NMR Spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **19**, 1357-1359 (1991).
- 45 Lednicer, D. *The Organic Chemistry of Drug Synthesis, Volume 7.* (2007).

- 46 Hagler, A. T. & Lifson, S. Energy Functions for Peptides and Proteins. II. Amide Hydrogen Bond and Calculation of Amide Crystal Properties. *Journal of the American Chemical Society* **96**, 5327-5335 (1974).
- 47 Pitzer, J. & Steiner, K. Amides in Nature and Biocatalysis. *Journal of Biotechnology* **235**, 32-46 (2016).
- 48 Leggio, A. *et al.* One-Pot Synthesis of Amides from Carboxylic Acids Activated Using Thionyl Chloride. *RSC Advances* **6**, 34468-34475 (2016).
- 49 Boersch, C., Merkul, E. & Muller, T. J. J. Catalytic Syntheses of *N*-Heterocyclic Ynones and Ynediones by *In Situ* Activation of Carboxylic Acids with Oxalyl Chloride. *Angewandte Chemie* **50**, 10448-10452 (2011).
- 50 Cade, J. A. & Gerrard, W. Interaction of Carboxylic Acids With Phosphorus Trichloride, or Butyl Phosphorodichloridite, or the Chloridite in the Absence, and in the Presence of Pyridine. *Journal of Chemical Society*, 2030-2034 (1954).
- 51 Mittelbach, M. An Easy and Convenient Synthesis of 6-Methyl-4(1H)-pyridone-3-carboxylic Acid. *Synthesis* **6**, 479-480 (1988).
- 52 Ragnarsson, U. & Grehn, L. Novel Amine Chemistry Based on DMAP-Catalyzed Acylation. *Accounts of Chemical Research* **31**, 494-501 (1998).
- 53 Selinger, Z. & Lapidot, Y. Synthesis of Fatty Acid Anhydrides by Reaction with Dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Lipid Research* **7**, 174-175 (1966).
- 54 Vaughan, J. R. & Osato, R. L. Preparation of Peptides Using Mixed Carboxylic Acid Anhydrides. *Journal of the American Chemical Society* **73**, 5553-5555 (1951).
- 55 Gooßen, L. J. & Ghosh, K. Palladium-Catalyzed Synthesis of Aryl Ketones from Boronic Acids and Carboxylic Acids Activated in situ by Pivalic Anhydride. *European Journal of Organic Chemistry* **2002**, 3254-3267 (2002).
- 56 Kalir, R., Warshawsky, A., Fridkin, M. & Patchornik, A. New Useful Reagents for Peptide Synthesis. Insoluble Active Esters of Polystyrene-Bound 1-Hydroxybenzotriazole. *European Journal of Biochemistry* **59**, 55-61 (1975).
- 57 Gangwar, S., Pauletti, G. M., Siahaan, T. J., Stella, V. J. & Borchardt, R. T. Synthesis of a Novel Esterase-Sensitive Cyclic Prodrug of a Hexapeptide Using an (Acyloxy)alkoxy Promoiety. *Journal of Organic Chemistry* **62**, 1356-1362 (1997).

- 58 Atherton, E., Cameron, L. R. & Sheppard, R. C. Peptide Synthesis : Part 10. Use of Pentafluorophenyl Esters of Fluorenylmethoxycarbonylamino Acids in Solid Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron* **44**, 843-857 (1988).
- 59 Rajappan, V. P. & Hosmane, R. S. Pentafluorophenol: A Superior Reagent for Condensations in Heterocyclic Chemistry. *Synthetic Communications* **28**, 753-764 (1998).
- 60 Kisfaludy, L. *et al.* Immuno-Regulating Peptides, I. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Thymopentin Analogs. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **364**, 933-940 (1983).
- 61 Anderson, G. W., Zimmerman, J. E. & Callahan, F. M. *N*-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 3039-3039 (1963).
- 62 Ragnarsson, U. & Grehn, L. Dual Protection of Amino Functions Involving Boc. *RSC Advances* **3**, 18691-18697 (2013).
- 63 Mohapatra, D. K. & Datta, A. Di-*tert*-butyl Dicarboxylate: A Novel Reagent for the Efficient Synthesis of Dipeptides under Mild Conditions. *Journal of Organic Chemistry* **64**, 6879-6880 (1999).
- 64 Schelhaas, M. & Waldmann, H. Protecting Group Strategies in Organic Synthesis. *Angewandte Chemie* **35**, 2056-2083 (1996).
- 65 Greene, T. W. & Wuts, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed. *John Wiley & Sons* (2005).
- 66 Han, G., Tamaki, M. & Hruby, V. J. Fast, Efficient and Selective Deprotection of the *Tert*-Butoxycarbonyl (Boc) Group Using HCl/Dioxane (4 M). *Journal of Peptide Research* **58**, 338-341 (2001).
- 67 Ravinder, K., Reddy, A. V., Mahesh, K. C., Narasimhulu, M. & Venkateswarlu, Y. Simple and Selective Removal of the *t*-Butyloxycarbonyl (Boc) Protecting Group on Indoles, Pyrroles, Indazoles, and Carbolines. *Synthetic Communications* **37**, 281-287 (2007).
- 68 Wang, G., Li, C., Li, J. & Jia, X. Catalyst-Free Water-Mediated *N*-Boc Deprotection. *Tetrahedron Letters* **50**, 1438-1440 (2009).
- 69 Wang, J., Liang, Y. & Qu, J. Boiling Water-Catalyzed Neutral and Selective *N*-Boc Deprotection. *Chemical Communications* **34**, 5144-5146 (2009).

- 70 Fangming, J., Zhouyu, Z., Heiji, E., Takehiko, M. & Hisao, H. Conversion Mechanism of Cellulosic Biomass to Lactic Acid in Subcritical Water and Acid–base Catalytic Effect of Subcritical Water. *Chemistry Letters* **33**, 126-127 (2004).
- 71 Shelton, J. *et al.* Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chemical Reviews* **116**, 14379-14455 (2016).
- 72 Seley-Radtke, K. L. & Yates, M. K. The Evolution of Nucleoside Analogue Antivirals: A Review for Chemists and Non-Chemists. Part 1: Early Structural Modifications to the Nucleoside Scaffold. *Antiviral Research* **154**, 66-86 (2018).
- 73 Noble, S. & Goa, K. L. Gemcitabine. *Drugs* **54**, 447-472 (1997).
- 74 Zhang, D. *et al.* Facile Rearrangement of N^4 -(α -Aminoacyl)cytidines to N -(4-Cytidinyl)amino Acid Amides. *Tetrahedron Letters* **49**, 2052-2055 (2008).
- 75 Yoshikawa, M., Kato, T. & Takenishi, T. Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **42**, 3505-3508 (1969).
- 76 Gillerman, I. & Fischer, B. An Improved One-Pot Synthesis of Nucleoside 5'-Triphosphate Analogues. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **29**, 245-256 (2010).
- 77 Zatorski, A., Goldstein, B. M., Colby, T. D., Jones, J. P. & Pankiewicz, K. W. Potent Inhibitors of Human Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type II. Fluorine-Substituted Analogs of Thiazole-4-carboxamide Adenine Dinucleotide. *Journal of Medicinal Chemistry* **38**, 1098-1105 (1995).
- 78 Kovacs, T. & Otvos, L. Simple Synthesis of 5-Vinyl- and 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphates. *Tetrahedron Letters* **29**, 4525-4528 (1988).
- 79 Kore, A. R., Shanmugasundaram, M., Senthilvelan, A. & Srinivasan, B. An Improved Protection-Free One-Pot Chemical Synthesis of 2'-Deoxynucleoside-5'-Triphosphates. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **31**, 423-431 (2012).
- 80 Shanmugasundaram, M., Senthilvelan, A., Xiao, Z. & Kore, A. R. An Efficient Protection-Free One-Pot Chemical Synthesis of Modified Nucleoside-5'-Triphosphates. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **35**, 356-362 (2016).
- 81 Ludwig, J. & Eckstein, F. Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-

- 4H-1,3,2-Benzodioxaphosphorin-4-one. *Journal of Organic Chemistry* **54**, 631-635 (1989).
- 82 Hollenstein, M. Synthesis of Deoxynucleoside Triphosphates that Include Proline, Urea, or Sulfonamide Groups and Their Polymerase Incorporation into DNA. *Chemistry: A European Journal* **18**, 13320-13330 (2012).
- 83 Hollenstein, M., Wojciechowski, F. & Leumann, C. J. Polymerase Incorporation of Pyrene-Nucleoside Triphosphates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 4428-4430 (2012).
- 84 Wu, W., Meyers, C. L. F. & Borch, R. F. A Novel Method for the Preparation of Nucleoside Triphosphates from Activated Nucleoside Phosphoramidates. *Organic Letters* **24**, 2257-2260 (2004).
- 85 Clark, M. K. *et al.* Synthesis, Biochemical, and Cellular Evaluation of Farnesyl Monophosphate Prodrugs as Farnesyltransferase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **50**, 3274-3282 (2007).
- 86 Wu, W., Sigmond, J., Peters, G. J. & Borch, R. F. Synthesis and Biological Activity of a Gemcitabine Phosphoramidate Prodrug. *Journal of Medicinal Chemistry* **50**, 3743-3746 (2007).
- 87 Liao, J., Bala, S., Ngor, A. K., Yik, E. J. & Chaput, J. C. P(V) Reagents for the Scalable Synthesis of Natural and Modified Nucleoside Triphosphates. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 13286-13289 (2019).
- 88 Bala, S., Liao, J., Mei, H. & Chaput, J. C. Synthesis of α -l-Threofuranosyl Nucleoside 3'-Monophosphates, 3'-Phosphoro(2-Methyl)imidazolides, and 3'-Triphosphates. *Journal of Organic Chemistry* **82**, 5910-5916 (2017).
- 89 Braithwaite, D. K. & Ito, J. Compilation, Alignment, and Phylogenetic Relationships of DNA Polymerases. *Nucleic Acids Research* **21**, 787-802 (1993).
- 90 Motea, E. A. & Berdis, A. J. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: The Story of a Misguided DNA Polymerase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1804**, 1151-1166 (2010).
- 91 Desiderio, S. V. *et al.* Insertion of N Regions into Heavy-Chain Genes is Correlated with Expression of Terminal Deoxytransferase in B Cells. *Nature* **311**, 751-755 (1984).
- 92 Ono, K. Inhibitory Effects of Various 2',3'-Dideoxynucleoside 5'-Triphosphates on the Utilization of 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphates by Terminal

- Deoxynucleotidyltransferase from Calf Thymus. *Biochimica et Biophysica Acta* **1049**, 15-20 (1990).
- 93 Arzumanov, A. A., Victorova, L. S., Jasko, M. V., Yesipov, D. S. & Krayevsky, A. A. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Catalyzes the Reaction of DNA Phosphorylation. *Nucleic Acids Research* **28**, 1276-1281 (2000).
- 94 Sosunov, V. V. *et al.* Stereochemical Control of DNA Biosynthesis. *Nucleic Acids Research* **28**, 1170-1175 (2000).
- 95 Krayevsky, A. A., Victorova, L. S., Arzumanov, A. A. & Jasko, M. V. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: Catalysis of DNA (Oligodeoxynucleotide) Phosphorylation. *Pharmacology and Therapeutics* **85**, 165-173 (2000).
- 96 Lebon, C. *et al.* On the Use of an Appropriate TdT-Mediated dUTP–Biotin Nick End Labeling Assay to Identify Apoptotic Cells. *Analytical Biochemistry* **480**, 37-41 (2015).
- 97 Trainor, G. L. & Jensen, M. A. A Procedure for the Preparation of Fluorescence-Labeled DNA with Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *Nucleic Acids Research* **16**, 11846 (1988).
- 98 Gorczyca, W., Gong, J. & Darzynkiewicz, Z. Detection of DNA Strand Breaks in Individual Apoptotic Cells by the *in situ* Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation Assays. *Cancer Research* **53**, 1945-1951 (1993).
- 99 Mullis, K. *et al.* Specific Enzymatic Amplification of DNA *in Vitro*: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273 (1986).
- 100 Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G. & Kubista, M. A New Minor Groove Binding Asymmetric Cyanine Reporter Dye for Real-Time PCR. *Nucleic Acids Research* **31**, e45 (2003).
- 101 Ahmad, A. I. & Ghasemi, J. B. New FRET Primers for Quantitative Real-Time PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 2737-2743 (2007).
- 102 Davidson, J. F., Fox, R., Harris, D. D., Lyons-Abbott, S. & Loeb, L. A. Insertion of the T3 DNA Polymerase Thioredoxin Binding Domain Enhances the Processivity and Fidelity of *Taq* DNA Polymerase. *Nucleic Acids Research* **31**, 4702-4709 (2003).
- 103 Pavlov, A. R., Belova, G. I., Kozyavkin, S. A. & Slesarev, A. I. Helix–Hairpin–Helix Motifs Confer Salt Resistance and Processivity on Chimeric DNA Polymerases.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13510-13515 (2002).
- 104 Wang, Y. *et al.* A Novel Strategy to Engineer DNA Polymerases for Enhanced Processivity and Improved Performance *in Vitro*. *Nucleic Acids Research* **32**, 1197-1207 (2004).
- 105 Barnes, W. M. & Rowlyk, K. R. Magnesium Precipitate Hot Start Method for PCR. *Molecular and Cellular Probes* **16**, 167-171 (2002).
- 106 Lebedev, A. V. *et al.* Hot Start PCR with Heat-Activatable Primers: a Novel Approach for Improved PCR Performance. *Nucleic Acids Research* **36**, e131 (2008).
- 107 Kim, J. & Easley, C. J. Isothermal DNA Amplification in Bioanalysis: Strategies and Applications. *Bioanalysis* **3**, 227-239 (2011).
- 108 Bachmann, L. H. *et al.* Nucleic Acid Amplification Tests for Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Rectal Infections. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 1827-1832 (2010).
- 109 Tanner, N. A., Zhang, Y. & Evans, T. C. Simultaneous Multiple Target Detection in Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification. *BioTechniques* **53**, 81-89 (2012).
- 110 Kumar, G., Garnova, E., Reagin, M. & Vidali, A. Improved Multiple Displacement Amplification with phi29 DNA Polymerase for Genotyping of Single Human Cells. *BioTechniques* **44**, 879-890 (2008).
- 111 Haible, D., Kober, S. & Jeske, H. Rolling Circle Amplification Revolutionizes Diagnosis and Genomics of Geminiviruses. *Journal of Virological Methods* **135**, 9-16 (2006).
- 112 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467 (1977).
- 113 Fuller, C. W., McArdle, B. F., Griffin, A. M. & Griffin, H. G. DNA Sequencing Using Sequenase Version 2.0 T7 DNA Polymerase. *Basic DNA and RNA Protocols. Methods in Molecular Biology* **58**, 373-387 (1996).
- 114 Prober, J. M. *et al.* A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. *Science* **238**, 336-341 (1987).
- 115 Swerdlow, H. & Gesteland, R. Capillary Gel Electrophoresis for Rapid, High Resolution DNA Sequencing. *Nucleic Acids Research* **18**, 1415-1419 (1990).

- 116 Chen, F. *et al.* The History and Advances of Reversible Terminators Used in New Generations of Sequencing Technology. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* **11**, 34-40 (2013).
- 117 Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of Age: Ten Years of Next-Generation Sequencing Technologies. *Nature Reviews Genetics* **17**, 333-351 (2016).
- 118 Smith, G. P., Bailey, D. M. D., Sanhes-Kuiper, R. M., Swerdlow, H. & Earnshaw, D. J. Modified Polymerases for Improved Incorporation of Nucleotide Analogues. **Patent US 20160362664 A1** (2016).
- 119 Quail, M. A. *et al.* A Tale of Three Next Generation Sequencing Platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq Sequencers. *BMC Genomics* **13** (2012).
- 120 Rothberg, J. M. *et al.* An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-Optical Genome Sequencing. *Nature* **475**, 348-352 (2011).
- 121 Eid, J. *et al.* Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* **323**, 133-138 (2009).
- 122 Laszlo, A. H. *et al.* Decoding Long Nanopore Sequencing Reads of Natural DNA. *Nature Biotechnology* **32**, 829-833 (2014).