

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
POLIMERŲ CHEMIJOS KATEDRA

Julija Dabužinskaitė
Pagrindinių studijų programa Chemija – 2 kursas

**Modifikuotų uracilo ir citozino nukleozidų bei nukleotidų
sintezė ir jų tyrimas**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovė:
Dr. D. Tauraitė

Darbas atliktas VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Vilnius, 2016

TURINYS

ĮVADAS	3
SANTRUMPŲ PAAIŠKINIMAI	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1 Nukleozidų sintezė	6
1.1.1. Hidroksių grupių blokavimo reakcija.....	6
1.1.2. Tiogrupės įvedimo reakcija.....	7
1.2. Nukleotidų sintezė.....	9
1.3. Hidrazinų sintezė	12
1.4. Hidrazonų sintezė	14
1.5. Modifikuotų nukleotidų biocheminiai tyrimai	15
2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA	18
2.1. Prietaisų sąrašas	18
2.2. Nukleozidų sintezė	19
2.2.1. Acetilavimo reakcija.....	19
2.2.2. Tiogrupės įvedimo reakcija	20
2.2.3. Deblokavimo reakcija	21
2.3. Nukleotidų sintezė	21
2.3. Hidrazinų sintezė	24
2.4. Hidrazonų sintezė.....	26
2.6. Biocheminiai tyrimai.....	28
2.6.1. Oligonukleotido pažymėjimas ³³ P ir sulydymas su nežymėta DNR matrica.....	28
2.6.2. Pradmens prailginimo reakcija	28
2.6.3. Radioaktyvių DNR fragmentų elektroforetinis frakcionavimas	28
3. REZULTATI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1. Nukleozidų sintezė	29
3.2. Nukleotidų sintezė	32
3.3. Hidrazinų sintezė	33
3.4. Hidrazonų sintezė	36
3.5. Oligonukleotidų ilginimo reakcija	37
IŠVADOS	40
SANTRAUKA UŽSIENIO KALBA	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS	43

ĮVADAS

Nukleozidų 5'-trifosfatai yra labai svarbi biologinių sistemų junginių klasė, turinti platų pritaikymą įvairiose srityse. Natūraliai susidarantys deoksiribo- ir ribonukleozidų trifosfatai yra pagrindiniai DNR ir RNR baltyminės sintezės statybiniai blokai *in vivo* ir *in vitro* [1], lemiantys tokius procesus kaip DNR replikacija, transkripcija ir transliacija [2]. Modifikuoti nukleozidų trifosfatai tiriami kaip potencialūs terapiniai ir diagnostiniai agentai bei naudojami biocheminių ir farmakologinių procesų analizėje. Nukleotidai ir jų dariniai yra svarbi antivirusinių ir priešvėžinių vaistų klasė. Pastaruoju metu jie tapo genų terapijos, biologinių tyrimų ir modernios DNR sekoskaitos cheminių technologijų plėtojimų objektu, taip pat pasitarnavo cheminio karcinogenezės molekulinio mechanizmo ištyrimui bei DNR pažaidų taisymo technologijose. Nukleotidai taip pat naudojami maisto industrijoje, kaip skonio stiprikliai [3].

Nepaisant nukleotidų svarbos biologijoje ir medicinoje, komerciškai galimų trifosfatų įvairovė - ribota, nes yra apsunkinti šių junginių sintezė ir gryninimas [2]. Susidomėjimas 5'-nukleotidais paskatino plačiau išnagrinėti jų sintezę. Taikomi keturi pagrindiniai 5'-nukleotidų sintezės metodai: (1) fermentacija, naudojant mikroorganizmus. Šiuo metodu, nukleotidai gana sunkiai gaunami per ląstelės membraną dėl jų didelio poliškumo, kuris kartu apsunkina ir gryninimą; (2) fermentiniu metodu. Mikrobu ir augalų nukleozidų fosfotransferazės yra plačiausiai pritaikomos kaip nukleotidų sintezės biokatalizatoriai organinių fosfatų fosfatinės grupės pavertimui į nukleotidus. Šį metodą paprastai riboja siauras fermentų specifiskumas, reakcijų grįžtamumas ar reakcijos slopinimas dėl didelio fosfatų donorų perteklių naudojimo; (3) RNR enzimizė. Šiandien tai yra labiausiai ištirtas metodas, bet vis dar nepavyksta išvengti reakciją limituojančių faktorių, tokių kaip: ilgas produkto susidarymo ciklas, komplikotas atskyrimo ir gryninimo procesas, didelė kaina; ir (4) cheminės sintezės (Yoshikawa's) metodas, skirstomas į dvi stadijas. Pirmiausiai, fosforilinimo reagentu selektyviai fosforilinimos nukleozido 5'-hidroksi grupės, paskui vyksta fosforilchlorido hidrolizė, gaunant norimą 5'-nukleotidą [3]. Ši sintezė negali būti pritaikyta nukleozidų analogams, sudarytiems iš modifikuotų bazių, jautrių Yoshikawa's fosforilinimo procedūrai. Kaip alternatyva plačiai naudojami vienstadijiniai nukleotidų sintezės metodai, susidarant aktyvuotiems nukleozidų monofosfatams, tokiems kaip fosforamidatai, morfolidatai ar imidazolidatai, kurie vėliau reaguoja su pirofosfatais ir taip susintetinami nukleotidai [1].

Literatūroje pateikiama dar viena naujai besivystanti nukleotidų pritaikymo sritis. Tai - aptamerų, kitaip dar vadinamų cheminių antikūnų, sintezė. Aptamerai pasižymi unikalia galimybe suformuoti antrines ir tretines konformacijas, dėl kurių plačiai taikomi pagrindiniuose biomediciniuose tyrimuose, ligų diagnostikoje ir vaistų gabenime.

Aptamerai - viengrandžiai oligonukleotidai, sudaryti iš dešimčių nukleotidų sekos. Jie suformuoja 3 D struktūrą iš susijungusių nukleorūgščių (paprastai 20 - 60 bazių). DNR ir RNR aptamerai turi tvarkingą ketvirtinę struktūrą, kuri leidžia jiems suformuoti stabilius ir specifinius kompleksus su skirtingais taikiniai, tokiais kaip: proteinais, nukleorūgštys ir mažos molekulės. Aptamerų taikinių atpažinimo galimybės yra panašios, kaip ir antikūnų, tačiau išskiriami keli jų pranašumai: nesudėtinga didelių kiekių sintezė, priimtina proceso sąnaudų kaina, platus taikinių molekulių pasirinkimas: metalų jonai, toksinai, enzimai, proteinais, virusai, bakterijos ir pavienės ląstelės. Taip pat jie pasižymi nedidele molekuline mase, akivaizdžiu imunogeniškumu, yra lengvai modifikuojami ir gryninami, didelė įvairovė ir specifiškumas, stiprus ryšys tarp aptamero ir taikinio molekulės. Prognozuojama, jog aptamerai bus taikomi terapijoje, biojutikliuose, diagnostikoje ir dar daugelyje kitų sričių. Šios teigiamos savybės, lyginant su antikūnais, atveria plačias galimybes panaudoti juos biologijos, chemijos ir medicininiais tikslais. Pavyzdžiui, naudojant aptamerus ieškoma naujų daugeliui vėžio tipų tinkančių biomarkerių, kurie pagerintų ankstyvą diagnostiką ir terapines intervencijas.

Atsižvelgiant į plačias nukleotidų pritaikymo galimybes buvo suformuluotas darbo tikslas: Įvairių 4-oje padėtyje pakeistų uracilo ir citozino junginių sintezės būdų paieška ir panaudojimas biocheminiuose tyrimuose, tikrinant jų kaip natūralių nukleotidų analogų veikimą DNR sintezės reakcijose.

Šiam tikslui pasiekti buvo keliami tokie uždaviniai:

- Uracilo nukleozidų ir nukleotidų sintezė;
- Citozino nukleozidų ir nukleotidų sintezė;
- Susintetintų junginių biocheminiai tyrimai.

SANTRUMPŲ PAAIŠKINIMAI

DNR - deoksiribonukleorūgštis
RNR - ribonukleino rūgštis
TEA - trietilaminas
THF - tetrahidrofuranas
HOBT - hidroksibenzotriazolas
LiHDMS - ličio bis(trimetilsilil)amidas
DMAP - 4-dimetilamino piridinas
TBAPF - tributilamoniopiro fosfatas
HPLC - didelio efektyvumo skysčių chromatografija
MS - masių spektroskopija
TBA - tributilaminas
TFA - trifluoracto rūgštis
BMR - branduolių magnetinis rezonansas
DBU - 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undecenas-7
PGR - polimerazės grandininė reakcija
dC - deoksicitidinas
TMF - trimetilfosfatas
TLC - plonasluoksnė chromatografija
APS - amonio persulfatas
TEMED - tetrametietilendiamidas
TBE - tetrabrometanas

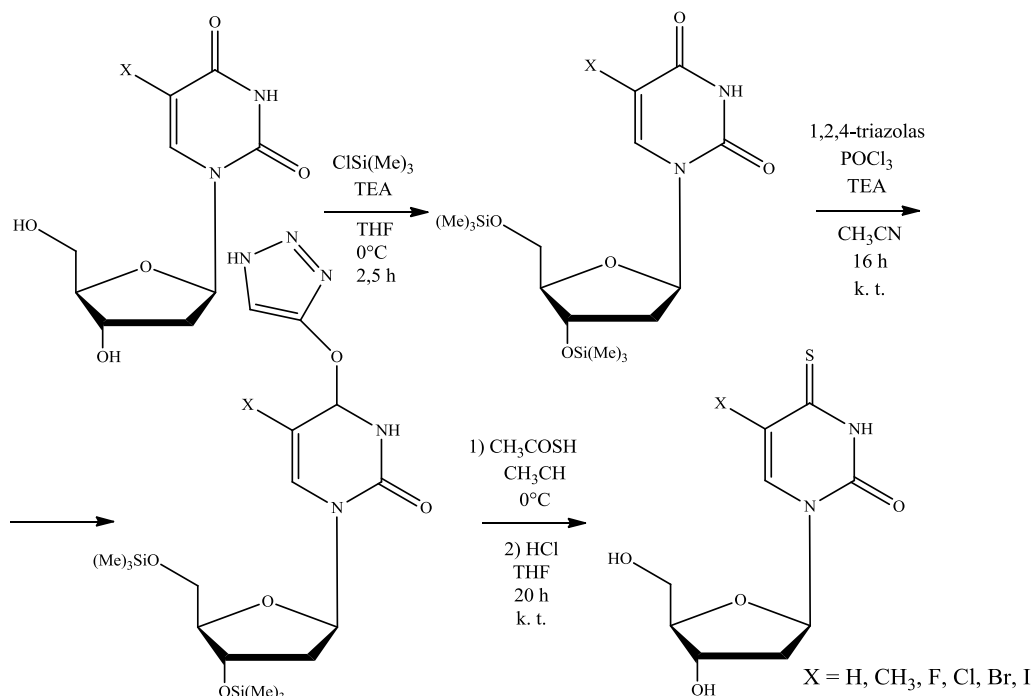
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nukleozidų sintezė

1.1.1. Hidroksigrupių blokavimas

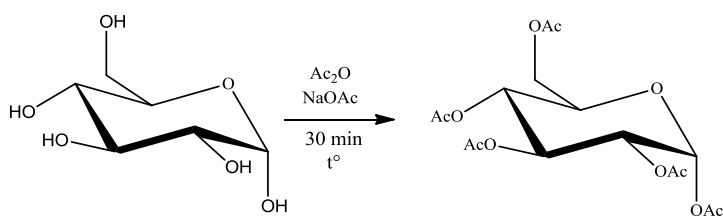
4-Tio-2'-deosiridino sintezės metu N⁴-oje padėtyje esančią oksogrupę keičiant tiogrupe būtina atsižvelgti į 2'-deoksiridino hidroksigrupių aktyvumą. Norint išvengti hidroksigrupių pašalinių reakcijų, į 2'-deoksiridiną įvedant tiogrupę, būtina rasti efektyvų būdą minėtųjų funkcinių grupių blokavimui.

Literatūroje randamas ne vienas būdas kaip apsaugoti ribozės žiedo hidroksigrupes.



1 Schema - 4-tio-5-pakeistų-2'-deoksiridinių sintezė [5]

Schemoje 1 pateikta tio grupę turinčio nukleozido gavimo reakcija [5]. Pirmoje šios reakcijos stadijoje deoksiridinas bei 5-oje padėtyje metilinti arba halogeninti jo dariniai tirpinami THF ir paveikiami trimetilchlorsilanu su lengvai nueinančiu chlorido jonu. Susidariusiam vandenilio chlorido neutralizavimui į reakcijos mišinį pridedama trietilamino. Egzoterminė reakcija šaldant 0°C temperatūroje vykdoma 2,5 h. Taip gaunami tarpiniai 3',5'-bis-(trimetilsilil)-5-pakeisti-2'-deoksiridiniai, galintys dalyvauti tolimesnėse tiogrupės įvedimo reakcijose.

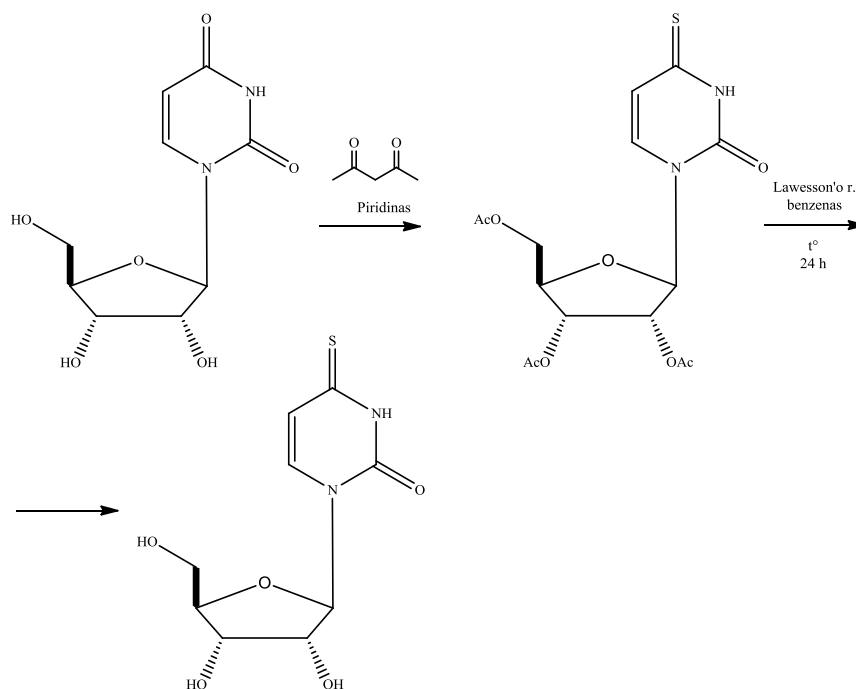


2 Schema - D-gliukozės acetilinimo reakcija [6]

Acetilinimas - kitas efektyvus būdas, skirtas hidroksigrupių blokavimui. Antroje schemeje pateikta D-gliukozės acetilinimo reakcija acto rūgšties anhidridu, dalyvaujant natrio acetatui [6]. Taip hidroksigrupių vandeniliai pakeičiami acetilo grupėmis. Pasiremiant šia reakcijos schema galima acetoksi grupėmis modifikuoti ribozę, susijungusią su heterocikline baze.

1.1.2. Tiogrupės įvedimo reakcija

Tiogrupės įvedimui skirtų reagentų pasirinkimų gausa - gana didelė. Vienas populiariausių ir dažniausiai naudojamų - Lawesson'o reagentas.



3 Schema - 4-tiouridino sintezė [7]

Aptinkama daug publikacijų, kuriose įvairius junginius paveikus Lawesson'o reagentu oksido grupė pakeičiama tiogrupe. Vienas iš tokių pavyzdžių pateiktas 3 schemeje. Iš uridino

susintetinamas 4-tiouridinas. Piridine uridinas acetilinamas acto rūgšties anhidridu, gaunant 2',3',5'-tri-*O*-acetiluridiną, kuris tirpinamas benzene, veikiamas Lawesson'o reagentu ir reakcijos mišinys maišomas tirpiklio virimo temperatūroje [7]. Kituose straipsniuose [8, 9] pateikiamas analogiškas tiogrupės įvedimo būdas, tačiau reakcijos vykdomos mažiau toksiškame tirpiklyje - toluene.

Alternatyva tio grupės įvedimo būdai su Lawesson'o reagentu pateikta 1 schemeje. 1,2,4-Triazolas tirpinamas bevandeniame acetonitrile, pridedama POCl₃ ir trietilamino. Sudedami 3',5'-bis-(trimetilsilil)-5-pakeisti-2'-deoksiuridino dariniai ir reakcija vykdoma 16 h kambario temperatūroje. Gautas reakcijos mišinys filtruojamas bei ekstrahuojamas [5]. Šios reakcijos metu N⁴-oje padėje esanti okso grupė pakeičiama triazolo žiedu.

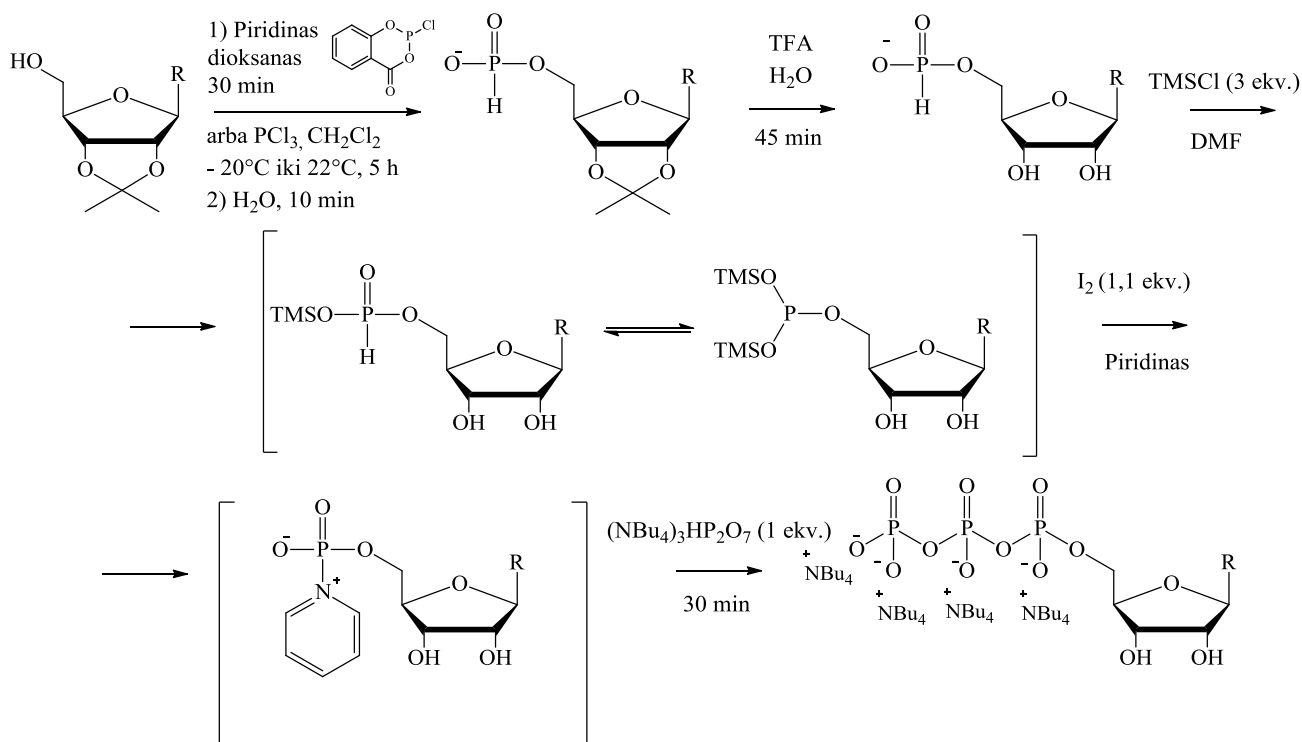
Antroje tio grupės įvedimo reakcijos stadijoje gauti 3',5'-bis-(trimetilsilil)-5-pakeisti-2'-deoksi-4-triazoluridino dariniai paveikiami sieros acto rūgštimi [5], triazolo žiedą pakeičiant tio grupe. Gauti produktai išgryninami ekstrahavimo būdu.

Straipsniuose [10, 11] aprašomas dar vienas galimas tio grupės įvedimo metodas į uracilo darinius. Uracilas tirpinamas bevandeniame piridine [10], 2',3',5'-tri-*O*-acetil-5-bromuridinas - 1,4-dioksane [11]. Abejais atvejais temperatūra pakeliamą iki tirpiklių virimo temperatūros ir sudedamas fosforo pentasulfidas. Reakcija su uracilu įvyksta per 20 h, antruoju atveju per 1,5 h.

Ekonomiškiausias tiogrupės įvedimo būdas, naudojant Lawesson'o reagentą. Tai vienos stadijos reakcija. Ji patraukli laiko atžvilgiu, sunaudojamų reagentų kiekiu bei užtenka vienos gryninimo procedūros, lyginant su 1 schemeje pavaizduotu metodu. Taip pat šiuo būdu išgaunamos didžiausios produktų procentinės išėigos.

Nukleozidų sintezė baigiama pirmoje stadijoje suformuotų apsauginių grupių pašalinimu. Pirmoje schemeje pavaizduotos reakcijos ketvirtoje stadijoje trimetilsililgrupės pašalinamos į reakcijos mišinį pridėjus druskos rūgšties [5]. Acetilinti junginiai deblokuojami amoniaku metanolyje [7], pučiant sausas amoniako dujas [11] arba natrio metilatu [9]. Visais atvejais apsauginės grupės pakeičiamos vandeniliais ir gaunami nukleozidai.

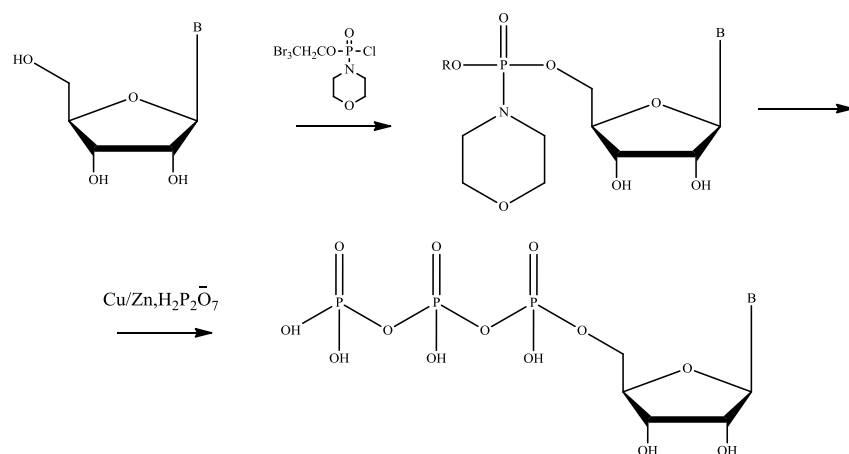
1.2. Nukleotidų sintezė



4 Schema - nukleotidų sintezė [2]

Schemaje 4 pateikta nukleotidų gavimo seka. Pradiniai 2' ir 3' padėtyse *O*-izopropilidengrupe apsaugoti nukleozidai fosforilinami salicilchlorfosfitu arba PCl_3 . Gauti monoesteriai deblokuojami vandeniniu TFA ir gaunami 5'-H-fosfonatai sudaryti iš keturių natūralių nukleozidų (uridino, citidino, guanozino, adenozino) bei ribavirino ir 6-metilpurino ribonukleozido [2].

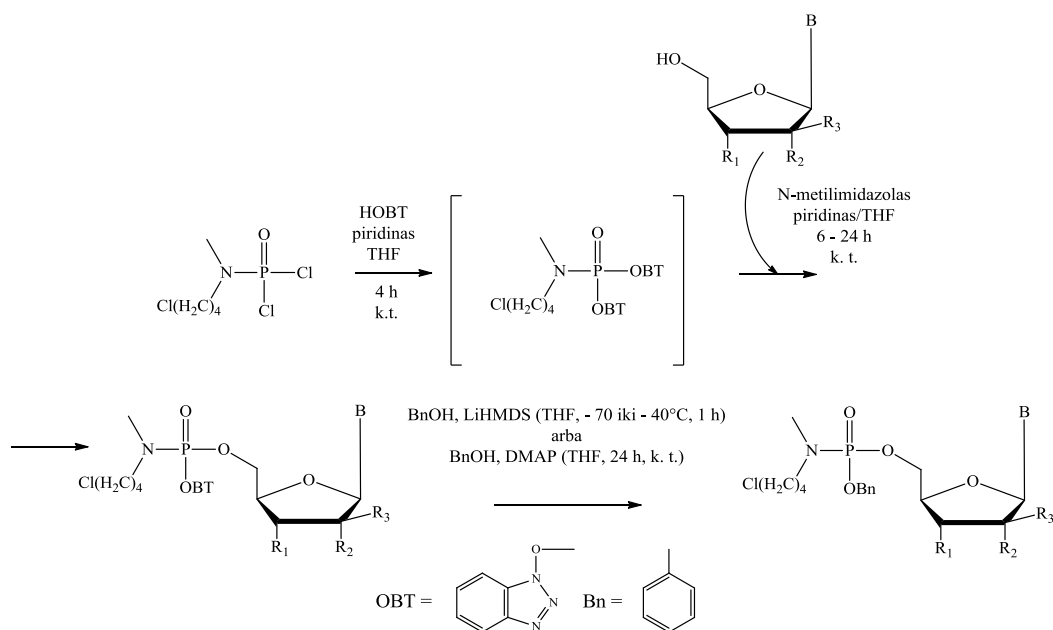
Į neapsaugotų nukleozidų 5'-H-fosfonatų monoesterių reakcijos mišinį pridėjus TMSCl susintetinami du junginiai: silil-H-fosfonatas ir labiau reaktingas bis-sililfosfitas, kurie veikiami elementiniu jodu. Vyksta greita fosfito oksidacija ir gaunamas reaktyvus tarpinis elektrofiliškas piridino fosforomidatas. Reakcijoje dalyvaujant tris(tetra-*n*-butilamonio) vandenilio pirofosfatui vyksta nukleofilinė ataka ir taip susintetinami nukleozido 5'-trifosfatai. Susidarę nefosfatiniai pašaliniai reakcijos produktai pašalinami gelfiltracijos būdu. Jos metu naudojama kolonėlė, pripildyta Sephadex LH-20 sorbento. Eliuojama trietilamonio bikarbonato vandeniniu buferiu. Gautas produktas liofilizuojamas ir gryninamas preparatyvinės atvirkščių fazių HPLC būdu, naudojant C18 kolonėlę. Galutinis produktas išgaunamas tetra(trietilamonio) druskų pavidalu [2].



5 Schema- nukleotidų sintezė [12]

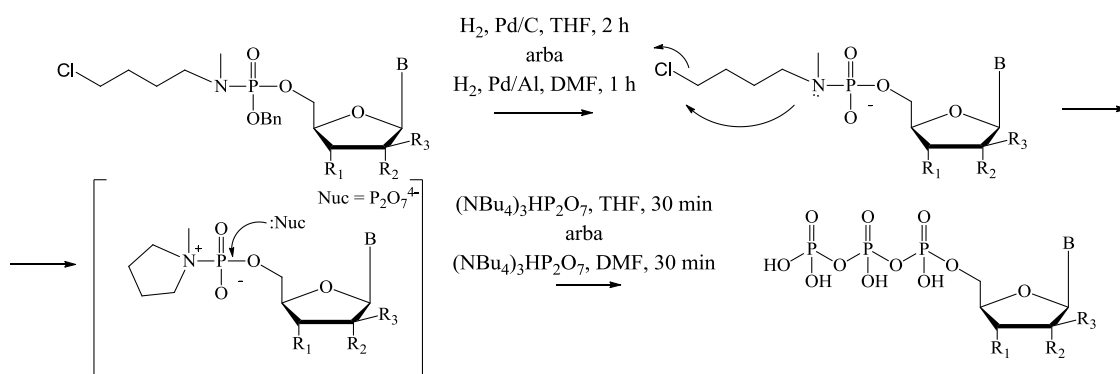
Straipsniuose [12, 13] aprašomas dar vienas monofosforilimo reagentas. Vienas iš galimų trifosfatų sintezės metodų pateiktas 5 schemeje. Fosfotriesteriniai dariniai buvo gauti bevandeniame piridine 2,2,2-tribrometilmorfolino fosfonochloridatu modifikuojant nukleozidus. Neišgryninti gauti morfolidatai paversti į trifosfatus, veikiant juos bis(tri-n-butilamonio) pirofosfato druskomis [12].

Kitas alternatyvus nukleotidų sintezės būdas pradedamas didelio reakingumo tarpinio junginio - pirolidonio fosforamidato cviterjono suformavimu, kuris vėliau greitai ir efektyviai jungdamasis su tris(tetra-n-butilamonio) vandenilio pirofosfatu sudaro nukleozido trifosfatą [1]. Šis sintezės kelias pavaizduotas 6 ir 7 schemose.



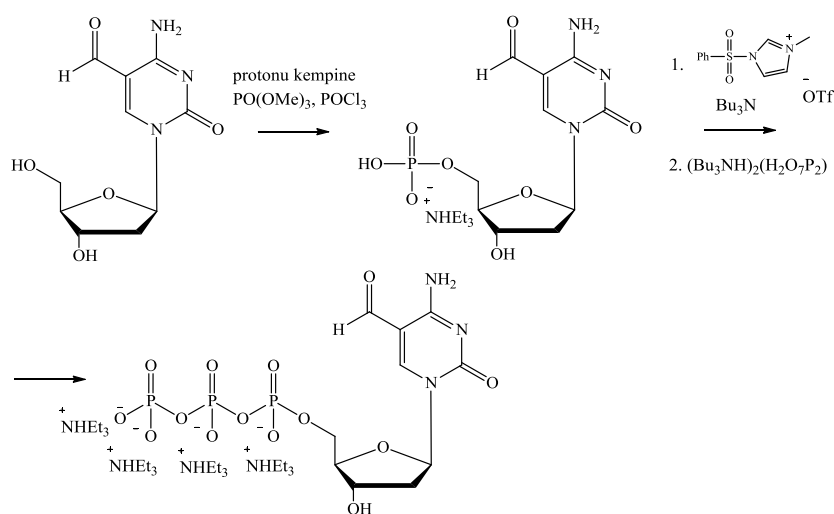
6 Schema - tarpinio junginio - benzotriazolilfosforamidato suformavimas [1]

Fosforamidatai sintetinami pagal 5 schemoje pateiktą metodiką. Apsaugoti nukleozidai reaguodami su fosforilinio agentu, gautu *in situ* iš fosforochloridato ir 1-hidroksibenzotriazolo (HOBT), suformuoja benzotriazolilfosforamidatą. OBT į Bn grupę pakeičiama benzilo alkoholiu, pridėjus LiHDMS arba DMAP [1].



7 Schema - nukleotido sintezė iš benzotriazolilfosforamidato [1]

Toliau gautasis fosforamidato esteris aktyvuojamas pagal 7 schemoje pateiktą mechanizmą. Tarpinis fosforamidato cviterjonas pagaminamas *in situ* katalitinės hidrogenolizės metu su paladžiu ant aktyvuotos anglies bevandeniame THF kambario temperatūroje. Nufiltravus katalizatorių, vykdyta pirofosfato prijungimo reakcija. Jos metu į fosforamidato cviterjono tirpalą pridedama bis(tri-n-butilamonio) pirofosfato arba tris(tetra-n-butilamonio) vandenilio pirofosfato ir taip susintetinamas nukleotidas. Produktai išgryninti jonų mainų chromatografijos būdu, kolonėlę užpildant Q Sepharose sorbentu, ir eliuojant amonio bikarbonato linijiniu gradientu [1].



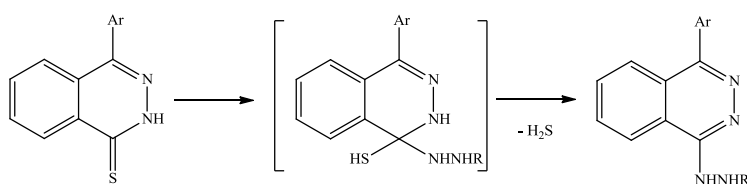
8 Schema - nukleotido sintezė su aktyvuojančio 1-metil-3-benzensulfonilimidazolo triflato reagentu

[14]

Nukleozidas pateiktas 8 schemeje buvo paverstas į 5'-monofosfatą, naudojant POCl_3 kaip monofosforilavimo stadijos reagentą. Gautas 5-formil-2'-deoksicitidin-5'-monofosfatas išgrynintas HPLC metodu, paveiktas aktyvuojančiu 1-metil-3-benzensulfonilimidazolo triflato reagentu bei pirofosfatu. Šios procedūros metu iš monofosfato gautas trifosfatas. Produktas išgrynintas jonų mainų chromatografijos būdu, kolonėlę pripildant DEAE celiuliozės sorbentu [14].

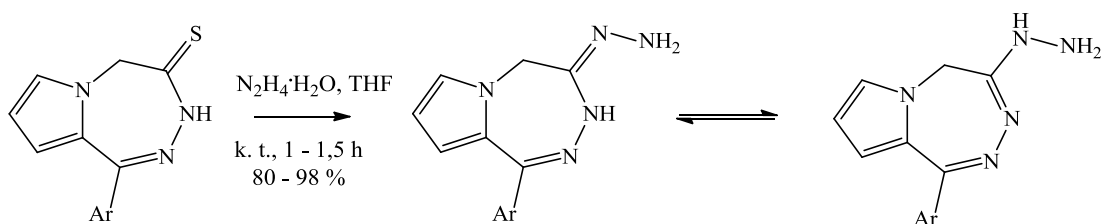
Labai panaši metodika aprašoma kitose publikacijose [15 - 18], tačiau šiais atvejais atliekant nukleotidų sintezes nėra naudojamas aktyvuojantis agentas. Vienu atveju [16, 17] kaip bazė naudojamas TBA, kitais [14, 15, 18] - protonų kempinė. Kiek rečiau pasirenkamos alternatyvos išvardintoms bazėms - 2,4,6 kolidinas, Hünig'o bazė arba 4-dimetilaminopiridinas (DMAP) [15]. Jei monofosforilavimo stadijoje nenaudojama bazė, reakcija yra lėta ir gaunamos mažos galutinio produkto procentinės išeigos. Tai lemia reakcijos metu iš POCl_3 susidariusi druskos rūgštis [15]. Esant rūgščiai terpei monofosfato susidarymas - negalimas.

1.3. Hidrazinų sintezė



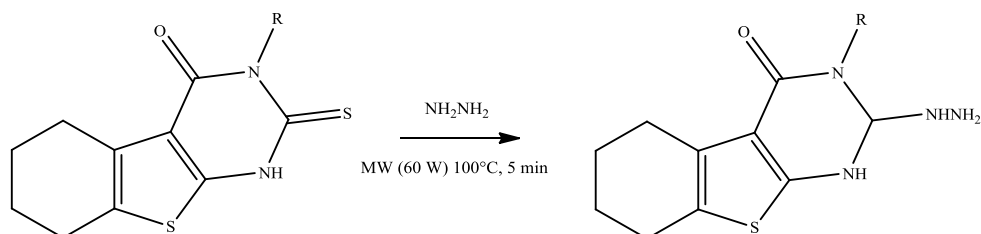
9 Schema - hidrazinų sintezė [19]

Tiogrupes turinčių junginių paveikimas hidrazino dariniais, tokiais kaip hidrazino hidratas, 2-hidrazino piridinas arba benzoilhidrazinas, sudaro hidrazino darinius, išsiskiriant dujiniam H_2S . Šie junginiai formuojasi tarp hidrazino darinių bazės, turinčios laisvą NH_2 grupę, ir junginių su $\text{C}=\text{S}$ grupe. Reakcijos metu gaunamas tarpinis junginys nėra gryninamas. Nuo jo atskilus H_2S molekulei susidaro hidrazinai [19].



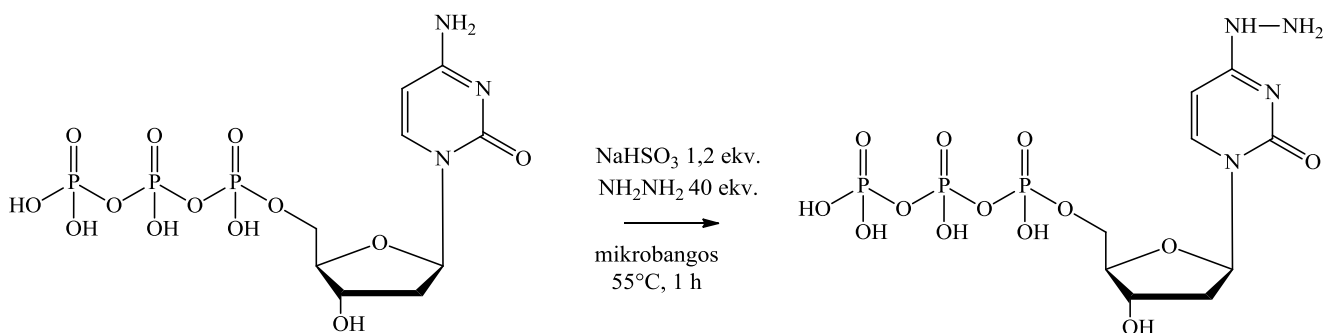
10 Schema - hidrazino susidarymas tautomerinių formų pavidalu [8]

Schemaje 10 pavaizduotas analogiškas hidrazinų klasės junginių gavimo metodas [8]. Pagrindinis dėmesys atkreiptinas į tai, jog produktas susidaro dviejų tautomerinių formų pavidalu. Izomerinės formos daro įtaką identifikuojant hidrazinų junginių struktūras ^1H BMR spektroskopijos metodu ir todėl spektre matomi keturi, o ne du aromatinės sistemos vandenilių, esančių prie dvigubojo ryšio, signalai.



11 Schema - hidrazino susidarymas, reakcijos mišinį veikiant mikrobangomis [20]

Esama dar viena hidrazinų sintezės galimybė, panaudojant tuos pačius reagentus ir reakcijos mišinį veikiant mikrobangų spinduliuote. Junginys, parodytas 11 schemaje, tirpinamas etanolyje, veikiamas hidrazino hidratu bei 100°C temperatūroje 60 W galingumo mikrobangomis. Reakcijai įvykti užtenka 5 min. Atliekant organines reakcijas mikrobangų spinduliuotės poveikyje yra sutrumpinamas reakcijos vykimo laikas, pagerinama produkto išeiga ir tai laikoma ekologiškesniu metodu, nei įprastinės cheminių reakcijų vykdymo sąlygos [20].



12 Schema - hidrazino sintezė iš 2'-deoksicitidino trifosfato [21]

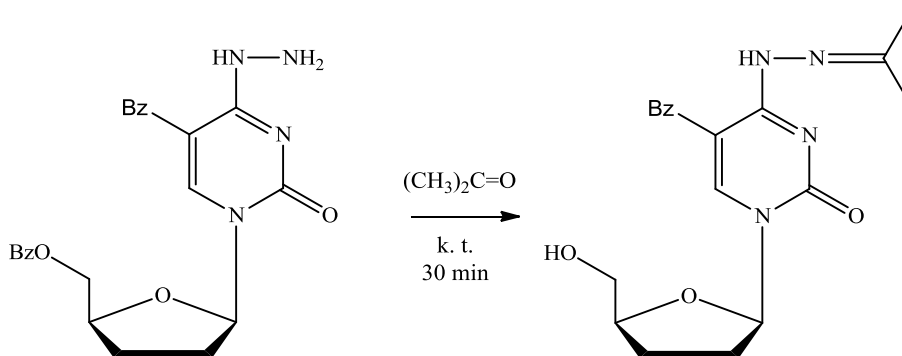
Dar viena hidrazinų sintezės metodika pavaizduota 12 schemaje. Šiuo atveju hidrazininė grupė gaunama modifikuojant ne tio, o pirminio amino funkcinę grupę. Šis sintezės kelias yra plačiai taikomas ir pirmą kartą Shapiro ir Weisgras'o aprašytas 1970 m. Bisulfitu katalizuotas citozino transamininimas susideda iš kelių stadijų: bisulfito prisijungimas prie 5 - 6 padėtyje esančių citozino anglies atomų, transamininimas per azoto nukleofilinę ataką ir amoniako

išsiskyrimas bei bazės katalizuojamas bisulfito eliminavimas, regeneruojantis dvigubajam ryšiui [21].

Iniciavimo reakcija atlikta pagal Negishi publikacijoje [22] aprašomą metodiką. Sekant reakcijos eigą išsiaiškinta, jog reakcijos metu dominuoja hidrolizė, o ne norimo produkto susidarymas. Atidus iniciavimo reakcijos išstudijavimas, leido pakeisti reakcijos sąlygas, panaudojant mikrobangų technologiją. Šis metodas buvo pasirinktas dėl atliktų studijų, paaiškinančių, kad mikrobangos pagreitina platų termiškai vykstančių reakcijų spektrą, tokių kaip: prisijungimo, cikloprisijungimo, kondensacijos, pavadavimo, persigrupavimo bei dar daugelį kitų reakcijų. Mikrobangų taikymo rezultatas yra labai greitas energijos perdavimas reaguojančioms molekulėms, suteikiant aktyvacijos energijos. Dėl šios priežasties greičiau pagaminami termodinaminiai produktai, dažnai išvengiant pašalinių produktų susidarymo, kurie atsiranda taikant tradicinius terminius metodus [21].

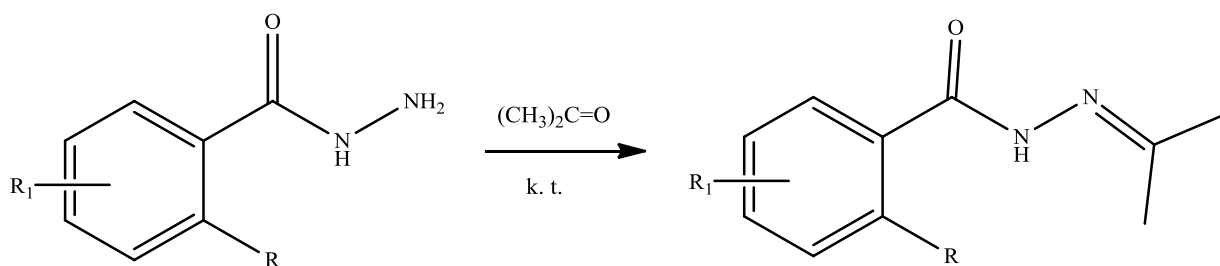
1.4. Hidrazonų sintezė

Hidrazonai - tai junginiai giminingi iminams, tačiau jie pakankamai retai aptinkami biologinėse molekulėse. Hidrazonai susidaro vykstant reakcijai tarp hidrazinų bei aldehidų arba ketonų.



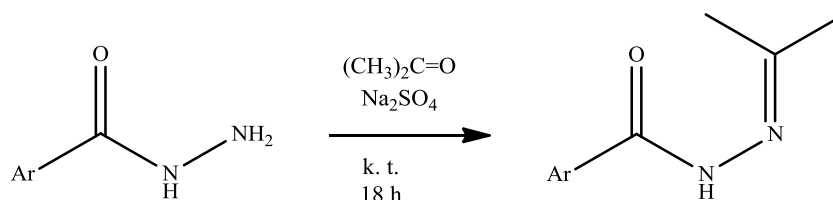
13 Schema - 5-benzil-1-(2,3-dideoksi-β-D-glycero-pentofuranozil)-4-(izopropilidenhidrazino)-2(1H)-pyrimidinono sintezė [23]

Hidrazono sintezės kelias pateiktas 13 schemeje. Į susintetinto ir negryninto hidrazino reakcijos mišinį pridėta acetono ir tirpalas maišytas 30 min kambario temperatūroje. Išgrynintas tarpinis benzoilintas produktas su hidrazinine grupe deblokuotas metanoliniu amoniaku. Susintetintas nukleozidas kolonėlinės chromatografijos būdu išskirtas β anomero pavidalu [23].



14 Schema - hidrazonų sintezės [24, 25]

Scheme 14 hidrazonas (kai $R = \text{NH}_2$) gaunamas hidraziną paveikus acetonu. Lyginant hidrazino ir hidrazono ^1H BMR spektrus pastebėta, jog hidrazininio junginio charakteringas išplitęs signalas (3,92 - 4,19 ppm) dingsta įvykstant kondensacijai, kurios metu NH_2 grupė prisijungia acetoną [24].



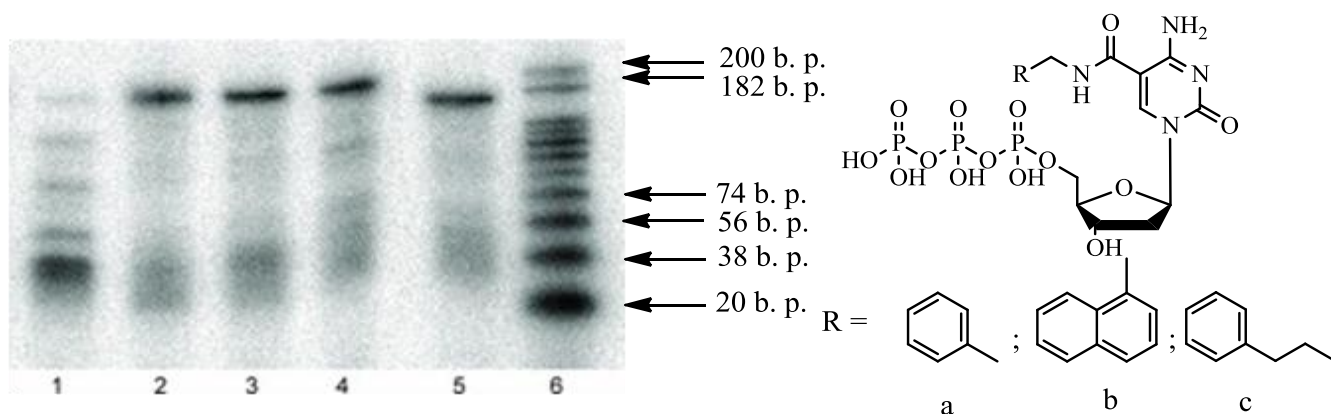
15 Schema - acilhidrazono sintezė [26]

Kondensacijos reakcijos metu yra svarbu išvengti susidarančio vandens įtakos reakcijos pusiausvyrai. Šalinant jį, pusiausvyra paslenkama į produktų susidarymo pusę. Scheme 14 pateikto hidrazono (kai $R = \text{NO}_2$) sintezės metu naudojamas bevandenis etanolio tirpiklis bei hidrazinas veikiamas sausu acetonu ir reakcija vykdoma argono atmosferoje [25]. Kitas vandens surišimo būdas - Na_2SO_4 pridėjimas į reakcijos mišinį [26], kuris buvo pasirinktas atliekant 15 scheme pavaizduotą reakciją. Vandens šalinimas vykstant kondensacijos reakcijai lemia spartesnę produkto susidarymą ir pagerina sintezės išeią.

1.5. Modifikuotų nukleotidų biocheminiai tyrimai

Modifikuotų nukleotidų sintezės tikslas yra jų panaudojimas biocheminiuose tyrimuose, įjungiant juos į tam tikros bazių sekos oligonukleotido ar DNR grandinės seką, atliekant PGR reakciją. Seką pratęsus modifikuotais trifosfatais, galima pakartotinę įjungtų gamtinių bazių analogų funkcinių grupių regioselektyvi modifikacija tam tikrais reagentais, suformuojant norimų klasių

junginius. Susintetintos oligonukleotidų ar DNR sekos analizuojamos HPLC būdu arba atliekant poliakrilamidinio gelio elektroforezę.



1 Paveikslas - poliakrilamidinio gelio atvaizdas, atlikus pradmens pratęsimą su deoksinukleotidais. 1 takelis: *dAdGdT* (neigiama kontrolė), 2 takelis: *dAdGdTc* (kontrolė), 3 takelis: *dAdGdT* + a, 4 takelis: *dAdGdT* + b, 5 takelis: *dAdGdT* + c, 6 takelis: 20/200 b. p. DNR nukleotidų seka [27]

Trys nauji susintetinti citidin-5-karboksamidų trifosfatai (pažymėti a - c) pritaikyti pradmens pratęsimui, naudojant KOD egzo (-) DNR polimerazę. Oligonukleotido prailginimo reakcijoje pasirinkta matricos seka su visomis galimomis trijų natūralių nukleotidų kombinacijomis:

5'-TTTTTTTTTCTTCTTCTCCTTCTCTTCCAAAATCACACGGACCCAGGGCATTCTAGATATGGTTTACGCTCAAGCGAACTTGCCGTCCTGAGTGTAAAGAGGGAAAgagggcagggtgtggcatatatat-3'

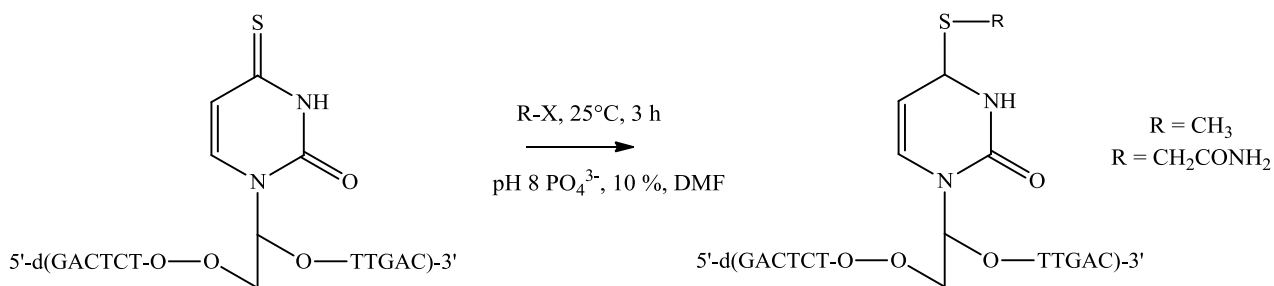
prie kurios buvo komplementariai prijungtas pradmuo:

5'-atatatatgccacaccctgcctc-3'

Pradmens seka buvo pažymėta ^{32}P . Reakcijos mišinys, paruoštas iš T4 polinukleotidų kinazės, ^{32}P -ATP, pradmens, tris-HCl, MgCl_2 , ditiotreitolio, pakaitintas 30 minučių 37°C temperatūroje. Gautas žymėtas pradmuo atskirtas nuo druskų, naudojant kolonėlę, užpildytą Sephadex G-50 sorbentu. Iš tris-HCl, KCl, MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BSA, Triton X-100, DNR matricos, pradmens ir KOD egzo (-) DNR polimerazės paruošti pradmens ilginimo reakcijos mišiniai 30 sekundžių pakaitinti 96°C temperatūroje ir vienai valandai patalpinti į 65°C temperatūros 96 duobučių MJ termociklerį. Susidarę reakcijos produktai analizuoti, esant 7 M karbamido 8% akrilamido $1\times$ TBE gelyje. Gelis valandą autoradiografuotas specialiu ekranu bei rezultatai vizualizuoti fotovaizdintuvu FujiFilm FLA3000 [27].

Gautas gelio atvaizdas pateiktas 1 paveiksle. Iš atliktos poliakrilamidinio gelio elektroforezės matyti, jog pirmo takelio neigiamos kontrolės pavyzdyje yra vienas nepakilęs signalas, atspindintis nepratęstos oligonukleotido sekos fragmentą. Taip yra todėl, kad reakcijos mišinyje nėra citidino trifosfato ir polimerazė negali komplementariai kopijuoti DNR matricos. Pirmasis signalas 6 takelyje atitinka 20 DNR bazių porų (b. p.). Prie visų kitų, esančių aukščiau, pridedama po 18. Takelyje 2 analizuotas pradmens pratęsimo reakcijos mišinys su gamtinėmis adenino, guanino, timino bei citozino heterociklinėmis bazėmis. Tai - teigiama kontrolė, su kuria lyginti 3 - 5 takeliuose matomi signalai. 3 - 5 Pradmens ilginimo reakcijos vykdytos su adenino, guanino, timino bei gamtinio citidino trifosfato analogais (a - c), pavaizduotais 1 paveiksle. Jų signalų pakilimo aukštis sutampa su teigiamos kontrolės signalo pakilimo aukščiu. Iš to galima spręsti, jog sintetiniai citidino analogai vienodai efektyviai įjungiami kaip ir gamtinis citidinas, susidarant 182 DNR bazių poroms.

Įmanomos į DNR seką įjungtų modifikuotų nukleotidų selektyvios norimų funkcinių grupių reakcijos, jas veikiant tam tikrais reagentais. Tokios reakcijos pavyzdys pateiktas 17 schemeje.



17 Schema - Oligonukleotido sekokoje esančio $d^{S4}U$ tiokarbonil grupės S-alkilinimo reakcijos [9]

Oligonukleotido sekokoje esančio $d^{S4}U$ tio grupės S-alkilinimas jodmetano pertekliumi (100 - 300 mM, pH 8.0 fosfatinis buferis, 10 % DMF) įvyksta chemoselektyviai modifikuojant tik tiogrupę ir gaunant $d(\text{GACTCT}^{\text{MeS}4\text{U}}\text{TTGAC})$ oligonukleotidą. Panaši reakcija, taikant tokias pačias sąlygas, atlikta su α -jodacetamidu. Susintetintas $(\text{GACTCT}^{\text{RS}4\text{U}}\text{TTGAC})$, kur $\text{R} = \text{CH}_2\text{CONH}_2$. Abiejose pavyzdžiuose konversija iki S-alkilinto produkto buvo kiekybiška ir įvyko visiškai selektyviai. Procesas stebėtas HPLC analize [9].

2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA

2.1. Prietaisų sąrašas

^1H , ^{13}C , ^{31}P BMR spektrai užrašyti Bruker Ascend 400 spektrometru. 400 MHz dažnis ^1H BMR, 100 MHz dažnis ^{13}C BMR bei 200 MHz dažnis ^{31}P BMR. Cheminių poslinkių reikšmės pateiktos m. d. skalėje 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 – kvartetą, dd – dubleto dubletas, dt – dubleto tripletas, m – multiplėtas.

Reakcijų eiga ir medžiagų grynumas buvo sekami plonasluoksne chromatografine (TLC) analize, naudojant aliuminio plokštes, padengtas silikageliu (60 F254 (Merck)). TLC mobilios fazės CHCl_3 ir MeOH mišinys (tūriniu santykiu 5:1 bei 9:1), 1,4-dioksano, izopropanolio vandens ir amoniako mišiniai įvairiais tūriniais santykiais (4:2:2:1 ir 4:2:5:1). Gryninant susintetintus produktus kolonėlinės chromatografijos būdu naudota 2,5 cm skersmens ir 17 cm aukščio kolonėlė, kuri būdavo užpildoma silikageliu 60 (0,063-0,2 mm) (Merck). Eliuentai – CHCl_3 ir MeOH bei mišinys įvairiais tūriniais santykiais. TLC ryškikliai – ninhidrino tirpalas, kuris paruoštas tirpinant 0,3 g ninhidrino 100 ml etanolio ir 3 ml acto rūgšties mišinyje, 5 % sieros rūgšties tirpalas etanolyje, bei 254 nm UV lempa.

Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS) buvo atlikta naudojant sistemą, sudarytą iš CBM-20A valdymo bloko, dviejų LC-2020AD siurblių, SIL-30AC automatinio bandinių ėmiklio ir CTO-20AC kolonų termostato, naudojant SPD-M20A fotodiodų gardelės detektorių ir LCMS-2020 masių spektrometrą su ESI šaltiniu. Chromatografinis frakcionavimas atliktas naudojant YMC – Pack Pro C18, 150×3 mm kolonėlę (YMC, Japonija), esant 40 °C temperatūrai, vandeninio 0,1 % acto rūgšties tirpalo ir acetonitrilo gradientė. Masių spektrai buvo užrašyti nuo 10 m/z iki 500 m/z, esant 350 °C temperatūrai ir ±4500 V įtampa (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.

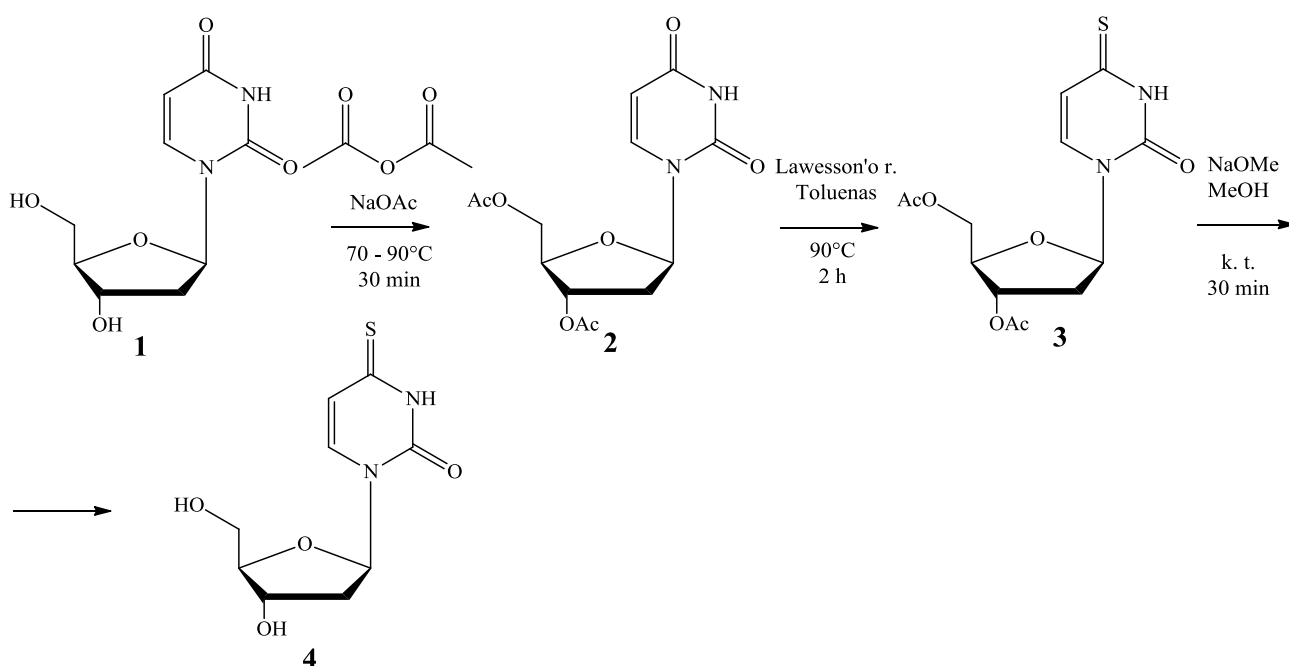
Susintetinti nukleotidai gryninti jonų mainų chromatografijos būdu, į sistemą sujungiant UV detektorių, saviraštį ir peristaltinį siurblį. Naudota XK-16 kolonėlė, pripildyta DEAE Sephadex A-25 sorbentu. Medžiagos eliuotos įvairių koncentracijų LiCl (0,1; 0,25; 0,5 M) vandeniniais tirpalais.

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.

Nukleotidų vandeninių tirpalų koncentracija nustatyta naudojant spektrofotometrą Thermo Electron Helios Gamma, analizė atlikta 220 nm – 400 nm bangų ilgio intervale 1 cm ilgio kiuvetėse.

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“ ir vakuuminė gelių džiovyklė.

2.2. Nukleozidų sintezė



18 Schema - 4-tio-2'-deoksiuridino sintezė.

2.1.1. Acetilinimo reakcija

Pirmoje modifikuoto 4-tio-2'-deoksiuridino **1** nukleozido sintezės stadijoje vykdyta hidroksigrupių acetilinimo reakcija. Mišinys, sudarytas iš 804 μ l (8,52 mmol) acto rūgšties anhidrido bei 116 mg (1,42 mmol) natrio acetato, 15 min kaitintas 70 - 90 °C temperatūroje. Į karštą reakcijos mišinį suberta 648 mg (2,84 mmol) 2'-deoksiuridino **1** ir tirpalas maišytas 30 min, kol ištirpsta visas 2'-deoksiuridinas. Reakcijos pabaiga įvertinta, atlikus TLC analizę. Eliuentu pasirinkta CHCl_3 ir MeOH (5 : 1) mišinio sistema. Proceso metu susidariusi acto rūgštis neutralizuota natrio vandenilio karbonatu. Tirpalas ekstrahuotas chloroformu. Atskirta organinė fazė praleista pro stiklinį filtrą, padengtą natrio sulfatu, ir taip pašalinti vandens likučiai. Dėl juntamo acto rūgšties kvapo į chloroforminį tirpalą pripilta tolueno ir garinant kartu su toluenu

azeotropu pašalinta acto rūgštis. Tolueno likučiai nugarinti kelis kartus pripylus acetonitrilo. Atlikus gryninimo procedūras gauti gelsvi 3' ir 5' padėtyse acetilo grupėmis blokuoti 2'-deoksiuridino **2** kristalai.

3',5'-Bis-*O*-acetil-2'-deoksiuridinas (2)

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 2,06 (s, 3H, CH₃); 2,07 (s, 3H, CH₃); 2,31 (ddd, 1H, CH₂CHN, *J* = 2,61; 4,3; 6,2 Hz); 2,43 – 2,46 (m, 1H, CH₂CHN); 4,18 (dt, 1H, CHOCOCH₃, *J* = 1,5; 4,5 Hz); 4,23 (dd, 2H, CH₂OCOCH₃, *J* = 2,4; 4,6 Hz); 5,16 – 5,20 (m, 1H, CHCH₂OCOCH₃); 5,71 (dd, 1H, CH₂CHN, *J* = 2,1; 8,1 Hz); 6,16 (dd, 1H, CH=CHCO, *J* = 6,2; 8,2 Hz); 7,66 (d, 1H, CH=CHCO, *J* = 8.1 Hz); 11,40 (d, 1H, NH, *J* = 1.5 Hz).

¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 170,61; 170,47; 163,44; 150,83; 140,83; 102,72; 84,91; 81,65; 74,38; 64,10; 36,18; 21,23; 21,05.

UV λ_{max} 261 nm. R_f = 0,75 (CHCl₃ : MeOH - 5 : 1)

Išgryninta 818 mg gelsvų kristalų (M = 312,10 g/mol), išeiga 92 %.

2.1.2. Tiogrupės įvedimo reakcija

Antroje nukleozido sintezės stadijoje gautas acetilintas produktas **2** paveiktas Lawesson'o reagentu ir taip N⁴-oje padėtyje esanti oksogrupė pakeista tiogrupe. 818 mg (2,62 mmol) 3',5'-bis-*O*-acetil-2'-deoksiuridino **2** tirpinta 43 ml tolueno ir paveikta 636 mg (1,57 mmol) Lawesson'o reagentu. Reakcijos mišinys maišytas 90 °C temperatūroje. Po 2 h valandų atlikus TLC analizę, įsitikinta, jog nebeliko pradinio reagento ir reakcija nutraukta. Susidaręs produktas grynintas tiesioginių fazių chromatografijos būdu. Kolonėlė užpildyta chloroforme suspenduotu silikageliu. Eliuojant chloroformu atskirtos visos priemaišos, produktas išplautas 0,5 % metanolio chloroforme. Surinkta 30 ml produkto frakcijų ir nugarinus tirpiklius gautas siera modifikuotas nukleozidas **3**.

3',5'-Bis-*O*-acetil-N⁴-tio-2'-deoksiuridinas (3)

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 2,05 (s, 3H, CH₃); 2,06 (s, 3H, CH₃); 2,38 (ddd, *J* = 3,0; 6,3; 14,4 Hz, 1H, CH₂CHN); 2,45 (dd, *J* = 7,2; 14,8 Hz, 1H, CH₂CHN); persikloję 4,20 – 4,27 (m, 3H, CHOCOCH₃ ir CH₂OCOCH₃); 5,17 – 5,22 (m, 1H, CHCH₂OCOCH₃); 6,07 – 6,11 (m, 1H, CH₂CHN); 6,37 (d, 1H, CH=CHCS, *J* = 7.6 Hz); 7,57 (d, 1H, CH=CHCS, *J* = 7,6 Hz); 12,78 (s, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 190,75; 170,60; 170,47, 148,08; 136,16; 113,39; 85,91; 82,10; 74,30; 64,02; 36,59; 21,22; 21,04.

MS (ESI⁺), m/z 326,97 (M-H)⁻, 329,00 (M+H)⁺, 6,204 min.

UV λ_{max} 250 nm. R_f = 0,56 (CHCl₃ : MeOH - 9 : 1)

Išgryninta 935 mg žalsvas klampios konsistencijos produktas (M = 328,07 g/mol), išeiga 98 %.

2.1.3. Deblokavimo reakcija

Deblokavimo reakcijos metu 860 mg (2,62 mmol) 3',5'-bis-*O*-acetil- N⁴-tio-2'-deoksiuridino **3** paveikta 5,242 ml 1M natrio metilato tirpalu ir mišinys maišytas 30 min kambario temperatūroje. Reakcija baigta, kai atlikus TLC analizę plokštelėje išnyko pradinio junginio **3** signalas. Produktas nuo mažiau polinių reakcijos mišinio komponentų atskirtas tiesioginių fazių chromatografijos būdu. Kolonėlė buvo užpildyta chloroforme suspenduoto silikagelio stacionaria faze, o produktas eliuotas 12 - 14 % metanolio chloroforme. Po gryninimo surinkta 120 ml tirpalo bei nugarintas tirpiklių mišinys. Labiau polinės medžiagos pašalintos atvirkščių fazių chromatografijos būdu. Gryninimui naudota 18 ml C18 kolonėlė. Produktas **4** eliuotas 10 % metanolio vandenyje mišiniu ir bendrai surinkta 80 ml tirpalo. Nugarintus tirpiklius gautas deblokuotas nukleozidas **4**.

N⁴-Tio-2'-deoksiuridinas (4)

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 2,05 (ddd, 1H, CH₂CHN, *J* = 6,0; 7,1; 13,2 Hz); 2,13 (ddd, 1H, CH₂CHN, *J* = 3,5; 6,1; 13,3 Hz); 3,56 – 3,61 (m, 2H, CH₂OH); 3,79 – 3,84 (m, 1H, CHOH); 4,20 – 4,24 (m, 1H, CHCH₂OH); 4,93 (išplitęs s, 1H, CH₂OH); 5,25 (išplitęs s, 1H, CHOH); 6,09 (t, 1H, CH₂CHN, *J* = 6.6 Hz); 6,25 (d, 1H, CH=CHCS, *J* = 7,4 Hz); 7,64 (d, 1H, CH=CHCS, *J* = 7,5 Hz), 11,79 (s, 1H, NH).

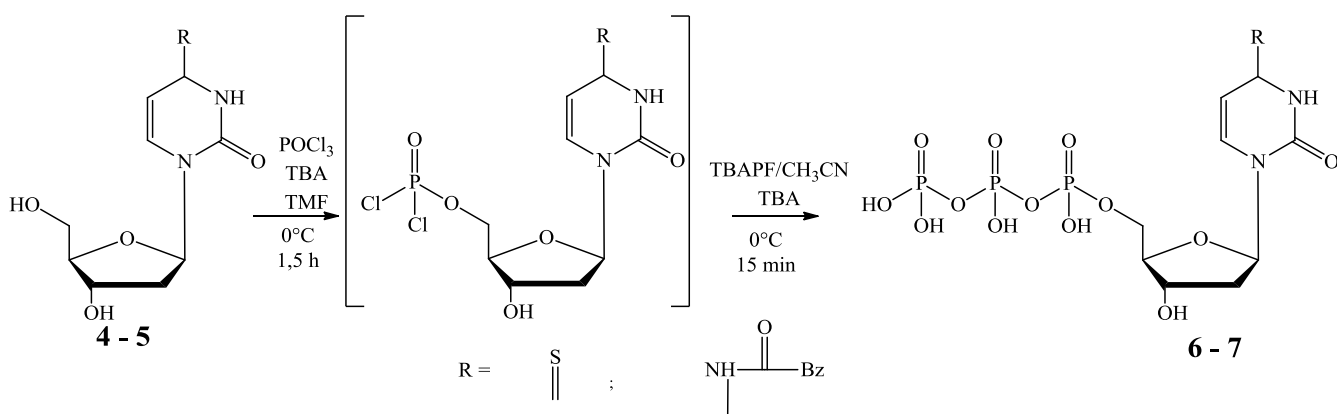
¹³C BMR (DMSO-d₆): δ = 192,53; 135,39; 113,25; 88,00; 85,39; 70,70; 61,64; 49,05; 40,46.

MS (ESI⁺), m/z 243,00 (M-H)⁻, 245,00 (M+H)⁺, 4,890 min.

UV λ_{max} 250 nm. R_f = 0,19 (CHCl₃ : MeOH - 9 : 1)

Išgryninta 438 mg geltonas aliejiškos konsistencijos produkto (M = 244,05 g/mol), išeiga 68 %.

2.3. Nukleotidų sintezė



19 Schema - nukleotidų sintezė

19 Schemoje pavaizduotų junginių numeriai ir pavadinimai

Junginio Nr.	R	Junginio pavadinimas
4	=S	N ⁴ -Tio-2'-deoksiuridinas
5	-NHCOC ₆ H ₅	N ⁴ -Benzoil-2'-deoksicitidinas
6	=S	N ⁴ -Tio-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatas
7	-NHCOC ₆ H ₅	N ⁴ -Benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas

Nukleotidų sintezėje naudoti reagentų kiekiai

Reagentas	N ⁴ -Tio-2'-deoksiuridinas 4			N ⁴ -Benzoil-2'-deoksicitidinas 5		
	m, mg	n, mmol	V, µL	m, mg	n, mmol	V, µL
Reagentas	125	0,51	-	100	0,30	-
POCl ₃	86	0,56	52	148	0,97	90
TBA	-	1,02	244	-	0,60	134
TMF	-	-	1000	-	-	2000
TBAPF	-	2,56	5120	-	1,51	3020
TBA	-	0,37	87	-	0,22	52

Iš gauto nukleozido **4** bei komercinio N⁴-benzoil-2'-deoksicitidino **5** buvo susintetinti nukleotidai. Atitinkamai paruošti mišiniai iš N⁴-tio-2'-deoksiuridino **4** arba ⁴N-benzoil-2'-deoksicitidino **5**, TBA (0,778 g/cm³) ir TMF (100 mg nukleozido / 1 ml tirpiklio) šaldyti ledo vonelėje 0 °C temperatūroje. Po 10 min pridėta 1,1 ekvivalento POCl₃ (1,645 g/cm³). 1,4-Dioksano, izopropanolio vandens ir amoniako (4 : 2 : 2 : 1) mišinio sistemoje atliekant TLC analizę buvo sekama abiejų reakcijų eiga. N⁴-Benzoil-2'-deoksicitidino trifosfato **7** sintezės atveju nesusidarant monofosfatui porcijomis pridėta dar 2,1 ekvivalento POCl₃ pertekliaus. Abiejų reakcijų atveju nustatyta, kad po 1,5 h susidarė pakankamai monofosfatinio tarpinio produkto, kuris nebuvo gryninamas. Į susidariusių tarpinių junginių reakcijos mišinius pridėta TBA ir 0,5 M TBAPF tirpalo acetonitrile. Antros nukleotidų sintezės stadijos reakcija vykdyta 15 min. Reakcija sustabdyta į tirpalą pripylus natrio vandenilio karbonato ir susidariusios nuosėdos nufiltruotos per stiklinį filtrą, naudojant vakuuminį siurbį. Gauti skaidrūs produktų tirpalai. Susintetinti nukleotidai išgryninti jonų mainų chromatografijos būdu, kolonėlę užpildant 30 ml DEAE Sephadex A - 25 sorbentu. N⁴-Tio-2'-deoksiuridino trifosfatas **6** iš kolonėlės eliuotas su 0,3 M, o ⁴N-benzoil-2'-deoksicitidino trifosfatas **7** - 0,25 - 0,3 M LiCl vandeniniu tirpalu. Surinkta apie 100 ml produkto frakcijų. Nugarinta didžioji dalis vandens, o tirpale likusi LiCl druska nuo produktų atskirta išsodinant juos acetono ir metanolio mišiniu, sumaišytu tūriniu santykiu 4 : 1. 4 ml produkto tirpalo užpilti 36 ml išsodinimo tirpiklių mišiniu, šaldyti -20 °C temperatūroje bei nucentrifuguoti.

Metanolio ir acetono mišinys su ištirpusiomis druskomis nupiltas. Gautas produktas ištirpintas vandenyje, nugarinti organinių tirpiklių likučiai ir spektrofotometriškai išmatuotos išgrynintų N⁴-tio-2'-deoksiuridino trifosfato **6** ir N⁴-benzoil-2'-deoksicitidino **7** trifosfato tirpalų absorbcijos, apskaičiuotos koncentracijos bei medžiagų kiekiai.

Nukleotidų sintezėje naudotas TBAPF buvo susintetintas pagal tam tikrą metodiką. 50 ml Dowex 50 WX8-100H⁺ sorbentu užpilta chromatografinė kolonėlė plauta 250 ml distiliuoto vandens. Ant sorbento suneštas 7,56 g (22,42 mmol) kalio pirofosfatas, ištirpintas 60 ml distiliuoto vandens. Į stiklinę pripilta 10,655 ml (44,84 mmol) TBA, ant kurio maišant sulašinta iš kolonėlės vandeniui eliuota pirofosfatinė rūgštis. Tikrintas iš kolonėlės išeinančio tirpalo pH. Procesas nutrauktas, kai pH vertė pasiekė 7. Gautas TBAPF tirpalas sukonzentruotas iki alyvos, kuri buvo pasverta. Formule: $V = m/549 \cdot 2000$ apskaičiuotas acetonitrilo tūris, reikalingas norint gauti 0,5 M koncentracijos TBAPF tirpalą. Tai įvertinus 12,16 g TBAPF buvo užpilta 44,29 ml acetonitrilo. Gautas tirpalas naudotas kaip fosforilinimo agentas nukleotidų sintezėje.

N⁴-Tio-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatas (6)

¹H BMR (D₂O): δ = 2,18 – 2,26 (m, 1H, CH₂CHN); 2,33 (ddd, J = 4,3; 6,4; 14,1 Hz, 1 H, CH₂CHN); 4,15 (d, 2 H, CH₂OP, J = 4,5 Hz); 4,50 – 4,54 (m, 1H, CHOH); 4,70 – 4,74 (m, 1H, CHCH₂OP); 6.19 (t, 1H, CH₂CHN, J = 6,5 Hz,); 6,57 (d, 1H, CH=CHCS, J = 7.6 Hz); 7,75 (d, 1H, CH=CHCS, J = 7,6 Hz).

³¹P BMR (D₂O): δ = -20,39 (t, 1P, J = 18,5 Hz); -10,85 (d, 1 P, J = 18,6 Hz); -5,19 (d, 1P, J = 18,7 Hz,)

MS (ESI⁺), m/z 482,70 (M-H)⁻, 484,75 (M+H)⁺, 2,043 min.

UV λ_{max} 328 nm. R_f = 0,12 (1,4-dioksanas : izopropanolis : vanduo : amoniakas - 4 : 2 : 5 : 1)

Išgryninta 43 mg baltų kristalų (M = 483,95 g/mol), išeiga 17 %.

N⁴-Benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas (7)

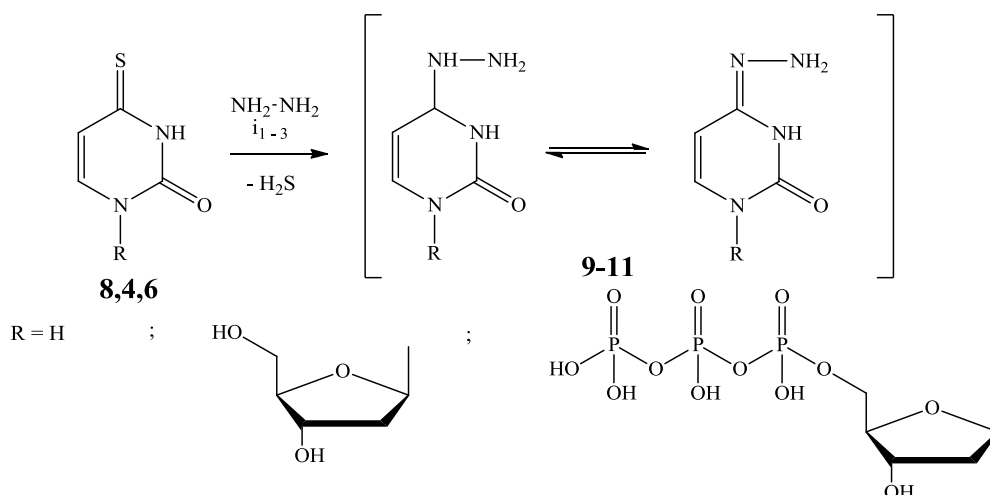
¹H BMR (D₂O): δ = 2,23 – 2,33 (m, 1H, CH₂CHN); 2,50 (ddd, 1H, CH₂CHN, J = 4,5; 6,3; 13,9 Hz); 4,20 (dd, 2H, CH₂OP, J = 4,4; 8,1 Hz); 4,54 (dt, 1H, CHOH, J = 4,0; 7,9 Hz); 4,73 – 4,76 (m, 1H, CHCH₂OH); 6,19 (t, 1H, CH₂CHN, J = 6,3 Hz); 7,39 (d, 1H, CH=CHCNH, J = 7.5 Hz); 7,48 - 7,50 (m, 2H, CH=CH=CH); 7,61 – 7,64 (m, 1H, CH); 7,82 (dd, 2H, COC(CH)₂, J = 1,2; 8,4 Hz); 8,34 (d, 1H, CH=CHN, J = 7,5 Hz).

¹³C BMR (D₂O): δ = 169,69; 163,14; 156,93; 145,72; 133,57; 132,7; 128,93; 128,05; 98,79; 87,34; 86,06; 70,21; 65,09; 39,90.

UV λ_{max} 259 nm. R_f = 0,19 (1,4-dioksanas : izopropanolis : vanduo : amoniakas- 4 : 2 : 5 : 1)

Išgryninta 43 mg baltų kristalų (M = 571,02 g/mol), išeiga 39 %.

2.4. Hidrazinų sintezė



20 Schema - hidrazinų sintezė. Reakcijos sąlygos: i_1 - $\text{NH}_2\text{-NH}_2\text{O}$, EtOH, 110 °C, 3 h; i_2 - $\text{NH}_2\text{-NH}_2\text{O}$, EtOH/ H_2O , k. t., 18 h; i_3 - $\text{NH}_2\text{-NH}_2\text{O}$, H_2O , k. t., 18 h.

3 Lentelė

20 Schemoje pavaizduotų junginių numeriai ir pavadinimai

Junginio Nr.	R	Junginio pavadinimas
8	H	N^4 -Tiouracilas
9	H	N^4 -Hidrazinilcitozinas
10	$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_3$	N^4 -Hidrazinil-2'deoksicitidinas
11	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{O}_{12}\text{P}_3$	N^4 -Hidrazinil-2'deoksicitidin-5'-trifosfatas

4 Lentelė

Hidrazinų sintezėje naudoti reagentų kiekiai

Reagentai	N^4 -Tiouracilas 8			N^4 -Tio-2'-deoksiuridinas 4			N^4 -Tio-2'-deoksiuridino trifosfatas 6		
	m, mg	n, mmol	V, ml	m, mg	n, mmol	V, μl	m, mg	n, mmol	V, μl
Reagentas	200	1,56	-	60	0,25	-	32	0,066	-
$\text{NH}_2\text{-NH}_2$	313	6,25	0,304	25	0,43	24	7	0,13	7

N^4 -Tiouracilas **8** tirpintas 10 ml etanolio bei paveiktas hidrazino hidratu. Jam neištirpus pripilti dar du ekvivalentai hidrazino hidrato. Reakcijos mišinys 3 h kaitintas 110 °C temperatūroje. Gautas geltonas tirpalas su nuosėdomis. Atlikta TLC analizė 1,4-dioksano, izopropanolio, vandens ir amoniako (4 : 2 : 2 : 1) mišinio sistemoje ir plokštelė išryškinta UV. Nuosėdos nufiltruotos ir produktas išgrynintas atvirkščių fazių kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant C18 kolonėlę.

Eliuojant vandeniu surinkta 60 ml produkto frakcijų. Nugarinius tirpiklį gautos gelsvos produkto **9** nuosėdos.

N⁴-Hidrazinilcitozinas (9)

¹H BMR (D₂O): δ = 1,06 (t, 1H, NHNH₂, J = 7,0 Hz); 3,16 – 3,19 (m, 2 H, NHNH₂); 5,50 (d, J = 7,2 Hz) ir 7,40 (d, J = 7,5 Hz) CH=CHCNHN (1 H); 6,09 (d, J = 6,4 Hz) ir 7,14 (d, J = 6,7 Hz) CH=CHCNHN (1 H); išplitęs 10,22 (s, 1H, CONH).

MS (ESI⁺), m/z 125,05 (M-H)⁻, 127,05 (M+H)⁺, 1,204 min.

UV λ_{max} 218 nm. R_f = 0,58 (1,4-dioksanoas, izopropanolis, vanduo, amoniakas = 4 : 2 : 2 : 1)

Išgryninta 120 mg gelsvos spalvos kristalų (M = 126,05 g/mol), išeiga 61 %

Atliktos dvi 4-tio-2'-deoksiuridino **10** reakcijos su hidrazino hidratu skirtinguose vandens ir etanolio tirpikliuose. 50 mg adukto tirpinta 500 μl etanolio, o 10 mg - 80 μl vandens. Į pirmąją reakcijos mišinį pridėta 20 μl, į antrąją - 4 μl NH₂-NH₂·H₂O. Abu tirpalai kambario temperatūroje maišyti 18 h. TLC analizė atlikta 1,4-dioksano, izopropanolio, vandens, amoniako (4 : 2 : 5 : 1) mišinio sistemoje. Abu reakcijos mišiniai apjungti ir produktas **10** iškristalintas iš etanolio.

N⁴-Hidrazinil-2'-deoksicitidinas (10)

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,21 (t, 1H, NHNH₂, J = 7,0 Hz); 1,90 – 2,00 (m, 1H, CH₂CHN); 2,07 (dd, 1H, CH₂CHN J = 6,7; 3,4 Hz); 3,20 – 3,25 (m, 2 H, NHNH₂); 3,55 (dd, 2H, CH₂OH, J = 5,7; 9,7 Hz); 3,75 (d, 1H, CHOH, J = 2,4 Hz); 4,17 – 4,24 (m, 1H, CHCH₂OH); 4,53 (s, 1H, CH₂OH); 4,96 – 5,16 (m, 1H, CHOH); 5,66 (d, J = 7,5 Hz) ir 7,63 (d, J = 7,3 Hz) CH=CHCNH (1 H); 6,18 (t, 1H, CH₂CHN, J = 6,7 Hz); 6,23 (d, J = 7,5 Hz) ir 7,87 (d, J = 7,3 Hz) CH=CHCNH (1H); 8,85 (s, 1H, NHNH₂).

MS (ESI⁺), m/z 241,05 (M-H)⁻, 243,05 (M+H)⁺, 1,291 min.

UV λ_{max} 220 nm. R_f = 0,68 (1,4-dioksanas : 1,4-izopropanolis : vanduo : amoniakas - 4 : 2 : 2 : 1)

Išgryninta 40 mg baltų kristalų (M = 242,10 g/mol), išeiga 67 %.

N⁴-tio-2'-deoksiuridino trifosfatas **6** tirpintas distiliuotame vandenyje ir paveiktas hidrazino hidratu. Gautas mišinys kambario temperatūroje maišytas 18 h. Reakcijos eiga sekta TLC analize 1,4-dioksano, izopropanolio vandens ir amoniako (4 : 2 : 5 : 1) mišinio sistemoje. Gautas produktas išgrynintas jonų mainų chromatografijos būdu. Nukleotidas **11** iš kolonėlės eliuotas su 0,2 M LiCl vandeniniu tirpalu. Surinkta 130 ml frakcijų. Tirpalas sukonzentruotas iki 6,5 ml.

N⁴-Hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas (11)

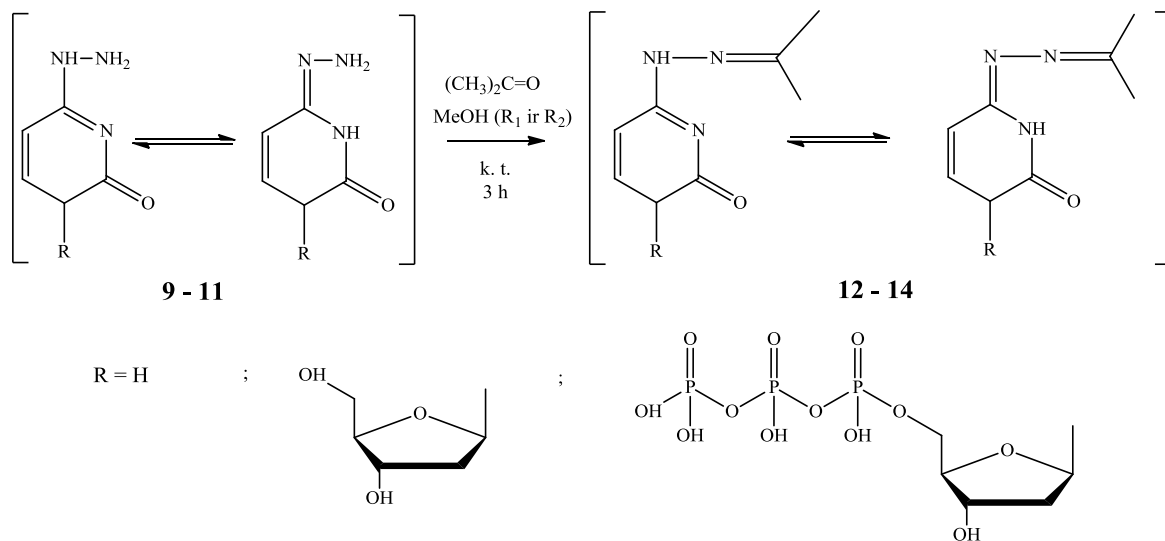
¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 2,60 – 2,71 (m, 1H, CH₂CHN); 2,73 – 2,85 (m, 1H, CH₂CHN); 4,31 – 4,39 (m, 2 H, CH₂OP); 4,43 – 4,51 (m, 1 H, CHOH); 4,53 – 4,58 (m, 1H, CHCH₂OP); 6,48 (t, 1H, CH₂CHN, J = 6,3 Hz); 6,63 (d, 1H, CH=CHCN, J = 7,9 Hz); 8,09 (d, 1H, CH=CHN, J = 8,2 Hz).

³¹P BMR (D₂O): δ = -19,09 (t, 1 P, J = 14,9 Hz); -10,05 (d, 1 P, J = 15,0 Hz); -5,86 (d, 1 P, J = 15,0 Hz).

UV λ_{\max} 273 nm. $R_f = 0,19$ (1,4-dioksanas, izopropanolis vanduo, amoniakas = 4 : 2 : 5 : 1)

Išgryninta 16 mg baltų kristalų ($M = 482,00$ g/mol), išeiga 50 %

2.5. Hidrazonų sintezė



21 Schema - hidrazonų sintezė

3 Lentelė

21 Schemoje pavaizduotų junginių numeriai ir pavadinimai

Junginio Nr.	R	Junginio pavadinimas
12	H	N^4 -(2-(propan-2-iliden)hidrazinil)citozinas
13	$C_4H_9O_3$	N^4 -(2-(propan-2-iliden)hidrazinil)-2'-deoksicitidinas
14	$C_4H_{12}O_{12}P_3$	N^4 -(2-(propan-2-iliden)hidrazinil)-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas

4 Lentelė

Hidrazonų sintezėje naudoti reagentų kiekiai

Reagentai	N^4 -Hidrazinilcitozinas 9			N^4 -Hidrazinil-2'-deoksicitidinas 10			N^4 -Hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas 11		
	m, mg	n, mmol	V, ml	m, mg	n, mmol	V, μ l	m, mg	n, mmol	V, μ l
Reagentas	56	0,444	-	22	0,0909	-	10	0,0207	-
Acetonas	791	13,619	1	156	3,478	202	36	0,619	46
Tirpiklis	-	-	2	-	-	776	-	-	-

Susintetinti hidrazinai buvo paversti į hidrazonų klasės junginius.

N^4 -Hidrazinilcitozinas **9** ir 4-hidrazinil-2'-deoksicitidinas **10** užpilti metanoliumi ir gauta gelsva emulsija. Reakcijos mišinys paveiktas acetonu ir gautas tirpalas maišytas 1,5 h kambario temperatūroje. Reakcijos eiga sekta TLC analize, naudojant $CHCl_3$ ir MeOH (9 : 1) mišinio sistemą. Produktai **12** ir **13** gauti nugarinus metanolį ir acetono perteklių.

N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinil)citozinas (12)

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,52 (s, 1H, NHN, *J* = 7,0 Hz); 1,94 – 2,08 (m, 6H, 2xCH₃); 5,64 (d, *J* = 7,2 Hz) ir 7,87 (d, *J* = 7,5 Hz) CH=CHCNHN (1 H); 6,14 (d, *J* = 6,4 Hz) ir 7,19 (d, *J* = 6,7 Hz) CH=CHCNHN (1 H); 10,40 (išplitęs s, 1H, CONH).

MS (ESI⁺), m/z 165,00 (M-H)⁻, 167,00 (M+H)⁺, 1,291 min.

UV λ_{max} 306 nm. R_f = 0,35 (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1)

Išgryninta 73 mg baltų kristalų (M = 166,09 g/mol), išeiga 99 %.

N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinil)-2'-deoksicitidinas (13)

¹H BMR (DMSO-d₆): δ = 1,88 – 2,02 (m, 6H, 2xCH₃), 3,51 - 3,55 (m, 2H, CH₂CHN), 4,18 – 4,22 (m, 2H, CH₂OH), 4,53 – 4,58 (m, 1H, CHOH); 4,93 (išplitęs s, 1H, CH₂OH); 5,25 (išplitęs s, 1H, CHOH); 5,30 -5,35 (m, 1H, CHCH₂OP); 5,80 (d, *J* = 6,5 Hz) ir 7,45 (d, *J* = 6,5 Hz) CH=CHNH (1 H); 6,16 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH₂CHN); 6,34 (d, *J* = 7.3 Hz) ir 7,75 (d, *J* = 7,3 Hz) CH=CHNH (1 H); išplitęs 10.23 (s, 1H, NH).

MS (ESI⁺), m/z 241,05 (M-H)⁻, 243,05 (M+H)⁺, 1,291 min.

UV λ_{max} 306 nm. R_f = 0,68 (1,4-dioksanas, izopropanolis vanduo, amoniakas = 4 : 2 : 2 : 1)

Išgryninta 18 mg baltų kristalų (M = 242,10 g/mol), išeiga 69 %.

4-Hidrazinil-2'-deoksicitidino trifosfato **11** tirpalas paveiktas acetonu ir gautas reakcijos mišinys kambario temperatūroje maišytas 3 h. Produktas išgrynintas jonų mainų chromatografijos būdu, kolonėlę užpildant SEPHADEX A - 25 DEAE sorbentu ir eliuojant 0,05 M vandeniniu LiCl tirpalu surinkta 130 ml vandenyje ištirpusio nukleotido. Gautas produktas **14** išsodintas acetono ir metanolio (4 : 1) mišiniu.

N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinil)-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas (14)

¹H BMR (D₂O): δ = 1,89 - 1,96 (m, 6H, 2xCH₃); 2,18 – 2,37 (m, 2H, CH₂CHN); 4,33 – 4,39 (m, 2 H, CH₂OP); 4,45 – 4,53 (m, 1 H, CHOH); 5,45 -5,52 (m, 1H, CHCH₂OP); 6,22 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, CH₂CHN); 6,22 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH=CHCN); 7,77 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH=CHCN).

³¹P BMR (D₂O): δ = -21,76 (m, 1 P), -11,08 (d, 1 P, *J* = 19.9 Hz), -8,19 (m, 1 P).

UV λ_{max} 275 nm. R_f = 0,15 (1,4-dioksanas, izopropanolis vanduo, amoniakas = 4 : 2 : 5 : 1)

Išgryninta 9 mg baltų kristalų (M = 522,03 g/mol), išeiga 82 %.

2.6. Biocheminiai tyrimai

2.6.1. Oligonukleotido pradmens pažymėjimas ³³P ir sulydymas su nežymėta DNR matrica

Iš 2 µl 10x reakcijos buferio A T4 polinukleotidų kinazei, 1 µl 10 u/µl T4 polinukleotidų kinazės, 6 µl 3,3 µM ³³P-γATP, 2 µl 10 µM T7-pradmens ir 9 µl vandens paruoštas oligonukleotido pradmens žymėjimui skirtas reakcijos mišinys (T7*). Reakcija vykdyta 37 °C temperatūroje 20 min, pridėta 1 µl 0,5 M EDTA ir kaitinta 80 °C temperatūroje 10 min. 10 µl paruošto mišinio (T7*) užpilta 1,2 µl 10 µM T7Tm arba T7Am bei 88,8 µl vandens, 3 min kaitinta 95 °C temperatūroje ir lėtai atvėsinta iki kambario temperatūros. Nudruskinta pagal gamintojo protokolą naudojant *ZebaTM Spin Desalting Columns 7K MWCO* nudruskinimo kolonėlę. Paruoštame hibridizacijos mišinyje galutinė DNR substrato koncentracija - 100 nM.

2.6.2. Pradmens prailginimo reakcija

DNR grandinės ilginimo reakcijos atliktos naudojant glutamatinį arba tris-acetatinį buferį. Paruoštas reakcijos mišinys iš 50 nM fermento, 5 nM DNR substrato, 0,01 µM - 1 mM nukleotido, 1 µM - 10 mM magnio chlorido arba mangano sulfato tirpalų ir glutamatinio buferio arba tris-acetatinio buferio. Reakcijos vykdytos 5 - 15 min 37 °C temperatūroje ir sustabdytos STOP (95 % formamido, 0,060 % bromfenolio mėlio ir ksileno cianolio, 2 mM EDTA) tirpalu. Mėginiai kaitinti 5 min 95°C temperatūroje.

2.6.3. Radioaktyvių DNR fragmentų elektroforetinis frakcionavimas

DNR fragmentų elektroforezė vykdyta denatūruojančiomis sąlygomis, esant 8 M karbamido poliakrilamido gelyje. Į 15 mL 15 % gelio tirpalą įpilta 150 µl 10 % APS ir 15 µl TEMED tirpalų. Gautasis mišinys supiltas tarp švariai nuvalytų dviejų elektroforezės stiklų ir įstatytos „šukutės“. Geliui susipolimerizavus, stiklai patalpinti į elektroforezės aparatą, kurio blokas užpildytas 1x TBE elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimtos „šukutės“. Į susidariusius gelio šulinėlius įneštas bromfenolio mėlio ir ksileno cianolo dažų mišinys ir per 30 min įvykdyta peforezė, esant 500 V įtampai. Sunešti DNR mėginių reakcijos tirpalai ir 200 V įtampoje vykdyta elektroforezė. Po 30 min įtampa pakeista į 600 V ir laukta kol dažo linija pasieks gelio apačią. Elektroforezei pasibaigus, gelis 15 min mirkytas 10 % acto rūgšties tirpale ir 15 min plautas po tekančio vandens srove. Viena gelio pusė prilipintas prie 3 mm storio popieriaus, kita - padengta polietileno plėvele ir jis išdžiovinamas vakuuminėje gelių džiovyklėje. Sausas gelis autoradiografuotas specialiu Fujifilm ekranu. Rezultatai vizualizuoti fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Atliekant magistrinį darbą buvo susintetinti keturių organinių klasių junginiai, pasiremiant literatūroje rasta informacija apie panašių darinių sintezes. Ieškota naujų junginių, neaprašytų sintezės kelių bei reakcijos sąlygų optimizavimo būdų. Susintetinti modifikuoti nukleotidai panaudoti kaip natūralių nukleotidų analogai DNR sintezės reakcijose.

3.1. Nukleozidų sintezė

Nukleozido **4** sintezei pasirinktas trijų stadijų metodas: 2'-deoksiuridino **1** ribozės hidroksigrupių acetilinimas, tiogrupės įvedimas Lawesson'o reagentu bei apsauginių grupių deblokavimas natrio metilatu, tiksliai pakartojant ar modifikuojant literatūros apžvalgoje aptartas kiekvienos stadijos reakcijas. Įvardintos dvi galimos ribozės hidroksigrupių blokavimo galimybės trimetilsililo arba acetilo grupėmis. Praktinei sintezei pasirinkta acetilinimo reakcija. Tai lėmė blokavimo bei apsauginių grupių deblokavimo reakcijos sąlygų įvertinimas. Acetilinimo reakcija vykdoma 70 – 90 °C temperatūroje, todėl tai gerokai sutrumpina reakcijos trukmę, lyginant su sililinio reakcija, kuri atliekama kambario temperatūroje. Pirmoji įvyksta per 30 min, antroji - 2,5 h valandos. Deblokuojant acetilo grupes naudojama stipri amoniako bazė, o trimetilsililo grupės pašalinamos stipria druskos rūgštimi. Laiką, per kurį įvyksta minėtosios reakcijos apsprendžia apsauginių grupių elektrofilinės savybės. Acetilai yra daug lengviau nueinanti grupė, lyginant, su trimetilsililo grupėmis, todėl acetilo grupių deblokavimo reakcija yra trumpesnė.

Pirmojoje nukleozidų sintezės stadijoje vykdytas hidroksigrupių acetilinimas. Reakcija inicijuojama natrio acetatui reaguojant su acto rūgšties anhidridu, kurios metu natrio jonas prisijungia prie deguonies atomo ir susidaro karbkatijonas. Toliau seka kelios nukleofilinės reakcijos. Ribozės žiedo hidroksigrupės prisijungia krūvį turintį acto rūgšties anhidridą, atskylant vandenilio atomui. Tirpale esantis acetato jonas eliminuoja natrij, susidarant natrio acetatui. Šis toliau dalyvauja nukleofilinėje reakcijoje, natriui prisijungiant prie kito acetilo grupės deguonies atomo. Susidariusiame karbkatijone vyksta elektronų persigrupavimas, atskylant acto rūgščiai ir naujai susidariusiame karbkatijone susiformuojant dvigubajam ryšiui. Galiausiai acetato jonas eliminuoja natrio joną ir taip nukleozido 3' ir 5' padėtyse suformuojamos acetoksigrupės.

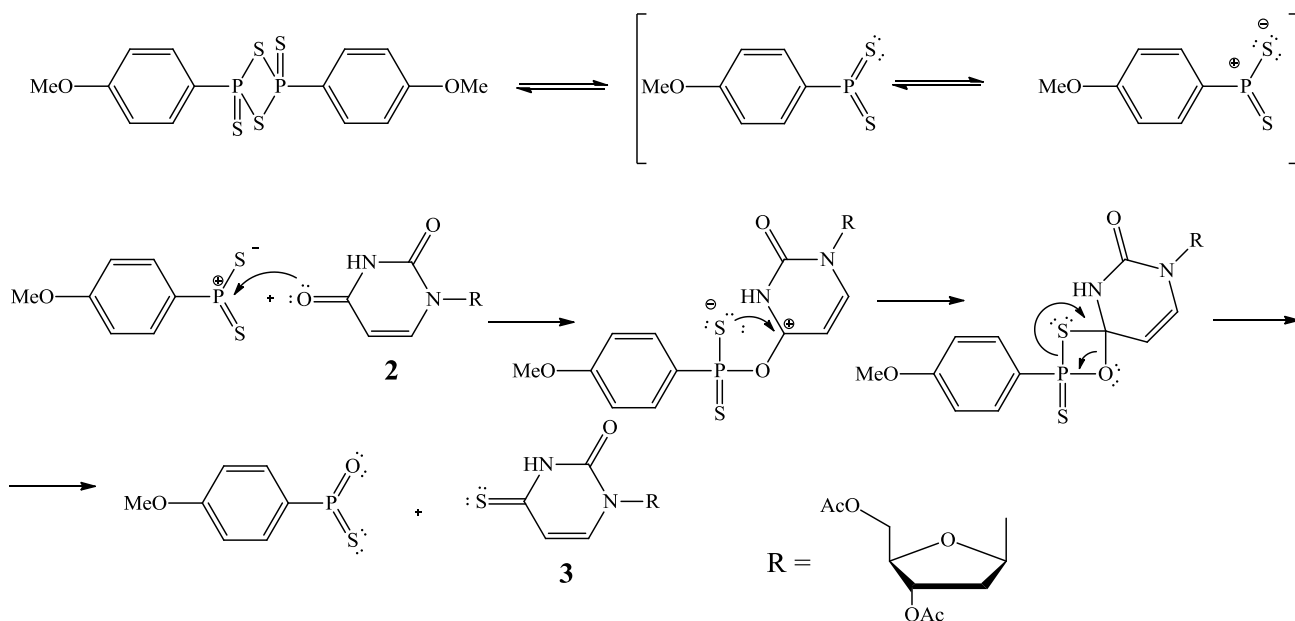
Acetilinimo stadijos reakcijos eiga sekta TLC būdu. Judri fazė paruošta sumaišius CHCl_3 ir MeOH tūriniu santykiu 5 : 1. Pasibaigus reakcijai identifikuoti TLC plokštelėje matomi signalai. Po 30 min reakcijos mišinio pavyzdyje išnyko pradinio junginio signalas **1** ($R_f = 0,40$), iš jo susidariusio acetilinto produkto **2** ($R_f = 0,75$) bei pašalinio ($R_f = 0,82$) junginių signalai pakilo

aukščiau. Tai sąlygojo susidariusių junginių sumažėjęs poliškumas, lyginant su pradiniu junginiu. Produkto signalas identifiкуotas TLC plokštelę pamerkus į vizualizacinį reagentą (5% sieros rūgšties tirpalą etanolyje). Ją pakaitinus išryškėjo juodas produkto taškas ir taip buvo nustatytas susidariusio 3',5'-bis-acetil-2'-deoksiuridino signalo pakilimo aukštis TLC plokštelėje.

Įvertinus tai, jog reakcijos metu kaip pašalinis produktas susidaro acto rūgštis, reakcijos mišinys neutralizuotas natrio vandenilio karbonato vandeniniu tirpalu. Atsižvelgus į tikslinio produkto hidrofilines savybes parinktas jo gryninimo metodas ekstrahavimo būdu. Acetilo grupių įvedimas sumažina produkto poliškumą ir kartu padidina tirpumą organiniuose tirpikliuose. Ekstrahuojant, 3',5'-bis-acetil-2'-deoksiuridinas **2** ištirpo chloroforme, o po neutralizacijos susidariusios neorganinės druskos - vandenyje. Nugarinus organinį tirpiklį gauti balti kristalai. Dėl vis dar juntamo acto rūgšties kvapo pripilta tolueno bei nugarintas susidaręs azeotropas. Tolueno likučiai pašalinti jį garinant su acetonitrilu.

Antroje nukleozido sintezės stadijoje N⁴-oje uracilo žiedo padėtyje įvesta tiogrupė. Įvertintos visos literatūroje rastos šios reakcijos galimybės. Rinktasi iš trijų reagentų: sieros acto rūgšties, forforo pentasulfido, bei Lawesson'o reagento. Literatūros apžvalgoje minėtas dvistadijinis metodas, kai okso grupė pakeičiama triazolo žiedu, o šis sieros acto rūgštimi modifikuojamas iki tiogrupės. Pirmoji stadija vykdoma 16 h, antroji tęsiama per naktį. Tiek tarpinis, tiek galutinis junginiai gryninami ekstrahavimo būdu. Šis sintezės metodas nėra labai patrauklus dėl ilgai vykstančių reakcijų bei dviejų gryninimo procedūrų, kurių metu sunaudojami dideli tirpiklių kiekiai. Alternatyvus sieros įvedimo metodas - fosforo pentasulfido panaudojimas. Produkto išeiga priklauso nuo reakcijos vykdymo laiko, pradinių junginių struktūros ypatybių bei gryninimo metodo. Jei reakcija vykdoma 1,5 h produktas kristalinant iš etanolio išgryninamas 55,6 % išeiga, jei 20 h - atlikus kolonėlinės chromatografijos gryninimą gaunama 86 % išeiga. Publikacijose plačiausiai aprašomas tio grupės įvedimas Lawesson'o reagentu. Susintetinti junginiai gryninami kolonėlinės chromatografijos būdu. Šiuo metodu išgrynintų produktų išeigos siekia 71 - 95 %.

Acetilinto produkto oksogrupė modifikuota į tiogrupę pagal mechanizmą, pateiktą 14 schemoje. Ištirpintas Lawesson'o reagentas yra pusiausvyroje su labiau aktyviu ditiofosfino mišiniu. Karbonilinė grupė nukleofiliškai prisijungia prie teigiamo fosforo atomo ir susidariusiame tarpiniame junginyje įvyksta elektronų persigrupavimas, įvykstant ciklizacijai. Iširus ciklui pašaliniame reakcijos produkte susiformuoja stabilus P=O ryšys bei susidaro laukiamas N⁴-tio-3',5'-bis-acetil-2'-deoksiuridino junginys **3**.



22 Schema - tiogrupės įvedimo į N^4 -tio-3',5'-bis-acetil-2'-deoksiuridiną reakcijos mechanizmas

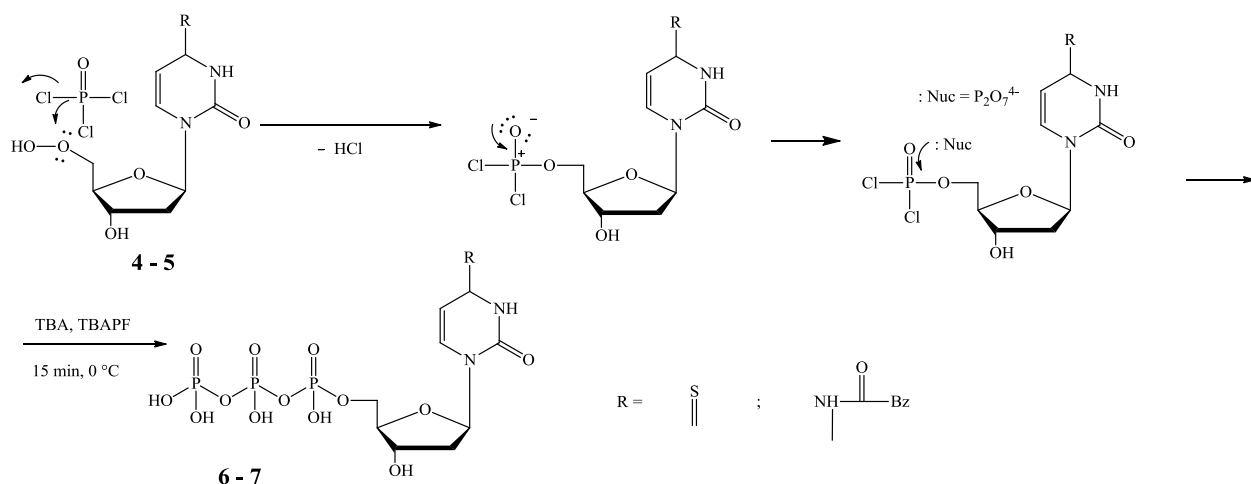
Gautas acetilintas darinys **3** deblokuotas natrio metilatu, acetilo grupės pakeičiant vandeniliais. Šia reakcijos stadija užbaigiama nukleozidų sintezė.

Tiogrupės įvedimo ir deblokavimo reakcijų eiga stebėta atliekant TLC analizes. Abejais atvejais naudota CHCl_3 ir MeOH mišinio sistema, pagaminta 9 : 1 tūriniu santykiu. Pasibaigus tiogrupės stadijai TLC analize įvertintinta reakcijos mišinio sudėtis. Plokštelės apačioje matomas likusio nesureagavusio Lawesson'o reagento signalas ($R_f = 0,08$). Nors naudotas neperteklinis ekvivalentinis šio reagento kiekis, tačiau skylant pusiau vienai jo molekulei susidaro dvi aktyvios formos, dalyvaujančios reakcijoje. Aukščiau plokštelėje matomi reakcijos metu susidariusių junginių signalai. Vidurinėje dalyje išryškėja mažiau polinis laukiamas reakcijos produktas **3** ($R_f = 0,56$), aukščiau – pašalinis junginys ($R_f = 0,97$), susidaręs reakcijos metu. Sekančioje stadijoje acetilus pakeitus vandeniliais junginio **4** poliškumas padidėja ir signalas ($R_f = 0,19$) matomas žemiau, lyginant su acetilintu dariniu **3** ($R_f = 0,53$). Pagal TLC chromatogramoje matomų signalų pakilimo aukščius įvertintas susidariusių produktų poliškumas bei hidrofiliinės savybės ir parinkti tinkami jų gryninimo metodai.

Acetilintas darinys pasižymi vidutiniu poliškumu, todėl jis grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu. Labai nepolinis pašalinis reakcijos produktas iš kolonėlės eliuotas chloroformu. Į eliuentą pridėjus metanolio, padidintas jo poliškumas, ir taip išgautas acetilo grupėmis blokuotas produktas **3**. Išskyrus produktą **3**, gryninimas nutrauktas ir prie silikagelio prisitvirtinęs Lawesson'o reagentas paliktas kolonėlėje. Didelis deblokuoto N^4 -tio-2'-deoksiuridino **4** poliškumas lemia jo hidrofiliškumą ir galimybę produktą išgryninti taikant atvirkščių fazių chromatografiją. Reakcijos mišinio komponentai TLC chromatogramoje matomi virš produkto

signalu eliuoti chloroformo ir metanolio mišiniu tiesioginių fazių chromatografijos būdu. Iš C18 kolonėlės produktas eliuotas vandens ir metanolio mišiniu.

3.2. Nukleotidų sintezė



23 Schema - nukleotidų sintezės reakcijos mechanizmas

Kontroliniu junginiu nukleotidų sintezėje pasirinktas timidinas. Jo trifosfato sintezė taikyta, norint parinkti optimalias nukleotidų sintezės sąlygas. Nustačius reagentų ekvivalentinius kiekius bei mono ir trifosfatų susidarymo laiką buvo susintetinti du modifikuoti nukleotidai, N⁴-oje padėtyje turintys funkcines grupes R.

Pirmoje nukleotidų reakcijos stadijoje nukleozidai tirpinti trietilfosfate. Reakcijoje dalyvaujant POCl₃ bei TBA gautas labai aktyvus tarpinis junginys su lengvai nueinančia chloro grupe. Dėl gauto darinio reaktiškumo labai svarbu sekti reakcijos laiką, nes be norimo produkto reakcijos mišinyje daugėja pašalinių junginių. Tuo tikslu timidino fosforilimo reakcijos pirmos stadijos eigoje atlikta TLC analizė, ieškant optimalios monofosfatinio produkto susidarymo reakcijos trukmės. Lyginant dTnp bei reakcijos mišinio tarpinio monofosfato signalų pakilimo aukštį, nustatytas sintetinto kontrolinio nukleotido signalas TLC chromatogramoje. Atsižvelgiant į timidino monofosfato signalų intensyvumus, praėjus skirtingam laiko tarpui, nustatyta, jog ši reakcijos stadija įvyksta per 1,5 h. Problematiška tai, jog atliekant TLC analizę naudotas labai polinis eliuentas, dėl kurio prailgėja analizės trukmė. Vykstant TLC analizei kartu toliau vyksta ir reakcija, todėl timidinas pasirinktas kontroliniu variantu.

Antroje stadijoje tarpiniam junginiui reaguojant su TBAPF bei esant TBA susintetintas norimas nukleotidas. Fosforilinant timidino monofosfatą kas penkias minutes (po 5, 10, 15 min) imti reakcijos tirpalo mėginiai, ant jų užpilta vandens natrio karbonato ir taip sustabdyta reakcija.

Vizualus požymis, jog reakcijoje daugėja pašalinių produktų yra reakcijos mišinio gelsvėjimas. Sintetinio modelinio reakcijos mišinio mėginio pavyzdys užrašintas ant plokštelės ir atlikta TLC analizė, kontrole pasirenkant gamtinį dTTP. Nustatyta jog maksimalus produkto kiekis susidaro praėjus 15 minučių po TBAPF bei TBA reagentų supylimo į reakcijos mišinį. Išsiaiškinus optimalias sąlygas pagal šią metodiką atliktos 4-tio-2'-deoksiuridino trifosfato ir 4-benzoil-2'-deoksicitidino trifosfato sintezės.

Gautieji junginiai gryninti jonų mainų chromatografijos būdu. Pasibaigus reakcijai produktas susidaro tetra(trietilamonio) druskų pavidalu. Gryninimo metu trietilamonio katijonai pakeičiami vandeniliais.

Gautų trifosfatų kiekiai tirpale išmatuoti spektrofotometrine analize. Transformavus Beer-Lambert'o dėsnį ($A = \epsilon lc$) apskaičiuota produkto koncentracija tirpale:

$$c = \frac{A}{l \cdot \epsilon}$$

c – tirpalo koncentracija, mol/l

A – tirpalo sugertis

l – sluoksnio storis, cm (mūsų atveju 1 cm)

ϵ - molinis absorbcijos koeficientas, l/mol*dm³ (skaičiavimuose naudotas 10 l/mol*dm³)

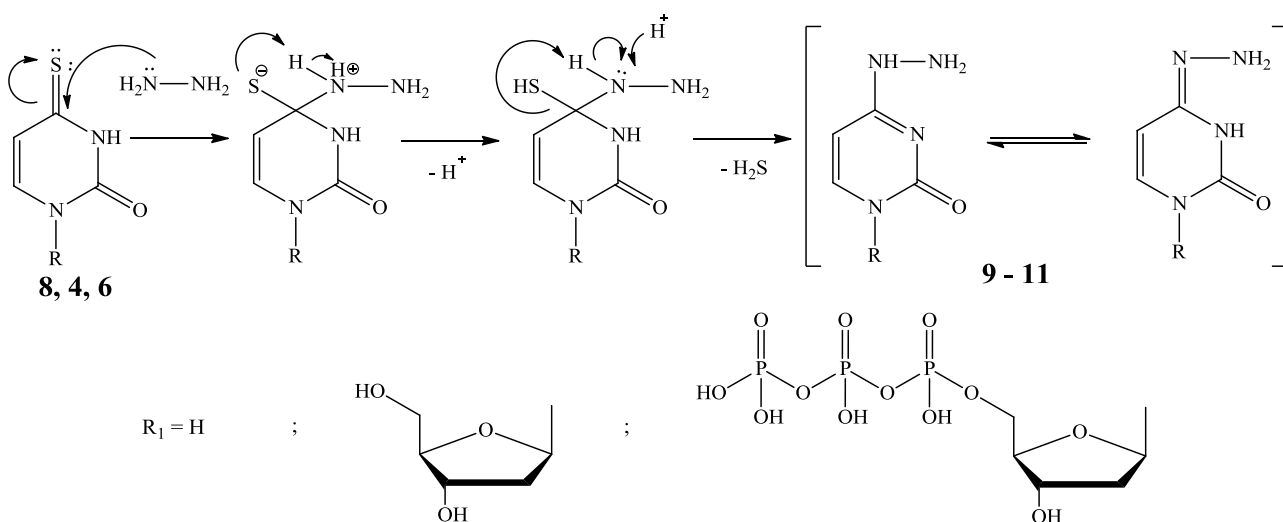
Sudauginus gautą koncentraciją ir bendrą tirpalo tūrį, apskaičiuotas molinis medžiagos kiekis, masė bei procentinė reakcijos išeiga.

Išgryninti bei vandenyje ištirpinti susintetinti nukleozidai panaudoti biocheminiuose tyrimuose.

3.3 Hidrazinų sintezė

Apibendrinant literatūros apžvalgoje aptartas hidrazininės grupės susidarymo reakcijas galima išskirti kelias sintezės metodikas. Hidrazino grupė gaunama arba iš citidino amino grupės, arba modifikuojant tuo grupę tuo pačiu hidrazino hidrato reagentu. Citidino modifikacija atliekama reakcijos mišinį šildant 55 °C temperatūroje mikrobangų poveikyje. Tai daro įtaka reakcijos trukmei. Literatūroje teigiama, jog produktas susidaro per 60 min. Nors ši paprasta sintezė patraukli laiko atžvilgiu, jai atlikti reikalinga papildoma mikrobangų reaktoriaus įranga. Alternatyvi tiogrupės modifikacija iki hidrazino taip pat gali būti atlikta reakcijos mišinį veikiant mikrobangomis arba reakciją vykdant tirpiklio virimo temperatūroje. Praktiškai sintetinant hidrazinų klasės junginius pasirinkta tiogrupės modifikavimo reakcija, nes tiek N⁴-oje padėtyje tio **6**, tiek hidrazino **11** grupės turintys modifikuoti nukleotidai gali būti panaudojami biocheminiuose tyrimuose oligonukleotido ilginimo reakcijose. Atmetus sintezės galimybę, panaudojant mikrobangas, ieškota tinkamiausio

hidrazinų sintezės varianto. Ieškant palankių sąlygų hidrazino grupę turinčio nukleotido sintezei būtina atsižvelgti į tai, kad 5' padėtyje suformuota trifosfatinė grupė yra jautri temperatūros poveikiui ir galima jos atskilimo nuo ribozės žiedo tikimybė, reakciją vykdant tirpiklio virimo temperatūroje. Rasta publikacija, kurioje teigiama, jog hidrazino grupę iš tiogrupės suformuojama reakciją vykdant kambario temperatūroje 1 - 1,5 h. Visą įvertinus pasirinkta tiogrupės modifikacija hidrazino hidratu.



24 Schema - hidrazinų sintezės reakcijos mechanizmas.

Hidrazinų klasės junginių sintezės mechanizmas pavaizduotas 24 schemoje. Hidrazinas N⁴-oje padėtyje nukleofiliškai prisijungia prie N⁴-tiouracilo žiedo, nutrūkstant dvigubajam ryšiui. Susidariusiame tarpiniame junginyje įvyksta vandenilio migracija nuo azoto prie sieros atomo bei persigrupuoja elektronai, atskylant vandenilio sulfido molekulei. Terpėje esantis vandenilio jonas elektronų akceptoriniu būdu prisijungia prie azoto atomo ir pasibaigus reakcijai susidaro dvi tautomerinės hidrazido grupę turinčio produkto formos. Tautomerinių formų susidarymą patvirtino DMSO tirpiklyje užrašytų ¹H BMR spektrų analizės. Aromatinių 5 ir 6 padėties citidino heterociklinės bazės vandenilių signalai išsidėstę skirtingais poslinkiais po du. Signalų ploto integralai leidžia spręsti, jog dviejų signalų suma lygi vienam vandeniliui. Ši ypatybė nematoma, jei ¹H BMR spektras užrašytas deuteruotame vandenyje.

TLC analize įvertintas reakcijos įvykimo pilnumo laipsnis bei parinktas tinkamas susidariusių produktų gryninimo metodas. Sintetinant produktus, turinčius R₁ **9** ir R₂ **10** grupes, TLC eliuentu pasirinkta sistema sudaryta iš 1,4-dioksano, izopropanolio, vandens ir amoniako (4 : 2 : 2 : 1) mišinio. Abejais atvejais, uracilo žiedo N⁴-oje padėtyje tiogrupę pakeitus hidrazinine grupe, gautų produktų poliškumas padidėja ir TLC chromatogramoje junginių signalai matomi žemiau nei

pradinių junginių. Tai atspindi apskaičiuotos R_f vertės. Reakcijos mišinio pavyzdyje išnykus N^4 -tiouracilo **8** junginio signalui ($R_f = 0,79$) iš jo susidaro tikslinis produktas **9** ($R_f = 0,56$) bei plokštelės apačioje matomas likusio nesureagavusio hidrazino signalas ($R_f = 0,34$). Atsižvelgus į reakcijos mišinio komponentų poliškumus N^4 -hidrazilcitozinas išgrynintas per C18 kolonėlę atvirkščių fazių chromatografijos būdu. Pirmiausiai iš kolonėlės eliuotas nesureagavęs hidrazino perteklius. Tada produktas atskirtas nuo kitų reakcijos mišinio komponentų. Dėl N^4 -oje heterociklinės bazės padėtyje atsiradusios laisvos $-NH_2$ grupės galimas hidrazino produkto **9** ir ninhidrino komplekso susidarymas. Identifikuojant N^4 -hidrazilcitozino **9** signalą, chromatograma pamerkta į vizualizacinį ninhidrino reagentą. Pakaitinus plokštelėje išryškėjo rausvas tarp ninhidrino ir reakcijos produkto **9** susidaręs komplekso signalas. Panašus reakcijos mišinio komponentų signalų išsidėstymas matomas, kai hidrazinas sintetintamas iš N^4 -tio-2'-deoksiuridino **4**. Pasibaigus reakcijai chromatogramoje išnyko N^4 -tio-2'-deoksiuridino **4** signalas ($R_f = 0,91$) bei atsirado iš jo susidaręs labiau polinis produktas ($R_f = 0,68$). 4-Hidrazilcitudinas nuo priemaišų atskirtas, kristalinant jį iš etanolio.

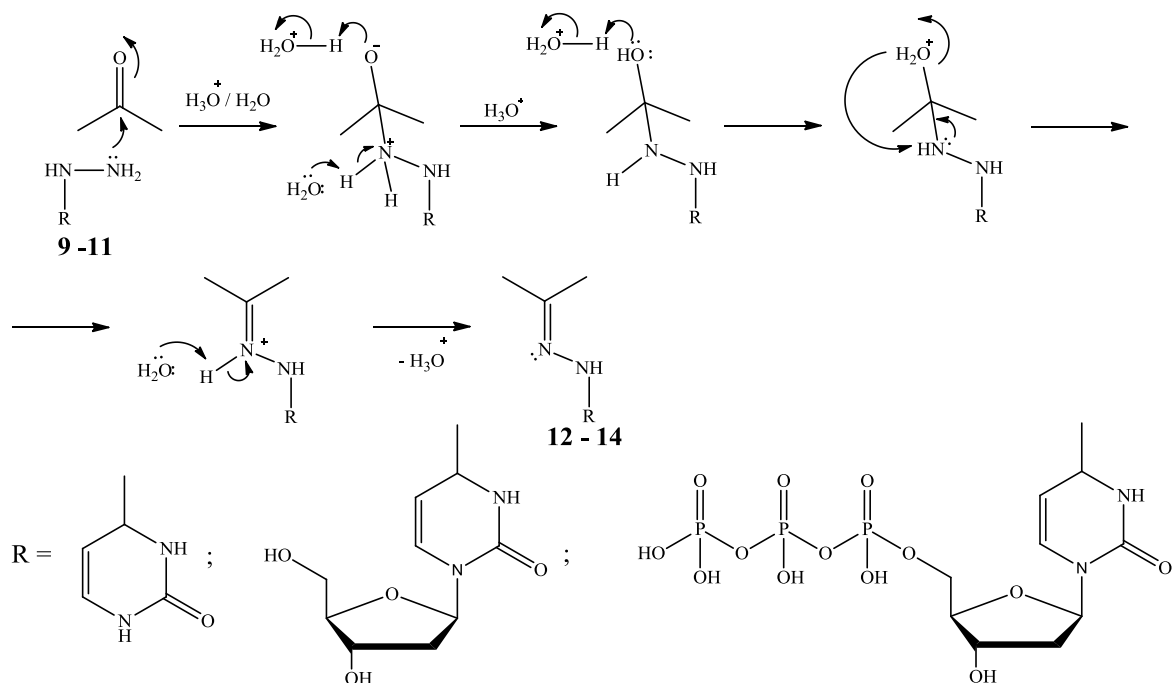
N^4 -Hidrazilil-2'-deoksicitidino **10** sintezė buvo atlikta dviejose tirpikliuose, nekeičiant kitų reakcijos sąlygų. Reakcijos įvykdytos vienodoje temperatūroje per tą patį laiko tarpą, išlaikant tokius pačius reaguojančių medžiagų ekvivalentinius kiekius. Atlikus TLC analizę pastebėta, jog sintezę vykdant vandenyje nebelieka pradinio reagento ir susidaro mažiau pašalinių medžiagų nei etanolio tirpiklyje. Tai paaiškinama geresniu N^4 -hidrazilil-2'-deoksicitidino **10** tirpimu vandenyje, lyginant su etanolium. Ši išvada leido pakeisti straipsniuose aprašomą hidrazinų sintezės metodiką ir hidrazido trifosfato sintezę vykdyti vandeniniame tirpiklyje. Susidaręs N^4 -hidrazilil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas **11** išgrynintas įprastiniu nukleotidų gryninimo jonų mainų chromatografijos būdu. Numatant tai, jog hidrazininė grupė reaguoja su acetonu, susidarant hidrazonui, po gryninimo likusios LiCl druskos nebuvo atskirtos produkto išsodinimo metanolio ir acetono mišiniu. Įvertinus nukleotidų poliškumą, TLC analizei pasirinkta labai polinė sistema sudaryta iš 1,4-dioksano, izopropanolio vandens ir amoniako (4 : 2 : 5 : 1) mišinio. Susintetintas nukleotidas **11** ($R_f = 0,19$) poliškesnis už N^4 -tio-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatą **6** ($R_f = 0,33$), todėl jo signalas TLC analizėje matomas žemiau nei pradinio junginio, kurio pasibaigus reakcijai nebeliko reakcijos mišinyje.

Atsižvelgiant į galimą N^4 -hidrazilil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato **11** praktinį pritaikymą, įjungiant jį į oligonukleotido ar DNR grandinės seką, pagal standartinį hidrazinų sintezės mechanizmą, atliktos dar kelios reakcijos, tikrinant ar natūralios DNR heterociklinės bazės gali būti modifikuojamos į hidrazinus. Guaninas, adeninas, timinas, citozinas, uracilas bei N^4 -tiouracilas **8** paveikti hidrazinu. Atlikta visų reakcijos mišinių TLC analizė, eliuentu naudojant chloroformo ir metanolio mišinį, tūriniu santykiu 9 : 1. Pastebėta, jog tik reakcijos mišinyje su N^4 -

tiouracilu **8** įvyko pokyčiai, TLC plokštelėje išnykstant 4-tiouracilo ir atsirandant naujo produkto **9** signalui. Tai leidžia manyti, jog įjungus 4-tio-2'-deoksiuridino trifosfatą į oligonukleotido ar DNR grandinės seką, tiogrupę galima selektyviai modifikuoti įvairiais hidrazino hidratu, sintetinant atitinkamus hidrazinus.

3.4. Hidrazonų sintezė

Literatūroje randama nemažai aprašytų duomenų apie hidrazinų modifikavimą acetonu, gaunant hidrazonus. Šių junginių sintezės metu atliekama standartinė hidrazino tirpinimo etanolyje procedūra, jį paveikiant acetonu. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje.



25 Schema - hidrazonų sintezės reakcijos mechanizmas

Galima hidrazonų sintezė išgrynintus hidrazinus veikiant ketonais arba aldehidais. Schemoje 17 parodytas hidrazinų reakcijos su acetonu mechanizmas. Hidrazino NH₂ grupė nukleofiliškai prisijungia acetoną, nutrūkstam dvigubajam ryšiui. Neigiamą krūvį įgavęs deguonis iš amonio katijono prisijungia vandenilį. Vandens molekulė eliminuoja vandenilio atomą, elektronams peršokant ant azoto ir taip panaikinamas jo teigiamas krūvis. Susidariusi hidroksi grupė iš amonio jono nukleofiliškai prisijungia vandenilį bei įvyksta jo migracija prie azoto atomo. Perteklinė azoto elektronų pora sudaro dvigubąjį ryšį su anglies laisva orbitale. Galiausiai vandens molekulė atskelia

vandenilį, ryšio elektronams peršokant ant azoto. Vėl atskilus amonio katijonui gaunamas hidrazonas.

Abejais atvejais, atlikus TLC su junginiais turinčiais R₁ ir R₂ grupes, hidrazonų signalai plokštelėje matomi aukščiau nei hidrazinų. Tai sąlygoja mažesnis susidariusių produktų poliškumas, lyginant su reaguojančių hidrazinų. Analizės atliktos chloroformo ir metanolio 9 : 1 tūriniu santykiu mišinio eliuento sistemoje. Trifosfatinio hidrazono reakcijos mišinio pavyzdys įvertintas atliekant TLC analizę, judria faze pasirenkant sistemą sudarytą iš dioksano, izopropanolio vandens, amoniako (4 : 2 : 5 : 1) mišinį. Šiuo atveju produkto poliškumas padidėja ir plokštelės apačioje matomas vos pakilęs produkto signalas.

3.5. Oligonukleotidų ilginimo reakcija

Matrica CCCC

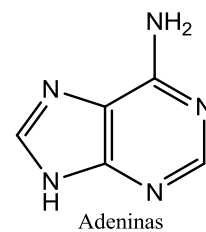
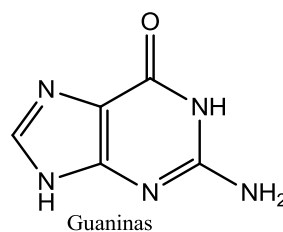
5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA

3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCCCCTTAAGGCC

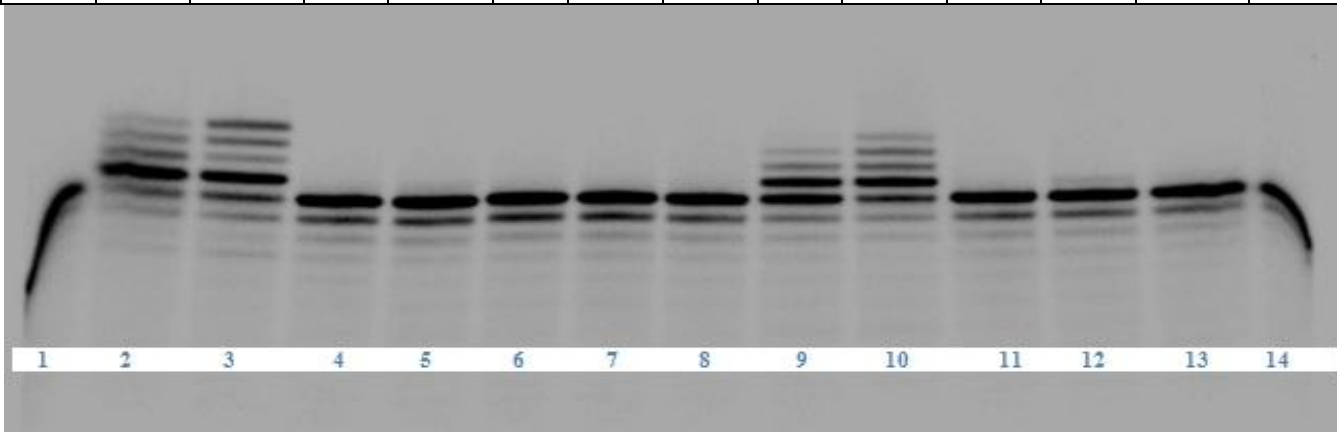
Matrica TTTT

5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA

3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTTTTTTTAAGGCC

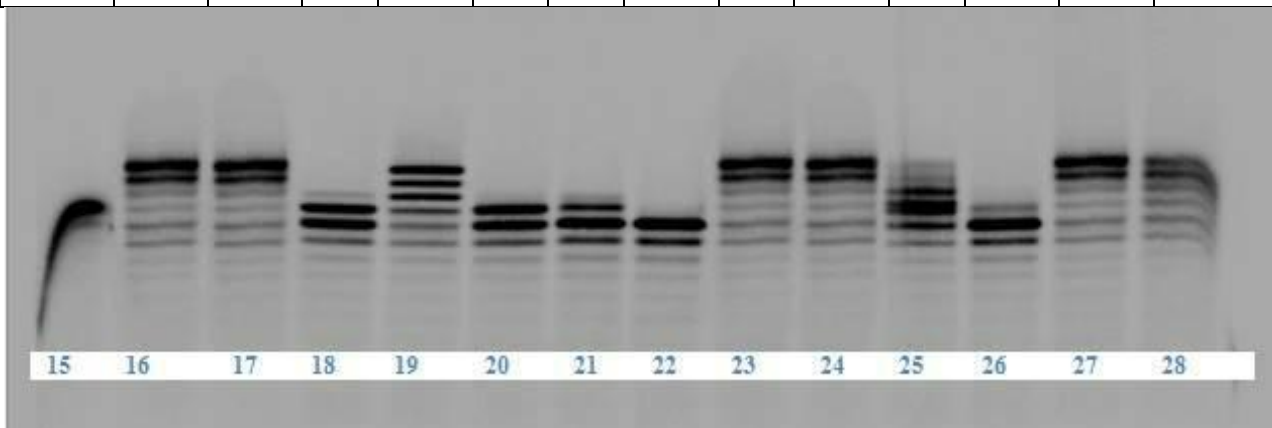


Laikas, min	Matrica CCCC						Matrica TTTT							
	0	dGTP		7	6	11	14	0	dATP		7	6	11	14
	15	5	15	15	15	15	15	15	5	15	15	15	15	15



2 Paveikslas - poliakrilamidinio gelio atvaizdas, atlikus pradmens pratęsimo reakciją su susintetintais modifikuotais deoksinukleotidais, naudojant dvi skirtingas DNR matricių sekas 5' gale turinčius vienodus CCCC arba AAAA heterociklinių bazių fragmentus. Skaičiais pažymėti takelių numeriai.

	Matrica AAAA						Matrica GGGG							
	0	dTTP		7	6	11	14	0	dCTP		7	6	11	14
Laikas, min	15	5	15	15	15	15	15	15	5	15	15	15	15	15



3 *Paveikslas - poliakrilamidinio gelio atvaizdas, atlikus pradmens pratęsimą su susintetintais modifikuotais deoksinukleotidais, naudojant dvi skirtingas DNR matricų sekas 5' gale turinčius vienodus AAAA arba GGGG heterociklinių bazių fragmentus. Skaičiais pažymėti takelių numeriai*

Neigiama kontrolė – **0**

N⁴-Benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas – **7**

N⁴-Tio-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatas – **6**

N⁴-Hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas – **11**

N⁴-(2-(propan-2-iliden)hidrazinil)-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas – **14**

Reakcijos mišiniai su 2'-deoksiguanidino trifosfatu (dGTP), 2'-deoksiadenozino trifosfatu (dATP), 2'-deoksicitidino trifosfatu (dCTP), 2'-deoksitimidino trifosfatu (dCTP) – **teigiama kontrolė**

Gamtinę DNR grandinę sudaro keturios skirtingos natūralios bazės, išsidėsčiusios įvairiomis kombinacijomis. Genomo ištyrimas bei besivystančios technologijos skatina ieškoti gamtinių nukleotidų naujų galimų modifikacijų bei jų įjungimo į DNR grandinę būdų. DNR sekoje natūralias bazes pakeitus sintetiniais nukleotidais atsiveria galimybės genetiniame lygmenyje pagerinti įvairių ligų diagnozavimo ir gydymo technologijas.

Darbo metu susintetinti keturi nukleotidai (**7, 6, 11, 14**) panaudoti oligonukleotido ilginimo reakcijoje, norint išsiaiškinti į kurią natūralią DNR bazę savo struktūra, stereochemija bei polimerazės atpažinimo galimybe ji yra panašiausia. Taip pat vertintas ilginimo reakcijos selektyvumas, tikrinant ar nukleotidas elgiasi kaip tam tikros vienos ar kelių gamtinių bazių analogas.

Oligonukleotido ilginimo reakcijų rezultatai pateikti 3 ir 4 paveiksluose. 1, 8, 15 ir 22 gelio takeliuose buvo suleista neigiama kontrolė, kurios reakcijos mišinyje nebuvo įdėtas nukleotidas,

todėl pratęsimo reakcija neįvyko ir šių takelių atvaizduose matomas tik vienas signalas, atspindintis matricos dalį (23 nukleotidai) prie kurios komplemetariai prisijungęs pradmuo. Matricos tarpusavyje skiriasi tik 24 - 27 sekos padėtyse esančiomis iš eilėmis vienodomis einančiomis natūraliomis bazėmis. Visuose reakcijos mišiniuose parinkta tokia nukleotidų koncentracija, kad maksimaliai oligonukleotidas galėtų būti prailgintas keturiomis bazėmis ir tokiu atveju paveiksle, lyginant su neigiamąja kontrole, būtų matomi dar keturi papildomi signalai. Signalų intensyvumai atspindi reakcijos mišiniuose dominuojančius ^{33}P pažymėtus oligonukleotidų pradmens fragmentus. Buvo tikėtasi 2 paveiksle pateiktų rezultatų. Susintetinti nukleotidai savo chemine struktūra smarkiai skiriasi nuo guanino bei adenino, todėl polimerazė jų neatpažįsta ir pagal komplementarumą jie negali būti įjungti į oligonukleotido seką nei prieš C, nei prieš T. Teigiama kontrolė su gamtiniais guaninu (2, 3 takeliai) bei su adeninu (9, 10 takeliai) rodo oligonukleido pratęsimo galimybę. Visai kitokios tendencijos matomos 3 paveiksle. N^4 -Tiouracilas **8** savo chemine struktūra panašus timiną. Abu jie yra sudaryti iš vieno šešianario žiedo, N^4 -oje padėtyje esančiai angliai dvigubuoju ryšiu susijungus su atitinkamu heteroatomu. Deguonies ir sieros atomų dydžiai, ir elektroneigiamumų vertės yra panašūs, todėl egzistuoja labai panaši tikimybė sudaryti vandenilinius ryšius su matricos komplementaria adenino baze. Šie teoriniai svarstymai atsispindi praktiniuose rezultatuose. 19 Takelyje matomi keturi brūkšneliai byloja tai, jog oligonukleotidas buvo prailgintas keturiomis N^4 -tiouracilo molekulėmis. Iš apačioje matomų gana ryškių trijų signalų galima spręsti, kad reakcijos mišinyje taip pat yra oligonukleotidų mišinys, prailgintų nuo 1 iki 3 modifikuotais nukleotidais. Citozino ir 4-tiouracalo molekuliniai skirtumai lemia tai, jog tiogrupę turinčio junginio polimerazė neįjungia į grandinę prieš guaniną. Benzoilinto darinio N^4 -oje padėtyje esanti anglis susijungusi su azoto atomu. Ši ypatybė leidžia išvelgti panašumą su citozinu. Jei prailginimo reakcijoje naudojama matrica turinti keturias adenino molekules, 18 takelyje stebimas silpnas benzoilinto darinio įjungimas. Kur kas produktyviau, net iki trijų modifikuotų molekulių, jis įjungiamas prieš guaniną, nors šiame reakcijos mišinyje dominuoja dvejomis modifikuotomis bazėmis prailgintas produktas. Hidrazino **11** ir hidrazono **14** reakcijos produktai beveik identiški. Prieš adeniną oligonukleotidas pratęsiama viena šių klasių junginių molekule. Hidrazino antrasis signalas intensyvesnis, todėl su juo pilniau įvyksta reakcija. Hidrazinas ir hidrazonas puikiai įjungiami prieš guaniną. Tai lemia jų struktūrinis panašumas į citoziną dėl N^4 -oje padėtyje esančios NH grupės. Oligonukleotido prailginimo reakcijos eksperimentas įrodė, jog visi keturi modifikuoti nukleotidai selektyviai gali būti įjungti prieš adeniną arba guaniną. Teoriškai numatyti rezultatai pagrįsti eksperimentiškai ir įrodyta, jog 4-tiouracilas yra timidino, o 4-benzoilcitozinas, 4-hidrazinilcitozinas ir 4-izopropilidenhidrazincitozinas citozino modifikuoti analogai oligonukleotido ilginimo reakcijoje, naudojant Taq DNR polimerazę.

IŠVADOS

1. Atlikta trijų stadijų *nukleozido* sintezė ir gautas N⁴-tio-2'-deoksiuridinas.
2. Yoshikawa's metodu susintetinti du *nukleotidų trifosfatai* - N⁴-tio-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatas ir N⁴-benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas.
3. Heterociklinės bazės N⁴ tiogrupę paveikus hidrazinu gauti trys hidrazinogrupę turintys junginiai: N⁴-hidrazinilcitozinas, N⁴-hidrazinil-2'-deoksicitidinas, N⁴-hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas trifosfatas.
4. Acetonu modifikavus gautus hidrazinus, susintetinti trys *hidrazonai*: N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinilcitozinas, N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinil-2'-deoksicitidinas, N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas.
5. Atlikti susintetintų nukleotidų biocheminiai tyrimai. Oligonukleotido prailginimo reakcijos eksperimentu įrodyta, jog visi keturi modifikuoti nukleotidai (6, 7, 11, 14) selektyviai įjungiami prieš adeniną arba guaniną. N⁴-Tio-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatas yra timino, N⁴-benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas, N⁴-hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas ir N⁴-(propan-2-iliden)hidrazinil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas - citozino analogai oligonukleotido ilginimo reakcijoje, naudojant Taq DNR polimerazę.

Synthesis and Investigation of Uracil and Cytosine Nucleosides and Nucleotides

Julija Dabužinskaitė

SUMMARY

Nucleoside 5'-triphosphates are a class of very important compounds in biological systems. Naturally occurring deoxyribo- and ribonucleoside triphosphates are the basic building blocks for enzymatic synthesis of DNA and RNA *in vivo* and *in vitro* [1], are critical mediators of myriad biological processes including DNA replication, transcription, and translation [2]. Nucleotides and their derivatives are a well-established and important class of antiviral and anticancer drugs. More recently, they have become the chemical centerpiece of the development of genetic therapies, biological probes, and modern DNA sequencing technologies, as well as investigations into the molecular mechanisms of chemical carcinogenesis and DNA repair. Among them, 5'-nucleotides have been widely used in the pharmaceutical and food industries [3].

Despite their importance in biology and medicine, the diversity of commercially available NTPs is limited because these compounds are often difficult to prepare and isolate in pure form [2]. The widespread interest in 5'-nucleotides has promoted extensive studies on their synthesis. Generally, there are four methods for the synthesis of 5'-nucleotides: (1) fermentation using microorganisms, where, in this process, nucleotides are usually difficult to get through the cell membrane due to their strong polarity, thus increasing the difficulties of extraction; (2) the enzymatic method, where microbial and plant nucleoside phosphotransferases are most widely applied as biocatalysts for the synthesis of nucleotides by the transfer of phosphate groups from organic phosphates to nucleosides; however, this method is usually limited by the narrow specificity of the enzyme and the reactions are either reversible or inhibited by the products, which need to use a gross excess of phosphate donor; (3) enzymolysis of RNA, which is the most mature method today but still has some limitations, such as a long production cycle, a complicated separation and refinement process, high processing cost, and easy contamination; and (4) the chemical synthesis method, in which this process can be divided into two stages, first, the use of phosphorylating reagent for the selective

phosphorylation of the 5'-hydroxy of the nucleoside, and subsequently, hydrolysis of phosphoryl chloride to yield the corresponding 5'- nucleotides, such as Yoshikawa's procedure [3]. However, it is not applicable to all nucleoside derivatives, especially for triphosphorylation of nucleoside analogues bearing modified bases sensitive to Yoshikawa's phosphorylation procedure. Other widely used multistep methods rely upon the use of activated nucleoside monophosphates such as unsubstituted phosphoramidate, morpholidate, or imidazolidate that undergo subsequent displacement with pyrophosphate [1].

Nucleoside 5'-triphosphates play an important role in biological processes. Then was decided to synthesize and investigate of uracil and cytosine nucleosides and nucleotides. Nucleoside was prepared in three step procedure to form N⁴-thio-2'-deoxyuridine. It and commercial N⁴-thio-2'-deoxycytidine were converted to nucleotides by Yoshikawa's procedure. Hydrazine derivatives were prepared by treatment with hydrazine hydrate of thio group and these compounds were converted to hydrazones by acetone. The ability of nucleotide analogues to extend DNA oligonucleotide was investigated. Four synthesized nucleotides (7, 6, 11, 14) could be used as substrates for DNA biosynthesis catalyzed by Taq DNR polymerase. Results show that N⁴-thio-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate is of thymine, N⁴-benzoyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate, N⁴-hydrazinyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate and N⁴-(propan-2-ylidene)hydrazinyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate are analogues of cytosine.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Wu W., Meyers C. L. F., Borch R. F., *Org. Lett.*, 6 (13), **2004**, p. 2257 - 2260.
2. Sun Q., Edathil J. P., Wu R., Smidansky E. D., Cameron C. E., Peterson B. R., *Org. Lett.*, 10 (9), **2008**, p. 1703 - 1706.
3. Zhu C., Tang C., Cao Z., HE W., Chen Y., Chen X., Guo K., Ying H., *Org. Process. Res. Dev.*, 18, **2014**, p. 1575 - 1581.
4. Zhang J., Liu B., Liu H., Zhang X., Tan W., *Nanomedicine-UK*, 8 (6), **2013**, p. 983 - 993.
5. Zhang X., Xu Y. Z., *Molecules*, 16, **2011**, p. 5656 - 5664.
6. Michihata N., Kaneko Y., Kasa Y., Tanigawa K., Hirokane T., Higasa S., Yamada H., *The J. Org. Chem.*, 78 (9), **2013**, p. 4319-4328.
7. El-Tayeb A., Qi A., Nicholas R. A., Müller C. E., *J. Med. Chem.*, 54, **2011**, p. 2878-2890.
8. Milen M., Földesi T., Dansco A., Simig G., Volk B., *New York - Synlett*, 26, **2015**, p. 2418 - 2424.
9. Coleman R. S., Kesicki E. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (26), **1994**, p. 11636 - 11642.
10. Brown D. J., Shinozuka K., *Aust. J. Chem.*, 33, **1980**, p. 1147 - 1152.
11. Zhang X., Wang J., Xu Y. Z., *Magn. Reson. Chem.* 51, **2013**, p. 523-529.
12. Boom J. H., Crea R., Lucyten W. C., Vink A. B., *Tetrahedron Lett.*, 32, **1975**, p. 2779 - 2782.
13. Toppin C. R., Pauly G. T., Devanesan P., Kryak D. Bobst A. M., *Helv. Chim. Acta*, 69, **1986**, p. 345 - 349.
14. Steigenberger B., Schiesser S., Hackner B., Brandmayr C., Laube S. K., Steinbacher J., Pfaffeneder T., Carell T., *Org. Lett.*, 15 (2), **2013**, p. 366 - 369.
15. Kore A. R., Yang B., Srinivasan B., *Tetrahedron Lett.*, 56, **2015**, p. 808 - 811.
16. Tokarenko A., Slavetinska L. P., Klepetarova B., Hocek M., *Eur. J. Org. Chem.*, 36, **2015**, p. 7962 - 7983.
17. Mishra N. C., Broom A. D., *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, 18, **1991**, p. 1276 - 1277.
18. Summerer D., Marx A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (19), **2001**, p. 3693 - 3695.
19. Hemdan M. M., Taha S. M., Gabr A. M., Elkady M. Y., *J. Chem. Res-S.*, 38, **2014**, p. 617 - 621.
20. Alissa S., *Orient. J. Chem.*, 30 (2), **2014**, p. 469 - 477.
21. Lefever M., Kosmeder J. W., Farell M., Bieniarz C., *Bioconjugate Chem.*, 21, **2010**, p. 1773 - 1778.

22. Negishi K., Harada C., Ohara Y., Oochara K., Nitta N., Hayatsu H., *Nucleic Acids Res.*, 11, **1983**, p. 5223 - 5233.
23. Krecmerova M., Hrebabecky H., Holy A., *Collect. Czech. Chem. Commun*, 61, **1996**, p. 627 - 644.
24. Zhou Y., Wang B., Di F., Xiong L., Yang N., Li Y., Li Yu., Li Z., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, **2014**, p. 2295 - 2299.
25. Lopez-Cara L. C., Carrion M. D., Entrena A., Gallo M. A., Espinosa A., Lopez A., Escames G., Acuna-Castrojiego D., Camacho M., *Eur. J. Med. Chem.*, 50, **2012**, p. 129 - 139.
26. Benstead D. J., Hule A. N., McNab H., Wight P., *Synlett*, 10, **2005**, p. 1571 - 1574.
27. Rogloff J. C., Fowler C., Ream B., Carter J. D., Warle G., Fitzwater T., *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 34, **2015**, p. 180 - 198.

PADĖKA

Dėkoju savo magistrinio darbo vadovei dr. Daivai Tauraitei už pagalbą, gilinantis į įvairių darbe aprašytų junginių sintezės metodikas bei praktinius patarimus sintetinant, gryninant ir įvairiais metodais analizuojant šiuos junginius. Taip pat esu dėkinga VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus doktorantei Jevgenijai Jakubovskai už pagalbą atliekant mano susintetintų nukleotidų trifosfatų biocheminius tyrimus ir šiems tyrimams vadovavusiam bei padėjusiam juos interpretuoti VU gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir molekulinės biologijos katedros dr. Sauliui Servai.

Publikacija ir konferencijos darbo tema

1. Tauraitė D., Dabužinskaitė J., Ražanas R., Urbonavičius J., Stankevičiūtė J., Serva S., Meškys R., Synthesis of Novel Derivatives of 5-Carboxyuracil, *Chemija*, **2015**.
2. Ražanas R., Dabužinskaitė J., Tauraitė D., Meškys R., Synthesis of Acyclic and Cyclic nucleosides, *International Conference of Lithuanian Chemical Society, Chemistry and Chemical Technology*, **2015**, Vilnius.
3. Tauraitė D., Dabužinskaitė J., Ražanas R., Serva S., Meškys R., Synthesis and Investigation of Modified Uracil Derivatives, *International Conference on Organic Synthesis, BOS*, **2014**, Vilnius.