



(11) **LT 7144 B**

(51) Int. Cl. (2025.01):

C12P 19/00
C07H 19/00

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2023 539**
(22) Paraiškos padavimo data: **2023-09-13**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2025-03-25**
(45) Patento paskelbimo data: **2025-07-10**

(73) Patento savininkas:
Vilniaus universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
Saulius KLIMAŠAUSKAS, LT
Giedrius VILKAITIS, LT
Bernadeta MASIULIONYTĖ, LT
Viktoras MASEVIČIUS, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Otilija KLIMAITIENĖ, 35, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

LT 7144 B

(54) Pavadinimas:
S-adenozil-L-metionino analogų sintezės būdas

(57) Referatas:

Aprašomas chemofermentinis būdas gaminti funkciškai aktyvius S-adenozil-L-metionino analogus su prailgintomis pernešamomis grupėmis, kurių struktūrinė formulė (I) ir (II), iš atitinkamų alkilbromidų ir S-adenozil-L-homocisteino.

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas yra susijęs su S-adenozil-L-metionino (AdoMet) analogų (nuo AdoMet priklausomų metiltransferazių kofaktorių), turinčių prailgintus struktūrinius fragmentus, naudingus biotechnologiniams taikymams, gamyba chemofermentiniu būdu; būtent susijęs su halogenidų metiltransferazės nukreipta stereomeriškai grynų AdoMet analogų sinteze, naudojant atitinkamus alkilhalogenidus ir S-adenozil-L-homocisteiną.

TECHNIKOS LYGIS

DNR citozinų, histonų aminorūgščių ir RNR adeninų arba ribozinų metilinimas yra pagrindiniai epigenetiniai mechanizmai, dalyvaujantys daugelyje svarbių biologinių procesų, įskaitant embriono vystymąsi, transkripciją, chromatino struktūrą, ligų patogenezę ir kt. Šias fermentines reakcijas katalizuoja gausi klasė nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) priklausomų metiltransferazių (MTazių), kurios perneša metilo grupę iš ko-substrato (kofaktoriaus) AdoMet ant N-, C-, O- arba S-nukleofilų (Moore et al. 2013). Pastaraisiais metais sukonstruotos MTazės, pasižyminčios alkiltransferaziniu aktyvumu, leidžia perkelti prailgintus struktūrinius fragmentus su funkcinėmis arba reporterinėmis grupėmis nuo AdoMet analogų ant specifinių molekulių ar taikinių ir turi didžiulį potencialą cheminės ir sintetinės biologijos srityse (Struck et al. 2012; Tomkuvienė et al. 2019). Šie fermentai naudojami kaip įrankiai epigenetinių/epitranskriptominių/biologinių procesų ir jų reguliavimo dekodavimui, ar netgi ir mažų cheminių junginių, tokių kaip vaistai, maisto produktai ir kiti natūralūs produktai, sintezei (Mickutė et al. 2021; Stankevičius et al. 2022; Mo et al. 2017; Kunjapur et al. 2016).

Įvairūs funkciniai AdoMet analogai buvo sukurti ir panaudoti DNR, RNR, baltymų ar mažų molekulių žymėjimui, kad būtų galima izoliuoti, vizualizuoti ir analizuoti šias pažymėtas biomolekules, naudojant naujos kartos sekoskaitą ir kitas technologijas (Lukinavičius et al., 2012 ir 2013; Stankevičius et al. 2022; Mickutė et al. 2021; Staševskij et al. 2017; Osipenko et al. 2017). Dauguma dabartinių metodų naudoja AdoMet analogus su ilga pernešama dalimi su trigubuoju ryšiu šalia reaktyvaus anglies atomo, kad būtų užtikrinta efektyvi DNR MTazės reakcija (Lukinavičius et al., 2013; Tomkuvienė et al. 2019).

Deja, negamtinių AdoMet analogų cheminė sintezė yra brangi, dažnai labai sudėtinga ir pasižymi prastu stereoselektyvumu, maža išeiga, o daugeliui biologinių taikymų reikia miligraminių kiekių. Dėl cheminės sintezės metu kylančių sunkumų, chemofermentinė kofaktorių gamyba būtų pranašesne, nes ji siūlo: geresnį saito-, stereo- ir chemoselektyvumą; didesnį stabilumą dėl aplinkos temperatūros, švelnių ir vandens aplinkos sąlygų, kurios yra labai svarbios ferment veikimui; didesnį tvarumą ir bioortogonalumą; mažesnius kaštus (Bennett et al. 2017; Mordhorst et al. 2017; Zhang et al. 2021; Liao and Seebeck 2020; Doyon and 35 Narayan 2020).

Paskutiniu metu chemofermentinei sintezei buvo naudojami du skirtingi fermentai. Metionino adenosiltransferazės gali pagaminti platų kofaktorių asortimentą, naudodamos ATP ir L-metionino (L-Met) analogus (Huber et al. 2020; Shu et al. 2020; Hartstock et al. 2018).

Halogenazės – adenosil-chlorido sintazė ir adenosil-fluorido sintazė – katalizuodamos atvirkštinę reakciją gamina kofaktorių, naudojant L-Met arba jo darinius ir 5'-chloro- arba 5'-fluoro-5'-deoksiadenoziną (Davis et al. 2018; Bennett et al. 2017; Thomsen et al. 2013).

Tačiau šių chemoenziminiai metodikų taikymas susiduria su reikšmingomis kliūtimis, įskaitant sudėtingą cheminę L-Met analogų sintezę; ląstelinio L-Met konkurenciją su L-Met analogais biologinėje aplinkoje, kuri reikalauja ląstelių kultivavimo nenatūralioje metionino neturinčioje terpėje (Tang et al. 2021b).

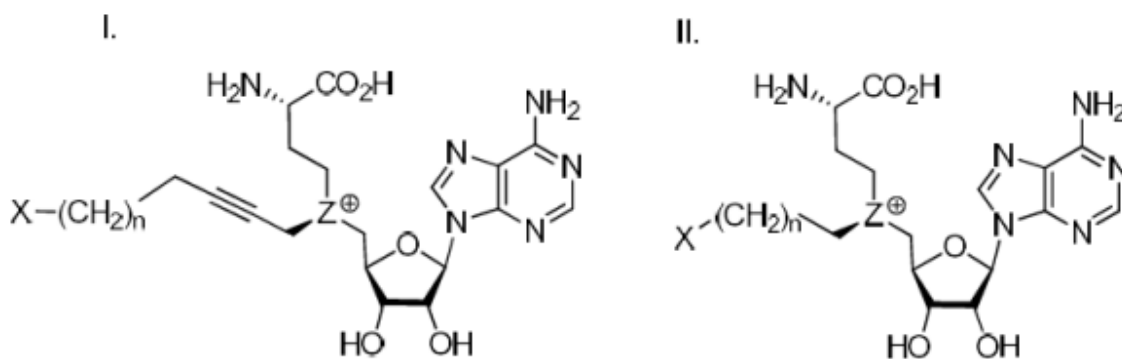
Halidinių metiltransferazių (HMT) taikymas leidžia naudoti S-adenozil-L-homocisteiną (AdoHcy) ir haloalkanus, kurių sintezė yra paprastesnė (Liao and Seebeck 2019; Bengel et al. 2021; Tang et al. 2021a; Hoffmann et al. 2023). Anksčiau skelbtame AdoMet analogų serijos kūrime, naudojant *Aspergillus clavatus* HMT (Schülke et al. 2022) pademonstruota, kad alkilhalidams su ilgesnėmis nei 5 anglies atomų grandinėmis konversijos išeiga yra mažesnė nei 10%. Artimiausiame žinomame išradime (Hoffmann et al. 2023), alkilinimo išeiga su benzilo jodidu pasiekė 29% (naudojant 2,5 ekvivalento haloalkano, 0,1 ekvivalento fermento AdoHcy atžvilgiu ir inkubuojant 2 valandas 37°C temperatūroje), tačiau junginys taip pat suteikė didelį (10%) nespecifinį foninį reaktyvumą (cheminį nestereoselektyvų alkilinimą) kontrolinėse reakcijose. Bendrai, kiti ankstesni išradimai pranešė apie kofaktorių su prie sulfonio prijungtomis ilgesnėmis nei 5 anglies atomų grandinėmis gamybą su išeigomis mažesnėmis nei 50%.

Šios techninės problemos sprendimas pasiekiamas pateikiant 1-5 paveiksluose parodytus pavyzdžius, kurie demonstruoja, kaip pagaminti funkciškai aktyvius AdoMet analogų stereoizomerus su prailgintomis šoninėmis grandinėmis ilgesnėmis nei 5 anglies atomai, pasiekiant konversijos išeigas, viršijančias 60–95%.

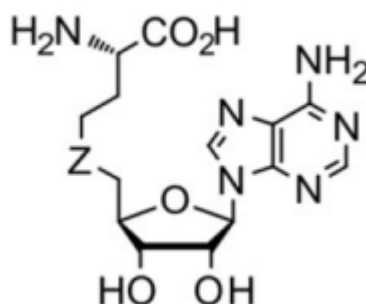
IŠRADIMO ESMĖ

Pristatomas išradimas pateikia chemofermentinį būdą gamybai AdoMet analogų su struktūriniais fragmentais, tinkamais efektyvioms modifikavimo reakcijoms, naudojant AdoMet-priklausomas metiltransferazes. Būdas apima AdoMet analogų su struktūriniais fragmentais, turinčiais reporterinę grupę arba funkcinę grupę, sintezę, kurie gali būti naudojami tiksliniam DNR metiltransferazės nukreiptam specifinių taikinių baltymuose, RNR ar DNR žymėjimui;

Chemofermentinis S-adenozil-L-metionino (AdoMet) analogų, turinčių struktūrinius fragmentus su funkicine grupe arba reporterine grupe, gavimo būdas, naudojant I ir II formulių junginius



būdas, apimantis III formulės AdoMet pirmtako molekulės reakciją



su alkilhalogenidu R-Hal ir halidine metiltransferaze (HMT) tokiomis sąlygomis,

kurios tinkamos AdoHcy arba SeAdoHcy paversti į AdoMet analogus,

kur

n yra 0, 1, 2, 3 arba 4

Z yra S arba Se

X yra funkcinė arba reporterinė grupė: N₃, C≡CH, NH₂, arba 4-Y-2,3,5,6-tetrazin-1-il, 4-(4'Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il

kur

W yra para-arilenas, kurio struktūrą sudaro bet koks skaičius ir bet koks šių struktūros elementų derinys: N, CH, C-Oalkil (C₁-C₁₂).

Y yra H, CH₃, OCH₃, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂CH₂CH₃, fenil, 4-CH₃Ofenil, 3,4-diCH₃Ofenil, arba 2,6-diCH₃Ofenil.

R yra CH₂-(CH₂)_n-X arba CH₂-C≡C-(CH₂)_n-X ir yra sujungtas su Z (I, II, III formulės junginiai). Mokslininkai parodė, kad grybo *Aspergillus clavatus* halidinė metiltransferazė gali tiesiogiai pernešti ilgesnius struktūrinius fragmentus nuo tam tikrų halogenalkanų (R-Hal) ant S-adenozil- L-homocisteino S atomo. Vienas iš variantų halogenidas R-Hal1, bromidas su 6-azidoheks-2-inilo fragmentu, turintis galinę funkcinę azido grupę, kuri gali būti naudojama RNR arba DNR metiltransferazių ssRNR, dsRNR ir DNR taikinių analizei, naudojant *click* chemijos reakcijas. Antras variantas halogenidas R-Hal2, bromidas su prailgintu fragmentu, turintis galinę 1,2,4,5-tetrazino grupę. 1,2,4,5-tetrazinai tapo plačiai naudojami bioortogonaliose *click* chemijos reakcijose (Oliveira ir kt., 2017).

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Paveikslai yra pateikiami kaip nuoroda į galimus įgyvendinimo planus ir nėra skirti apriboti išradimo apimtį. Pateikti paveikslai ir grafikai neturėtų būti interpretuojami kaip ribojantys išradimo apimtį, jie pateikiami kaip galimo įgyvendinimo pavyzdys.

1 pav. Bendra schema, kuri vaizduoja S-adenozil-L-homocisteino (AdoHcy) stereoselektyvų S-alkilinimą arba Se-adenozil-L-homoselenocisteino (SeAdoHcy) stereoselektyvų Se-alkilinimą, kurį katalizuoja grybo *Aspergillus clavatus* halidinė metiltransferazė (HMT), panaudojant alkilhalogenidus (R-Hal), turinčius ilgesnius

struktūrinius fragmentus.

2 pav. HMT katalizuoja AdoMet kofaktoriaus analogo Ado-6-azido sintezę, pernešant ilgesnį struktūrinį fragmentą nuo halogeno atomo azido-1-bromheks-2-ine (R-Hal1) ant AdoHcy sieros atomo. A. Ado-6-azido sintezė skirtingais laiko taškais, panaudojant AdoHcy ir HMT sistemą, HPLC analizė. B. Chromatogramų AdoHcy, C₁₄H₂₁N₆O₅S (teorinė 385,1294; nustatyta 385,1291) ir produkto Ado-6-azido, C₂₀H₂₈N₉O₅S⁺ (teorinė 506,1929; nustatyta 506,1929) MS analizė. C. HMT sintezė iš AdoHcy į Ado-6-azidą, turintį 6-azidoheks-2-inilo grupę, skirtingais laiko taškais. Visos reakcijos buvo atliktos naudojant 1 mM AdoHcy, 10 mM R-Hal1 ir 100 μM fermento 25 °C temperatūroje. Reakcijos inaktyvuotos 0,5 M fosforo rūgštimi ir centrifuguotos 20000 g 30 min. 4 °C temperatūroje. Paruošti mėginiai buvo įnešti į integruotą HPLC/ESI-MS/MS sistemą (Agilent 1290 Infinity/6410 Triple Quad LC/MS), turinčią Supelco Discovery®HS C18 kolonėlę (7,5 cm × 2,1 mm, 3 μm), ir eliuoti su linijiniu tirpiklių gradientu (A) 0,02 % skruzdžių rūgšties tirpale vandenyje ir (B) 0,02 % skruzdžių rūgšties tirpale acetonitrile po 0-2 min., 0 % B; 2-8 min., 0-15 % B; 8-9 min., 15-95 % B; 9-14min 100 % B; 14-15 min., 100-0 % B; 15-20 min., 0 % B. Masių spektrometras veikė teigiamų jonų režimu ir buvo užfiksuoti šių jonų perėjimų MRM skaičiavimai: AdoHcy 385,1 → 136,1; Ado-6-azidas 506,2 → 250,1 arba 506,2 → 136,1.

3 pav. HMT perneša ilgesnį struktūrinį fragmentą nuo halogeno atomo 3-(2-bromoetil)-6-metil-1,2,4,5-tetrazinas (R-Hal2) ant AdoHcy sieros atomo ir katalizuoja AdoMet kofaktoriaus analogo Ado-2-Tet sintezę. A. Ado-2-Tet sintezė, panaudojant AdoHcy ir HMT sistemą, HPLC analizė. Pateikta chromatograma rodo AdoHcy konversiją į Ado-2-Tet per 60 min. B. Chromatogramų AdoHcy, C₁₄H₂₁N₆O₅S (teorinė 385,1294; nustatyta 385,1291) ir produkto Ado-2-Tet, C₁₉H₂₇N₁₀O₅S⁺ (teorinė 507,1881; nustatyta 507,1891) MS analizė. C. HMT sintezė iš AdoHcy į Ado-2-Tet, turintį metil-tetrazino-etilo grupę, skirtingais laiko taškais. Visos reakcijos buvo atliktos naudojant 1 mM AdoHcy, 10 mM R-Hal2 ir 100 μM fermento 25 °C temperatūroje. Reakcijos inaktyvuotos 0,5 M fosforo rūgštimi ir centrifuguotos 20000 g 30 min. 4 °C temperatūroje. Paruošti mėginiai buvo įnešti į integruotą HPLC/ESI-MS/MS sistemą (Agilent 1290 Infinity/6410 Triple Quad LC/MS), turinčią Supelco Discovery®HS C18 kolonėlę (7,5 cm × 2,1 mm, 3 μm), ir eliuoti su linijiniu tirpiklių gradientu (A) 0,02 % skruzdžių rūgšties tirpale vandenyje ir (B) 0,02 % skruzdžių

rūgšties tirpale acetonitrile po 0-2 min., 0 % B; 2-8 min., 0-15 % B; 8-9 min., 15-95 % B; 9-14 min 100 % B; 14-15 min., 100-0 % B; 15-20 min., 0 % B. Masių spektrometras veikė teigiamų jonų režimu ir buvo užfiksuoti šių jonų perėjimų MRM skaičiavimai: AdoHcy 385,1 → 136,1; Ado-2-Tet 507,2 → 250,1 arba 507,2 → 136,1.

4 pav. HMT Ado-6-azido sintezė yra stereospecifinė, nes susidaro tik funkciškai aktyvus S140 epimeras (sulfonio epimerų pasiskirstymas remiasi AdoMet). Chemofermentinė reakcija buvo atlikta naudojant 1 mM AdoHcy, 10 mM 6-azido-1-bromheks-2-ino (R-Hal1), 100 μM AclHmt 25 °C temperatūroje 30 min. (2 eilutė). Kontrolinis mėginys – chemiškai susintetintas Ado-6-azido kofaktorius, turintis sulfonio S- ir R-epimerų mišinį (Lukinavičius ir kt., 2013) (1 eilutė). Paruošti mėginiai buvo įnešti į integruotą HPLC/ESI-MS/MS sistemą (Agilent 1290 Infinity/6410 Triple Quad LC/MS), turinčią Supelco Discovery®HS C18 kolonėlę (7,5 cm × 2,1 mm, 3 μm), ir eliuoti su linijiniu tirpiklių gradientu (A) 0,0075 % skruzdžių rūgšties tirpale vandenyje ir (B) 0,0075 % skruzdžių rūgšties tirpale acetonitrile po 0-5 min., 0 % B; 5-15 min., 0-10 % B; 15-20 min., 10-100 % B; 20-24 min., 100 % B; 24-24,5 min., 100-0 % B; 24,5-30 min., 0 % B. Masių spektrometras veikė teigiamų jonų režimu ir buvo užfiksuoti Ado-6-azido 506,2 → 250,1 jonų perėjimo skaičiai.

5 pav. HMT susintetintas Ado-6-azido kofaktorius in situ naudojamas eM.HhaI DNR citozino-5 metiltransferazės specifinio GCGC taikino DNR sekoje alkilnimui, 2'-deoksicitidiną verčiant 5-(6-azidoheksynil)-2'-deoksicidinu (N3-m5dC). Kaskadinės reakcijos buvo atliktos naudojant 50 μM AclHmt, 100 μM AdoHcy, 10 mM 6-azido-1-bromheks-2-ino (R-Hal1), 500 ng pUC19 plazmidinės DNR, 1 μM eM.HhaI (Q842A/Y254S/N304A HhaI DNR citozino-5 metiltransferazės 155 mutantas, kaip aprašyta Lukinavičius ir kt., 2012) ir inkubuotos 1 val. 37 °C temperatūroje, inaktyvacija kaitinant 10 min. 80 °C temperatūroje (2 linija). Neigiama kontrolė atlikta be AclHmt baltymo (3 linija); teigiama kontrolė atlikta naudojant tik 500 ng pUC19 plazmidinės DNR, 1 μM eM.HhaI ir 100 μM chemiškai susintetinto Ado-6-azido (1 linija), kaip aprašyta Lukinavičius ir kt. 2013. Išgryninus mėginius, 500 ng modifikuotos DNR buvo hidrolizuota iki nukleozidų su 0,01 U/μL P1 nukleazės 4 val. 50 °C temperatūroje, po to inkubuojama per naktį su 0,01 U/μL šarmine fosfataze 37 °C temperatūroje. Reakcijos buvo sustabdytos kaitinant 10 min. 80 °C temperatūroje ir centrifuguojant 20000 g 30 min. 4 °C temperatūroje. Paruošti mėginiai buvo įnešti į integruotą HPLC/ESI-MS/MS sistemą (Agilent 1290 Infinity/6410 Triple Quad LC/MS),

sumontuotą su Supelco Discovery®HS C18 kolonėle (7,5 cm × 2,1 mm, 3 μm), ir eliuoti linijiniu tirpiklių gradientu (A) 0,0075 % skruzdžių rūgšties tirpale vandenyje ir (B) 0,0075 % skruzdžių rūgšties tirpale acetonitrile po 0-5 min., 0 % B; 5-15 min., 0-10 % B; 15-20 min., 10-100 % B; 20-24 % min., 100 % B; 24-24,5 min., 100-0 % B; 24,5-30 min., 0 % B. Masių spektrometras veikė teigiamų jonų režimu ir buvo užfiksuoti N3-m5dC 349,2 → 233,1 jonų perėjimo skaičiai.

6 pav. HMT Ado-6-azido kofaktoriaus sintezė beveik 3 kartus efektyvesnė, kai buferio pH 6,5 lyginant su pH 7,4. Chemofermentinė sintezė buvo atlikta naudojant 1 mM SAH, 10 mM R-Hal1 ir 100 μM AclHmt 25 °C temperatūroje 3 val., kai buferio pH 6,5 arba 7,4. Mėginiai analizuoti naudojant HPLC-MS, kaip aprašyta 4 pav. Reakcijos metu gauto Ado-6-azido kiekis vaizduojamas chromatogramoje 1 – kai pH 6,5, 2 – kai pH 7,4.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Kaip nurodyta aukščiau, šis išradimas siūlo halidinių metiltransferazių vykdomą chemofermentinę sintezę AdoMet analogų biologiškai aktyvių epimerų, kurie efektyviai veikia nuo AdoMet priklausomose fermentinėse reakcijose, analizuojant biomolekulių modifikavimą *in vitro* ir *in vivo*, kur pernešama ilgesnio fragmento dalis turi reporterinę arba funkcinę grupę.

AdoMet analogų, kurių I ir II formulės pateiktos 1 pav., chemofermentinė sintezė remiasi bendra schema, naudojant AdoHcy ir atitinkamą alkilhalogenidą R-Hal1 arba R-Hal2. Epimeriškai gryno AdoMet analogo, kuris pavaizduotas I formulėje, sintezės pavyzdys yra Ado-6-azidas, kuris gaunamas iš AdoHcy ir 6-azido-1-bromheks-2-ino, kaip pavaizduota 2 ir 4 pav. Tokiu būdu susintetintas Ado-6-azidas panaudotas metiltransferazių nukreiptai DNR derivatizacijai pavaizduotas 5 pav. AdoMet analogo, kuris pavaizduotas II formulėje, sintezės pavyzdys yra Ado7 2-Tet, kuris gaunamas iš AdoHcy ir 3-(2-bromoetil)-6-metil-1,2,4,5-tetrazino, kaip pavaizduota 3 pav. pavyzdžiai rodo, kad pasirenkant tinkamus bromidų pirmtakus ir tinkamas reakcijos sąlygas, kurios pateiktos 2 ir 3 pav. (10 ekvivalentų alkilbromido, 0,1 ekvivalento fermento 190 AdoHcy atžvilgiu ir inkubuojant 0,5–1 val. 25 °C temperatūroje), Ado-6-azido ir Ado-2-Tet kofaktoriai gali pasiekti išeigą >90% ir >60%, atitinkamai. Vykdomos reakcijos atsižvelgia į šiuos 3 veiksnius:

1) AdoMet ir jo analogai greitai skyla po ilgos inkubacijos priklausomai nuo temperatūros. Kaip aprašyta pateiktuose pavyzdžiuose, trumpesnis inkubacijos laikas (0,5-1 val.), žemesnė cheminį skylimą ir padidina kofaktoriaus išeigą.

2) Alkiljodidai, naudoti ankstesniuose tyrimuose (Bengel ir kt. 2021; Tang ir kt. 2021a; Hoffmann ir kt. 2023; Schülke ir kt. 2022) paprastai yra labiau reaktyvūs abejose, tiesioginėje ir atvirkštinėje, reakcijose, dėl to gali atsirasti nespecifinių alkilinio produkto (nestereoselektyvių produkto (Hoffmann ir kt., 2023) ir mažesnė išeiga dėl atvirkštinės reakcijos metu susikaupusio jodido anijono. Norėdami išvengti šių trūkumų, reakcijos substratu pasirinkome alkilbromidus.

3) Atlikta žinomų baltymų kristalų struktūros analizė parodė, kad AdoMet analogai su ilgesniais struktūriniais fragmentais gali būti surišti AclHmt baltymo aktyviajame centre. Manome, kad ilgesnių fragmentų aukštą pernešimo efektyvumą galima pasiekti derinant SN2 reakcijos tinkamą elektroninį aktyvumą (dėl šalia esančios trigubos jungties (I formulė) arba tetrazino žiedo (II formulė) su sulfoniu sujungtoje dalyje).

Fermentas

Išradėjai parodė, kad halidinės metiltransferazės gali pernešti ilgus struktūrinius fragmentus, turinčius reporterinę ar funkcinę grupę nuo alkilhalido ant AdoHcy. Halidinės metiltransferazės, naudojamas čia aprašytu būdu, galima rasti augaluose, grybuose, bakterijose ir pageidautina, kad AclHmt koduotų genas iš *Aspergillus clavatus*. Laukinio tipo metiltransferazės AclHmt sekas galima rasti GenBank, prieigos Nr. XP_001272206 (tiolo metiltransferazė, tariama).

Metiltransferazės geno nukleotidų seka optimizuota remiantis kodonų naudojimo dažniu *E. coli*, nekeičiant koduojamų aminorūgščių:

```
CATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
ATGTCTACTCCCTCACTGATTCCGAGCGGTGTGCACGAGGTTCTTGCAAAGTAT
AAGGATGGGAATTACGTGGACGGCTGGGCGGAATTGTGGGATAAATCTAAGGG
TGATCGCCTGCCGTGGGACCGTGGCTTTCCGAATCCGGCACTTGAGGATACAC
TTATTCAAAGCGTGCCATTATTGGCGGGCCGTTAGGTCAGGATGCCCAAGGTA
AAACTTATCGTAAGAAAGCCCTCGTTCCTGGGTGTGGGCGTGGCGTCGATGTAC
TTTTACTGGCATCGTTTGGTTATGACGCGTACGGGCTGGAATATTCAGCAACCG
```

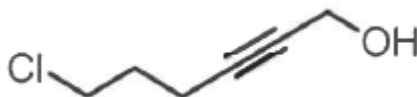
CCGTTGACGTTTGCCAAGAAGAACAAGCCAAGAATGGCGACCAGTATCCAGTCC
 GCGACGCAGAAATTGGTCAAGGTAAAATTACGTTTCGTTCAAGGGGACTTCTTCG
 AAGACACGTGGTTAGAGAAATTGAACCTTACCCGTAATTGTTTTGATGTTATCTA
 TGA CTATACCTTCTTTTGTGCTCTGAATCCGAGCATGCGTCCTCAGTGGGCGCT
 GCGCCATACCCAAC TTTTAGCGGACAGCCCGCGTGGCCATCTGATTTGTCTGGA
 GTTCCCGCGCCATAAAGACCCGAGTGTGCAGGGCCCGCCCTGGGGATCGGCA
 AGTGAAGCCTATCGTGCGCACCTCAGTCATCCTGGTGAAGAGATTCCGTATGAC
 GCGTCTCGCCAGTGTCAATTCGATTCTTCAAAGCACCGTCCGCGCAAGGGCT
 GGAACGCGTGGCCTACTGGCAGCCAGAACGCACTCACGAGGTGCGCAAGAAC
 GAGAAAGGCGAAGTGCAGGACCGCGTGTCAATCTGGCAACGTCCCCCGCAGTC
 TAGCCTGTAA

AcIhMT amino rūgščių seka turi prijungtą N-galinį HisTag (paryškinta) ir yra tokia:

HHHHHSSGLVPRGSHMSTPSLIPSGVHEVLAKYKDGNYVDGWAELWDK
 SKGDRLPWDRGFPNPALEDTLIQKRAIIGGPLGQDAQGKTYRKKALVPGCGRGVDV
 LLLASFGYDAYGLEYSATAVDVCQEEQAKNGDQYPVRDAEIGQGKITFVQGDFFED
 TWLEKLNLTRNCFDVIYDYTFFCALNPSMRPQWALRHTQLLADSPRGHLICLEFPRH
 KDPSVQGPPWGSASEAYRAHLSHPGEEIPYDASRQCQFDSSKAPSAQGLERVAY
 WQPERTHEVGKNEKGEVQDRVSIWQRPPQSSL

Alkilbromidai, skirti naudoti čia aprašytuose būduose, turi funkcinę arba reporterinę grupę, kuri gali būti pernešta aukščiau aprašyto fermento ant AdoHcy arba Se-AdoHcy.

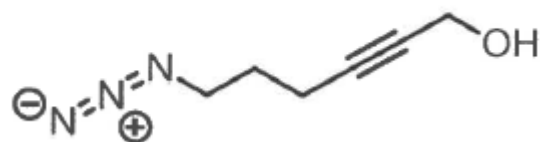
6-azido-1-bromheks-2-ino (R-Hal1) sintezė



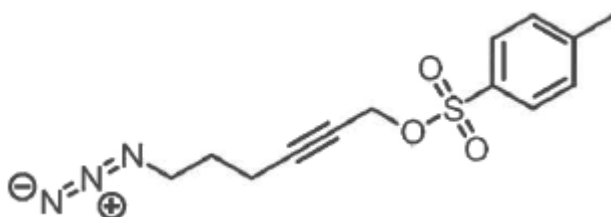
6-chlorheks-2-in-1-olis. Maišomas sauso THF (120 ml) ir 5-chlor-1-pentino (10 ml, 94,4 mmol) tirpalas argono aplinkoje atšaldomas iki -78 °C. Tada pridedama 2,5 M butiličio tirpalo heksanuose (37,8 ml, 93 mmol) ir maišoma 30 min. Po to į reakcijos mišinį suberiamas paraformas (3,36 g, 104 mmol) ir maišoma dar 30 min. Tada aušinimo vonia pašalinama ir reakcijos indas paliekamas sušilti iki kambario

temperatūros. Reakcija sustabdoma įpylus 100 ml šalto (0 °C) vandens. Mišinys supilamas į dalijamąjį piltuvą, organinė fazė atskiriama. Vandeninis sluoksnis ekstrahuotas dietileteriu (2 x 40 ml). Organiniai sluoksniai sujungiami, džiovinami natrio sulfatu ir išgarinami. Produktas buvo gryninamas distiliuojant vakuume. Gaunama bespalvė alyva (9,51 g; 76 %). ^1H BMR (400 MHz, CDCl_3): 1,98 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 + \text{OH}$); 2,44 (tt, 2H, $^3J = 6,3$ Hz, $^5J = 2,1$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CCH}_2$); 3,67 (t, 2H, $^3J = 6,3$ Hz, CH_2Cl); 4,27 (t, 2H, $^5J = 2,1$ Hz, CH_2OH).

6-azidoheks-2-in-1-olis. Į maišomą 6-chlorheks-2-in-1-olio (2,266 g, 2 ml, 17,1 mmol, 1 ekv.) tirpalą DMF (15 ml) suberiama natrio azido (3,33 g, 51,3 mmol; 3 ekv.) ir tetrabutilamonio bromide (0,551 g, 1,71 mmol).

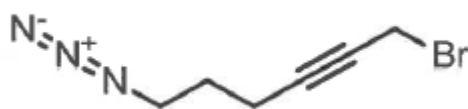


Reakcijos mišinys buvo maišomas 24 valandas 80 °C temperatūroje (smėlio vonia). Tada sumažintame slėgyje pašalinamas DMF ir įpilama 20 ml vandens. Produktas ekstrahuotas dietilo eteriu (3 x 30 ml), organiniai sluoksniai sujungiami, džiovinami natrio sulfatu ir tirpiklis išgarinamas. Produktas gryninamas sausos kolonėlinės vakuuminės chromatografijos būdu (DCVC), iš pradžių eliuuojant CH_2Cl_2 , o po to $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc}$ (20:1). Gaunama bespalvė alyva (2,13 g; 90%). ^1H BMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1,78 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 + \text{OH}$); 2,34 (tt, 2H, $^3J = 6,9$ Hz, $^5J = 2,4$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CCH}_2$); 3,41 (t, $^3J = 6,9$ Hz, 2H, CH_2N_3); 4,24 (t, 2H, $^5J = 2,4$ Hz, CH_2OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 16,04; 27,69; 50,16; 51,12; 79,49; 84,36.

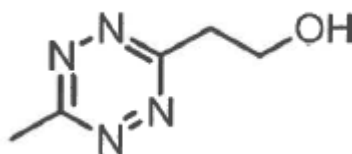


6-azidoheks-2-in-1-ilo 4-metilbenzensulfonatas. Argonu užpildytoje

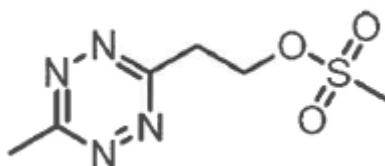
apvaliadugnėje kolboje 6-azidoheks-2-in-1-olis (800 mg; 5,75 mmol; 1 ekv.) ištirpinamas 15 ml THF ir mišinys atšaldomas iki 0 °C (ledo vonia). Įberiama kalio tret-butoksido (632 mg; 5,63 mmol; 0,98 ekv.), tada po 5 min. įberiama 4-metilbenzensulfonilchlorido (1,10 g; 5,75 mmol; 1 ekv.) ir maišoma. Po 1 valandos tirpiklis išgarinamas rotaciniu garintuvu. Į likutį įpilama 40 ml dietileterio, organinis sluoksnis plaunamas 20 ml sotaus NaHCO₃, tada 20 ml sočiojo natrio chlorido tirpalu. Organinė faze džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, filtruojama ir išgarinama rotaciniu garintuvu. Likutis gryninamas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant tolueną kaip eliuentą. ¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,46 (s, 3H, CH₃); 3,48 (t, J = 5,1 Hz, 2H, CH₂N₃); 5,16 (t, J = 5,1 Hz, 2H, CH₂O); 7,37 (d, J = 8,2 Hz, 2H, Ar3-H); 7,81 (d, J = 8,2 Hz, 2H, Ar2-H) NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21,8; 49,7; 68,2; 280 128,1; 130,1; 132,7; 145,4.



6-azido-1-bromheks-2-inas. 6-azidoheks-2-in-1-il-4-metilbenzensulfonatas (1,40 g; 4,71 mmol; 1 ekv.) ir ličio bromidas (2,07 g; 23,8 mmol; 5 ekv.) ištirpinami 50 ml acetono apvaliadugnėje kolboje. Reakcijos mišinys virinamas 18 valandų esant grįžtamajam šaldytuvui. Po reakcijos acetonas rotaciniu garintuvu išgarinamas sumažintame slėgyje, ne žemiau 100 mbar. Į likutį įpilama 30 ml vandens ir ekstrahuojama dietileteriu (3 x 20 ml), organiniai sluoksniai apjungiami, džiovinami bevandeniu MgSO₄, filtruojama, dietileteris išgarinamas sumažintame slėgyje. Produktas gryninamas sausos kolonėlinės vakuuminės chromatografijos būdu (DCVC), naudojant petrolio eterį, po to produktas eliuuojamas PE:DCM (3:1). Frakcijos, kuriose yra produktas, apjungiamos, o tirpikliai išgarinami sumažintame slėgyje naudojant rotacinį garintuvą. Produktas džiovinamas 50 mbar slėgyje. Gaunama bespalvė alyva (810 mg; 84%). ¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,79 (q, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂); 2,32-2,41 (m, 2H, C≡CCH₂CH₂); 3,41 (t, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂N₃); 3,88-3,95 (m, 2H, CH₂Br). ¹³C BMR (100 MHz, CDCl₃): δ 15,2; 16,3; 27,6; 295 50,1; 76,5; 86,1.

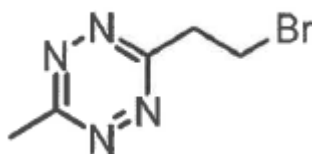
3-(2-brometil)-6-metil-1,2,4,5-tetrazino (R-Hal2) sintezė.

2-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etan-1-olis. 3-hidroksipropannitrilas (2,00 g; 1,87 ml; 28,1 mmol; 1 ekv.), acetonitrilas (9,24 g; 11,8 ml; 0,255 mol; 8 ekv.), 3-merkaptopropano rūgštis (2,99 g; 2,45 ml; 28,1 mmol; 1 ekv.) ir hidrazino hidratas (22,54 g; 21,84 ml; 0,450 mol; 16 ekv.) sumaišomi apvaliadugnėje kolboje ir tirpalas maišomas 18 valandų. Po to mišinys supilamas į 500 ml apvaliadugnę kolbą, atšaldomas ledo vonioje iki 0 °C ir įpilama natrio nitrito (29,12 g; 0,422 mol; 15 ekv.) tirpalo vandenyje (80 ml). Stipriai maišant, lašintuvu lėtai pilama 3M HCl (apie 250 ml per 2 valandas), kol nutrūksta dujų išsiskyrimas ir reakcijos pH nukrenta žemiau <3. Vandėninis tirpalas išgarinamas rotaciniu garintuvu 55 °C temperatūroje sumažintame slėgyje. Likę rausvi kristalai plaunami DCM (4 × 50 ml). Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, filtruojamas, tirpiklis išgarinamas rotaciniu garintuvu. Likutis gryninamas kolonėline chromatografija, eliuentu naudojant DCM:MeOH (40:1) mišinį. Gaunama purpurinė alyva (1,48 g; 37%). ¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,37 (pl. s, 1H, OH); 3,05 (s, 3H, CH₃); 3,55 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂CH₂OH); 4,24 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂CH₂OH). ¹³C BMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21,1; 37,4; 60,0; 167,8; 168,3.



2-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etilmetansulfonatas. 2-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etan-1-olis (782 mg; 5,58 mmol; 1 ekv.) ir metansulfonilchloridas (1 28 g; 864 µl; 11,2 mmol; 2 ekv.) ištirpinami 30 ml DCM apvaliadugnėje kolboje. Paruoštas tirpalas atšaldomas iki 0 °C ledo vonioje, įpilama trietilamino (1,13 g; 1,56 ml; 11,2 mmol; 2 ekv.) ir maišoma ledo vonioje 10 minučių. Po to ledo vonelė pašalinama ir mišinys papildomai maišomas 20 min. kambario temperatūroje. Reakcijos mišinys

plaunamas 20 ml sotaus NaHCO₃ ir 20 ml sotaus natrio chlorido tirpalais. Organinė faze džiovinama bevandeniu MgSO₄, filtruojama. Organinė fazė supilama į apvaliadugnę kolbą ir įberiama 10 ml silicio dioksido. Mišinys rotaciniu garintuvu išgarinamas, produktas lieka absorbuotas ant silicio dioksido. Produktas gryninamas sausos kolonėlinės vakuuminės chromatografijos būdu (DCVC), pirmiausia eliuuojant šalutinį produktą DCM, po to tikslinį produktą eliuuojant



DCM:MeOH (50:1) mišiniu. Gaunama purpurinė alyva (1,08 g; 89 %). ¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,02 (s, 3H, SCH₃); 3,07 (s, 3H, CCH₃); 3,76 (t, J = 6,2 Hz, 2H, CCH₂); 4,87 (t, J = 6,2 Hz, 2H, OCH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21,3; 34,7; 37,7; 66,1; 166,2; 168,3.

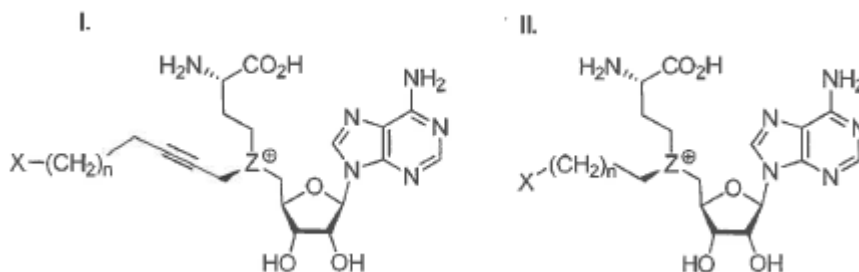
3-(2-brometil)-6-metil-1,2,4,5-tetrazinas. 2-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etilmetsulfonatas (208 mg; 0,953 mmol; 1 ekv.), ličio bromidas (414 mg; 4,77). mmol; 5 ekv.) ištirpinamas 10 ml acetone apvaliadugnėje kolboje. Mišinys virinamas 3 valandas esant grįžtamajam šaldytuvui, po to rotaciniu garintuvu pašalinamas acetonas. Į likutį įpilama 20 ml dietileterio, organinis sluoksnis plaunamas 10 ml sotaus NaHCO₃ ir 10 ml sotaus natrio chlorido tirpalais. Organinė faze džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, filtruojama, o tirpiklis išgarinamas rotaciniu garintuvu. Produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant DCM kaip eliuentą. Gaunama purpurinė alyva (181 mg; 95%). ¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,07 (s, 3H, CH₃); 3,89 (t, J = 6,2 Hz, 2H, CCH₂); 3,97 (t, J = 6,2 Hz, 2H, CH₂Br). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21,3; 28,2; 37,8; 167,4; 168,2.

Chemofermentiniu metodu susintetinti kofaktoriai

Čia aprašytais būdais pagaminti kofaktoriai yra pagrįsti S-adenozil-L-metionino (AdoMet) molekulės struktūra ir yra S-adenozil-L-metionino arba Se-adenozil-L-selenometionino analogai, turintys funkcinę grupę struktūriniame fragmente, kuris gali

būti perneštas ant taikinio.

Šie AdoMet analogai gali turėti tokią struktūrinę formulę:



$n = 0-4$

$Z = S, Se$

$X = N_3, C\equiv CH, NH_2, 4-Y-2,3,5,6-tetrazin-1-il, 4-(4'Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il$

kur

$W = para\text{-arilenas}$, kurio struktūrą sudaro bet koks skaičius ir bet koks šių struktūros element derinys: N, CH, C-Oalkil (C_1-C_{12}).

$Y = H, CH_3, OCH_3, NH_2, NHCH_3, N(CH_3)_2, CH_2CH_3, CH(CH_3)_2, CH_2CH_2CH_3$, fenil, 4- CH_3 Ofenil, 3,4-di CH_3 Ofenil, 2,6-di CH_3 Ofenil.

Vienas iš variantų yra I formulės junginys, kur $n=2$, $Z = S$ ir $X = N_3$ (Ado-6-azido kofaktorius

aprašytas Pav. 2).

Kiti I formulės junginių variantai, kur $n=2$, $Z = S$ ir $X = C\equiv CH$ arba NH_2 .

Kito I formulės junginio variantas yra, kur $n=0$, $Z = S$ ir $X = 4-(4'Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il$, $W =$

$para\text{-fenil}$ ir $Y = CH_3$.

Vienas iš II formulės junginio variantų yra, kur $n = 1$, $Z = S$, $X = 4-Y-2,3,5,6-tetrazin-1-il$ ir $Y = CH_3$

(Ado-2-Tet kofaktorius aprašytas Pav. 3).

Kitas II formulės junginio variantas yra, kur $n = 1$, $Z = S$, $X = 4-(4'Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il$, $W =$

para-fenil ir Y= CH₃.

Lentelė 1. Sekų sąrašas

SEQ ID Nr:	Aprašymas	Molekulės tipas	Organizmo pavadinimas	Molekulių kvalifikatoriaus tipas	Seka
SEQ ID Nr. 1. 4703853	tiolio metiltransferazė, numanoma	DNA	<i>Aspergillus clavatus</i>	Genominė seka prieinama GenBank, prisijungimo Nr. 4703853	ATGTCCACGCCT TCTCTCATCCCCT CCGGCGTCCACG AAGTCCTCGCCA AATACAAAGACG GAAACTATGTCGA TGGATGGGCCGA GCTCTGGGACAA GAGCAAAGGCCGA CCGTCTACCCTG GGATAGAGGATT CCCCAACCCCGC GCTGGAAGACAC CCTGATCCAGAA ACGCGCGATCAT CGGCGGCCCCCT CGGCCAAGACG CACAGGGCAAGA CGTACCGCAAGA AGGCGCTGGTAC CGGGCTGCGGTC GCGGTGTGGACG TGTTGCTGTTGG CGAGCTTCGGGT ACGATGCCTATG GTTTGGAGTACA GCGCCACTGCGG TGGATGTGTGTC AGGAGGAGCAGG CGAAGAACGGGG

LT 7144 B

					ATCAATACCCCGT GCGGGATGCGGA GATCGGACAGGG CAAGATCACCTTT GTGCAGGGTGAT TTCTTCGAGGATA CATGGTTGGAGA AGCTAAATCTGAC GCGGAACTGCTT CGACGTGATTTAC GATTACACGTTTT TCTGCGCGTTGA ACCCCTCAATGC GCCCACAATGGG CCCTCAGACACA CTCAGCTACTCG CAGATTCACCCC GCGGGCACCTCA TCTGCCTTGAATT TCCAAGACACAA GGATCCATCCGT TCAAGGACCTCC GTGGGGTTCAGC TCGGAGGCTTAC CGGGCACATCTG AGCCACCCGGGC GAGGAAATCCCC TACGATGCCAGC CGTCAATGCCAG TTTGACTCCTCAA AGGCCCAAGCG CACAGGGACTTG AGCGAGTCGCGT ATTGGCAACCAG AGCGGACCCATG AAGTTGGGAAGA ATGAGAAGGGGG AGGTTCAAGATC GGGTTTCGATATG GCAGC
--	--	--	--	--	---

LT 7144 B

					GTCCTCCTCAATC GTCTCTTTAG
SEQ ID Nr 2. Optimizuota 4703853	tiolio metiltransferazė, numanoma	DNA	sintetinė	XP_0012722 06 geno nukleotidų seka, kuri buvo optimizuota naudojant <i>E. coli</i> pageidaujamus kodonus, nekeičiant aminorūgščių	CATCATCATCATC ATCACAGCAGCG CCTGGTGCCGCG CGGCAGCCAT AT G TTACTCCCTCAC TGATTCCGAGCG GTGTGCACGAGG TTCTTGCAAAGTA TAAGGATGGGAAT TACGTGGACGGC TGGGGGAATTGT GGGATAAATCTAA GGGTGATCGCCT GCCGTGGGACCG TGGCTTTCCGAAT CCGGCACTTGAG GATACACTTATTC AAAAGCGTGCCA TTATTGGCGGGC CGTTAGGTCAGG ATGCCCAAGGTA AAACTTATCGTAA GAAAGCCCTCGT TCCTGGGTGTGG GCGTGGCGTCGA TGACTTTTACTG GCATCGTTTGTT ATGACGCGTACG GGCTGGAATATTC AGCAACCGCCGT TGACGTTTGCCA AGAAGAACAAGC CAAGAATGGCGA CCAGTATCCAGT CCGCGACGCAGA AATTGGTCAAGG TAAAATTACGTTC

LT 7144 B

					GTTCAAGGGGAC TTCTTCGAAGACA CGTGTTAGAGA AATTGAACCTTAC CCGTAATTGTTTT GATGTTATCTATG ACT ATACCTTCTTTTG TGCTCTGAATCC GAGCATGCGTCC TCAGTGGGCGCT GCGCCATACCCA ACTTTTAGCGGA CAGCCCGCGTGG CCATCTGATTTGT CTGGAGTTCCCG CGCCATAAAGAC CCGAGTGTGCAG GGCCCGCCCTGG GGATCGGCAAGT GAAGCCTATCGT GCGCACCTCAGT CATCCTGGTGAA GAGATTCCGTATG ACGCGTCTCGCC AGTGTCAATTCGA TTCTTCCAAAGCA CCGTCCGCGCAA GGGCTGGAACGC GTGGCCTACTGG CAGCCAGAACGC ACTCACGAGGTC GGCAAGAACGAG AAAGGCGAAGTG CAGGACCGCGTG TCAATCTGGCAA CGTCCCCCGCAG TCTAGCCTGTAA
SEQ ID	AcIHMT	Baltymas	<i>Aspergillus</i>	Aminorūgščių	MSTPSLIPSGVHE

LT 7144 B

Nr 3. AclHMT			<i>clavatus</i>	seka	VLAKYKDGNYVD GWAELWDKSKGD RLPWDRGFPNPA LEDTLIQKRAIIGG PLGQDAQGKTYR KKALVPGCGRGV DVLLLASFGYDAY GLEYSATAVDVCQ EEQAKNGDQYPV RDAEIGQGKITFV QGDDFFEDTWLEK LNLTRNCFDVIYD YTFFCALNPSMRP QWALRHTQLLAD SPRGHLICLEFPR HKDPSVQGPPWG SASEAYRAHLSHP GEEIPYDASRQCQ FDSSKAPSAQGLE RVAYWQPERTHE VGKNEKGEVQDR VSIWQRPPQSSL
SEQ ID Nr 4. HisTag- AclHMT	AclHMT aminorūgščių seka (tiolio metiltransferazė, numanoma) su N-galo HisTag	Baltymas	rekombinantin ė	Aminorūgščių seka	HHHHHHSSGLVP RGSHM STPSLIPS GVHEVLAKYKDG NYVDGWAELWDK SKGDRLPWDRGF PNPALEDTLIQKR AIIGGPLGQDAQG KTYRKKALVPGCG RGVDVLLLASFGY DAYGLEYSATAVD VCQEEQAKNGDQ YPVRDAEIGQGI TFVQGDDFFEDTW LEKLNLTNCFDVI YDYTFFCALNPSM RPQWALRHTQLL ADSPRGHLICLEF

LT 7144 B

					PRHKDPSVQ GPPWGSASEAYR AHLSHPGEEIPYD ASRQCQFDSSKA PSAQGLERVAYW QPERTHEVGKNE KGEVQDRVSIWQ RPPQSSL
--	--	--	--	--	---

Literatūros sąrašas

Bengel LL, Aberle B, Egler-Kemmerer A-N, Kienzle S, Hauer B, Hammer SC. 380 2021. Engineered Enzymes Enable Selective N-Alkylation of Pyrazoles With Simple Haloalkanes. *Angew Chem Int Ed Engl* 60: 5554–5560.

Bennett MR, Shepherd SA, Cronin VA, Micklefield J. 2017. Recent advances in methyltransferase biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 37: 97–106.

Davis TD, Kunakom S, Burkart MD, Eustaquio AS. 2018. Preparation, Assay, and Application of Chlorinase SalL for the Chemoenzymatic Synthesis of S-Adenosyl-L-Methionine and Analogs. *Methods Enzymol* 604: 367–388.

Doyon TJ, Narayan ARH. 2020. Synthetic utility of one-pot chemoenzymatic reaction sequences. *Synlett Acc Rapid Commun Synth Org Chem* 31: 230–236.

Hartstock K, Nilges BS, Ovcharenko A, Cornelissen NV, Püllen N, Lawrence-Dörner A-M, Leidel SA, Rentmeister A. 2018. Enzymatic or In Vivo Installation of Propargyl Groups in Combination with Click Chemistry for the Enrichment and Detection of Methyltransferase Target Sites in RNA. *Angew Chem Int Ed Engl* 57: 6342–6346.

Hoffmann A, Schülke KH, Hammer SC, Rentmeister A, Cornelissen NV. 2023. Comparative S395 adenosyl-L-methionine analogue generation for selective biocatalytic Friedel-Crafts alkylation. *Chem Commun Camb Engl*.

Huber TD, Clinger JA, Liu Y, Xu W, Miller MD, Phillips GN, Thorson JS. 2020. Methionine Adenosyltransferase Engineering to Enable Bioorthogonal Platforms for AdoMet-Utilizing Enzymes. *ACS Chem Biol* 15: 695–705.

Kunjapur AM, Hyun JC, Prather KLJ. 2016. Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the E. coli de novo vanillin biosynthesis pathway. *Microb Cell Factories* 15: 61.

Liao C, Seebeck FP. 2020. Asymmetric β -Methylation of L- and D- α -Amino Acids by a Self-Contained Enzyme Cascade. *Angew Chem Int Ed Engl* 59: 7184–7187.

Liao C, Seebeck FP. 2019. S-adenosylhomocysteine as a methyl transfer catalyst in biocatalytic methylation reactions. *Nat Catal* 2: 696–701.

Lukinavičius G., Lapinaitė A., Urbanavičiūtė G., Gerasimaitė R., Klimašauskas S. 2012. *Nucleic Acids Res*, 40: 11594–11602.

Lukinavičius G., Tomkuvienė M., Masevičius V., Klimašauskas S. 2013. Enhanced Chemical Stability of AdoMet Analogues for Improved Methyltransferase-Directed Labeling of DNA. *ACS Chem. Biol.* 8: 1134–1139.

Mickutė M., Kvederavičiūtė K., Osipenko A., Mineikaitė R., Klimašauskas S., Vilkaitis G. 2021. Methyltransferase-directed orthogonal tagging and sequencing of miRNAs and bacterial small RNAs. *BMC Biol* 19: 129.

Mo X, Gui C, Wang Q. 2017. Elucidation of a carboxylate O-methyltransferase 415 NcmP in nocamycin biosynthetic pathway. *Bioorg Med Chem Lett* 27: 4431–4435.

Moore LD, Le T, Fan G. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 38: 23–38.

Mordhorst S, Siegrist J, Müller M, Richter M, Andexer JN. 2017. Catalytic Alkylation Using a Cyclic S-Adenosylmethionine Regeneration System. *Angew Chem Int Ed Engl* 56: 4037–4041.

Oliveira BL, Guo Z, Bernardes GJL. 2017. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev* 46: 4895–4950.

Osipenko A, Plotnikova A, Nainytė M, Masevičius V., Klimašauskas S, Vilkaitis G. 2017.

Oligonucleotide-Addressed Covalent 3'-Terminal Derivatization of Small RNA Strands for Enrichment and Visualization. *Angew Chem Int Ed Engl* 56: 6507–6510.

Schülke KH, Ospina F, Hörnschemeyer K, Gergel S, Hammer SC. 2022. Substrate Profiling of Anion Methyltransferases for Promiscuous Synthesis of S-Adenosylmethionine Analogs from Haloalkanes. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 23: e202100632.

Shu X, Cao J, Cheng M, Xiang S, Gao M, Li T, Ying X, Wang F, Yue Y, Lu Z, et al. 2020. A metabolic labeling method detects m6A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol* 16: 887–895.

Stankevičius V, Gibas P, Masiulionytė B, Gasiulė L, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. 2022. Selective chemical tracking of Dnmt1 catalytic

activity in live cells. *Mol Cell* 82: 1053-1065.e8.

Staševskij Z, Gibas P, Gordevičius J, Kriukienė E, Klimašauskas S. 2017. Tethered Oligonucleotide-Primed Sequencing, TOP-Seq: A High-Resolution Economical Approach for DNA Epigenome Profiling. *Mol Cell* 65: 554-564.e6.

Struck A-W, Thompson ML, Wong LS, Micklefield J. 2012. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 13: 2642–2655.

Tang Q, Grathwol CW, Aslan-Üzel AS, Wu S, Link A, Pavlidis IV, Badenhorst CPS, Bornscheuer UT. 2021a. Directed Evolution of a Halide Methyltransferase Enables Biocatalytic Synthesis of Diverse SAM Analogs. *Angew Chem Int Ed* 60: 1524–1527.

Tang Q, Pavlidis IV, Badenhorst CPS, Bornscheuer UT. 2021b. From Natural Methylation to Versatile Alkylations Using Halide Methyltransferases. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 22: 2584–2590.

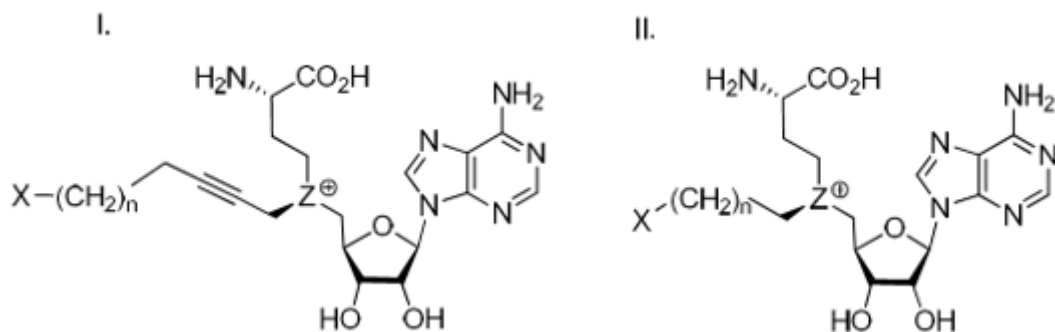
Thomsen M, Vogensen SB, Buchardt J, Burkart MD, Clausen RP. 2013. Chemoenzymatic synthesis and in situ application of S-adenosyl-L-methionine analogs. *Org Biomol Chem* 11: 7606–7610.

Tomkuvienė M, Mickutė M, Vilkaitis G, Klimašauskas S. 2019. Repurposing enzymatic transferase reactions for targeted labeling and analysis of DNA and RNA. *Curr Opin Biotechnol* 55: 114–123.

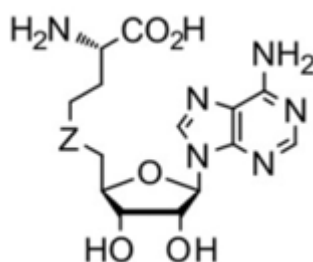
Zhang C, Sultan SA, T R, Chen X. 2021. Biotechnological applications of S-adenosyl-methionine-independent methyltransferases for natural products biosynthesis and diversification. *Bioresour 455 Bioprocess* 8: 72.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Chemofermentinis S-adenozil-L-metionino (AdoMet) analogų, turinčių prailgintus struktūrinius fragmentus su funkicine grupe arba reporterine grupe, gavimo būdas, naudojant I ir II formulių junginius



būdas, apimantis III formulės AdoMet pirmtako molekulės reakciją



su alkilhalogenidu R-Hal ir halidine metiltransferaze (HMT) tokiomis sąlygomis, kurios tinkamos AdoHcy arba SeAdoHcy paversti į AdoMet analogus,

kur

n yra 0, 1, 2, 3 arba 4

Z yra S arba Se

X yra funkcinė arba reporterinė grupė

R yra $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-X}$ arba $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C-(CH}_2\text{)}_n\text{-X}$.

2. Būdas pagal 1 punktą, kur X yra N_3 , $\text{C}\equiv\text{CH}$, NH_2 arba 4-Y-2,3,5,6-tetrazin-1-il, 4-(4'-Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il

kur

W yra *para*-arilenas, kurio struktūrą sudaro bet koks skaičius ir bet koks šių struktūros elementų derinys: N, CH, C-Oalkil (C₁-C₁₂),

Y yra H, CH₃, OCH₃, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂CH₂CH₃, fenil, 4-CH₃Ofenil, 3,4-diCH₃Ofenil arba 2,6-diCH₃Ofenil.

3. Būdas pagal 1 punktą, kur AdoHcy arba SeAdoHcy modifikacija yra katalizuojama *Aspergillus clavatus* halidine metiltransferaze (HMT).

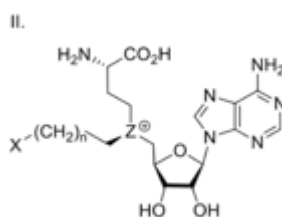
4. Būdas pagal 1 punktą, kur R-Hal yra alkilbromidas.

5. Būdas pagal 1 punktą, kur R-Hal yra 6-azido-1-bromheks-2-inas (R-Hal1) arba 3-(2-bromoetil)-6-metil-1,2,4,5-tetrazinas (R-Hal2).

6. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, kur būdas apima 10 molinių ekvivalentų alkilhalogenido, 0,1 molinių ekvivalentų HMT ir 1 molinių ekvivalentų AdoMet pirmtako molekulės inkubavimą 25°C temperatūroje ir 6,5 pH nuo 0,5 iki 1 h.

7. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, kur būdas apima 10 molinių ekvivalentų alkilbromido, 0,1 molinių ekvivalentų HMT ir 1 molinių ekvivalentų AdoMet pirmtako molekulės inkubavimą 25°C temperatūroje ir 6,5 pH nuo 0,5 iki 1 h.

8. AdoMet analogas, pagal formulę II



kur

n yra 0, 1, 2, 3 arba 4

Z yra S arba Se

X yra N_3 , $C\equiv CH$, NH_2 , arba 4-Y-2,3,5,6-tetrazin-1-il, 4-(4'Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il

kur

W yra *para*-arilenas, kurio struktūrą sudaro bet koks skaičius ir bet koks šių struktūros elementų derinys: N, CH, C-Oalkil (C_1-C_{12}),

Y yra H, CH_3 , OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, CH_2CH_3 , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2CH_3$, fenil, 4- CH_3 Ofenil, 3,4-di CH_3 Ofenil, arba 2,6-di CH_3 Ofenil.

9. AdoMet analogas, gautas būdu pagal vieną iš 1-7 punktų, ir turintis struktūrinę formulę II,

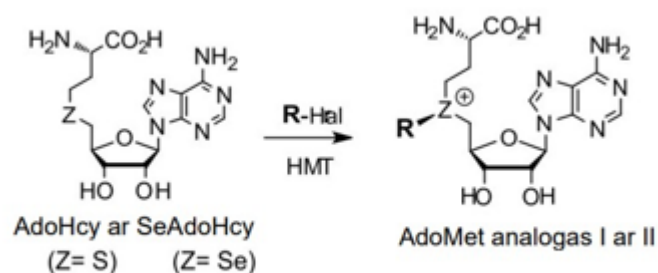
kur

a) n yra 1, Z yra S, X yra 4-Y-2,3,5,6-tetrazin-1-il ir $Y = CH_3$; arba

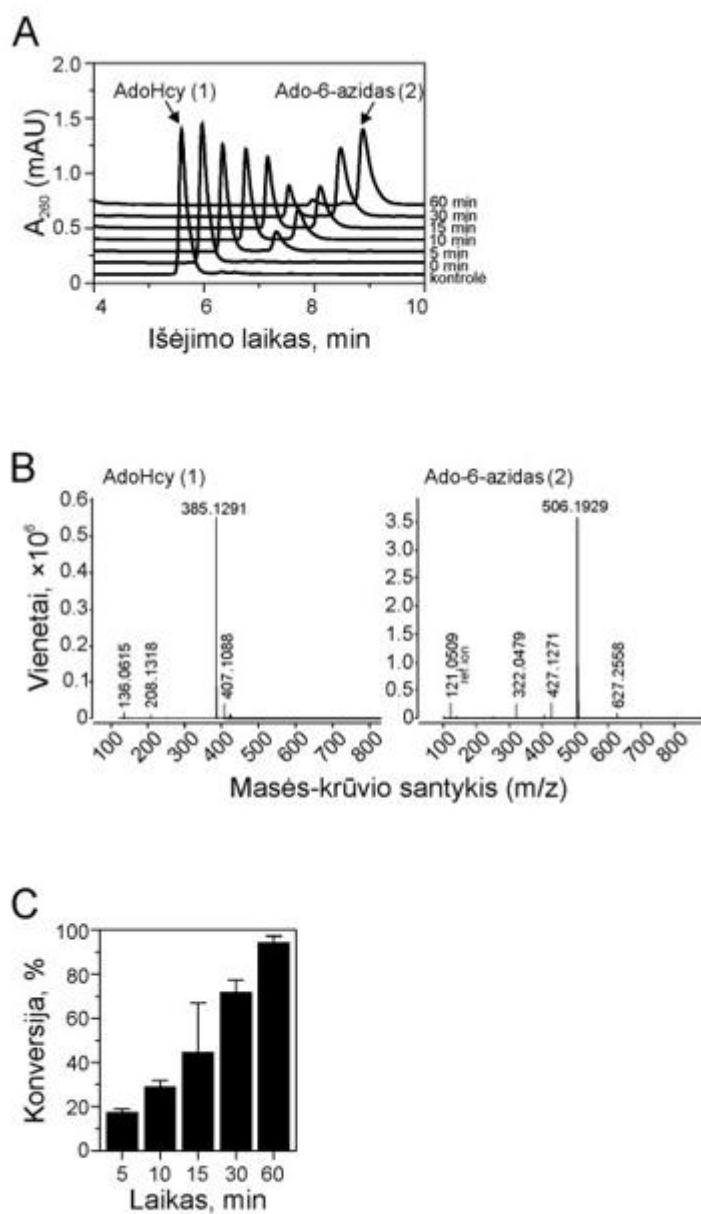
b) n yra 1, Z yra S, X yra 4-(4'Y-2,3,5,6-tetrazin-1'-il)-W-1-il, W= *para*-fenil ir $Y = CH_3$.

10. AdoMet I ir II analogai pagal 1-9 punktus naudojami kaip nuo AdoMet-priklausomų metiltransferazių kofaktoriai.

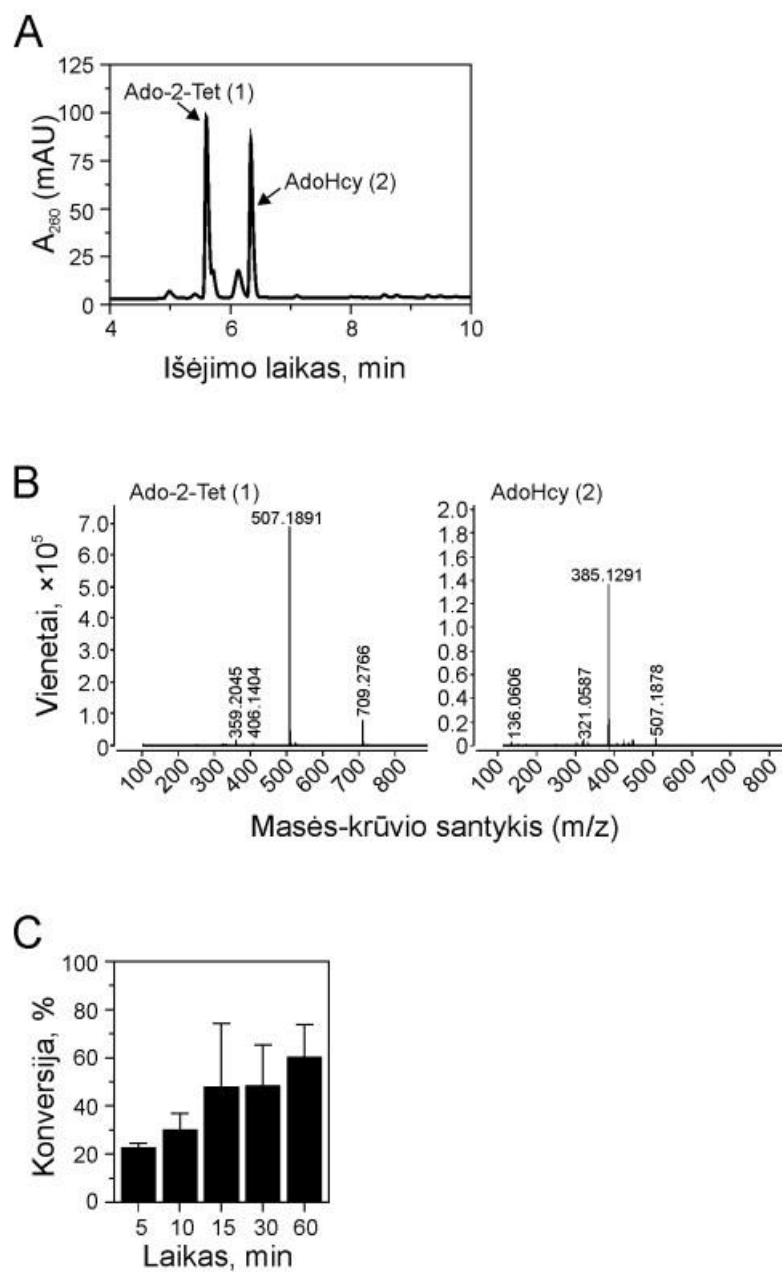
11. AdoMet II analogai pagal 1-10 punktus naudojami specifinių taikinių ant baltymų, RNR ar DNR selektyviam žymėjimui, naudojant atitinkamas nuo AdoMet-priklausomas metiltransferazes.



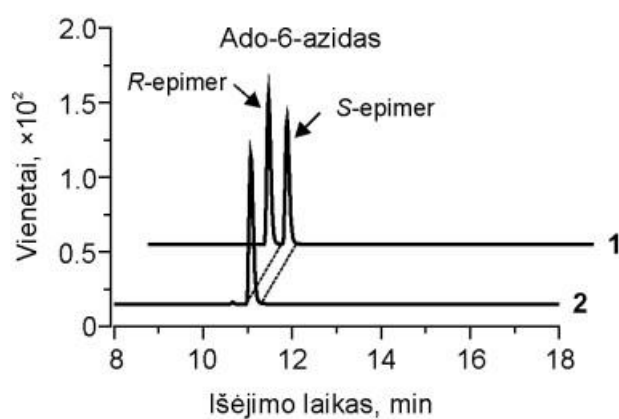
Pav. 1



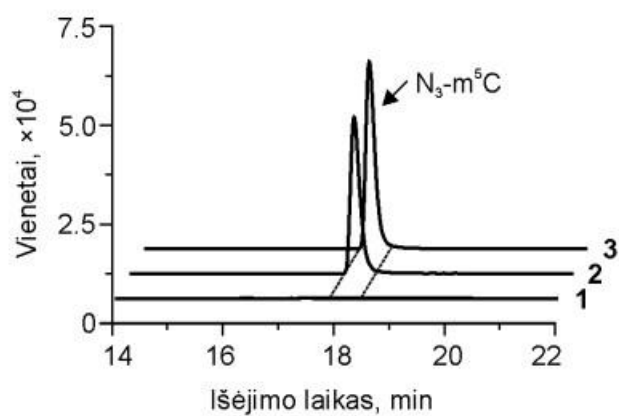
Pav. 2



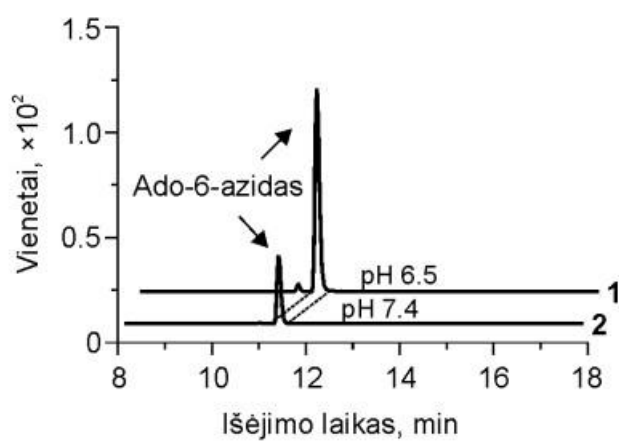
Pav. 3



Pav. 4



Pav. 5



Pav. 6