



Doctoral Thesis

## Untersuchungen über Oligonucleotide mit 2-Deoxy-D-ribose, 2,3-Dideoxy-D-glucopyranose und D-Allopyranose als Zuckerbausteine

**Author(s):**

Giger, Alfred

**Publication Date:**

1992

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000694127> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 9975

UNTERSUCHUNGEN ÜBER OLIGONUCLEOTIDE MIT  
2-DEOXY-D-RIBOSE, 2,3-DIDEOXY-D-GLUCOPYRANOSE UND  
D-ALLOPYRANOSE ALS ZUCKERBAUSTEINE

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
ALFRED GIGER  
dipl. Chem. ETH  
geboren am 17. September 1964  
von Entlebuch LU

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent  
Dr. Ch. Leumann, Korreferent

Zürich 1992

## A Zusammenfassung

---

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Synthese, Charakterisierung und besonders der Aufklärung der AU-, AT- und die für die Homo-DNA eigene AC-Paarung und dem Vergleich mit den analogen Sequenzen in der natürlichen DNA.

Des weiteren wurden Oligonucleotide in der Reihe der Homo-DNA von Adenin- und Thymin-haltigen Sequenzen mit  $\alpha$ -Konfiguration am anomeren Zentrum hergestellt und deren Eigenschaften untersucht.

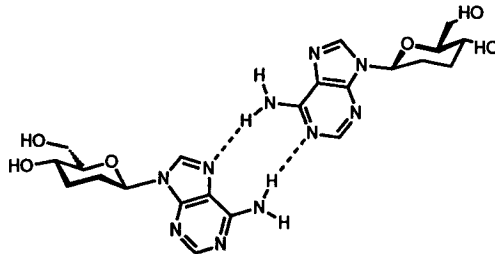
Darauf wurde ein neues Nucleosid, Homo-deoxy-7-carbaadenosin, zur strukturellen Aufklärung der AA-, AT- und AC-Paarungen, sowie, in Zusammenarbeit mit K. Zimmermann [81], zur erstmaligen Darstellung eines Purin-Purin-Purin Homo-DNA Triplexes eingeführt. Die Synthese dieses Nucleosids erfolgte in Analogie zu derjenigen in der Deoxyribofuranosylreihe, die in der Literatur von Seela [39] beschrieben ist.

Die Oligonucleotidsynthese aller Sequenzen erfolgte nach der von Caruthers [31] und Letsinger [32] eingeführten Phosphoramiditmethode.

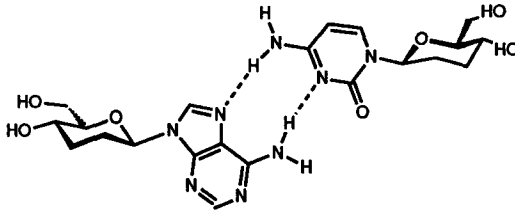
Die Palette der bisher durch Arbeiten von Böhringer [18], Roth [21] und Hunziker [22] bekannten Paarungseigenschaften von Homo-DNA konnten durch die Resultate in dieser Arbeit wie folgt erweitert werden:

- Eine AU-Paarung in Homo-DNA ist deutlich schwächer als eine AT-Paarung. Die grössere Stabilität der AT-Paarung beruht auf dem betragsmässig grösseren Enthalpieterm des Paarungsprozesses.
- Die AU-, wie auch die AT-Paarung in Homo-DNA Oligonucleotiden sind stärker als die entsprechenden Paarungen der natürlichen DNA. Die vergleichsweise grössere Stabilität ist entropisch bedingt.
- In der Homo-DNA Reihe existiert eine AC-Paarung. Diese Paarung ist deutlich schwächer als die entsprechende AT- und AU-Paarung. Diese schwächere Paarung ist auf einen weniger negativen Enthalpieterm des Paarungsprozesses zurückzuführen.
- Die AC-Paarung in Homo-DNA kann durch Protonierung des Homo-deoxycytidins nicht beeinflusst werden.
- Blockweise AC Sequenzen der Homo-DNA Serie ( $dd(A_5C_5)$  und  $dd(A_4C_4)$ ) gehen keine AC-, sondern eine AA-Paarung ein.
- Es konnte gezeigt werden, dass die AA-gepaarten Stränge in Homo-DNA antiparallel orientiert sind.

- $\alpha$ -Homo-deoxy-adenosin- und  $\alpha$ -Homo-thymin-Oligonucleotide paaren weder mit sich selbst, noch gehen sie eine  $\alpha A$ - $\alpha T$ -Paarung, noch eine  $\alpha A$ - $\beta T$ -Paarung ein. Diese Experimente wurden von R.P. Hammer [82] ausgeführt.
- Oligonucleotidstränge von Homo-DNA, die Watson-Crick-artig paaren, sind antiparallel orientiert. Dieses Resultat wurde in Zusammenarbeit mit C. Leumann [20] erhalten.
- Homo-DNA paart nicht mit einem entsprechenden parallelen oder antiparallelen DNA-Komplementärstrang. Dieses Resultat wurde in Zusammenarbeit mit C. Leumann [20] erhalten.
- Oligonucleotide, die Homo-deoxy-7-carbaadenosin enthalten, paaren nicht mit sich selbst. Das bedeutet, dass eine AA-Paarung nicht Watson-Crick-artig gepaart sein kann. Zusammen mit den Informationen von Böhlinger [18] ergibt sich als einzige verbleibende Möglichkeit für die AA-Paarung in Homo-DNA eine reverse Hoogsteen-artige Basenpaarung.



- Homo-DNA bildet Purin-Purin-Purin Triplexe wie im Fall von  $dd(G_6) \cdot dd(I_6) \cdot dd(7^{CH}A_5-A)$  gezeigt wurde. Der Schmelzprozess dieser Triplexes erfolgt stufenweise (Arbeiten z.T. von K. Zimmermann [81] durchgeführt).
- Eine AC-Basenpaarung in Homo-DNA ist reverse Hoogsteen-artig verknüpft. Dies folgt aus dem Schmelzexperiment mit Homo-deoxy-7-carbaadenosin/Homo-deoxycytidin. Unter der Voraussetzung, dass die Oligonucleotidstränge parallel orientiert sind und die Basen anti zum Zuckergesamt stehen, muss eine AC-Paarung ebenfalls aus antiparallelen orientierten Oligonucleotidsträngen aufgebaut sein.



Die Synthese des Allopyranosyl-isoguanin wurde in Anlehnung an die Synthese von Homo-deoxy-isoguanosin von *Fraser* [47] durchgeführt. Die Schutzgruppenstrategie für Allose wurde von *Fischer* [50] und *Helg* [51] entworfen.

In der Reihe der Allopyranosyl-NA konnten anhand von Oligonucleotiden, die die Basen Guanin und Isoguanin enthalten die folgenden neuen Basenpaarungsmuster aufgefunden werden:

- $\text{Allo(I}_8)$  zeigte einen deutlich höheren Schmelzpunkt als alle bisher bekannten Allopyranosyl-NA Oligonucleotide.
- $\text{Allo(G}_8)/\text{allo(I}_8)$  bilden in wässriger Lösung zwei koexistierende Triplexe, einen  $\{\text{allo(G}_8)\}_2 \cdot \text{allo(I}_8)$  mit einer Schmelztemperatur von etwa  $81^\circ\text{C}$  und einem  $\{\text{allo(I}_8)\}_2 \cdot \text{allo(G}_8)$  Triplex mit einer Schmelztemperatur um  $37^\circ\text{C}$ . Bei den Schmelzprozessen scheint es sich um Triplex-zu-Einzelstrang Uebergänge zu handeln. Im Fall des  $\text{G}_2\text{I}$  Triplex weist die Hybridisierungskurve gegenüber der Schmelzkurve eine grosse Hysterese von  $40^\circ\text{C}$  auf. Dies impliziert möglicherweise die vorgängige Bildung eines (thermodynamisch instabileren) GI-gepaarten Duplexes (Abb. C5.36), der als Rezeptor für  $\text{allo(G}_8)$  oder  $\text{allo(I}_8)$  dient.
- $\text{Allo(G}_4\text{I}_4)$  scheint ebenfalls ein höheres Assoziat zu bilden.
- $\text{Allo(GI)}_4$  scheint im Gegensatz zu  $\text{allo(G}_8)/\text{allo(I}_8)$  ausschliesslich Duplexstrukturen zu bilden, die weniger stabil sind als die entsprechenden Duplexe in der Homo-DNA Reihe oder die Triplexe des  $\text{G}_2\text{I}$  und  $\text{I}_2\text{G}$  Typs in Allopyranosyl-NA Oligonucleotiden.
- Es bestehen deutliche Hinweise darauf, dass GI-gepaarte Allopyranosyl-NA Oligonucleotidsequenzen, die nur Duplexstrukturen bilden, eine antiparallele Strangorientierung bevorzugen.

## B Summary

---

The goal of this work is composed of the synthesis, characterisation and especially the classification of AU-, AT- and the, for homo-DNA exclusive, AC-pairing and their comparison with analogous sequences of natural DNA.

Furthermore, oligonucleotides of the homo-DNA series of adenine- and thymine- containing sequences with an  $\alpha$ -configuration at the anomeric center were prepared and their properties examined.

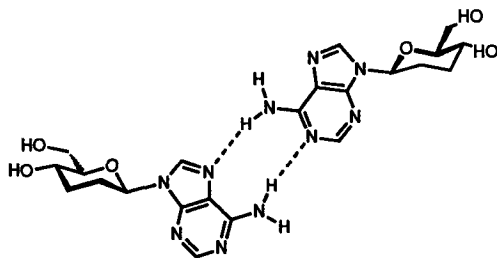
A new nucleoside, homo-deoxy-7-carbaadenosine, was introduced to elucidate the structure of the AA-, AT- and AC-pairing and to achieve, in collaboration with K. Zimmermann [81], for the first time a purine-purine-purine homo-DNA triplex. The synthesis of this nucleoside was performed analogously to the synthesis of the corresponding 7-carbaadenine compound in the DNA series described by Seela and co-workers [39].

The synthesis of all the oligonucleotides followed the phosphoramidite method developed by Caruthers [31] and Letsinger [32].

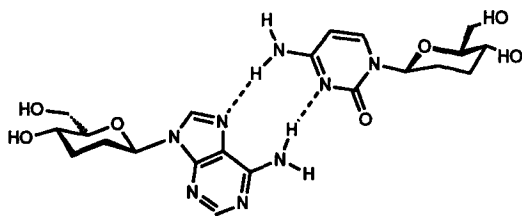
The palette of known pairing characteristics and properties of homo-DNA oligonucleotides, created by the results of the research done by Böhrringer [18], Roth [21] and Hunziker [22], could thus be enlarged through the results of this work as follows:

- An AU-pairing is clearly weaker than an AT-pairing in the homo-DNA series. The greater stability of the AT-pairing is due to the more negative enthalpy term of the pairing process.
- The AU- as well as the AT-pairing in homo-DNA is stronger than the corresponding pairing in DNA. This effect is due to entropic factors.
- In homo-DNA there exists an AC-pairing. This pairing is clearly weaker than the corresponding AT- and AU-pairing. This weaker pairing can be traced back to the less negative term of enthalpy of the pairing process.
- The AC-pairing can not be influenced by protonation of the homo-deoxycytidine.
- Blockwise homo-AC sequences ( $dd(A_5C_5)$  und  $dd(A_4C_4)$ ) do not pair as AC- but as AA-base pairs.
- One could show, that AA-paired oligonucleotide strands in homo-DNA are oriented in an antiparallel manner.

- $\alpha$ -Homo-deoxy-adenosine and  $\alpha$ -homo-thymidine oligonucleotides neither pair with themselves, nor do they pair in an  $\alpha A$ - $\alpha T$ - or an  $\alpha A$ - $\beta T$ - fashion. These experiments were carried out by R.P. Hammer [82].
- Oligonucleotide strands of homo-DNA which pair in a Watson-Crick manner are antiparallel oriented. These experiments were carried out in collaboration with C.Leumann [20].
- Homo-DNA does not pair with its corresponding parallel or antiparallel complementary DNA oligonucleotide strand. These experiments were carried out in collaboration with C.Leumann [20].
- Oligonucleotides which contain homo-deoxy-7-carbaadenosine do not pair with themselves. This means that adenine can not pair with adenine in a Watson-Crick fashion. Together with the results of Böhlinger's experiments [18] there is only one possibility left for an AA-pairing in homo-DNA: a reverse Hoogsteen base pairing:



- Homo-DNA forms a purin-purin-purin triplex as could be shown in the case of  $dd(G_6) \cdot dd(I_6) \cdot dd(7^{CH}A_5-A)$ . The melting process of this triplex takes place stepwise.
- An AC-pairing in homo-DNA is connected in a reverse Hoogsteen fashion. This is the conclusion of the melting experiment of a homo-deoxy-7-carbaadenosine/homo-deoxycytidine oligonucleotide. Given the condition that the bases are standing anti to the sugar backbone, an AC-pairing must be built up by antiparallel oriented oligonucleotide strands.



The synthesis of allopurinyl-isoguaninnucleoside was performed analogous to the synthesis of homo-deoxyisoguaninnucleoside by *Fraser* [47]. The strategy of the protecting groups was designed by *Fischer* [50] and *Helg* [51]. In the series of allopurinyl-NA oligonucleotides, the following new information on base pairing was discovered:

- **Allo(I<sub>8</sub>)** has a much higher melting temperature than all other examined allopurinyl-NA oligonucleotides.
- **Allo(G<sub>8</sub>)/allo(I<sub>8</sub>)** seems to form two coexisting triplexes, **{allo(G<sub>8</sub>)<sub>2</sub> · allo(I<sub>8</sub>)}** with a melting temperature of about 81°C and an **{allo(I<sub>8</sub>)<sub>2</sub> · allo(G<sub>8</sub>)}** triplex with a melting temperature of about 37°C. Both melting processes seem to be triplex-to-single strand transitions. For the **G<sub>2</sub>I** triplex, the hybridisation curve has a large hysteresis of 40°C. This could possibly mean the prior formation of a (thermodynamically more unstable) GI-paired Duplex (figure C5.36) which can perform as a receptor for **allo(G<sub>8</sub>)** or **allo(I<sub>8</sub>)** as well as, in particular, build up the thermodynamically more stable **G<sub>2</sub>I** triplex.
- **Allo(G<sub>4</sub>I<sub>4</sub>)** seems to form higher associates as well.
- **Allo(GI)<sub>4</sub>** seems to form, in contrary to the **allo(G<sub>8</sub>)/allo(I<sub>8</sub>)** system, exclusively duplex structures which are less stable than the corresponding duplexes in homo-DNA or the triplexes **G<sub>2</sub>I** and **I<sub>2</sub>G** in allopurinyl-NA oligonucleotides.
- There is strong evidence that GI-paired allopurinose-NA oligonucleotide sequences which form duplex structures, prefer an antiparallel strand orientation.