



Doctoral Thesis

Allopyranosyl-Nukleinsäure Synthese, Paarungseigenschaften und Struktur von Adenin-/ Uracil-haltigen Oligonukleotiden

Author(s):

Fischer, Reto Walter

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000701504> →

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. 9971

**ALLOPYRANOSYL-NUKLEINSÄURE:
SYNTHESE, PAARUNGSEIGENSCHAFTEN
UND STRUKTUR VON ADENIN-/URACIL-
HALTIGEN OLIGONUKLEOTIDEN**

Abhandlung zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE, ZÜRICH

vorgelegt von RETO WALTER FISCHER
dipl. Chem. ETH
geboren am 3. Januar 1963
von Merenschwand AG

angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent
Prof. Dr. D. Arigoni, Korreferent

Zürich, im Dezember 1992

Zusammenfassung

Die Nucleoside des Adenins und des Uracils mit Allopyranose als Zuckerbaustein wurden in Anwendung der Methode von Vorbrüggen [18] aus 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β ,D-allopyranose **1** und 6-N-Benzoyladenin **2** resp. Uracil **3** synthetisiert, deren Konstitution und Konfiguration konnte mittels Röntgenstrukturanalysen nachgewiesen werden.

Aus den Nucleosidierungsprodukten **101/201** stellte man nach Hydrolyse der Zuckerschutzgruppen die Vorstufen **106/206** der Bausteine für die Oligonucleotidsynthese **110/210** ('Aktivester' \rightarrow Starteinheit) und **107/207** ('Phosphoramidit' \rightarrow Verlängerungseinheit) in vier Stufen durch Einführung der cyclischen TIPDS-Schutzgruppe in die 4',6'-Position, säurekatalysierte Ketalisierung der 2'- und 3'-Hydroxygruppe mit 2-Methoxypropen, Abspaltung der Silylschutzgruppe und Tritylierung der primären Alkoholfunktion her.

Zur Frage nach der Abspaltung der 2',3'-O-Isopropylidenschutzgruppe vom Oligonucleotid sowie nach allfälligen Phosphatwanderungen unter den sauren Abspaltungsbedingungen führte man Kontrollexperimente an Mono-, Di- und schliesslich an einem Hexanucleotid durch, welche die Eignung des gewählten Schutzgruppenkonzeptes bestätigten.

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte ausnahmslos am Syntheseroboter nach der Phosphoramiditmethode [43,44]. Deren Freisetzung umfasste 4 Teilschritte, die Ammonolyse der Benzoyl- und Cyanoethylschutzgruppen, eine erste HPLC-Reinigung, die saure Hydrolyse der Ketal-schutzgruppen und schliesslich eine zweite (in gewissen Fällen eine dritte) HPLC-chromatographische Reinigung. Mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese konnte die Reinheit der so verarbeiteten Oligonucleotide nachgewiesen werden, der Beweis für die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen gelang mit Hilfe der Laser-Desorptions-Massenspektrometrie.

Die UV- und CD-spektroskopische Untersuchung von Adenin- und Uracil-enthaltenden Oligonukleotiden förderte die folgenden Paarungseigenschaften der Allose-NA zu Tage:

- Homologe Adenin-Sequenzen gehen eine Selbstpaarung ein, von der man auf der Basis der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte vermuten kann, dass sie bimolekular ist.
- Eine Paarung zwischen Adenin und Uracil kann nicht beobachtet werden.
- Die Dickerson-Sequenz weist in der Allose-NA eine schwache Selbstpaarung auf, die durch pH-Senkung an Stabilität gewinnt. Vergleichende Untersuchungen an derselben Sequenz aus der DNA- und der Homo-DNA-Reihe haben in beiden Fällen einen inversen, also destabilisierenden Einfluss einer pH-Senkung ergeben. Im Verbund mit den Erkenntnissen von A. Helg aus Guanin-/Cytosin-enthaltenden Oligonukleotiden [2] muss für dieses Basenpaar in der Dickerson-Sequenz eine Hoogsteen-Paarung postuliert werden, an welche die 4 AU-Basenpaare keinen wesentlichen Beitrag leisten.
- Eine AC-Paarung wird nicht beobachtet.
- Die Paarung zwischen Adenin und Guanin zeigt ein unklares Bild, das so interpretiert werden muss, dass im Gegensatz zur Homo-DNA-Reihe [7] eine, wenn auch schwache, Kreuzpaarung der beiden Purinbasen mit deren Selbstpaarung in Konkurrenz zu stehen scheint.
- Mit Ausnahme der AG-Sequenzen weisen alle in der Allose-NA beobachteten Paarungen ca. 30-40° tiefere Schmelztemperaturen auf als in der Homo-DNA-Reihe.
- Die Paarungsexperimente mit Allose-Nukleinsäuren deuten auf eine Präferenz für den Hoogsteen-Paarungstyp hin.
- Die Allose-NA stellt sowohl gegenüber der RNA wie auch der Homo-DNA ein autonomes Paarungssystem dar.

Die Untersuchung der Paarungseigenschaften von Allose-Nukleinsäuren führte auf Grund der geringen Stabilität der beobachteten Paarungen und deren mangelnder Selektivität zur Verneinung der Frage nach einer Rolle der Allose-NA als möglicher, präbiotischer Konkurrent zur RNA.

Die auf Modellbetrachtungen basierende und durch die beobachteten Paarungseigenschaften gestützte Vermutung, dass der equatorialen 2'-Hydroxygruppe die Hauptverantwortung für die geringe Stabilität der Alloose-NA-Duplexe zufällt (deren experimentelle Verifizierung R. Hammer mit der Untersuchung von 2'-Deoxy- und 3'-Deoxyallopypyranosyl-adenin-Oligonukleotiden gelang [46]), mündete in die Erkenntnis, dass im Ensemble der 4',6'-diequatorial verknüpften Hexopyranose-Nukleinsäuren einzig und alleine der Altrose-NA eine Chance zugesprochen werden kann, in der Rolle des präbiotischen Konkurrenten zur RNA zu bestehen.

Das Dinukleotid $\text{allo}(A_2)$ wurde NMR-spektroskopisch analysiert. Das daraus abgeleitete 'Realbild' von dessen Struktur weist die folgenden Hauptmerkmale auf:

- Die NMR-Daten widerspiegeln eine Ähnlichkeit mit jener idealisierten Rückgratkonformation, die als einzige repetitive aus der qualitativen Konformationsanalyse eines Hexose-NA-Einzelstranges hervorgegangen war [1].
- Die davon festgestellten Abweichungen in den Winkeln β , ϵ und ζ manifestieren sich in einem Abbau der Repulsionen im Rückgratbereich als Folge der Vergrößerung der Abstände zwischen H-C(3')-1 und O(6')-2 einerseits und O(3')-1 und H_{5'}-C(6')-2 andererseits.
- Die mit Hilfe eines einfachen 'Molecular Modellings' durchgeführte Extrapolation der aus den NMR-Daten abgeleiteten Konformation des $\text{allo}(A_2)$ auf ein längeres Allopypyranosylnukleinsäure-Oligomer führt zur Struktur einer linksdrehenden Helix mit einer 'pitch' von ca. 20 Baseneinheiten.

Summary

The synthesis of adenine/uracil-nucleosides based on allopyranose as the sugar moiety has been accomplished following the method of Vorbrüggen [18]. The constitution and configuration of both nucleosides was proven by x-ray analysis. The nucleosidation products 101/201 were converted into 106/206, precursors for the oligonucleotide building blocks 110/210 (starting units) and 107/207 (elongation units) in 5 steps. The hydrolysis of the acetylgroups was followed by 4',6'-silylation using the TIPDS-reagent. After introduction of the 2',3'-O-Isopropylidene protecting group, the silylgroup was cleaved and the primary alcohol function tritylated.

Test experiments on mono-, di- and finally a hexanucleotide showed the feasibility of the protecting group strategy, in particular the clean cleavage of the isopropylidene groups from the oligonucleotide.

The synthesis of adenine- and uracil-containing oligonucleotides was carried out on a automated DNA-synthesizer making use of the phosphoramidite approach [43,44]. The isolation of the free oligonucleotides involved 4 steps, the alkaline deprotection of bases and phosphodiester, a preliminary purification, the acidic hydrolysis of the ketal-groups and finally a second (in certain cases a third) purification by HPLC. The efficiency of the purification was proven by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The demonstration of complete protecting group removal was achieved by laser-desorption-mass-spectrometry.

The pairing properties of adenine-/uracil-containing allose-oligonucleotides were investigated by means of UV- and CD-spectroscopy revealing the following results:

- Homologous adenine sequences undergo self-pairing. The dependance of the melting temperatures upon the oligonucleotide concentration indicates a bimolecular process.
- No base pairing between adenine and uracil has been observed.
- The relatively weak self-pairing of the Dickerson-sequence is stabilised by low pH-values. In contrast, the same sequence in DNA- as well as in homo-DNA shows the opposite pH-dependance. Considering the results from the investigations of guanine-/cytosine-containing oligonucleotides by A. Helg [2], a Hoogsteen base pairing for the Dickerson-sequence in allose nucleic acids must be proposed. The 4 AU-base pairs within this sequence hardly contribute to the stability of the duplex.
- No base pairing between adenine and cytosine has been observed.
- In contrast to homo-DNA, a weak base pairing between adenine and guanine is observed, it seems to compete with the self-pairing of this two purine-bases.
- With the exception of AG-oligonucleotides the melting temperatures of all investigated allose-NA duplexes are about 30 to 40° lower than in the corresponding homo-DNA sequences.
- The pairing properties of allose nucleic acids indicate a general preference for the Hoogsteen-type of base pairing.
- Allose nucleic acids undergo no pairing interactions with either RNA or homo-DNA.

Due to low stability of oligonucleotide-duplexes and in particular as a result of insufficient pairing selectivity, allose nucleic acids may be excluded from a role as a potentially prebiotic system for information storage competing with RNA.

The identification of the 2'-hydroxylgroup as the origin of the destabilisation of allose nucleic acid duplexes (which was experimentally verified by R. Hammer with the synthesis of 2'- and 3'-deoxyallopyranose-adenine-oligonucleotides [46]) lead to the expectation that, within the family of hexopyranose nucleic acids featuring a 4',6'-diequatorial phosphodiester-linkage, only the altrose nucleic acids could be regarded as to fulfil the requirements for a role as a potentially prebiotic competitor of RNA.

The NMR-investigation of the dinucleotide allo(A₂) elicited the following structural features:

- The NMR-data reflect a similarity with the idealised backbone conformation which resulted from the qualitative conformation analysis of a hexose nucleic acid backbone as the only repetitive one [1].
- The distortions from the idealised model in angles β , ϵ and ζ yield larger distances between H-C(3')-1 and O(6')-2 as well as between O(3')-1 and H₅-C(6')-2 and therefore reduce the steric repulsions in the backbone.
- Modelling of larger oligonucleotide based on the dinucleotide conformation, provided evidence for a lefthanded helical structure of allopyranosyl nucleic acids with a pitch of about 20 baseunits.