



Doctoral Thesis

Synthese und Eigenschaften von Oligo-2'-deoxy-1',2'-seco-D-ribonukleotiden

Author(s):

Peng, Ling

Publication Date:

1993

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000701922> →

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. 10035

**1. SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN VON
OLIGO-2'-DEOXY-1',2'-SECO-D-RIBONUKLEOTIDEN**
**2. PURIN-PURIN-GEPAARTE OLIGONUKLEOTIDE
DER HOMO-DNA-REIHE**

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

vorgelegt von LING PENG
dipl. Chem, Universität Nanjing
geboren am 6. September 1966
von Hengyang, V.R. CHINA

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

Zürich 1993

ZUSAMMENFASSUNG

Homo-DNA mit 2,3-Dideoxy-glukopyranose als Zuckerbaustein stellt ein Modellsystem für Hexopyranose-Nukleinsäuren dar [18]. Die Untersuchungen [30 - 38] über Homo-DNA zeigten gegenüber natürlicher DNA neuartige Eigenschaften, z.B. lineares DNA-Rückgrat, stabilere Purin-Pyrimidin-Paarungen sowie auch Purin-Purin-Paarungen. Die vorliegende Arbeit befasst sich im ersten Teil mit der Synthese und Ermittlung der Eigenschaften von Oligo-2'-deoxy-1',2'-seco-D-ribonukleotiden und im zweiten Teil mit Fragen, welche die Purin-Purin-Paarungen in Homo-DNA-Oligonukleotiden betreffen.

Zur Synthese von 1',2'-seco-DNA-Oligonukleotiden wurde aus D(-)-Weinsäure 2,4-Di-*O*-benzyl-1-deoxy-D-erythritol hergestellt, welches zum 2'-Deoxy-1',2'-seco-thymidin resp. -adenosin überführt wurde. In Anlehnung an die Phosphoramidit-Methode [62] wurde das Dinukleotid-Monophosphat **1',2'-seco-d(T₂)** in Lösung und die Oligonukleotide **1',2'-seco-d((AT)₆)** resp. **1',2'-seco-d(A₁₀)** und **1',2'-seco-d(T₁₀)** an einer festen Phase automatisch bzw. manuell synthetisiert und mittels HPL-Chromatographie gereinigt.

Die Untersuchungen über die Eigenschaften von 1',2'-seco-DNA-Oligonukleotiden mit den Basen Adenin und Thymin mittels UV- und CD-Spektroskopie sowie Gel-Elektrophorese haben gezeigt, dass es in der 1',2'-seco-DNA-Reihe keine zur natürlichen DNA-Reihe analoge (beobachtbare) Adenin-Thymin-Paarung sowie auch keine zur Homo-DNA-Reihe analoge (beobachtbare) Adenin-Adenin-Paarung gibt. Weder zwischen 1',2'-seco-DNA und natürlicher DNA noch zwischen 1',2'-seco-DNA und Homo-DNA findet eine Paarung statt. Diese Beobachtungen stimmen mit dem Resultat einer qualitativen Konformationsanalyse überein und können auf die durch die Ringöffnung des Zuckerteils grösstenteils verlorengegangene Präorganisation zurückgeführt werden.

Die dieser Arbeit vorangegangenen Arbeiten von M. Böhlinger [32], H.-J. Roth [33], J. Hunziker [34] und F. Giger [21] haben gezeigt, dass in der Homo-DNA-Reihe sowohl Adenin als auch Guanin eine Selbstpaarung nach dem *Reverse-Hoogsteen*-Modus eingehen. Um den Paarungstyp der Adenin-Adenin-Paarung wenn möglich durch Röntgenstrukturanalyse zu belegen, wurden die Oligonukleotide **dd(CG_nCG)** ($n = 2,4,6$) synthetisiert. Die Versuche zur Kristallisation haben zu Kristallen von **dd(CGAAAACG)** geführt, welche jedoch zu klein waren, um eine Röntgenstrukturanalyse durchführen zu können. Die UV- und CD-spektroskopischen Untersuchungen

an den Paarungskomplexen von **dd(CGA_nCG)** führten zur Vorstellung, dass der Duplex von **dd(CGAAACG)** nach *Watson-Crick*-Modus CG gepaart ist, und die vier CG-Paarungen durch die mittleren Adenine destabilisiert sind, dass hingegen die Duplexe von **dd(CGAAAACG)** und **dd(CGAAAAAACG)** nach *Reverse-Hoogsteen*-Modus AA intersträngig gepaart und die endständigen CG nur *intrasträngig* gestapelt sind. Die orientierenden NMR-Experimente an **dd(CGAAAACG)** wurden von J. O'Connell [82] am Institut für Molekularbiologie und Biophysik der ETH durchgeführt.

Nach der Phosphoramidit-Methode [62] wurden Isoguanin-/Guanin-haltige Homo-DNA-Oligonukleotide verschiedener Sequenzen hergestellt. Die thermodynamischen Daten von **dd(I₆)**, **dd((GI)₃)** und **dd((IG)₃)** wurden mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Zusammen mit den von W. Fraser [48] und J. Hunziker [34] durchgeführten Arbeiten konnte der *Reverse-Hoogsteen*-Paarungstyp für die Isoguanin-Selbstpaarung postuliert werden. Die Paarungseigenschaften von **dd((GI)₃)** und **dd((IG)₃)** (starke Selbstpaarung) und von **dd(IIGGII)** und **dd(GGIIGG)** (Selbstpaarung und stärkere Mischpaarung) sowie ihre CD-Spektren, welche die für eine *Watson-Crick*-Paarung in der Homo-DNA-Reihe charakteristische Kurvenform aufwiesen, sprechen für eine Isoguanin-Guanin-Paarung nach dem *Watson-Crick*-Modus. Eine Bestätigung dieses Paarungstypes in der Selbstpaarung von **dd(IIGIGG)** durch NMR-Untersuchungen und Röntgenstrukturanalyse scheiterte an der geringen NMR-spektralen Auflösung und der geringen Qualität der Röntgenbeugungsmuster der Kristalle.

SUMMARY

Homo-DNA with 2,3-dideoxy-D-glucopyranose as sugar building block represents a model system for the study of hexopyranose nucleic acids [18]. Studies [30-38] have demonstrated new properties of homo-DNA relative to natural DNA; for example, a backbone with a linear conformation, more stable pyrimidine-purine base pairings and also purine-purine base pairings. The first part of this thesis describes the synthesis and the investigations on the properties of 1',2'-seco-DNA-Oligonukleotide (2-deoxy-1,2-seco-D-ribose as sugar building block). The second part is concerned with questions on purine-purine base pairings in the homo-DNA.

To prepare 1',2'-seco-DNA oligonucleotides, D-(-)-tartaric acid was converted into 2,4-di-*O*-benzyl-1-deoxy-D-erythritol, which was then used to synthesize 2'-Deoxy-1',2'-seco-adenosine and 2'-Deoxy-1',2'-seco-thymidine. Using the phosphoramidite method [62], the dinucleotide mono-phosphate **1',2'-seco-d(T₂)** was synthesized in solution and the oligonucleotides **1',2'-seco-d((AT)₆)**, **1',2'-seco-d(A₁₀)** and **1',2'-seco-d(T₁₀)** were prepared on solid phase with automated and manual techniques. All oligonucleotides were purified by HPLC.

UV-, CD-spectroscopic, as well as gel electrophoresis studies showed that neither the adenine-thymine base pairing as in natural DNA, nor the adenine-adenine base pairing as in homo-DNA exists in 1',2'-seco-DNA. Also, no pairing exists between 1',2'-seco-DNA and natural DNA or between 1',2'-seco-DNA and homo-DNA. These results agree with the those from a qualitative conformational analysis.

Previous work by M. Böhringer [32], H.-J. Roth [33], J. Hunziker [34] und F. Giger [21] showed that adenine pairs with adenine and guanine with guanine in homo-DNA. Both of these pairings are of the *reverse-Hoogsteen* type. In order to confirm these findings by X-ray crystallography, the oligonucleotides **dd(CGAnCG)**, $n = 2,4,6$, were synthesized. Crystallization experiments resulted in only small crystals of **dd(CGAAAACG)**, which were not suitable for X-ray analysis. The UV- and CD-spectroscopic investigations of **dd(CGAnCG)** implied that the four CG pairs in the **dd(CGAAACG)** duplex are *Watson-Crick* paired, and that they are destabilized by the central adenine residues. Conversely, the cytosine and guanine residues in the duplexes **dd(CGAAAACG)** and **dd(CGAAAAAACG)** are only *intra-strand* stacked, and the central adenine residues are *inter-strand, reverse-Hoogsteen* paired. Some NMR

experiments of **dd(CGAAAACG)** were done by J. O'Conelle [82] in the Institut of Biophysics and Molecular Biology at the ETH.

Different homo-DNA oligonucleotides with isoguanine and guanine were prepared using the phosphoramidite method [62]. The thermodynamic data were obtained by UV spectroscopy. These results, along with those of W. Fraser [48] and J. Hunziker [34], lead to a postulate of a *reverse-Hoogsteen* isoguanine self-pairing. The self-complementary sequences **dd((GI)₃)** and **dd((IG)₃)** showed strong self-pairing, and the oligonucleotides **dd(IIGGII)** and **dd(GGIIGG)** displayed self-pairing as well as stronger mixed pairing. Also, their CD spectra closely resemble those of *Watson-Crick* paired homo-DNA oligonucleotides. These findings suggested that isoguanine and guanine form *Watson-Crick* base pairs. NMR or X-ray crystallographic methods have not yet confirmed this type of base pairing in the duplex of **dd(IIGIGG)**, because the resolution of the NMR spectra was too low, and the crystals of the above sequence diffracted only poorly.