

Ueber Purin-Purin-Paarungen bei Hexopyranose-Nukleinsäuren

Doctoral Thesis

Author(s):

Groebke, Katrin

Publication date:

1993

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000905510>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH Nr. 10'149

ÜBER PURIN-PURIN-PAARUNGEN BEI HEXOPYRANOSE-NUKLEINSÄUREN

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

vorgelegt von
KATRIN GROEBKE
Dipl. Natw. ETH
geboren am 21. Februar 1966
von Oberwil BL

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

Zürich 1993

ZUSAMMENFASSUNG

Im Zusammenhang mit der Frage, warum die in lebenden Organismen vorkommenden Nucleinsäuren Pentofuranosen und nicht Hexopyranosen als Zuckerbausteine enthalten [12], wurden in unserem Laboratorium 2',3'-Dideoxyglucopyranose-Nucleinsäuren (Homo-DNS) als Modellsystem untersucht [83]. Vorgehende Arbeit hatten unter anderem die Abklärung der Paarungseigenschaften von 2',3'-Dideoxyglucopyranose-Oligonucleotiden mit den vier natürlichen Nucleinsäurebasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin zum Ziel [8], [9], [10], [11], [14]. Es stellte sich heraus, dass den Oligonucleotiden der Homo-DNS-Reihe als besonderes Charakteristikum die Fähigkeit zukommt, Purin-Purin-Paarungen einzugehen. Dabei bilden sowohl Adenin als auch Guanin jeweils mit sich selber ein stabiles Basenpaar; untereinander paaren diese beiden Purinbasen hingegen nicht [8], [10].

In Zusammenarbeit mit *Fraser* [22] und *Diederichsen* [15] wurden die Paarungseigenschaften von Homo-DNS-Oligonucleotiden untersucht, welche neben den beiden in natürlichen Nucleinsäuren vorkommenden Purinbasen Adenin und Guanin vier weitere Purinbasen, nämlich Xanthin, 2,6-Diaminopurin, Isoguanin und Hypoxanthin enthielten. Die entsprechenden Oligonucleotidsequenzen wurden durch Festphasensynthese gemäss dem Phosphoramiditverfahren hergestellt. Dazu wurden zunächst geeignete Nucleotidbausteine (2,6-Diaminopurin, Xanthin: eigene Arbeit; Isoguanin: *Fraser* [22]; Hypoxanthin: *Diederichsen* [15]) bereitgestellt. Als O-Schutzgruppe für den Xanthin- und den Isoguaninbaustein bewährte sich die Allylethergruppierung, welche in Anlehnung an eine von *Noyori* entwickelte Methode milde abgespalten werden kann [65].

Es wurden selbstkomplementäre Hexanucleotide hergestellt, die alle paarweisen Basenkombinationen enthielten, welche unter Einbezug der Purinbasen 2,6-Diaminopurin, Xanthin, Isoguanin, Guanin, Adenin und Hypoxanthin möglich sind. Die Oligonucleotide wurden UV- und CD-spektroskopisch untersucht. Zum Paarungsverhalten von Purin-Oligonucleotiden der Homo-DNS-Reihe wurden folgende Beobachtungen gemacht:

- Den Erwartungen entsprechend sind die Basenpaare 2,6-Diaminopurin/Xanthin und Isoguanin/Guanin ausserordentlich stabil. Entsprechende Hexanucleotide schmelzen (dissoziieren) bei einer Temperatur von ca. 60°C (20 µM). Die Stabilität dieser Duplexe lässt keinen Zweifel daran, dass sowohl das 2,6-Diaminopurin/Xanthin-Paar als auch das Isoguanin/Guanin-Paar gemäss Watson-Crick gepaart sind und dass beide Basenpaare drei Wasserstoffbrücken ausbilden.
- Die Derivate des Adenins - Adenin selber, 2,6-Diaminopurin und Isoguanin - bilden eine Gruppe von Purinbasen, welche sowohl mit sich selber als auch untereinander stabile Basenpaare ausbilden. Diese sind mit grosser Wahrscheinlichkeit isomorph mit dem Adenin/Adenin-Paar, dessen Reverse-Hoogsteen'scher Konstitutionstyp in früheren Arbeiten experimentell belegt wurde [8], [14], [15]. Entsprechende Hexanucleotide weisen einen Schmelzpunkt von ca. 40°C (20µM) auf.

- Unter den Paarungen zwischen den Derivaten des Guanins - Guanin selber, Xanthin und Hypoxanthin - ist nur die von *Hunziker* untersuchte Guanin-Selbstpaarung von nennenswerter Stabilität (dd(G₆): T_m = 38°C (15 µM); [10]).

Xanthin geht mit Guanin eine Basenpaarung ein, welche deutlich weniger stabil ist als die Guanin-Selbstpaarung. Entsprechende selbstkomplementäre Hexanukleotide schmelzen bei einer Temperatur von ca. 20°C (20 µM). Ihre - dem CD-Spektrum von dd(G₆) sehr ähnlichen - CD-Spektren lassen vermuten, dass das Xanthin-Guanin-Paar und das Guanin-Guanin-Paar isomorph sind. Ihre im Vergleich zu dd(G₆) niedrigen Schmelzpunkte dürften auf elektrostatische Abstossung zwischen den bei neutralem pH-Wert negativ geladenen Xanthinbasen und den Phosphodiesterbindungen zurückzuführen sein.

Das von *Diederichsen* [15] untersuchte Guanin-Hypoxanthin-Paar ist schwach. Die Schmelzpunkte entsprechender Hexanukleotide liegen unter 15°C (10 µM). Xanthin und Hypoxanthin [15] bilden sowohl mit sich selber als auch untereinander keine stabilen Basenpaare.

- Alle verbleibenden Mischpaarungen - es sind dies die Basenpaare Xanthin/Adenin, 2,6-Diaminopurin/Guanin, 2,6-Diaminopurin/Hypoxanthin, Isoguanin/Hypoxanthin, Adenin/Hypoxanthin (vgl. [15]) und Xanthin/Isoguanin - sind schwach. Der Schmelzpunkt entsprechender Hexanukleotide liegt meist unter 15°C (10 - 20 µM). Anhand von UV- und CD-Experimenten lässt sich nicht entscheiden, welchem Konstitutionstyp sie angehören. Einzig das Hexanukleotid dd(XXIXII) (T_m = 16°C, 19 µM) zeichnet sich dadurch aus, dass sein CD-Spektrum dem Spektrum von dd(G₆) sehr ähnlich sieht, was nahelegt, dass das Xanthin-Isoguanin-Paar und das Guanin-Guanin-Paar isomorph sind. *Diederichsen* zeigte - unter anderem mit Hilfe von NMR-Experimenten -, dass das Adenin/Hypoxanthin-Paar gemäss Watson-Crick gepaart ist [15].

Zusammen mit *Fraser* [22] und *Zimmermann* [89] wurde die Fähigkeit von Purin-oligonukleotiden der Homo-DNS-Reihe zur Ausbildung von Triplexstrukturen untersucht. Der derzeitige Stand dieser Untersuchungen wird diskutiert.

Die Untersuchung von Oligonukleotiden der Allopyranose-Reihe hatte ergeben, dass diese wesentlich weniger stabile Duplexe ausbilden als entsprechende Oligonukleotide der Homo-DNS-Reihe [17], [18]. Durch das Studium des Paarungsverhaltens von 2'-Deoxyallopyranose- und 3'-Deoxyallopyranose-Nukleinsäuren [19] wurde gezeigt, dass die Destabilisierung von Allopyranose-Duplexen im wesentlichen durch die äquatoriale 2'-Hydroxygruppe zustandekommt, dass hingegen die axiale 3'-Hydroxygruppe die Duplexstabilität unbeeinflusst lässt. Die Untersuchungen an Hexopyranose-Nukleinsäuren wurden deshalb auf die Altopyranose-Reihe (axiale 2'- und 3'-Hydroxygruppe) ausgedehnt

Ein für die Festphasensynthese (Phosphoramiditverfahren) geeigneter 9-N-(β-D-Altopyranosyl)-adenin-Baustein wurde hergestellt. Den Schlüsselschritt dieser Synthese stellte die Inversion der Zentren C(2') und C(3') eines geschützten 9-N-(β-D-Glucopyranosyl)-adenin-

Derivats dar. Diese Inversion beinhaltete das Ueberführen desselben in die entsprechende 2',3'-Anhydroverbindung und die anschliessende substitutive Oeffnung des Epoxidrings. Dabei entstanden sowohl ein altro- als auch ein glucokonfiguriertes Reaktionsprodukt im Verhältnis 45:55. Die beiden Diastereomeren konnten auf einer späteren Stufe chromatographisch getrennt werden.

Die Hydroxygruppen in Stellung 2' und 3' der Nukleotideinheiten wurden während der Festphasensynthese von Altropropanosyladenin-Oligonukleotiden als Benzoesäureestergruppierungen, die Phosphordiesterbindungen wurden als Allylestergruppierungen geschützt. Im Anschluss an die Festphasensynthese wurden zuerst die Phosphorsäurediestergruppen freigesetzt und in der Folge die Benzoylschutzgruppen unter wässrigen alkalischen Bedingungen abgespalten. Dabei trat Strangbruch nur in zu vernachlässigendem Ausmass auf. Dahingegen ist natürliche RNS, deren Phosphodiestergruppen dieselbe relative Anordnung zu den 2'-Zuckerhydroxygruppe einnehmen wie die Phosphodiesterbindungen von Altropropanose-Nukleinsäuren zu den 3'-Hydroxygruppen, unter basischen Bedingungen nicht stabil, sondern zersetzt sich unter Spaltung ihres Phosphatrückgrats.

Schmelzexperimente ergaben, dass in der Altropropanose-Reihe ebenso wie in der Allopropanose- und in der Homo-DNS-Reihe eine Adenin-Selbstpaarung existiert. CD-Spektroskopische Untersuchungen legten nahe, dass Altropropanosyladenin-Duplexe bezüglich ihrer Konstitution mit Adenin/Adenin-gepaarten Duplexen der Homo-DNS-Reihe vergleichbar sind, dass also die Adenin-Selbstpaarung in der Altropropanose-Reihe ebenso wie die Adenin-Selbstpaarung in der Homo-DNS-Reihe gemäss Reverse-Hoogsteen erfolgt.

Entgegen den Erwartungen sind Altropropanosyladenin-Duplexe nicht wesentlich stabiler sind als Allopropanosyladenin-Duplexe. Der Schmelzpunkt des Altropropanosyladenin-Dodecamers liegt nur 10°C über dem Schmelzpunkt der entsprechenden Sequenz der Allopropanose-Reihe (altro(A₁₂): 39°C (9 µM); allo(A₁₂): 29°C (10 µM) [11]). Er liegt deutlich tiefer als die Schmelzpunkte vergleichbarer Duplexe der Homo-DNS-Reihe (dd(A₈): 63°C (7 µM); [8]). Der destabilisierende Einfluss einer axialen 2'-Hydroxygruppe ist demgemäss fast ebenso gross wie derjenige einer äquatorialen 2'-Hydroxygruppe. Modellbetrachtungen legten nahe, dass die sterische Behinderung durch den axialen Substituenten in Stellung 2' die anti-Konformation ($\chi = -120^\circ$) der glykosidischen Bindung nicht erlaubt und damit eine Propellertwist-Anordnung der Basenpaare innerhalb eines Altropropanosyladenin-Duplexes erzwingt. Diese geht zwangsläufig mit einer Destabilisierung der Wasserstoffbrücken und einer Störung der Basenstapelung einher. Einen Hinweis auf die Grössenordnung des kritischen Torsionswinkel χ lieferte die Röntgenstrukturanalyse von 9-N-(β-D-Altropropanosyl)-adenin. Der Winkel χ des ungeschützten monomeren Nukleosid beträgt im Kristall - 150.3°. Damit ist dessen Adeninkern vom axialen Substituenten weg- und aus der anti-Konformation herausgedreht.

Die Ermittlung der thermodynamischen Parameter des Paarungsprozesses von altro(A₁₂) ergab, dass dieser zwar enthalpisch wenig günstig ist, dafür aber mit einem geringen Verlust an Freiheitsgraden einhergeht. Dies dürfte die Tatsache widerspiegeln, dass die freie Drehbarkeit der glykosidischen Bindung auch im Altropropanose-Einzelstrang durch den axialen Substituenten in Stellung 2' stark eingeschränkt ist.

SUMMARY

To address the question why the nucleic acids occurring in living organisms contain pentofuranoses and not hexopyranoses as sugar building blocks, 2',3'-dideoxyglucopyranose nucleic acids (homo-DNA) were investigated. Prior work was aimed at studying 2',3'-dideoxyglucopyranose oligonucleotides containing the four natural nucleobases adenine, guanine, thymine and cytosine [8], [9], [10], [14]. A unique feature of homo-DNA is its ability to form purine-purine base-pairs. Adenine, as well as guanine form stable base-pairs with themselves; however, these two purine bases do not pair with each other [8], [10].

In cooperation with *Fraser* [22] and *Diederichsen* [15] the pairing properties of homo-DNA oligonucleotides containing in addition to the two natural purine bases adenine and guanine the four purine bases xanthine, 2,6-diaminopurine, isoguanine and hypoxanthine were studied within the scope of this work. The respective oligonucleotide sequences were prepared by automated solid phase synthesis according to the phosphoramidite procedure [28], [31]. Appropriate nucleotide building blocks were prepared (2,6-diaminopurine, xanthine: this work; isoguanine: *Fraser* [22]; hypoxanthine: *Diederichsen* [15]). The allylether group introduced by *Noyori* [65] proved to be a suitable O-protecting group for xanthine and isoguanine.

Self-complementary hexanucleotides containing all pairwise base combinations between adenine, guanine, 2,6-diaminopurine, xanthine, isoguanine and hypoxanthine were synthesized. The oligonucleotides were characterized by UV- and CD-spectroscopy. The following observations about the pairing properties of purine-oligonucleotides of the homo-DNA series have been made:

- According to the expectations the base-pairs 2,6-diaminopurine/xanthine and isoguanine/guanine are extraordinarily stable. The corresponding hexanucleotides melt (dissociate) at a temperature of about 60°C (20 μM). The stability of these duplexes leaves no doubt that 2,6-diaminopurine with xanthine as well as isoguanine with guanine are paired according to the Watson-Crick mode with both base pairs forming three hydrogen bonds.
- The three adenine derivatives (adenine itself, 2,6-diaminopurine and isoguanine) represent a group of purine bases which form stable base-pairs with themselves and with each other. These base-pairs are isomorphous with the adenine/adenine pairing whose reverse-Hoogsteen constitution has been established experimentally [8], [14], [15]. The corresponding hexanucleotides have a melting point of approximately 40°C (20 μM).
- Among the base-pairings between the guanine derivatives (guanine itself, xanthine and hypoxanthine) only the guanine self-pairing is of considerable stability. The melting temperature of the hexanucleotide dd(G₆) investigated by *Hunziker* [10] is 38°C (15 μM). Xanthine forms a base-pair with guanine which is much less stable than the guanine self-pairing. The corresponding self-complementary hexanucleotides melt at a temperature of about

20°C (20 μ M). Their CD-spectra look very similar to the one of dd(G₆) and therefore suggest that the xanthine-guanine pair is isomorphous to the experimentally confirmed reverse-Hoogsteen guanine self-pairing [10], [16]. Nevertheless the melting points of xanthine-guanine paired hexanucleotides are low compared to the melting point of dd(G₆) which can be explained by electrostatic repulsion between the xanthine bases negatively charged at neutral pH and the phosphodiester groups.

The guanine-hypoxanthine pair investigated by *Diederichsen* [15] exhibits minor stability. The melting points of the respective hexanucleotides lie below 15°C (10 - 20 μ M). Xanthine and hypoxanthine do not form stable base pairs with themselves or with each other.

- All remaining mixed pairings including the base pairs xanthine/adenine, 2,6-diaminopurine/guanine, 2,6-diaminopurine/hypoxanthine, isoguanine/hypoxanthine, adenine/hypoxanthine und xanthine/isoguanine are very weak. By means of UV- and CD-experiments it cannot be decided to which pairing mode they belong to. Only the hexanucleotide dd(XXIXII) is distinguished by observing a CD-spectrum similar to that of dd(G₆) suggesting that the xanthine/isoguanine pairing is isomorphous to the guanine self-pairing.

NMR-studies of *Diederichsen* [15] corroborated that the adenine/hypoxanthine pairs according to the Watson-Crick mode.

Together with *Fraser* [22] and *Zimmermann* [89] the ability of purine oligonucleotides to form triple helical structures was investigated. The present state of these studies is discussed.

The investigation of allopyranose nucleic acids revealed that they form much less stable duplexes than the corresponding oligonucleotides of the homo-DNA series [17], [18]. The examination of 2'-deoxyallopyranose and 3'-deoxyallopyranose nucleic acids [19] showed that the destabilization of allopyranose duplexes is mainly due to the equatorial hydroxy group in position 2', and that the duplex stability is not influenced by the axial 3'-hydroxy group. Therefore investigation of hexopyranose nucleic acids was extended to the altropyranose series (axial 2'- and 3'-hydroxyl).

A 9-N-(β -D-altropyranosyl)-adenine building block appropriate for the solid phase synthesis (phosphoramidite procedure) was prepared. The inversion of the centers C(2') and C(3') of a protected 9-N-(β -D-glucopyranosyl)-adenine derivative are the key steps of this synthesis. The conversion of this derivative into the corresponding 2',3'-anhydro compound and the subsequent substitutive opening of the epoxide ring afforded a mixture two products which was determined to consist of a nucleoside with altroconfiguration and of one with glucoconfiguration in a ratio of 45:55. The two diastereoisomers could be separated by chromatography after the next step.

During the solid phase synthesis the hydroxyls in position 2' and 3' were protected as benzoic acid ester groups and the phosphoric acid diester bonds were protected as allyl ester groups. After the solid phase synthesis the phosphoric acid diester groups were liberated first.

Then the benzoic acid esters groups were cleaved under aqueous alkaline conditions. Concomitant strand breakage occurred only to a negligible extent. Under the same conditions natural RNA whose phosphodiester bonds also assume cis-position with respect to a hydroxyl is not stable, but decomposes by cleavage of its phosphate backbone.

Melting experiments showed that as in the allopyranose and the homo-DNA series an adenine-selfpairing exists in the altropyranose series. CD-Spectroscopic investigations suggested that with respect to their constitution altropyranosyladenine oligonucleotides are comparable to adenine/adenine-paired duplexes of the homo-DNA series [8]. Based on these results the pairing mode for the adenine self-pairing in the altropyranose series should be reverse-Hoogsteen.

Unexpectedly the altropyranosyladenine duplexes are not much more stable than allopyranosyladenine duplexes. The melting point of the altropyranosyladenine dodecamer lies 10°C above the melting point of the corresponding sequence of the allopyranose series (altro(A₁₂): 39°C (9 μM); allo(A₁₂): 29°C(10 μM) [11]). However it lies clearly below the melting points of comparable sequences of the homo-DNA series (dd(A₈): 63°C (7 μM); [8]). It seems that the destabilizing influence of an axial 2'-hydroxy group is almost as large as of an equatorial 2'-hydroxy group. From the model it becomes apparent that the steric hindrance between the axial substituent in position 2' does not allow the anti conformation of the glycosidic bond ($\chi = -120^\circ$) and therefore enforces a propeller twist arrangement of the base pairs within an altropyranosyladenine duplex which would inevitably coincide with a destabilization of the hydrogen bond and an impairment of the base stacking. A hint to the magnitude of the critical torsional angle χ was provided by the x-ray analysis of 9-N-(β-D-altropyranosyl)-adenine. In the crystal its angle χ amounts to -150.3° . Its adenine moiety is considerably rotated away from the axial 2'-substituent.

The determination of the thermodynamic parameters of the melting process of altro(A₁₂) revealed that its enthalpy change is not very favourable, but that it is accompanied by a small loss of degrees of freedom. This might reflect the fact that the entropy content of an altropyranose single strand is low in the sense that the rotation about the glycosidic bonds is restricted by the steric interaction between the adenine nucleus and the axial 2'-hydroxyl.