



Doctoral Thesis

Allopyranosyl-Nukleinsäure Synthese, Paarungseigenschaften und Struktur von Guanin-/ Cytosin-enthaltenden Oligonukleotiden

Author(s):

Helg, Andreas Gabriel

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000946982> →

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. 10464

Allopyranosyl-Nukleinsäure:

Synthese, Paarungseigenschaften und Struktur von Guanin-/Cytosin-enthaltenden Oligonukleotiden

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

vorgelegt von ANDREAS GABRIEL HELG
dipl. Chem. ETH
geboren am 8. April 1964
von Zürich ZH

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

1994

A ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl die Allopyranose ein höheres oder ein der Ribofuranose zumindest vergleichbares Selbstkonstituierungspotential aufweist (*Kapitel 1.1.2*) [4] [5] [6] und obwohl aufgrund einer Konformationsanalyse eines 2',3'-Dideoxy-allopyranosyl-(4'→6')-NA-Einzelstrangs (eines Homo-DNA-Einzelstrangs) erwartet wird, dass die Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotide paaren (*Kapitel 1.1.3 und 1.2.2*) [3] — was sie auch tun, wie in dieser Arbeit, der Arbeit von *Fischer* [10] und jener von *Giger* [11] gezeigt wird —, wählte die Natur nicht das Allopyranosyl-(4'→6')-NA-System als Träger der genetischen Information. Diese Tatsache widerspiegelt die funktionelle Überlegenheit der DNA und der RNA gegenüber der Allopyranosyl-(4'→6')-NA. Diese Überlegenheit der DNA und der RNA hat strukturelle Gründe ([1] [2]) [3]. Die vorliegende Arbeit stellt eine experimentelle Rationalisierung (zumindest einiger) dieser Gründe anhand der Paarungseigenschaften diverser, gezielt ausgewählter und synthetisierter Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotide vor.

Die Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotide wurden nach dem Phosphoramidit-Verfahren [23] an einer Festphase auf einem 'DNA synthesizer' hergestellt (die Synthesen der Guanin-/Cytosin-enthaltenden Oligonukleotide sind in dieser Arbeit beschrieben (*Kapitel 2.8.1*), die der Adenin-/Uracil-enthaltenden Oligonukleotide in der Arbeit von *Fischer* [10] und jene der Isoguanin-enthaltenden Oligonukleotide in der von *Giger* [11]). Die Isolation der freien Oligonukleotide umfasste vier Schritte (*Kapitel 2.8.2*): (i) die Ammonolyse der Basen-(Acyl-)Schutzgruppen, die Elimination der Phosphat-(Cyanethyl-)Schutzgruppen und die Abspaltung der Oligonukleotide vom Träger in ~ 25 %-iger wässriger NH₃-Lösung bei 55° C während 16 h; (ii) eine erste HPLC-Reinigung entweder an 'reversed phase'(RP)-Säulen oder an DEAE-Ionenaustauscher(IA)-Säulen (Abtrennung der Oligonukleotide mit der Zielsequenz von den kürzeren Oligonukleotiden mit Fehlsequenzen); (iii) die saure Hydrolyse der 2',3'-O-Isopropyliden-Gruppen in wässriger Lösung von pH = 2.0 und 55° C während 4.1 bis 8.0 h je nach Zielsequenz; (iv) eine zweite (und in gewissen Fällen auch noch eine dritte) HPLC-Reinigung zumeist an 'reversed phase'(RP)-Säulen (Abtrennung der vollständig entschützten Oligonukleotide von den bloss partiell entschütz-

ten Oligonukleotiden). Die Effizienz der Reinigung wurde mittels HPL-Chromatographie an alternativen Systemen und — unabhängig — mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen [10] überprüft. Die Vollständigkeit der Entfernung aller Schutzgruppen und die Integrität der Oligonukleotide wurde mittels 'Laser Desorption/Ionization'-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) nachgewiesen (*Kapitel 2.8.5*).

Die Bausteine für die automatisierte Festphasen-Oligonukleotid-Synthese wurden folgendermassen erhalten (*Kapitel 2.4* und *2.5*): die vollständig geschützten Allopyranosylguanin- und -cytosin-Nukleoside **N⁹-20** und **N¹-10** wurden in einer von *Vorbrüggen* und Mitarbeitern [53c] erarbeiteten, *Lewis*-Säure-katalysierten 'one-step/one-pot' Nukleosidierung, einer Variante der *Hilbert-Johnson*-Reaktion, aus 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-allopyranose (**5**) und N²-Isobutyroylguanin-monohydrat (7·H₂O) resp. N⁴-Benzoylcytosin (**6**) hergestellt. Deren Konstitution und deren Konfiguration wurden durch Röntgenkristallstrukturanalysen belegt; beim Allopyranosylguanin auf der Stufe des vollständig geschützten Nukleosids **N⁹-20** (*Kapitel 4.1.1*), beim Allopyranosylcytosin auf der Stufe des vollständig entschützten Nukleosids **18** (*Kapitel 4.1.2*). Die vollständig geschützten Allopyranosylguanin- und -cytosin-Nukleoside **N⁹-20** und **N¹-10** wurden sodann durch selektive Verseifung der Acetyl-Gruppen, 4',6'-O-Silylierung mit dem *Markiewicz*-Reagenz TIPDSiCl₂ [64] [65] [66], Pyridiniumtosylat-katalysierte Ketalisierung der 2'-OH- und der 3'-OH-Gruppe mit 2-Methoxy-propen, Desilylierung und Dimethoxytritylierung der 6'-OH-Funktion in die geeignet geschützten Nukleoside **25** und **15** überführt. Phosphitylierung von **25** und von **15** ergab die Verlängerungseinheiten **26** und **16**; Derivatisierung mit 'long-chain alkylamine controlled-pore glass' die Starteinheiten, Festphasen-gebundenes **25** und **15**.

Die Stabilität der 2',3'-O-Isopropyliden-Gruppe unter den Detritylierungsbedingungen und die Abspaltbarkeit derselben wurden vor der ersten Oligonukleotid-Synthese an Mononukleosiden [10] und an Dinukleotiden (diese Arbeit und jene von *Fischer* [10]) überprüft (*Kapitel 2.2*). Die durchgeführten Experimente zeigten, dass die 2',3'-O-Isopropyliden-Gruppe unter den Detritylierungsbedingungen mindestens 100-mal stabiler ist als erforderlich, dass sie jedoch in wässriger Lösung von pH = 2.0 und 55° C

relativ leicht abgespalten wird. Die Dinukleotide erlitten unter geringfügig drastischeren Bedingungen als die eben angegebenen und innerhalb einer Zeit, welche die für eine vollständige Abspaltung der 2',3'-O-Isopropyliden-Gruppe notwendige um einen Faktor zwei übertraf, keine detektierbare Schädigung, insbesondere keine Strangbrüche oder Phosphat-Wanderungen und keine Depurinisierung oder Depyrimidinisierung.

Die Paarungseigenschaften der Guanin-/Cytosin-enthaltenden Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotide wurden mittels temperaturabhängiger UV- und mittels temperaturabhängiger CD-Spektroskopie untersucht (*Kapitel 3*). Die gemachten Beobachtungen legen die folgenden Schlüsse nahe: (i) die Oligonukleotide mit homo-G-Sequenzen gehen eine schwache bis mässig starke Selbstpaarung ein ($T_m(\text{All}(\text{G}_6), 10.4 \mu\text{M}) < 5^\circ \text{C}$, $T_m(\text{All}(\text{G}_8), 9.9 \mu\text{M}) = 13^\circ \text{C}$, $T_m(\text{All}(\text{G}_{10}), 2.3 \mu\text{M}) = 22^\circ \text{C}$; Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH = 7). Die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der Oligonukleotid-Konzentration beim $\text{All}(\text{G}_8)$ und die relativ geringen Hysteresen zwischen entsprechenden Schmelz- und Hybridisierkurven indizieren einen bimolekularen Hybridisierungsprozess. Die G-G-Paarung erfolgt mit grösster Wahrscheinlichkeit nach dem 'reversed'-Hoogsteen-Typ. (ii) Die Schmelztemperaturen des $\text{All}[(\text{GC})_5]$ und des $\text{All}(\text{CGCGAAUUCGCG})$ [10] steigen mit fallendem pH an. Diese Tatsache weist auf eine G-CH⁺-Paarung. Dagegen zeigen die Schmelztemperaturen des $\text{All}(\text{G}_5\text{C}_5)$ und des $\text{All}(\text{C}_5\text{G}_5)$ im Bereich $5.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$ keine solche pH-Abhängigkeit. Bei einem pH < 5.5 neigen die letzten zwei Oligonukleotide extrem zur Präzipitation. Eine eingehende Analyse der CD-Spektren dieser vier Oligonukleotide unter Einbeziehung der CD-Spektren des $\text{All}(\text{A}_6\text{U}_6)$ führte zu der Schlussfolgerung, dass die Basenpaare in den Selbstpaarungskomplexen dieser fünf Oligonukleotide zumindest quasi-isomorph sein sollten. Diese Anforderung wird lediglich von einer A-U- und einer G-C-Paarung nach dem Watson-Crick-Typ resp. einer G-CH⁺-Paarung nach dem 'wobble'-Watson-Crick-Typ erfüllt. — Das $\text{All}(\text{G}_8)/\text{All}(\text{C}_8)$ -1:1-Gemisch bekundet im Neutralen Eigenschaften, die sich am ehesten entweder durch ein Gleichgewicht zwischen einem $(\text{All}(\text{G}_8)\cdot\text{All}(\text{C}_8))$ -Mischpaarungskomplex und einem $\text{All}(\text{G}_8)$ -Selbstpaarungskomplex oder durch einen $(\text{All}(\text{G}_8):\text{All}(\text{G}_8)\cdot\text{All}(\text{C}_8))$ -Triplex erklären lassen. Im Säuren zeigt die Schmelzkurve dieses Gemisches zwei Übergänge. Diese Beobachtung spricht für die zweite Möglichkeit und schliesst

die erste — zumindest im Sauren — aus. (iii) Purin–Purin-Paarungen treten im Unterschied zur Homo-DNA-Reihe [57] nicht nur zwischen Adenin und Adenin sowie Guanin und Guanin auf, sondern auch zwischen Adenin und Guanin. (iv) Die Paarungseigenschaften der Isoguanin-enthaltenden Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotide sind hochgradig Sequenzabhängig; das $\text{All}[(\text{GI})_4]$ als Beispiel scheint wohldefinierte Selbstpaarungskomplexe zu bilden, das $\text{All}(\text{G}_4\text{I}_4)$ höhere Assoziate und das $\text{All}(\text{I}_8)$ mit dem $\text{All}(\text{G}_8)$ Triplexe [11]. (v) Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotide paaren weder mit komplementären RNA-Strängen noch mit komplementären Homo-DNA-Oligonukleotiden.

Die Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotid-Duplexe sind generell deutlich weniger stabil als die korrespondierenden Homo-DNA-Oligonukleotid-Duplexe. Diese Tatsache widerspiegelt sich in den Schmelztemperaturen. Die Paarungseigenschaften der von *Hammer* [83] untersuchten 2'-Deoxy- und 3'-Deoxyallopyranosyladenin-(4'→6')-Oligonukleotide sowie die Paarungseigenschaften der von *Groebke* [13] und von *Diederichsen* [12] untersuchten Altopyranosyl- und Glucopyranosyladenin-(4'→6')-Oligonukleotide belegen eindeutig, dass die verhältnismässig geringen Stabilitäten der Allopyranosyl-(4'→6')-NA-Oligonukleotid-Duplexe den 2'-OH-Gruppen zugeschrieben werden können. Modellbetrachtungen offenbarten, dass diese 2'-OH-Gruppen die Basenpaarung und das Basenstapelung behindern.

Wegen der generell ausgeprägten Sequenzabhängigkeit der Paarungseigenschaften der untersuchten Oligonukleotide, den geringen Stabilitäten der Paarungskomplexe dieser Oligonukleotide und der resultierenden ungenügenden Paarungselektivität kann die Allopyranosyl-(4'→6')-NA kaum als ein replikations- und evolutionsfähiges molekulares Informationsspeichersystem erachtet werden (*Kapitel 5.1*).

Die NMR-Analysen der Dinukleotide $\text{All}(\text{A}_2)$ [10] und $\text{All}(\text{GC})$ (*Kapitel 4.2*) enthüllten die Ähnlichkeit der realen Rückgrat-Konformationen dieser Dinukleotide mit der idealisierten Rückgrat-Konformation des Modells eines Hexopyranosyl-(4'→6')-NA-Einzelstrangs [3].

B SUMMARY

Although allopyranose possesses a self-constitution potential higher than or at least comparable to the one of ribofuranose (*chapter 1.1.2*) [4] [5] [6], and although the allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotides based on a qualitative conformational analysis of a single-strand backbone of 2',3'-dideoxy-allopyranosyl-(4'→6')-NA (homo-DNA) oligonucleotides were predicted to undergo pairing (*chapter 1.1.3 and 1.2.2*) [3] — which they actually do, as is shown in this work, in the work of *Fischer* [10], and in that of *Giger* [11] —, nature did not choose the allopyranosyl-(4'→6')-NA system as the carrier of genetic information. This fact reflects the functional superiority of the DNA and the RNA system over the allopyranosyl-(4'→6')-NA system, which must have structural reasons [1] [2] [3]. An experimental rationalization of (at least part of) these reasons based on the pairing behaviour of some carefully selected and synthesized allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotides is presented in this work.

The allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotides were synthesized by the phosphoramidite approach [23] on a solid support with an automated DNA-synthesizer (the syntheses of guanine-/cytosine-containing oligonucleotides are described in this work (*chapter 2.8.1*), those of adenine/uracil-containing oligonucleotides in the work of *Fischer* [10], and those of isoguanine-containing oligonucleotides in that of *Giger* [11]). The isolation of the free oligonucleotides involved four steps (*chapter 2.8.2*): (i) the ammonolysis of the base-protecting groups, the alkaline deprotection of the phosphodiester groups, and the cleavage of the oligonucleotides from the support in ~ 25 % NH₃ in H₂O at 55° C for 16 h; (ii) a first purification either by reversed-phase or by ion-exchange HPLC (separation of the oligonucleotides with the target-sequence from the shorter oligonucleotides with failure sequences); (iii) the acidic hydrolysis of the 2',3'-O-isopropylidene groups in H₂O of pH = 2.0 and 55° C for 4.1 to 8.0 h depending on the target-sequence; (iv) a second (and in some cases also a third) purification mainly by reversed-phase HPLC (separation of the fully deprotected oligonucleotides from the only partially deprotected oligonucleotides). The efficiency of the purification was proven by HPLC on alternative systems, and — independently — by polyacrylamide gel-electrophoresis under denaturing conditions

[10]. The completeness of the removal of all protecting groups, and the integrity of the oligonucleotides was demonstrated by laser desorption/ionisation mass-spectrometry (*chapter 2.8.5*).

The building blocks for the automated solid-phase oligonucleotide synthesis were obtained as follows (*chapter 2.4 and 2.5*). The fully protected allopyranosylguanine and -cytosine nucleosides **N⁹-20** and **N¹-10** were prepared from β -D-allopyranose pentaacetate (**5**) and **N²-isobutyrylguanine monohydrate (7·H₂O)** or **N⁴-benzoylcytosine (6)** in a *Lewis* acid-catalysed one step/one pot nucleosidation procedure of the *Hilbert-Johnson* type described by *Vorbrüggen* and coworkers [53c]. Their constitution and their configuration were confirmed by x-ray analysis; in the case of the allopyranosylguanine at the level of the fully protected nucleoside **N⁹-20** (*chapter 4.1.1*), and in the case of the allopyranosylcytosine at the level of the fully deprotected nucleoside **18** (*chapter 4.1.2*). The fully protected allopyranosylguanine and -cytosine nucleosides **N⁹-20** and **N¹-10** were then converted into the appropriately protected nucleosides **25** and **15** by selective saponification of the acetyl groups, followed by 4',6'-O-silylation with *Markiewicz's* reagent TIPDSiCl₂ [64] [65] [66], pyridinium tosylate catalyzed ketalization of the 2'-OH and the 3'-OH group with 2-methoxypropene, desilylation and dimethoxytritylation of the 6'-OH function. Phosphitylation of **25** and of **15** yielded the elongation units **26** and **16**; derivatization with long-chain alkylamine controlled-pore glass gave the starting units, solid-phase bound **25** and **15**.

The stability of the 2',3'-O-isopropylidene group under the conditions of detritylation, as well as its cleavability were examined on mononucleosides [10], as well as on dinucleotides (in this work, and in that of *Fischer* [10]) prior to the first oligonucleotide synthesis (*chapter 2.2*). The experiments showed that the 2',3'-O-isopropylidene group is at least 100 times more stable than required under the conditions of detritylation, but that it is removed relatively easily in H₂O of pH = 2.0 and 55° C. The dinucleotides did not suffer any strand cleavage, phosphate migration, depurination, nor depyrimidination under conditions slightly more drastic than the latter ones within a period that exceeded the time necessary for the complete removal of the 2',3'-O-isopropylidene group by a factor two.

The pairing properties of the guanine-/cytosine-containing allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotides were studied by temperature-dependent UV- and temperature-dependent CD-spectroscopy (*chapter 3*). The observations made strongly suggest the following conclusions. (i) The oligonucleotides with homo-G-sequences are weakly to moderately self-pairing ($T_m(\text{All}(\text{G}_6), 10.4 \mu\text{M}) < 5^\circ \text{C}$, $T_m(\text{All}(\text{G}_8), 9.9 \mu\text{M}) = 13^\circ \text{C}$, $T_m(\text{All}(\text{G}_{10}), 2.3 \mu\text{M}) = 22^\circ \text{C}$; buffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH = 7). The dependence of the melting temperature upon the oligonucleotide concentration in the case of $\text{All}(\text{G}_8)$, as well as the relatively small hystereses between corresponding dissociation and association curves indicate a bimolecular association process for these oligonucleotides. The G–G-pairing is assumed to be of the reversed-*Hoogsteen* type. (ii) The melting temperatures of $\text{All}[(\text{GC})_5]$ and $\text{All}(\text{CGCGAAUUCGCG})$ [10] linearly increase with decreasing pH suggesting a G–CH⁺-pairing, while the melting temperatures of $\text{All}(\text{G}_5\text{C}_5)$ and $\text{All}(\text{C}_5\text{G}_5)$ do not show such a pH-dependence in the range $5.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$. At pH < 5.5 these latter oligonucleotides strongly tend to precipitate. An extensive analysis of the CD-spectra of these last four oligonucleotides in addition to the CD-spectra of $\text{All}[(\text{AU})_6]$ led to the conclusion that the base pairs in the duplexes of these five self-pairing oligonucleotides must be at least quasi-isomorphous. This requirement is only met by an A–U- and a G–C-pairing of the *Watson-Crick* type, or by a G–CH⁺-pairing of the wobble-*Watson-Crick* type. — The $\text{All}(\text{G}_8)/\text{All}(\text{C}_8)$ 1:1 mixture in neutral medium demonstrates properties which are explained best either by an equilibrium between an $\text{All}(\text{G}_8)\cdot\text{All}(\text{C}_8)$ duplex and a complex of the self-pairing $\text{All}(\text{G}_8)$, or by an $\text{All}(\text{G}_8):\text{All}(\text{G}_8)\cdot\text{All}(\text{C}_8)$ triplex. In acidic medium its melting curve shows two transitions. This observation corroborates the latter possibility, and excludes — at least in acidic medium — the former. (iii) In contrast to the homo-DNA series purine–purine pairing does not only occur between adenine and adenine, as well as guanine and guanine, but also between adenine and guanine. (iv) The pairing properties of the isoguanine-containing allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotides are highly sequence-dependent; the self-pairing $\text{All}[(\text{GI})_4]$ for example seems to form well-defined duplexes, the $\text{All}(\text{G}_4\text{I}_4)$ polyplexes, and the $\text{All}(\text{I}_8)$ with the $\text{All}(\text{G}_8)$ triplexes [11]. (v) Allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotides neither pair with complementary RNA single-strands nor with complementary homo-DNA oligonucleotides.

As the melting temperatures reflect, the allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotide duplexes are generally drastically less stable than the corresponding homo-DNA oligonucleotide duplexes. The pairing properties of some 2'-deoxy- and 3'-deoxyallopyranosyladenine (4'→6')-oligonucleotides investigated by *Hammer* [83] as well as the pairing properties of some altopyranosyl- and glucopyranosyladenine (4'→6')-oligonucleotides investigated by *Groebke* [13] and *Diederichsen* [12] clearly demonstrated that the comparatively low stability of the allopyranosyl-(4'→6')-NA oligonucleotide duplexes can be attributed to the 2'-OH groups. As model studies reveal these 2'-OH groups strongly hinder base pairing and base stacking.

Due to the generally high sequence-dependence of the pairing properties of the oligonucleotides examined, the low stability of the duplexes of these oligonucleotides, and the resulting insufficient pairing selectivity the allopyranosyl-(4'→6')-NA can hardly be considered as a molecular information storage system capable of replication and evolution.

Finally, the NMR-analyses of the dinucleotides **AII(A₂)** [10] and **AII(GC)** indicated the the similarity of the actual backbone conformations of these dinucleotides with the backbone conformation of the idealised hexopyranosyl-(4'→6')-NA single-strand model [3].