



Doctoral Thesis

## Kristallstrukturanalysen von RNA-Sekundärstrukturelementen und Antisense-Oligonukleotiden

**Author(s):**

Portmann, Stefan

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001732203> →

**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](#).

**KRISTALLSTRUKTURANALYSEN VON RNA-SEKUNDÄR-  
STRUKTURELEMENTEN UND ANTISENSE-  
OLIGONUKLEOTIDEN**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

ZÜRICH

vorgelegt von

STEFAN PORTMANN

Dipl. Chem. ETH

geboren am 3. März 1967

von Kriens (LU)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. Max Dobler, Referent

Prof. Dr. Martin Egli, Korreferent

Zürich 1996

## Zusammenfassung

Detaillierte strukturelle Information über RNA ist derzeit nur spärlich vorhanden. Zum Verständnis der komplexen Funktion von RNA ist die präzise Bestimmung der dreidimensionalen Struktur ihrer verschiedenen Elemente jedoch von grosser Wichtigkeit. In dieser Arbeit wurden zwei Strukturelemente von RNA - die Doppelhelix und eine Ausstülpung (*Bulge*) in einer A-Duplex - mittels Einkristallröntgenstrukturanalyse untersucht. Ein dritter Teil behandelt kristallographische Studien chemisch modifizierter Oligonukleotide aus der Antisense-Forschung, welche Rückschlüsse auf die Anforderungen an Oligonukleotide bezüglich einer stabilen und selektiven Paarung mit natürlicher RNA erlauben sollten und ebenfalls zum allgemeinen Verständnis von Nukleinsäuren beitragen.

Die Struktur der RNA-Duplex mit der Sequenz r(CCCCGGGG) konnte in zwei unterschiedlichen Kristallformen (P6<sub>1</sub>22 und R32) bestimmt werden. Mit Synchrotronstrahlung konnte von der rhomboedrischen Kristallform ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.46Å gemessen werden. Die selbstkomplementären A-Duplexe der beiden Kristallformen unterscheiden sich nur geringfügig, der Unterschied zur DNA-Duplex der gleichen Sequenz, welche eher als A'-Duplex bezeichnet werden sollte, ist jedoch beträchtlich. Die hohe Auflösung erlaubte eine detaillierte Studie der Hydratation. Diese ist sehr systematisch und bildet in den beiden Furchen ein zusammenhängendes Netzwerk von Wasserstoffbrücken. Entlang des Rückgrates in der grossen Furche bilden die Wassermoleküle zusammen mit Phosphatsauerstoffatomen einen kontinuierlichen Strang von Pentagonen. In der kleinen Furche sind die 2'-Sauerstoffatome durch Paare von Wassermolekülen über die Furche miteinander verbrückt. Der trotz grösserer Duplexstabilität beobachtete erhöhte Verlust an Entropie bei der Duplexbildung im Vergleich zur DNA kann zum grösseren Teil dieser geordneten Hydratationshülle zugeschrieben werden.

Von der Sequenz r(GCC)d(ATATA)r(CGC) konnten ebenfalls zwei Kristallstrukturen erarbeitet werden. Sowohl in der hexagonalen (P6<sub>5</sub>22, 2.8Å Auflösung) wie auch in der orthorhombischen (C222<sub>1</sub>, 1.83Å Auflösung) Struktur ist jeweils Base A8 ungepaart, zeigt weg von der aus symmetrieverwandten Einzelsträngen bestehenden A-Duplex und ist somit nicht in diese interkaliert. Die Konformationen der Ausstülpungen (*Bulges*) sind in beiden Strukturen recht unterschiedlich, was eine grosse Flexibilität dieses Bereiches widerspiegelt. In der hexagonalen Struktur nimmt das ungepaarte Nukleotid eine *anti*-Konformation ein, während in der orthorhombischen Struktur der glykosidische Torsionswinkel im *syn*-Bereich liegt. Beide Duplexe sind an der Stelle der Ausstülpungen in die kleine Furche geknickt, was von einer Verengung dieser Furche und einer Erweiterung der grossen Furche begleitet wird. Die grosse Furche ist damit für Protein- und RNA-Wechselwirkungen viel besser zugänglich. Die orthorhombische Struktur bietet mit den koordinierten Sperminmolekülen

eine gute konformationelle Basis für die durch Metallionen katalysierte und relativ spezifische RNA-Selbstspaltungsreaktion am ungepaarten Nukleotid.

Die beiden selbstkomplementären DNA-Duplexe  $[d(\text{CGCGAAt}_{\text{Me}}\text{t}_{\text{Me}}\text{CGCG})]_2$  und  $[d(\text{CGCGAAt}_{\text{OH}}\text{t}_{\text{OH}}\text{CGCG})]_2$  mit eingebauten 6'- $\alpha$ -methylcarbozyklischen ( $t_{\text{Me}}$ ) bzw. 6'- $\alpha$ -hydroxycarbozyklischen ( $t_{\text{OH}}$ ) Thymidinen kristallisierten beide isomorph zur nativen Dickerson-Drew-Duplex  $[d(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ . Die Cyclopentanringe der carbozyklischen Bausteine, in welchen der Deoxyribose-4'-Sauerstoff durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist, nehmen entweder einen C2'-*endo*- oder C1'-*exo*-Pucker ein. Die Duplex mit 6'- $\alpha$ -Methylcarbozyklen besitzt eine etwas weitere kleine Furche im Vergleich zur nativen und der Duplex mit 6'- $\alpha$ -Hydroxycarbozyklen. Die 6'- $\alpha$ -Hydroxygruppen bilden Wasserstoffbrücken zu den N3- oder O2-Atomen der 3'-benachbarten Adenosine bzw. Thymidine. Die Strukturen wurden mit den Paarungseigenschaften von carbozyklischen Oligonukleotiden gegenüber DNA und RNA korreliert und Ansätze zur strukturellen Erklärung der Eigenschaften gefunden.

Die selbstkomplementäre Duplex  $[d(\text{GCGTAt}_{\text{O}^2\text{Et}}\text{t}_{\text{OMe}}\text{ACGC})]_2$  mit 2'-O-Methoxyethyl-thymidinen ist mit bekannten Strukturen (z.B.  $[d(\text{GCGTAt}_{\text{O}^2\text{Me}}\text{TACGC})]_2$ ) ebenfalls isomorph. Die Unterschiede zu den isomorphen A-Duplexen sind nur gering. Die Seitenketten, welche die erwartete *gauche*-Konformation einnehmen, beeinflussen die Konformation der Duplex kaum. Sie bilden in der kleinen Furche zusammen mit einem Teil des Rückgrates einen an einen 18-Krone-6 Kronenether erinnernden Halbkreis, welcher in seiner Mitte ein Metallion koordinieren könnte. Ein Metallion kann in der Kristallstruktur jedoch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, da die Seitenketten, speziell in einem der symmetrieunabhängigen Stränge, nicht gut geordnet sind. Befriedigende Erklärungen der für die Antisense-Anwendung günstigen Eigenschaften dieser Modifikation (gute Nukleaseresistenz und gleichzeitig hohe RNA-Affinität) kann diese einzelne Struktur allerdings nicht liefern. Dazu sind weitere strukturelle Studien in dieser Modifikationsklasse nötig.

## Summary

Currently, detailed structural information of RNA is still rare. However, the precise determination of the three-dimensional crystal structure of the various elements of RNA is of profound importance in understanding the complex function of RNA. In this work, two structural elements of RNA, the double helix and a bulge in an A-type duplex, were studied by single crystal X-ray diffraction methods. A third part deals with crystallographic studies of antisense research-based chemically modified oligonucleotides, which should discern the requirements that oligonucleotides have to fulfil in order to pair more selectively and more stably with natural RNA and, in addition, should contribute to the general understanding of nucleic acids.

The structure of the RNA duplex with sequence r(CCCCGGG) was determined in two distinct crystal forms (P6<sub>1</sub>22 and R32). Synchrotron radiation yielded a 1.46Å resolution data set of the rhombohedral crystal form. The A-duplexes in the two crystal forms showed only minor differences, however, the differences to the DNA duplexes with the same sequence, which resembles an A'-form, were significant. The high resolution allowed a detailed study of the hydration, which is systematic and shows a connected network of hydrogen bonds in both grooves. Along the backbones, in the major groove, water molecules together with phosphate oxygens form a continuous ribbon of pentagons. Across the minor groove, the 2'-oxygens are linked by pairs of water molecules. Although the RNA duplex is thermodynamically more stable compared to the DNA-duplex, its formation is entropically disfavored. The observed loss of entropy in duplex formation, can in part be explained by the highly ordered first shell hydration.

The structure of the bulged duplex [r(GCG)d(ATATA)r(CGCG)]<sub>2</sub> could also be determined in two crystal forms. In the hexagonal (P6<sub>5</sub>22, 2.8Å resolution), as well as in the orthorhombic form (C222<sub>1</sub>, 1.83Å resolution), base A8 is unpaired, points away from the A-duplex consisting of symmetry-related strands and is thus not intercalated into the duplex. The conformational differences between the bulges in both crystal structures implicate high flexibility in this region. In the hexagonal structure the unpaired nucleotide adopts an *anti* conformation, whereas in the orthorhombic structure the glycosidic torsion angle is in the *syn* range. At the bulge site, both duplexes are kinked into the minor groove, which is accompanied by a narrowing of the minor groove and a widening of the major groove. Therefore, the major groove is much more accessible to protein and RNA interactions. The orthorhombic structure with its coordinated spermine molecules provides a good conformational basis for the metal ion assisted and relatively specific RNA self-cleavage reaction at bulge sites.

The two self-complementary DNA duplexes [d(CGCGAA<sub>Met</sub>t<sub>Me</sub>CGCG)]<sub>2</sub> and [d(CGCGAA<sub>OH</sub>t<sub>OH</sub>CGCG)]<sub>2</sub> containing 6'-α-methyl (t<sub>Me</sub>) and 6'-α-hydroxy

carbocyclic thymidines (t<sub>OH</sub>), respectively, crystallized isomorphously to the native Dickerson-Drew dodecamer duplex [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub>. The cyclopentane moieties of the carbocyclic thymidine residues with the deoxyribose 4'-oxygen replaced by a carbon atom adopt either C2'-*endo* or C1'-*exo* B-DNA type puckers. The dodecamer duplex incorporating 6'- $\alpha$ -methyl carbocyclic thymidines shows an enlarged minor groove relative to both the unmodified duplex and the one with 6'- $\alpha$ -hydroxy carbocyclic modifications. The 6'- $\alpha$ -hydroxy groups form hydrogen bonds to N3 and O2 atoms of 3'-adjacent adenosines and thymidines, respectively. The structural results were correlated with the pairing properties of oligonucleotides containing carbocyclic nucleotides with DNA and RNA and a number of explanations with regard to the relative stabilities were suggested.

The self-complementary duplex [d(GCGTAtO<sub>2</sub>'EtOMeACGC)]<sub>2</sub> with 2'-O-methoxyethyl thymidines is also isomorphous with known structures (e.g. [d(GCGTAtO<sub>2</sub>'MeTACGC)]<sub>2</sub>). The differences to the isomorphous A-form duplexes are relatively small, indicating compatibility of the modification with the A-conformation. In the minor groove, the side chains adopt the expected *gauche* conformation. Together with parts of the backbone, they form a half-circle reminiscent of a crown ether, possibly coordinating a metal ion in its center. However, the conformational disorder seen in one of the 2'-O-substituents in the symmetry-independent strands allow no definite assignment of a metal ion at that position. This structure alone does not provide a satisfying explanation for the favorable antisense properties (combining good nuclease resistance and high duplex stability) of this modification. An improved understanding will depend on structural studies of oligonucleotides of this category with further modifications.