



Doctoral Thesis

Kombinatorische und evolutionäre Konzepte in der Chemie kleiner und grosser organischer Verbindungen

Author(s):

Giger, Thomas Stefan

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003845954> →

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. 13198

Kombinatorische und evolutionäre Konzepte in der Chemie kleiner und grosser organischer Verbindungen

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
eines Doktors der Naturwissenschaften der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

Vorgelegt von

Thomas Stefan Giger

Dipl. Chem. Universität Basel
Geboren am 5. Mai 1970
in Schlieren (ZH)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. G. Folkers, Referent
Prof. Dr. S. A. Benner, Koreferent/Leiter der Arbeit

Zürich 1999

Zusammenfassung

1. Teil (Kap. 1-3):

Die kombinatorische Chemie ist mit etwa zehn Jahren ein relativ junger Forschungszweig. Trotz ihrer kurzen Geschichte hat sie sich einen überaus wichtigen Platz in den Forschungslabors der meisten Chemiefirmen erobert. Man erhofft sich von ihr, dass sie das Werkzeug für die schnelle Entdeckung von neuen Wirksubstanzen wird oder zumindest deren effiziente Weiterentwicklung ermöglicht. Der Grund für diese grossen Erwartungen liegt darin, dass der Chemiker mit der kombinatorischen Chemie ein neues Produktivitätsniveau erreicht. Anstatt ein paar wenige Substanzen pro Jahr herzustellen, vermag er nun mehrere tausend in Form einer Bibliothek in wenigen Schritten und in kürzester Zeit zu synthetisieren.

Bei den meisten bis anhin publizierten Bibliotheken handelt es sich um festphasengebundene Heterozyklen- oder Peptidbibliotheken. Diese Arbeit will darum neue Wege zur Synthese von Flüssigphasen-Bibliotheken aufzeigen. Mit Hilfe der Metathese-Reaktion wurde eine Olefin-Bibliothek synthetisiert und diese in verschiedenste andere Bibliotheken derivatisiert, u.a. eine 1,2-Diol-Bibliothek.

Weiter wurde versucht, eine neue Screening-Methode für Flüssigphasen-Bibliotheken, die sogenannte "Receptor Assisted Combinatorial Synthesis", ("RACS") zu entwickeln. Das Grundprinzip ist, eine virtuelle Bibliothek aus zwei Sub-Bibliotheken in Gegenwart eines Rezeptors zu synthetisieren. Dabei wird das Gleichgewicht der Reaktion zum am stärksten bindenden Inhibitor des Rezeptors hin verschoben und führt zu einer Akkumulation desselben. Die Analyse dieser Reaktion wird bevorzugt im FT-ICR-MS durchgeführt, welches erlaubt, zwischen Rezeptor und Rezeptor-Inhibitor-Komplex zu diskriminieren.

Boratester besitzen eine ähnliche Struktur wie zyklische Phosphate. Darum können sie als potentielle Inhibitoren in Metabolismen mit zyklischen Phosphaten als Zwischenprodukten auftreten. Als System der Wahl wurde RNase A, ein RNA-Nukleotid, Borat und eine 1,2-Diol-Bibliothek verwendet. Es war auch vorgesehen im Falle eines Erfolges analoge Experimente mit BS-RNase und einigen ihrer Mutanten durchzuführen. Leider konnten die erhofften Resultate nicht einmal mit der RNase A erzielt werden. Der Grund dafür ist darin zu suchen, dass die Analytik noch zuwenig ausgereift ist um diese Art von Probleme zu lösen, da die erfolgversprechendsten Methoden (z.B. FT-ICR-MS) bei den benötigten hohen Ionenkonzentrationen versagen. In weiteren Versuchen konnten mit dem FT-ICR-MS jedoch diverse nonkovalente Komplexe zwischen RNase A und Diolen einer Diol-Bibliothek bzw. mit 3'- und 5'-Nukleotiden beobachtet werden.

2. Teil (Kap. 4):

Die Entstehung von BS-RNase kann auf eine Genduplikation der RNase A vor ca. 30-40 Mio. zurückverfolgt werden. Von der RNase A (*Bos taurus*) un-

terscheidet sie sich durch ihre homodimere Struktur sowie in 23 von 124 AS. Dass die BS-RNase im Gegensatz zur RNase A eine immunsuppressive Wirkung sowie eine Antitumoraktivität aufweist, deutet darauf hin, dass die BS-RNase diese Attribute nach ihrer Entstehung aus der RNase A in einem evolutionären Prozess gewonnen hat. In einer früheren Arbeit wurde bereits der gemeinsame Vorfahre der BS-RNasen der *Bovidae* rekonstruiert. Um das Gesamtbild abzurunden und um den Verlauf dieser evolutionären Entwicklung auf molekularer Ebene mitverfolgen zu können, wurde der gemeinsame Vorfahre der BS-RNasen der Hirsche (*Cervidae*), Giraffen (*Giraffidae*) und Rinder (*Bovidae*) rekonstruiert und charakterisiert. Die Resultate zeigen, dass bereits kurz nach der Genduplikation gewisse charakteristische Merkmale der BS-RNase vorhanden waren, wenn auch noch nicht so ausgeprägt. Da eine Ambivalenz für die Aminosäuren 55 und 113 vorhanden war, wurden zwei Mutanten synthetisiert; einer mit beiden AS identisch zum RNase A-Vorgänger und einer mit beiden AS identisch zur BS-RNase. Dabei hat sich gezeigt, dass diese beiden Positionen, im Einklang mit früheren Arbeiten, wichtig sind für die neuerworbenen biologischen Eigenschaften von BS-RNase. So zeigt der RNase A-ähnlichere Mutant fast durchwegs ein Verhalten, das man von RNase A erwarten würde, während der BS-RNase-ähnlichere Mutant bereits deutliche Merkmale seines Abkömmlings aufweist. Beiden ist jedoch eigen, dass sie ein vermindertes RNA-Hydrolyse-Vermögen besitzen. Dasselbe Muster kann auch für die Immunsuppressivität beobachtet werden; der RNase A ähnliche Mutant besitzt keine, während der BS-RNase ähnliche Mutant bereits eine kleine Aktivität aufweist. Es scheint, als ob die Immunsuppressivität oder Antitumoraktivität bereits früh nach der Genduplikation einen Vorteil für den damals lebenden Wiederkäuer brachte.

Summary

Part 1 (Chapter 1-3):

At around ten years old, combinatorial chemistry is one of the most exciting and dynamic events to have occurred in the chemical sciences. Despite its comparative youth, combinatorial chemistry managed to establish itself in an eminent position in the research laboratories of many chemical companies. It was expected to provide a means for the fast discovery of new lead compounds, and enable their more efficient development. The reason for these great expectations lies in the fact that the chemist is able to achieve a higher level of productivity. Instead of synthesizing just a few compounds per year he can now produce thousands of them within a few steps in form of a library.

Most of the libraries published up to date are solidphase bound heterocycle and peptide libraries. In contrast this thesis displays new approaches to the synthesis of solution phase libraries. An olefin library was synthesized with the help of the metathesis reaction and then derivatized into various other libraries, among them a 1,2-diol library.

The next goal was to develop a new screening method, called the "Receptor assisted combinatorial synthesis" ("RACS"). The idea involves the synthesis of a virtual library from two sublibraries in the presence of a receptor. The equilibrium of the reaction between the two substrates is pulled in favor of the two strongest binding ligands of the receptor. The result is an accumulation of the inhibitor that can be detected, preferably by FT-ICR-MS for this method allows for the discrimination between receptor and receptor inhibitor complex.

Borate esters have a similar structure to cyclic phosphates. They are therefore potential inhibitors for reactions in which cyclic phosphates are produced as reaction intermediates. The system of choice was RNase A, an RNA nucleotide, borate and a 1,2-Diol-library. If successful we planned to do analog experiments with BS-RNase and some of its mutants. Unfortunately this novel approach prove unsuccessful. The reasons are that the most promising analysis tools such as FT-ICR-MS are not working properly at the required high salt concentrations. In other experiments with FT-ICR-MS it was possible though to detect several non-covalent complexes between RNase A and diols of a diol library or 3'- and 5'- nucleotides respectively.

Part 2 (Chapter 4):

The origin of BS-RNase can be traced back to a gene duplication of RNase A about 30-40 million years ago. It differs from RNase A (*Bos taurus*) by its homodimeric structure as well as in 23 of 124 amino acids. Contrary to BS-RNase, RNase A does not have either immunosuppressivity or antitumor activity. From this it can be assumed that BS-RNase has gone through a period of adaptive evolution in its short time of existence. In an earlier work the common ancestor of the *bovidae* was reconstructed. To get the full picture and to get an overview of this evolutionary development it was necessary to recon-

struct and characterize the common ancestor of the BS-RNase gene of deer (*Cervidae*), giraffes (*Giraffidae*) and bovids (*Bovidae*). Because of an ambiguity at the positions 55 and 113 two mutants were made, one of them with both amino acids identical to the RNase A residues and one of them with both identical to BS-RNase. The results show that shortly after the gene duplication some distinctive properties of BS-RNase were already partly developed. It was also shown that those two positions are important for the newly acquired biological properties of BS-RNase, in accordance with earlier work. The mutant closer to RNase A shows more or less the same behavior that would be expected from RNase A, whereas the other mutant shows behavior more characteristic of BS-RNase. Both display a reduced ability to hydrolyze RNA. The same pattern of behavior was observed with immunosuppressivity and antitumor activity. The RNase A like mutant showed none, whereas the BS-RNase like mutant already possessed displayed some of it. In conclusion it seems that very early after the gene duplication occurred the resultant immunosuppressivity and antitumoractivity bestowed greater fitness on the ancient organism.