



## Doctoral Thesis

# Synthese und Paarungseigenschaften einer neuen Klasse von Oligodeoxynucleotiden mit einem die Nucleobasen enthaltenden Phosphat-Rückgrat

**Author(s):**

Czechtizky, Werngard

**Publication Date:**

2001

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004173465> →

**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. 14239

**Synthese und Paarungseigenschaften einer neuen Klasse  
von Oligodeoxynucleotiden mit einem die Nucleobasen  
enthaltenden Phosphat-Rückgrat**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
Doktor der Naturwissenschaften

der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
Werngard Czechtizky

Dipl. Ing. TU Graz  
geboren am 24. September 1973  
aus Österreich

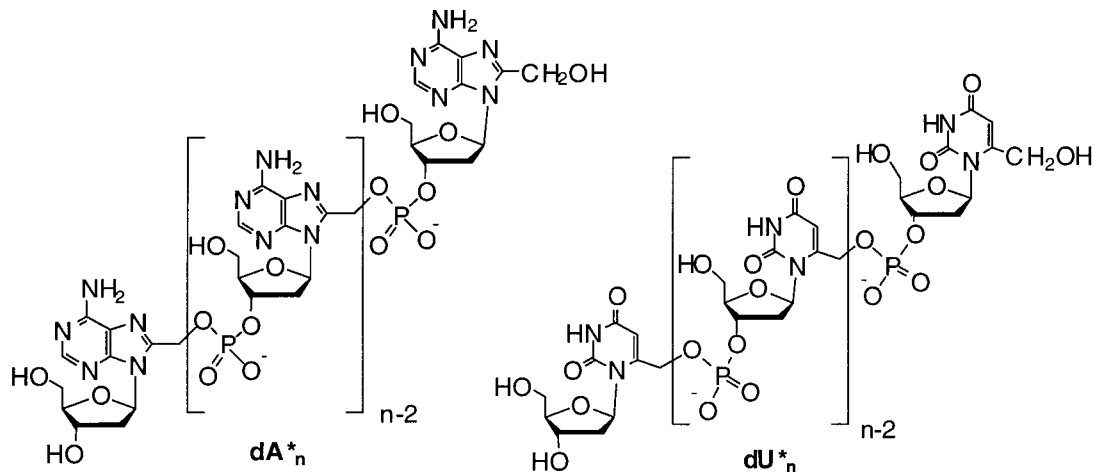
Angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. A. Vasella, Referent  
Prof. Dr. P. Chen, Korreferent

Zürich 2001

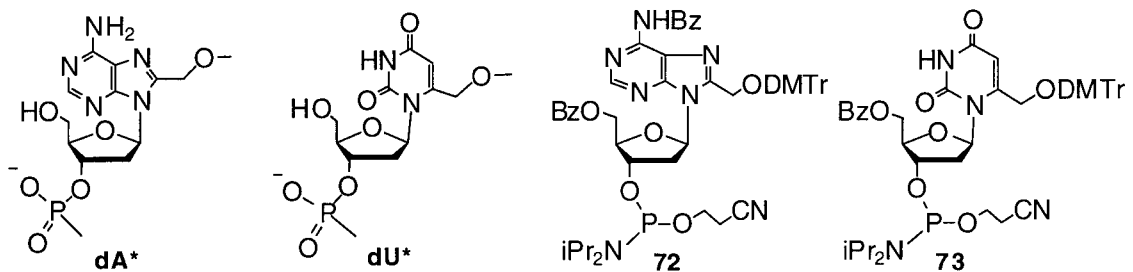
## Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Frage, ob eine strukturelle und funktionale Differenzierung zwischen den Nucleobasen und dem Oligonucleotid-Rückgrat eine Grundvoraussetzung für die Duplexbildung von Oligonucleotiden darstellt, werden in unserer Arbeitsgruppe Oligonucleotide mit einem die Nucleobasen einschliessenden Rückgrat untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Phosphodiesteranalogue bearbeitet, die Phosphinato-gruppen zwischen C(3')-O und einem Oxymethylsubstituenten am C(8) bzw. C(6) einer benachbarten 2'-Desoxyadenosyl- bzw. einer 2'-Desoxyuridyleinheit enthalten:



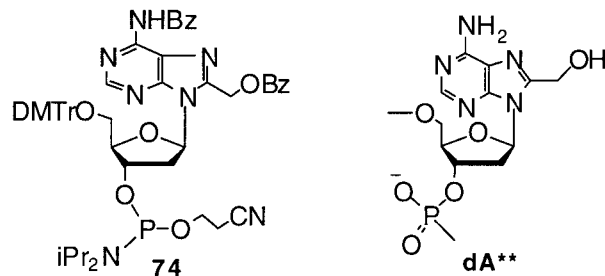
Ausgehend von 2'-Desoxyadenosin und 2'-Desoxyuridin wurden die von  $dA^*$  bzw.  $dU^*$  abgeleiteten Phosphoramidite **72** und **73** synthetisiert, die für die Festphasensynthese aller  $dA^*$  und  $dU^*$  enthaltenden Analogen benötigt wurden.



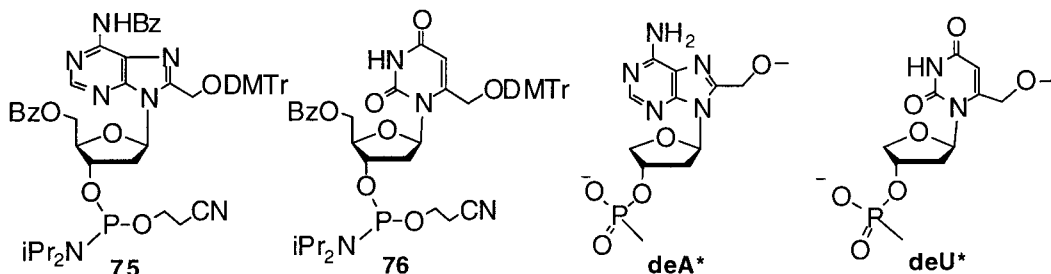
Um die Anwendbarkeit von **72** und **73** für die konventionelle Oligonucleotid-Festphasensynthese zu testen, wurden einzelne  $dA^*$ - bzw.  $dU^*$ -Nucleotide in DNA-Stränge eingebaut. Die Paarung dieser einfach modifizierten Analogen mit komplementären DNA- und RNA-Strängen ergab eine Destabilisierung eines 14meren DNA·DNA- bzw. DNA·RNA-Duplexes um  $6-8^\circ$ , was eine Anwendung dieser Oligomere für Antigen- bzw. "Antisense"-Anwendungen verhindert. Die Berechnung des modifizierten 14meren DNA·DNA-Duplexes mit dem GROMOS-Paket ergab eine deutliche Destabilisierung des modifizierten Duplexes, die dadurch zustandekommt, dass die Doppelhelix des modifizierten Duplexes gestreckt wird und eine grössere Oberfläche der DNA mit Wasser in Berührung kommt.

Die UV-spektroskopische Untersuchung der Paarungseigenschaften des vollmodifizierten Decameren dU\*<sub>10</sub> und eines Gemisches der vollmodifizierten Oligomere dA\*<sub>6</sub>/dA\*<sub>7</sub> zeigte, dass diese Analogen kein Paarungssystem bilden. Das Decamere dU\*<sub>10</sub> paarte weiters nicht mit dem komplementären DNA-Strang dA<sub>10</sub>.

Das Phosphoramidit **74** wurde hergestellt, um den Einfluss eines in der Mitte eines DNA-Duplexes positionierten C(8)-hydroxymethylierten dA-Nucleotides (dA\*\*) auf das Paarungsverhalten zu testen. Der Einbau von dA\*\* führt zu einer im Vergleich zum Einbau von dA\* geringen Destabilisierung des untersuchten DNA-Duplexes um 2.5°.



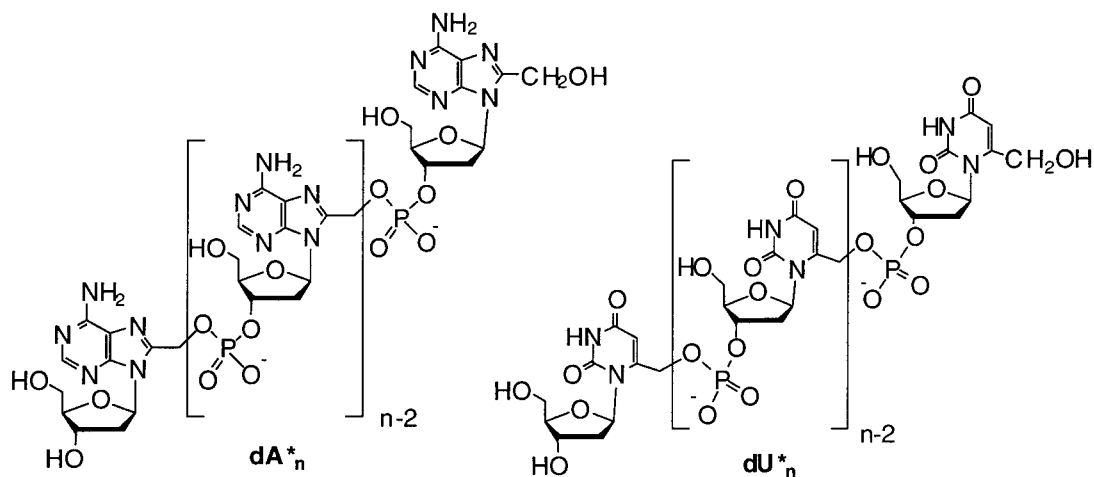
Die von 2-Desoxyerythrose abgeleiteten Phosphoramidite **75** und **76** wurden ausgehend von D-Glucose in jeweils 11 Schritten synthetisiert und in DNA eingebaut, um die Auswirkung einer Wechselwirkung zwischen der C(4')-Hydroxymethylgruppe und dem C(8)- bzw. C(6)-Substituenten in dA\* bzw. dU\* auf die Paarungseigenschaften dieser Oligomere zu testen.



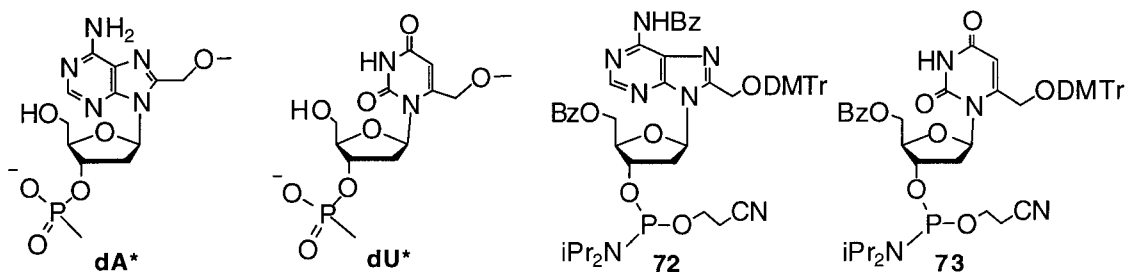
Der Einbau von deA\* und deU\* ergab wie der Einbau von dA\* und dU\* eine Destabilisierung eines 14meren DNA-Duplexes um 7–8°. Dies zeigt, dass die Destabilisierung unabhängig von der C(4')-Hydroxymethylgruppe ist.

## Summary

To investigate the question whether the structural and functional differentiation of the nucleobases and the oligonucleotide backbone in DNA and RNA is a necessary prerequisite for the formation of stable homo- and heteroduplexes we investigate oligonucleotide analogues with a nucleobase-including backbone. This work deals with the synthesis of phosphodiester analogues with phosphinato groups between C(3')-O and either a C(8)-CH<sub>2</sub>O group of 2'-deoxyadenosine or a C(6)-CH<sub>2</sub>O group of 2'-deoxyuridine:



The phosphoramidites **72** and **73**, suitable for the solid-phase synthesis of all oligomers containing dA\* or dU\*, were prepared from 2'-deoxyadenosine and 2'-deoxyuridine.

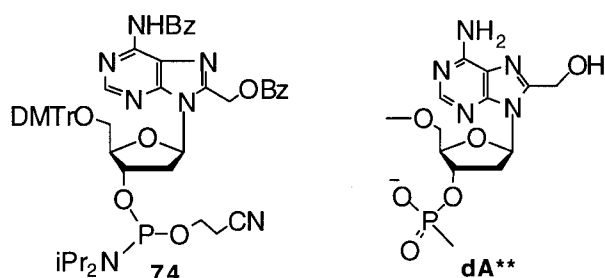


Single dA\* or dU\* units were incorporated into DNA strands to test the applicability of **72** and **73** for conventional oligonucleotide solid-phase synthesis. The pairing of these singly modified oligomers with complementary DNA and RNA strands showed a destabilization of a 14mer DNA·DNA and a 14mer DNA·RNA duplex by 6–8°, which prevents these oligomers from being used for antigene- or "antisense"-applications.

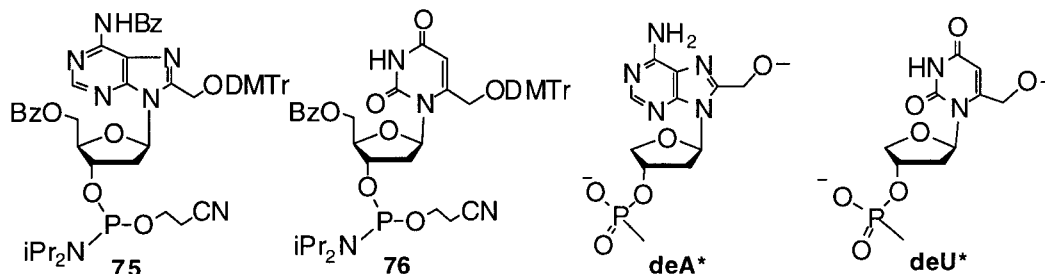
The calculation of a modified 14mer DNA·DNA duplex using the GROMOS simulation package showed a significant destabilization of the modified duplex that is due to a stretching of the double helix and the exposure of a larger surface of the DNA towards water.

UV-spectroscopic pairing studies of the fully modified decamer dU\*<sub>10</sub> and of a mixture of the fully modified oligomers dA\*<sub>6</sub>/dA\*<sub>7</sub> showed that these oligomers do not form an autonomous pairing system. The decamer dU\*<sub>10</sub> does not pair with the complementary DNA strand dA<sub>10</sub> either.

The phosphoramidite **74** was synthesized and incorporated into a DNA duplex to investigate the influence of a C(8)-hydroxymethylated dA nucleotide (dA\*\*) on the pairing. The incorporation of a single dA\*\* unit leads to a destabilization of a 14mer DNA duplex by 2.5°.



The phosphoramidites **75** and **76**, derived from 2-deoxy-D-erythrose, were synthesized starting from D-glucose in 11 steps each.



They were incorporated into DNA to study the influence of the interaction between the C(4')-hydroxymethyl group and the C(8)- *resp.* the C(6)-substituent in dA\* bzw. dU\* on the pairing properties of these analogues. Similarly to the incorporation of a dA\* or a dU\* unit, the incorporation of a deA\* or a deU\* unit leads to a destabilization of a 14mer DNA duplex by 7–8°, showing that the destabilization is independent of the C(4')-hydroxymethyl group.