



Doctoral Thesis

Towards diversified artificial genetic systems synthesis and molecular biology of thymidine analogs with C⁵- position sulfur functionality

Author(s):

Held, Heike A.

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004256704> →

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 No. 14174

**Towards Diversified Artificial Genetic Systems:
Synthesis and Molecular Biology of
Thymidine Analogs with C⁵-Position Sulfur Functionality**

A Dissertation Submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH
for the Degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Heike A. Held

Dipl. Chem. University of Freiburg
born April 16, 1968
in Freiburg i. Br. (Germany)

accepted on recommendation of

Prof. Dr. D. Hilvert, examiner
Prof. Dr. S. A. Benner, co-examiner

Zurich 2001

SUMMARY

DNA and proteins, key components of present day life, are evidently specialized to fulfill their tasks. Having a regular structure and enhanced chemical stability due to minimal functionality, DNA may be perfectly adapted for storing and transmitting genetic information. Proteins may have efficiently evolved a diverse array of functionality to help them perform their crucial role as the catalysts for chemical reactions for living systems. Findings of RNA molecules that catalyze their own splicing have raised the question, however, whether there could have been an early stage of life when catalysis was generally performed by nucleic acids. A spectrum of catalytically active nucleic acids has been found using *in vitro* selection techniques. Nevertheless, a remaining problem with the concept of a “nucleic acid world” is the presumed inferiority of nucleic acid catalysts, as measured against the standard of proteins. It is a plausible assumption that equipping DNA with the functionality available to proteins would improve the catalytic potential of the former.

Thiol groups seem especially valuable in this aspect, as they fulfill two crucial roles in proteins:

- Intramolecular disulfide bridges stabilize conformations
- Free thiols are often directly involved in catalytic mechanisms.

To this end, four functionalized nucleosides were designed, synthesized and investigated as components of thiol functionalized DNA (see Figure page xii).

The synthesis of 5'-*O*-triphosphates and 3'-*O*-phosphoramidites was required to incorporate the functionalized nucleotide building blocks into oligonucleotides. Nucleosides **dS³** and **dS⁴** in a form suitable for triphosphate and phosphoramidite synthesis were synthesized following published procedures. These intermediates were converted to the corresponding triphosphates, which are novel compounds. For the synthesis of the analogous intermediates derived from **dS¹** and **dS²** a streamlined synthesis scheme was developed that involves Pd-catalyzed coupling of thioesters to 5-iodo-2'-deoxyuridine. This reaction is a novel variation of Pd-catalyzed couplings to iodoarenes. The triphosphates and phosphoramidites of **dS¹** and **dS²** were prepared.

\mathbf{dS}^2 was successfully incorporated into oligonucleotides of various lengths (9-94 nucleotides) and varying \mathbf{dS}^2 -content (1-6 nucleotides) by solid phase synthesis, using standard phosphoramidite chemistry. Even in the demanding case of three subsequent internal \mathbf{dS}^2 -residues, coupling yields >97% were consistently obtained.

Solid phase oligonucleotide synthesis with \mathbf{dS}^1 failed, however, probably due to intrinsic chemical instability of \mathbf{dS}^1 .

Reductive cleavage of the mixed disulfide with 1,4-dithiothreitol (DTT) quantitatively generated the highly reactive free thiols on \mathbf{dS}^2 -containing oligonucleotides. Through this functionality virtually the entire spectrum of thiol reactivity in aqueous solution, well known from peptide chemistry, can be applied to the thiol-containing oligonucleotides. In this work the reaction of the free thiols with iodoacetamide and oxidation to intramolecular disulfides is described. The efficiency of the postsynthetic modifications was tested with an oligonucleotide library containing \mathbf{dS}^2 -building blocks.

In order to obtain information about the efficiency and accuracy with which the modified nucleotides are processed by polymerases, simple replications of various templates by a variety of thermostable DNA polymerases in the presence of a suitable primer were performed. \mathbf{dS}^1 was eliminated from the studies because of its instability. \mathbf{dS}^2 was found to be accepted better than \mathbf{dS}^3 and \mathbf{dS}^4 by all polymerases tested. *Pwo* polymerase accepted the modified uridine \mathbf{dS}^2 so well that it is presently being used to support in vitro selection experiments involving functionalized oligonucleotides.

ZUSAMMENFASSUNG

DNA und Proteine sind essentiellen Bestandteile lebender Systeme. Beide Biopolymere sind hervorragend fuer die Erfuellung ihrer jeweiligen Aufgaben geeignet. Ihre repetitive Struktur und relative chemische Stabilitaet machen DNA-Molekuele zu einem guten, vielleicht sogar perfekten Traeger des genetischen Materials. Proteine dagegen sind flexible Molekuele, die als Katalysatoren chemischer Vorgaenge grundlegend fuer alles Leben sind. Die Vielfalt an funktionellen Gruppen ist vermutlich grundlegend fuer die hohe katalytische Wirksamkeit von Proteinen. Seit der Entdeckung von RNA-Molekuelen mit katalytischer Aktivitaet wird eine sogenannte "RNA-Welt" als fruehes Entwicklungsstadium von lebenden Systemen diskutiert. Etliche katalytisch wirksame Nucleinsauremolekuele wurden bereits mit Hilfe von *in vitro* Selektions-Technologie gefunden. Diese Nucleinsauren sind jedoch im Vergleich mit Proteinen recht schlechte Katalysatoren. Es ist plausibel anzunehmen, dass die Einfuehrung zusaetzlicher funktioneller Gruppen in Nucleinsaure-Molekuele deren katalytisches Potential verbessern wuerde.

Thiolgruppen tragen auf zwei Arten entscheidend zu der katalytischen Aktivitaet von Proteinenzymen bei:

- Intramolekulare Disulfidbruecken stabilisieren Konformationen und schaffen dadurch strukturelle Vielfalt.
- Freie Thiole sind oft direkt am katalytischen Mechanismus beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier funktionalisierte Nucleoside entworfen, synthetisiert und als Bestandteile funktionalisierter Oligonucleotide getestet (siehe Abbildung Seite xii).

Nucleoside **dS³** und **dS⁴** wurden gemaess von Literaturverfahren synthetisiert, fuer die Synthese von **dS¹** und **dS²** wurde eine verkuerzte Syntheseroute entwickelt, die auf der Kopplung eines Thioesters mit 5-Iod-2'-desoxyuridin beruht. Diese Kopplung ist eine neuartige Variante bekannter Palladium-katalysierter Kopplungsreaktionen.

dS² wurde mit Festphasentechnik chemisch in Oligonucleotide eingebaut. Oligonucleotide verschiedener Laenge und mit verschiedenem **dS²**-Gehalt wurden uauf

diese Weise erhalten. Der analoge Einbau von dS^1 ist nicht gelungen, vermutlich aufgrund der chemischen Instabilität des Nukleosides.

Die freien Thiolgruppen wurden nach erfolgter Oligonukleotidsynthese durch Reduktion mit 1,4-Dithiothreitol (DTT) erhalten. Die Thiolgruppen wurden dann zur intramolekularen Disulfidbrücken-Bildung ausgenutzt. Des Weiteren wurden die Thiole mit Iodacetamid derivatisiert. Als Substrate für die postsynthetischen Modifikationen wurden Oligonukleotide mit definierter Sequenz und eine Oligonukleotid-Bibliothek eingesetzt.

Die Eignung der funktionalisierten Nukleoside zur polymerase-katalysierten Replikation von Oligonukleotid-Templaten wurde anhand von sogenannten "primer extension assays" getestet. Die Template waren so gewählt, dass sie verschiedene Schwierigkeitsgrade für die Polymerasen darstellten. In allen Fällen wurde das Triphosphat von dS^2 , das eine Butinyl-Seitenkette trägt, besser als die Triphosphate von dS^3 und dS^4 eingebaut. Da Nukleosid dS^1 offenbar chemisch instabil ist, wurden keine systematischen Einbauexperimente mit diesem Nukleosid durchgeführt. Von den acht getesteten DNA-Polymerasen akzeptierte *Pwo*-Polymerase akzeptierte das dS^2 -Triphosphat am besten.

Die Akzeptanz von *Pwo*-Polymerase für dS^2 ist hoch genug für die effiziente PCR-Amplifikation von dS^2 -enthaltenden Oligonukleotiden. Zur Zeit werden in der Benner-Gruppe *in vitro* Selektions-experimente mit Oligonukleotiden, die dS^2 enthalten, durchgeführt.