

Diss. ETH No. 14438

**The Influence of the Phosphate Backbone on the
Conformation and Thermal Stability of DNA**

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

presented by

Daniel Hutter

Dipl. Chem. ETH Zurich
born February 8, 1969
from Diepoldsau (SG)



accepted on the recommendation of
Prof. Dr. P. L. Luisi, examiner
Prof. Dr. S. A. Benner, co-examiner

Zurich 2001

Summary

To understand the impact of removing the charge and replacing the bridging oxygens by methylene groups on the formation of DNA duplex structures, dinucleoside analogs were prepared where the phosphate linker was replaced by a dimethylenesulfone, dimethylenephosphinate or 5'-methylene phosphonate unit. The synthetic route is outlined in the figure. These dimers were incorporated into natural oligonucleotides at various positions. The resulting chimeric DNA molecules were then studied by polyacrylamide gel electrophoresis and UV thermal melting. From these studies, the impact of these backbone modifications on the conformation and stability of the duplex was evaluated.

The results can be summarized and interpreted as follows:

- 1) Replacing the 5'-oxygen resulted in a significant destabilization of the duplex. This was explained mainly by a steric clash between the bulkier methylene group and the *syn*-face of the nucleobase. This destabilization is expected to arise from any other replacement of the 5'-oxygen as well.
- 2) Removing the charge led to substantial destabilization as well, probably because of reduced solvation. An alternative explanation ascribes this phenomenon to a collapse of the neutral backbone onto the hydrophobic core of the helix.
- 3) Replacing the 3'-oxygen decreased the stability of a duplex with complementary DNA, mainly due to a change in sugar pucker to the RNA-like C3'-*endo*. It might therefore be expected to increase the stability of a duplex with complementary RNA.

All these conclusions are corroborated by results reported in the literature about other backbone modifications.

Remarkably, these small steps away from the natural backbone all seem to be detrimental for duplex stability. The results obtained in this dissertation have therefore significant implications for the "antisense strategy" and the search for life beyond Earth. In brief, they suggest that two major requirements for the antisense strategy, stability of a modified linker against enzymatic digestion as well as high thermal stability of a duplex formed with complementary RNA, are mutually exclusive. They also suggest that any successful genetic molecule guaranteeing a Watson-Crick-like reversible templating behavior must be a polyelectrolyte, and that therefore the search for extraterrestrial life can be reformulated as the search for extraterrestrial polyelectrolytes.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war ein besseres Verständnis der Auswirkungen, die eine Veränderung der Phosphat-Gruppe, insbesondere das Ersetzen der Sauerstoff-Brücken mit Methyl-Gruppen und die Neutralisierung der Ladung, auf die Konformation und Stabilität der DNA-Doppelhelix haben würde. Dazu wurden Dinukleotid-Analoga hergestellt, bei denen die Phosphat-Gruppe durch eine Dimethylensulfon-, Dimethylenphosphinat- oder 5'-Methylenphosphonat-Verknüpfung ersetzt war. Die angewandte Syntheseroute ist in der Abbildung zusammengefasst. Die Dimere wurden an unterschiedlichen Stellen in natürliche Oligonukleotide eingebaut. Die erhaltenen Chimere wurden anhand von Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Schmelztemperatur-Messungen untersucht. Dadurch konnten die Auswirkungen der Rückgrat-Veränderungen auf die Konformation und Stabilität der Doppelhelix bestimmt werden.

Die Resultate können folgendermassen zusammengefasst werden:

- 1) Das Ersetzen des 5'-Sauerstoffs führte zu einer deutlichen Erniedrigung der Duplex-Stabilität. Dies lässt sich hauptsächlich mit einer nachteiligen sterischen Wechselwirkung zwischen der grösseren Methyl-Gruppe und der *syn*-Seite der Kernbase erklären. Diese reduzierte Duplex-Stabilität kann auch von jeder anderen Substitution des 5'-Sauerstoffs erwartet werden.
- 2) Die Neutralisierung der Ladung führte ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Duplex-Stabilität, wahrscheinlich wegen verminderter Solvatisierung. Eine alternative Erklärung schreibt dieses Phänomen einem Kollaps des neutralen Rückgrats auf das hydrophobe Zentrum der Helix zu.
- 3) Das Ersetzen des 3'-Sauerstoffs verringerte die Duplex-Stabilität mit komplementärer DNA. Dieser Effekt wurde vor allem auf die Rotation des Zucker-Bausteins zur RNA-ähnlichen C3'-*endo* Konformation zurückgeführt. Dies lässt erwarten, dass ein Duplex mit komplementärer RNA durch das Ersetzen des 3'-Sauerstoffs stabilisiert würde.

Alle diese Folgerungen stimmen überein mit Resultaten aus der Literatur über andere Rückgrat-Veränderungen.

Es ist bemerkenswert, dass sich diese kleinen Schritte weg vom natürlichen Rückgrat so ungünstig auf die Duplex-Stabilität auswirken. Die in dieser Arbeit gewonnenen Einsichten haben daher weitreichende Folgen sowohl für die "antisense"-Strategie als auch für die Suche nach ausserirdischen Lebensformen. Zwei zentrale Bedingungen in der "antisense"-Strategie, die Stabilität eines veränderten Rückgrats gegenüber enzymatischem Verdau und eine hohe Duplex-Stabilität eines modifizierten Stranges mit komplementärer RNA, scheinen unvereinbar. Die Resultate legen ausserdem nahe, dass nur ein Polyelektrolyt ein erfolgreiches genetisches Molekül darstellen kann, das ein reversibles Paarungsverhalten ähnlich dem Watson-Crick-Muster gewährleistet, und dass die Suche nach ausserirdischen Lebensformen deshalb umformuliert werden kann zur Suche nach ausserirdischen Polyelektrolyten.

