ETH zürich

ETH Library

Strukturbestimmung nicht-natürlicher Nukleinsäuren mit Hilfe der NMR-Spektroskopie

Doctoral Thesis

Author(s):
Ebert, Marc-Olivier

Publication date:
2003

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-004555269

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. 15123

STRUKTURBESTIMMUNG NICHT-NATÜRLICHER NUKLEINSÄUREN MIT HILFE DER NMR-SPEKTROSKOPIE

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

MARC-OLIVIER EBERT
Dipl. Chem. ETH

geboren am 3. September 1974
von Zürich und Waldkirch, SG

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Bernhard Jaun, Referent
Prof. Dr. Wilfred van Gunsteren, Korreferent

2003

Zusammenfassung

Die Ribofuranosyl-Nukleinsäuren, die molekularen Bausteine des genetischen Systems, sind das besterhaltene strukturelle Prinzip im Laufe der Evolution. Ihre Vorherrschaft ist das Ergebnis eines vermuteten präbiotischen Selektionsprozesses, dessen Kriterien noch weitgehend im Dunkeln liegen. Ein möglicher Weg zu seinem besseren Verständnis bildet der Vergleich mit alternativen Nukleinsäuren, die unter ähnlichen präbiotischen Bedingungen hätten entstanden sein können wie RNA. Die Strukturaufklärung solcher potentiell konkurrierender Paarungssysteme mittels NMR-Spektroskopie wird in einem ersten Teil dieser Arbeit beschrieben.

Kapitel 3 behandelt die Aufklärung der Lösungsstruktur von α-L-Arabinopyranosyl-(4′→2′)-$(CGAATTCG)_2$. Die Arabinopyranosyl-Nukleinsäuren gehören zu den stärksten bekannten Paarungssystemen überhaupt. Der anti-parallele Oktamer-Duplex paart im *Watson-Crick*-Modus und weist eine lineare Leiter-Struktur mit einer starken Inklination von *ca.* –50° und damit vorherrschendem *inter*-Strang-Stacking auf.

Während Arabinose gleich wie Furanose zur Familie der Pentosen gehört, wird in Kapitel 5 mit α-L-Threofuranosyl-(3′→2′)-$(CGAATTCG)_2$ die Struktur eines Tetrose-Paarungssystems mit der gleichen Sequenz beschrieben. Im Gegensatz zu den Pyrano-

syl-Nukleinsäuren sind Threofuranosyl-Oligonukleotide (TNA) zur Kreuzpaarung mit RNA und DNA fähig. Auch dieser antiparallele Duplex paart im *Watson-Crick*-Modus, bildet aber eine rechtsgängige Doppelhelix aus. Die helikalen Parameter sowie die Form der *minor groove* rücken diese Struktur in die Nähe von A-RNA.

Die in Kapitel 4 untersuchte pDNA ist im Unterschied zu den beiden anderen Systemen keine potentiell natürliche Alternative zu RNA. Dieses System verfügt jedoch über Eigenschaften, die es zusammen mit RNA für eine Verwendung in Hybrid-Konstrukten interessant machen. Ausserdem bildet es durch die hervorragende Dispersion der NMR-Signale einen Modellfall für die Strukturbestimmung von Pyranosyl-Nukleinsäuren, an dem exemplarisch die Möglichkeiten und Grenzen der verwendeten Methoden aufgezeigt werden können.

Die NMR-Studien dieses ersten Teiles werden ergänzt durch MD-Simulationen eines TNA- sowie eines pDNA Duplexes mit GROMOS.

Ein unabhängiger zweiter Teil beinhaltet die Untersuchung zweier RNA-Tetranukleotid-"Mini-Duplexe" hinsichtlich ihrer Eignung als potentielle Modellsysteme für die Codon-Anticodon-Wechselwirkung. Durch die Verknüpfung der beiden Stränge mit einem Polyethylenglykol-Linker an einem Ende des Duplex kann der ungünstige entropische Beitrag zur freien Paarungs-Energie dieser Strukturen soweit vermindert werden, dass sie für eine NMR-Strukturbestimmung zugänglich werden. Es kann gezeigt werden, dass die beiden „Mini-Duplexe" alle Merkmale von A-RNA aufweisen und dass der Linker die Struktur der angrenzenden Reste nicht wesentlich beeinflusst. Es erschliessen sich somit

neue Möglichkeiten für strukturelle Untersuchungen der *frame shift*-Problematik mittels NMR.

Summary

Ribofuranosyl nucleic acids, the molecular building blocks of the genetic system, are the best conserved structural principle in the course of evolution. Their absolute predominance is judged to be the result of a prebiotic selection process according to criteria which remain widely in the dark. One possible way towards a better understanding is the comparison with alternative nucleic acids which could have been formed under similar prebiotic conditions as RNA. The structure elucidation of such potentially competitive pairing systems using NMR-spectroscopy is described in a first part of this thesis.

Chapter 3 describes the elucidation of the solution structure of α-L-Arabinopyranosyl-(4′→2′)-$(CGAATTCG)_2$. The arabinopyranosyl nucleic acids belong to the strongest pairing systems known to date. The anti-parallel octamer-duplex pairs in the *Watson-Crick* mode and shows a linear ladder-shaped structure with a strong inclination of about –50° and therefore dominant inter-strand stacking.

Whereas, like furanose, arabinose belongs to the family of the pentoses, α-L-Threofuranosyl-(3′→2′)-$(CGAATTCG)_2$ the structure of which is described in chapter 5 is a tetrose pairing system of

the same sequence. Unlike pyranosyl nucleic acids, threofuranosyl oligonucleotides (TNA) are capable of cross-pairing with RNA and DNA. The anti-parallel duplex also pairs in the *Watson-Crick* mode, although forming a right-handed double-helix this time. The helical parameters as well as the shape of the minor groove are closely related to those found in A-RNA.

Unlike the other systems described so far, pDNA investigated in Chapter 4 is not a potentially natural alternative to RNA. However, the system possesses properties that together with RNA, make it interesting for use in hybrid-constructs. In addition, because of the excellent dispersion of the NMR-signals, it is a model case for the structure elucidation of pyranosyl nucleic acids which demonstrates the possibilities and limitations of the methods used.

The NMR studies of this first part are complemented by MD-simulations of a TNA as well as of a pDNA duplex using GROMOS.

A independent second part of the thesis includes the investigation of two RNA tetra-nucleotide „mini-duplexes" with regard to their suitability as a potential model system for codon-anticodon interaction. By connecting both strands with a polyethylene glycol linker at one end of the duplex the unfavorable entropic contribution to the free energy of pairing can be largely eliminated in order to make them accessible for structure determination by NMR. It can be shown that both „mini-duplexes" have all attributes of A-RNA and that the structure of the neighbouring residues is not significantly biased by the linker. This makes questions related to frame-shifts during the translation process accessible to structural investigation by NMR.