ETH zürich

ETH Library

Funktionalisierte Desoxyribonukleinsäuren

Doctoral Thesis

Author(s):
Heeb, Norbert Viktor

Publication date:
1991

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000626289

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. 9633

FUNKTIONALISIERTE DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN

Abhandlung

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

NORBERT VIKTOR HEEB

dipl. Chem. ETH
geboren am 1. November 1962
von Altstätten/SG

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Steven A. Benner, Referent
Prof. Dr. Albert Eschenmoser, Korreferent

Zürich 1991

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der strukturellen Gegebenheiten in einem DNA-RNA-Hybrid schien ein N^2-acyliertes 2'-Desoxyguanosin geeignet um eine Imidazolfunktion bis auf Wasserstoffbrückenabstand der 2'-Hydroxygruppe eines komplementären Cytidins anzunähern. Ausgehend von 2'-Desoxyguanosin wurde über drei Stufen das **N^2-(3-(Imidazol-4-yl)-propionyl)-2'-desoxy-guanosin 13** als Hydrofluorid in guter Ausbeute hergestellt. Um das, von Pfleiderer (42) eingeführte, zur Synthese basenlabiler Nukleinsäuren geeignete Konzept der *p*-Nitrophenyl-ethyl- bzw. der *p*-Nitrophenyl-ethyloxy-carbonyl-schutzgruppen zu erproben, wurde aus dem 3',5'-Tetraisopropyl-disiloxan-diyl-geschützten Nukleosid **12** in neun Stufen N^2-(3-(Imidazol-4-yl)-propionyl)-2'-desoxy-guanosin-3'-monophosphat **43** hergestellt. Dabei konnte die thiolytisch spaltbare 2,4-Dinitrophenylfunktion als Imidazolschutzgruppe erfolgreich eingesetzt werden. Aehnlich wie Histidin liegt auch das Nukleotid **43** bei physiologischen Bedingungen zwitterionisch vor (pK_1: 5.86, pK_2: 7.13, pK_3: 9.24). So schien uns Histosin (Hsn, H) in Analogie zur Aminosäurenomenklatur ein geeigneter Name für das imidazolhaltige Nukleosid **13** zu sein.

In Lösung wurden nach der **Phosphorsäuretriestermethode** die N^{Im}-2,4-dinitrophenyl-, O^6-*p*-nitrophenyl-ethyl-geschützten Phosphorsäurediester und triester **34, 35** und die Nukleoside **24, 26** mit geeignet funktionalisierten Cytidin- und Thymidinderivaten zu Dimeren und Trimeren kondensiert. Nach dem Abspalten der Schutzgruppen konnten die Oligomere TpH **54**, CpH **59**, CpHp **64**, pCpHp **65** und TpHpC **60** durch RP-HPLC gereinigt und mit NMR-Spektroskopie (^1H- ^{31}P- ^{13}C-NMR), FAB-Massenspektrometrie und enzymatischer Verdauung (SVPD'ase, BAP'ase) eindeutig charakterisiert werden.

Die für eine **trägergebundene DNA-Synthese** benötigten Methyl- oder Cyanoethylphosphoramidite **46** und **47** konnten aus dem N^{Im}-2,4-dinitrophenyl-, O^6-*p*-nitrophenyl-ethyl-geschützten Nukleosid **23** gewonnen werden. Dagegen konnte das O^6-ungeschützte Nukleosid **19** nicht zu den entsprechenden Phosphoramiditen umgesetzt werden. Das Cyanoethylphosphoramidit **47** wurde nach der **Phosphoramidit-Methode** im µmol-Massstab mit einem 'DNA-Sythesizer' in die Oligomere dT_7HT_8 **75** und dT_6HTTHT_6 **76** eingebaut. Verglichen mit den guaninhaltigen, homologen Oligomeren dT_7GT_8 **77** und dT_6GTTGT_6 **78** eluieren die zwitterionischen

Oligomere **75** und **76** an einer DEAE-HPLC-Säule etwas schneller. Die durch enzymatische Verdauung (SVPDase, BAPase) gefundenen relativen Basenzusammensetzungen entsprechen gut den erwarteten Verhältnissen. Die thermischen Hypochromizitäten der Oligomere **75** (1 %) und **76** (1 %), bestimmt im Temperaturbereich von 10-70 °C, sind verglichen mit den Homologen **77** (2 %) und **78** (6 %) kleiner. Dagegen sind die enzymatischen Hypochromizitäten von dT_7HT_8 **75** (13 %) und dT_6HTTHT_6 **76** (17 %) verglichen mit **77** und **78** um 5 % grösser.

Das **Paarungsverhalten** von N^2-(3-(Imidazol-4-yl)-propionyl)-guanin mit Cytosin wurde NMR-spektroskopisch (^1H-, ^{13}C-NMR, 1D-NOE) untersucht. In einem apolaren Lösungsmittel ($CDCl_3$) in Gegenwart der Cytidine **1b** oder **1c** verschoben sich die an Wasserstoffbrücken beteiligten ^1H- und ^{13}C-Resonanzen des Histosins **21** mit zunehmender Konzentration gegen tieferes Feld. Anhand der Konzentrationsabhänigkeit der NH^1- und NH^2-Resonanzen von **21** konnten für die Selbstpaarung (dH-dH) eine Assoziationskonstante $\mathbf{K_{dH\text{-}dH}}$ von **3.5** $\mathbf{M^{-1}}$ und für die Watson-Crick-artigen Paarungen mit Desoxycytidin **1b** (dH-dC) und Cytidin **1c** (dH-rC) Assoziationskonstanten $\mathbf{K_{dH\text{-}dC}}$ von **160** $\mathbf{M^{-1}}$ und $\mathbf{K_{dH\text{-}rC}}$ von **630** $\mathbf{M^{-1}}$ ermittelt werden. Die grössere Affinität des Histosins **21** zum Cytidin **1c** sowie die Verschiebung der $OH^{2'}$-Resonanz im Cytidin **1c** deuteten auf eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Imidazolfunktion von **21** und der 2'-Hydroxygruppe des Cytidins **1c**. Die experimentell bestimmten Assoziationskonstanten sind grösser als die entsprechenden Werte der Adenin-Thyminpaarung ($K_{A\text{-}T}$: 130 M^{-1}) jedoch kleiner als jene der Guanin-Cytosin-paarung ($K_{G\text{-}C}$: ca.10^4-10^5 M^{-1}) (79,81,82).

Das **Assozitationsverhalten der Oligomere** dT_7HT_8 **75** und dT_6HTTHT_6 **76** mit den komplementären Desoxyribonukleinsäuren dA_8CA_7 **79** und dA_6CAACA_6 **80** wurde bei 260 nm UV-spektroskopisch untersucht und mit jenem der Homologen dT_7GT_8 **77** und dT_6GTTGT_6 **78** verglichen. Aequimolare Mischungen der komplementären Oligomere zeigten bei Temperaturen unter 55 °C maximale Hypochromizität (Mischkurvenexperimente). Dies entspricht der erwarteten Stöchiometrie eines Dimeren. Während der Duplex $\mathbf{dT_7HT_8\text{-}dA_8CA_7}$ (2 µM) bereits bei 37 °C zerfällt, schmilzt das entsprechende Assoziat dT_7GT_8-dA_8CA_7 (2 µM) erst bei 43 °C. Entsprechend dem höheren G-C-Gehalt schmilzt der Komplex dT_6GTTGT_6-

dA_6CAACA_6 (2 µM) bei 45 °C und zeigt ebenfalls das für DNA-DNA-Duplexe typische, kooperative Dissoziationsverhalten. Dagegen findet man beim Aufwärmen des Duplex **dT_6HTTHT_6-dA_6CAACA_6** (2 µM) kein sigmaoides Schmelzverhalten, sondern eine lineare Absorptionszunahme. Die deutlich geringeren Schmelztemperaturen der imidazolhaltigen Duplexe entsprechen den in apolaren Lösungsmitteln gefundenen Assoziationskonstanten der Nukleoside. Interessanterweise schmelzen missgepaarte Assoziate aus dT_7HT_8 **75** und einer Mischung der Ribonukleinsäuren $rA_{(12-18)}$ verglichen mit jenen des Homologen dT_7GT_8 **77** bei höherer Temperatur (35 °C bzw. 32 °C). Die beobachtete Stabilisierung der Assoziate **dT_7HT_8-$rA_{(12-18)}$** deutet, ähnliche wie die erhöhte Affinität von **21** gegenüber dem Ribonukleosid **1c**, auf eine zusätzliche Wasserstoffbrücke der Imidazolfunktion mit einer Hydroxygruppe im komplementären RNA-Strang.

Erste **Versuche zur sequenzspezifischen RNA-Hydrolyse** innerhalb der leicht zugänglichen dT_7HT_8-$rA_{(12-18)}$-Hybride blieben bisher erfolglos. Weiterführende Studien sollten geeigneter mit Watson-Crick gepaarten, höher schmelzenden (T_M > 50 °C) DNA-RNA-Duplexen durchgeführt werden.

Inspection of the structural features in a DNA-RNA-hybrid suggests that an N^2-acylated 2'-deoxyguanosine seemed to be a promising location for the introduction of an imidazole-moiety capable of binding the 2'-hydroxyl-group in the paired cytidine on the RNA strand. **N^2-(3-(imidazol-4-yl)-propionyl)-2'-deoxyguanosine 13** was synthesised in three steps starting from 2'-deoxyguanosine and isolated as the hydrofluoride salt in good yield. The *p*-nitrophenylethyl- and the *p*-nitrophenylethyloxycarbonylprotecting groups, introduced by Pfleiderer, seemed to be useful for the synthesis of acylated, base-labile nucleic acids. To test this protecting group strategy, the synthesis of N^2-(3-(imidazol-4-yl)-propionyl)-2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate **43** was accomplished in nine steps starting from the 3',5'-tetraisopropyldisiloxandiylprotected nucleoside **12**. The thiolate-cleavable 2,4-dinitrophenylgroup was also used succesfully as imidazole protection. Like histidine, the nucleotide **43** exists as a zwitterion unter physiological conditions (pK_1: 5.86, pK_2: 7.13, pK_3: 9.24). Therefore, with respect to the nomenclature of amino acids, Histosine (Hsn, H) seemed to be an appropriate name for the imidazole bearing nucleoside **13**.

In solution, using the **phosphate triester-method**, the N^{Im}-2,4-dinitrophenyl-, O^6-*p*-nitrophenylethyl protected phosphoric acid diester and triester **34**, **35** and the nucleosides **24**, **26** were condensed to dimers and trimers with appropriate functionalised cytidine- and thymidine-derivatives. After deprotection, the oligomers TpH **54**, CpH **59**, CpHp **64**, pCpHp **65** and TpHpC **60** were purified by reversed phase-HPLC and the structures were assigned by NMR-spectroscopy (^1H- ^{31}P- ^{13}C-NMR), FAB-mass-spectrometry and by enzymatic digestion (SVPD'ase, BAP'ase) to the appropriate nucleosides.

Methyl- or cyanoethylphosphoramidite **46** and **47**, necessary for a **DNA synthesis on a solid support**, were synthesised from N^{Im}-2,4-dinitrophenyl- O^6-*p*-nitrophenylethyl protected nucleoside **23**. Starting from O^6-unprotected nucleoside **19**, it was not possible to isolate the appropriate phosphoramidate. However, using cyanoethylphosphoramidite **47** the oligomers dT_7HT_8 **75** and dT_6HTTHT_6 **76** were prepared in the DNA-synthesizer in µmol quantities, according to the **phosphoramidite method**.

The zwitterionic oligomers eluted from a DEAE-HPLC-Column before the guanine bearing homologues. The relative nucleoside compositions found by enzymatic digestion (SVPDase, BAPase) were in good agreement with the expected ratios. The thermal hypochromicity of the oligomers **75** (1 %) and **76** (1 %), measured in a temperature range from 10-70 °C, was smaller than those of the homologues **77** (2 %) and **78** (6 %). The enzymatic hypochromicity from dT_7HT_8 **75** (13 %) and dT_6HTTHT_6 **76** (17 %) was about 5 % higher than those of **77** and **78**.

The **base pairing behaviour** of N^2-(3-(imidazol-4-yl)-propionyl)-guanine with cytosine was elucidated by NMR-spectroscopy (^{1}H-, ^{13}C-NMR, 1D-NOE). Using an apolar sovent ($CDCl_3$) in presence of the cytidines **1b** or **1c** the ^{1}H- and ^{13}C-NMR signals of histosine **21** involved in hydrogen bonding showed a concentration dependent down field shift. Analysing the concentration dependence of the ^{1}H-NMR signals of NH^1 and NH^2 in **21**, a selfpairing association constant $\mathbf{K_{dH\text{-}dH}}$ of **3.5 M^{-1}** was found and for a Watson-Crick-like pairing with deoxycytidine **1b** (dH-dC) and cytidine **1c** (dH-rC) association constants $\mathbf{K_{dH\text{-}dC}}$ of **160 M^{-1}** and $\mathbf{K_{dH\text{-}rC}}$ of **630 M^{-1}** were observed. The enhanced affinity of histosine **21** to cytidine **1c** and the observed down-field shift of the $OH^{2'}$-signal in cytidine **1c** in presence of the complementary base was in agreement with the predicted hydrogen-bond between the imidazole in **21** and the 2'-hydroxylgroup of cytidine **1c**. Compared to the appropriate association constant in an adenine-thymine basepair ($K_{A\text{-}T}$: 130 M^{-1}), the measured association constants $K_{dH\text{-}dC}$ and $K_{dH\text{-}rC}$ are larger, but considerably smaller than those for a guanine-cytosine pairing ($K_{G\text{-}C}$: ca. 10^4-10^5 M^{-1}) under similar conditions (79,81,82)

The association behaviour of the oligomers dT_7HT_8 **75** and dT_6HTTHT_6 **76** with the complementary deoxyoligomers dA_8CA_7 **79** and dA_6CAACA_6 **80** was analysed UV-spectrophotometrically at 260 nm and compared with those of the homologues dT_7GT_8 **77** and dT_6GTTGT_6 **78**. Below 55 °C a maximal hypochromicity was observed with equimolar mixtures of the complementary oligomeres (mixing curve experiments). This is in agreement with the expected stoichiometry in a dimer. While the duplex **dT_7HT_8-dA_8CA_7** (2 µM) dissociates at 37 °C, the homologoues complex dT_7GT_8-dA_8CA_7 (2 µM) melts at 43 °C. Because of the higher G-C-content, the duplex dT_6GTTGT_6-dA_6CAACA_6 (2 µM) dissociates at 45 °C and also shows the

typical cooperative melting behaviour of a DNA-DNA-duplex. Warming up the duplex **dT_6HTTHT_6-dA_6CAACA_6** (2 µM), a linear increase of the absorption, but no sigmaoid melting curve, was observed. The considerable melting temperature decrease of imidazole-bearing duplexes are in agreement with the association constants of nucleoside pairs found in apolar solvents. Interestingly misspaired associates between dT_7HT_8 **75** and a mixture of ribonucleic acids $rA_{(12-18)}$ melted at higher temperature (35 °C) than the duplexes with the homologue dT_7GT_8 **77** (32 °C). As with the enhanced affinity of **21** with the ribonucleoside **1c**, the observed stabilisation of the **dT_7HT_8-$rA_{(12-18)}$** associates is in agreement with the predicted hydrogen bond between the imidazole in the DNA-strand and a 2'-hydroxylgroup in the complementary RNA strand.

Preliminary **experiments to obtain sequence specific RNA-hydrolyses** with the dT_7HT_8-$rA_{(12-18)}$-hybrids were unsuccessful. Further studies with DNA-RNA-Duplexes of higher melting temperatures (T_M > 50°C) will probably prove more fruitful.