

**Darstellung massenmodifizierter
2', 3'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphate für die
DNA-Analyse mittels MALDI-TOF-MS**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im
Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

von

Anette Jacob

aus Hamburg

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 1993 bis August 1999 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Hamburg durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Köster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 30.08.1999

Herrn Prof. Dr. Hubert Köster danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, die wertvollen Anregungen und die sowohl fachliche als auch persönliche Unterstützung im Verlaufe dieser Arbeit.

Dem gesamten Arbeitskreis sowie allen Praktikanten/-innen danke ich für die gute Zusammenarbeit, für viele fruchtbare Diskussionen und vor allem für viel Spaß im und außerhalb des Labors.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die in irgendeiner Weise am Entstehen dieser Arbeit teilhatten und die mich moralisch, tatkräftig oder finanziell unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
I EINLEITUNG.....	1
1 MASSENSPEKTROMETRISCHE VERFAHREN IN DER DNA-ANALYTIK	3
1.1 Elektrospray-Ionisation	4
1.2 Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation	5
2 DNA-SEQUENZIERUNG MITTELS MALDI-TOF-MS	7
2.1 Möglichkeiten und derzeitige Grenzen	7
2.2 Neuere Entwicklungen im diagnostischen Bereich.....	10
2.3 Mögliche Ansätze zur Multiplex-Sequenzierung diagnostischer Assays	12
II AUFGABENSTELLUNG	15
III MALDI-TOF-ANALYSE VON OLIGONUCLEOTIDEN.....	17
1 OPTIMIERUNG DER GERÄTEPARAMETER UND PROBENPRÄPARATION	17
1.1 Geräteparameter und Probenpräparation.....	17
1.2 Sprühpräparation.....	20
2 ANALYSE EINZELSTRÄNGIGER, SYNTHETISCHER OLIGONUCLEOTIDE	23
2.1 Isotopenauflösung	24
2.2 Kationenaddukte und Fragmentierungen	27
2.3 Analyse von Gemischen synthetischer Oligonucleotide.....	30
3 ANALYSE VON DOPPELSTRÄNGIGER DNA (PCR-PRODUKTE).....	36
3.1 Einsatz von 7-Desaza-Purinen.....	37
3.1.1 Abspaltung der Primer mittels Ribose-Modifikation.....	40
3.1.2 Nachweis von doppelsträngiger DNA bei der Analyse von PCR-Produkten ...	42
3.2 Untersuchungen zum Nachweis von doppelsträngiger DNA.....	44
4 SCHLUßFOLGERUNGEN FÜR MASSENMARKIERUNG UND SEQUENZIERUNG	48
IV DARSTELLUNG MASSENMARKIERTER TERMINATOREN.....	50
1 ALLGEMEINE ANFORDERUNGEN AN MASSENMARKIERTE TERMINATOREN	50
1.1 Akzeptanz und Einbau durch Polymerasen.....	50
1.1.1 Modifizierung der Riboseeinheit	51
1.1.2 Modifizierung der Base.....	52
1.2 Stabilität der massenmarkierten Verbindungen.....	53

2	DARSTELLUNG MODIFIZIERTER PYRIMIDINNUCLEOSID-5'-TRIPHOSPHATE	55
2.1	<i>Syntheseplanung</i>	55
2.2	<i>C-5 substituierte 2', 3'-Didesoxyuridinderivate</i>	60
2.2.1	Einführung eines Alkynylaminolinkers	60
2.2.2	Abspaltung der 3'-Hydroxylgruppe	62
2.2.3	Einführung des Alkynylaminolinkers und Hydrierung	69
2.2.4	Derivatisierung des Linkers	72
2.3	<i>C-5 substituierte 2',3'-Didesoxycytidinderivate</i>	74
2.3.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen	76
2.3.2	<i>C-5 substituierte 2',3'-Didesoxycytidinderivate</i>	77
2.4	<i>C-3'-O-modifizierte Thymidinderivate</i>	80
2.5	<i>Massenmarkierte 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate</i>	83
2.5.1	Nucleosid-5'-triphosphate	83
2.5.2	Triphosphatsynthese.....	84
2.5.3	Abspaltung der t-Butyloxycarbonylgruppe	90
2.5.4	Stabilität der modifizierten 5'-Triphosphate unter MALDI-Bedingungen.....	92
V	SEQUENZIERUNGEN MIT MASSENMARKIERTEN 2',3'-DIDESOXY- NUCLEOSID-5'-TRIPHOSPHATEN	97
1	OPTIMIERUNG VON PROBE-ASSAY UND SANGER-SEQUENZIERUNG	102
2	PROBE-ASSAY MIT MASSENMODIFIZIERTEN TERMINATOREN	114
3	SANGER-SEQUENZIERUNG MIT MASSENMODIFIZIERTEN TERMINATOREN	118
3.1	<i>Sequenzierung von M13mp18</i>	118
3.2	<i>Sequenzierungen mittels MALDI-TOF-MS</i>	122
4	MULTIPLEX-PROBE-ASSAY.....	125
5	UNTERSUCHUNGEN ZUR TRIPHOSPHATSYNTHESE	130
VI	DISKUSSION	132
VII	ZUSAMMENFASSUNG	147
VIII	SUMMARY	149
IX	EXPERIMENTELLER TEIL	151
1	ALLGEMEINE HINWEISE	151
1.1	<i>Chemikalien</i>	151
1.2	<i>Meßgeräte und Methoden</i>	154
2	SYNTHESEN.....	159
2.1	<i>Synthese von C-5 substituiertem 2',3'-Didesoxyuridin</i>	159

2.1.1	5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2'-desoxyuridin <u>2</u>	159
2.1.2	3-t-Butyloxycarbonylamidopropin <u>10</u>	160
2.1.3	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin <u>3</u>	160
2.1.4	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-phenoxythiocarbonyl-2'-desoxyuridin <u>12</u>	161
2.1.5	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxyuridin <u>13</u>	162
2.1.6	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin <u>14</u>	162
2.1.7	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxyuridin-2'-en <u>15</u>	163
2.1.8	5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-phenoxythiocarbonyl-5 iod-2'-desoxyuridin <u>17</u>	164
2.1.9	5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin <u>19</u>	164
2.1.10	5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2',3'-didesoxyuridin-2'-en <u>20</u>	165
2.1.11	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxyuridin-2'-en <u>22</u>	166
2.1.12	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxyuridin <u>23</u>	167
2.1.13	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin <u>24</u>	168
2.1.14	5-(3-Aminopropyl)-2',3'-didesoxyuridin <u>25</u>	169
2.1.15	5-(3-Acetylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin <u>26</u>	170
2.2	<i>Synthese von C-5 substituiertem 2',3'-Didesoxycytidin</i>	171
2.2.1	3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin <u>29</u>	171
2.2.2	1-[3'-O-Acetyl-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-5-methyl-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-pyrimidin-2-on <u>30</u>	172
2.2.3	3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin <u>31</u>	173
2.2.4	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-1-[2',3'-didesoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-pyrimidin-2-on <u>32</u>	174
2.2.5	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxycytidin <u>33</u>	175
2.2.6	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxycytidin <u>34</u>	176
2.3	<i>Synthese von C-3'-O-modifizierten Thymidinderivaten</i>	177
2.3.1	N-Fmoc-Glycin <u>35</u> und N-Fmoc-Alanin <u>36</u>	177

2.3.2	3'-O-(N-Fmoc-glycyl)-2'-desoxythymidin <u>41</u> und 3'-O-(N-Fmoc-alanyl)- 2'-desoxythymidin <u>42</u> (2-Stufen-Reaktion).....	178
2.3.3	5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(2-methoxy-ethoxy-methyl)- 2'-desoxythymidin <u>43</u>	180
2.3.4	3'-O-(2-methoxy-ethoxy-methyl)-2'-desoxythymidin <u>44</u>	180
2.4	<i>Synthese von massenmarkierten Nucleosidtriphosphaten</i>	181
2.4.1	Massenmodifizierte 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate <u>45-49</u>	181
2.4.2	Abspaltung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe <u>48, 49</u>	183
3	MALDI-TOF-ANALYSEN.....	184
3.1	<i>Probenpräparation und Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren</i>	184
3.2	<i>Analyse synthetischer Oligonucleotide und Oligonucleotidgemische</i>	186
3.3	<i>Analyse von doppelsträngiger DNA</i>	186
3.3.1	PCR-Produkte ⁵⁹	186
3.3.2	Untersuchungen zum Nachweis von doppelsträngiger DNA.....	187
4	SANGER-SEQUENZIERUNGEN.....	188
4.1	<i>Sequenzierung von M13mp18</i>	188
4.2	<i>Sequenzierungen mittels MALDI-TOF-MS</i>	189
4.2.1	PROBE Assay.....	191
4.2.2	Multiplex-PROBE-Assay.....	191
X	LITERATUR	193

Publikationsverzeichnis

"Analysis of ligase chain reaction products via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry"

C. Jurinke, D. van den Boom, A. Jacob, K. Tang, R. Wörl and H. Köster,
Anal. Biochem. 237, 174-181, (1996)

"Detection of hepatitis B virus DNA in serum samples via nested PCR and MALDI-TOF mass spectrometry"

C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, A. Jacob, J. Kirchhübel, A. Lüchow, D. van den Boom, R. Laufs and H. Köster, *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 13, 67-71, (1996)

"Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of polymerase chain reaction products containing 7-deazapurine moieties"

C.W. Siegert, A. Jacob and H. Köster, *Anal. Biochem.* 243, 55-65, (1996)

"Recovery of nucleic acids from immobilized biotin-streptavidin complexes using ammonium hydroxide and applications in MALDI-TOF mass spectrometry"

C. Jurinke, D. van den Boom, V. Collazo, A. Lüchow, A. Jacob and H. Köster,
Anal. Chem. 69, 904-910, (1997)

"DNA analysis by mass spectrometry: Applications in DNA sequencing and diagnostics"

H. Köster, D. van den Boom, A. Braun, A. Jacob, C. Jurinke, D. P. Little and K. Tang,
Nucleosides & Nucleotides 16 (5&6), 563-571, (1997)

"Direct detection of synthetic and biologically generated double-stranded DNA by MALDI-TOF MS"

D. P. Little, A. Jacob, T. Becker, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, C. Jurinke, D. van den Boom and H. Köster, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 169/170, 133-140, (1997)

"Application of nested PCR and mass spectrometry for DNA based virus detection: HBV-DNA detected in the majority of isolated anti-HBc positive sera"

C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, D. van den Boom, A. Jacob, S. Polywka, R. Lauf and H. Köster, *Gen. Anal.* 14, 97 (1998)

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ac	Acetyl-
abs.	absolutiert
AIBN	Azoisobutyronitril
APS	Ammoniumperoxydisulfat
BOC	tert-Butyloxycarbonyl-
C	Cytosin
CDCl ₃	deutertes Chloroform
COSBE	competitive oligonucleotide single base extension
CPG	controlled pore glass
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
ddC _{BOC} TP	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddC _{NH₂} TP	5-aminopropyl-2',3'-didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphat
ddT _{Ac} TP	5-(3-acetylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin-5'-triphosphat
ddT _{BOC} TP	5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin-5'-triphosphat
ddT _{NH₂} TP	5-aminopropyl-2',3'-didesoxyuridin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPCD	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl-, 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-
DNA (DNS)	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E ₀	Schwellenbestrahlungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
EtOH	Ethanol
FAB-MS	fast atom bombardement mass spectrometry
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanin
GPC	Gelpermeationschromatographie

3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	high pressure liquid chromatography
IEC	ion exchange chromatography
IE-HPLC	ion exchange high pressure liquid chromatography
IR	Infrarot
LCR	ligase chain reaction
M	molar, Molarität
M	Molmasse
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
MEM	2-Methoxyethoxymethyl-
MeOH	Methanol
Mesyl	Methansulfonyl
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulphonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol
NMR	nuclear magnetic resonance (magnetische Kernresonanz)
nt	Nucleotid
OD	Optische Dichte
p.A.	pro analysi
Ph	Phenyl-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PROBE	primer oligo base extension
RNA (RNS)	Ribonucleinsäure
RP-HPLC	reversed phase high pressure liquid chromatography
<i>t, tert</i>	tertiär
T	Thymin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEBK	Triethylammoniumbicarbonat (Triethylammoniumhydrogencarbonat)
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
U	Uracil
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen zu Volumen
VIS	visible (Bereich des sichtbaren Lichtes)

I Einleitung

Die genetische Information jedes lebenden Organismus ist im Basencode der Desoxyribonucleinsäuren (DNA) gespeichert (Abb.1). Die Sequenz dieser "Schlüssel-moleküle des Lebens" ist somit eine wesentliche Grundvoraussetzung für ein besseres Verständnis von Struktur und Funktionsweise eines Organismus. Unter anderem führen Sequenzdaten auch zu Informationen über die genetischen Grundlagen menschlicher Erkrankungen. Die Kenntnis der Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Genen und Umweltfaktoren kann zu bedeutenden Verbesserungen in der vorbeugenden Medizin führen. Ein genaueres Wissen über die genetische Ursache von Krankheiten ermöglicht ein besseres Verständnis ihrer Entstehungsmechanismen und eröffnet damit neue Behandlungswege.

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms stellt jedoch aufgrund seiner astronomischen Größe eine immense Herausforderung dar. Während die durchschnittliche Länge eines kleinen Virengenoms im Bereich von 10^5 Basenpaaren (Bp) liegt, werden mit zunehmender Komplexität der Organismen sehr schnell weitere Größenordnungen überschritten. Das menschliche Genom, bestehend aus schätzungsweise 100000 Genen, erreicht ca. $3 \cdot 10^{12}$ Bp¹. In Anbetracht der Dimensionen der zu analysierenden genomischen DNA kommt der Entwicklung neuer und effektiver Sequenzierungsstrategien und -techniken eine zentrale Bedeutung zu. Methoden, die sich durch Schnelligkeit, hohe Automatisierbarkeit, hohen Probendurchsatz, lange Leselängen sowie eine effizientere Datenerfassung auszeichnen, sind erforderlich, um den Anforderungen des Humangenom-Projektes (HUGO) gewachsen zu sein.

Parallel zum Fortschreiten des Humangenom-Projektes, dessen Hauptziel die Kartierung und Sequenzierung des menschlichen Genoms ist, gewinnt die Aufklärung der Funktion und Wirkungsweise der analysierten Sequenzinformationen einen immer größeren Stellenwert. Die hier gewonnenen Kenntnisse führten unter anderem zur Diagnose von Erbkrankheiten auf

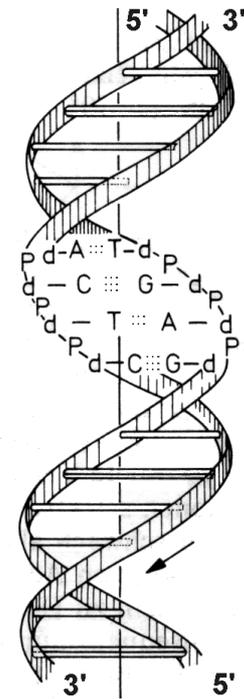


Abb. 1: Modell der DNA-Doppelhelix (d: 2'-Desoxyribose; P: Phosphat; ---: Wasserstoffbrückenbindung)
Die genetische Information ist in der Reihenfolge der Nucleotidbasen A, C, G und T in 5'-3'-Richtung verschlüsselt.

DNA-Basis. Obwohl erst ca. 5% des menschlichen Genoms sequenziert worden sind, sind bereits mehr als 3000 genetisch bedingte Krankheiten bekannt, darunter Duchenne Muskeldystrophie und Cystische Fibrose. Die zunehmend an Bedeutung gewinnenden Bedürfnisse der diagnostischen DNA-Sequenzierung, die zwar nur kleine Fragmente analysiert, diese jedoch in großer Zahl verarbeitet, zwingt daher ebenfalls zur Entwicklung schneller, effektiver Sequenzierungsmethoden mit hohem Probendurchsatz. Während jedoch bei der *de novo* DNA-Sequenzierung lange Leselängen ein wichtiges Kriterium darstellen, sind hier neben Schnelligkeit und Kosteneffizienz ein hohes Maß an Genauigkeit und Zuverlässigkeit sowie Flexibilität und Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Problemstellung relevant.

Die derzeit etablierten Verfahren der DNA-Sequenzierung basieren auf der automatisierten gelelektrophoretischen Auftrennung und Detektion fluoreszenzmarkierter Proben^{2,3,4}. Hierbei stellt die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente den zeit- und durchsatzlimitierenden Faktor dar. Eine erhebliche Verringerung des Zeit- und Arbeitsaufwandes sowie der anfallenden Kosten verspricht der Ersatz der Gelelektrophorese durch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Der Zeitaufwand für die Auftrennung und Identifizierung der Sequenzierungsprodukte ließe sich auf diese Weise von mehreren Stunden auf wenige Minuten reduzieren. Durch die Möglichkeit der Automatisierung und der parallelen Prozessierung ist eine zusätzliche Erhöhung des Probendurchsatzes erreichbar. Zudem repräsentiert die Massenspektroskopie ein direktes, definitives und schnelles Nachweisverfahren. Da hier das Molekulargewicht (definierte physikalische Größe) der Fragmente detektiert wird, ist, im Vergleich zu anderen Verfahren^{5,6,7,8,9,10,11}, die ebenfalls die Eliminierung der durchsatzlimitierenden Gelelektrophorese zum Ziel haben, keine weitere Markierung der Fragmente durch Fluoreszenz oder Radioaktivität erforderlich.

Die massenspektrometrische Analyse von DNA ist jedoch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, so daß zur Zeit die möglichen Anwendungen in der DNA-Sequenzierung auf kleine Fragmente bekannter Sequenz beschränkt sind. Theoretisch könnte die fehlende Leselänge durch die Schnelligkeit der Analyse kompensiert werden. Eine weitere Erhöhung des Probendurchsatzes wäre durch die Multiplex-Sequenzierung (Mehrfach-Sequenzierung) denkbar. Aus diesem Grunde sollten im Rahmen dieser Arbeit massenmarkierte Terminatoren synthetisiert und hinsichtlich ihrer Eignung für die Multiplex-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS untersucht werden.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die massenspektrometrischen Methoden in der Nucleinsäureanalytik sowie der Möglichkeiten und derzeitigen Grenzen der MALDI-TOF-Massenspektrometrie in der DNA-Sequenzierung gegeben werden. Der größte Teil der hier

beschriebenen Entwicklungen auf dem massenspektrometrischen Gebiet, sowohl in der DNA-Analytik als auch in der DNA-Sequenzierung, verlief dabei parallel zur Entstehung dieser Arbeit und wird hier vorweggenommen, um einen besseren Einblick in die Thematik und den jetzigen Stand der Forschung zu geben.

1 Massenspektrometrische Verfahren in der DNA-Analytik

Die Massenspektrometrie zählt aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Aussagekraft zu den leistungsfähigsten Methoden in der instrumentellen Analytik. Klassische Ionisierungsverfahren wie Elektronenstoßionisation (EI) oder Chemische Ionisation (CI) erlauben jedoch nur

den Nachweis relativ kleiner Moleküle, die unzerstört verdampfbar sind. Mit der Entdeckung und Entwicklung schonenderer Desorptions- und Ionisierungsverfahren wie FD (Felddesorption)^{12,13}, FAB (Fast Atom Bombardment)¹⁴, PD (Plasma Desorption)¹⁵, TS (Thermospray) und in jüngerer Zeit ESI (Elektrospray Ionisation)¹⁶ und MALDI (Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)¹⁷ ist es inzwischen gelungen,

den der Massenspektrometrie organischer Substanzen zugänglichen Massenbereich kontinuierlich zu erweitern.

Im Vergleich zu anderen Biopolymeren erwies sich jedoch die Erzeugung intakter Moleküle von Oligonucleotiden oder sogar Nucleinsäuren aufgrund der hohen Polarität und Fragmentierungstendenz dieser Substanzen als äußerst schwierig. Ein weiteres Problem stellen die infolge des negativ geladenen Phosphatgerüsts (Polyanion) in Gegenwart von Metallionen (Na^+ , K^+ etc.) gebildeten, heterogenen Kationenaddukte dar. Heterogenität im Gegen-

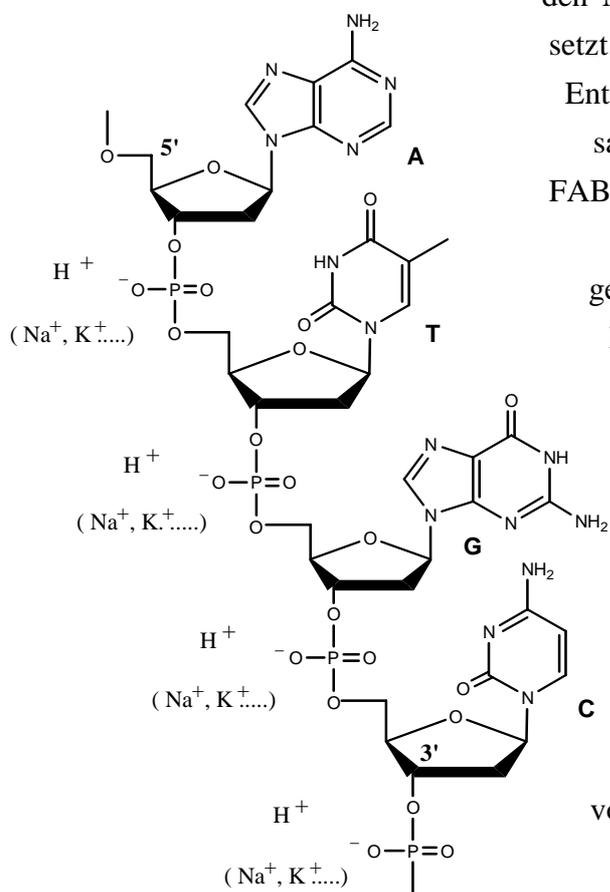


Abb. 2: Ausschnitt aus einem DNA-Strang. Kationenheterogenität führt durch die Bildung separater Peaks ($[\text{M}-n\text{H}^+ + (n+1)\text{Na/K}]^+$) zur Aufspaltung des eigentlichen Molekülsignals ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (mit n_{max} = Anzahl der Phosphatgruppen).

Kation führt zu separaten Signalen und hat eine Abnahme des Signal/Rausch-Verhältnisses des eigentlichen Moleküliions zur Folge.

Während Techniken wie FAB und PD bei der Analyse von Oligosacchariden¹⁸, Peptiden und kleineren Proteinen¹⁹ mit wachsendem Erfolg eingesetzt werden konnten, fanden sie in der Nucleinsäureanalytik nur wenig Verbreitung. Hohe Probenmengen (nmol-Bereich) wurden benötigt, um relativ kurze Oligonucleotide zu analysieren^{20,21,22,23}. Erst die Einführung der Elektrospray Ionisation (ESI) und der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI) Ende der achtziger Jahre brachte den entscheidenden Durchbruch in der massenspektrometrischen Analyse von DNA. Diese beiden völlig unterschiedlichen Techniken, die sich in ihrem Anwendungsbereich zum Teil ergänzen, haben den zugänglichen Massenbereich sowie die Nachweisempfindlichkeit innerhalb kürzester Zeit beträchtlich erhöht.

1.1 Elektrospray-Ionisation

Bei der Elektrospray-Ionisation²⁴ wird durch Versprühen der Probe in Gegenwart eines hohen elektrischen Feldes eine Serie mehrfach geladener Molekülionen erzeugt. Aufgrund des hohen Ladungszustandes der gebildeten Molekülionen kann für die Detektion hochmolekularer Verbindungen ein Quadrupol als Massenganalysator eingesetzt werden (m/z-Bereich bis 2000 Da). Infolge der multiplen Molekülionen, die alle zur Molekulargewichtsbestimmung der zu analysierenden Probe eingesetzt werden können, und des relativ hohen Auflösungsvermögens in diesem m/z-Bereich zeichnet sich ESI-MS durch eine hohe Massengenauigkeit aus (0.01% gegenüber 0.1% bei MALDI-TOF-MS). Schon kurz nach der Einführung von ESI-MS konnte die massenspektrometrische Analyse von Oligonucleotiden und t-RNA unterschiedlichster Länge (21-76 nt) beschrieben werden^{25,26}. Die Entwicklung der nano-Ionenquelle (nano-ESI-MS)²⁷ trug wesentlich zur Verbesserung der Empfindlichkeit bei. Die benötigte Probenmenge konnte auf diese Weise auf wenige pmol bzw. unter optimalen Bedingungen auf wenige 100 fmol reduziert werden²⁸. Die Kopplung von ESI mit dem hochauflösenden FT-ICR-MS (fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) anstelle des Quadrupols ist ebenfalls möglich und führt zu einer bedeutend höheren Auflösung und Massengenauigkeit²⁹. Der mittels ESI-MS zugängliche Massenbereich wurde in den letzten Jahren kontinuierlich erweitert. Inzwischen können Nucleinsäuren mit mehr als 100³⁰ oder auch mehr als 1000^{31,32} Nucleotiden (z.B. Plasmid und Phagen DNA) detektiert werden. Vorteile von ESI-MS gegenüber MALDI-MS sind vor allem die hohe Massengenauigkeit (ESI-Quad-MS:0.01% bzw. ESI-FT-MS:0.002%), der zugängliche Massenbereich für Nucleinsäuren bis in den

Megadalton Bereich oder auch die Möglichkeit, on-line mit einer HPLC oder Kapillarelektrophorese ES-massenspektrometrische Analysen durchführen zu können. Schwierigkeiten treten jedoch bei der Analyse komplexer Gemische auf. Wenige Komponenten, die sich in ihrer Masse nur geringfügig unterscheiden, lassen sich bei entsprechendem Auflösungsvermögen des Gerätes (FT-MS) durchaus analysieren²⁹. Die Analyse von komplexeren Gemischen ist jedoch durch die für ESI-MS charakteristische Bildung komplexer Serien unterschiedlich geladener Molekülonen limitiert. Die Auswertung der Spektren wird mit steigender Anzahl an Komponenten zunehmend schwieriger. Zudem ist ein hohes Auflösungsvermögen erforderlich, um die multiplen Molekülonen voneinander zu trennen. Aus diesen Gründen findet ESI-MS für die Analyse von komplexen Gemischen, wie sie Sequenzierungsprodukte darstellen, wenig Verbreitung.

1.2 Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation

Bei der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI)³³ wird die Probe mit einem Überschuß an Matrix (meist kleine aromatische Säuren) kokristallisiert und anschließend einem kurzen Laserpuls ausgesetzt. Die Energie des Laserstrahls wird von der Matrix absorbiert und auf die in der Matrix "eingebetteten", isoliert vorliegenden Probenmoleküle übertragen. Auf diese Weise entstehen hauptsächlich einfach geladene Molekülonen, deren Molekulargewichte in der Regel mittels eines Flugzeitanalysators (TOF, time-of-flight) bestimmt werden³⁴. Dieser arbeitet ebenfalls im gepulsten Modus und ermöglicht daher die nahezu gleichzeitige Bestimmung aller Massen eines extensiven Massenbereiches. Infolge der meist einfach geladenen Molekülonen sind die Spektren leicht zu interpretieren, so daß die Analyse von komplexeren Gemischen gut möglich ist. Wie zuvor bei FAB und PD festgestellt, ruft auch hier der stark ionische Charakter von DNA und die Fragmentierungstendenz der Molekülonen Probleme hervor, und zwar bei MALDI-MS mehr als bei ESI-MS. Die ersten Spektren wurden 1990 publiziert und zeigten ein Octamer³⁵ oder Oligothymidinsäuren^{36,37} unterschiedlicher Länge bis hin zum 18-mer.

Erst das Auffinden geeigneter Matrixmoleküle und Laserbedingungen ermöglichte eine breitere Anwendung.^{38,39,40} Als UV-sensitive Matrices (337 und 355 nm) lassen sich 6-aza-2-thiothymin⁴¹, 2',4',6'- Trihydroxyacetophenon⁴², ein Gemisch von 2',4',6'- und 2',3',4'- Trihydroxyacetophenon, Picolinsäure⁴³ (266 nm) und 3-Hydroxypicolinsäure verwenden, wobei die ersten beiden lediglich die Analyse von Oligonucleotiden bis zu einer Länge von ca. 25 nt erlauben. Der Einsatz von 3-Hydroxypicolinsäure⁴⁴ hingegen führt zu deutlich reduzierten Ionenfragmentierungen und besseren Signalintensitäten, so daß erstmals auch

längere Oligonucleotide detektiert werden konnten. In Kombination mit einem Stickstoff-Laser (337 nm) repräsentiert sie zur Zeit die Standardmatrix für die DNA-Analyse mittels MALDI-TOF-MS.

Empfindlichkeit, Massenauflösung, Massengenauigkeit und zugänglicher Massenbereich sind jedoch nicht nur von der geeigneten Matrix/Laser-Kombination abhängig, sondern auch von den Geräteparametern des verwendeten MALDI-TOF-MS (Größe des Laserspots, Einfallswinkel, Laserenergie, Beschleunigungsspannung etc.)^{45,46}, der Art der Probe (RNA, DNA, synthetische oder aus enzymatischen Reaktionen hervorgegangene Verbindungen) sowie der Probenvorbereitung (quantitativer Austausch der Alkaliionen gegen Ammoniumionen, Kristallisationsbedingungen etc.). Bei einem Vergleich der publizierten Daten ist daher zu bedenken, daß die jeweiligen Messungen meist unter variierenden Bedingungen mit unterschiedlichen, zum Teil selbst entworfenen und auf die jeweiligen Bedürfnisse optimierten Geräten durchgeführt wurden.

Aufgrund der größeren Stabilität der N-glycosidischen Bindung nimmt die Ionenstabilität während des MALDI-Prozesses in der Reihe Oligothymidinsäuren>RNA>DNA ab, so daß von Anfang an im Vergleich zu DNA längere RNA-Fragmente analysiert werden konnten. Entsprechendes gilt für die Analyse von modifizierten Oligonucleotiden, deren Modifizierung eine Stabilisierung der N-glycosidischen Bindung zur Folge hat (wie z.B. Verbindungen, die 7-Desaza-Purinbasen^{47,59} oder auch 2'-Fluoro-Cytidin¹¹⁰ enthalten).

Ganz allgemein nehmen Empfindlichkeit sowie Massenauflösung und -genauigkeit mit zunehmender Molekülgröße ab. Hierbei spielen mehrere Faktoren zusammen: Der quantitative Austausch von Alkaliionen gegen Ammoniumionen wird mit zunehmender Kettenlänge schwieriger. Kationenheterogenität, Matrix-Addukte und Fragmentierungen, insbesondere Basenverlust, führen zu separaten Signalen, die dem des eigentlichen Molekülions vor- bzw. nachgelagert sind, und bewirken eine Verringerung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Bei längeren Oligonucleotiden können diese einzelnen Peaks aufgrund der mangelnden Geräteauflösung nicht mehr aufgetrennt werden und erscheinen daher als einheitliches Signal.

Im Gegensatz zur Elektrospray-Ionisation, welche die Analyse von Megadalton-DNA erlaubt, ist der mittels MALDI-MS zugängliche Massenbereich für Nucleinsäuren zur Zeit noch begrenzt. Gegenwärtig können Desoxyribonucleinsäuren bis zu einer Länge von 622 nt^{48,49,50} nachgewiesen werden, allerdings mit nur sehr geringen Auflösungen (20-40).

Deutliche Verbesserungen hinsichtlich Massengenauigkeit und Signalintensitäten im niedrigeren Massenbereich (< 50 nt) konnten durch den Einsatz der verzögerten Ionenextraktion (DE: delayed extraction) erzielt werden^{51,52}. Selbst mit DE-MALDI-TOF-MS

werden jedoch bei Standarduntersuchungen lediglich Massengenauigkeiten von 0.1% erreicht (<30 nt: 0.01-0.1%). Die Kombination von MALDI mit FT-MS ist ebenfalls möglich und führt zu einer bedeutend höheren Auflösung und Massengenauigkeit. Aufgrund der gegenüber TOF-MS längeren Meßdauer und der kurzen Lebenszeiten der Molekülonen (Fragmentierung) ist der hier zugängliche Massenbereich jedoch zur Zeit noch auf kleine Oligonucleotide beschränkt (<25 nt)^{53,54}.

Infolge der in den letzten Jahren erzielten Fortschritte auf dem Gebiet der Geräteentwicklung, der Probenvorbereitung sowie der Datenerfassung hat die MALDI-TOF-Massenspektrometrie analog zu ESI-MS breite Anwendungsmöglichkeiten in der Nucleinsäureanalytik gefunden. Neben der Untersuchung von synthetischen oder auch modifizierten Oligonucleotiden^{55,42,56}, RNA⁵⁷, LCR⁵⁸- und PCR^{59,60}-Produkten ist die Analyse von komplexeren Gemischen realisierbar geworden. Fragmentierungen bzw. Addukt-Bildungen führen jedoch mit steigendem Molekulargewicht zu abnehmenden Signalaufösungen und limitieren daher den für diese Anwendung zugänglichen Massenbereich.

2 DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS

Die Möglichkeit, Nucleinsäuren massenspektrometrisch zu analysieren, eröffnete neue Wege in der DNA-Sequenzierung und hatte die Entwicklung verschiedener Sequenzierungsansätze zur Folge. Hierzu zählen die direkte massenspektrometrische Strukturanalyse durch prompte Fragmentierung oder PSD-Analyse, die massenspektrometrische Analyse von Exonuclease-Abbauprodukten sowie die massenspektrometrische Analyse von Sanger-Sequenzierungsprodukten.

2.1 Möglichkeiten und derzeitige Grenzen

Bei der direkten massenspektrometrischen Sequenzierung durch prompte bzw. schnelle Fragmentierung^{61,52} oder PSD-Analyse⁶² (metastabiler Zerfall) werden die in der Gasphase auftretenden DNA-Fragmentierungen für die Sequenzbestimmung genutzt. Eine eindeutige Identifizierung aller Fragmentierungsprodukte setzt jedoch hohe Signalauflösung und Massengenauigkeit voraus, wodurch der für diese Anwendung zugängliche Massenbereich limitiert wird (< 21 nt). Schwierige Reproduzierbarkeit und schlechte Kontrollierbarkeit der Fragmentationbildung, komplexe Spektren und das Auftreten nicht identifizierbarer Fragmentierungsprodukte stellen zusätzliche Probleme dar. Weitere Untersuchungen und

Entwicklungen sind daher notwendig, um diese Verfahren in der DNA-Sequenzierung wirklich nutzen zu können.

Bessere Ergebnisse für die Sequenzierung kleiner Oligonucleotide ermöglicht die MALDI-TOF-Analyse von Exonuclease-Abbauprodukten^{63,42}. Die zeitlich begrenzte Spaltungsreaktion mittels einzelstrangspezifischer Exonucleasen führt zur Bildung von Abbauprodukten, welche sich jeweils um ein Nucleotid unterscheiden (Fragmentleiter). Die Sequenz des entsprechenden Oligonucleotids kann dann, direkt aus dem Spektrum, durch Bestimmung der Massendifferenzen der benachbarten Signale abgelesen werden. Da die Massendifferenz zwischen einer Abspaltung von Thymin (dTMP=304.2 Da) und Adenin (dAMP=313.2 Da) lediglich 9 Da beträgt, ist auch hier eine hohe Massengenauigkeit erforderlich, um eine eindeutige Basenzuordnung zu gewährleisten. Partielle Sequenzanalysen von Oligonucleotiden unterschiedlicher Länge konnten demonstriert werden^{64, 65}.

Breitere Einsatzmöglichkeiten und größere Flexibilität in der Anwendung verspricht die MALDI-TOF-Analyse von Sanger-Sequenzierungsprodukten. Hierbei wird die zeitaufwendige gelelektrophoretische Auftrennung durch die massenspektrometrische Analyse ersetzt (siehe Abb. 3). Da die Sequenzleitern der vier Basen getrennt voneinander vermessen werden, ist die kleinstmögliche Massendifferenz die zweier aufeinanderfolgender, gleicher Basen wie TT, CC etc. (Δm : ca. 300 Da). Aus diesem Grund sind die Anforderungen an Massenauflösung und -genauigkeit weniger hoch als beim vorher beschriebenen Exonuclease-Abbau, der die gesamte Sequenzleiter aller vier Basen in einem Spektrum wiedergibt (Δm A/T: 9 Da). Die Fähigkeit, Massendifferenzen von ca. 300 Da zu bestimmen, ist hier für eine Sequenzanalyse ausreichend, so daß der zugängliche Massenbereich gegenüber den oben beschriebenen Methoden erweitert ist.

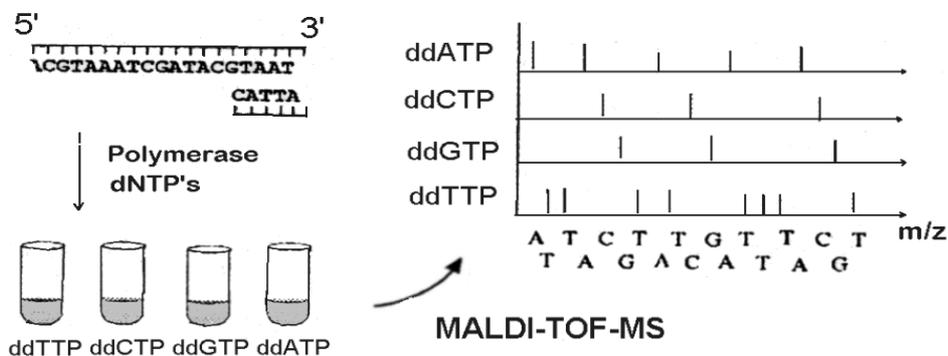


Abb. 3: schematische Darstellung der Sanger-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS

Im Vergleich zur Gelelektrophorese finden bei der MALDI-TOF-Analyse Auftrennung und Identifizierung der Sequenzierungsprodukte in einem Schritt statt und lassen sich innerhalb weniger Minuten anstelle von mehreren Stunden durchführen. Markierungen mittels Fluoreszenz, Radioaktivität etc. sind für eine Identifizierung nicht notwendig. Zudem bietet die direkte Bestimmung der Molekulargewichte der Fragmente (bzw. der Fragmentionen) zusätzliche Informationen über den Ablauf von Sequenzierungsreaktionen. Bei ausreichender Massenauflösung und -genauigkeit können z.B. "falsche" Kettenabbrüche (Einbau eines dNTP's anstelle eines ddNTP's) oder auch unspezifische Kettenabbrüche über die jeweiligen Massen der Fragmente nachgewiesen werden. Ferner entfällt der Zeit- und Kostenaufwand für das Gießen und die Entsorgung des Gels. Hohes Potential für Automatisierbarkeit sowie eine effiziente Datenerfassung und -auswertung stellen zusätzliche Vorteile der MALDI-TOF-Massenspektrometrie dar. Zudem bietet sie die Möglichkeit für eine voll automatisierte Sequenzierung im großen Maßstab. Mehrere hundert oder auch tausend Proben könnten mit Hilfe von Pipettierrobotern auf einem einzelnen Probenträger aufgetragen und innerhalb kürzester Zeit analysiert werden.

Trotz all dieser offensichtlichen Vorzüge sind vor allem im Hinblick auf Empfindlichkeit, Massenauflösung und zugänglichen Massenbereich weitere Verbesserungen und Entwicklungen notwendig, um zur Gelelektrophorese konkurrenzfähig zu sein. Heutige Sequenzierautomaten sind in der Lage, routinemäßig pro Sequenzierungsreaktion 400-1000 Bp zu bestimmen, wobei Substanzmengen im unteren fmol- oder auch oberen attomol-Bereich pro Sequenzierungsprodukt mehr als ausreichend sind. Mittels MALDI-MS lassen sich zwar zur Zeit Nucleinsäuren bis zu einer Länge von 622 nt detektieren, was durchaus mit der Gelelektrophorese vergleichbar und für die heutigen Anwendungen akzeptabel wäre. Allerdings sind Auflösung und Empfindlichkeit in diesem Massenbereich wesentlich geringer als für die Problemstellung erforderlich. Für die Analyse von Sanger-Sequenzierungsprodukten sind Signalaufösungen, die die Bestimmung von Massendifferenzen von ca. 300 Da erlauben, notwendig. Diese Voraussetzung ist zur Zeit jedoch nur für Polynucleotide bis zu einer Länge von ca. 80 nt gegeben. Während bei der Gelelektrophorese kleine und große Fragmente mit nahezu der gleichen Wirksamkeit detektiert werden können, nimmt die Effizienz der Detektion bei der MALDI-TOF-Analyse mit steigendem Molekulargewicht stark ab. Ferner wird die Nachweissensitivität längerer Verbindungen durch die Anwesenheit eines Überschusses kleinerer Oligonucleotide (z.B. Primer) unterdrückt⁶⁶. Obwohl die Detektion von kleineren Oligonucleotiden im unteren fmol-Bereich beschrieben wurde⁶⁷, werden für Standarduntersuchungen typischerweise Substanzmengen im unteren pmol-Bereich eingesetzt. Die üblicherweise bei Sequenzierungsreaktionen anfallenden Analytmengen liegen jedoch im unteren fmol- bzw. amol-Bereich. MALDI-Spektren von synthetischen Oligonucleotidgemischen, die so

konzipiert wurden, daß sie die Produkte einer Sanger-Sequenzierung simulieren, verdeutlichen die bestehende Problematik⁶⁸.

Weiterhin ist zu bedenken, daß im Gegensatz zu synthetischen Gemischen enzymatische Sequenzierungsansätze Pufferbestandteile, mono- und divalente Kationen, Template-DNA sowie einen Überschuß an Primer und Didesoxynucleosidtriphosphaten enthalten, die die MALDI-TOF-Analyse empfindlich stören⁶⁷. Die Entwicklung schneller und effektiver Verfahren zur Probenaufreinigung mit hoher Wiederfindungsrate spielt daher eine ebenso wichtige Rolle wie die Optimierung der Sequenzierungsreaktionen hinsichtlich ihrer Ausbeute.

Trotz der bestehenden Schwierigkeiten konnte innerhalb der letzten drei Jahre in neueren Arbeiten gezeigt werden, daß die Analyse von Sequenzierungsprodukten bis zu einer Länge von ca. 80 nt mittels MALDI-TOF-MS möglich ist^{69,51}. Theoretisch könnte die geringe Leselänge durch den enormen Zeitvorteil und des damit verbundenen höheren Probendurchsatzes einer voll automatisierten, massenspektrometrischen Analyse kompensiert werden. Die derzeitigen Ergebnisse verdeutlichen jedoch, daß die Spektrenqualität selbst in diesem, verglichen zur Gelelektrophorese, niedrigem Massenbereich lediglich für die Identifizierung bekannter Modellsequenzen, nicht aber für die standardmäßige Analyse unbekannter Sequenzen ausreichend ist. Weitere signifikante Fortschritte auf den Gebieten der Probenvorbereitung und -aufreinigung, der gezielten Modifizierung von DNA-Fragmenten (Verbesserung der Desorbierbarkeit/Ionisierbarkeit und/oder der Ionenstabilität der Verbindungen) sowie der Geräte- und Software-Entwicklung sind daher notwendig, damit die MALDI-TOF-MS als echte Alternative zur Gelelektrophorese bei der de novo-Sequenzierung von Genomen eingesetzt werden kann. Die rasanten Fortschritte der letzten 5 Jahre zeigen jedoch, daß ein großes Potential für derartige Entwicklungen vorhanden ist.

Demgegenüber verspricht die Schnelligkeit und Genauigkeit der massenspektrometrischen Analyse kleinerer Verbindungen zusammen mit der Möglichkeit der Automatisierung und parallelen Prozessierung eine hohe Leistungsfähigkeit für die Sequenzanalyse im diagnostischen Bereich.

2.2 Neuere Entwicklungen im diagnostischen Bereich

Aufgrund dieses Potentials wurden innerhalb kürzester Zeit, basierend auf biochemischen Methoden wie PCR^{70,7172}, Sequenz-spezifische Hybridisierung⁷³, Sanger- oder auch Cycle-Sequencing, speziell für die MALDI-TOF-MS ausgerichtete, diagnostische Assays entwickelt,

die äußerst vielversprechend und flexibel in ihrer Anwendung sind. Diese Methoden sind einfach, genau, schnell und kostengünstig mit einem großen Anwendungspotential auf allen Gebieten der genetischen Analyse. Zudem weisen sie eine hohe Anpassungsfähigkeit an die jeweils gegebene Problemstellung auf. So wurde in Anlehnung an das Verfahren der "genetic bit analysis"^{10,11}, das sich sehr gut zum Nachweis von Punktmutationen eignet, der PinPoint Assay⁷⁴ entwickelt.

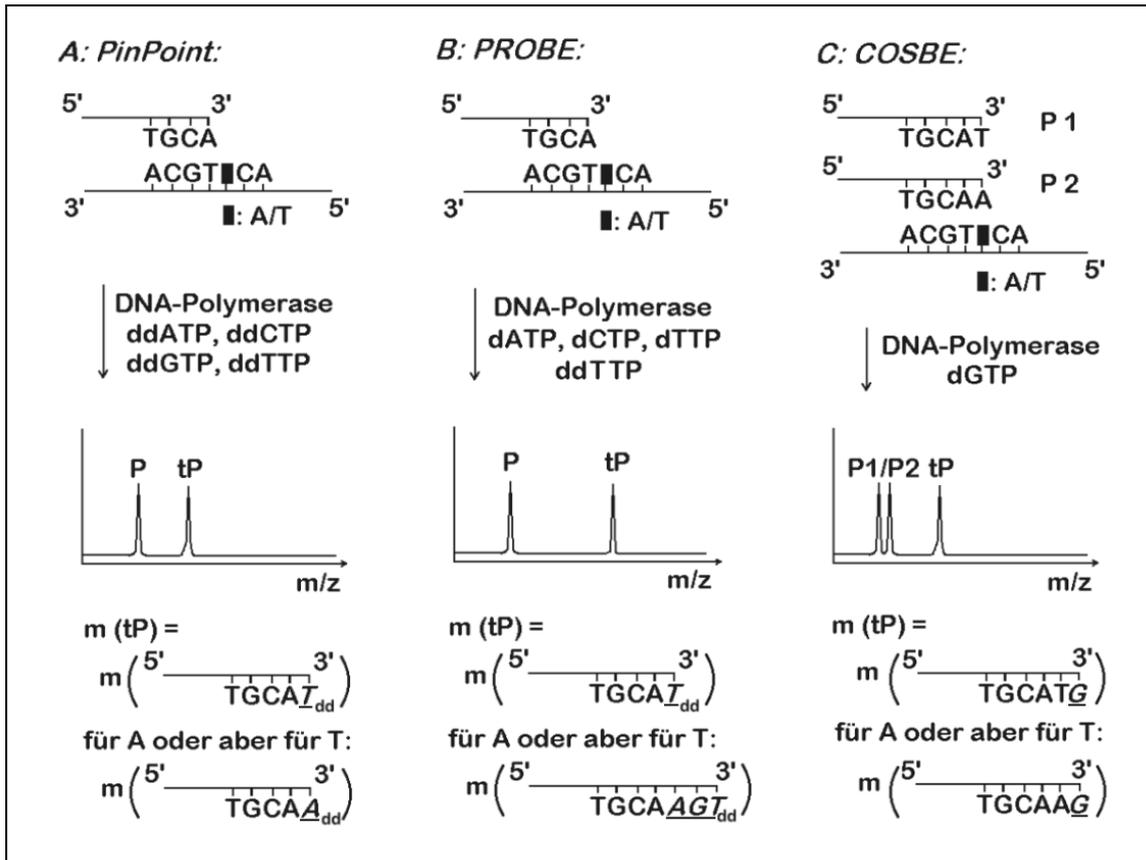


Abb. 4: Schematische Darstellung des PinPoint- PROBE- und COSBE-Assays am Beispiel eines A/T-Polymorphismus'. (■ :Mutationsstelle, P: Primer, tP: terminiertes Produkt und m: Masse) In Abhängigkeit der verwendeten Reaktionsbedingungen und Aufreinigungsmethode werden entweder Primer und terminiertes Produkt oder aber nur das terminierte Produkt bei der MALDI-MS-Analyse detektiert.

Eine flexiblere Variante zu diesem Verfahren stellt der PROBE (primer oligo base extension) Assay dar, der neben dem Nachweis von Punktmutationen auch den Nachweis von Insertionen und Deletionen erlaubt. Hierbei wird dem Primer ein Gemisch aus drei dNTP's und dem ddNTP, das nicht in der Desoxy-Form vorliegt, zugesetzt. Analog zur Sanger-Sequenzierung

wird der Primer durch die DNA-Polymerase verlängert, allerdings nur bis das erste auftretende ddNTP eingebaut wird. Da dieses nur in der Didesoxy- und nicht zusätzlich in der Desoxy-Form vorliegt, können keine Sequenzleitern gebildet werden, und es entsteht ein einheitliches, terminiertes Produkt, dessen Masse durch die Sequenz der Mutationsstelle charakterisiert ist. Während der PinPoint Assay die Primer Extension sofort abbricht und damit nur eine Aussage über das nächst folgende Nucleotid erlaubt, bietet die PROBE Variante über die Möglichkeit den Primer sowie die Zusammensetzung des dNTP/ddNTP-Gemisches auf die jeweilig zu analysierende Sequenz (Mutation) abzustimmen, eine größere Variationsbreite und damit eine höhere Flexibilität in der Anwendung. Zudem beträgt hier die kleinstmögliche auftretende Massendifferenz zwischen den denkbaren Terminationsprodukten mindestens eine Nucleotideinheit (ca. 300 Da gegenüber 9 Da beim PinPoint-Assay), so daß die Anforderungen an Massenauflösung und Genauigkeit weniger hoch sind. Der Einsatz dieses Verfahrens für die Mutationsdetektion^{75,76} und für die Nucleotid-Repeatlängenbestimmung in Mikrosatelliten⁷⁷ konnte vor kurzem beschrieben werden.

Eine etwas andere Möglichkeit für den Nachweis von Punktmutationen, Insertionen und Deletionen stellt der COSBE (competitive oligonucleotide single base extension) Assay dar⁷⁸. Hier werden zwei Primer eingesetzt, deren 3'-terminale Base entweder zur "normalen" oder aber zu der "mutierten" Sequenz komplementär ist. In Gegenwart des zur nächsten Templatebase komplementären Nucleosidtriphosphates (wahlweise dNTP (kostengünstiger) oder ddNTP) wird lediglich der Primer durch die Polymerase verlängert, der "vollständig" hybridisiert, also dessen 3'-terminale Base komplementär zur Mutationsstelle ist. MALDI-MS-Analyse des Produktes gibt Aufschluß über die vorliegende Sequenz.

All diese Verfahren eignen sich für den schnellen Nachweis von zuvor gut charakterisierten Mutationsstellen im großen Maßstab und haben daher hohes Potential für Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, der Genotypisierung, der forensischen Diagnostik etc..

2.3 Mögliche Ansätze zur Multiplex-Sequenzierung diagnostischer Assays

Eine weitere Erhöhung des Probendurchsatzes sowie Verringerung des Arbeits-, Zeit- und Kostenfaktors ließe sich durch den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Mutationsstellen erzielen (Multiplex-Sequencing). Hierbei können theoretisch verschiedene Ansätze verfolgt werden:

a): Mehrere unterschiedliche Mutationen, die sich auf einem oder auch auf verschiedenen Templates befinden, können durch den Einsatz der entsprechenden komplementären Primer

gleichzeitig in einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5).

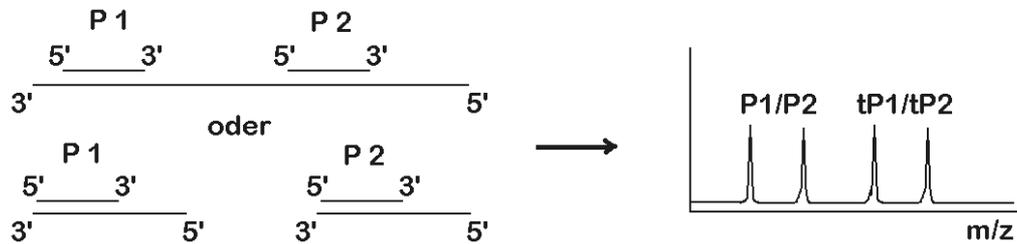


Abb. 5: Schematische Darstellung der gleichzeitigen Sequenzierung unterschiedlicher Mutationsstellen in einem Reaktionsansatz. (P: Primer; tP: terminiertes Produkt)

Damit bei gegebener Auflösung und Genauigkeit des verwendeten Massenspektrometers eine eindeutige Massen- und damit Sequenzzuordnung der unterschiedlichen Fragmente gewährleistet ist, müssen die Massendifferenzen zwischen den einzelnen Komponenten (sowohl der eingesetzten Primer als auch aller möglichen terminierten Produkte) hinreichend groß sein. Dies läßt sich entweder durch Länge bzw. Zusammensetzung (Basensequenz) der jeweiligen Primer erzielen oder aber durch Verwendung von Massenmarkierungen (massenmodifizierenden Gruppen), mit deren Hilfe die Masse des jeweiligen Primers (und damit des jeweiligen Produktes) gezielt verändert und optimiert werden kann.

b): Mehrere gleiche Mutationsstellen des gleichen Templates unterschiedlicher Herkunft (z.B. verschiedene Patienten) können in verschiedenen Reaktionsansätzen sequenziert und einer gemeinsamen, simultanen massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden. Da hier für alle Mutationsstellen die gleiche Primersequenz vorliegt, ist es nicht möglich, die resultierenden Produkte aufgrund der Massendifferenzen unterschiedlicher Primer zu differenzieren und die Sequenzreaktionen in einem Ansatz durchzuführen. Durch den Einsatz genau definierter massenmodifizierender Gruppen lassen sich die entstehenden Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Massenverschiebung eindeutig zuordnen und identifizieren, so daß eine simultane massenspektrometrische Analyse mehrerer Sequenzierungsansätze möglich ist. Hierbei können sowohl der Primer als auch die einzubauenden Desoxy- oder Didesoxynucleosidtriphosphate die Massenmarkierung tragen. Abb. 6 zeigt eine schematische Darstellung für den Einsatz markierter Primer oder ddNTP's:

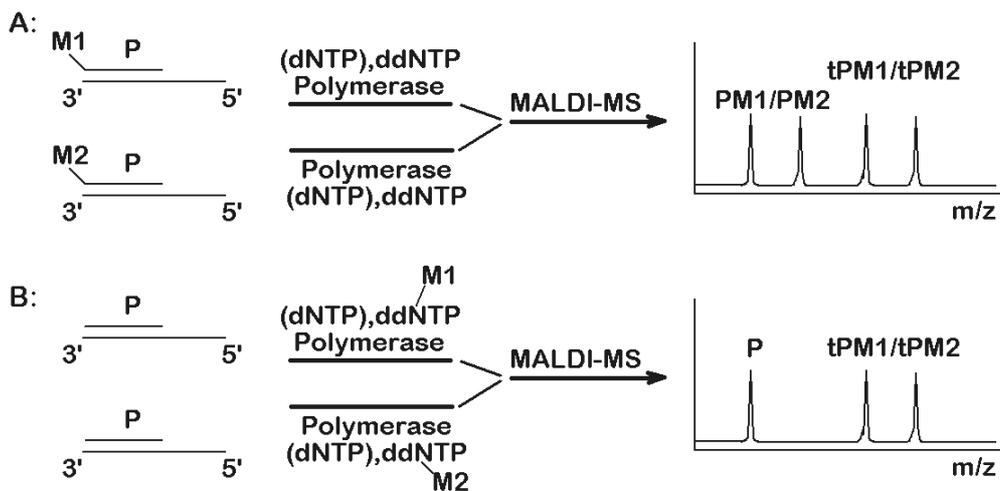


Abb. 6: Schematische Darstellung der simultanen massenspektrometrischen Analyse gleicher Mutationsstellen mittels massenmarkierter Primer (A) oder massenmarkierter Terminatoren (B). (P: Primer, tP: terminiertes Produkt, M: Massenmarkierung)

Bei der Primermarkierung können entweder Primer unterschiedlicher Länge oder aber Primer gleicher Länge mit unterschiedlichen massenmodifizierenden Gruppen zum Einsatz kommen. Während massenmarkierte dNTP's oder auch ddNTP's nicht von jeder Polymerase als Substrat akzeptiert und daher zum Teil schlechter oder gar nicht eingebaut werden, treten hier zumeist keine sterischen Wechselwirkungen auf, so daß die Markierung keinen störenden Einfluß auf die Sequenzierungsreaktion selbst hat.

Der Einsatz massenmarkierter Didesoxynucleosidtriphosphate hingegen erlaubt die Einführung einer genau definierten Massenmodifikation mit dem jeweilig terminierenden ddNTP. Da hier lediglich das Terminationsprodukt die Massenmodifikation trägt, sind die Reaktionsgemische, bei nicht quantitativer Umsetzung des Primers, im Vergleich zur Primermarkierung weniger komplex und daher leichter massenspektrometrisch analysierbar (vgl. Abb. 6: nur ein Signal für den Primer, jedes zusätzliche Signal gibt Information über ein zusätzliches Terminationsprodukt).

Auch der Einbau massenmodifizierter Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) wäre denkbar. Im Gegensatz zur Primer- oder Terminatorenmarkierung ist hier jedoch die Massendifferenz zwischen markiertem und unmarkiertem Produkt sequenzabhängig, was bei unbekanntem Sequenzen zu Schwierigkeiten führen kann. Für den PinPoint Assay, bei dem der Primer lediglich mit dem nächst folgenden ddNTP terminiert wird, scheidet diese Variante ganz aus.

II Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwieweit der Einsatz massenmarkierter Terminatoren für die MALDI-TOF-MS-Analyse von Sequenzierungsprodukten vorteilhaft ist. Zu diesem Zweck sollten massenmodifizierte 2',3'-Dideoxypyrimidinnucleosid-5'-Triphosphate synthetisiert und hinsichtlich ihrer Eignung für die Multiplex-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS untersucht werden.

Für einen möglichen Einsatz dieser Verbindungen bei der Multiplex-Sequenzierung, ist zu berücksichtigen, daß die Wahl der Massen der einzuführenden Markierungen eine entscheidende Rolle spielt. Die Massen der hier darzustellenden markierten Terminatoren müssen so gewählt werden, daß Auflösung und Massengenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers ausreichend sind, um zwischen den einzelnen markierten Terminationsprodukten zu differenzieren und damit eine eindeutige Zuordnung bei der gemeinsamen MS-Analyse zu gewährleisten. Für diagnostische Assays, wo zumeist nur ein terminiertes Produkt entsteht, ist die Masse der Modifikation frei wählbar, sofern die obige Voraussetzung erfüllt wird. Bei der Sanger-Sequenzierung hingegen entstehen mehrere Terminationsprodukte (Sequenzleiter), deren Abstand mindestens eine Nucleotideinheit beträgt. Aus diesem Grund ist die Wahl der Massenmodifikation hier stärker eingeschränkt. Sinnvoll sind Modifikationen, deren Massen innerhalb von 300 Da (ein nt) variieren, so daß eine Überlappung der Massen von unterschiedlich markierten und unmarkierten Terminationsprodukten innerhalb der Sequenzleiter vermieden werden kann. Die Mindest-Massendifferenz der einzelnen Terminatoren ist analog zur Multiplex-Sequenzierung der diagnostischen Assays ausschließlich durch das Auflösungsvermögen und die Massengenauigkeit des verwendeten Gerätes gegeben.

Für eine sinnvolle Auswahl der Massen der Markierungen und eine realistische Einschätzung der Einsatzmöglichkeiten von markierten Terminatoren für die DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS sollte daher, parallel zur Synthese der Verbindungen, Auflösungsvermögen und Empfindlichkeit des hier zur Verfügung stehenden Gerätes für die Analyse von Oligonucleotiden und Oligonucleotidgemischen in unterschiedlichen Massenbereichen untersucht werden.

Folglich gliedert sich die vorliegende Aufgabenstellung in drei Teilbereiche:

- Untersuchungen hinsichtlich Auflösungsvermögen und Empfindlichkeit bei der MALDI-TOF-MS-Analyse von Oligonucleotiden und Oligonucleotidgemischen in unterschiedlichen Massenbereichen.
- Entwicklung eines schnellen und kostengünstigen Syntheseverfahrens zur Darstellung von massenmodifizierten 2',3'-Dideoxypyrimidinnucleosid-5'-Triphosphaten, welches die Einführung einer Vielzahl definierter Massenmodifikationen mit relativ geringem Arbeits-, Kosten- und Zeitaufwand erlaubt.
- Entwicklung eines Modellsystems für Sanger-Sequenzierung und PROBE-Assay mittels MALDI-TOF-MS zur Untersuchung der hier dargestellten Verbindungen hinsichtlich ihrer Eigenschaften als potentielle Terminatoren und ihrer Eignung für die Multiplex-Sequenzierung.

III MALDI-TOF-Analyse von Oligonucleotiden

Für eine realistische Einschätzung des für die Multiplex-Sequenzierung zugänglichen Massenbereiches und für eine sinnvolle Auswahl der Massendifferenzen der darzustellenden Verbindungen sollte im folgenden das Auflösungsvermögen des verwendeten Gerätes für die Analyse von Oligonucleotiden und PCR-Produkten in unterschiedlichen Massenbereichen untersucht werden. Speziell im Hinblick auf die spätere Analyse von Sequenzierungsprodukten mittels MALDI-TOF-MS sollten zudem Empfindlichkeit und Auflösungsvermögen bei der Analyse komplexer Gemische untersucht werden.

1 Optimierung der Geräteparameter und Probenpräparation

Der Erfolg von MALDI-MS-Analysen ist sowohl von den Geräteparametern und der Verwendung von geeigneten Matrices als auch von der Reinheit der Probe und den Kristallisationsbedingungen sehr stark abhängig. Die Gegenwart von Verunreinigungen kann zu schlechter Auflösung, verringerter Signalintensität oder auch zum vollständigen Verlust des Molekülionsignals führen. So hat, wie schon in der Einleitung erwähnt, die Anwesenheit von mono- und divalenten Kationen die Bildung von heterogenen Kationenaddukten zur Folge (Aufspaltung des eigentlichen Molekülions). Verunreinigungen durch viskose Substanzen oder auch zu hohe Salzkonzentrationen beeinträchtigen den Kristallisationsprozeß nachteilig. Andere Verunreinigungen hingegen scheinen die Effektivität der Matrix negativ zu beeinflussen⁷⁹. Einer effizienten und reproduzierbaren Probenaufreinigung und Präparation kommt somit genau wie den Geräteparametern eine wichtige Rolle zu.

Aus diesem Grund wurden zunächst Geräteparameter und Probenvorbereitung optimiert. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sollen jedoch im folgenden Abschnitt nur kurz zusammengefaßt werden:

1.1 Geräteparameter und Probenpräparation

Das hier zur Verfügung stehende Gerät konnte sowohl im linearen (LTOF-MS) als auch im reflektierenden Modus (RTOF-MS) betrieben werden und erlaubte den Nachweis von positiven und negativen Ionen. Spektren wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 30 kV im Linear-Modus und 5 kV im Reflektor-Modus aufgenommen. Bei der Analyse längerer Oligonucleotide ließ sich die Ionenausbeute durch das Anlegen einer

Nachbeschleunigungsspannung von 20 kV beträchtlich erhöhen. Für kleinere Substanzen (< 2000 Da) erwies sich eine Nachbeschleunigung von 5-6 kV als optimal. Ein Vergleich von L-TOF- und RTOF-Spektren der gleichen Oligonucleotide unter gleichen Bedingungen zeigte, daß Spektren die im Reflektor-Modus aufgenommen wurden, sich im unteren Massenbereich durch bessere Auflösung bei vergleichbarer Signalintensität und im oberen Massenbereich durch höhere Empfindlichkeit auszeichneten. Aus diesem Grund wurden die folgenden Spektren hauptsächlich im Reflektor-Modus aufgenommen. Für Standard-Analysen von synthetischen Oligonucleotiden erwiesen sich Substanzmengen von 0.5-5pmol als optimal, wobei bereits Einzelschüsse signifikante Signalintensitäten lieferten.

Als Matrices wurden unterschiedliche Verbindungen sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus getestet. Da vermutet wurde, daß saure Matrices Depurinierungsreaktionen begünstigen und Fragmentierungen, insbesondere Basenverlust, eines der Hauptprobleme bei der MALDI-Analyse von Oligonucleotiden darstellen, wurden neben kleinen aromatischen Säuren auch basische (z.B. 3-Aminochinolin⁸⁰) und neutrale Verbindungen (z.B. Fullerene⁸¹) untersucht. Darunter auch Matrices, die in der Literatur für die Analyse von Peptiden/Proteinen und kleineren Oligonucleotiden^{82,41,42} beschrieben wurden. Keine dieser Verbindungen lieferte jedoch auch nur annähernd vergleichbare Ergebnisse zur Standard-Matrix 3-HPA (3-Hydroxypicolinsäure). In Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten^{83, 84} konnten für diese Matrix sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus gute Ergebnisse erzielt werden. Der pos. Ionenmodus lieferte jedoch wenig bessere Signalintensitäten, so daß alle folgenden Untersuchungen in dieser Betriebsart durchgeführt wurden.

Um Kontaminationen mit allgegenwärtigen Metallkationen wie z.B. Na⁺ oder K⁺ bei den letzten Schritten der Probenpräparation zu vermeiden, werden in der Literatur mehrere Methoden beschrieben, die auf den Austausch der Gegenionen durch Ammoniumionen basieren (NH₃ verdampft während des Desorptions/Ionisationsprozesses^{85,86}). Hierzu gehört der Einsatz von Kationenaustauscher-Beads in der Ammoniumform³⁸, der Einsatz von Nafion^{50,87} oder Nitrocellulose-Membranen^{49,70} oder auch die Zugabe hoher Konzentrationen an Diammoniumhydrogencitrat oder auch -tartrat zur Matrix-Lösung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Zugabe von Diammoniumhydrogencitrat (10%) zur Matrixlösung gute Ergebnisse erzielt werden. Bei kleineren Verbindungen lassen sich Kationenaddukte auf diese Weise vollständig eliminieren (Abb. 7 zeigt ein typisches MALDI-Spektrum als Beispiel). Mit wachsender Kettenlänge (wachsende Anzahl an negativen Ladungen) wird der quantitative Austausch gegen Ammoniumionen jedoch zunehmend schwieriger, so daß sich die Bildung von heterogenen Addukten zwar reduzieren, aber nicht

mehr vollständig vermeiden läßt. Intensität und Verteilung der auftretenden Signale sind dabei neben der Kettenlänge entscheidend von der Reinheit der Proben- bzw. der Matrixlösung und des Probenträgers abhängig. So zeigten bei gleicher Probenpräparation synthetische Oligonucleotide, die von unterschiedlichen Firmen bezogen wurden, zum Teil erhebliche Unterschiede in der Spektrenqualität. Je nach Problemstellung kann hier eine zusätzliche Aufreinigung der Probe über HPLC, Ionenaustauschchromatographie oder durch die Zugabe von wenigen NH_4^+ - beladenen Austauscherbeads zur Probenlösung empfehlenswert sein.

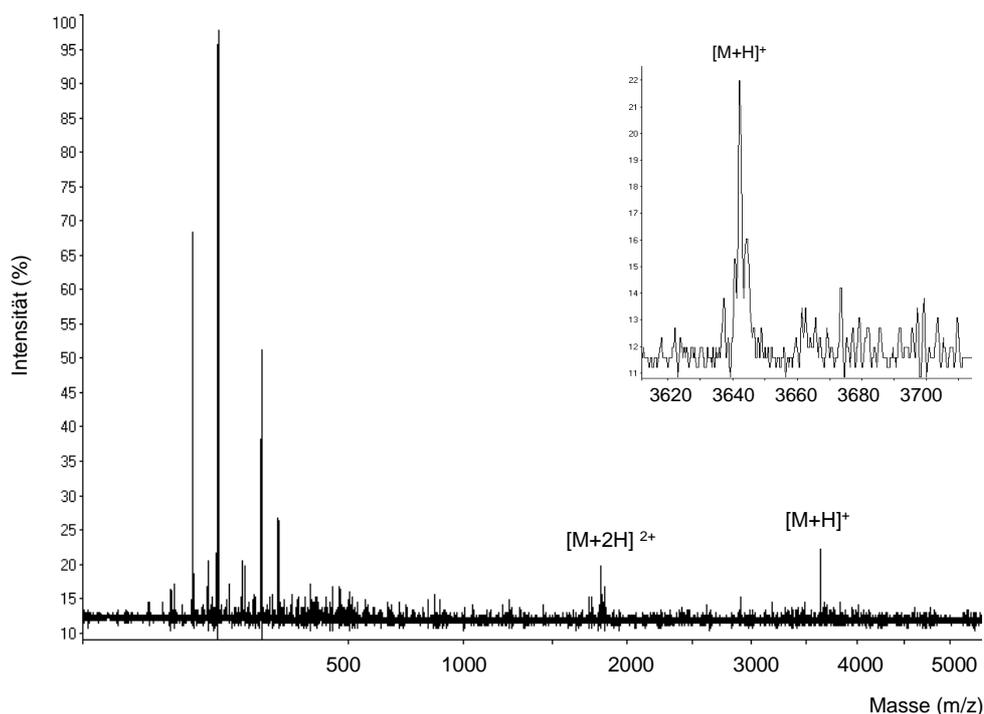


Abb. 7: MALDI-TOF-Spektrum eines 12-mers (Probenpräparation mit Diammoniumhydrogencitrat). Neben dem einfach geladenen Molekülion tritt hier, in geringerer Intensität, ebenfalls das doppelt geladene $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Signal auf. Die Signale im unteren Massenbereich sind ausschließlich der Matrix (hoher Überschuß) bzw. Verunreinigungen zuzuordnen. Heterogene Kationenaddukte (Austausch von H^+ gegen Na^+ (+22Da) oder K^+ (+38 Da)) wurden nicht beobachtet (vgl. Bildausschnitt), können jedoch in diesem Massenbereich bis zur Grundlinie aufgetrennt und eindeutig identifiziert werden.

Die Verwendung von Kationenaustauscherbeads anstelle des Diammoniumhydrogencitrats bei der Probenpräparation führte zu vergleichbaren Ergebnissen, wobei diese Methode jedoch etwas zeit- und arbeitsintensiver ist (Vorbereiten des Ionenaustauschers; Entsalzen der

Matrixlösung; Zugabe bzw. Entfernen der Beads bei jeder einzelnen Probe etc.). Der Einsatz von NC-Membranen zeigte, daß diese sich in Lösungen von 50% Acetonitril/ 50% Wasser (v/v) (Matrixlösung) infolge des hohen Anteils an Acetonitril auflösen. Deshalb wurde für diese Untersuchungen 3-HPA in 30% Acetonitril/ 70% Wasser gelöst. Die Ergebnisse waren jedoch wenig reproduzierbar. Untersuchungen mit Nafion-Schichten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Ähnlich wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) bildet auch 3-HPA heterogene Matrix-Probenkristalle aus, die eine schlechte Reproduzierbarkeit der MALDI-Messungen zur Folge haben. Bei der Standardprobenpräparation werden Probenlösung und Matrixlösung auf dem Probenträger vermischt und bei Raumtemperatur auskristallisiert. Aufgrund des nicht steuerbaren Kristallisationsprozesses und der für 3-HPA typischen Heterogenität des Matrix-Probenkristallisats ist die Reproduzierbarkeit von Einzelmessungen jedoch sehr gering; und zwar sowohl von Probe zu Probe als auch innerhalb der gleichen Probe von Stelle zu Stelle und von Laserschuß zu Laserschuß (gleiche Probenstelle). Nur sehr wenige Matrices (z.B. 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure) bilden ein homogenes Kristallisat mit mikroskopisch kleinen, gleichmäßigen Kristallen aus, das für eine gute Gesamt-Reproduzierbarkeit notwendig wäre⁸⁸. Bei der Mehrzahl der Verbindungen können nur aus ausgewählten kristallinen Bereichen der Probe gute Ergebnisse erzielt werden. Das Suchen nach einem "sweet spot" ist dabei zeit- und arbeitsaufwendig und erschwert zudem die Automatisierung bei der Spektrenaufnahme. Auch quantitative Bestimmungen sind infolge der schlechten Reproduzierbarkeit von Einzelmessungen in der Regel nicht möglich.

1.2 Sprühpräparation

Mit dem Ziel, dünne Schichten homogener Matrix-Probenkristallisate zu erzeugen und dadurch die Reproduzierbarkeit der Signale zu erhöhen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. R. Woisch (Universität Oldenburg) eine von ihm entwickelte Sprühapparatur für die Probenpräparation getestet. Ähnlich wie bei der "thin layer"-Technik⁸⁹ werden auch hier Matrix und Probe getrennt aufgetragen:

Mit Hilfe eines genau regulierbaren Gasstromes wird zunächst die Matrixlösung (0.5-1 μ l) unter Druck durch eine Kapillare fein auf den Probenträger versprüht. Bei optimalen Sprüheinstellungen, die hauptsächlich auf das verwendete Lösungsmittel abgestimmt werden müssen, entstehen sehr feine, kleine, gleichmäßige Tröpfchen. Aufgrund der großen Oberfläche und des kontinuierlichen Gasstromes verdampft das Lösungsmittel sehr schnell, so

daß beim "Erreichen" des Probenträgers die Matrix innerhalb dieser feinen Tröpfchen sofort als Feststoff vorliegt. Im Idealfall wird so eine dünne, homogene Schicht aus sehr kleinen, gleichmäßigen Matrixkristallen erzeugt, auf die dann die Probenlösung nach dem gleichen Verfahren aufgesprüht werden kann. Das Resultat ist die Bildung eines mikrokristallinen Matrix-Proben-Gemisches, welches bei der anschließenden MALDI-Analyse aufgrund der gleichmäßigen, homogenen Oberfläche eine gute Gesamt-Reproduzierbarkeit der Signale aufweisen sollte.

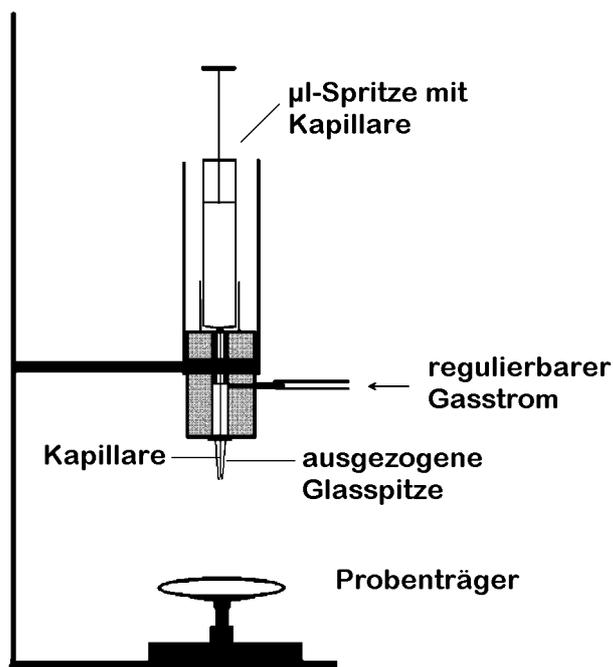


Abb. 8: Schematische Darstellung der verwendeten Sprühhapparatur

Der Erfolg dieser Präparationstechnik hängt jedoch entscheidend von den Geräteparametern ab. Diese wurden bei der hier verwendeten Apparatur zum größten Teil manuell eingestellt und waren aus diesem Grunde schlecht reproduzierbar. So wird z.B. die Schichtdicke durch die Sprühdauer und eine gleichzeitige, gleichmäßige Bewegung des Probenträgers festgelegt. Tröpfchengröße und -geschwindigkeit beeinflussen entscheidend die Größe und Form der entstehenden Kristalle und sind von vielen Faktoren abhängig. Hierzu gehören unter anderem das verwendete Lösungsmittel (leicht flüchtige Substanzen sind besser geeignet), der Abstand zwischen Probenträger und

Kapillare, der Gasstrom, die Position der Kapillare innerhalb der Glasspitze, Länge und Durchmesser der Kapillare sowie der Druck, mit dem die Lösung durch die Kapillare gedrückt wird. Da das Röhrchen für die Glasspitze "per Hand" ausgezogen wurde, war es schwierig, den Durchmesser gezielt zu optimieren. Der "Druck" der benötigt wird, damit die Lösung durch die Kapillare fließt, wurde mittels einer GC-Spritze manuell erzeugt, was ebenfalls das Auffinden und Optimieren reproduzierbarer Sprühbedingungen erschwerte.

Gute Sprühbedingungen konnten für die MALDI-Analyse von Ligninen sowohl mit DHB als auch mit 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure als Matrix gefunden werden. Hierbei ist zu beachten, daß 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure auch bei Standard-Präparationen mikrokristalline,

homogene Kristallisate ausbildet, die eine gute Reproduzierbarkeit von Einzelmessungen zur Folge haben. DHB hingegen bildet typischerweise heterogene, ringförmig angeordnete Kristallnadeln aus. Für beide Verbindungen konnten hier mit Hilfe des Sprühverfahrens homogene, mikrokristalline Oberflächen erzeugt werden, die eine äußerst gute Reproduzierbarkeit von Laserschuß zu Laserschuß (shot-to-shot) über die gesamte Probenoberfläche aufwiesen. Auflösungsvermögen und Signalintensitäten waren dabei vergleichbar mit den Signalen, die mittels Standardprobenpräparation aus ausgewählten kristallinen Bereichen erzielt werden konnten. Um eine homogene Oberfläche zu gewährleisten, wurde versucht, die Schichtdicke möglichst gleichmäßig und gering zu halten. Ein bis zwei Laserschüsse reichten daher zumeist aus, um das Matrix-Probengemisch an *einer* Probenstelle vollständig zu desorbieren/ionisieren. Infolge der hohen Reproduzierbarkeit über die gesamte Probenoberfläche und der mit Standardpräparationen vergleichbaren Signalgüte sind für die Spektrenaufnahme nur sehr wenige Einzelschüsse erforderlich (Kein Suchen nach einem "sweet-spot"). Daher wäre es durchaus denkbar, durch eine Verkleinerung der Apparatur mit sehr viel geringeren Mengen an Matrix- bzw. Probenlösung (unterer nl-Bereich) vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Demgegenüber konnten für die Analyse von Oligonucleotiden mittels 3-HPA (10% Diammoniumhydrogencitrat) keine Sprühbedingungen gefunden werden, bei denen die Spektrenqualität vergleichbar zur Standardpräparation gewesen wäre. Obwohl es gelang, die Bedingungen so zu wählen, daß anstelle der für 3-HPA typischen Kristallnadeln eine homogene Schicht kleiner, gleichmäßiger Matrixkristalle gebildet wurde, entstand nach dem Aufsprühen der Probe zumeist ein "festes" Proben-Matrix-Gemisch, aus dem auch mit hohen Laserenergien keine Desorption/Ionisation der Probenmoleküle möglich war. Wurde die Matrix ohne Zusatz von Diammoniumhydrogencitrat verwendet, so konnten kleinere Oligonucleotide bis zum 6-mer detektiert werden. Trotz relativ guter spot-to-spot Reproduzierbarkeit war die Spektrenqualität selbst sehr schlecht. Geringe Signalintensitäten und Peakverteilungen infolge von Kationenheterogenität konnten beobachtet werden. Dabei ist zu bedenken, daß die hier verwendeten Glasgeräte (GC-Spritze, Glasspitze) zusätzliche Kontaminationsquellen für Natrium- und Kalium-Ionen bei den letzten Schritten der Probenvorbereitung darstellen. Da die Sprühbedingungen so gewählt werden, daß die Verbindungen sofort auskristallisieren, wenn sie die Oberfläche des Probenträgers erreichen, ist die Behandlung mit Kationenaustauscherbeads oder auch der Einsatz von Nafion-Schichten hier nicht möglich bzw. wenig effektiv. Eine Verminderung der Kationenaddukte läßt sich somit lediglich durch die Verwendung anderer Materialien und durch Zusatz von Diammoniumhydrogencitrat, und zwar sowohl zur Matrix- als auch zur Probenlösung, erreichen. Die Anwesenheit des Ammoniumsalzes beeinträchtigte jedoch die Kristallisation,

so daß für diese Lösungen keine geeigneten Sprühbedingungen gefunden werden konnten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Sprühverfahren eine effiziente Methode darstellen kann, um die Gesamt-Reproduzierbarkeit bei der MALDI-Analyse und damit auch die Schnelligkeit und mögliche Automatisierbarkeit der Spektrenaufnahme erheblich zu verbessern; speziell für Matrices, die heterogene Matrix-Proben-Kristallisate ausbilden. Die Schwierigkeit dieser Technik liegt jedoch im Auffinden geeigneter und reproduzierbarer Sprühbedingungen. Diese müssen auf die jeweilige Problemstellung bzw. auf die jeweilig benötigten Matrix- und Probenlösungen angepaßt werden und sind somit nicht standardisierbar.

2 Analyse einzelsträngiger, synthetischer Oligonucleotide

Das Auflösungsvermögen, und damit auch die Massengenauigkeit und Empfindlichkeit, wird neben den instrumentellen Parametern entscheidend von der natürlich auftretenden Isotopenverteilung, der Bildung von heterogenen Kationen- oder auch Matrixaddukten sowie den auftretenden Fragmentierungen limitiert. Ausreichende instrumentelle Auflösung hat zur Folge, daß diese Signale voneinander getrennt detektiert werden können und somit lediglich zu einer Verringerung der Signalintensität des eigentlichen Molekülions, nicht aber zu einer Peakverbreiterung (schlechtere Gesamtauflösung) führen. Die folgenden Ergebnisse zeigen, in welchen Massenbereichen diese Signale unter Standardbedingungen noch ausreichend aufgelöst und identifiziert werden können.

Für die hier abgebildeten Spektren wurden Polythymidinsäuren mit einer Länge bis zu 100 nt und Oligonucleotide, die in ihrer Länge zwischen 7 und 50 nt variieren, eingesetzt. Tab. 1 gibt einen Überblick über die jeweiligen Massen und Sequenzen:

Tab. 1: Sequenzen und berechnete Massen (Durchschnittsmolekulargewichte) der hier verwendeten Oligonucleotide

	Sequenz	$[M+H]^+$ _{ber.}
7-mer	5'-TAACGGT-3'	2121.4
10-mer	5'-TAACGGTCAT-3'	3028.0
11-mer	5'-TAACGGTCATT-3'	3332.2
19-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCAT-3'	5788.8
20-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATT-3'	6093.0
24-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACT-3'	7328.8
26-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGT-3'	7962.2
33-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGTAGGACCT-3'	10129.6
37-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGTAGGACCTGCAT-3'	11365.4
38-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGTAGGACCTGCATT-3'	11669.6
42-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGTAGGACCTGCATTACAT-3'	12889.4
46-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGTAGGACCTGCATTACATGACT-3'	14125.2
50-mer	5'-TAACGGTCATTACGGCCATTGACTGTAGGACCTGCATTACATGACTAGCT-3'	15361.0

2.1 Isotopenauflösung

Aufgrund der hohen Häufigkeiten von ^{12}C (98.9%), ^1H (99.99%), ^{16}O (99.76%) und ^{14}N (99.63%) spielt die natürliche Isotopenverteilung dieser Elemente bei massenspektrometrischen Bestimmungen im niedermolekularen Bereich kaum eine Rolle. Hier wird hauptsächlich das Monoisotopensignal der Verbindung detektiert. Mit steigender Molekülgröße nimmt jedoch der Einfluß von Isotopen geringerer Häufigkeit zu, so daß die Massenspektren infolge der natürlichen Isotopenhäufigkeiten eine breitere Signalverteilung aufweisen. Abb. 9 verdeutlicht die Problematik anhand zweier simulierter Spektren, die die berechneten Isotopenverteilungen des in Tab. 1 aufgeführten 7- bzw. 50-mers wiedergeben:

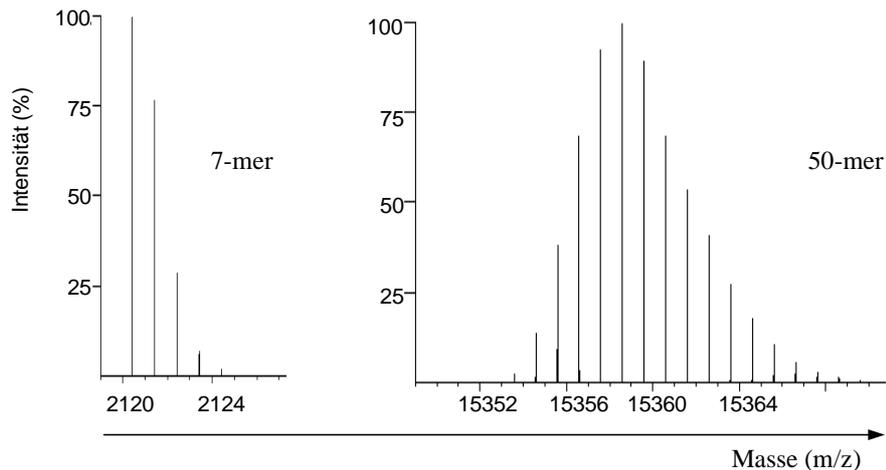
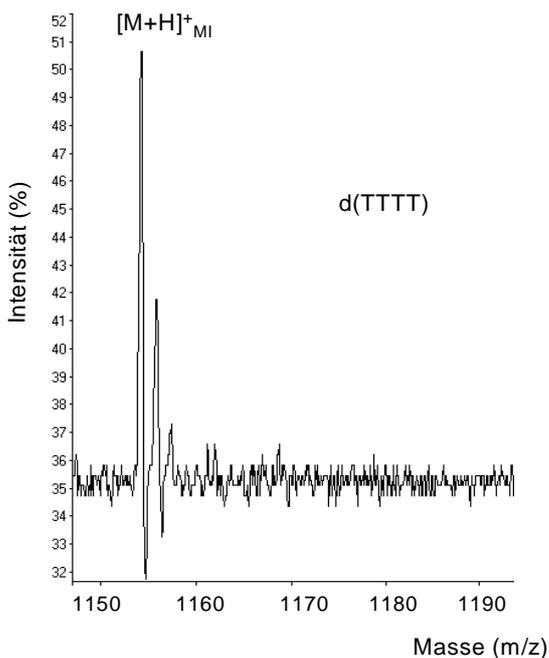


Abb. 9: Einfluß der Isotopenhäufigkeiten (C, H, N und O) auf die Signalverteilung im Massen-spektrum bei steigendem Molekulargewicht anhand simulierter Spektren des 7- u. 50-mers¹.



Während im Linear-Modus, aufgrund der kurzen Flugzeiten und der nicht korrigierten Energieverteilung, auch für kleine Oligonucleotide keine Isotopenauflösung erzielt werden konnte, erlaubte die Spektrenaufnahme im Reflektor-Modus Grundlinien-trennung der Isotopensignale von 4- und 5-meren (d(TTTT) und d(TAGCT)) (vgl. Abb. 10). Obwohl die Qualität der Spektren aufgrund der Heterogenität des Matrix-Proben-Kristallisats von Laserschuß zu Laserschuß schwankt,

Abb. 10: Ausschnitt eines MALDI-RTOF-Spektrums zeigt Isotopenauflösung eines 4-mers. Substanzmenge: 5pmol, Beschleunigungs- und Nachbeschleunigungsspannung: 5kV. mit $[M+H]^+_{MI}$ = relative Isotopenmasse des Moleküliions

¹ Simulationsprogramm: Isopro (Isotopic abundance simulator), v. 2.0, PC-Version by Senko, M. W.; Department of chemistry, Cornell University, Ithaca, NY 14853

sind in diesem Massenbereich Signale mit Isotopenauflösung relativ gut reproduzierbar. Auffallend ist, daß die Intensitäten der Signale untereinander von Schuß zu Schuß durchaus variieren können, so daß in einzelnen Spektren nicht immer das berechnete Isotopenverhältnis wiedergegeben wird. Im Routinebetrieb lassen sich in diesem Massenbereich Auflösungen um die 3000 erzielen. Durch Herabsetzen der Beschleunigungsspannung von 5 auf 3 kV konnten für das 4-mer (1155.2 Da) in Einzelmessungen Auflösungen bis zu 4000 erreicht werden. Allerdings ist die Schuß-zu-Schuß-Reproduzierbarkeit bei derart niedrigen Beschleunigungsspannungen sehr viel schlechter, so daß für Standarduntersuchungen stets Beschleunigungsspannungen von 5 kV verwendet wurden.

Demgegenüber ließen sich bei der Analyse von Oligonucleotiden mit einer Länge von 7 nt die Signale der einzelnen Isotope zwar noch eindeutig zuordnen, aber in der Regel nicht mehr bis zur Grundlinie auflösen (vgl. Abb. 11).

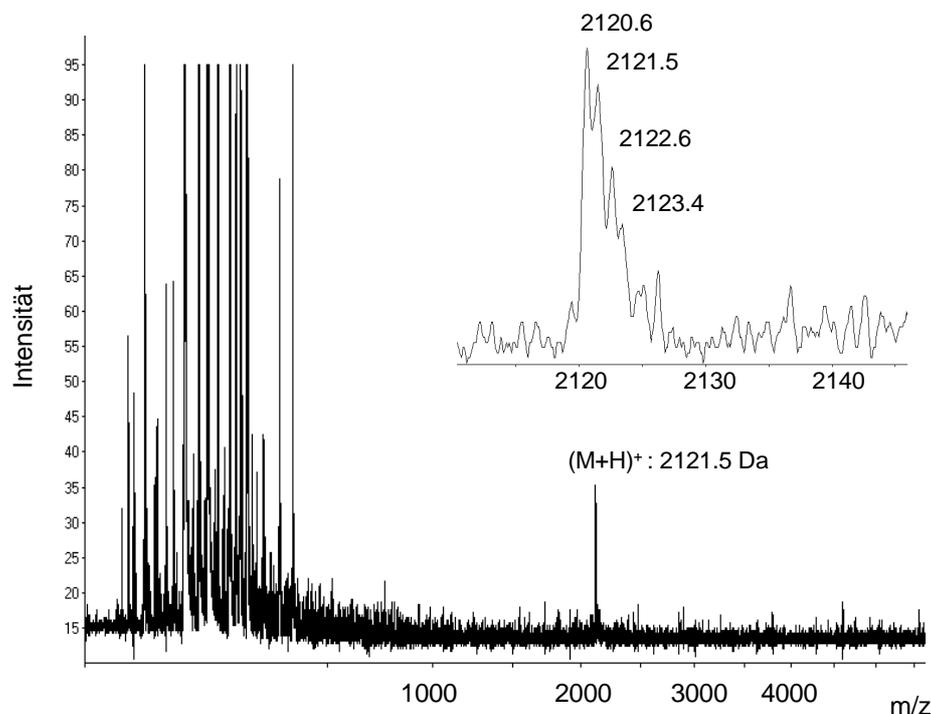


Abb. 11: MALDI-TOF-Spektrum eines 7-mers. (Substanzmenge: 5 pmol). Ausschnitt des Spektrums zeigt die Vergrößerung des Molekülionensignals. Isotopensignale lassen sich nicht mehr bis zur Grundlinie auftrennen. Peakbreite bei halber Höhe des Maximums: 1.71 Da (Auflösung: 1240). $(M+H)^+$: exp. ermittelte relative Durchschnittsmasse des Molekülions (berechnet: 2121.4 Da). Der Bildausschnitt dagegen zeigt die exp. ermittelten Isotopenmassen (Monoisotopensignal berechnet: 2120.4 Da).

Die resultierende Peakverbreiterung bei halber Signalhöhe hat eine entsprechend schlechtere Auflösung zur Folge ($m/\Delta m_{7\text{-mer}}$: 1240 Da). Sowohl die Masse des Monoisotopensignals (relative Isotopenmasse) als auch das Durchschnittsmolekulargewicht (mittlere relative oder auch chemische Masse) konnten hier mit guter Genauigkeit bestimmt werden ($([M+H]^+_{\text{MI}})$: berechnet: 2140.4 Da, experimentell: 2120.6 Da; $[M+H]^+_{\text{D}}$: ber.: 2121.4, exp.: 2121.5 Da).

2.2 Kationenaddukte und Fragmentierungen

Abb. 12 demonstriert das Auflösungsvermögen des hier verwendeten Gerätes in bezug auf Kationenadduktbildung und Fragmentierungen am Beispiel eines 10- 20- und 50-mers. (Sequenzen und Massen der Verbindungen sind in Tab. 1, S.24 aufgeführt.) Ein Vergleich der Spektrenausschnitte, die jeweils Massenfenster von 3000 Da zeigen, verdeutlicht die Signalverbreiterung mit zunehmendem Molekulargewicht. Sowohl instrumentelle Faktoren wie z.B. unterschiedliche Startzeiten der Ionen, Fluktuation in der Energie des Laserstrahls oder die Bildung von Sekundärionen und -elektronen an der Nachbeschleunigungsdynode als auch nicht aufgelöste Signale der natürlichen Isotopenverteilung, Heterogenität im Gegenkation und Fragmentierungen sind hierfür verantwortlich.

Beides, Kationenaddukte und (prompte) Fragmentierungen konnten im unteren Massenbereich gut aufgelöst und aufgrund ihrer Massendifferenz zum eigentlichen Molekülion identifiziert werden. Die beobachteten Fragmentierungen lassen sich dabei hauptsächlich auf den Verlust einer oder mehrerer Basen zurückführen (G: 151 Da, A: 135 Da, C: 111 Da oder T: 125 Da), wobei die Eliminierung von G am häufigsten auftritt. Spaltung des Desoxyribosephosphat-Gerüsts wurde im allgemeinen nicht beobachtet. Zusätzlich zum Basenverlust läßt sich in einigen Spektren ein Massenverlust von 18 Da nachweisen, der wahrscheinlich auf der Eliminierung eines Wassermoleküls vom 3'-oder 5'-Ende des Molekülions basiert.

Mit steigendem Molekulargewicht sind höhere Laserenergien erforderlich, um die Probe zu desorbieren/ionisieren. Zudem nimmt die Ionenstabilität mit zunehmender Kettenlänge stark ab, was im höheren Massenbereich zu einem deutlichen Anstieg der Fragmentationen führt. Wie Abb. 12a) zeigt, lassen sich schon für Oligonucleotide mit einer Länge von 10 nt in Einzelmessungen Fragmentationen und Kationenaddukte nachweisen. Unter optimierten Bedingungen treten diese in diesem Massenbereich jedoch relativ selten auf. Demgegenüber stellt bei der Analyse eines 20-mers das Auftreten von Fragmentationen die Regel dar, und zwar selbst bei guter Kristallisation und niedriger Laserenergie (Schwellenbestrahlungsenergie). Sowohl einfacher als auch zweifacher Basenverlust läßt sich hier reproduzierbar nachweisen (vgl. Abb. 12b). Das Ausmaß der Fragmentierungen ist dabei neben der Probe und

III. MALDI-TOF-Analyse von Oligonucleotiden

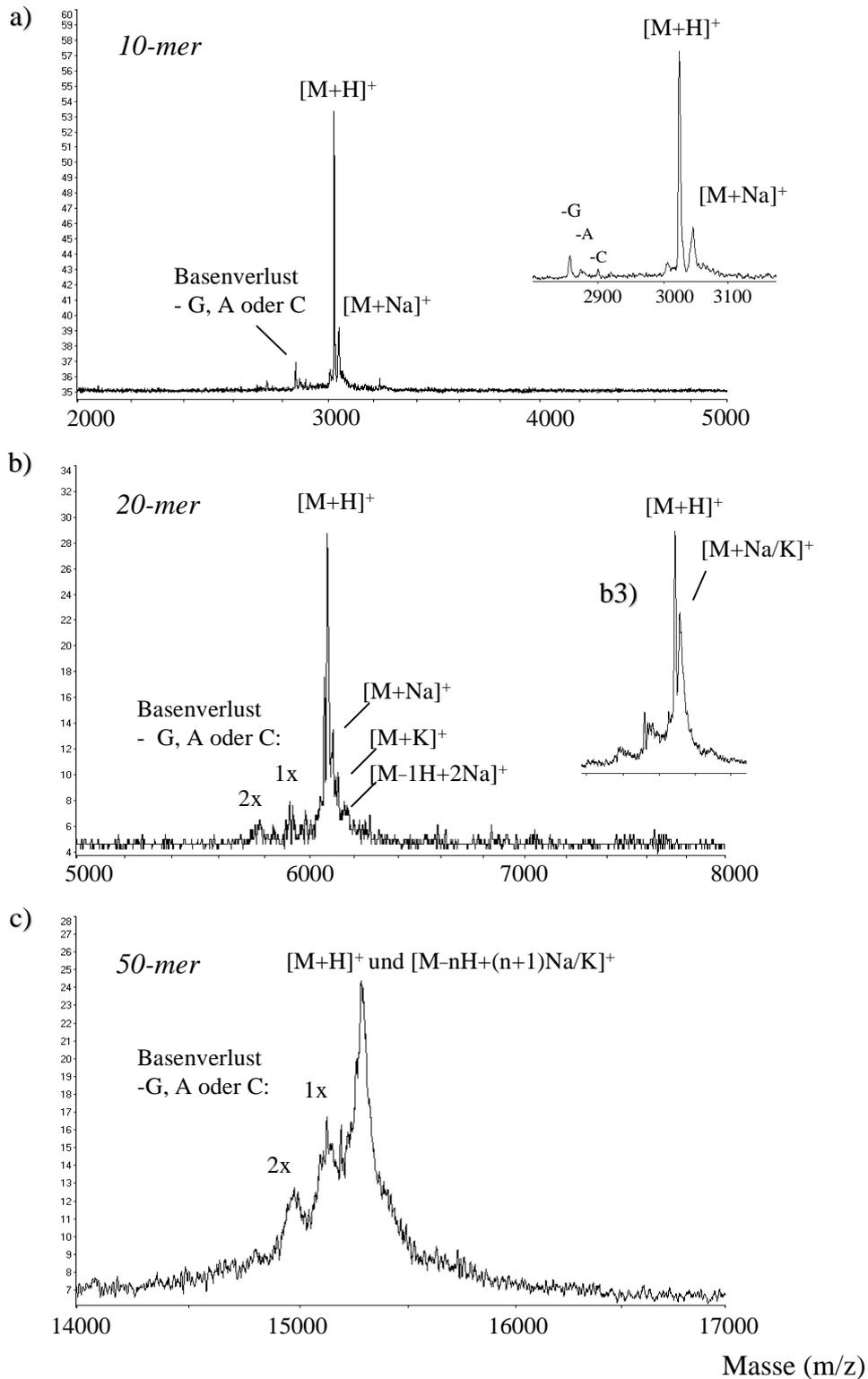


Abb. 12 a), b) und c): MALDI-RTOF-Spektren eines 10-, 20- und 50-mers (je 5 pmol).
 b) 20-mer, b3): wenig höhere Na/K-Kontamination: Na/K-Addukte können untereinander nicht mehr aufgelöst werden.

Probenvorbereitung stark vom jeweiligen Proben-Matrix-Kristallinat und der für die Desorption/Ionisation erforderlichen Laserenergie abhängig.

Während beim 10-mer (~ 3000 Da) Signale mit Massendifferenzen von ca. 20 Da routinemäßig bis zur Grundlinie aufgetrennt werden können (Δm : G/A: 16 Da; A/C: 24 Da; $[M+H]^+ / [M+Na]^+$: 22 Da), ist das im Massenbereich von 6000 Da (20-mer) schon nicht mehr möglich. Signale des Molekülions und der Natrium- und Kalium-Addukte lassen sich hier nur noch unter optimalen Bedingungen auftrennen und identifizieren (s. b)). Bei höherer

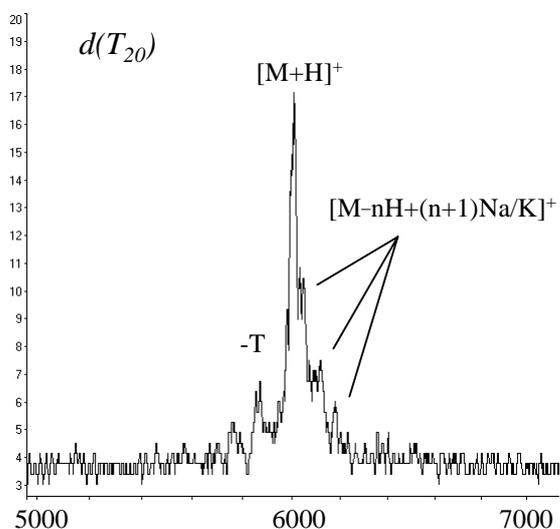


Abb. 13: Ausschnitt aus einem MALDI-TOF-Spektrum von $d(T_{20})$ demonstriert das Auftreten eines Fragmentions infolge der Abspaltung von Thymin

Wie aus den Spektren hervorgeht, tritt die Abspaltung von G am häufigsten auf, gefolgt von der Eliminierung von A und C. Die Abspaltung von T konnte beim 10-mer nicht detektiert und beim 20-mer nicht eindeutig zugewiesen werden. MALDI-Analysen von Polythymidin-säuren demonstrierten jedoch, daß ab Kettenlängen von ca. 20 nt ebenfalls die Abspaltung von Thymin nachzuweisen ist, wenn auch nur in geringer Intensität (s. Abb. 13). Zudem wiesen die Spektren von Polythymidinsäuren unter gleichen Bedingungen der Probenpräparation, intensivere Signale der Kationenadduktbildung auf als Spektren gemischter Oligonucleotide vergleichbarer Kettenlänge (Spektren hier nicht abgebildet). Diese Beobachtung wird auch in der Literatur beschrieben und läßt vermuten, daß $d(T_n)$ -Verbindungen verstärkt zur Bildung heterogener Kationenaddukte neigen¹⁰⁹.

Laserenergie oder auch wenig höheren Addukt-Intensitäten (vgl. b2)) lassen sich zwar Metallkationenaddukte und Molekülion getrennt voneinander darstellen (Δm : 22 Da), die einzelnen Addukte können jedoch untereinander nicht mehr aufgelöst werden (Δm Na/K: 16 Da oder K/2Na: 6 Da). Ähnlich sieht es für die unterschiedlichen Fragmentionen aus. Eliminierung von G, A oder C führt zu Signalen mit relativ kleinen Massendifferenzen (16-24 Da), die in diesem Massenbereich nur noch unter optimalen Bedingungen zugeordnet werden können.

Wie aus den Spektren hervorgeht, tritt die Abspaltung von G am

Wie Abb. 12c) demonstriert, können bei der Analyse des 50-mers Fragmentionen, die der Eliminierung einer oder zweier Basen entstammen, zwar noch unterschieden, aber nicht mehr bis zur Grundlinie aufgelöst werden ($\Delta m > 100$ Da). Zudem ist es in diesem Massenbereich nicht mehr möglich, das Signal des Molekülions und die der heterogenen Kationenaddukte aufzutrennen. Die resultierende Peakverbreiterung des Molekülions hat eine schlechtere Gesamtauflösung zur Folge und trägt dazu bei, daß bei der Analyse von Gemischen Signale von Verbindungen ähnlicher Masse sich überlagern und somit nicht mehr identifiziert werden können. Mit steigendem Molekulargewicht können daher immer größere Massendifferenzen nicht mehr aufgelöst werden (7-mer: Isotopenauflösung; 20-mer: Auflösung von Massendifferenzen von ≥ 22 Da; 50-mer: $\Delta m = \sim 100$ Da gut auflösbar).

Zudem nimmt, neben der Empfindlichkeit auch die Massengenauigkeit ab. Während im unteren Massenbereich standardmäßig Auflösungen von ~ 3000 und Massengenauigkeiten bis zu 0.01% erzielt werden können, lassen sich bei der Analyse des 50-mers (~ 15 kDa) lediglich Genauigkeiten bis zu 0.1% bei Auflösungen um die 200 erreichen. Zwar sind in Einzelmessungen bessere Ergebnisse möglich, stellen aber nicht die Regel dar.

2.3 Analyse von Gemischen synthetischer Oligonucleotide

Im Hinblick auf den möglichen Einsatz massenmarkierter Terminatoren für die Sanger-Sequenzierung mittels MALDI-MS wurden Auflösungsvermögen und Empfindlichkeit bei der Analyse von Gemischen untersucht. Um eine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Oligonucleotide im Matrix-Proben-Kristallinat zu gewährleisten, wurde zunächst eine gut durchmischte Stammlösung des jeweiligen Oligonucleotidgemisches hergestellt. Untersuchungen hinsichtlich der Empfindlichkeit erfolgten mittels einer Verdünnungsreihe dieser Stammlösungen. Im Vergleich zur Analyse einzelner Oligonucleotide läßt sich ganz allgemein feststellen, daß Auflösungsvermögen und Empfindlichkeit mit zunehmender Komplexität des Gemisches leicht abnehmen. Hierfür sind mehrere Faktoren verantwortlich:

Obwohl bei MALDI-Analysen von Oligonucleotiden hauptsächlich intensive Signale des einfach geladenen Molekülions auftreten, können dennoch in geringerer Intensität zusätzliche Signale höhergeladener Molekülionen und einfach geladener Molekülionencluster (Dimere, Trimere etc.) gebildet werden. Bei der Analyse einzelner Verbindungen spielen diese Signale für die genaue Massenzuweisung des einfach geladenen Molekülions keine Rolle. Sie können jedoch zu Problemen führen, wenn sie bei der Analyse von Gemischen ähnliche Massen wie die anderer Analytionen aufweisen. Bei mangelnder Auflösung ist dann eine

Peakverbreiterung des zu analysierenden Moleküls und, in Abhängigkeit der jeweiligen Signalintensitäten, eine verminderte Genauigkeit bei der Massenbestimmung die Folge (vgl. Peak 3 und 4 in Abb. 14). Auftreten, Ausmaß und Intensität dieser Signale sind dabei von mehreren Faktoren abhängig und nicht vorhersagbar. Abb. 14 zeigt ein Beispiel für das Auftreten dieser Signale und deren Auswirkungen bei der Analyse von Gemischen.

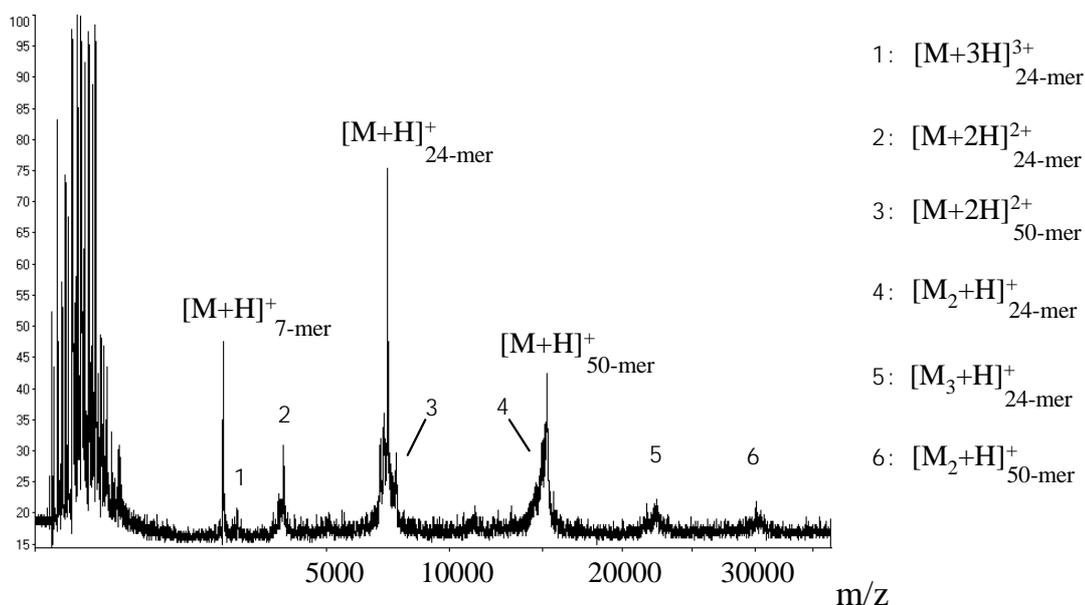


Abb. 14: MALDI-TOF-Spektrum eines Oligonucleotidgemisches (7-mer: 0.5 pmol; 24-mer und 50-mer: je 1 pmol). Massen und Sequenzen der Moleküle sind in Tab. 1, S. 24 wiedergegeben.

Neben den einfach geladenen Molekülen des 7-, 24- und 50-mers treten doppelt und dreifach geladene Moleküle sowie Di- und Trimere auf. Auch wenn die meisten dieser Signale hier ausreichend aufgelöst werden können und zudem in niedrigen Intensitäten vorliegen, führen sie bei komplexeren Gemischen zu einem erhöhten Untergrund (schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis) und Peakverbreiterung.

Zudem fällt auf, daß die Intensitäten der einfach geladenen Molekülsignale untereinander innerhalb der gleichen Probe von Spot zu Spot stark variieren können. Deshalb wird in Einzelspektren oft nicht das richtige Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander wiedergegeben. Vor allem bei höheren Analytkonzentrationen ($\sim 10\text{pmol}/\mu\text{l}$ je Verbindung) ist es möglich, daß an einzelnen Stellen des Proben-Matrix-Kristallisats hauptsächlich eine Komponente des Gemisches nachgewiesen werden kann, während an anderer Probenstelle ein

völlig anderes Verhältnis der Verbindungen vorliegt. Um ein repräsentatives Spektrum zu erhalten, ist hier die Aufaddierung von Einzelspektren über die gesamte Probenoberfläche erforderlich (10 - 50 Schuß). Da die Oligonucleotide vor dem Vermengen mit der Matrix gut durchmischt worden sind, müssen derartige Effekte auf die Matrix-Proben-Kristallisation zurückgeführt werden. Mit abnehmender Konzentration verringert sich dieser Effekt, so daß auch in Einzelspektren verschiedener kristalliner Bereiche der Probenoberfläche ähnliche Relationen der Signalintensitäten beobachtet werden können.

Aufgrund der, für MALDI-MS typischen, geringen Reproduzierbarkeit von Einzelmessungen ist eine Quantifizierung über die Signalintensitäten nicht möglich. Dennoch erlaubt, bei niedrigen Konzentrationen der Komponenten, das Verhältnis der Signalintensitäten der $[M+H]^+$ -Ionen eine grobe (qualitative) Abschätzung der Konzentrationsverhältnisse im Gemisch (Summenspektrum). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Nachweiseffizienz der Verbindungen mit steigendem Molekulargewicht abnimmt.

Hat die Heterogenität des Proben-Matrix-Kristallisats bei Einzelmessungen zur Folge, daß nur aus ausgewählten kristallinen Bereichen Signale guter Intensität und Auflösung erhalten werden können, ist es bei der Analyse von Gemischen zunehmend schwieriger, Bereiche zu finden, in denen alle Komponenten gute Auflösung und Intensität aufweisen. Zudem lassen sich die Meßbedingungen (z.B. Laserenergie und Nachbeschleunigungsspannung) nicht mehr auf die einzelnen Komponenten optimieren und richten sich in der Regel nach den Bedingungen, die für die Desorption/Ionisation des Oligonucleotids höchster Masse erforderlich sind. Daraus resultieren jedoch zu hohe Laserintensitäten (und eventuell auch zu hohe Nachbeschleunigungsspannungen) für die kleineren Komponenten des Gemisches, so daß hier im Vergleich zur Analyse der Einzelverbindungen schlechtere Auflösung und erhöhte Fragmentierungen auftreten. Je breiter der Massenbereich des zu analysierenden Gemisches, desto schwieriger ist es, einheitliche, optimale Meßbedingungen für alle Komponenten zu finden.

Abb. 15 demonstriert die Simulation einer Sanger-Sequenzierung eines 50-mers (T-Reaktion; Massen und Sequenzen: s. Tab. 1, S.24). Stammlösung und die resultierenden verdünnten Lösungen enthielten die einzelnen Komponenten in gleichen Konzentrationen. 0.5µl der jeweiligen Lösungen (mit Konzentrationen von 4, 2, 1, 0.4, 0.2 und 0.1 pmol/µl je Verbindung) wurden mit der Matrix vermischt und anschließend sowohl im Linear- als auch im Reflektor-Modus vermessen. Wie schon zuvor beobachtet, treten auch hier mehrfach geladene Molekülonen und Molekülonencluster auf, die entweder zu gut aufgelösten Signalen oder aber zusammen mit Signalen der Adduktbildung und Fragmentierungen zu einem erhöhten Untergrund und Peakverbreiterung führen. Abb. 15 zeigt die jeweiligen

III. MALDI-TOF-Analyse von Oligonucleotiden

Spektren bei absoluten Substanzmengen von 500 fmol (a): LTOF und c): RTOF) und 200 fmol (b): LTOF und d): RTOF).

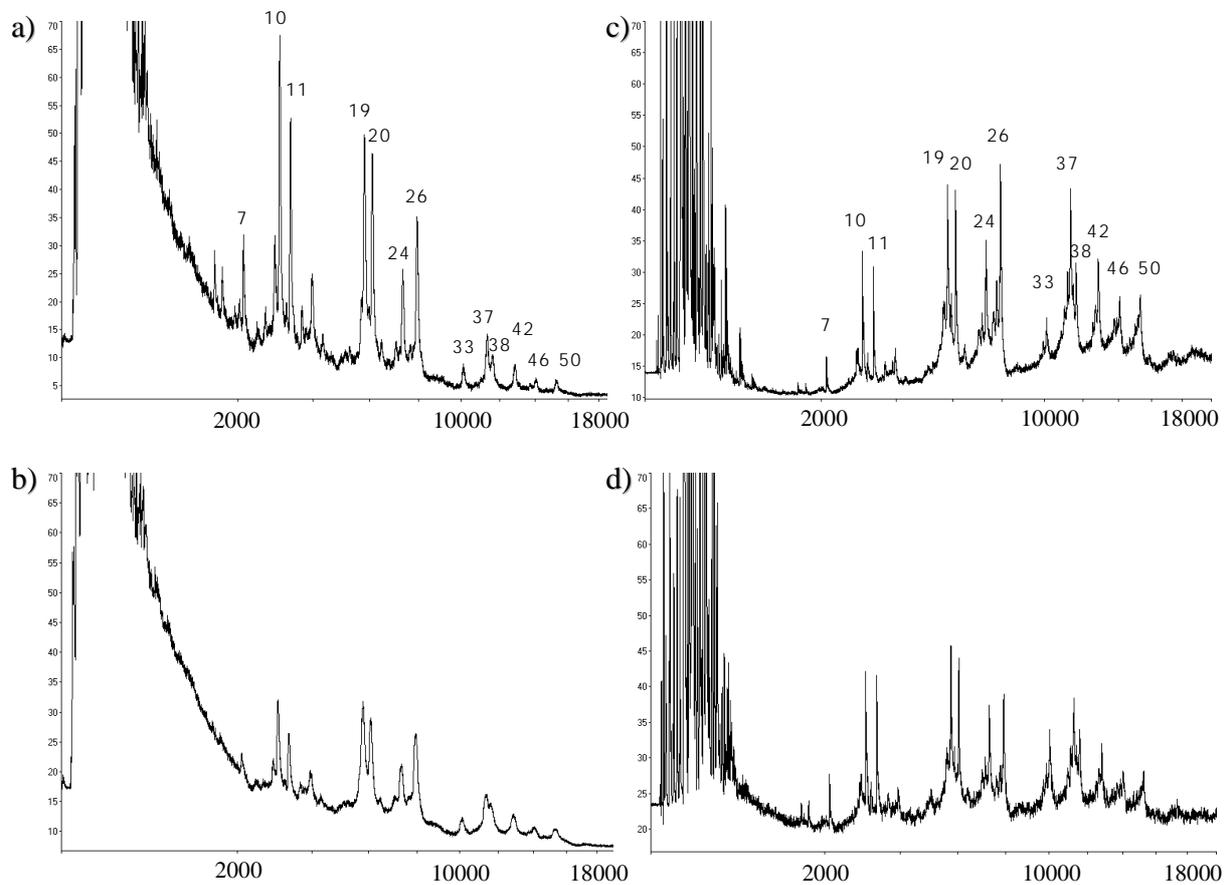


Abb. 15: MALDI-TOF Spektren eines Gemisches, bestehend aus 13 synthetischen Oligonucleotiden gleicher Sequenz und gleicher Konzentration, die in ihrer Länge zwischen 7 und 50 nt variieren. a) LTOF-Spektrum, 500fmol je Verbindung b) LTOF-Spektrum, 200fmol je Verbindung c) RTOF-Spektrum, 500fmol je Verbindung d) RTOF-Spektrum, 200fmol je Verbindung

Für Gemische mit Substanzmengen von 2 pmol bis zu 200 fmol konnten im linearen und im reflektierenden Modus alle 13 Verbindungen ausreichend aufgelöst und eindeutig identifiziert werden.

Ein Vergleich der Spektren a) und c) bzw. b) und d) demonstriert jedoch deutlich besseres Auflösungsvermögen und höhere Signalintensitäten bei Oligonucleotiden >25 nt mittels RTOF-MS. Und zwar, obwohl die Signale im Reflektor-Modus aufgrund der zunehmenden Fragmentierungen im unteren Bereich sehr breit und insgesamt unsymmetrisch sind.

Gegenüber der Analyse der Einzelverbindungen (RTOF-MS) ist die Massenauflösung für Substanzen in komplexen Gemischen geringer. So lassen sich die Isotope des 7-mers und heterogene Kationenaddukte beim 20-mer unter Standardbedingungen in der Regel nicht mehr zuweisen und führen zur Peakverbreiterung bzw. zu einem höheren Untergrund. Basenverlust hingegen kann auch noch beim 50-mer aufgelöst und zugewiesen werden.

Alle vier Spektren demonstrieren abnehmende Auflösung mit steigendem Molekulargewicht. Zwar sind Auflösung und Massengenauigkeit durchaus ausreichend, um zwischen einzelnen Basen zu unterscheiden (Δm : ~300 Da), dennoch können Signale aufeinanderfolgender, gleicher Basen im höheren Massenbereich zunehmend schlechter aufgetrennt werden (vgl. Signale für: 10-/11-mer; 19-/20-mer; 37-/38-mer). Eine Vergrößerung des Massenbereiches des 37-/38-mers läßt erwarten, daß zwischen diesen beiden Signalen lediglich ein maximal zwei zusätzliche Signale für T-Terminationsprodukte mit etwa gleichen Massenabständen (entweder 150 oder ~100 Da) aufgelöst und zugeordnet werden können. Der Einsatzbereich markierter Terminatoren für die Multiplex-Sanger-Sequenzierung ist daher auf einen relativ kleinen Massenbereich beschränkt.

Vergleich der LTOF-Spektren a) und b) zeigt deutlich schlechtere Intensitäten und abnehmendes Auflösungsvermögen mit sinkender Konzentration. Unterhalb von 200 fmol (100 fmol) sind 37- und 38-mer häufig nicht mehr auftrennbar und erscheinen als einheitliches Signal. Zudem ist, aufgrund des für den Linear-Modus typischen, steilen Anstiegs der Signale im Matrixbereich, das 7-mer oft nicht mehr nachweisbar. Demgegenüber lassen sich im Reflektor-Modus die einzelnen Komponenten der Gemische auch noch bei Konzentrationen von 0.2 pmol/ μ l (abs. Substanzmengen bei der MALDI-Messung von 100 fmol je Verbindung) nachweisen. Die Qualität der Spektren nimmt jedoch auch hier, mit abnehmenden Konzentrationen, stark ab (hoher Untergrund, schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis und geringere Auflösung). Liegen die einzelnen Verbindungen des Gemisches nicht in gleichen Konzentrationen vor, können Substanzen geringerer Konzentration nicht mehr nachgewiesen werden. Neben der schlechteren Spektrenqualität stellt die längere Meßzeit einen weiteren Nachteil dar. Bei sehr geringen Substanzmengen läßt sich die Probe nur an sehr wenigen kristallinen Bereichen des Matrix-Probenkristallisats nachweisen, so daß die Suche nach einem "sweet spot" mehr Zeit beansprucht. Zudem ist es zumeist erforderlich, infolge der schlechten Signalintensitäten mehr Spektren aufzusummieren (bis zu 100 Einzelschüsse).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Analyse von komplexen Gemischen absolute Substanzmengen von 1-2 pmol je Verbindung ideal sind, wobei die Spektrenaufnahme durch das Aufsummieren von Einzelspektren über die gesamte Probenoberfläche erfolgen sollte. Gute Ergebnisse hinsichtlich Massenauflösung und Genauigkeit lassen sich auch mit

Substanzmengen von bis zu 200 fmol erzielen. Niedrigere Mengen sind nachweisbar, die resultierenden Spektren weisen jedoch infolge des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses eine deutlich schlechtere Qualität auf. Zudem können Verbindungen, die im Gemisch in niedrigeren Mengen enthalten sind, oftmals nicht mehr detektiert werden.

Bei Sequenzierungsreaktionen fallen üblicherweise Substanzmengen im unteren fmol-Bereich an, wobei die Konzentration der einzelnen Komponenten im allgemeinen mit steigender Masse abnimmt. Um die Analyse von Sequenzierungsprodukten mit dem hier verwendeten Gerät zu ermöglichen, ist es daher notwendig, entweder die Ausbeute der enzymatischen Sanger-Reaktion zu erhöhen oder aber die Probenpräparation bei der MALDI-Messung so zu optimieren, daß geringere absolute Substanzmengen für die Messungen benötigt werden.

Letzteres läßt sich durch eine Verringerung der zu analysierenden Probenlösung erreichen. Da für die MALDI-Analyse nur ein kleiner Bruchteil des Proben-Matrix-Kristallisats benötigt wird, läßt sich die für die Probenpräparation verwendete Menge an Proben- und Matrixlösung theoretisch nahezu beliebig verkleinern (kleinerer Probenspot). Während die Probenpräparation der oben dargestellten Spektren mit 0.5 µl je Lösung (Matrix und Probe) durchgeführt wurde, konnten Spektren gleicher Qualität auch mit 0.25µl je Lösung erhalten werden (nicht abgebildet). Bei Konzentrationen der Probenlösungen von 0.4 pmol/µl entspricht das einer absoluten Substanzmenge von 100 fmol (gegenüber 200 fmol bei 0.5µl Probenlösung). Aufgrund der geringeren Spotgröße wird zudem das Suchen nach geeigneten kristallinen Bereichen eingeschränkt. Lösungsmengen unterhalb von 250 nl waren jedoch schlecht zu handhaben (Pipettierfehler, schlechtere Reproduzierbarkeit des Kristallisationsprozesses) und fanden deshalb für die Standardprobenpräparation keine weitere Anwendung. Für Standarduntersuchungen erwiesen sich Lösungsmengen von 0.3-0.5 µl als am Besten geeignet.

Zudem zeigte sich, daß bei komplexen Gemischen mit Konzentrationen > 1pmol/µl ein höherer Anteil an Matrixlösung (Verhältnis Proben-/Matrixlösung 1:2 oder 1:3 statt 1:1) vorteilhaft ist. Hoher Untergrund bei RTOF-Spektren infolge von mehrfach geladenen Molekülonen, Molekülonenclustern und Fragmentierungen ließen sich durch einen höheren Matrixanteil oftmals reduzieren.

3 Analyse von doppelsträngiger DNA (PCR-Produkte)

Die Untersuchung des Auflösungsvermögens im Massenbereich >15 kDa erfolgte durch die Analyse von PCR-Produkten. Abb. 16 zeigt das MALDI-Spektrum eines PCR-Produktes mit einer Kettenlänge von 103 nt.

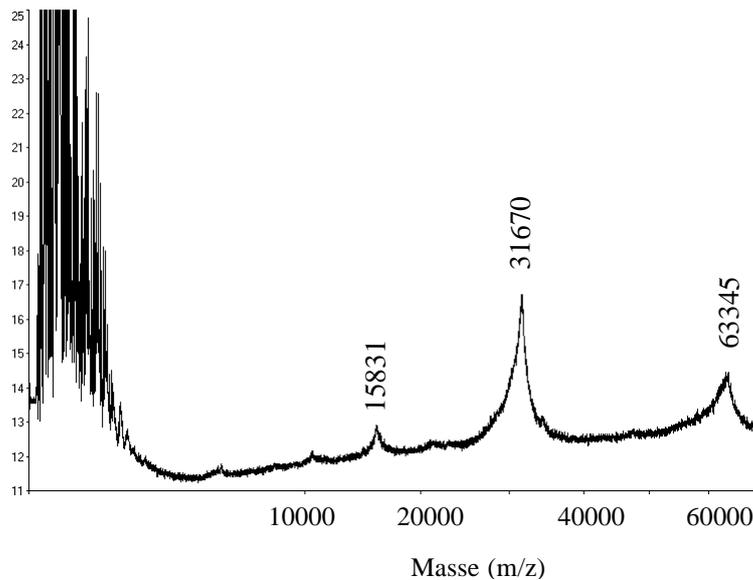


Abb. 16: MALDI-Spektrum eines 103-mer PCR-Produktes (Summenspektrum von 12 Einzelschüssen). Berechnete Massen der Einzelstränge: 31768 und 31759 Da (Mittelwert: 31763 Da).

Das Signal bei 31670 Da repräsentiert die einfach geladenen Molekülionensignale der beiden Einzelstränge (Berechnete Massen der Einzelstränge: 31768 und 31759 Da; Mittelwert: 31763). Da die Massen der beiden Einzelstränge lediglich um 9 Da differieren, können diese nicht mehr aufgelöst werden und erscheinen als einheitliches Signal. Analog zur Analyse einzelsträngiger Oligonucleotide können zusätzlich Signale mehrfach geladener Moleküle oder aber einfach geladener Dimere oder Trimere beobachtet werden, allerdings immer in geringeren Intensitäten als die der einfach geladenen Moleküle. Signale der Kationenaddukte und der Fragmentierungen (Basenverlust) können hier nicht mehr aufgelöst werden und führen zu ausgeprägtem Tailing des Molekülionensignals; und zwar sowohl zu niedrigeren als auch zu höheren Massen. Die Kalibrierung der Massenskala erfolgte extern mittels eines Gemisches synthetischer Oligonucleotide, deren Länge zwischen 7 und 50 nt lag. Da das experimentell ermittelte Molekulargewicht gegenüber dem berechneten eine deutliche Verschiebung zu geringeren Massen aufweist, ist anzunehmen, daß Fragmentierungen in diesem Massenbereich den größten Anteil zur Peakverbreiterung beitragen und somit

entscheidend das Auflösungsvermögen limitieren ($[M+H]^+_{\text{exp}}$: 31670 Da; $[M+H]^+_{\text{ber.}}$: 31763 Da = Mittelwert der beiden Einzelstränge (31768 und 31759 Da)). Wie zuvor demonstriert, ist die Abspaltung von G, gefolgt von A und C, die Hauptursache für das Auftreten von Fragmentationen. Da sich die Stabilität der Basen unter MALDI-Bedingungen analog zur Säurestabilität der N-glycosidischen Bindung der einzelnen Nucleotideinheiten verhält ($T \ll C < A < G$), wird für den Fragmentierungsmechanismus, basierend auf Untersuchungen zur Säurestabilität von Nucleosiden in Lösung^{90,91,92}, eine Protonen-katalysierte Eliminierung angenommen⁶¹. Für Nucleoside in Lösung konnte gezeigt werden, daß Protonierung im Falle des Guanosins hauptsächlich am N-7-Atom auftritt⁹³ und daß die Stabilität von Purinen, gegenüber säurekatalysierter Hydrolyse, erheblich gesteigert werden kann, indem das N-7-Atom durch eine Methingruppe ersetzt wird⁹⁴.

Aufgrund dieser Beobachtungen war anzunehmen, daß modifizierte Oligonucleotide, die anstelle der Purinbasen die entsprechenden 7-Desaza-Verbindungen enthalten, eine erhöhte Ionenstabilität (geringere Fragmentierungsrate) während des MALDI-Prozesses aufweisen.

3.1 Einsatz von 7-Desaza-Purinen

In Zusammenarbeit mit C. Siegert wurde im folgenden der Einfluß von 7-Desaza-Purinen auf die Ionenstabilität von Nucleinsäuren untersucht⁵⁹. Hierfür wurden 7-Desaza-modifizierte und nicht-modifizierte PCR-Produkte unter gleichen Bedingungen synthetisiert und anschließend einer MALDI-Analyse unterzogen. Aufgrund des zuvor beschriebenen Einflusses der Laserenergie auf Fragmentierungen erfolgte die Spektrenaufnahme von modifizierten und nicht-modifizierten PCR-Produkten unter gleichen Meßbedingungen (gleiche Laserintensitäten). Die enzymatische Synthese der modifizierten Verbindungen erfolgte unter vollständigen Ersatz von dATP und dGTP durch die entsprechenden 7-Desaza-Verbindungen. Dabei wurden für alle PCR-Reaktionen unmodifizierte Oligonucleotide als Primer gewählt. Diese sind, gegenüber der entsprechend modifizierten Verbindung, einfach und kostengünstig zu synthetisieren, leicht zu beziehen und universell einsetzbar. Zudem ist der Anteil der Purinbasen im Primer gegenüber dem Gesamtanteil der Purinbasen im Molekül, selbst bei kleinen PCR-Produkten von ca.100 nt, relativ gering und sinkt mit steigender Kettenlänge des PCR-Produktes. Bei den hier untersuchten 100-200-meren ließen sich daher, allein durch die enzymatische Reaktion, 80-90% der Purinbasen durch die entsprechenden 7-Desaza-Komponenten ersetzen (vgl. Tab. 2). Für die Untersuchung des Einflusses einer 7-Desaza-Purin-Modifikation auf die Ionenstabilität während des MALDI-Prozesses sollte dies durchaus ausreichend sein.

Tab. 2: Basenzusammensetzung der 7-Desaza-Purin-modifizierten und nicht-modifizierten, doppelsträngigen (DS) PCR-Produkte:

PCR-Produkte (DS)	C	T	A	G	c ⁷ - A	c ⁷ - G	Gesamtanteil an c ⁷ -G / c ⁷ -A in [%]
103-mer	56	47	47	56	-	-	-
modifiziertes 103-mer	56	47	13	9	34	47	79
99-mer	54	45	45	54	-	-	-
modifiziertes 99-mer	54	45	9	9	36	45	82
200-mer	110	90	90	110	-	-	-
modifiziertes 200-mer	110	90	9	9	81	101	91

Den vollständigen Ersatz der Purinnucleosidtriphosphate durch die entsprechenden 7-Desaza-Komponenten bei der enzymatischen Reaktion ermöglichte Exo(-)Pfu-DNA-Polymerase. Infolge der geringeren Akzeptanz von C⁷-dATP und C⁷-dGTP gegenüber dATP und dGTP lagen die modifizierten PCR-Produkte trotz gleicher Synthese und Aufarbeitungsbedingungen in geringeren Ausbeuten vor.

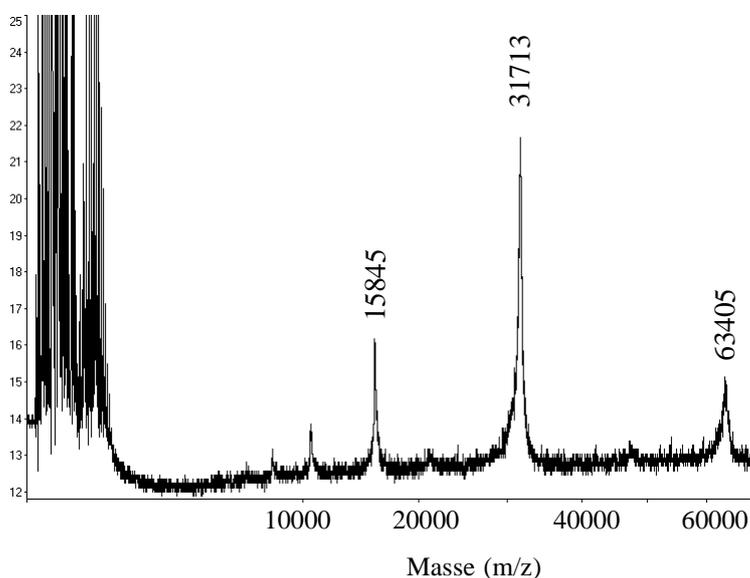


Abb. 17: MALDI-Spektrum eines 7-Desaza Purin-modifizierten 103-mer PCR-Produktes (Summenspektrum von 3 Einzelschüssen) demonstriert deutlich weniger Fragmentierung und damit bessere Signalintensität, Massenauflösung und Genauigkeit bei der Massenzuweisung (vgl. Abb. 16).

Abb. 17 zeigt das in Abb. 16 (S. 36) dargestellte 103-mer mit 7-Desaza-Purin-Modifizierung. Ein Vergleich der beiden Abbildungen demonstriert deutlich den Einfluß von 7-Desaza-Purinbasen auf die Ionenstabilität von DNA während des MALDI-Prozesses. Obwohl aufgrund des nicht modifizierten Primers immer noch ca. 20 % der Purinbasen unmodifiziert vorliegen, ist für das modifizierte PCR-Produkt Peak-Tailing zu niedrigeren Massen infolge

von Fragmentierungen sichtbar reduziert. Deutlich bessere Massenauflösung ($m/\Delta m=67$ gegenüber 18 für die unmodifizierte Verbindung) und höhere Genauigkeit bei der Massenzuweisung sind die Folge. Zusätzlich weist die 7-Desaza-Purin-modifizierte Verbindung reproduzierbar höhere Signalintensitäten auf. Weniger Laserenergie war erforderlich, um diese Verbindungen zu desorbieren/ionisieren. Wurden die Messungen von modifizierten und nicht-modifizierten PCR-Produkten bei gleicher Laserintensität durchgeführt, mußten weniger Einzelspektren aufsummiert werden, um vergleichbare Signalintensitäten zu erhalten (vgl. hier dargestellte Spektren).

Um zu überprüfen, inwieweit größere Massendifferenzen in diesem Massenbereich aufgelöst werden können, wurden Primer und Template für das zu analysierende PCR-Produkt so gewählt, daß die Massendifferenzen der Einzelstränge 526 Da betrug (größer als eine Nucleotideinheit). Abb. 18 zeigt den vergrößerten Ausschnitt der MALDI-Spektren des PCR-Produktes ohne (a) und mit (b) 7-Desaza-Purin-Modifizierung.

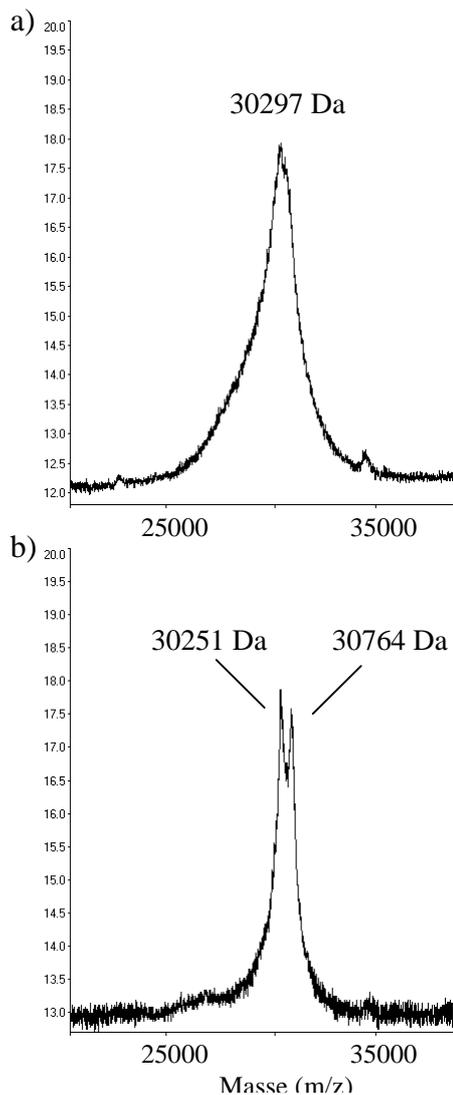


Abb. 18: Vergrößerter Ausschnitt der MALDI-Spektren eines 99-mer-PCR-Produktes. a) nicht-modifiziert (Summenspektrum: 20 Einzelschüsse) b) C^7 -Purin-modifiziert (Summenspektrum: 12 Einzelschüsse). Berechnete Massen der beiden Einzelstränge $[M+H]^+$: 30224 und 30750 Da

Massendifferenzen von 526 Da können für nicht-modifizierte Nucleinsäuren nicht mehr aufgelöst werden. Die Unterscheidung einzelner Nucleotideinheiten (~300 Da) bei Sequenzierungsreaktionen ist daher mit dem hier verwendeten Gerät im Massenbereich von ~30kDa nicht mehr möglich. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum des modifizierten PCR-Produktes eine erheblich bessere Qualität. Obwohl die Signale der beiden Einzelstränge nicht Grundlinien-getrennt werden können, ist das Auflösungsvermögen aufgrund der geringeren Fragmentierungsrate durchaus ausreichend, um beide Verbindungen eindeutig nachzuweisen und die Masse beider Einzelstränge mit guter Genauigkeit zu bestimmen (0.1%).

3.1.1 Abspaltung der Primer mittels Ribose-Modifikation

Speziell für kleine PCR-Produkte (~100 nt) ließe sich durch den Einsatz modifizierter Primer eine weitere Verbesserung der Massenauflösung und Empfindlichkeit erzielen. Wie schon erwähnt, ist die Synthese von 7-Desazapurin-modifizierten Oligonucleotiden jedoch nicht trivial und dementsprechend arbeits- und kostenintensiv. Da zudem durch Primer-Modifikation, selbst bei kleinen PCR-Produkten, lediglich ~20% der Purinbasen ersetzt werden, ist die Auswirkung auf Massenauflösung und Empfindlichkeit weniger hoch als bei dem hier demonstrierten ~80%-igen Ersatz durch die enzymatische Reaktion. Je nach Problemstellung sollte daher der Kosten/Nutzen-Effekt in Erwägung gezogen werden. Eine günstigere und zudem effektivere Alternative stellt hingegen die Verwendung von Primern mit einer Ribose-Modifikation am vorletzten Nucleotid dar. Diese können nach der Synthese des PCR-Produktes mittels NaOH abgespalten werden⁹⁵ und ermöglichen somit ebenfalls die Darstellung eines vollständig 7-Desaza-Purin-modifizierten Produktes.

Abb. 19 zeigt a) ein partiell 7-Desaza-Purin-modifiziertes 100-mer PCR-Produkt (mit Ribo-Primern) und b) das gleiche PCR-Produkt nach hydrolytischer Abspaltung der Primer. Wie aus den Spektren hervorgeht, erfolgte die Abspaltung der Primer nahezu quantitativ. Einzelmessungen über die gesamte Oberfläche des Proben-Matrix-Kristallisats wiesen vergleichbare Intensitätsverhältnisse der Signale auf, wie das oben dargestellte Spektrum (Summenspektrum aus 12 Einzelmessungen). Zwar konnte das PCR-Produkt noch nachgewiesen werden, verglichen mit dem Hydrolyseprodukt jedoch nur mit sehr geringen Signalintensitäten. Die abgespaltenen Primer wurden bei der Aufreinigung des Hydrolyseproduktes über eine "Ultra-fee-Filtereinheit" (10000 NMWL) abgetrennt. Wie das Spektrum demonstriert, erfolgte diese Abtrennung nicht quantitativ, so daß beide Signale ebenfalls in geringen Intensitäten detektiert werden konnten. Für das vollständig 7-Desaza-Purin-modifizierte Hydrolyseprodukt wurde ein schmales, symmetrisches Signal erhalten, das

sich durch verminderte Fragmentationbildung (geringeres Peak-Tailing zu niedrigeren Massen) auszeichnet.

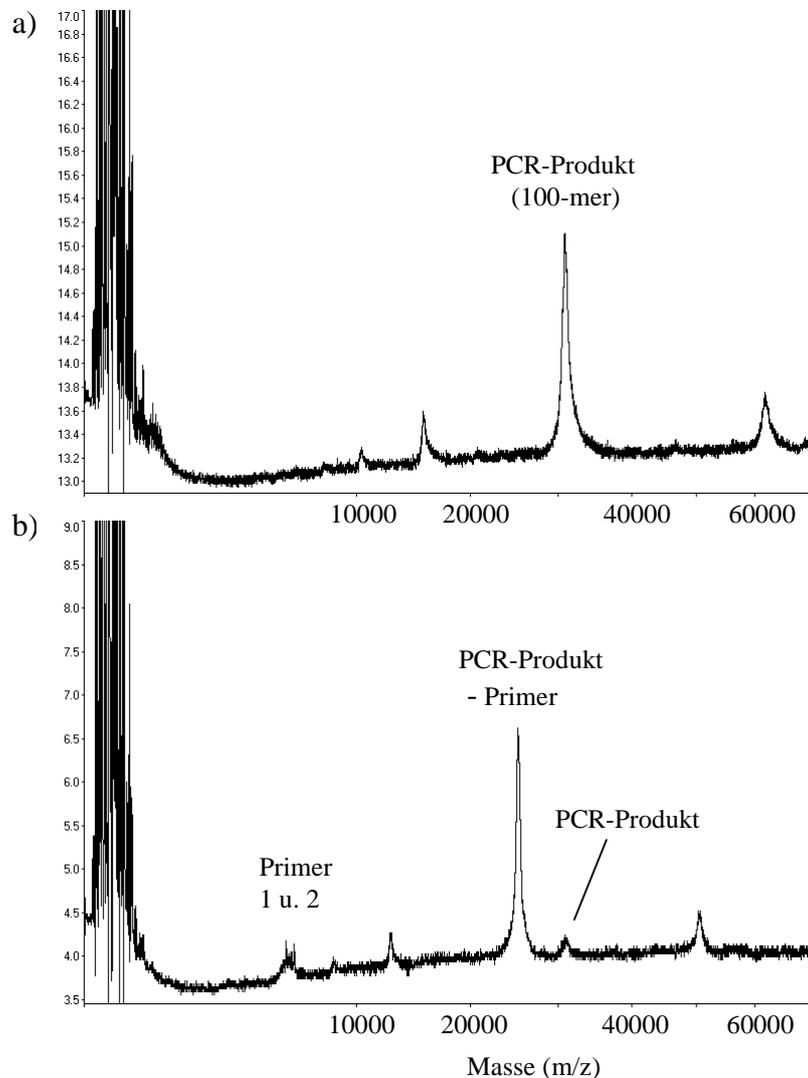


Abb. 19 a): MALDI-Spektrum eines 7-Desaza-Purin-modifizierten 100-mer PCR-Produktes, dessen Primer eine Ribo-Modifikation trägt. b) MALDI-Spektrum des modifizierten PCR-Produktes nach der hydrolytischen Abspaltung der beiden Primer mittels NaOH.

Wie vermutet, sind die Auswirkungen auf Massenauflösung und Empfindlichkeit nicht so deutlich wie bei dem zuvor demonstrierten 80%-igen Ersatz von A und G. Die relativ hohe Massenauflösung des Signals ist zudem, neben dem Einfluß der vollständigen 7-Desaza-Purin-Modifikation, ebenfalls auf die Verschiebung des Molekulargewichtes des zu analysierenden Produktes in den kleineren Massenbereich zurückzuführen. Wie zuvor gezeigt,

nehmen Auflösung, Empfindlichkeit und Massengenauigkeit mit zunehmenden Molekulargewicht ab, so daß hier generell durch die Abspaltung der Primer (5437 und 5918 Da) eine Verbesserung für die MALDI-TOF-Analyse des PCR-Produktes erzielt werden kann.

3.1.2 *Nachweis von doppelsträngiger DNA bei der Analyse von PCR-Produkten*

Bei längeren PCR-Produkten nimmt der Anteil an Purinbasen im Primer gegenüber dem Gesamtanteil ab (hier ca. 10%), so daß der Einfluß nicht-modifizierter Primer sinkt. Abb. 20 zeigt ein 200-mer PCR-Produkt mit und ohne 7-Desaza-Modifizierung. Beide Spektren stellen Summenspektren von 30 Einzelschüssen bei gleicher Laserintensität dar. Auch hier lassen sich für die MALDI-Analyse der modifizierten Verbindung reproduzierbar bessere Massenauflösung und höhere Signalintensitäten beobachten. Spektrum b) demonstriert das einfach geladene Molekülionensignal der beiden Einzelstränge des modifizierten 200-mers mit guter Auflösung und gutem Signal/Rausch-Verhältnis. Wie üblich treten, in sehr viel geringeren Intensitäten, ebenfalls Signale der doppelt geladenen Molekülionen der beiden Einzelstränge sowie Signale der einfach geladenen Dimere auf. Demgegenüber zeigt das Spektrum des nicht-modifizierten 200-mers überraschenderweise ein anderes Verhältnis der Signalintensitäten. Hier dominiert erstmals das einfach geladene Molekülionensignal der Dimere bzw. des DNA-Duplexes (bei 121.1 kDa). Auch das Signal der beiden Einzelstränge ist nachzuweisen, allerdings in geringeren Intensitäten.

Da bei der MALDI-Analyse einzel- und doppelsträngiger DNA neben den einfach geladenen Molekülionen ebenfalls die Bildung der einfach geladenen Dimere (AA) und Multimere (A_n) zu beobachten ist und zudem bei der Analyse von PCR-Produkten stets hauptsächlich die Einzelstränge detektiert werden, wurde angenommen, daß die bei der MALDI-Analyse doppelsträngiger DNA auftretenden Signale der Dimeren auf unspezifische Ko-Desorption der Einzelstränge zurückzuführen sind (AA, AB, BB) und nicht auf die Desorption des intakten DNA-Doppelstranges (AB_{DS}), basierend auf den Wechselwirkungen der Watson-Crick-Basenpaarung. Die Tatsache, daß bei der Detektion des 200-mer PCR-Produktes das Dimer-Signal in höheren Intensitäten vorliegt als das Molekülionensignal der beiden Einzelstränge, legt jedoch die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um die Desorption des intakten Doppelstranges handelt und nicht lediglich um unspezifische Ko-Desorption der Einzelstränge.

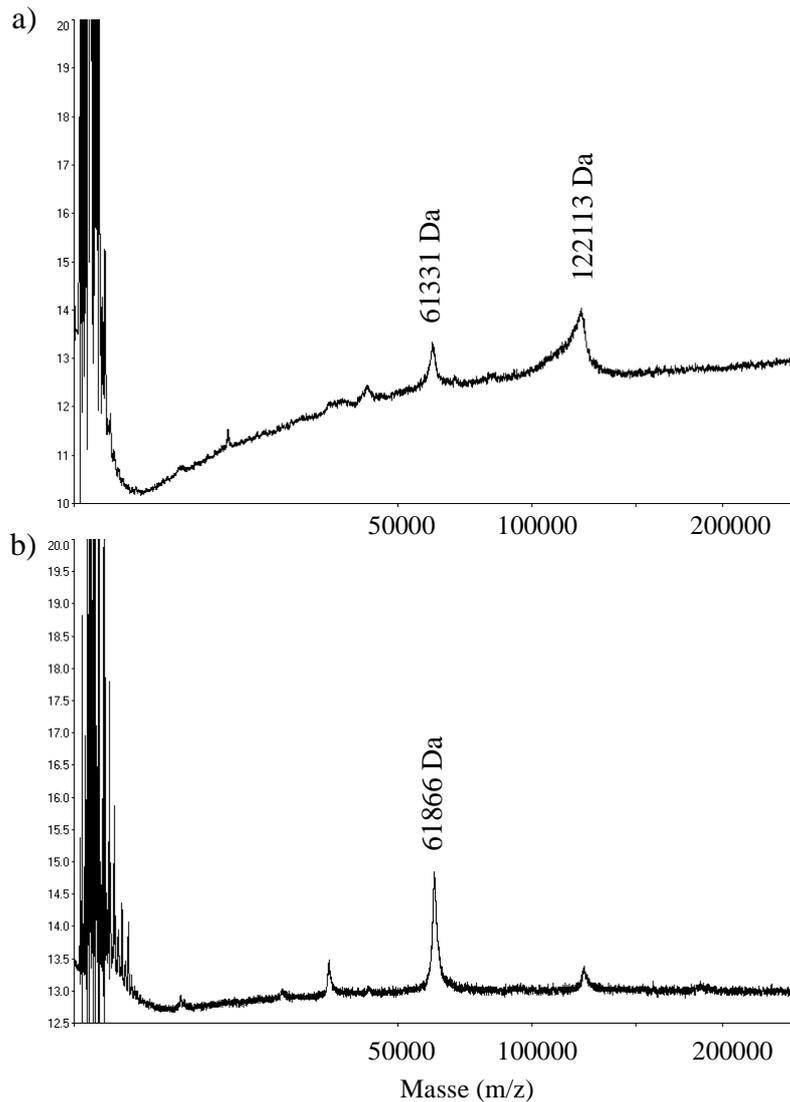


Abb. 20: MALDI-Spektren des 200-mer PCR-Produktes (jeweils Summenspektren von 30 Einzelschüssen): a) nicht-modifiziert ($m/\Delta m=28$); $[M+H]^+$ -Signal der Einzelstränge nur in geringeren Intensitäten nachweisbar (61.3 kDa), außergewöhnlich hohe Intensität des Signals in der $[M_2+H]^+$ -Region (122.1 kDa) läßt hier den direkten Nachweis des DNA-Duplexes vermuten. b) 7-Desaza-Purin-modifiziert ($m/\Delta m=39$); $[M+H]^+$ -Signal der beiden Einzelstränge dominiert.

Dies ist um so wahrscheinlicher, da die Stabilität von DNA-Duplexen mit steigender Kettenlänge zunimmt, aufgrund der extensiveren Wasserstoffbrückenbindungen, erkennbar am höheren Schmelzbereich dieser Verbindungen. Da die Massendifferenzen zwischen den Homodimeren der beiden Einzelstränge (AA bzw. BB) und dem DNA-Duplex (AB_{DS}) bzw. Heterodimer (AB) zu klein sind, um aufgelöst zu werden, ist es hier jedoch nicht möglich, eindeutig zwischen diesen Signalen zu differenzieren.

Im Vergleich dazu weist das Spektrum der 7-Desaza-modifizierten Verbindung, trotz gleicher Kettenlänge und Basenzusammensetzung, das Signal in der $[M_2+H]^+$ -Region nur in gewohnt niedriger Intensität auf. Hierfür können mehrere Faktoren verantwortlich sein: Zum einen liegt die 7-Desaza-Verbindung infolge der geringeren Ausbeute bei der PCR in geringerer Konzentration vor. Zum anderen hat der Ersatz des N-7-Atoms der Purinbasen durch eine Methingruppe ebenfalls Einfluß auf die Stabilität des Doppelstranges. So führt der Austausch zum Verlust eines Akzeptors für eine Wasserstoffbrückenbindung, die auf nicht-Watson-Crick'scher Basenpaarung basiert und die Fähigkeit von Nucleinsäuren zur Bildung von Sekundärstrukturen beeinflusst⁹⁶. Zudem weist das aromatische Ringsystem der 7-Desaza-Purine eine niedrigere Elektronendichte auf, was zu einer Schwächung der "stacking-interactions" führt, erkennbar an den verringerten Schmelzpunkten des Doppelstranges⁹⁷. Es ist daher durchaus vorstellbar, daß, je nach Stabilität des Duplexes, in Abhängigkeit zur Kettenlänge, Basenzusammensetzung, Konzentration und Meßbedingungen, die Detektion von intakten DNA-Doppelsträngen mittels MALDI-MS möglich ist.

3.2 Untersuchungen zum Nachweis von doppelsträngiger DNA

Da auch für die MALDI-TOF-Analyse einer *Fill-In*-Reaktion für den Arbeitskreis intensive Signale für das Heterodimer/Duplex-Ion nachgewiesen wurden und zudem für die Analyse von Sequenzierungsprodukten zusätzliche Signale der doppelsträngigen Komponenten Empfindlichkeit und Auflösung (Überlappung mit anderen Signalen) vermindern, sollte im folgenden überprüft werden, ob die erhöhte Intensität des Heterodimer/Duplex-Signals wirklich auf den Nachweis intakter DNA-Duplexe zurückzuführen ist.

Um eindeutig zwischen der Ionenbildung von Homo- und Heterodimeren der Einzelstränge (AA, BB, AB) einerseits und doppelsträngiger DNA (AB_{DS}) andererseits differenzieren zu können, wurde ein synthetisches, einzelsträngiges Oligonucleotid mit einer Länge von 50 nt mit einem entweder komplementären (k) oder aber nicht komplementären (nk) 27-mer bei Raumtemperatur gemischt und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Äquimolare Lösungen der beiden Gemische ($50/27_k$ und $50/27_{nk}$) mit Konzentrationen von 20, 10, 5 und 2.5 pmol/ μ l (je Verbindung) wurden untersucht. Abb. 21a) zeigt das Spektrum des Gemisches bestehend aus 50-mer und komplementären 27-mer_k mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ l. Zusätzlich zu den erwarteten Signalen der einfach geladenen Molekülionen des 27- und 50-mers tritt ein intensives Signal für das Molekülion des Doppelstranges bzw. des Heterodimeren bei 23.68 kDa auf ($[M_2+H]^+ : 27-/50\text{-mer}_k$). Obwohl das Verhältnis der Signalintensitäten der einzelnen Komponenten von Laserschuß zu Laserschuß leicht variiert, ist die Intensität des Signals für

III. MALDI-TOF-Analyse von Oligonucleotiden

den Doppelstrang, reproduzierbar über die gesamte Oberfläche des Proben-Matrix-Kristallisats, gleich hoch oder höher als die Signalintensität des 50-mers. Selbst das doppelt geladene Molekölion dieser Komponenten ist nachweisbar (a_3 bei 11.84 kDa). Demgegenüber erscheinen die Signale der beiden Homodimeren ($27/27:b_1$ und $50/50:b_2$) in vernachlässigbar geringen Intensitäten.

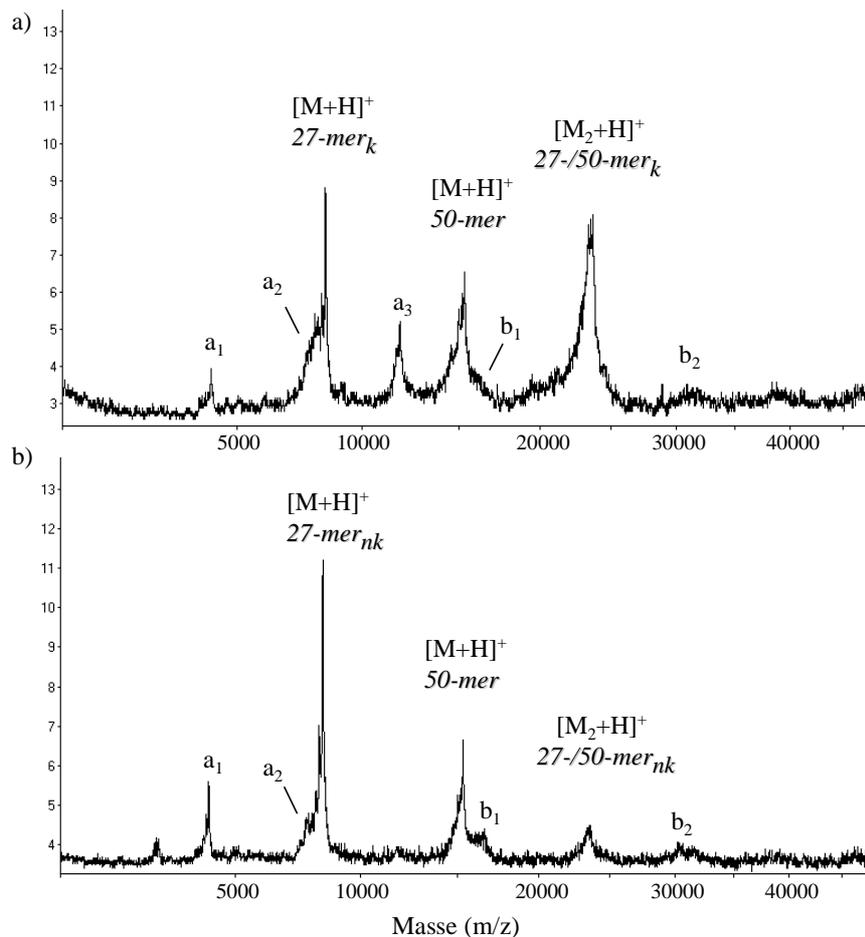


Abb. 21: MALDI-TOF-Spektren eines synthetischen 50-mers gemischt mit a) einem komplementären und b) einem nicht komplementären 27-mer. Konzentration der analysierten Lösung war 10 pmol/ μ l (je Verbindung). Das $[M_2+H]^+$ -Signal im Spektrum a) demonstriert den Nachweis des Duplexes der beiden komplementären Stränge; das entsprechende Signal im Spektrum b) repräsentiert das Molekölion der Heterodimere der beiden nicht komplementären Verbindungen (unspezifische Ko-Desorption). a_1 , a_2 und a_3 stellen die doppelt geladenen Molekölionen des 27- und 50-mers und des DNA-Duplexes dar; b_1 und b_2 die entsprechenden Homodimeren des 27- und 50-mers.

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 21b das Spektrum des nicht komplementären Gemisches (10 pmol/ μ l), aufgenommen unter gleichen Bedingungen bei gleicher Laserintensität. Wie gewohnt treten hier, neben den intensiven, einfach geladenen Molekülionensignalen, Signale der doppelt geladenen Molekülonen und Dimere auf, allerdings alle in geringeren Intensitäten. Die Intensität des Molekülionensignals des Heterodimers, das sich infolge nicht spezifischer Ko-Desorption der beiden nicht komplementären einzelsträngigen Verbindungen bildet, ist hier vergleichbar mit der des homodimeren Signals des 27-mers (b_1 , schlecht aufgelöst). Auch das Homodimer des 50-mers ist nachweisbar (b_2). Die noch geringere Intensität dieses Signals mag darauf zurückzuführen sein, daß längere Oligonucleotide allgemein schlechtere Ionenausbeuten bei der Desorption/Ionisation aufweisen. Das Verhältnis der Signalintensitäten (einzelssträngige Molekülonen/Dimerionen) ist auch hier, innerhalb der typischen Schwankungsbreite, über die gesamte Probenoberfläche reproduzierbar. Selbst bei erhöhter Laserenergie ($\gg E_0$) tritt das Signal des Heterodimers nicht in signifikant höheren Intensitäten auf. Daraus läßt sich schließen, daß das beobachtete, intensive Signal des komplementären Gemisches (Spektrum a)) eindeutig auf den Nachweis des doppelsträngigen Molekülonens (AB_{DS}) zurückzuführen ist, wobei sich jedoch ein ähnlich geringer Anteil an heterodimeren Ionen, wie Spektrum b) ihn aufzeigt, nicht ausschließen läßt.

Abnehmende Konzentrationen der zu analysierenden Lösungen führten beim komplementären Gemisch zu abnehmenden Signalintensitäten des doppelsträngigen Molekülonens (27-/50-mer_k) in Relation zu denen der einzelsträngigen Verbindungen. Verdünnungen durch den Einsatz höherer Matrixlösungsmengen hatten den gleichen Effekt. Während bei Konzentrationen von 20 pmol/ μ l das Duplex-Signal eindeutig dominiert, treten bei Konzentrationen von 10 pmol/ μ l einzel- und doppelsträngige Ionen in ähnlichen Intensitäten auf. Für Lösungen mit Konzentrationen von 5 pmol/ μ l läßt sich zusätzlich zur Verringerung der relativen Signalintensität eine Abhängigkeit vom jeweiligen ProbenSpot für den Nachweis doppelsträngiger DNA beobachten. Abb. 22 demonstriert diesen Sachverhalt anhand zweier Spektren der gleichen Probe (komplementäres Gemisch; 5 pmol/ μ l). Während das erste Spektrum deutlich den Nachweis doppelsträngiger Ionen demonstriert, wenn auch mit niedrigerer Signalintensität als bei der Analyse des konzentrierteren Gemisches, läßt sich an anderer Stelle des gleichen Matrix-Proben-Gemisches das Duplex/Heterodimer-Signal nur mit einer Intensität nachweisen, die vergleichbar ist mit der des heterodimeren Ions des nicht komplementären Gemisches (vgl. b) und c)). Hier kann davon ausgegangen werden, daß lediglich die Einzelstränge involviert sind. Derartige Beobachtungen lassen vermuten, daß bei der Analyse von Lösungen geringerer Konzentrationen einige Kristalle der Matrix-Proben-Oberfläche hauptsächlich die einzelsträngigen Komponenten, andere hingegen zusätzlich den Doppelstrang aufweisen. Mit abnehmender Konzentration verstärkt sich dieser Effekt, so daß

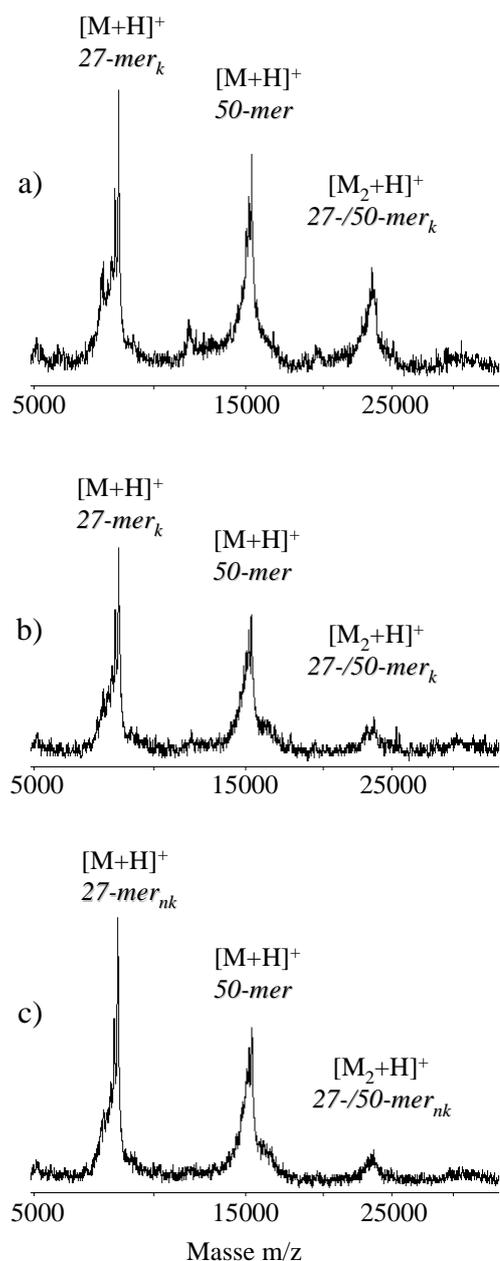


Abb. 22: MALDI-TOF-Spektren beider 27-/50-mer Gemische (Konz.: 5 pmol/ μ l). Spektren a) und b): komplementäres Gemisch: Doppelstrang läßt sich eindeutig nachweisen, allerdings nicht bei jedem Laserimpuls über die gesamte Probenoberfläche. An einigen kristallinen Bereichen treten nur die Signale der einzelsträngigen Molekülonen auf (Spektrum b)). In diesem Fall sind die Intensitäten des $[M_2+H]^+$ -Signals von komplementärem und nicht-komplementärem Gemisch (Spektrum c)) vergleichbar.

hier in Einzelmessungen über die gesamte Oberfläche des Kristallisats hauptsächlich die einzelsträngigen Komponenten detektiert werden.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß für diese Untersuchungen Standard-Probenpräparationsbedingungen gewählt wurden, wie sie allgemein bei der Analyse von Oligonucleotiden üblich sind. So erfolgte das Vermischen der Oligonucleotide bei Raumtemperatur in Reinstwasser, also unter nicht idealen Hybridisierungsbedingungen. In Anbetracht der Tatsache, daß die Hybridisierung eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, ist es plausibel, daß neben doppelsträngiger DNA auch einzelsträngige vorliegt. Abnehmende Konzentrationen der Einzelstränge in Lösung hat abnehmende Konzentration des Duplexes zur Folge. Stärkere Hybridisierungsbedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet.

4 Schlußfolgerungen für Massenmarkierung und Sequenzierung

Wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigen, nehmen Auflösungsvermögen, Empfindlichkeit und Massengenauigkeit mit zunehmendem Molekulargewicht drastisch ab. Dieser Effekt wird bei der Analyse komplexer Gemische und der Verwendung geringer Substanzmengen (<200 fmol) noch verstärkt. Bei der Analyse einzelner Oligonucleotide lassen sich im Massenbereich ≤ 2.1 kDa unter optimalen Bedingungen Massendifferenzen von 1 Da auflösen (Isotopenauflösung). Im Massenbereich ≤ 6 kDa Massendifferenzen von ≥ 22 Da. Bei der Analyse komplexer Gemische geringer Substanzmengen ist das in der Regel jedoch nicht mehr möglich, so daß hier wenig größere Massendifferenzen erforderlich sind, um eine zufriedenstellende Signalauftrennung zu erhalten. Da bei Sequenzierungsreaktionen Oligonucleotide mit einer Länge von ca. 17 nt als Primer verwendet werden, liegt das erstmögliche terminierte Sequenzierungsprodukt im Massenbereich von ~ 5.4 kDa. Für die Multiplex-Sequenzierung diagnostischer Assays erscheinen daher Mindestmassendifferenzen von 30 oder auch 40 kDa in diesem Massenbereich als zweckmäßig. Mit steigender Masse sind größere Massendifferenzen zwischen den einzelnen Terminatoren erforderlich, damit eine eindeutige Zuordnung der Fragmente der unterschiedlichen terminierten Produkte gewährleistet werden kann. Die einzusetzende Massenmarkierung richtet sich daher nach der jeweiligen Problemstellung und dem Massenbereich der terminierten Produkte. Im Massenbereich zwischen 6 und 15 kDa ist zu erwarten, daß Mindestmassendifferenzen der terminierten Produkte von ~ 40 bis 150 Da zweckmäßig sind (steigend mit zunehmenden Molekulargewicht).

Bei der Multiplex-Sanger-Sequenzierung richtet sich diese Mindestgröße immer nach dem Auflösungsvermögen in dem Massenbereich des größten Fragmentes innerhalb der zu analysierenden Sequenzleiter. Wie die Analyse von PCR-Produkten zeigte, sind im Massenbereich von ~ 30 kDa (~ 100 nt) Massendifferenzen von 526 nt (\gg eine Nucleotideinheit) für unmodifizierte Verbindungen nicht mehr auflösbar. Selbst mit stabilisierender 7-Desaza-Purin-Modifikation ist die Auflösung von 300 nt bei einem 100-mer mit dem hier verwendeten Gerät nicht möglich (s. Ribo-7-Desaza-Purin-modifiziertes PCR-Produkt). Die Analyse komplexer Gemische läßt erwarten, daß der für die Sanger-Sequenzierung zugängliche Massenbereich (Auflösung von Massendifferenzen einer Nucleotideinheit) mit dem hier verwendeten Gerät bei einer Oligonucleotidlänge von 60-70 nt liegt. Der Einsatz massenmarkierter Terminatoren zur effizienten Erhöhung des Probendurchsatzes ist in diesem Massenbereich jedoch wenig sinnvoll, da hier Auflösung und Massengenauigkeit gerade eben ausreichend sind, um einzelne Nucleotideinheiten zu identifizieren. Das Spektrum des komplexen Gemisches mit Substanzmengen von 200 fmol je

Verbindung läßt erwarten, daß schon im Massenbereich der Signale des 37-/38-mers lediglich ein, maximal zwei zusätzliche Terminationsprodukte ausreichend aufgelöst werden könnten (vgl. 37-/38-mer des komplexen Gemisches, Abb. 15, S.33). Eine effektive Erhöhung des Probendurchsatzes durch Multiplex-Sequenzierung von DNA-Fragmenten ~50 nt ist somit infolge des limitierten Auflösungsvermögens zur Zeit nicht realisierbar.

Zur Untersuchung der hier dargestellten Substanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaften als potentielle Terminatoren und ihrer Eignung für die Multiplex-Sequenzierung bietet sich somit ein kurzes synthetisches Template an, das die Bildung von mindestens zwei Terminationsprodukten für die T- und C-Reaktion erlaubt. Infolge der relativ geringen Empfindlichkeit für die MALDI-Analyse von Gemischen ist es erforderlich, die Sequenzierungsreaktion bezüglich der Ausbeute zu optimieren. Obwohl mit dem hier verwendeten Gerät der Nachweis doppelsträngiger DNA möglich ist, zeigen die vorangegangenen Untersuchungen, daß die zusätzliche Detektion von DNA-Duplexen unter den Standardbedingungen der Probenpräparation (Aufnahme der aufgereinigten Proben in Reinstwasser etc.) mit kleinen Kettenlängen (bis zu 50 nt) in den bei Sequenzierungsreaktionen anfallenden Substanzmengen eher unwahrscheinlich ist. Trotzdem kann die vorherige Denaturierung der Proben oder aber der Einsatz von Aufreinigungsverfahren, welche Strangtrennung erlauben, sinnvoll sein, um die MALDI-Analyse der Sequenzierungsprodukte zu verbessern.

IV Darstellung massenmarkierter Terminatoren

Es sollte ein schnelles und kostengünstiges Syntheseverfahren für die Darstellung von massenmodifizierten 2',3'-Dideoxypyrimidinnucleosid-5'-triphosphaten entwickelt werden. Da die Fähigkeit, die Massen der Terminatoren optimal an die gegebene Problemstellung anzupassen (Auflösungsvermögen des zur Verfügung stehenden Gerätes, Massenbereich der terminierten Produkte), eine hohe Flexibilität für die mögliche Anwendung und damit einen effektiveren Nutzen dieser Verbindungen in der DNA-Sequenzierung zur Folge hat, ist eine Synthesestrategie wünschenswert, welche mit geringem synthetischen Aufwand die schnelle und gezielte Einführung unterschiedlicher, genau definierter Massenmodifikationen erlaubt.

Als Grundlage für die Syntheseplanung soll im folgenden kurz auf die zu erfüllenden Anforderungen an massenmarkierte Terminatoren eingegangen werden:

1 Allgemeine Anforderungen an massenmarkierte Terminatoren

1.1 Akzeptanz und Einbau durch Polymerasen

Im Hinblick auf die Verwendung als Terminatoren in Sequenzierungsreaktionen stellt die Akzeptanz bzw. der Einbau dieser massenmarkierten Verbindungen durch die Polymerase eine der wichtigsten Voraussetzungen dar. Das bedeutet, die Massenmodifizierung des Nucleosids sollte an einer Position erfolgen, bei der weder sterische Wechselwirkungen mit der Polymerase noch eine Beeinträchtigung der Watson-Crick-Basenpaarung auftritt.

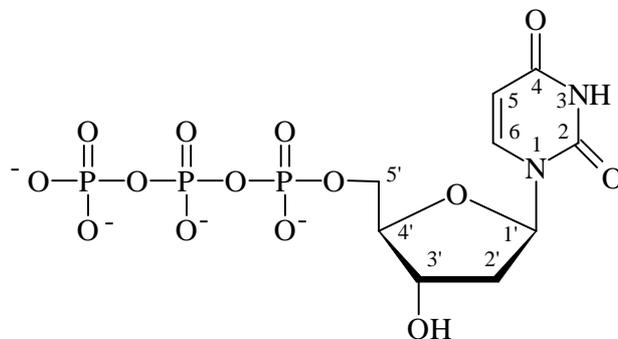


Abb. 23: 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat

Abb. 23 zeigt 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat. Da der Triphosphat-Teil des Moleküls die aktive Seite (Bindungsstelle) für die Enzym-Substrat-Reaktion darstellt, könnten theoretisch sowohl Base als auch Zucker-Einheit mit einer entsprechenden Massenmarkierung modifiziert werden. Für die Einführung der Massenmodifikation sollten folgende Überlegungen berücksichtigt werden:

1.1.1 Modifizierung der Riboseinheit

Die 2'-Desoxyribose trägt zur Enzym-Erkennung bei, so daß größere Reste in 2'- oder 3'-Position vermutlich zu sterischen Wechselwirkungen mit der Polymerase führen würden. 2'-Desoxynucleosidtriphosphate, deren 3'-OH-Gruppe lediglich durch eine NH₂-Gruppe oder durch ein Fluor-Atom ausgetauscht wurde, werden durchaus von Polymerasen akzeptiert und eingebaut^{98,99}. Des weiteren konnten M. L. Metzger und Mitarbeiter zeigen, daß 3'-O-methyl-dTTP und ähnliche 3'-O-modifizierte-dATP-Verbindungen als Terminatoren bei Sequenzierungen verwendet werden können¹⁰⁰. Allerdings werden diese Verbindungen nur von sehr wenigen Polymerasen akzeptiert. Einige Polymerasen werden durch sie inhibiert, bei anderen wiederum erfolgt kein Kettenabbruch. Daraus läßt sich folgern, daß die Verbindungen entweder nicht eingebaut werden oder aber die Modifikation abgespalten und die Kette weiter verlängert wird, so daß keine Termination an dieser Stelle auftritt. Nur 4 von 8 verschiedenen 3'-O-modifizierten dNTP's wurden von mindestens einer Polymerase eingebaut und führten zur Termination. Verschiedene 3'-O-modifizierte dNTP's wurden zudem durch unterschiedliche Polymerasen eingebaut, so daß es schwierig ist, einheitliche Sequenzierungsbedingungen für alle Verbindungen zu finden. C. Wojczewski et al. haben Fluorescein- und Rhodamin-Derivate an 3'-Amino-2'-Desoxynucleosidtriphosphate gekoppelt und setzten diese Verbindungen dann als Terminatoren bei der Sequenzierung unter Verwendung von T7 DNA-Polymerase ein¹⁰¹.

Wie man sieht, ist eine Modifikation der Zucker-Einheit in 3'-Position mit einer entsprechenden Massenmarkierung durchaus erfolgversprechend. Ob diese Verbindungen jedoch wirklich in Sequenzierungsreaktionen als potentielle Terminatoren wirken, ist sehr stark abhängig von der verwendeten Polymerase und der Art der Modifizierung (Stabilität unter den Reaktionsbedingungen während der Sequenzierung; funktionelle Gruppen, die eventuell die Polymerase inhibieren; mögliche Abspaltung der Modifikation durch Exonuclease-Aktivität der Polymerase - speziell bei 3'-O-modifizierten Verbindungen; sterische Hinderung etc.). Ein besseres Verständnis der Funktionsweise der Polymerasen und der molekularen Verhältnisse des Enzym-Substrat-Komplexes könnte dieses Problem lösen. S.

Tabor und C. C. Richardson z.B. untersuchten die bei der enzymatischen DNA-Synthese involvierten aktiven Zentren von Polymerasen. Sie fanden heraus, daß Bakteriophage T7 DNA-Polymerase Didesoxynucleotide aufgrund einer einzelnen Hydroxylgruppe in der Polypeptidkette sehr viel effizienter einbaut als DNA-Polymerasen von *Escherichia coli* und *Thermus aquaticus*. Ersetzt man in *E. coli*- oder *T. aquaticus* DNA-Polymerase das entsprechende Phenylalanin gegen Tyrosin, wird der Einbau von Didesoxynucleotiden um ein Vielfaches gesteigert¹⁰². Solche Experimente ermöglichen die Konstruktion neuer, modifizierter DNA-Polymerasen, deren Struktur für die jeweilige Problemstellung optimiert werden könnte und die z.B. den Einbau von Zucker-modifizierten Terminatoren begünstigen würden.

1.1.2 Modifizierung der Base

Auch über den Einfluß der Base in dem Enzym-Substrat-Komplex bei der Replikation ist bisher wenig bekannt. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen in einer speziellen räumlichen Orientierung auszubilden, repräsentieren die Basen das kritische Erkennungselement für die selektive Basenpaarung. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß diese Selektivität - speziell bei der Replikation - durch Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen allein nicht erklärt werden kann. S. Moran und Mitarbeiter konnten zeigen, daß derivatisiertes Thymidintriphosphat, bei dem die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen (Position 1 und 3) durch Fluor ersetzt worden waren, mit hoher Sequenz-Selektivität unter Verwendung des Klenow-Fragments von *Escherichia coli* DNA-Polymerase eingebaut wird¹⁰³. Das derart modifizierte Triphosphat kann keine "echten" Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, weist aber im Vergleich zu Thymidintriphosphat auch keine signifikanten sterischen Veränderungen auf. Die Autoren postulieren daher, daß es allein aufgrund seiner Watson-Crick-Geometrie mit relativ hoher Genauigkeit bei der Replikation eingebaut wird. Diese Theorie unterstützt einen Mechanismus der Replikation, den Petruska und Mitarbeiter diskutieren. Ist das aktive Zentrum der DNA-Polymerase so beschaffen, daß es die Ausbildung der Watson-Crick-Geometrie unterstützt, könnte die Polymerase die Spezifität der Insertion erhöhen. Auf diese Weise werden die Rotationsfreiheitsgrade am Primerende beschränkt und damit der Entropieverlust bei korrekter Basenpaarung erniedrigt. Sowohl Entropie-Enthalpie-Kompensation als auch die günstigere Enthalpie des Übergangszustandes könnten eine erhöhte Selektivität bei der Basenpaarung erklären^{104,105}.

Letztendlich beruht selektive Basenpaarung bei der Replikation vermutlich auf einer

Kombination beider Effekte: Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen komplementärer Basen, verbunden mit der Eigenschaft möglichst genau in die Watson-Crick-Geometrie innerhalb dieser Bindungen zu passen (Wasserstoffbrückenbindungs-Komplementarität und Struktur-Komplementarität).

Speziell beim Einbau von Terminatoren in Sequenzierungsreaktionen ist selektive Basenpaarung von großer Bedeutung, da durch "mismatches" eine falsche Sequenzinformation erhalten wird. Unter Berücksichtigung der oben genannten Effekte kommt somit für die Einführung einer Massenmarkierung an der Base bei 2'-Desoxyuridintriphosphat (Abb. 23) nur Position 5 oder 6 in Frage. Modifikationen der Positionen 2, 3 und 4 würden die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen beeinträchtigen bzw. verhindern. Die Einführung einer Massenmarkierung stellt in jedem Fall eine signifikante sterische Veränderung des Moleküls dar und wird die Struktur-Komplementarität beeinflussen. Dieser Einfluß ist vermutlich um so größer, je stärker die Watson-Crick-Geometrie im Wasserstoffbrückenbindungsbereich gestört wird, und läßt sich minimieren, indem die Derivatisierung in Position 5 oder 6 erfolgt. So konnten Dale und Mitarbeiter zeigen, daß Nucleosidtriphosphate mit voluminösen Substituenten in Position 5 bei Pyrimidinen und Position 7 bei Purinen mit hoher Selektivität eingebaut werden¹⁰⁶. Der Einsatz von Fluoreszenz-Terminatoren in der DNA-Sequenzierung, bei denen Fluorescein oder Rhodamin über einen Linker in Position 5 (Pyrimidine) bzw. Position 7 (Purine) angebracht wurde, ist ebenfalls bekannt^{107,108}.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Akzeptanz und selektiver Einbau von massenmarkierten Thymidin- bzw. Cytidintriphosphaten bei der Replikation ist am wahrscheinlichsten, wenn die Derivatisierung des Moleküls in Position 5 oder 6 erfolgt. Auch eine Modifizierung in 2'- oder 3'-Position ist möglich.

1.2 Stabilität der massenmarkierten Verbindungen

Der Einsatz als "mass tag" bei der MALDI-MS Analyse setzt voraus, daß die Massenmodifikation weder unter den Reaktionsbedingungen der Sequenzierung und Aufarbeitung noch während der MALDI-MS-Analyse der Terminationsprodukte zu Fragmentierungen führt. Die Modifikation sollte sich in keinster Weise destabilisierend auf das Nucleosidtriphosphat bzw. auf das Oligonucleotid auswirken. Substituenten, die aufgrund mesomerer Effekte über Delokalisierung der π -Elektronen im Pyrimidin-Ringsystem die N-glycosidische Bindung destabilisieren, sollten daher vermieden werden. Ähnliche

Überlegungen gelten für Derivatisierungen der Position 2' oder 3' der Zucker-Einheit. Substituenten mit –I-Effekt in Position 2' und/oder 3' wirken sich stabilisierend auf die N-glycosidische Bindung aus. Dies macht sich speziell in der massenspektrometrischen Analyse der entsprechenden Oligonucleotide stark bemerkbar. So weisen RNA- im Vergleich mit den entsprechenden DNA-Fragmenten aufgrund der zusätzlichen 2'-OH-Gruppe eine signifikant höhere Ionenstabilität in MALDI-MS Messungen auf¹⁰⁹. Vergleichbare Effekte vermutet man für 2'-Fluor-modifizierte Verbindungen¹¹⁰.

Eine mögliche Abspaltung der Massenmarkierung während des MALDI-Prozesses führt ebenfalls zu Problemen. In diesem Fall werden die bei der Sequenzierung erhaltenen Terminationsprodukte zwar mittels MALDI-MS detektiert, aber die Information der Massenmarkierung geht entweder ganz oder teilweise verloren. So zeigt die MALDI-MS-Analyse von 5'-DMT-geschützten Oligodesoxynucleotiden z.B., daß die DMT-Schutzgruppe während des Desorptions-/Ionisationsprozesses größtenteils abgespalten wird. In diesem Fall erhält man als Hauptsignal das entschützte Oligodesoxynucleotid. Bei Messungen mit niedriger Laserenergie tritt ein zusätzliches, zweites Signal geringerer Intensität für die 5'-DMT-Verbindung auf.

Da die quantitative Abspaltung der Massenmodifikation den Einsatz als mass tag verhindert, partielle Abspaltung dagegen - vor allem beim "multiplex-sequencing" im diagnostischen Bereich - zu Fehlinterpretationen führt, ist die Stabilität der Verbindungen während des MALDI-Prozesses von großer Bedeutung. Gute Abgangsgruppen, wie z.B. die DMT-Gruppe, sind als Massenmarkierung daher nicht geeignet.

2 Darstellung modifizierter Pyrimidinnucleosid-5'-triphosphate

2.1 Syntheseplanung

Für die Darstellung massenmodifizierter Nucleoside bieten sich generell zwei Vorgehensweisen an:

- Konvergente Syntheseführung: Derivatisierung der Base bzw. der Ribose und anschließende Umsetzung zum Nucleosid (Glycosidierung)^{111,112,113,114}.
- Lineare Syntheseführung: Direkte Modifizierung des Nucleosids

Da die Glycosidierungsreaktion mit anschließender Auftrennung der α - und β -Anomeren einen zusätzlichen und zudem relativ aufwendigen Reaktionsschritt darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit der zweite Weg verfolgt.

Im Hinblick auf eine möglichst gute Polymerase-Akzeptanz sollte die Massenmarkierung der darzustellenden modifizierten Pyrimidinnucleosidtriphosphate in Position 5 erfolgen.

Basen-modifizierte Pyrimidin-Nucleoside, bei denen die Massenmarkierung über eine stabile C-C-Bindung in Position 5 mit dem Pyrimidin verknüpft ist, sind über Palladium-katalysierte Umsetzungen unter milden Bedingungen leicht zugänglich. So wurden, ausgehend von den Studien von Heck^{115,116} und Larock¹¹⁷, die Kopplung von Allylchloriden mit 5-chlormercuri-derivatisierten Uracilnucleosiden in Gegenwart von Li_2PdCl_4 ¹¹⁸ sowie Kopplungen von 5-Iod-Pyrimidinnucleosiden mit terminalen Alkinen in Gegenwart von $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ ^{119,120}, bzw. $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ ¹²¹, CuI und Et_3N beschrieben. Letztere machen den Einsatz von toxischen Quecksilberverbindungen und deren zeit- und kostenintensive Entsorgung unnötig und sind daher zu bevorzugen. Zudem zeigte sich, daß die Anwesenheit von Kupfersalzen die katalytische Aktivität der Palladium(II)Salze erhöht^{122,123,124}. Katalysator-Systeme, die neben der Palladiumkomponente Kupfersalze mit einbeziehen, sind daher deutlich effektiver. Der Mechanismus¹²⁵ dieser Kopplungsreaktionen beruht auf der Ausbildung eines palladiumorganischen Komplexes als Zwischenstufe. Neben dem Palladium/Kupfer-Verhältnis spielt die Konzentration des Triethylamins und die Wahl des Lösungsmittels eine wichtige Rolle. Kopplungsausbeuten, Reaktionszeiten und Auftreten von Nebenprodukten sind daher stark abhängig von dem eingesetzten Alkin und den verwendeten Reaktionsbedingungen. Der Einsatz von OH-Schutzgruppen für die 2'-Desoxyribose ist für eine erfolgreiche Kopplung nicht unbedingt erforderlich, kann sich jedoch vorteilhaft auf die Ausbeute auswirken. Die Reaktionsbedingungen, speziell der Palladium/Kupfer/Triethylamin-Anteil, sind abhängig von den umzusetzenden Komponenten und sollten daher gegebenenfalls

für die jeweilige Reaktion optimiert werden.

Da 2',3'-Didesoxynucleoside um ein vielfaches teurer sind als die entsprechenden 2'-Desoxy-Verbindungen, ist es empfehlenswert, von 2'-Desoxyuridin auszugehen. Die 3'-OH-Gruppe kann durch eine Reduktion (z.B. Barton Desoxygenierung) oder aber über eine Eliminierung mit anschließender Hydrierung entfernt werden¹²⁶. Als Schutzgruppe für die 5'-OH-Position bietet sich die säurelabile 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMT) an¹²⁷.

Massenmarkierte Cytidinderivate lassen sich analog zur Synthese der entsprechenden Uridinverbindung gewinnen. Alternativ dazu wäre die direkte Umwandlung des modifizierten Uridins zum entsprechenden Cytidinderivat mittels einer Thymidin (bzw. Uridin)-Cytidin-Konversion denkbar. Auf diese Weise ließe sich der Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand erheblich reduzieren. Da die massenmodifizierende Gruppe in Position 5 der Base lokalisiert ist, kann eine sterische Hinderung dieser Reaktion durch die Anwesenheit des Linkers jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es ist daher zu überprüfen, inwieweit eine T-C-Konversion für die Darstellung modifizierter Cytidinverbindungen sinnvoll ist. Aufgrund der relativ geringen Stabilität und hohen Reaktivität der 5'-Triphosphatverbindungen sollte diese Reaktion auf jeden Fall vor der Triphosphatsynthese erfolgen.

Um den synthetischen Arbeits- und Kostenaufwand für die Darstellung verschiedener Triphosphate mit unterschiedlichen Massenmarkierungen möglichst gering zu halten, ist es vorteilhaft als massenmodifizierende Verbindung zunächst einen kurzen Alkynyllinker mit funktioneller Gruppe in die 5-Position einzuführen. Auf diese Weise läßt sich eine Schlüssel- oder auch Stammverbindung erzeugen, welche durch Substitution mit anderen Gruppen, entweder vor oder nach der Triphosphatsynthese, die schnelle und einfache Darstellung einer Vielfalt von massenmarkierten Derivaten erlaubt. Ausgehend von 2'-Desoxyuridin bietet diese "Stammolekül-Strategie" den weiteren Vorteil, daß über eine T-C-Umwandlung auf direktem Wege die entsprechende "Schlüsselverbindung" des Cytidins dargestellt werden könnte. Diese erlaubt dann ebenfalls über die funktionelle Gruppe des Linkers schnelle Derivatisierung mit genau definierten massenmodifizierenden Verbindungen.

Als funktionelle Gruppe des Linkers ist eine Aminofunktion naheliegend. Primäre aliphatische Aminogruppen sind stärker nucleophil als die der heterocyclischen Basen der Nucleinsäuren und können daher selektiv mit verschiedenen Reagenzien umgesetzt werden¹²⁸. Eine selektive Derivatisierung der terminierten Oligonucleotidfragmente wäre auf diesem Wege ebenfalls möglich.

In Abb. 24 ist ein vereinfachtes Schema für den möglichen Syntheseweg von C-5-massenmarkierten 2',3'-Didesoxyuridin- und -cytidintriphosphaten dargestellt:

IV. Darstellung massenmarkierter Terminatoren

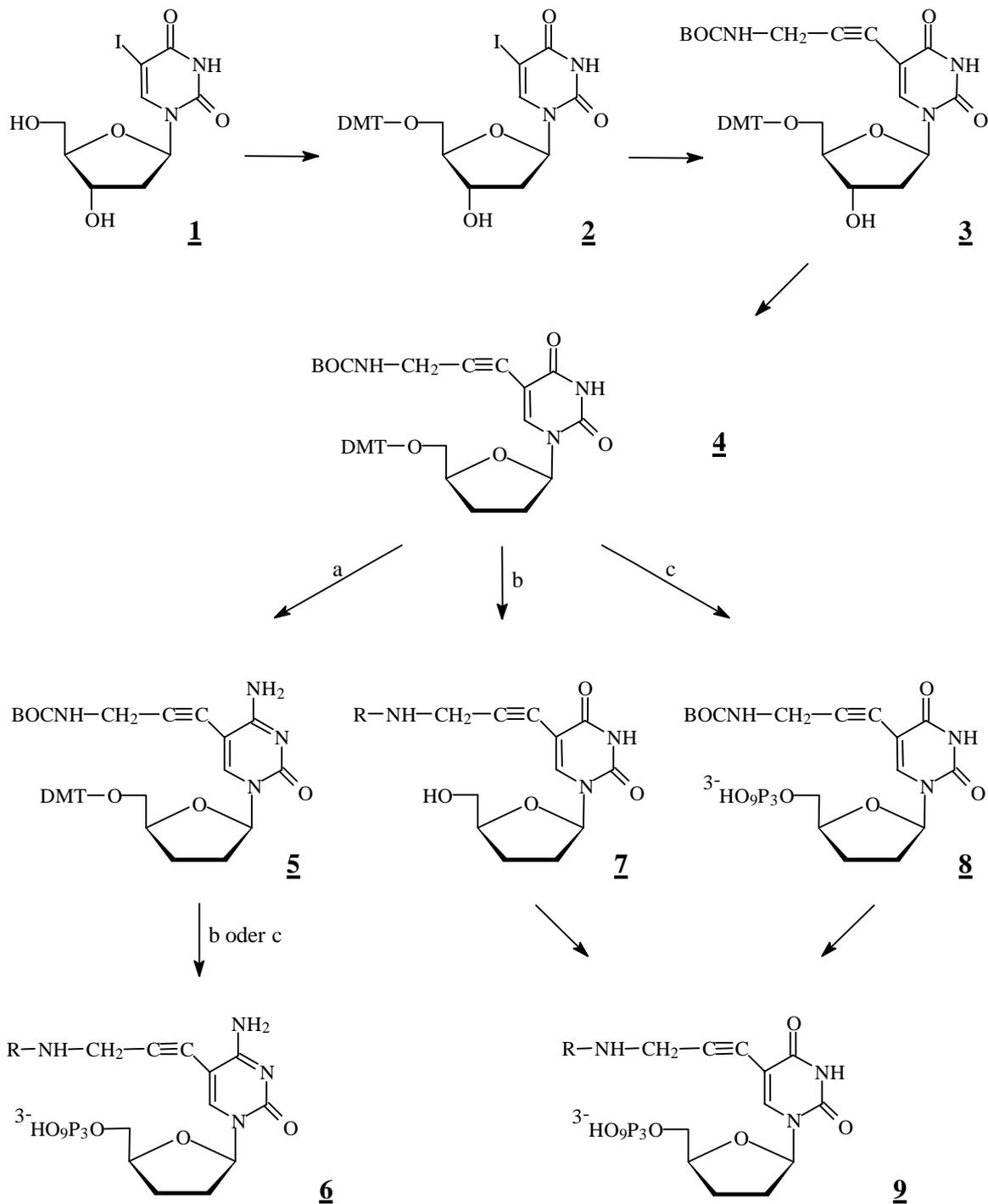


Abb. 24: Syntheseweg für C-5 substituierte massenmarkierte 2',3'-Dideoxyuridin- und cytidin- 5'-triphosphate

Ausgehend von 5-Iod-2'-Desoxyuridin wird zunächst die 5'-OH-Schutzgruppe eingeführt. Die

Einführung eines Alkynylamins in Position 5 ist über eine Palladium-katalysierte Umsetzung der 5-Ioduridin-Verbindung unter milden Bedingungen möglich und führt nach Abspaltung der 3'-Hydroxylfunktion zur Schlüsselverbindung **4**, die als Edukt für folgende Synthesen verwendet werden kann:

- a) Thymidin-Cytidin-Umwandlung zur direkten Darstellung des modifizierten Cytidinderivats und weitere Umsetzung nach b) oder c)
- b) Abspaltung der Schutzgruppen, selektive Derivatisierung der freien Aminofunktion mit unterschiedlichen Massenmarkierungen und anschließende Triphosphatsynthese
- c) Abspaltung der DMT-Schutzgruppe, Umsetzung zum Triphosphat, Abspaltung der Amino-Schutzgruppe und anschließende Einführung der Massenmodifikation

Die Stammverbindung selbst stellt ebenfalls ein massenmodifiziertes 2',3'-Didesoxynucleosid dar und kann nach der Triphosphatsynthese als Terminator für die Sanger-Sequenzierung eingesetzt werden. Zusätzlich bietet sich über die Derivatisierung der Aminofunktion des Linkers eine einfache und schnelle Methode zur Darstellung weiterer Didesoxynucleoside mit definierten Massenmodifikationen.

Für die Kopplungsreaktion sollte ein geschütztes Alkynylamin eingesetzt werden. Unter optimierten Reaktionsbedingungen führen zwar auch Kopplungen mit ungeschützten Verbindungen zu guten Ausbeuten, aber die Aufreinigung ist sehr viel aufwendiger¹²¹. Freie Aminogruppen komplexieren Kupfer- und Palladium-Ionen, so daß die Kopplungsprodukte nur schwer vollständig vom Katalysator abgetrennt werden können. Da zudem für die anschließende Umsetzung des modifizierten 2',3'-Didesoxyuridins zur entsprechenden Cytidin-Verbindung die Einführung einer Schutzgruppe für die Aminofunktion des Linkers notwendig ist, liegt es nahe, die Kopplungsreaktion mit einem geschützten Alkynylamin durchzuführen.

Bei der Wahl der Schutzgruppe ist zu beachten, daß die Kopplungsreaktion selbst entweder in Triethylamin als Lösungsmittel oder aber unter Zusatz von Triethylamin stattfindet. Auch die Uridin-Cytidin Umwandlung erfolgt im basischen Milieu. Ferner wird für die chromatographische Aufreinigung der Produkte aufgrund der Säurelabilität der DMT-Schutzgruppe dem Laufmittel Pyridin zugesetzt. Stabilität der Schutzgruppe unter basischen Bedingungen ist daher ein wichtiges Kriterium. Eine selektive Abspaltung der DMT-Gruppe sollte ebenfalls möglich sein. Auf diese Weise läßt sich das Nucleosid mit geschütztem

Alkinyllinker zum 5'-Triphosphat umsetzen. Die Schutzgruppe kann dann entweder als Massenmarkierung verwendet oder aber abgespalten und durch andere Substituenten ersetzt werden.

Für die vorliegende Problemstellung erscheint die *tert*-Butyloxycarbonylschutzgruppe (*t*-BOC) geeignet. Sie läßt sich mittels Trifluoressigsäure abspalten, ist somit stabil unter basischen Bedingungen und erlaubt zudem eine selektive Abspaltung der DMT-Gruppe mit Hilfe von 80%-iger Essigsäure. Auch die Derivatisierung der Aminofunktion des Linkers vor der Triphosphatsynthese ist möglich. In diesem Fall lassen sich DMT- und *t*-BOC-Schutzgruppe in einem Reaktionsschritt mittels Trifluoressigsäure entfernen. Nach der selektiven Derivatisierung der Aminofunktion des Linkers kann dann die Darstellung der 5'-Triphosphate erfolgen (Syntheseweg b in Abb. 24).

Mit weitaus weniger synthetischem Aufwand lassen sich massenmodifizierte Nucleosidtriphosphate darstellen, wenn die Einführung der Massenmodifikation in Position 3 über eine Derivatisierung der 3'-OH-Gruppe erfolgt. Auf diese Weise kann vom kostengünstigen Thymidin ausgegangen werden. Zusätzliche Reaktionsschritte zur Abspaltung der 3'-Hydroxylfunktion fallen weg, so daß nach der Einführung der notwendigen Schutzgruppe für die 5'-Hydroxylfunktion sofort die Derivatisierung und Umsetzung zum Triphosphat stattfinden kann. Als Schutzgruppe für die 5'-Hydroxylfunktion ist auch hier die DMT-Gruppe naheliegend. Für die Derivatisierung der 3'-OH-Gruppe bietet sich als einfachste und schnellste Methode eine Veretherung oder auch Veresterung an. Auch hier wäre es denkbar, über eine Aminofunktion der eingeführten Massenmodifikation weitere Derivatisierungen vor oder nach der Triphosphatsynthese zu ermöglichen, wobei weitere Umsetzungen vor der Triphosphatsynthese aufgrund des geringen synthetischen Aufwandes zur Darstellung dieser Verbindungen keinen zusätzlichen Vorteil bezüglich Zeit- Arbeits- und Kostenersparnis mit sich bringen.

Als Alternative zur Darstellung der C-5-substituierten 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphate wurde daher zusätzlich eine 3'-O-Modifikation in Erwägung gezogen. Da zu befürchten war, daß derartig modifizierte Verbindungen von der Polymerase nicht oder aber nur sehr schlecht als Substrat akzeptiert werden, sollte hier zunächst nur ein Thymidinderivat dargestellt und dieses hinsichtlich der Eignung als potentieller Terminator bei der Sanger-Sequenzierung untersucht werden.

2.2 C-5 substituierte 2', 3'-Didesoxyuridinderivate

Für die Synthese von Basen-modifizierten 2',3'-Didesoxynucleosiden wurde 5-Iod-2'-Desoxyuridin **1** (siehe Abb. 25) als Ausgangsverbindung verwendet. Die Abspaltung der 3'-OH-Gruppe mittels Barton Desoxygenierung oder Eliminierung erforderte die Einführung einer Schutzgruppe für die primäre 5'-Hydroxylfunktion. Hierfür bot sich die bewährte säurelabile 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMT) an. Die Umsetzung mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid fand in wasserfreiem Pyridin statt. 5'-O-DMT-5-iod-2'-desoxyuridin **2** konnte nach dem Auskristallisieren aus Toluol in Ausbeuten bis zu 85% erhalten werden. Im ^{13}C -NMR-Spektrum von **2** findet man das C-5'-Signal im Vergleich zu dem von **1** um 3 ppm tieffeldverschoben, was O-5' als Tritylierungsposition absichert. Aus dem ^1H -NMR-Spektrum wird dies durch das Fehlen des 5'-OH-Tripletts bestätigt.

2.2.1 Einführung eines Alkynylaminolinkers

Kopplungen von 5-Pyrimidinnucleosiden mit terminalen Alkinen in Gegenwart von $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ oder $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ wurden in der Literatur mehrfach beschrieben. Robins und Barr¹¹⁹ konnten zeigen, daß die Kopplung von 5-Ioduridin mit terminalen Alkinen in Triethylamin bei 50°C mit einem $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2/\text{CuI}$ -Verhältnis von 1:3.5 zu guten Ausbeuten führt (68-90%). Als Nebenprodukt tritt eine zyklische Verbindung auf, die auch erhalten werden kann, indem das aufgereinigte Kopplungsprodukt in Gegenwart von Kupfer(I)iodid in Triethylamin erwärmt wird. Das Ausmaß der Zyklisierung ist sehr stark vom eingesetzten Alkin abhängig und läßt sich durch Herabsetzen der Triethylamin- und/oder Kupferiodid-Konzentration minimieren. Haralambidis und Mitarbeiter¹²⁰ setzten Ethylacetat als Lösungsmittel ein, verwendeten einen 5-fachen Überschuß an Triethylamin (bezogen auf das Nucleosid) und führten die Kopplung mit geschützten Alkynylaminen bei Raumtemperatur durch. F. W. Hobbs¹²¹ modifizierte das Katalysatorsystem und verwendete statt der üblichen Palladium(II)-Salze Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und Kupferiodid im Verhältnis 1:2. In Dimethylformamid mit einem 2-fachen Überschuß an Triethylamin (bezogen auf das umzusetzende Nucleosid) konnten gute Kopplungsausbeuten erzielt werden. Erhöht man den Kupferiodid-Anteil auf 1:3 treten vermehrt Nebenprodukte auf.

Um die Bildung des zyklischen Nebenproduktes weitgehend zu vermeiden, erfolgte die Einführung des Linkers nach den von Haralambidis und Mitarbeitern beschriebenen Reaktionsbedingungen¹²⁰. Hierfür wurde zunächst die Aminofunktion der Alkynylverbindung mit der *t*-Butyloxycarbonylgruppe geschützt. Die anschließende Kopplungsreaktion von 5'-O-

IV. Darstellung massenmarkierter Terminatoren

DMT-5-iod-2'-desoxyuridin **1** mit 3-*t*-Butyloxycarbonylamidopropin **10** erfolgte bei Raumtemperatur in Ethylacetat, mit einem 5-fachen Überschuß an Triethylamin (bezogen auf das umzusetzende Nucleosid). Als katalytisches System wurde Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)chlorid und Kupfer(I)iodid im molaren Verhältnis von 1:3.8 verwendet.

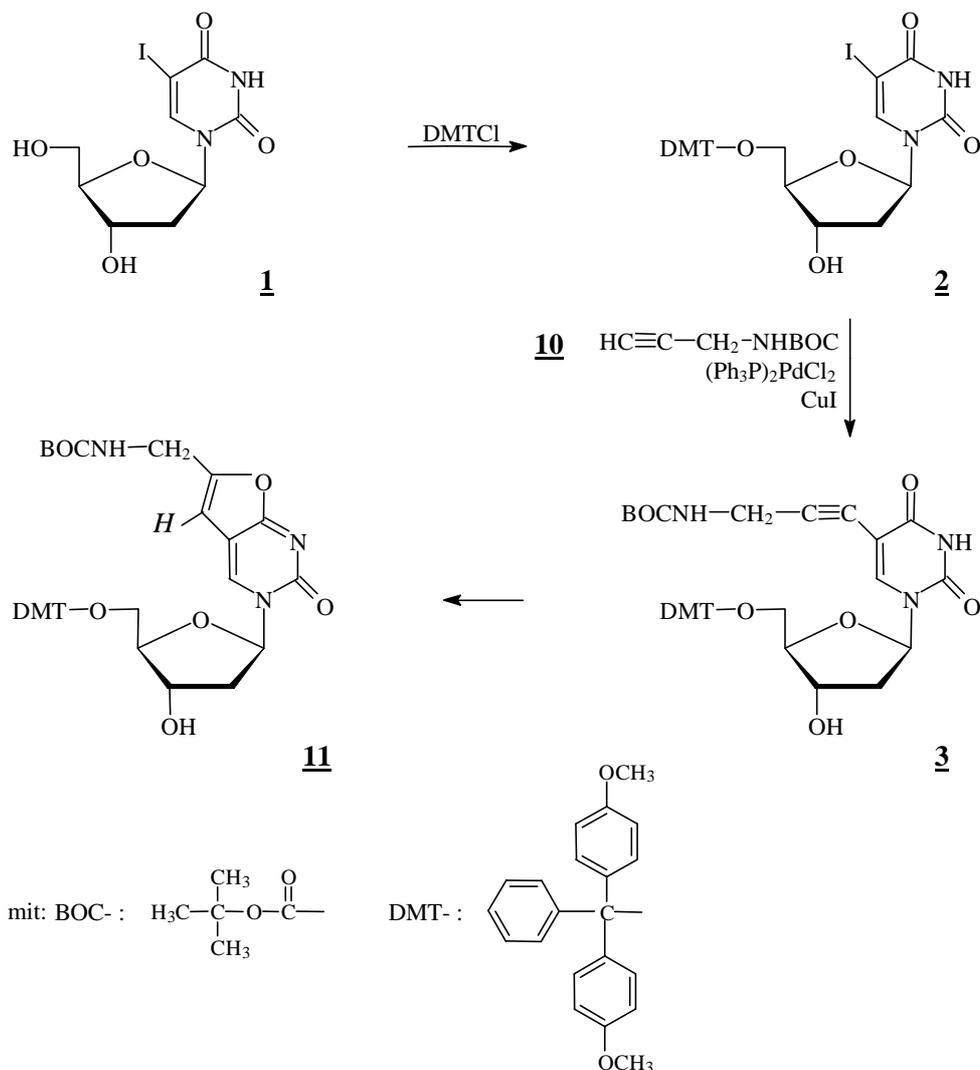


Abb. 25: Einführung eines Alkinylaminolinkers

Während Haralambidis und Mitarbeiter für diese Kopplung 3',5'-(Di-*O*-*p*-toluoyl)-5-iod-2'-desoxyuridin einsetzen, wurde hier auf den Schutz der 3'-Hydroxylfunktion verzichtet. 5-(3-*t*-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin **3** konnte nach chromatographischer Aufreinigung in 87%-iger Ausbeute erhalten werden. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die Kopplungsausbeuten der 3',5'-geschützten

Verbindung (84%) und zeigt deutlich, daß unter diesen Reaktionsbedingungen keine Notwendigkeit für die Einführung und anschließende Abspaltung einer 3'-OH-Schutzgruppe besteht. Da hierdurch zwei zusätzliche Syntheseschritte wegfallen, die einerseits einen erhöhten Arbeitsaufwand bedeuten, andererseits die Gesamtausbeute verringern, wären selbst niedrigere Kopplungsausbeuten von 60-80% durchaus noch akzeptabel.

Das von Robins und Barr¹¹⁹ beschriebene zyklische Nebenprodukt **11** wurde ebenfalls in geringen Mengen gebildet und konnte dünn-schichtchromatographisch mittels UV-Detektion nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Ähnlichkeit in Molekülgröße und Polarität ist der R_f -Wert (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95:5) des Nebenproduktes nur geringfügig größer als der des Hauptproduktes. Die quantitative Abtrennung der zyklischen Verbindung war durch chromatographische Aufreinigung an Kieselgel sowohl mit dem Laufmittel Dichlormethan/Essigsäureethylester/Triethylamin (45:45:10) als auch mit Dichlormethan/Methanol (98:2 mit 1%-igem Zusatz von Triethylamin) möglich. Geringste Verunreinigungen des Produktes konnten schon im Dünnschichtchromatogramm infolge der starken Fluoreszenz des Nebenproduktes nachgewiesen werden. Da beide Verbindungen dieselbe Masse haben, ist eine massenspektrometrische Unterscheidung nicht möglich. Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie läßt sich jedoch durch das Fehlen des Singulett-Signals des zusätzlichen Vinylprotons der zyklischen Verbindung die Reinheit von **3** nachweisen. Zudem treten im ^{13}C -NMR-Spektrum des Hauptproduktes nur die charakteristischen Signale der beiden Alkin-C-Atome des Linkers bei $\delta = 74.08$ und 89.67 ppm auf. Weitere Kohlenstoff-Signale, die auf das Vorhandensein zweier zusätzlicher Vinyl-C-Atome schließen lassen, konnten nicht detektiert werden.

2.2.2 Abspaltung der 3'-Hydroxylgruppe

Für die Abspaltung der 3'-Hydroxylgruppe bietet sich eine Reduktion nach Barton an. Die Barton-McCombie-Reaktion^{129,130} wurde bisher in erster Linie zur Darstellung von 2'-Desoxynucleosiden aus den entsprechenden Ribonucleosiden genutzt^{131,132}. Robins und Mitarbeiter haben die Anwendbarkeit dieses Verfahrens jedoch sowohl für Purin als auch für Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinnucleoside zeigen können^{132,133}. Die Darstellung von 2',3'-Didesoxynucleosiden aus den entsprechenden 2'-Desoxyverbindungen ist in der Literatur nur an wenigen Beispielen dokumentiert. Vielversprechend ist eine Reduktion mittels Tributylzinnhydrid über die jeweiligen 3'-S-Methylxanthate¹³⁴, Thioimidazole^{135,136} oder Phenoxythiocarboylester¹²⁶.

Auch eine Eliminierung der 3'-Hydroxylfunktion mittels Tetrabutylammoniumfluorid¹²⁶,

IV. Darstellung massenmarkierter Terminatoren

Natriummethanolat¹³⁷ oder Kalium-*tert*-butanolat¹³⁸ wäre denkbar. Die sekundäre 3'-OH-Gruppe läßt sich in guten Ausbeuten zu Sulfonylderivaten (z.B.: Tosyl, Mesyl, Sulfat) verestern, welche dann für die anschließende β -Eliminierung eine geeignete Abgangsgruppe liefern. Hydrierung der resultierenden ungesättigten Verbindungen unter milden Bedingungen ermöglicht den Zugang zu den entsprechenden 2',3'-Didesoxynucleosiden¹³⁹.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Reaktionswege – Reduktion nach Barton und die basenkatalysierte Eliminierung – zur Abspaltung der 3'-OH-Gruppe untersucht. Abb. 26 gibt einen Überblick:

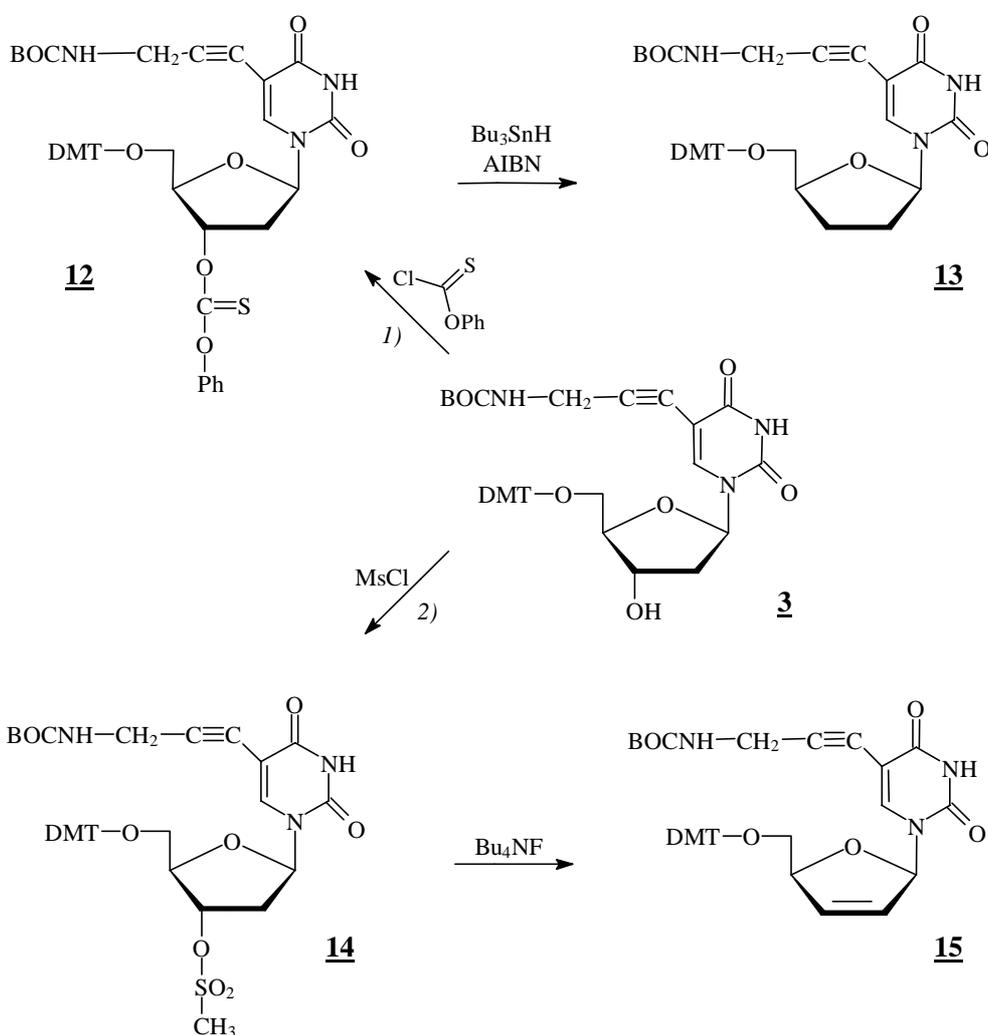


Abb. 26. Abspaltung der 3'-OH-Gruppe 1): Reduktion 2): Eliminierung

1) Reduktion mit Tributylzinnhydrid: Ausgehend von 5-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamidoprop-1-

inyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin **3** wurde zunächst die 3'-OH-Funktion mit Phenoxythiocarbonylchlorid zu Verbindung **12** verestert. Da die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel zur partiellen Dedimethoxytritylierung des Nucleosids führte, erfolgte die Thioacylierung in Pyridin oder aber unter Zusatz von Pyridin. Der Thionoester **12** konnte in 48%-iger Ausbeute erhalten und seine Struktur mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigt werden. Charakteristisch ist die deutliche Tieffeldverschiebung um ca. 1.4 ppm des H-3'-Signals und das Auftreten der fünf zusätzlichen Arylprotonen des Phenoxythiocarbonylsubstituenten. Der Thionoester sollte anschließend in Gegenwart von AIBN mit Tributylzinnhydrid bei 80°C reduziert werden. Während der Durchführung der Reaktion konnte jedoch – dünnschichtchromatographisch – das gleichzeitige Entstehen mehrerer Produkte mit unterschiedlichen Laufeigenschaften beobachtet werden. Wie eine Untersuchung des Gemisches mittels FAB-MS zeigte, weisen fast alle Verbindungen höhere Massen auf als das Edukt **12** oder aber das zu erwartende Produkt **13**. Vermutlich tritt unter diesen Reaktionsbedingungen neben der Reduktion eine Addition an die C-C-Dreifachbindung des Linkers auf. Auch die daraus resultierende C-C-Doppelbindung kann auf diese Weise weiter reagieren, so daß die Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten mit höheren Massen möglich ist. 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxy-uridin **13** war über eine Barton-Desoxygenierung der Verbindung **3** nicht zugänglich.

2) *Eliminierung mit Tetrabutylammoniumfluorid*: Zur Einführung einer 2',3'-Doppelbindung in die Riboseeinheit des Nucleosids wurde die Verbindung **3** zunächst mit Methylsulfonylchlorid (Mesylchlorid) umgesetzt. 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin **14** konnte nach der Aufreinigung an Kieselgel in 62%-iger Ausbeute erhalten werden. Die charakteristische Tieffeldverschiebung des C-3'- bzw. H-3'-Signals (um 8 bzw. 0.8 ppm) im ^{13}C - und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum belegen deutlich den Angriff in 3'-Position. Anschließende β -Eliminierung der Mesylgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid in THF bei 80°C führte jedoch nicht zur gewünschten Zielverbindung **15**. Analog zur Reduktion mit Tributylzinnhydrid konnte auch hier die Bildung vieler nucleosidischer Nebenprodukte beobachtet werden. Dies war um so erstaunlicher, da die FAB-MS-Analyse der Mesylverbindung lediglich ein Molekülionensignal mit einer Masse der Verbindung **15** aufwies. Das Mesylderivat selbst konnte nicht nachgewiesen werden, was vermuten läßt, daß schon unter den Bedingungen der Desorption/Ionisation während der MS-Messung eine Eliminierung eintritt, welche zum gewünschten Produkt führt.

Der Versuch durch Optimierung der Reaktionsbedingungen die Bildung der Nebenprodukte zu

verringern und auf diesem Wege zu einem einheitlichen Produkt zu gelangen, scheiterte ebenfalls. Ein Nucleosid/ Bu_4NF -Verhältnis von 1:1.2 statt 1:10 und Reaktionstemperaturen von 60°C führten zwar zu nur einem Hauptprodukt, jedoch weist das $^1\text{H-NMR}$ dieser Verbindung nicht die für eine Doppelbindung typische Tieffeldverschiebung der beiden Protonen in Position 2' und 3' auf. Die Abspaltung des Methylsulfonylsubstituenten ist klar erkennbar, da das Singulett-Signal der CH_3 -Gruppe nicht vorliegt. Dafür treten im Bereich von $\delta = 1\text{-}2$ ppm zusätzliche Protonen auf, was auf eine Substitutionsreaktion anstelle der gewünschten Eliminierung hinweist.

Wird die Tetrabutylammoniumfluorid-Konzentration erhöht (Verhältnis 1:4) werden zwei weitere "Hauptprodukte" gebildet. Nur eines zeigt die charakteristische Tieffeldverschiebung der zusätzlichen Vinylprotonen im NMR-Spektrum ($\delta = 6.0$ ($\text{H}3'$); 6.38 ($\text{H}2'$)) an. Allerdings treten auch hier zusätzliche aliphatische Signale im Bereich von $\delta = 1\text{-}2$ ppm auf. Vermutlich findet neben der Eliminierung eine Addition an die Alkinbindung des Linkers statt. Auf eine eindeutige Identifikation der Nebenprodukte wurde verzichtet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die gewünschte Verbindung **15** auf diesem Wege nicht zugänglich war. Auch die zunächst vermutete Bildung des stabilen $\text{O}^2,3'$ -Cyclonucleosids **16** (siehe Abb. 27), welches durch Umsetzung mit Kalium-*tert*-Butanolat geöffnet und zur ungesättigten 2',3'-Dideoxyverbindung **15** überführt werden könnte¹⁴⁰, wurde $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch nicht bestätigt.

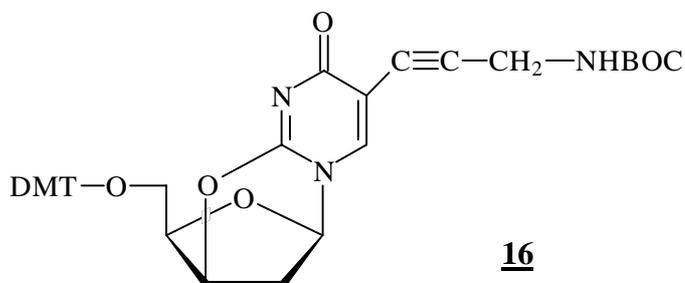


Abb. 27: $\text{O}^2,3'$ -Cyclonucleosid

Aufgrund der auftretenden Schwierigkeiten sollte die Reduktion bzw. basenkatalysierte Eliminierung ausgehend von 5'-O-DMT-5-iod-2'-desoxyuridin **2** (siehe Abb. 28) untersucht werden. Anschließende Einführung des Alkynylaminolinkers führt dann zur gewünschten Stammverbindung. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, daß bei der Umsetzung mit Bu_3SnH oder Bu_4NF die Bildung von Nebenprodukten durch Additionsreaktionen an die Alkinbindung des Linkers vermieden werden kann. Wie Abb. 28 zeigt, wurde ausgehend von

Verbindung **2** zunächst der Thionoester **17** bzw. das Methansulfonylderivat **19** dargestellt. Beide Produkte konnten nach chromatographischer Aufreinigung an Kieselgel in guten Ausbeuten (68 und 91%) erhalten werden. Die Struktur der Verbindungen wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigt. Anschließende Umsetzung mit Tributylzinnhydrid bzw. Tetrabutylammoniumfluorid führte jedoch nicht zu dem Zielmolekül **18** bzw. **20**. Auf eine weitere Aufreinigung und Identifikation des Produktgemisches wurde verzichtet. Statt dessen stand eine basenkatalysierte Eliminierung mittels Natriummethanolat oder Kalium-*tert*-Butanolat zur Diskussion.

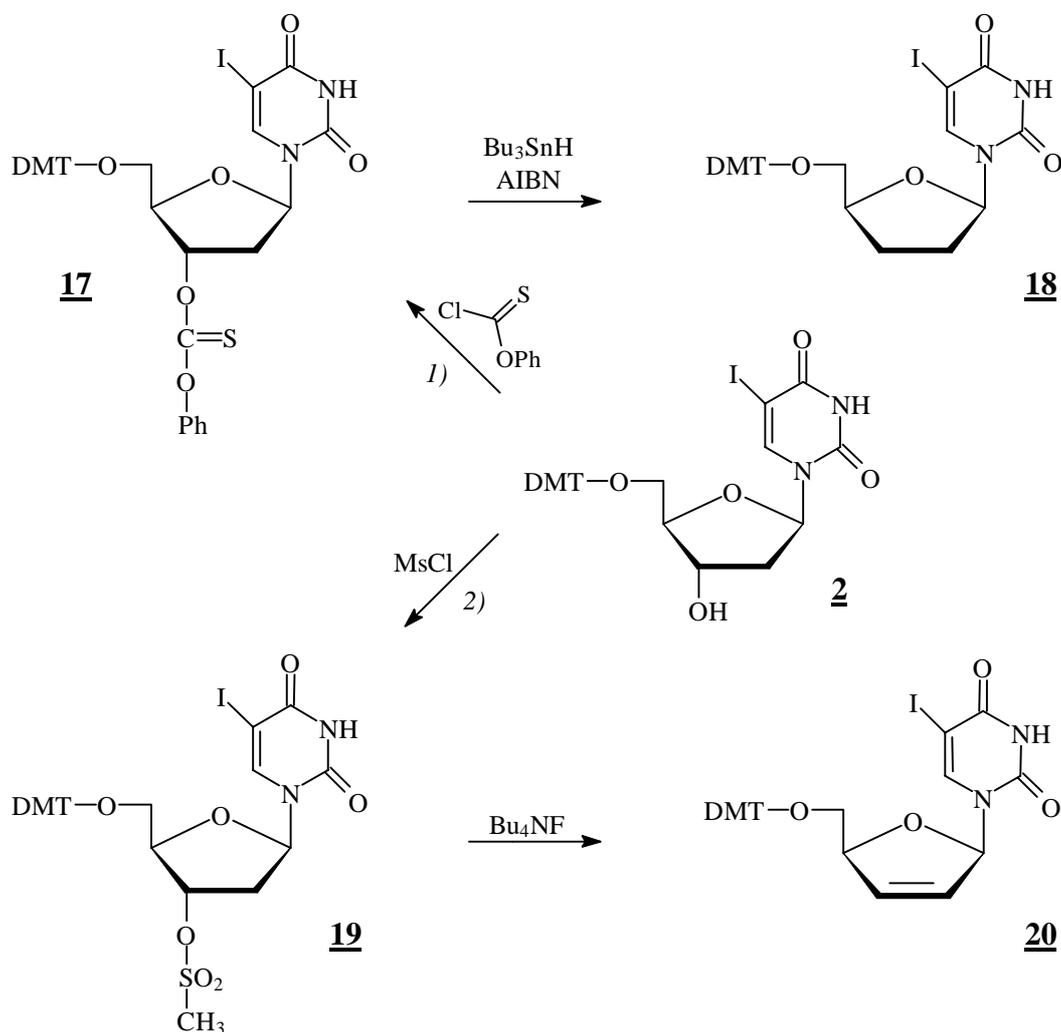


Abb. 28: Abspaltung der 3'-Hydroxylgruppe von 5'-O-DMT-5-iod-2'-desoxyuridin **2** (s. Abb. 25)

Im Gegensatz zu Purinnucleosiden, deren 3'-O-Tosylate sich mittels NaOH oder Natriummethanolat zu den entsprechenden ungesättigten 2',3'-Didesoxyverbindungen umsetzen lassen¹³⁷, führen Eliminierungen mit kleinen Basen bei den Pyrimidinderivaten zu den stabilen O²,3'-Cyclonucleosiden (siehe Abb. 29, Verbindung **21**). Diese können dann über eine β -Eliminierung mittels Kalium-*tert*-butanolat geöffnet werden, wobei die Pyrimidineinheit des Moleküls als Abgangsgruppe fungiert¹³⁸. Durch den Einsatz voluminöserer Basen in höheren Konzentrationen lassen sich 2',3'-ungesättigte Pyrimidinnucleoside auch direkt durch β -Eliminierung des Mesylderivates erhalten. Inwieweit das O²,3'-Cyclonucleosid hierbei als Zwischenstufe auftritt und anschließend eliminiert wird, ist nicht vollständig geklärt.

Im folgenden wurde 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin **19** mit zwei Äquivalenten Kalium-*tert*-butanolat in DMSO bei Raumtemperatur zu **20** umgesetzt (vgl. Abb. 29). Dies gelang in 74%-iger Ausbeute.

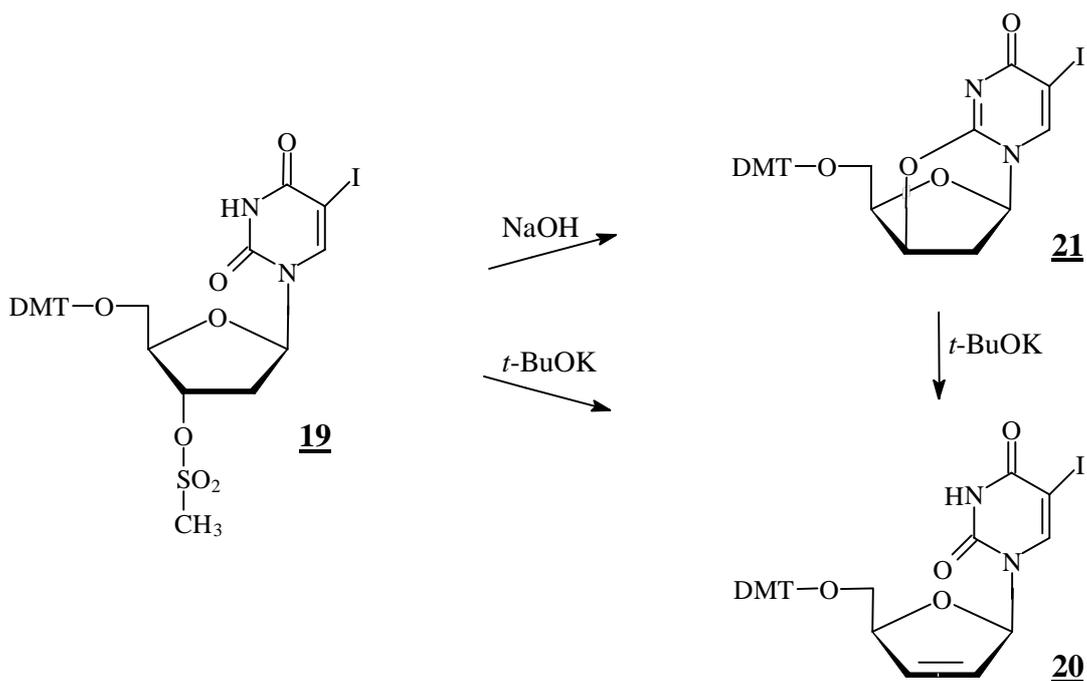


Abb. 29: Eliminierung mittels Kalium-*tert*-Butanolat

Charakterisierend für die Struktur von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2',3'-didesoxyuridin-2'-en **20** sind die Signallagen der Kohlenstoffe C-2' ($\delta = 134.77$ ppm) und C-3' ($\delta = 125.36$ ppm) sowie die entsprechende Tieffeldverschiebung der H2'- und H3'-Protonen ($\delta = 6.41$ und 5.95 ppm). Weiterhin tritt anstelle des typischen Triplettsignals des anomeren

Protons aufgrund des benachbarten Vinylprotons in C2'-Position ein Duplettsignal auf ($\delta=6.98$ ppm), welches ebenfalls zu tieferen Feld verschoben ist. Abb. 30 zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **20**.

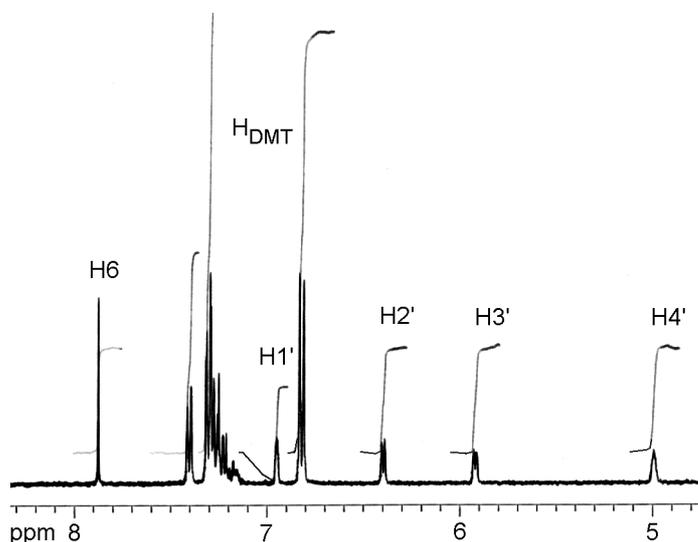


Abb. 30: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 2',3'-Didesoxyuridin-2'-en-Derivates **20**

Für die weitere Umsetzung von **20** standen zwei Wege offen.

- Hydrierung von **20** und anschließende Einführung des Alkylaminolinkers
- Einführung des Linkers und anschließende Hydrierung

Hierbei bietet b) den Vorteil, daß die Alkinbindung des Linkers zusammen mit der 2',3'-Doppelbindung der Riboseeinheit hydriert wird. Die Hydrierung des Linkers ist zwar nicht absolut notwendig, verhindert jedoch bei den folgenden Umsetzungen das Entstehen möglicher Nebenprodukte durch Additionsreaktionen an die Dreifachbindung oder aber durch Zyklisierung (siehe S. 61: Abb. 25 Verbindung 5). Da die 2',3'-Doppelbindung der Verbindung **20** vermutlich keinen störenden Einfluß auf die Palladium-katalysierte Kopplung mit dem Alkylamin ausübt, wurde im folgenden zunächst die Variante b) verfolgt.

2.2.3 Einführung des Alkynylaminolinkers und Hydrierung

Die Kopplung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2',3'-dideoxyuridin-2'-en **20** mit 3-*t*-Butyloxycarbonylamidopropin **10** zu Verbindung **22** (siehe Abb. 31) sollte zunächst analog zu der auf S. 60 beschriebenen Kopplung unter den Reaktionsbedingungen nach Haralambidis durchgeführt werden. Da Verbindung **20** jedoch in Ethylacetat nicht löslich war, erfolgte die Umsetzung in DMF mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und Kupfer(I)iodid im Verhältnis 1:2 als Katalysator unter den von Hobbs und Mitarbeitern beschriebenen Bedingungen¹²¹.

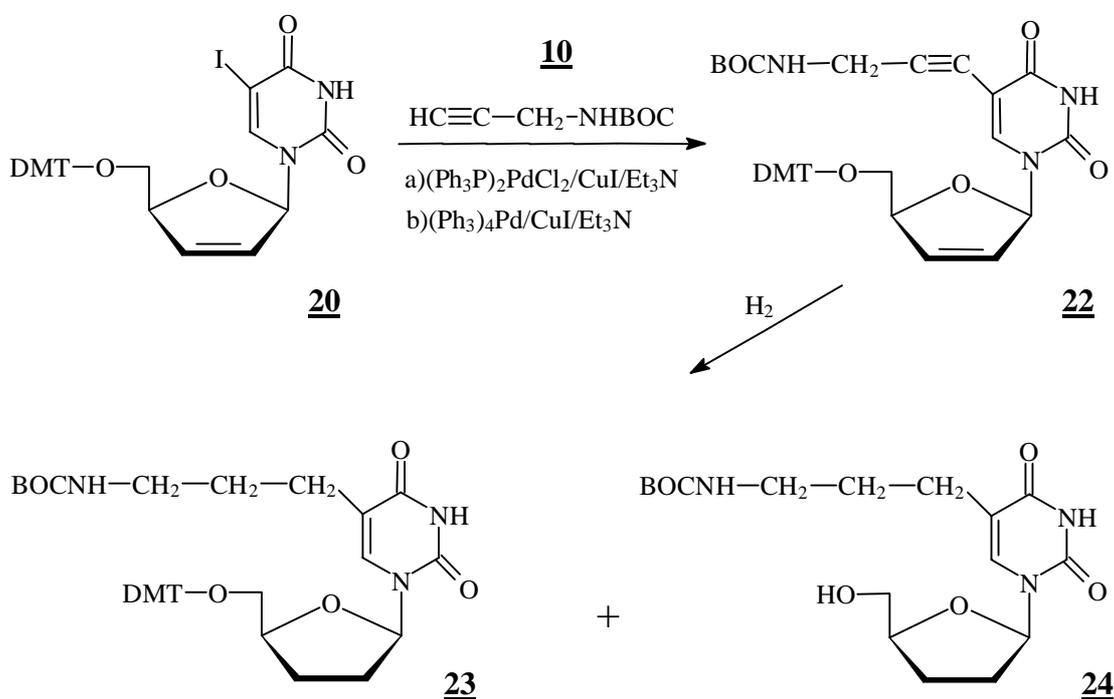


Abb. 31: Kopplung mit einem Alkynylaminolinker und anschließende Hydrierung

Verbindung **22** konnte nach chromatographischer Aufreinigung an Kieselgel in 75%-iger Ausbeute gewonnen werden. Auffallend ist das zusätzliche Auftreten des Singulett-Signals der neun Protonen der *tert*-Butylgruppe bei $\delta = 1.42$ ppm im ^1H -NMR-Spektrum sowie die Tieffeldverschiebung des C-5-Signals um 32 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung. Das zyklische Nebenprodukt trat unter diesen Reaktionsbedingungen, wie erwartet und in der Literatur beschrieben, nicht auf. Dennoch war die Kopplungsausbeute dieser Reaktion etwas niedriger als die der zuvor beschriebenen Kopplung von 5'-O-DMT-5-iod-2'-desoxyuridin **2** mit 3-*t*-Butyloxycarbonylamidopropin **10** unter Reaktionsbedingungen nach Haralambidis

(75% bis max. 80% gegenüber ~87%). Ein Vorteil der Verwendung von $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}/\text{CuI}$ in DMF stellt jedoch die erheblich kürzere Reaktionszeit dar. Während Umsetzungen mit $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2/\text{CuI}$ (1:3.8) innerhalb von 40–90 Stunden ablaufen, benötigen Kopplungen bei denen $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}/\text{CuI}$ (1:2) als katalytisches System verwendet wird, je nach Reaktionsansatz 0.5–6 Stunden. Speziell bei Synthesen im größeren Maßstab (ca. 3-6 g Nucleosid) trat hier jedoch das Problem auf, daß die Reaktionszeiten sehr stark von der Qualität der eingesetzten Reagenzien abhängig waren. Bei zu kurzen Reaktionszeiten (quantitative Umsetzung zum Produkt innerhalb von 20 min) erfolgte hier eine sehr schnelle und vollständige Zersetzung des gebildeten Produktes. Daher war es wichtig, eine Methode zu finden, die es ermöglichte, die Reaktion innerhalb kurzer Zeit vollständig abubrechen. Dies gelang durch Verdünnen des Reaktionsansatzes mit Dichlormethan und anschließender Präzipitation in n-Hexan. Chromatographische Aufreinigung des Niederschlags lieferte das Produkt in 75%-iger Ausbeute. Bei kleineren Ansätzen (100-500 mg) hingegen trat dieses Problem nicht auf. Die Reaktionszeit betrug hier generell 4-6 Stunden. Ausbeuten von 77-80% wurden erzielt.

Durch Hydrierung von **22** unter Wasserstoffatmosphäre mit Pd/C (5%) konnte sowohl das gewünschte Produkt **23** (50 % Ausbeute) als auch das dedimethoxytritylierte Produkt **24** (26% Ausbeute) gewonnen werden. Beide Verbindungen ließen sich aufgrund ihrer stark unterschiedlichen Laufeigenschaften chromatographisch gut voneinander trennen und aufreinigen. Demgegenüber sind hydrierte und partiell oder nicht hydrierte Verbindungen nur sehr schwer vollständig trennbar, so daß der Reaktionsabbruch stets nach der vollständigen Hydrierung des Eduktes stattfinden sollte. Die Ausbeute an dedimethoxytritylierten Produkt läßt sich durch verlängerte Hydrierungszeiten erhöhen. Zu lange Reaktionszeiten führten allerdings zur Bildung von Nebenprodukten, die sich durch rechtzeitigen Reaktionsabbruch vermeiden lassen. Das ^{13}C -DEPT-NMR beider Verbindungen zeigt sechs Signale für die sekundären C-Atome, was auf eine vollständige Hydrierung der Alkinbindung des Linkers hinweist (vgl. Abb. 32). Im ^1H -NMR-Spektrum tritt das charakteristische Triplettsignal für das anomere Proton bei $\delta = 6.13$ ppm auf, während die Signale für H2' und H3' eine deutliche Hochfeldverschiebung um ca. 4 ppm erfahren. Ferner treten 4 zusätzliche aliphatische Protonen im Bereich von $\delta = 2-2.4$ ppm auf. Das Signal der Methylenprotonen, die benachbart zur Dreifachbindung lagen, verschiebt sich ebenfalls in diesen Bereich. ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **24** zeigen zusätzlich deutlich das Fehlen der DMT-Schutzgruppe an. Eine partielle Hydrierung des Pyrimidinringes konnte nicht beobachtet werden. Allerdings erwies sich eine gute Aufreinigung des ungesättigten Eduktes als essentiell. Unaufgereinigte oder ungenügend aufgereinigte Alkinylnucleoside waren gegenüber einer Hydrierung resistent.

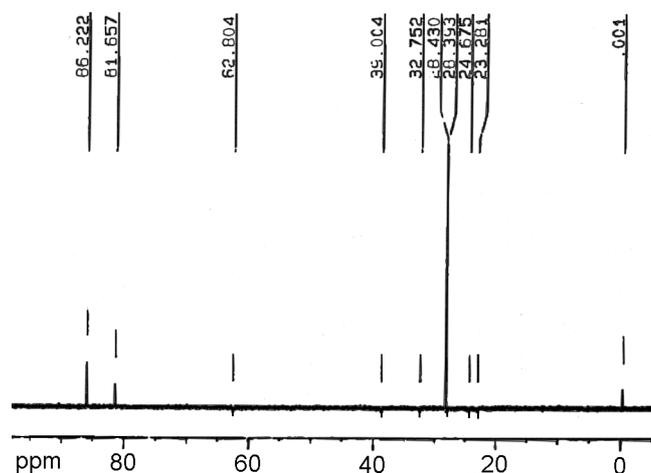


Abb. 32: Ausschnitt aus dem ^{13}C -DEPT-NMR des hydrierten DMT-Derivates **23**. Die sechs sekundären C-Atome zeigen die vollständige Hydrierung der 2',3'-Doppelbindung und des Linkers an.

5-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin **24** konnte ebenfalls durch selektive Dedimethoxytritylierung von **23** mittels 80%-iger Essigsäure gewonnen werden. Die erhaltene Ausbeute war stark abhängig von der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches. Neutralisieren des Reaktionsansatzes in Eiswasser, anschließendes Extrahieren des Produktes mit Ethylacetat und chromatographische Aufreinigung an Kieselgel führte zu Ausbeuten von 54%. Eine Steigerung der Ausbeute und gleichzeitige Reduzierung des Arbeitsaufwandes konnte erreicht werden, indem die Essigsäure am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand mehrmals mit Toluol koevaporiert wurde. Aufreinigung an Kieselgel lieferte **24** in hoher Reinheit und 71%-iger Ausbeute. Eine Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonylschutzgruppe trat unter diesen Bedingungen nicht auf.

In bezug auf die ursprüngliche Syntheseplanung (siehe S. 57, Abb. 24) repräsentiert 5-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin **23** das vorgestellte Stamm- bzw. Schlüsselmolekül. Aufgrund der aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Abspaltung der 3'-Hydroxylfunktion wurde der Linker zusammen mit der 2',3'-Doppelbindung hydriert, um mögliche Nebenprodukte bei weiteren Umsetzungen zu vermeiden. Deshalb zeichnet sich die hier dargestellte Schlüsselverbindung, abweichend vom ursprünglichen Syntheseplan, durch einen Alkyl- statt eines Alkynylaminolinkers aus. Im

folgenden sollte der Einsatz von Verbindung **23** als Edukt für folgende Synthesen untersucht werden:

- a) Thymidin-Cytidin-Conversion zur direkten Darstellung des modifizierten Cytidinderivates (siehe S. 77; C-5 substituierte 2',3'-Didesoxycytidinderivate)
- b) Abspaltung der beiden Schutzgruppen, Derivatisierung der freien Aminofunktion und anschließende Umsetzung zum Triphosphat (siehe S. 72; Derivatisierung des Linkers)
- c) Selektive Abspaltung der DMT-Schutzgruppe (siehe oben Verbindung **24**), Umsetzung zum Triphosphat und anschließende Abspaltung der Aminoschutzgruppe (siehe S.80, Massenmarkierte 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate)

Für die direkte Darstellung des modifizierten 2',3'-Didesoxycytidinderivates (Cytidin-Stammolekül) ist neben der Verbindung **23** ebenfalls die nicht hydrierte Verbindung **22** geeignet.

2.2.4 Derivatisierung des Linkers

Für die Derivatisierung des Linkers war es notwendig, zunächst die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe abzuspalten. Wie Abb. 33 zeigt, konnte sowohl **23** als auch das dedimethoxytritylierte Derivat **24** als Edukt eingesetzt werden. Beide Verbindungen lassen sich innerhalb von 15 min mittels Trifluoressigsäure vollständig entschützen. Die Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe verläuft unter Austritt zweier gasförmiger Reaktionsprodukte, Isobuten und Kohlendioxid. Nebenprodukte konnten im Dünnschichtchromatogramm nicht detektiert werden. Jedoch war es wichtig, das beim Neutralisieren entstandene Trifluoracetat vollständig abzutrennen, da es die weitere Umsetzung zu **26** verhinderte. Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit der Verbindung **25** gelang dies nur über eine gelpermeationschromatographische Aufreinigung an Sephadex LH 20. Das Produkt 5-(3-aminopropyl)-2',3'-didesoxyuridin **25** konnte in 92%-iger Ausbeute erhalten werden. Die Abwesenheit beider Schutzgruppen wurde durch das Fehlen des Singulett-Signals der C(CH₃)₃-Gruppe bei $\delta = 1.42$ ppm bzw. des Multipllett-Signals der aromatischen Protonen des DMT-Substituenten im ¹H-NMR-Spektrum bestätigt.

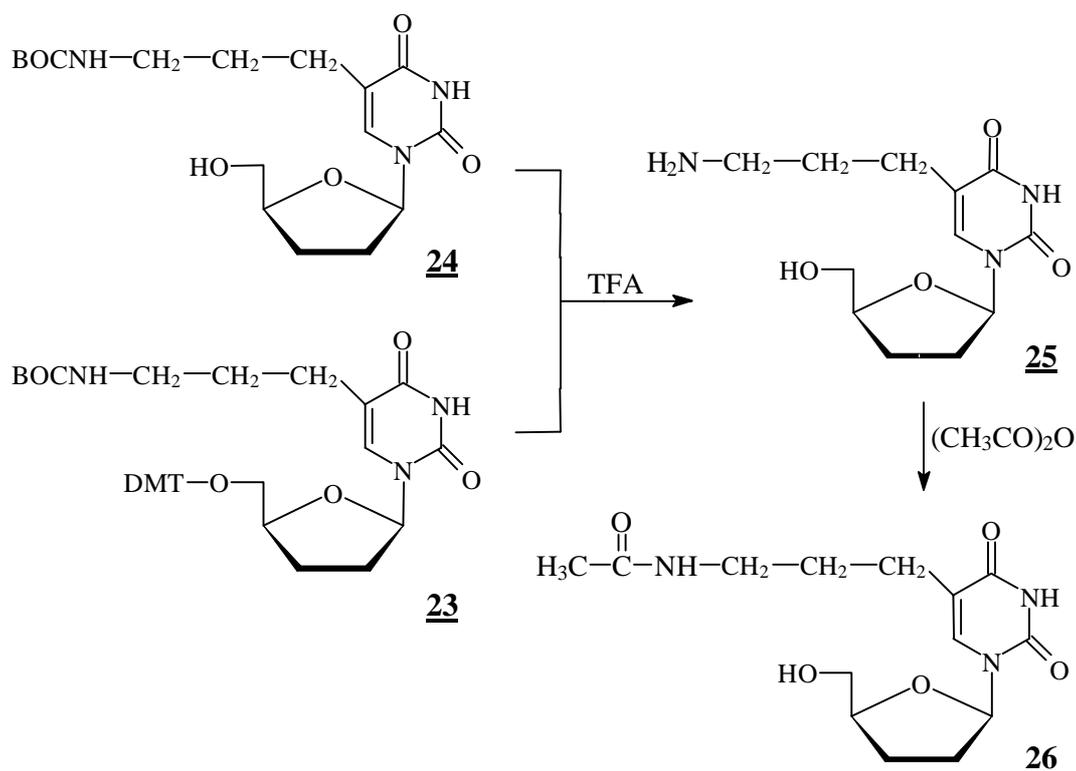


Abb. 33: Derivatisierung des Linkers

Für die zugrunde liegende Problemstellung erscheint die Einführung einer Acetylgruppe als weitere Massenmodifikation sinnvoll. Im Hinblick auf den späteren Einsatz der Verbindungen für die Multiplex-Sequenzierung sollten die Massen der Markierungen so gewählt werden, daß die Massenunterschiede zwischen den einzelnen Substanzen relativ klein und von einer Verbindung zur nächst schwereren möglichst gleich sind. Wie die Untersuchungen zum Auflösungsvermögen bei der MALDI-TOF-Analyse von Oligonucleotiden gezeigt haben, sind für eine zufriedenstellende Signalauftrennung im Massenbereich des Primers vermutlich Mindestmassendifferenzen von 30-40 Da erforderlich. Die Masse des Acetylderivates **26** liegt direkt zwischen denen der Verbindungen **24** und **25**. Ausgehend von unmarkierten ddT über **25** und **26** zu **24** beträgt die Massendifferenz zwischen den einzelnen Komponenten ca. 50 Da (vgl. Tab. 3). Die Massendifferenzen der hier dargestellten Verbindungen liegen damit im Bereich von 42 und 143 Da.

Tab. 3: Massen und Massendifferenzen der markierten 2',3'-Didesoxynucleoside **24-26** und ddT im Hinblick auf die MALDI-Analyse der Sequenzierungsprodukte

	ddT	ddT _{NH2} 25	ddT _{Ac} 26	ddT _{BOC} 24
m [Da]	226	269	311	369
Δm [Da]		43	42	58
Δm [Da]		85		
Δm [Da]			100	
Δm [Da]		143		

Die Umsetzung zum Acetylderivat erfolgte mit Essigsäureanhydrid. Um auszuschließen, daß bei der Acetylierung der Aminofunktion des Linkers eine zusätzliche Derivatisierung der 5'-Hydroxylfunktion auftritt, wurde die Reaktion nach der "transient-protection" Methode^{141,142} durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst eine Silylierung der 5'-OH-Gruppe mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl). Durch Zugabe von Essigsäureanhydrid wurde dann die freie Aminogruppe acyliert und anschließend die 5'-Hydroxylfunktion mit Ammoniak entschützt. 5-(3-acetylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin **26** konnte nach der Aufreinigung an Kieselgel in 55%-iger Ausbeute erhalten werden. Das ¹H-NMR-Spektrum zeichnet sich durch das Auftreten eines zusätzlichen Singulett-Signals der Methylgruppe des Acetylrestes bei δ = 1.98 ppm aus.

2.3 C-5 substituierte 2',3'-Didesoxycytidinderivate

Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit massenmarkierte 2',3'-Didesoxycytidinderivate über eine Uridin-Cytidin-Umwandlung der modifizierten Uridinverbindung **23** zugänglich sind.

Die Umwandlung von Thymidin (T) in Cytidin (C) ist über die Einführung eines Schwefel-Substituenten in Position 4 des Thymidins und anschließender Aminierung¹⁴³ oder aber über Chlorierung¹⁴⁴ oder Silylierung¹⁴⁵ der Position 4 mit anschließender Aminierung möglich. Reaktionen dieser Art erfordern jedoch relativ drastische Bedingungen.

Mildere Reaktionsbedingungen erlauben Umsetzungen von Uridin (oder auch Thymidin) mit 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), 3-Nitro-1,2,4-triazol oder auch 1,2,4-Triazol in Gegenwart von phosphorylierenden Reagenzien. Hierbei wird zunächst das (3-Nitro-)Triazol-Derivat des Nucleosids gebildet (in Position 4), welches sich dann anschließend durch Behandlung mit Ammoniak in die jeweilige Cytidinverbindung überführen läßt. Die Verwendung von Natriumhydroxyd, Methanol, Ethanol oder Dimethylamin anstelle von Ammoniak führt unter milden Bedingungen zu den entsprechend in Position 4 modifizierten Cytidin- oder auch 5-Methyl-Cytidin-Verbindungen^{146,147,148}, so daß bei der Aufreinigung des Triazol-Derivates derartige Reagenzien vermieden werden sollten. Reese und Mitarbeiter¹⁴⁹ demonstrierten die Umsetzung von 2',3',5'-Triacetyluridin in Gegenwart von MSNT und Diphenylphosphat. Die gleiche Umsetzung mit 3',5'-Diacetylthymidin anstelle der Uridinverbindung verlief, laut Literatur, extrem langsam mit sehr schlechten Ausbeuten, vermutlich infolge von sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Arensulfonylderivat des 3-Nitro-1,2,4-triazols und der Methylgruppe in Position 5 des Thymidins. Tatsächlich konnten mit dem sterisch weniger anspruchsvollen 3-Nitro-1,2,4-Triazol oder 1,2,4-Triazol in Gegenwart von teilchlorierten Phosphorsäureestern^{146,148} oder Phosphorylchlorid^{150,151} auch für die Umsetzung von Thymidinderivaten bessere Ergebnisse erzielt werden¹⁵².

Angesichts des sterisch anspruchsvollen Linkers in Position 5 der hier dargestellten modifizierten Uridinverbindung wurde für die Konversion zum C-5-substituierten Cytidin die Umsetzung mit 1,2,4-Triazol untersucht.

Die in der Literatur beschriebenen Ausbeuten für eine U-C- bzw. T-C-Konversion sind je nach verwendeten Reaktionsbedingungen stark unterschiedlich und erstrecken sich sowohl bei der Bildung des Triazol-Derivates als auch bei der anschließenden Darstellung der Cytidinverbindung über einen Bereich von 48-90%. Ähnlich starke Abweichungen finden sich in den beschriebenen Reaktionszeiten wieder. Hierbei scheinen Umsetzungen mit Thymidin im Vergleich zu Uridinverbindungen, speziell bei der Bildung des Triazolderivates, generell zu schlechteren Ausbeuten bei längeren Reaktionszeiten zu führen. Vergleichbare Effekte treten für die Reaktion von 5'-DMT-geschützten Pyrimidinnucleosiden auf.

Im Hinblick auf kurze Reaktionszeiten und gute Ausbeuten, erscheint es daher angebracht, zunächst die Reaktionsbedingungen zu optimieren. **23** stellt im Vergleich zu leicht zugänglichem Uridin oder Thymidin eine relativ arbeits- und kostenintensive Verbindung dar. Somit ist es naheliegend, die Optimierung der Versuchsbedingungen vorerst unter Verwendung von Thymidin als Edukt durchzuführen und diese dann auf die Umwandlung von **23** in das entsprechende Cytidinderivat zu übertragen. Thymidin ist hierfür besser geeignet als

Uridin, da es aufgrund der Methylgruppe in Position 5 und des Fehlens der 2'-Hydroxylgruppe eine größere Analogie zu Verbindung **23** aufweist. Schutz der 5'-OH-Funktion mittels der DMT-Gruppe und der 3'-Hydroxylfunktion durch eine Acetylierung lassen ähnliche Eigenschaften in bezug auf Löslichkeit und sterischer Hinderung wie Verbindung **23** vermuten, so daß eine "gute" Übertragbarkeit der optimierten Bedingungen gegeben sein sollte.

2.3.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Wie Abb. 34 zeigt, wurde für die Darstellung des geschützten 5-Methyl-Cytidinderivats zunächst die 5'-Hydroxylfunktion des Thymidins **27** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu **28** umgesetzt. Die anschließende Acetylierung der 3'-OH-Funktion führte in 91%-iger Ausbeute zum vollständig geschütztem Nucleosid **29**. Aus sterischen Gründen wurde für die Darstellung von **30** eine Umsetzung mit 1,2,4-Triazol der Reaktion mit MSNT oder 3-Nitro-1,2,4-Triazol vorgezogen. Die Anwendbarkeit der Reaktionsbedingungen nach Sung^{152, 146} sowie nach Kim¹⁵⁰ bzw. Reese¹⁵¹ wurde im Hinblick auf eine optimale Reaktionszeit und maximale Ausbeute untersucht. Die Umsetzung nach Sung erfolgte in Pyridin mit 1,2,4-Triazol (3 Äquivalente) und 4-Chlorphenyldichlorphosphat (1.5 Äquivalente) innerhalb von 72 Stunden und führte zu einem Produktgemisch. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte deutlich, daß die Ausbeute der einzelnen gebildeten Produkte unterhalb von 40% lag, weshalb auf eine weitere Aufreinigung und genauere Quantifizierung verzichtet wurde. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß 5'-O-DMT-geschützte Thymidinverbindungen bei der Triazololylierung im allgemeinen zu schlechteren Ausbeuten führen als die entsprechenden 5'-O-Acetylverbindungen oder Uridinderivate.

Gute Ergebnisse hinsichtlich Ausbeute und Reaktionszeit lieferten Umsetzungen in Gegenwart von Phosphorylchlorid unter Reaktionsbedingungen analog zu Kim bzw. Reese. Der Einsatz eines hohen Überschusses an POCl₃ (6 Äquivalente) und 1,2,4-Triazol (28 Äquivalente) führte zu stark verkürzten Reaktionszeiten. Während Kim und Mitarbeiter für die Reaktion von 2',3'-Didesoxy-5'-O-tritylthymidin mit Triazol bei einer Reaktionsdauer von 90 Minuten eine Ausbeute von 54% erzielten, konnte durch die Verwendung milderer Bedingungen und längerer Reaktionszeiten (90 min. Rühren bei 0°C, 120 min. bei RT) bei der Umsetzung von 3'-O-Acetyl-5'-O-DMT-2'desoxythymidin **29**, das Triazolderivat **30** in 91%-iger Ausbeute isoliert werden. Dies entspricht einer nahezu quantitativen Umsetzung innerhalb von 3.5 Stunden.

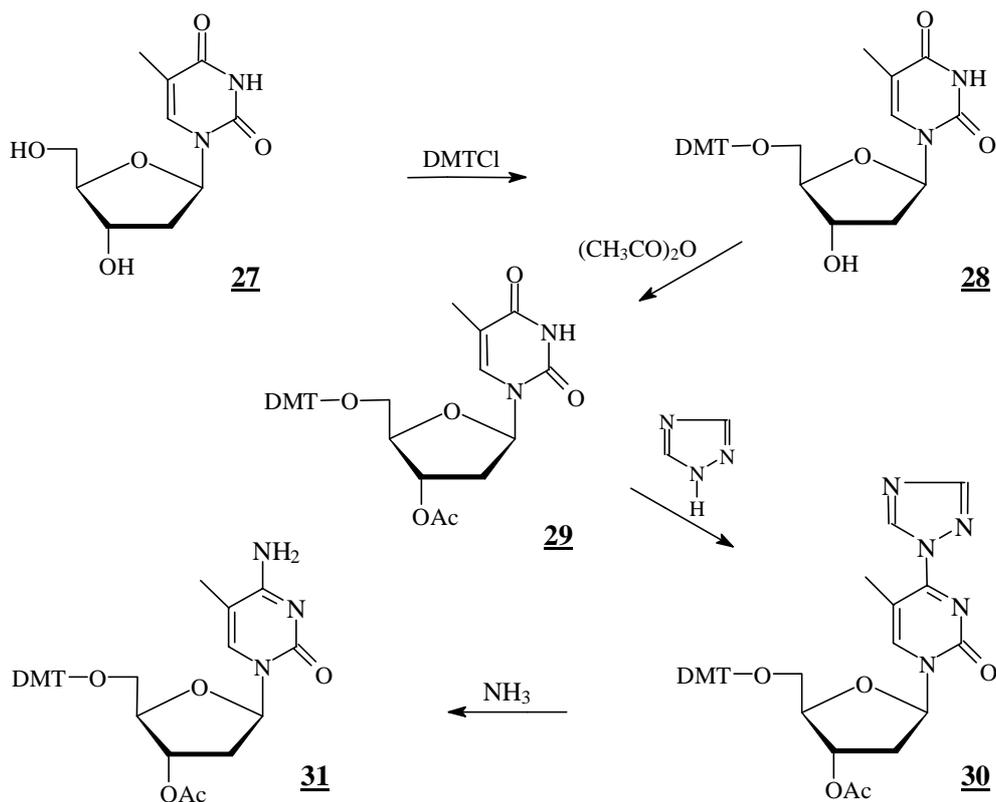


Abb. 34: Thymidin-Cytidin-Konversion

Die anschließende Aminolyse von **30** erfolgte unter den von Sung beschriebenen Bedingungen in NH₃/Dioxan (1:3 v/v) innerhalb von 45 min. Das Cytidinderivat **31** ließ sich in 87%-iger Ausbeute isolieren. Eine Abspaltung der Acetylschutzgruppe trat unter diesen Bedingungen nicht auf.

2.3.2 C-5 substituierte 2',3'-Didesoxycytidinderivate

Im folgenden wurde die Anwendbarkeit der oben geschilderten, optimierten Reaktionsbedingungen auf die Umsetzung von **23** bzw. **22** (siehe S. 69, Abb. 31) zum Triazolderivat untersucht. Die Reaktion der nicht hydrierten Verbindung **22** mit 1,2,4-Triazol bei 0°C lieferte hierbei ein Produktgemisch, bestehend aus sehr vielen Verbindungen, und wurde nicht weiter verfolgt. Die Umsetzung von **23** zu **33** (vgl. Abb. 35) hingegen verlief innerhalb von 150 min bei 0°C nahezu quantitativ. Um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden, war es vorteilhaft, die Reaktionszeit bei 0°C von 90 auf 150 min zu erhöhen. Nach

weiteren 30 min Rühren bei Raumtemperatur war die Reaktion vollständig abgelaufen. Das Triazolpyrimidinonderivat **32** konnte nach chromatographischer Aufreinigung an Kieselgel in 89%-iger Ausbeute isoliert werden. Sterische Wechselwirkungen mit dem relativ voluminösen Linker in Position 5 führten unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu keinen erwähnenswerten Auswirkungen auf die Ausbeute oder Reaktionszeit. Beide Verbindungen, sowohl **30** als auch **32**, konnten in Ausbeuten um 90% bei einer Reaktionszeit von ca. 3.5 h dargestellt werden.

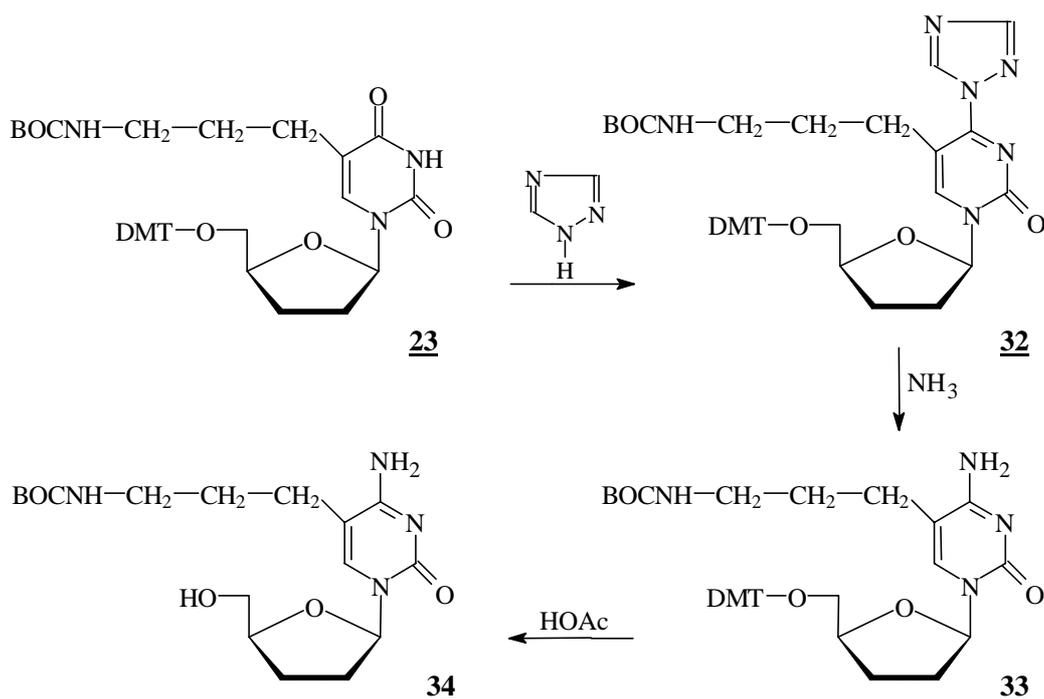


Abb. 35: Darstellung von C-5-substituierten 2',3'-Dideoxycytidin

Dünnschichtchromatographisch zeichnen sich die hier gewonnenen Triazolderivate verglichen mit den Edukten durch eine geringfügig niedrigere Mobilität aus. Während das Anfärben mit Anisaldehyd-Sprühreagenz bei den Edukten zu einer typischen Grünfärbung führt, weisen Produkte eine bräunlich-grüne Farbe auf. Charakterisierend für die Strukturen von **32** und **30** sind die beiden neu auftretenden Singulett-Signale der Triazol-Protonen. Im Gegensatz zu den ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **23** und **29** oder auch **33** und **31**, welche nur das Singulett-Signal des H6-Protons der Base bei δ= 7.8 ppm aufweisen, zeichnet sich das Spektrum der Triazolverbindungen durch das Auftreten dreier Singulett-Signale bei δ= 8.1, 8.4 und 9.3 ppm aus. Abb. 36 veranschaulicht dies an den ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **32** und **33**.

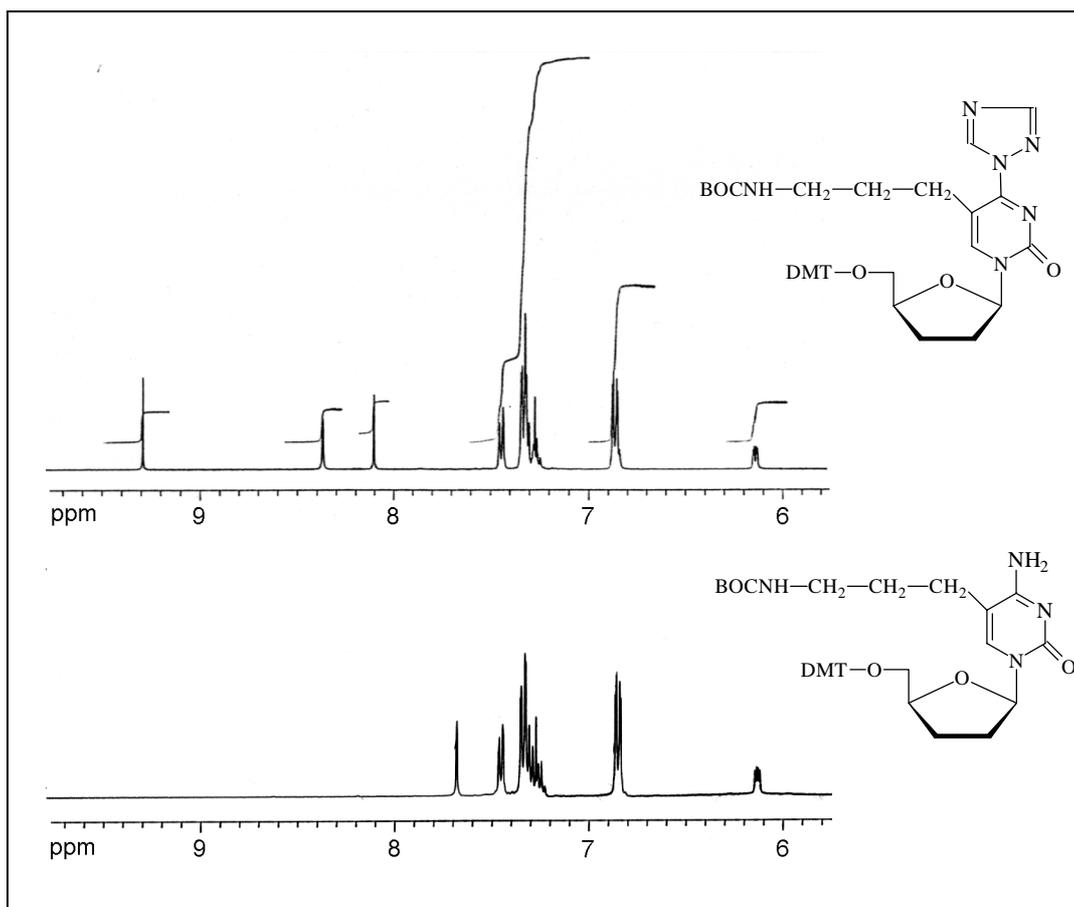


Abb. 36: Ausschnitt aus den ¹H-NMR-Spektren des Triazolderivates **32** und der daraus resultierenden Cytidinverbindung **33**

Die darauf folgende Aminolyse erfolgte in NH₃/Dioxan und führte in 68%-iger Ausbeute zu dem C-5-modifiziertem Cytidinderivat **33**. Bemerkenswert bei der Betrachtung der FAB-Massenspektren von **33** und auch **31** ist das Auftreten eines zusätzlichen [M₂+H]⁺-Signals neben dem des protonierten Moleküliions. Im Vergleich hierzu konnte bei der Vermessung von Uridinverbindungen mittels FAB-MS das Auftreten von Dimeren nicht festgestellt werden. Weiterhin ist zu bemerken, daß die chromatographische Aufreinigung des Triazolderivates für die weitere Umsetzung zur modifizierten Cytidinverbindung nicht erforderlich ist. Beide Cytidinderivate (**31** und **33**) ließen sich in vergleichbaren Ausbeuten (bezogen auf **29** und **23**) erhalten, wenn das jeweilige Rohprodukt für die Aminolyse eingesetzt wurde.

Die selektive Abspaltung der DMT-Schutzgruppe verlief in 80%-iger Essigsäure innerhalb von 2 h. Partielle Abspaltung der t-BOC-Schutzgruppe trat unter diesen Bedingungen, wie erwartet, nicht auf. 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxycytidin **34** konnte in einer Ausbeute von 71% isoliert werden.

Analog zum "Stammolekül" der Uridinverbindung **23** repräsentiert das entsprechende Cytidinderivat **33** ebenfalls eine Schlüsselverbindung. Zum einen läßt es sich nach der Dedimethoxytritylierung und Umsetzung zum Triphosphat in Sequenzierungsreaktionen als massenmarkiertes 2',3'-Didesoxynucleosid einsetzen, zum anderen ermöglicht es über die Derivatisierung des Linkers vor oder nach der Triphosphatsynthese die schnelle und einfache Darstellung weiterer Didesoxycytidinverbindungen mit definierten Massenmodifikationen.

2.4 C-3'-O-modifizierte Thymidinderivate

Wegen des beträchtlich geringeren synthetischen Aufwandes, den die Einführung der Massenmodifikation über die Derivatisierung der 3'-Hydroxylfunktion beinhaltet, wurden alternativ zu den C-5-substituierten Pyrimidinnucleosidderivaten 3'-O-modifizierte Thymidin-Verbindungen hergestellt. Als einfachste Variante bot sich eine Veresterung an. Da die Anwesenheit einer Aminofunktion die denkbare, spätere Derivatisierung ermöglicht und damit zu mehr Flexibilität führt, wurde die Umsetzung mit einer geschützten Aminosäure durchgeführt. Als Schutzgruppe kam die 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) zum Einsatz. Aufgrund ihrer Säurestabilität ermöglicht sie die selektive Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe vor der Triphosphatsynthese. Zudem repräsentiert sie einen relativ voluminösen Rest und erlaubt daher auch Untersuchungen zur Polymerase-Akzeptanz von sterisch anspruchsvolleren Modifikationen (modifizierte Triphosphate mit und ohne Amino-Schutzgruppe).

Zur Darstellung von 3'-O-modifiziertem Thymidin wurden zunächst Glycin und Alanin mit Fluorenylmethyl-succinimidylcarbonat zu den entsprechenden Fmoc-Derivaten **35** und **36** umgesetzt¹⁵³. Die Reaktionen erfolgten mit guten Ausbeuten. Die Produkte wurden mittels ¹H- und ¹³C-NMR charakterisiert. Für die anschließende Umsetzung dieser Verbindungen mit der 3'-Hydroxylfunktion des 5'-(4,4'-Dimethoxytrityl)-Thymidins (DMTT) stand zur Aktivierung der Carboxylfunktion eine Überführung zum Säurechlorid oder -anhydrid zur Diskussion. Da diese Umsetzungen einen zusätzlichen Reaktionsschritt bedeuten - hier aber auf eine möglichst einfache und schnelle Methode Wert gelegt wurde -, wurde eine direkte Kopplung der Fmoc-geschützten Aminosäure mit DMTT unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) vorgezogen. Dabei erfolgte die Reaktionsführung zunächst unter den Bedingungen nach Leikauf¹⁵⁴. N-Fmoc-Glycin und DMTT wurden in absolutem Dioxan gelöst und direkt mit DCC versetzt (molares Verhältnis von 1:1:2). Obwohl der entstehende Niederschlag des Harnstoffderivates und das Dünnschichtchromatogramm darauf hinwiesen, daß die Aktivierung der Säurefunktion mit DCC ablief, war auch nach einer

IV. Darstellung massenmarkierter Terminatoren

Reaktionszeit von 6h bei Raumtemperatur keine Umsetzung des DMTTs zum 3'-O-modifizierten Derivat zu beobachten. Aufgrund der auftretenden Schwierigkeiten wurde in einem weiteren Reaktionsansatz zunächst Fmoc-Glycin mit DCC zum symmetrischen Anhydrid umgesetzt, das entstehende Harnstoffderivat abfiltriert und das aufkonzentrierte Reaktionsgemisch (Anhydrid) zu einer Lösung von DMTT in wenig Pyridin gegeben (indirekte DCC-Methode). Doch auch hier zeigte das Dünnschichtchromatogramm nur sehr geringe Umsetzung zum gewünschten Produkt.

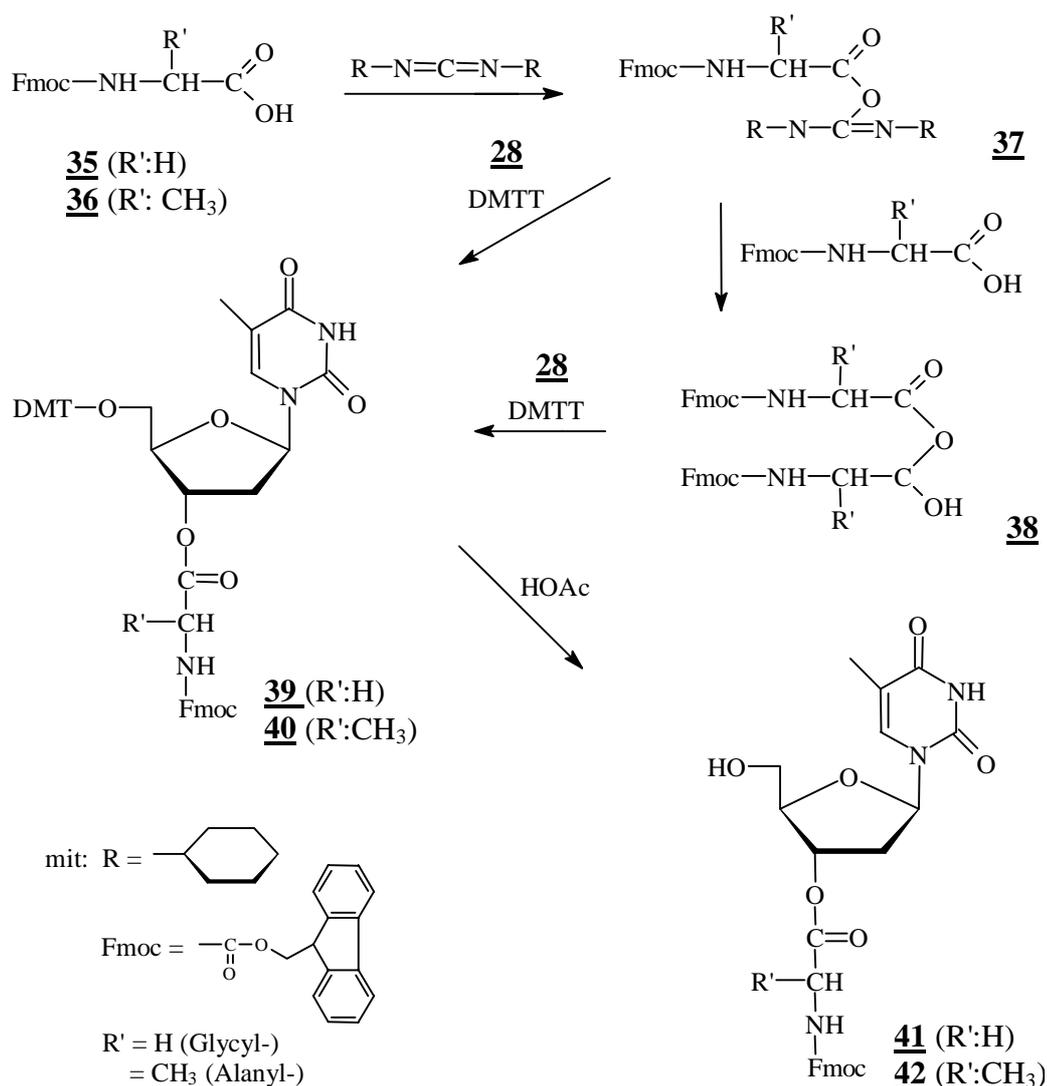


Abb. 37: Darstellung von 3'-O-(N-Fmoc-glycyl/alanyl)-2'-desoxythymidin

Bessere Ergebnisse ließen sich unter Bedingungen erzielen, die auf Untersuchungen von Hudson¹⁵⁵ zur Kopplung von geschützten Aminosäuren mittels der direkten und indirekten

DCC- (oder auch DIPCD-) Methode basieren. Analog dazu erfolgte die Voraktivierung der Fmoc-Aminosäure mit DCC in einem Lösungsmittelgemisch von Dichlormethan/DMF 1:1 (v/v). Anschließend wurde das DMTT in Pyridin direkt zu der Lösung gegeben. Reaktionsmechanismen von Carbodiimid-Kopplungen^{156,157} zeigen, daß die Reaktion sowohl über das O-Acylisoharnstoffderivat **37** als auch über das Anhydrid **38** als Zwischenstufe ablaufen kann, so daß die Verbindungen in einem molaren Verhältnis von 1:2 (DMTT/Fmoc-Aminosäure) eingesetzt wurden. Falls erforderlich, läßt sich die Ausbeute durch eine weitere DCC-Zugabe verbessern. 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(N-Fmoc-glycyl)-2'-desoxythymidin **39** und 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(N-Fmoc-alanyl)-2'-desoxythymidin **40** waren auf diesem Weg gut zugänglich. Die Rohprodukte wurden ohne weitere Aufreinigung durch Zusatz von 80 %-iger Essigsäure detrityliert und führten zu den gewünschten 3'-O-modifizierten Thymidinderivaten **41** und **42**. Die Charakterisierung der Substanzen erfolgte auch hier über NMR und MS. Tieffeldverschiebung des H3'-Protons im ¹H-NMR belegt deutlich die Derivatisierung in Position 3 (5.29 ppm beim Glycyl- bzw. 5.27 ppm beim Alanylderivat gegenüber 4.55 ppm bei DMTT). Auch das Triplett-Signal für das NH-Proton (7.79 ppm) und das Dublett-Signal der beiden Protonen der CH₂-Gruppe des Glycins (3.84 ppm) erfahren eine leichte Verschiebung zu tieferem Feld (gegenüber 7.64 und 3.68 ppm für N-Fmoc-Glycin). Entsprechendes gilt für das Alaninderivat.

Als Alternative zu den zuvor synthetisierten Estern wurde zusätzlich eine Veretherung in Betracht gezogen. Alkylierung der 3'-Hydroxyfunktion ist z.B. durch Umsetzung mit Diazomethan¹⁵⁸ oder auch mit primären Alkylhalogeniden¹⁵⁹ möglich. Hier wurde die Umsetzung mit 2-Methoxyethoxy-methylchlorid (MEMCl), welches als Schutzgruppe für primäre, sekundäre und auch tertiäre Alkohole Verwendung findet, gewählt (vgl. Abb. 38). Die Reaktion erfolgte in Dichlormethan unter Zusatz von Diisopropylethylamin¹⁶⁰. Gegenüber den Literatursausbeuten für die Einführung der MEM-Schutzgruppe (~95%) lief die Umsetzung mit DMTT jedoch nur mit sehr geringer Ausbeute ab (43.5%). Weitere Zugabe von Diisopropylethylamin und/oder MEMCl bei verlängerter Reaktionszeit führte zwar zu einer weiteren Umsetzung des Produktes, aber auch zur Bildung von Nebenprodukten, so daß die Produktausbeute auf diese Weise nicht erheblich gesteigert werden konnte. Das ¹³C-DEPT-NMR der Verbindung **43** wies im Vergleich zum DMTT-Spektrum drei zusätzliche sekundäre C-Signale bei 69.9, 71.4 und 71.9 ppm und ein zusätzliches tertiäres C-Signal bei 59.2 ppm auf, welche deutlich die Anwesenheit der CH₃O((CH₂)₂)OCH₂-Gruppe belegen.

Die anschließende Dedimethoxytritylierung erfolgte in 80%-iger Essigsäure. Das Dünnschichtchromatogramm demonstrierte die quantitative Abspaltung der DMT-Schutzgruppe. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Produktes **44** traten jedoch erhebliche Schwierigkeiten bei der Aufreinigung auf. Als alternatives Aufreinigungsverfahren

bietet sich die Extraktion des abgespaltenen 4,4'-Dimethoxytritylhydroxids mit Dichlormethan und nachfolgende gelpermeationschromatographische Trennung der neutralisierten, eingengteten wässrigen Phase unter ähnlichen Bedingungen, wie sie für die Aufreinigung des Acetylderivates **47** (s. Abb. 33, S. 73) verwendet wurden, an. Diese Untersuchungen wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

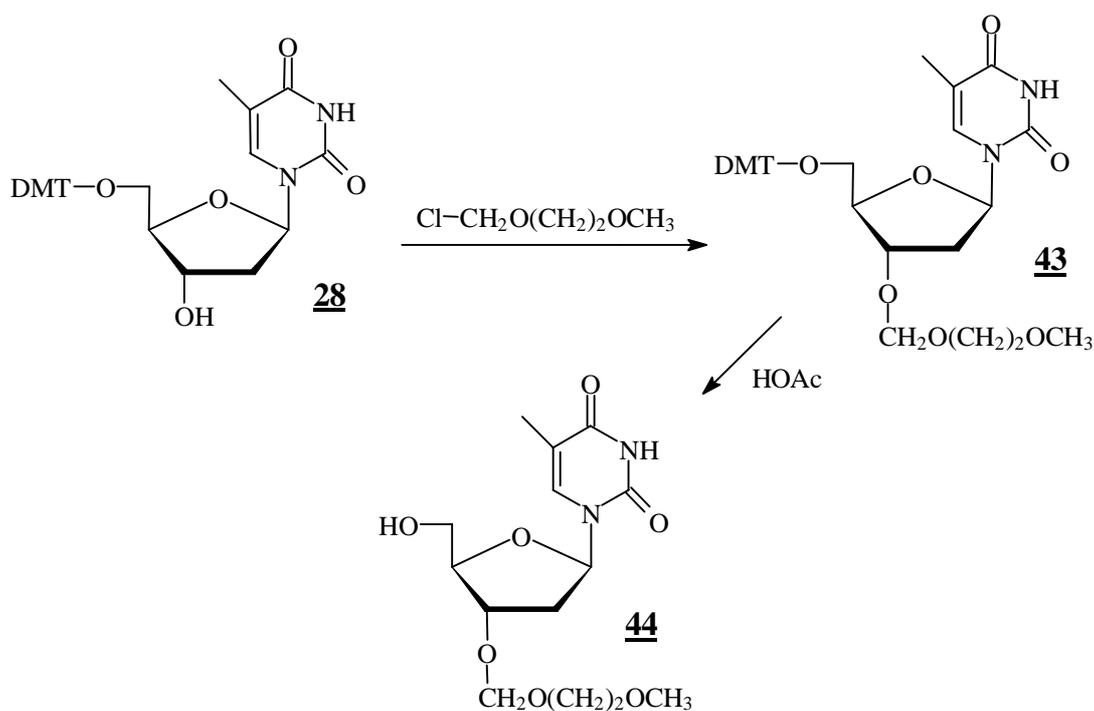


Abb. 38: Darstellung von 3'-O-(2-methoxy-ethoxy-methyl)-2'-desoxythymidin.

2.5 Massenmarkierte 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate

2.5.1 Nucleosid-5'-triphosphate

Nucleosid-5'-triphosphate sind sowohl durch enzymatische^{161,162} als auch durch chemische Umsetzungen zugänglich. Speziell für die Darstellung modifizierter 5'-Triphosphate erscheint jedoch die chemische Methode zweckmäßiger. So ist bei enzymatischen Umsetzungen nur schwer abzuschätzen, ob das modifizierte Nucleosid als Substrat akzeptiert wird und eine ausreichende Umsetzung stattfindet. Zudem läßt sich das Produkt nur in geringen Mengen isolieren, was die Charakterisierung deutlich erschwert.

Eine gängige Methode zur Darstellung von Triphosphaten basiert auf der Aktivierung eines Nucleosid-5'-monophosphates und anschließender Kondensation mit Pyrophosphat. Als kondensierendes Agens kann hierbei z.B. DCC/Morpholin¹⁶³, Diphenylchlorphosphat¹⁶⁴ oder auch 1,1'-Carbonyldiimidazol¹⁶⁵ verwendet werden. Diese Zwei-Stufen-Synthesen sind jedoch relativ zeit- und arbeitsaufwendig (allein die Kondensation mit Pyrophosphat benötigt 24 h) und erfordern zudem die Einführung von Schutzgruppen für die 2'- und 3'-Hydroxylfunktion sowie für die exocyclischen Aminogruppen der Base.

Schneller und effizienter ist die Reaktion mit Phosphorylchlorid zum Nucleosid-5'-dichlorphosphat und anschließende direkte Umsetzung mit Pyrophosphat in DMF nach einem Eintopfverfahren. Die Phosphorylierung mit POCl₃ in Trialkylphosphaten verläuft hierbei regioselektiv an der 5'-Hydroxylfunktion des Nucleosids¹⁶⁶, weshalb die Einführung von Schutzgruppen nicht notwendig ist. Für die direkt anschließende Umsetzung des Nucleosid-5'-dichlorphosphats zum 5'-triphosphat werden die Bis-¹⁶⁷, Tris-¹⁶⁸ oder auch Tetrakis¹²⁶-(tri-n-butylammonium)-salze des Pyrophosphats in DMF eingesetzt.

Eine ähnlich schnelle und effektive Methode zur Darstellung von Triphosphaten beruht auf der Phosphitylierung der 5'-Hydroxylfunktion des Nucleosids mit 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on¹⁶⁹. Das gebildete Zwischenprodukt läßt sich mit Pyrophosphat zum P²,P³-dioxo-P¹-5'-nucleosidylcyclotriphosphit umsetzen, welches dann durch Iod-Oxidation und Hydrolyse zum Triphosphat führt. Im Vergleich zur oben beschriebenen Methode verläuft diese Reaktion nicht regioselektiv. Dennoch kann auf die Verwendung von Basenschutzgruppen verzichtet werden. Die Einführung von Schutzgruppen für die 2'- bzw. 3'-Hydroxylfunktion ist unentbehrlich, aber für die hier durchzuführende Umsetzung von 2',3'-Didesoxynucleosidderivaten nicht relevant. Aus diesem Grund stellt dieses Verfahren eine gute Alternative zur oben beschriebenen regioselektiven Synthese dar.

2.5.2 *Triphosphatsynthese*

Die Darstellung der 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphate erfolgte nach einem Protokoll, welches ursprünglich für die regioselektive Phosphorylierung von Uridintriphosphat ausgearbeitet wurde¹⁷⁰ (Umsetzung mit POCl₃ und Tetrakis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat). Synthese- und Aufreinigungsbedingungen wurden dabei zunächst anhand der Darstellung von UTP untersucht. Die Umsetzung zum monophosphoryliertem Produkt konnte dünn-schichtchromatographisch gut verfolgt werden (Kieselgel-Folie, Laufmittel: CHCl₃/MeOH: 3:1). Für die Auftrennung von Mono-, Di- und Triphosphat zur Reaktionskontrolle der Triphosphatsynthese wurden mit Hilfe von käuflich

erworbenen UMP, UDP und UTP unterschiedliche DC-Systeme untersucht. Die besten Ergebnisse lieferte die Trennung an PEI-Cellulose-beschichteter Folie, welche nach dem Auftragen der Substanzen für 2 min. in 0.2M, 6 min. in 1.0M und 30 min. in 1.6M wässriger LiCl-Lösung entwickelt wurde (R_f -Werte: UMP: 0.64, UDP: 0.54, UTP: 0.44). Auch RP-18 F₂₄₅S-Folien, die in 2M HCL entwickelt wurden, erlaubten den Nachweis von UMP, UDP und UTP, wobei die beiden letzteren jedoch, infolge der ähnlichen R_f -Werte, lediglich unter optimalen Bedingungen aufgetrennt werden konnten (R_f -Werte: UMP: 0.65, UDP: 0.84, UTP: 0.87). Eine bessere Trennung konnte mit Standard-Kieselgel-Folie und dem Laufmittel: 2-Propanol/Ammoniak (25%)/ Wasser: 3:1:1 erzielt werden (R_f -Werte: UMP: 0.2, UDP: 0.1, UTP: 0.02). Da es sich hierbei um die kostengünstigste und einfachste Variante handelt, wurden für die nachfolgenden Synthesen hauptsächlich diese Bedingungen verwendet.

Die chromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches sollte an DEAE-Cellulose erfolgen und wurde ebenfalls zunächst mit Hilfe einer Standardlösung von Uridin-5'-mono-, -di- und -triphosphat optimiert (1ml einer Lösung von jeweils 2 mg/ml). Unter den im *Experimentellen Teil* angegebenen Bedingungen konnten Grundlinien-getrennte Signale für Mono- Di- und Triphosphat erhalten werden. Die Verbindungen eluierten bei 0.22, 0.28 und 0.34 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (TEBK)-Puffer.

Als Alternative zur Dünnschichtchromatographie war ebenfalls eine Reaktionsverfolgung mittels HPLC denkbar. So konnte eine Standardlösung von UMP, UDP und UTP mittels RP-HPLC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0-15% Acetonitril innerhalb von 20 min. aufgetrennt werden (Laufmittel: 0.1M Triethylammoniumacetatpuffer/Acetonitril, Retentionszeiten: UMP: 4.9 min., UDP: 5.4 min, UTP: 6.1 min.). Um gegebenenfalls sehr kleine Reaktionsansätze über RP-HPLC aufzureinigen zu können, wurden diese Bedingungen auf die präparative RP-HPLC übertragen. Die Auftrennung der drei Substanzen war hier unter gleichen Bedingungen nicht möglich, ließ sich aber durch die Verwendung eines nicht-linearen Gradienten (0-15% Acetonitril innerhalb von 30 min.) erzielen.

Zur Darstellung modifizierter Nucleosid-5'-triphosphate wurden die Verbindungen **24**, **26**, **34**, **41** und **42** zunächst mit POCl₃ in Acetonitril in Gegenwart von pulverisiertem Molekularsieb zu den Nucleosid-5'-dichlorphosphaten umgesetzt. Aufgrund der guten Löslichkeiten der 2',3'-Didesoxynucleoside **24**, **26** und **34** in Acetonitril verliefen die Monophosphorylierungen hier innerhalb von 2 h nahezu quantitativ. Die direkt folgende Kondensation mit Tetrakis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat fand in DMF statt und verlief ebenfalls innerhalb von 2 h. Die Aufreinigung erfolgte über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose mittels Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer als Laufmittel (lin. Gradient: 0.1-0.4M). Lyophilisation der gesammelten Fraktionen führte zu den farblosen, amorphen

Triethylammoniumsalzen der gewünschten Produkte **45**, **46** und **47** (siehe Abb. 39).

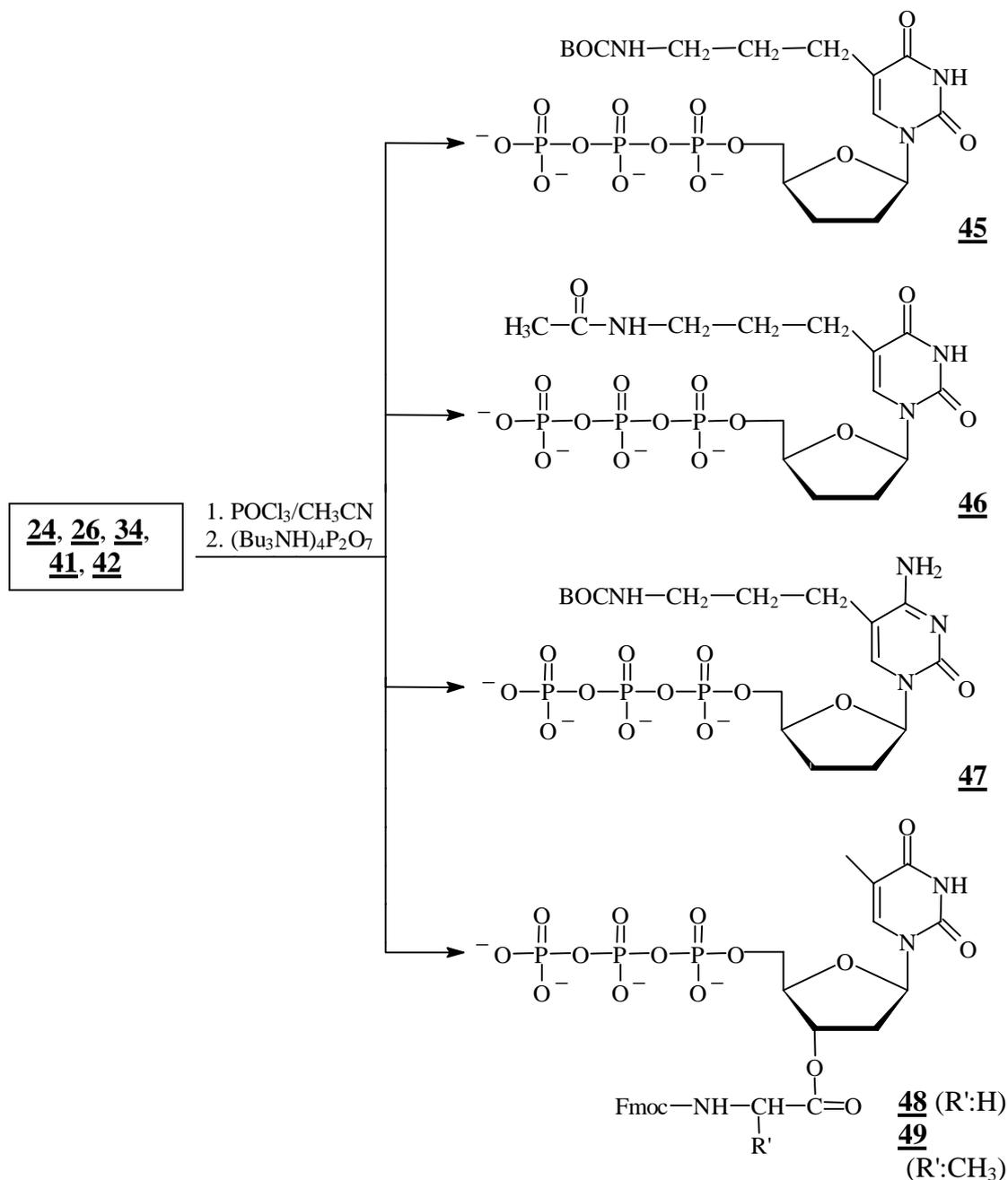


Abb. 39: Umsetzung zu den modifizierten Pyrimidinnucleosid-5'-triphosphaten

Demgegenüber traten bei der Umsetzung der 3'-O-modifizierten-Nucleoside überraschenderweise Probleme auf. Infolge der schlechten Löslichkeit der Fmoc-Derivate in Acetonitril verlief die Umsetzung zum Nucleosid-5'-dichlorphosphat selbst bei verlängerten

Reaktionszeiten und/oder erhöhter POCl_3 -Zugabe nur sehr schlecht. Die nachfolgende Kondensation mit Tetrakis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat führte daher hauptsächlich zu Verbindungen, die bei der Aufreinigung an DEAE-Cellulose sehr viel später eluierten ($>0.4\text{M}$ TEBK-Puffer, vermutlich Polyphosphate). Da die Fmoc-Derivate in DMF oder auch DMF-Gemischen relativ gut löslich sind, lassen sich möglicherweise durch die Verwendung von DMF anstelle des Acetonitrils als Lösungsmittel bessere Ergebnisse für die Monophosphorylierung und damit auch für die anschließende Umsetzung zum Triphosphat erzielen. Als Alternative zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wäre ebenfalls die vorherige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit anschließender Darstellung des Triphosphats oder aber die Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein, basierend auf der Umsetzung mit 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in Pyridin/DMF, denkbar. Diese Untersuchungen stehen noch aus und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Die Charakterisierung der Substanzen **45** – **47** erfolgte mittels ^{31}P -NMR, UV-Absorption und IE-HPLC. Zwar wurde zunächst eine Charakterisierung über RP-HPLC nach den oben beschriebenen Bedingungen für die Auftrennung von UMP/UDP/UTP in Betracht gezogen, die Analyse der Produkte über IE-HPLC unter den im *Experimentellen Teil* angegebenen Bedingungen erwies sich jedoch als deutlich überlegen. So zeigte das Dünnschichtchromatogramm der an DEAE-Cellulose aufgereinigten Triphosphat-Fraktion der Verbindung **45** (und auch **47**) im Gegensatz zu Verbindung **46** eine sehr geringe Verunreinigung mit niedrigerem R_f -Wert an. Die Untersuchung dieser Fraktion (Verbindung **45**) mittels RP-HPLC führte zu einem einzigen Signal. Die chromatographische Auftrennung war hier, vermutlich aufgrund der geringen Polaritätsunterschiede der Substanzen, nicht möglich. Während die Verunreinigung der bei der Aufreinigung an DEAE-Cellulose gewonnenen Triphosphat-Fraktion laut DC sehr gering war, bestanden die beiden Fraktionen, die direkt davor und danach eluiert wurden (vermutlich Di- und Polyphosphat), gemäß dem Dünnschichtchromatogramm eindeutig aus zwei Verbindungen. Auch hier war eine Auftrennung über RP-HPLC nicht möglich. Demgegenüber konnten diese Substanzen über IE-HPLC mit den gewählten Bedingungen sehr gut aufgetrennt werden.

Die IE-HPLC-Chromatogramme der Verbindungen **45-47** sind in Abb. 40 dargestellt. Tab. 4 gibt die Retentionszeiten der hier dargestellten modifizierten Verbindungen im Vergleich zu käuflich erworbenen Didesoxythymidin- und -cytidin-5'-triphosphaten wieder.

IV. Darstellung massenmarkierter Terminatoren

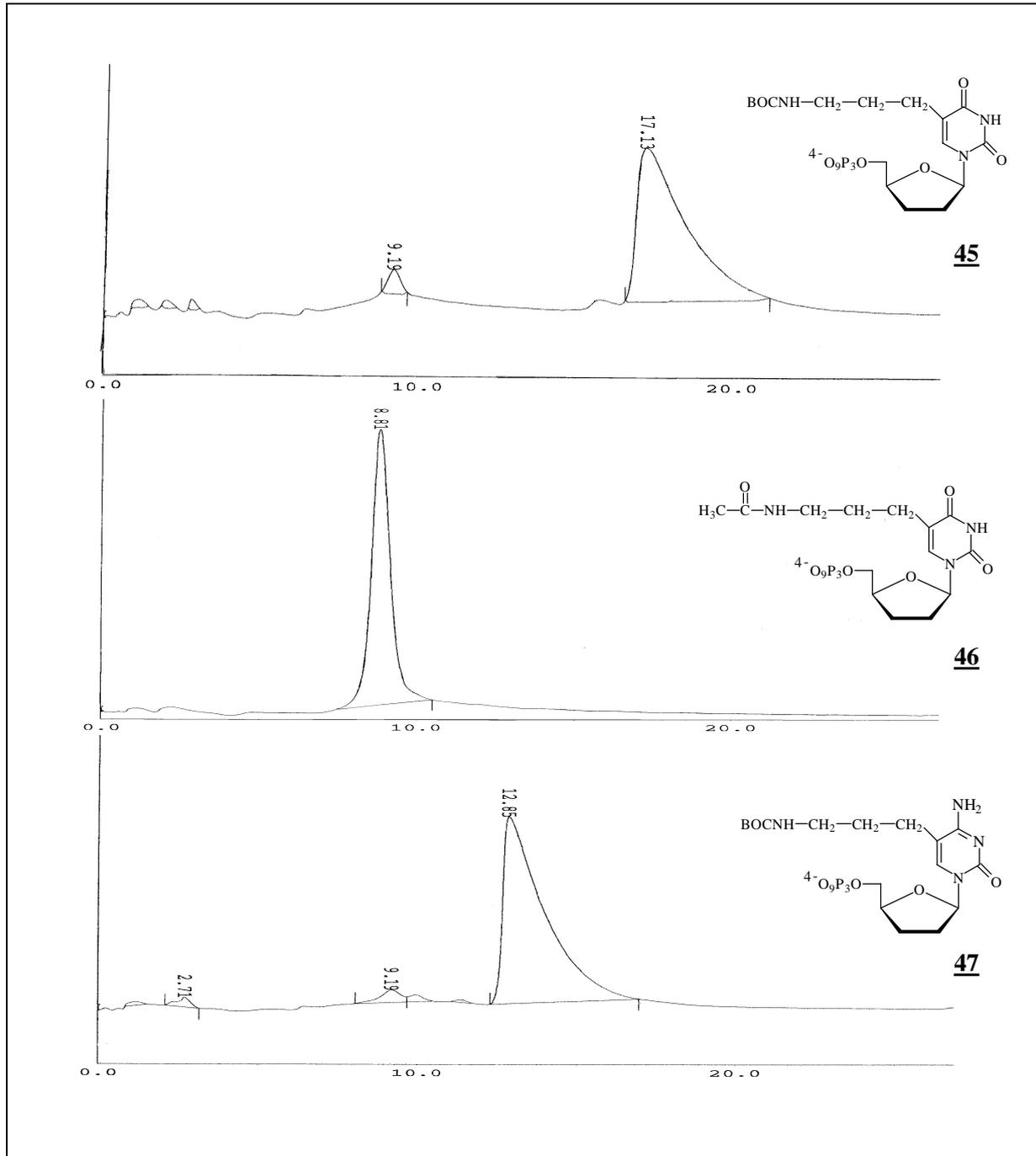


Abb. 40: IE-HPLC-Chromatogramme der modifizierten 2',3'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphate **45-47**. HPLC-Bedingungen: Laufmittel: Puffer A: 25 mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0.3 M NaCl, pH 8; Puffer B: wie A nur 1 M NaCl; Lauf: 5 min isokratisch 10% B, anschließend 10-30%B in 20 min mit einer Flußrate von 100µl/min (siehe auch S. 157: IE-HPLC)

Tab. 4: Retentionszeiten (IE-HPLC) der Verbindungen **45-47** im Vergleich mit ddTTP und ddCTP

Verbindung:	45 (<i>ddT_{BOC}TP</i>)	ddTTP	46 (<i>ddT_{Ac}TP</i>)	ddCTP	47 (<i>ddC_{BOC}TP</i>)
Retentionszeit [min]:	17.13	11.21	8.81	11.09	12.85

Wie Tab. 4 zu entnehmen ist, liegen die Retentionszeiten der Verbindungen **46** (*ddT_{Ac}TP*) und **47** (*ddC_{BOC}TP*) durchaus im Bereich der Retentionszeiten von ddTTP und ddCTP. 5-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin-5'-triphosphat **45** hingegen wurde erst sehr viel später bei 17.13 min eluiert. Dies ist um so erstaunlicher, da ddTTP und ddCTP unter den gewählten Bedingungen recht ähnliches Laufverhalten zeigen (11.21 und 11.09 min). Daher wurde zunächst angenommen, daß der Einfluß des Linkers mit *t*-BOC-Schutzgruppe bei beiden Verbindungen -**45** und **47**- zu den gleichen Verschiebungen in der Retentionszeit führt. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zum Cytidinderivat, welches bei 12.85 min, also nur wenig später als ddCTP, eluiert wurde, weist die entsprechende Uridinverbindung eine sehr viel höhere Retentionszeit auf.

Bei der Betrachtung der abgebildeten Chromatogramme (s. Abb. 40) ist auffallend, daß die Signale der *t*-Butyloxycarbonylderivate - **45** und **47**- sich im Gegensatz zu denen anderer 5'-Triphosphate durch ein sehr starkes Tailing auszeichnen. Dies ist bei der Uridinverbindung noch sehr viel stärker ausgeprägt als bei dem Cytidinderivat. Zudem tritt neben dem Hauptsignal bei 12.85 min (**47**) bzw. 17.13 min (**45**) bei beiden Verbindungen ein weiteres Signal bei 9.19 min auf, dessen Peakfläche bei *ddC_{BOC}TP* 2.9 bei *ddT_{BOC}TP* 3.5% der Gesamtfläche beträgt.

Um zu überprüfen, ob dieses Signal auf Verunreinigungen der 2',3'-Dideoxynucleosidtriphosphate oder aber auf eine partielle Zersetzung unter den gegebenen HPLC-Bedingungen zurückzuführen ist, wurden beide Verbindungen (Verb. 1= 9.19 min; Verb. 2=12.85 min beim Cytidinderivat bzw. 9.19 und 17.13 min beim Uridinderivat) getrennt aufgefangen, lyophilisiert, mittels Gelfiltration entsalzt und erneut der IE-HPLC-Analyse unterzogen. Während die Verbindungen mit den Retentionszeiten von 9.19 min nur ein Signal mit exakt dieser Retentionszeit zeigten, wurde für die aufgetrennten, entsalzten Proben, die bei 12.85 min (C-Derivat) bzw. 17.13 min (U-Derivat) eluierten, dieselben Chromatogramme wie in Abb. 40 erhalten. Auch hier trat zusätzlich das Signal bei 9.19 min in vergleichbarer Größe auf. Es handelt sich hierbei also nicht um eine Verunreinigung der Verbindungen **45** und **47**, sondern vielmehr um ein Zersetzungsprodukt, welches unter den gegebenen Bedingungen

direkt aus dem Hauptsignal bei 12.85 bzw. 17.13 min gebildet wird. Dieser Effekt tritt lediglich bei den *t*-Butyloxycarbonyl-derivaten (**45** und **47**) auf. Da die *t*-BOC-Gruppe bei pH 8 durchaus stabil ist und zudem die Retentionszeiten der entschützten Verbindungen **48** und **49** bei 2.12 min liegen (s. Abb. 42, S. 91), läßt sich eine partielle Abspaltung der Schutzgruppe als Zersetzungsprodukt mit einer Retentionszeit von 9.19 min definitiv ausschließen.

2.5.3 Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonylgruppe

Wie zuvor unter Derivatisierung des Linkers auf S. 72 demonstriert, ist der in der Synthesepaltung vorgestellte Syntheseweg b), der die Abspaltung der beiden Schutzgruppen (BOC- und 5'-DMT-Schutzgruppe) mit nachfolgender Derivatisierung der freien Aminofunktion des Linkers und Umsetzung zum Triphosphat umfaßt, gut durchführbar. Für den Syntheseweg c) konnte gezeigt werden, daß die selektive Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe mit anschließender Triphosphatsynthese ebenfalls realisierbar ist. Aufgrund der relativ geringen Stabilität von 5'-Nucleosidtriphosphaten war jedoch nicht sicher, ob oder inwieweit diese unter den Abspaltungsbedingungen der *t*-BOC-Schutzgruppe stabil sind. Dies sollte im folgenden überprüft werden:

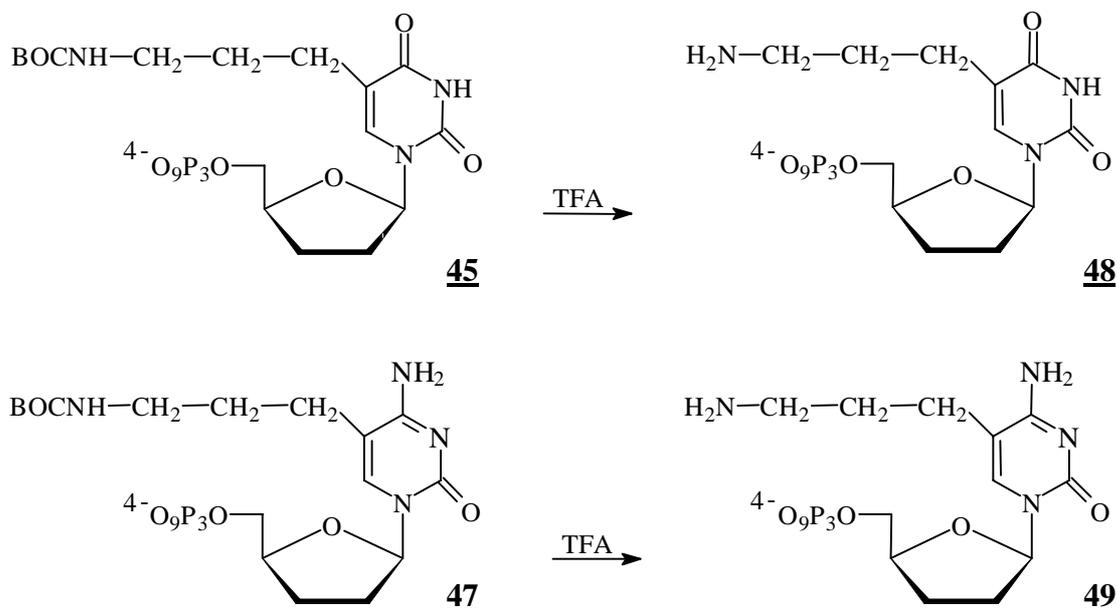


Abb. 41: Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe

Zur Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonylgruppe wurden 10 μ l einer 5mM Lösung von **45** bzw. **47** lyophilisiert und der Rückstand mit Trifluoressigsäure behandelt. Kurze Reaktionszeiten von 2-3 min und anschließende Lyophilisation führten zu den entschützten 5'-Triphosphaten **48** und **49** (siehe Abb. 41).

Wie die in Abb. 42 dargestellten IE-HPLC-Chromatogramme demonstrieren, verlief die Abspaltung quantitativ. Schon nach 3 min Reaktionszeit waren die Signale der *t*-Butyloxycarbonylderivate mit einer Retentionszeit von 17.13 bzw. 12.85 min nicht mehr detektierbar. Statt dessen tritt bei beiden Verbindungen **48** und **49** ein scharfes Signal bei 2.12 min auf (vgl. Abb. 40 Verb.: **45/47** und Abb. 42). Daraus läßt sich folgern, daß das starke Tailing der Signale von **45** und **47** sowie die auffallend unterschiedlichen Retentionszeiten dieser beiden Verbindungen tatsächlich auf die Anwesenheit der *t*-Butyloxycarbonylgruppe zurückzuführen ist.

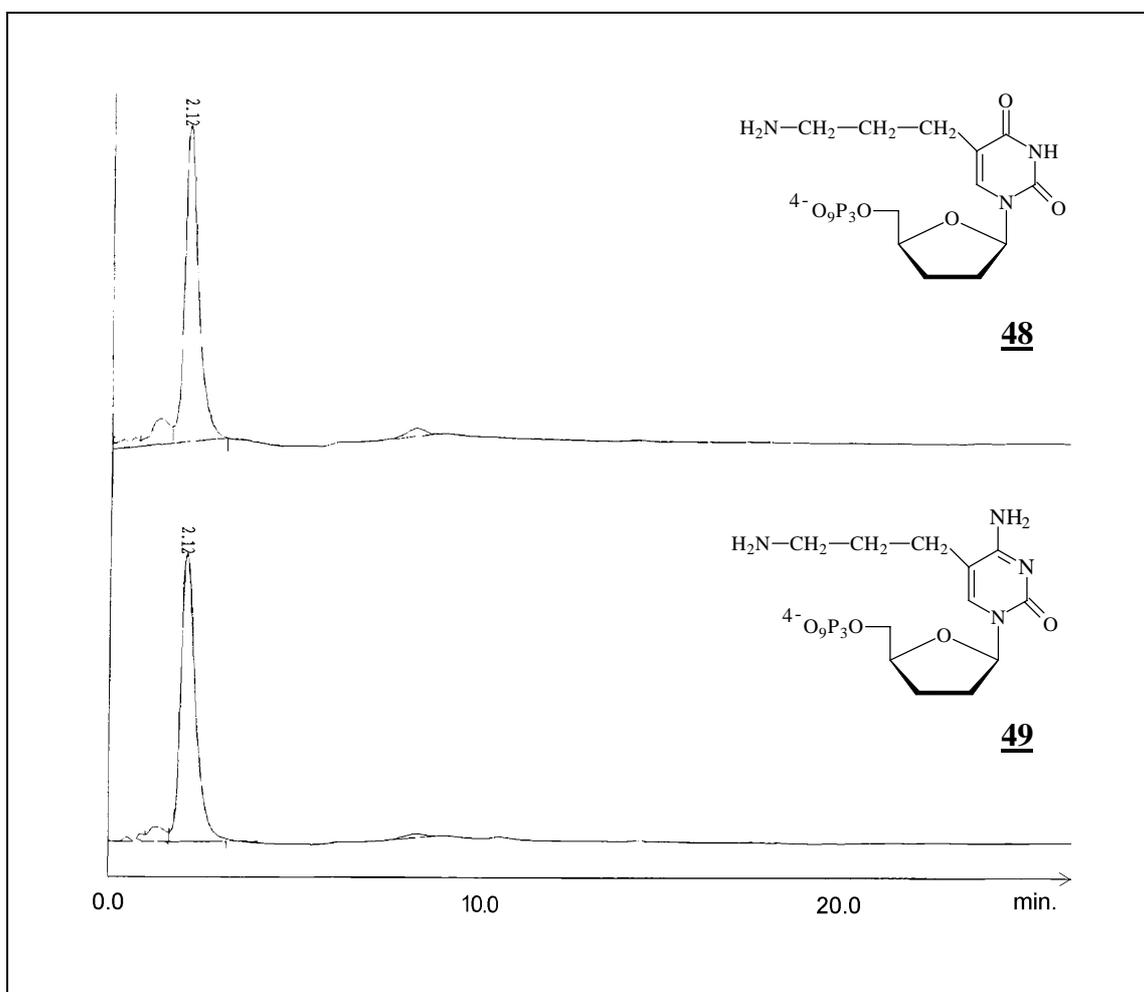


Abb. 42: IE-HPLC-Chromatogramme der modifizierten 2',3'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphate **48** und **49**. (HPLC-Bedingungen: siehe Abb. 40 oder S. 157, IE-HPLC)

Aufgrund der kurzen Reaktionszeit wurde die Bildung von Nebenprodukten vermieden. Da es sich bei den Abspaltungsprodukten um gasförmige Komponenten handelt (Isobuten und Kohlendioxid) und die Trifluoressigsäure durch Lyophilisation entfernt werden konnte, wurden die Produkte **48** und **49** ohne weitere Aufreinigung für die Sanger-Sequenzierung eingesetzt.

2.5.4 Stabilität der modifizierten 5'-Triphosphate unter MALDI-Bedingungen

Für den Einsatz als massenmarkierte Terminatoren bei der MALDI-TOF-Analyse von Sequenzierungsprodukten ist die Stabilität der Verbindungen, speziell der Massenmarkierung, unter MALDI-Bedingungen ein wichtiges Kriterium. Um diese schon möglichst vor der Verwendung der Substanzen in Sequenzierungsreaktionen zu überprüfen, wurden 10, 100 und 500 μM Lösungen der C-5-modifizierten Didesoxynucleosidtriphosphate mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Die Verbindungen lagen in Form ihrer Triethylammoniumsalze vor. Als Matrices kamen 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure zum Einsatz. Die Spektrenaufnahme erfolgte im positiven Ionenmodus mit reflektierender Geometrie, analog zu den später gewählten Bedingungen für die Analyse von Sequenzierungsprodukten. Da bei der MALDI-TOF-MS-Analyse von Oligonucleotiden, die in Form ihrer Ammonium- oder auch Triethylammoniumsalze vorliegen, stets das einfach geladene Molekülion der freien Säure detektiert wird, wurde auch hier das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal der freien Säure ($[\text{H}_4\text{P}_3\text{O}_9\text{-OR} + \text{H}]^+$) oder aber Signale der entsprechenden Na/K-Addukte dieser Verbindung erwartet (Triethylamin verdampft während des MALDI-Prozesses). Aufgrund der relativ geringen Stabilität von Nucleosidtriphosphaten war es zudem wahrscheinlich, daß das Molekülion der Triphosphatverbindung unter Verlust einer oder mehrerer Phosphatgruppen fragmentiert. Weder mit 3-HPA noch mit 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure als Matrix konnten Signale nachgewiesen werden, die mit den Massen der Molekül- oder Fragmentionen der zu analysierenden Probe korrelierten. Lediglich intensive Matrixsignale traten hier auf. Gute Ergebnisse hingegen lieferte die MALDI-MS-Analyse unter Einsatz von DHB als Matrix. Abb. 43 zeigt das Massenspektrum der Verbindung **45** (*ddT_{BOC}TP*). Das Molekülionensignal der freien Säure ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber.}}$: 610.4 Da) konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Analyse der 500 μM Lösung wurde das $[\text{M}-2\text{H}+3\text{Na}]^+$ -Signal detektiert, allerdings lediglich in sehr geringer Intensität. Statt dessen traten Signale von Fragmentionen auf, die eindeutig die vollständige Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe dokumentieren. So konnten Signale der Masse des Tri- Di- und Monophosphates der Verbindung **45** ohne *t*-BOC-Gruppe detektiert werden und zwar sowohl mit H^+ als auch mit allen denkbaren Variationen von Na^+ und K^+ als Gegenionen.

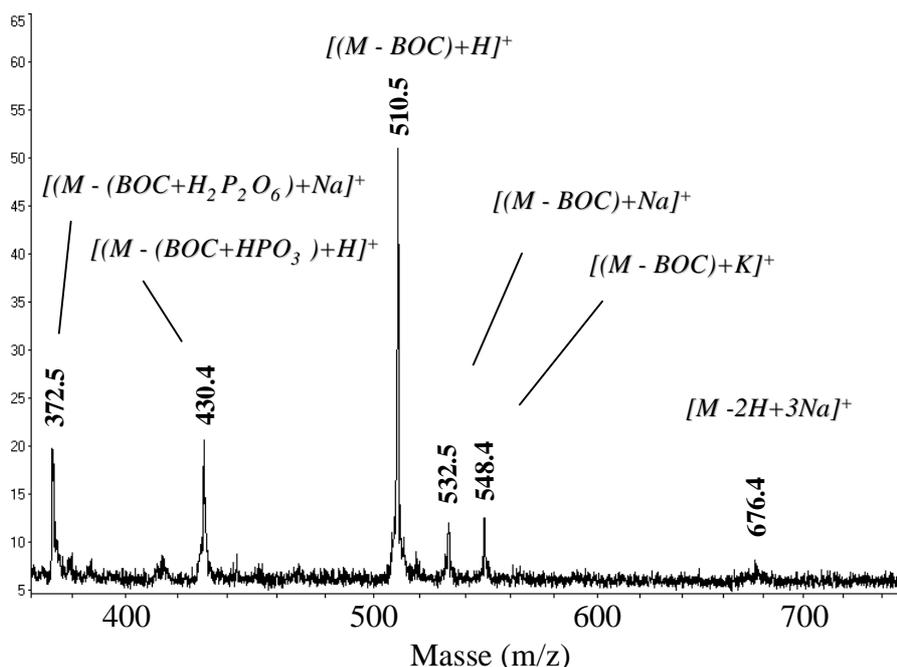


Abb. 43: Ausschnitt aus einem MALDI-RTOF-Spektrum der Verbindung 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin-5'-triphosphat (**45** (*ddT_{BOC}TP*)). Signale bei 510.5, 532.5 und 548.4 Da demonstrieren die Abspaltung der t-Butyloxycarbonylgruppe unter MALDI-Bedingungen (berechnete Werte: s: Tab. 5). Die Signale mit einer Masse von 372.5 und 430.4 Da repräsentieren die einfach geladenen Molekülionen des Mono- und Diphosphatderivates dieser "entschützten" Verbindung. Als Matrix diente DHB.

Tab. 5: Experimentell bestimmte und berechnete Massen der Molekülionen- bzw. Fragmentionensignale von Verbindung **45** (*ddT_{BOC}TP*).

Molekül-/Fragmentionen	Berechnet [Da]	Experimentell [Da]
$[M-2H+3Na]^+$	676.3	676.4
$[M+H]^+$	610.4	-----
$[M-BOC+K]^+$	548.3	548.4
$[M-BOC+Na]^+$	532.3	532.5
$[M-BOC+H]^+$	510.3	510.5
$[M-(BOC+HPO_3)+H]^+$	430.3	430.4
$[M-(BOC+H_2P_2O_6)+Na]^+$	372.3	372.5

Die Reproduzierbarkeit von Einzelmessungen - und zwar sowohl innerhalb einer Probe als auch von Probe zu Probe - war relativ schlecht, so daß die Signalintensitäten der verschiedenen Fragmentionen und deren Na/K-Addukte in unterschiedlichen Spektren stark voneinander abwichen. Dieser Effekt verstärkte sich noch bei der Analyse unterschiedlicher Konzentrationen. Zusätzliche Signale, die auf eine Abspaltung des vollständigen Linkers schließen lassen, wurden, wie erwartet, nicht nachgewiesen. Der Linker selbst ist über eine stabile C-C-Bindung in Position 5 verankert und ist somit unter MALDI-Bedingungen äußerst stabil.

Analoge Ergebnisse wurden für die MALDI-TOF-MS-Analyse der entsprechenden Cytidinverbindung (**47** (*ddC_{BOC}TP*)) erhalten. Auch hier erwies sich die t-BOC-Gruppe unter MALDI-Bedingungen mit DHB als Matrix als nicht stabil. Weder Molekül- noch Fragmentionensignale, die die Masse des Nucleosids mit vollständigem t-BOC-Amidopropyl linker repräsentieren, konnten nachgewiesen werden. Lediglich Fragmente mit intaktem Aminopropyl linker waren eindeutig zuzuordnen.

Im Vergleich zur t-Butyloxycarbonylgruppe, die während des MALDI-Prozesses vollständig abgespalten wird, erwies sich die Acetylgruppe als weitaus stabiler. Bei der MALDI-Analyse des 5-(3-acetylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin-5'-triphosphates (**46** (*ddT_{Ac}TP*)) wurde hauptsächlich das einfach geladene Molekülion bzw. dessen Na/K-Addukte oder auch Fragmentionen dieser Verbindung, die auf der Abspaltung von ein oder zwei Phosphatgruppen zurückzuführen sind, nachgewiesen. Überraschenderweise trat hier das $[M]^+$ -Signal des Molekülions anstelle des üblichen $[M+H]^+$ -Signals auf. Der zu beobachtende "Doppelpeak" mit einer Masse von 509.0 bzw. 510.3 Da läßt vermuten, daß auch die Acetylgruppe während des MALDI-Prozesses zu einem geringen Teil abgespalten wird (berechnete Massen: $[M-Ac]^+$: 509.2 Da, $[M-Ac+H]^+$: 510.3 Da). Obwohl die Intensitäten der einzelnen Signale in Einzelmessungen stark variieren, tritt dieser Peak in Relation zu den anderen in der Regel nur in sehr geringen Intensitäten auf. Eine eindeutige Zuordnung ist nicht möglich, da das $[(M-HPO_3)+K^+]$ - Fragmentionensignal mit einer berechneten Masse von 510.4 Da ebenfalls auftritt und die Signale aufgrund der ähnlichen Massen nicht ausreichend aufgelöst werden können. Zusätzliche Natrium- oder Kalium-Adduktsignale dieses Fragmentions lassen sich nicht detektieren, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Acetylgruppe während des MALDI-Prozesses relativ stabil ist.

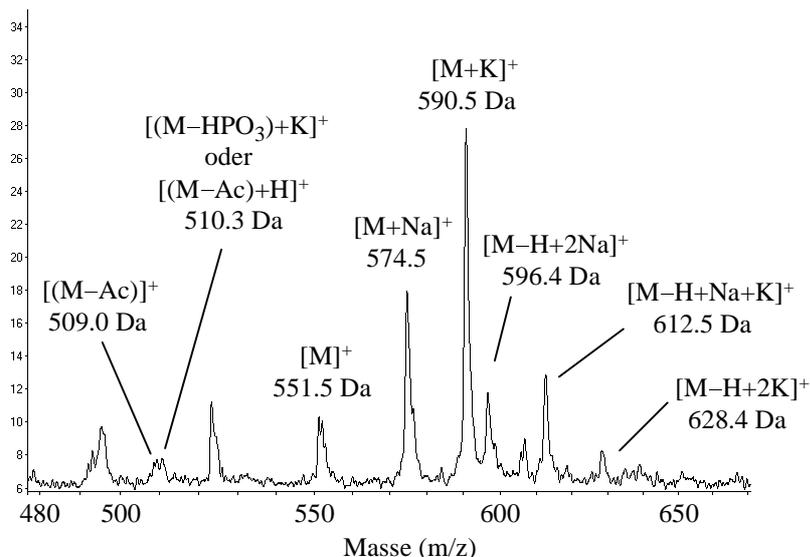


Abb. 44: Ausschnitt aus einem MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung **46** (*ddT_{AcTP}*) (5-(3-acetylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin-5'-triphosphat) mit DHB als Matrix. Berechnete Massen der einzelnen zugewiesenen Signale sind: 509.3, 510.4, 552.3, 574.3, 590.4, 596.3 und 612.4 und 628.5 Da (von links nach rechts).

Tab. 6: Experimentell bestimmte und berechnete Massen (relative Isotopenmasse) der Molekülionen- bzw. Fragmentationensignale von Verbindung **46** (*ddT_{AcTP}*).

Molekül-/Fragmentationen	Berechnet [Da]	Experimentell [Da]
$[M-H+2K]^+$	628.5	628.4
$[M-H+Na+K]^+$	612.4	612.5
$[M-H+2Na]^+$	596.3	596.4
$[M+K]^+$	590.4	590.5
$[M+Na]^+$	574.3	574.5
$[M]^+$	551.3	551.5
$[M-HPO_3+K]^+ / [M-Ac+H]^+$	510.4 / 510.3	510.3
$[M-Ac]^+$	509.2	509.0
$[M-HPO_3+Na]^+$	494.3	494.6

Für die entschützten Verbindungen **48** (*ddT_{NH2}TP*) und **49** (*ddC_{NH2}TP*) wurden, wie erwartet, die einfach geladenen Molekülonen der Triphosphate, die entsprechenden Na- und K-Addukte sowie Fragmentionen, die aus der Abspaltung von HPO₃ oder H₂P₂O₆ resultieren, nachgewiesen (Spektren hier nicht aufgeführt). Wie schon die oben dargestellten Spektren der *ddT_{Ac}TP*- und *ddT_{BOC}TP*-Verbindung demonstrieren, ist das Nucleosid mit dem Linker in 5-Position unter MALDI-Bedingungen sehr stabil.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen ist zu berücksichtigen, daß die Matrix einen entscheidenden Einfluß auf die schonende Desorption/Ionisation der Probe hat. Ko-Kristallisation des Proben-Matrix-Gemisches, Energieeinkopplung, Festkörperdesintegration sowie der Ionenbildungsprozeß werden maßgeblich von ihr beeinflusst. Speziell für die Analyse von Oligonucleotiden führt der Einsatz von 3-HPA als Matrix zu deutlich geringerer Fragmentionenbildung. Es wäre somit durchaus denkbar, daß auch die *t*-Butyloxycarbonylverbindung während des MALDI-Prozesses stabil ist, wenn eine andere Matrix verwendet wird. Zudem liegen hier lediglich die Triphosphate der Verbindungen vor. Oligonucleotide die diese modifizierten Verbindungen enthalten, können andere Fragmentierungsmuster aufweisen oder auch andere Meßbedingungen (z.B. höhere Laserenergie) erfordern. Den eindeutigen Nachweis über die Stabilität der Massenmodifizierung unter MALDI-Bedingungen erlaubt daher nur die Analyse der entsprechend terminierten Sequenzierungsprodukte. Aus diesem Grund wurden auch die beiden *t*-Butyloxycarbonylderivate (*ddT_{BOC}TP*), (*ddC_{BOC}TP*) für die Sanger-Sequenzierung eingesetzt und die resultierenden Oligonucleotidfragmente mittels MALDI-TOF-MS hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht.

V Sequenzierungen mit massenmarkierten 2',3'-Didesoxy-nucleosid-5'-triphosphaten

Im folgenden wurden Untersuchungen zur Polymerase-Akzeptanz der hier dargestellten massenmarkierten Terminatoren, zur Stabilität der modifizierten terminierten Produkte unter MALDI-TOF-Bedingungen sowie den Einsatzmöglichkeiten dieser Verbindungen für die Multiplex-Sequenzierung diagnostischer Assays durchgeführt.

Zur Überprüfung, ob die modifizierten Didesoxynucleosidtriphosphate von der Polymerase akzeptiert und eingebaut werden und inwieweit die resultierenden Terminationsprodukte während des MALDI-Prozesses stabil sind, stand zunächst eine *single base extension* Reaktion oder aber der in der Einleitung beschriebene PROBE-Assay zur Auswahl. Da beim PROBE-Assay 3dNTPs und das jeweilig fehlende Nucleosid als ddNTP eingesetzt werden, weist dieser den Vorteil auf, daß der Primer auf jeden Fall bis zum ersten einzubauenden ddNTP verlängert wird. Anhand der Massen der Reaktionsprodukte/Edukte läßt sich daher eindeutig unterscheiden, ob die enzymatische Reaktion nicht abgelaufen ist (Enzymaktivität, zu niedrige Produktausbeuten, Pipettierfehler etc.) oder ob die modifizierten Verbindungen von der Polymerase tatsächlich nicht akzeptiert werden. Zudem läßt sich hier auch eine unspezifische Verlängerung durch die Polymerase ausschließen, so daß dieses Verfahren für die gegebene Problemstellung zweckmäßiger erschien.

Für Untersuchungen hinsichtlich der Eignung der Verbindungen als potentielle Terminatoren bei der Sanger-Sequenzierung (Konkurrenzreaktion dNTP/ddNTP, Einbauraten) bot sich die radioaktive Sequenzierung einzelsträngiger M13mp18-DNA mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung an. Weiterhin könnte durch die Sanger-Sequenzierung eines kurzen, synthetischen Templates mit anschließender MALDI-TOF-Analyse der Terminationsprodukte überprüft werden, ob ein solches Verfahren ähnliche Aussagen hinsichtlich der terminierenden Eigenschaften der modifizierten Triphosphate erlaubt.

Für Untersuchungen zum Einsatz der Verbindungen für die Multiplex-Sequenzierung diagnostischer Assays wurde ebenfalls der PROBE-Assay gewählt. Gegenüber den anderen in der Einleitung beschriebenen diagnostischen Verfahren zeichnet sich dieser durch hohe Flexibilität und Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Problemstellung aus. Da beim PinPoint- und COSBE-Assay der Primer lediglich mit dem nächst folgenden ddNTP terminiert wird, schließt die Eignung der Substanzen für die Multiplex-PROBE-Sequenzierung die mögliche Anwendung der Verbindungen für die beiden anderen Verfahren mit ein.

Aufgrund der Ergebnisse bezüglich des Auflösungsvermögens wurde für die folgenden Untersuchungen in Abstimmung mit den hier gewählten Massenmarkierungen ein kurzes, synthetisches Primer-Template-System (17-mer Primer, 50-mer Template) gewählt, welches sowohl für den PROBE-Assay als auch für die Sanger-Sequenzierung als geeignet erschien. Da dieses System zuvor in unserer Arbeitsgruppe für Membran-gebundene *Fill-In* Reaktionen verwendet wurde, hybridisiert der Primer versetzt an das Template. Für die vorliegende Aufgabenstellung ist diese Besonderheit jedoch nicht relevant.

Wie die MALDI-TOF-Analyse komplexer Gemische gezeigt hat, ist die Empfindlichkeit des hier verwendeten Gerätes nicht ausreichend, um die bei Standard-Sanger-Sequenzierungen entstehenden geringen Substanzmengen an Terminationsprodukten nachzuweisen (ca. 0.5-1 fmol pro Terminationsprodukt bei radioaktiver oder auch Fluoreszenz-Markierung⁶⁸). Zudem sind Standard-Sequenzierungsprotokolle auf die Sequenzierung langer Templates ausgelegt und optimiert. Aus diesem Grunde sollten zunächst PROBE-Assay und Sanger-Sequenzierung anhand des gewählten Templates für die T-Reaktion hinsichtlich der Reaktionsausbeute optimiert werden. Die optimierten Reaktionsbedingungen sollten dann zunächst auf die C-Reaktion und nachfolgend auf die T- und C-Reaktionen mit markierten Didesoxynucleosidtriphosphaten übertragen werden. Für die Optimierung der T-Reaktionen sind folgende Überlegungen zu berücksichtigen:

Das hier verwendete Gerät erlaubt für komplexe, synthetische Gemische den Nachweis von Verbindungen mit Substanzmengen von ~100-200 fmol (je Verbindung). Die MALDI-TOF-Analyse derartig niedriger Substanzmengen ist jedoch relativ zeitaufwendig (langes Suchen nach geeigneten Proben-Matrix-Kristallen, Aufaddieren von 50-100 geeigneter Einzelspektren zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses etc.). Bei stark unterschiedlichen Substanzmengen der im Gemisch enthaltenen Komponenten liegen die in geringeren Mengen vorkommenden Verbindungen oftmals unterhalb der Nachweisgrenze. Zudem nimmt die Nachweiseffizienz von Verbindungen, deren Substanzmenge im unteren Bereich der Nachweisgrenze liegen, ab, wenn andere Verbindungen in hohen Überschüssen vorliegen (z.B. Primer). Generell sind Massenauflösung und Genauigkeit bei wenig höheren Substanzmengen (> 200 fmol) deutlich besser, was für die eindeutige Identifizierung von Fragmentierungen eine wichtige Rolle spielt.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß im Rahmen dieser Arbeit weniger der Nachweis von Sequenzierungsprodukten an sich im Vordergrund stand als vielmehr die Untersuchung der hier dargestellten Verbindungen hinsichtlich ihrer terminierenden Eigenschaften und der Stabilität der resultierenden Terminationsprodukte (Stabilität der Massenmarkierung) unter MALDI-TOF-Bedingungen. Während eine vollständige Abspaltung der Massenmarkierung

oder auch eines Teils der Massenmarkierung wie z.B. die Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonylgruppe auch bei Signalen mit relativ schlechten Signal/Rausch-Verhältnissen durch die Massenverschiebung des erwarteten Peaks sofort nachgewiesen werden kann, ist das bei einer nicht quantitativen Abspaltung, wie sie z.B. Depurinierungen darstellen, nicht der Fall. Treten neben dem markierten Terminationsprodukt in geringen Anteilen Fragmentationen auf, die auf der Abspaltung (eines Teils) der Massenmarkierung basieren, so liegen diese bei geringen Intensitäten des eigentlichen Moleküliions möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze und sind daher nicht mehr detektierbar. Zudem verringert das Auftreten von Fragmentationen die Signalintensität des eigentlichen Moleküliions. Es ist daher nicht auszuschließen, daß bei Substanzmengen der Terminationsprodukte, die im Bereich der unteren Nachweisgrenze liegen, und einer möglicherweise hohen Fragmentierungsrate der modifizierten Verbindung das Produktsignal nicht mehr nachgewiesen werden kann. Für die Untersuchungen der modifizierten Terminationsprodukte bezüglich ihrer Stabilität unter MALDI-TOF-Bedingungen sind folglich Produktausbeuten, die eine schnelle, reproduzierbare MALDI-TOF-Analyse mit guten Signalintensitäten ermöglichen, essentiell.

Speziell für die Sanger-Sequenzierung ist zusätzlich zu bedenken, daß die modifizierten Triphosphate von der Polymerase möglicherweise schlechter eingebaut werden als unmodifizierte, so daß die resultierenden Terminationsprodukte im Vergleich zur T-Reaktion unter gleichen Reaktionsbedingungen in niedrigeren Ausbeuten vorliegen. Lassen sich die Terminationsprodukte der T-Reaktion aufgrund niedriger Substanzmengen nur mit schlechten Signal/Rausch-Verhältnissen nachweisen, besteht die Möglichkeit, daß die modifizierten, terminierten Fragmente unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Ziel der hier durchgeführten Optimierung war es daher, die Produktausbeute soweit zu erhöhen, daß die Substanzmengen einer enzymatischen Reaktion ausreichend sind, um a) eine schnelle, verlässliche und reproduzierbare MALDI-TOF-Analyse mit guten Signalintensitäten der Terminationsprodukte zu gewährleisten (Untersuchungen der Substanzen hinsichtlich ihres Einbaus und ihrer Stabilität) und b) Vergleichsmessungen des gleichen Sequenzierungsansatzes zu ermöglichen. Diese erlauben unter gleichen Meßbedingungen eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der MALDI-Messungen bezüglich der Kristallisation, Spektrenqualität und der Signalintensitäten in Relation zueinander. Zudem lassen sich für die gleiche Probe unterschiedliche Probenpräparationen durchführen, so daß bei Bedarf das Proben/Matrix-Verhältnis oder auch andere Parameter der Probenpräparation optimiert werden können. Weiterhin ermöglichen sie die MALDI-TOF-Analyse des gleichen, aufgereinigten Reaktionsansatzes unter gleichen Meßbedingungen an unterschiedlichen Geräten.

Für Untersuchungen zu den terminierenden Eigenschaften der Substanzen erscheint es darüber hinaus als sinnvoll, die T-Reaktion so zu optimieren, daß Primer, Terminationsprodukte und Durchlauf in ähnlichen Signalintensitäten auftreten. Zwar ist MALDI-TOF-MS mit 3-HPA als Matrix für Quantifizierungen nicht geeignet; die Relation der Signalintensitäten eines Summenspektrums, das aus Einzelmessungen resultiert, die über die gesamte Probenoberfläche aufgenommen wurden, ermöglicht jedoch meist eine grobe Abschätzung der Mengenverhältnisse der im Gemisch enthaltenen Substanzen (bei Verbindungen gleicher Substanzklassen). Bei ähnlichen Signalintensitäten von Primer, Terminationsfragmenten und Durchlauf bei der T-Reaktion wäre es daher denkbar, durch einen Vergleich der Relationen der Signalintensitäten von T- und massenmodifizierten T-Reaktionen Aussagen über die Einbaurate der modifizierten Verbindungen zu treffen.

Für eine erfolgreiche MALDI-Analyse von Sequenzierungsprodukten ist neben der Erhöhung der Reaktionsausbeute eine schnelle und effiziente Aufreinigung der Reaktionsprodukte mit hoher Wiederfindungsrate von großer Bedeutung. Allgemein wurden unterschiedliche Aufreinigungsverfahren entwickelt, wie z.B. der Einsatz von Ultrafiltrationsmembranen (Zentrifugation)⁶⁷, Ionenaustauschersäulen⁷⁰ oder auch der Einsatz von Glasbeads, die die Abtrennung von Salzen durch Waschen mit 70%-iger Ethanol-Lösung erlauben⁶⁷.

Wie bei der Analyse von PCR-Produkten deutlich wurde, ist die Aufreinigung über Ultrafiltrationsmembranen aufgrund der Waschschritte und der jeweiligen Zentrifugationszeiten relativ zeitaufwendig. Zudem können Komponenten mit ähnlichem oder höherem Molekulargewicht (z.B. DNA-Polymerase) als das der zu analysierenden Probe nicht abgetrennt werden, da nur die kleineren Verbindungen die Membran passieren. Selbst diese sind, wie die MALDI-Analyse des Hydrolyseproduktes des 100-mers mit 7-Desaza-Purin-/Ribo-Modifikation zeigte, unter Standard-Waschbedingungen nicht immer quantitativ abtrennbar (vermutlich infolge von unspezifischer Adsorption an der Membran- oder Probenoberfläche). So konnten die beiden abgespaltenen Primer (5.4 und 5.9 kDa) trotz Aufreinigung über eine Ultrafiltrationsmembran mit einem molekularen Ausschlußgewicht von 10 kDa noch nachgewiesen werden.

Demgegenüber weisen Aufreinigungsverfahren, die auf der Immobilisierung der Probe an einer festen Phase basieren, die für Festphasengebundene Reaktionen allgemein bekannten Vorteile auf (schnelle, effiziente Aufreinigung der Produkte, gute Automatisierbarkeit etc.). Speziell die festphasengestützte Aufreinigung über das Streptavidin-Biotin System¹⁷¹ bietet vielfältige und flexible Anwendungsmöglichkeiten und konnte in unserer Arbeitsgruppe für die MALDI-Analyse von LCR-⁵⁸, PCR-^{60, 72, 172} und Sequenzierungsprodukten¹⁷³ optimiert werden.

Durch Biotinylierung der DNA (Primer oder Template) am 5'- oder 3'-Ende läßt sich diese infolge der starken Streptavidin-Biotin Wechselwirkung an Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln (Beads) immobilisieren. Mittels eines Magneten können die Beads an der Gefäßwand zurückgehalten werden und ermöglichen somit die schnelle und effektive Entfernung aller Verunreinigungen. Waschen mit Ammoniumcitratlösung erlaubt zugleich Kationenaustausch und stellt das Produkt ohne größeren Arbeits- und Zeitaufwand in der NH_4^+ -Form zur Verfügung. Zudem ist aufgrund der starken Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung unter milden Bedingungen eine Strangtrennung (Denaturierung) möglich, so daß beide DNA-Stränge getrennt voneinander einer MALDI-Analyse unterzogen werden können¹⁷⁴. Gegenüber anderen Aufreinigungsverfahren läßt sich hier zusätzlich das Template abtrennen, so daß das Auftreten doppelsträngiger, einfach geladener Molekülonen oder auch mehrfach geladener Molekülonen der Template DNA vermieden werden kann.

Je nach Problemstellung, können für den Einsatz dieses Aufreinigungsverfahrens unterschiedliche Ansätze verfolgt werden:

- *Aufreinigung des immobilisierten Doppelstranges und anschließende direkte MALDI-Analyse der an Streptavidin-Beads gebundenen Biotin-Duplex-Verbindung.* Überschüssige Laserenergie während des MALDI-Prozesses oder auch Bedingungen der MALDI-Probenpräparation führen zur Denaturierung des Doppelstranges, aber nicht zur Spaltung der Streptavidin-Biotin-Bindung. Aus diesem Grund wurde bei der direkten MALDI-Analyse der Dynabeads lediglich der nicht biotinylierte DNA-Strang desorbiert, ionisiert und detektiert. Der biotinylierte Strang dagegen blieb an die Beads gebunden auf dem Probenträger zurück und war daher nicht nachweisbar (Analoge Ergebnisse ließen sich mit Duplexen erhalten, bei denen ein Strang kovalent an CPG gebunden war¹⁷⁵).
- *Aufreinigung des immobilisierten Doppelstranges und anschließende Denaturierung mit Ammoniumhydroxid (25%) bei Raumtemperatur. MALDI-Analyse des Überstandes erlaubt den Nachweis des nicht-biotinylierten Stranges.*
- *Aufreinigung des immobilisierten Doppelstranges, Denaturierung mit Ammoniumhydroxid (25%) bei Raumtemperatur, Abtrennen des nicht-biotinylierten Stranges und anschließende Spaltung der Biotin-Streptavidin-Bindung mittels Ammoniumhydroxid (25%) bei 60°C für 10 min (~96%-ige Rückgewinnung¹⁷⁴ des biotinylierten Stranges). MALDI-Analyse des Überstandes erlaubt den Nachweis des biotinylierten Stranges.*

Alle drei Varianten erlauben eine schnelle und effektive Aufreinigung von Produkten

enzymatischer Reaktionen. Obwohl sich das erste Verfahren zunächst als eleganteste und schnellste Variante darstellte, traten hier jedoch bei der MALDI-Analyse einige Nachteile auf. Bei der Detektion von LCR-Produkten⁵⁸ zeigte sich, daß die direkte Desorption/Ionisation der Einzelstränge vom immobilisierten Duplex speziell bei längeren Verbindungen wenig höhere Laserenergien erfordert. Analog zur Probenpräparation mit Kationenaustauscherbeads sammeln sich die Dynabeads beim Kristallisationsvorgang in der Mitte des Probenspots. Die schlechte Ko-Kristallisation des Matrix/Beads-Gemisches hat zumeist schlechte Proben-Matrix-Verhältnisse zur Folge, was sich auf die Qualität der Spektren auswirkt. Zudem sind der MALDI-Analyse nur Probenmoleküle zugänglich, die sich an der Oberfläche der Beads befinden, Moleküle zwischen Bead und Probenträger hingegen nicht. All diese Einflüsse führen zusätzlich zu relativ langem Suchen nach geeigneten kristallinen Matrix-Proben-Bereichen. Unter der Annahme, daß die Watson-Crick'schen Wasserstoffbrückenbindungen hauptsächlich durch überschüssige Laserenergie zerstört werden, muß vor allem bei längeren Verbindungen eine erhöhte Laserenergie für die Messung verwendet werden (zunehmende Stabilität des Duplexes), was erhöhte Fragmentierung und damit geringere Auflösung und Signalintensitäten zur Folge hat. Bei der Analyse von Verbindungen ~50 nt nimmt daher die Detektionseffizienz gegenüber einzelsträngig vorliegenden, nicht festphasengebundenen Proben stark ab.

Im Vergleich dazu ermöglichte das zweite und dritte Verfahren eine schnellere und effektivere MALDI-TOF-Analyse der einzelsträngigen Produkte. Für die nachfolgenden Sequenzierungen mittels MALDI-TOF-MS wurde daher das für den Nachweis von einzelsträngigen PCR- und Sequenzierungsprodukten optimierte dritte Verfahren eingesetzt¹⁷⁴.

1 Optimierung von PROBE-Assay und Sanger-Sequenzierung

Zunächst sollten die Reaktionsausbeuten für Sanger-Sequenzierung und PROBE-Assay anhand der T-Reaktion optimiert werden. Die Aufreinigung erfolgte wie oben erläutert über das Streptavidin-Biotin-System. Für beide Ansätze wurde das in Abb. 45 wiedergegebene Primer-Template-System verwendet (Berechnete Massen der Fragmente: s. Tab. 7, S.113).

Für die Erhöhung der Reaktionsausbeute der Sequenzierungsprodukte sind mehrere Wege denkbar:

- Erhöhung der Eduktkonzentrationen ([Primer], [Template], [dNTPs/ddNTP])
- Erhöhung der Enzymmenge
- Erhöhung der Reaktionsdauer

Zusätzlich läßt sich eine Verschiebung der Produktausbeute zu kleineren Fragmenten durch den Einsatz von Mn^{2+} und durch Verminderung des dNTP/ddNTP Verhältnisses erzielen. Durch Erhöhung der ddNTP-Konzentration (gegenüber [dNTP]) vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit, mit der der Kettenabbruch stattfindet, so daß bevorzugt kleinere Fragmente gebildet werden. Die Anwesenheit von Mn^{2+} hingegen hat eine bessere Akzeptanz der Polymerase für Didesoxynucleosidtriphosphate zur Folge, so daß dNTP und ddNTP nahezu gleich gut eingebaut werden¹⁷⁶. Der Effekt von Mn^{2+} auf die Produktausbeute ist in Abb. 52, S.119 für die Sequenzierung von M13mp18 ss (radioaktive Markierung, gelelektrophoretische Auftrennung) demonstriert.

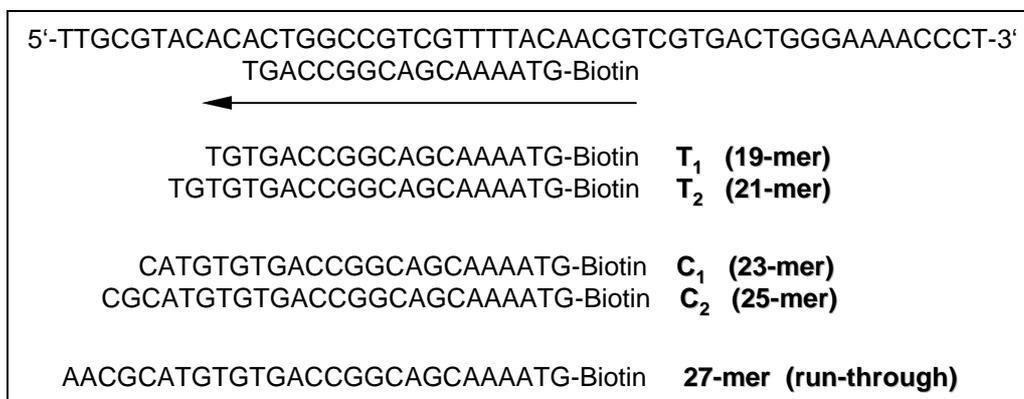


Abb. 45: Gewähltes Primer-Template-System (synthetisches 50-mer mit 5'-biotinyliertem Primer) für den PROBE Assay und die Sanger-Sequenzierung zur Untersuchung der hier dargestellten Verbindungen mit den jeweilig zu erwartenden Produkten für die T- und C-Reaktion.

Ausgehend von den publizierten Arbeiten von Shaler⁶⁷ und Köster⁶⁹ zum Nachweis von Sequenzierungsprodukten mittels MALDI-TOF-MS wurde zunächst die Sanger-Sequenzierung nach dem Standardprotokoll für Sequenase 2.0 unter Verwendung von 3 pmol Primer und 10 pmol Template mit einer Reaktionszeit von 2 min. bei 37⁰C durchgeführt. Als Terminationsgemisch für die Sanger-Sequenzierung wurde eine Lösung eingesetzt, deren Endkonzentration 80µM an den vier dNTPs und 20µM an ddTTP war (gegenüber 80µM/8µM bei der normalen Sanger-Sequenzierung). Der PROBE-Assay erfolgte unter gleichen Bedingungen mit einem Terminationsgemisch, dessen Endkonzentration jeweils 80 µM an dATP, dCTP und dGTP und 80µM an ddTTP war. Alle Umsetzungen wurden unter Zusatz von 1µl $MnCl_2$ durchgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurden die Produkte/Edukte durch Zugabe von Streptavidin-beschichteten Dynabeads über den biotinylierten Primer immobilisiert. Überschüssiges Template wurde zusammen mit den anderen

Reaktionskomponenten durch Waschen der immobilisierten Probe entfernt. Die Abtrennung des hybridisierten Templates hingegen erfolgte durch anschließende Denaturierung mit Ammoniumhydroxid bei Raumtemperatur. Eine weitere Behandlung der Dynabeads mit Ammoniumhydroxid bei 60°C führte zur Spaltung der Streptavidin-Biotin-Bindung und lieferte den (verlängerten) einzelsträngigen, aufgereinigten Primer im Überstand. Das Ammoniumhydroxid wurde durch Lyophilisation entfernt und der Rückstand in Reinstwasser aufgenommen. Ethanol-Präzipitation als Alternative zur Lyophilisation führte zu vergleichbaren Spektren.

Abb. 46a) und Abb. 47a) zeigen die MALDI-TOF-Spektren der beiden Reaktionen. Das Template mit einer berechneten Masse von 15338 Da konnte mit dem hier gewählten Aufreinigungsverfahren vollständig abgetrennt werden. Wie Abb. 46a) demonstriert, waren unter den verwendeten Reaktionsbedingungen für die Sanger-Sequenzierung weder die Terminationsprodukte T₁ und T₂ noch das bei nicht erfolgter Termination erwartete, vollständig synthetisierte 27-mer (Durchlauf / *run-through*) detektierbar. Lediglich der aufgereinigte, unverlängerte, biotinylierte Primer konnte nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wies das Massenspektrum des PROBE-Assays (Abb. 47a)) neben dem intensiven Signal des nicht umgesetzten, biotinylierten Primers zwei weitere Signale geringerer Intensität mit einer Masse von 6052 und 6340 Da auf. Letzteres entspricht dem erwarteten Terminationsprodukt T₁ ($[M+H]^+_{\text{ber.}}$: 6339.3 Da). Das nicht erwartete, zusätzliche Signal bei 6052 Da korreliert mit der Masse des um ein G verlängerten Primers ($[M+H]^+_{\text{ber.}}$: 6051.1 Da). Die Möglichkeit einer nicht-Template-spezifischen Verlängerung durch den Einbau von dATP, dCTP oder auch ddTTP läßt sich über die Masse eindeutig ausschließen (berechnete Massen der $[M+H]^+$ -Signale: P-dA: 6035.1 Da ; P-dC: 6011.1 Da; P-ddT: 6010.1 Da). Folglich kann davon ausgegangen werden, daß die enzymatische Reaktion hier nach dem Basenspezifischen Einbau von dGTP stoppt, vermutlich aufgrund der Bildung von Sekundärstrukturen des Templates (*full-stop* der Primer Extension). Aufgrund der Reaktionsverzögerung ist sowohl das P-dG- als auch das Terminationsprodukt T₁ nachweisbar. Das Auftreten von nicht spezifisch terminierten Fragmenten (full stops und mismatches) ist auch in der Literatur beschrieben und läßt sich sowohl in MALDI-TOF-Spektren als auch in Fluoreszenzspektren von Sequenzierungsreaktionen beobachten^{67, 69, 51}.

Obwohl unter den gewählten Reaktionsbedingungen für den PROBE-Assay das erwartete Produkt durchaus nachgewiesen werden konnte, ist das Signal/Rausch-Verhältnis und die Massenauflösung des T₁-Signals relativ schlecht. Das Spektrum stellt ein Summenspektrum über 24 Einzelmessungen dar, aufgenommen über die gesamte Probenoberfläche. Das Intensitätsverhältnis von Primer und Terminationsprodukt ist innerhalb der für MALDI-Analysen typischen Schwankungsbreite gut reproduzierbar und verdeutlicht, daß lediglich ein

geringer Anteil des Primers in der enzymatischen Reaktion umgesetzt wurde.

Um den Einfluß der Primer und Template Konzentration auf die Produktausbeute zu überprüfen, wurden im folgenden beide drastisch erhöht. Sanger-Sequenzierung und PROBE-Assay wurden unter sonst gleichen Bedingungen mit 15 pmol biotinyliertem Primer und 15 pmol Template mit Reaktionszeiten von 2, 25, 50 und 100 min. durchgeführt. Reaktionen mit einer Reaktionszeit von 25 min. erfolgten mit und ohne Zugabe von Pyrophosphatase. Reaktionen mit Reaktionszeiten von 25 und 50 min. wurden zusätzlich mit der doppelten Enzymmenge durchgeführt. Die Erhöhung der Primer/Template-Konzentration bei einer Reaktionszeit von 2 min. bestätigte die Vermutung, daß die enzymatische Umsetzung innerhalb von 2 min. nur unzureichend abläuft. Auch hier konnte für die Sequenzierung lediglich das Primersignal detektiert werden, wobei möglicherweise aufgrund der hohen Primerkonzentration die Signale für die Terminationsfragmente bei der MALDI-Analyse unterdrückt wurden. Eine deutliche Erhöhung der Produktausbeute ließ sich bei erhöhter Primer/Template-Konzentration sowohl durch die Verlängerung der Reaktionszeit bis zu 50 min. als auch durch die Verdoppelung der Enzymmenge erzielen. Reaktionszeiten von mehr als 60 min. führten zu keiner wesentlichen Verbesserung der Signalintensitäten der Produkte. MALDI-Spektren der Reaktionen mit und ohne Pyrophosphatase demonstrierten, daß auch bei Reaktionszeiten von 25 min. die Anwesenheit von Pyrophosphatase nicht unbedingt erforderlich ist. Für die MALDI-Analyse von Sanger-Sequenzierung und PROBE-Assay konnten in beiden Fällen die gleichen Signale nachgewiesen werden. Dennoch war die Intensität der Produktsignale der Reaktionen mit Pyrophosphatase in Relation zum Primer-Signal geringfügig besser, so daß alle weiteren Reaktionen mit Reaktionszeiten ≥ 25 min. unter Zusatz von Pyrophosphatase durchgeführt wurden.

Abb. 46b₁) und Abb. 47b) zeigen die MALDI-Spektren der Sanger-Sequenzierung und des PROBE-Assays bei einer Reaktionszeit von 25 min. unter Verwendung der normalen Enzymmenge und unter Zusatz von Pyrophosphatase. Im Vergleich zu Abb. 47a) (PROBE-Assay: 3 pmol Primer, 2 min. Reaktionszeit) demonstriert Abb. 47b) deutlich bessere Signal/Rausch-Verhältnisse für beide Fragmente, das P-dG-Fragment und das erwartete Terminationsfragment T₁ des PROBE-Assays. Dennoch wurde auch hier ein relativ großer Anteil des Primers nicht umgesetzt. Zusätzlich treten zwei weitere Signale bei 6486 und 12973 Da auf, deren Massen mit dem einfach- und dem doppelt geladenen Moleküllion des Streptavidins korrelieren ($[M+H]^+_{\text{ber.}}$: 12972.1 Da und $[M+H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 6486.1 Da). Aufgrund der höheren Primer-Konzentration wurde für die Aufreinigung eine entsprechend höhere Menge an Streptavidin-beschichteten Dynabeads verwendet (15 μ l statt 5 μ l). Wie das Spektrum zeigt,

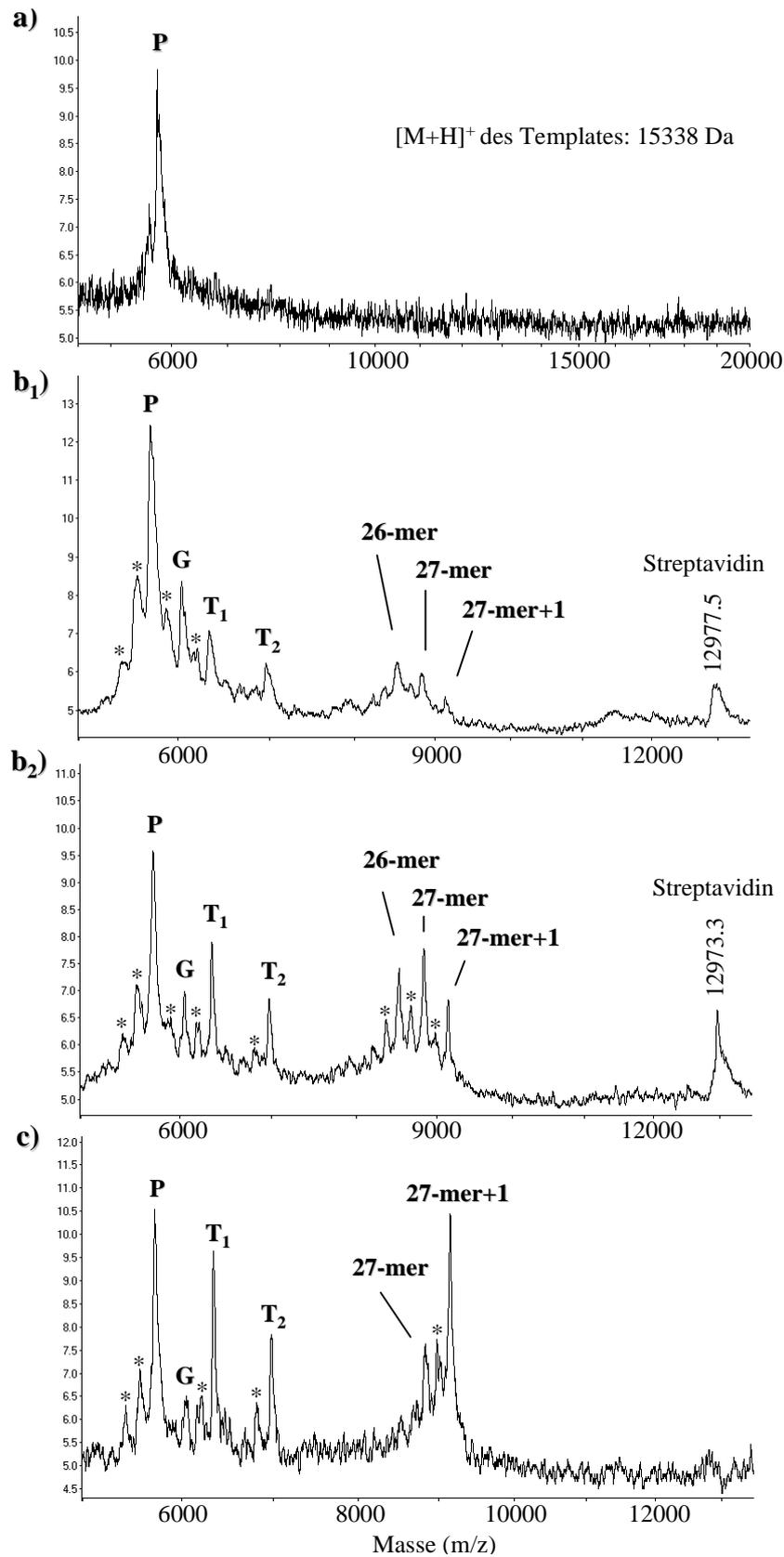


Abb. 46: MALDI-TOF-Spektren der T-Reaktion: a) 3pmol Primer (P) 10pmol Template (T) 2 min. Reaktionszeit (RZ). b₁) je 15pmol P u.T, 25 min. RZ. b₂) je 15pmol P u. T, 50 min. RZ, doppelte Enzymmenge. c) je 8pmol P u. T, 50 min. RZ, doppelte Enzymmenge.

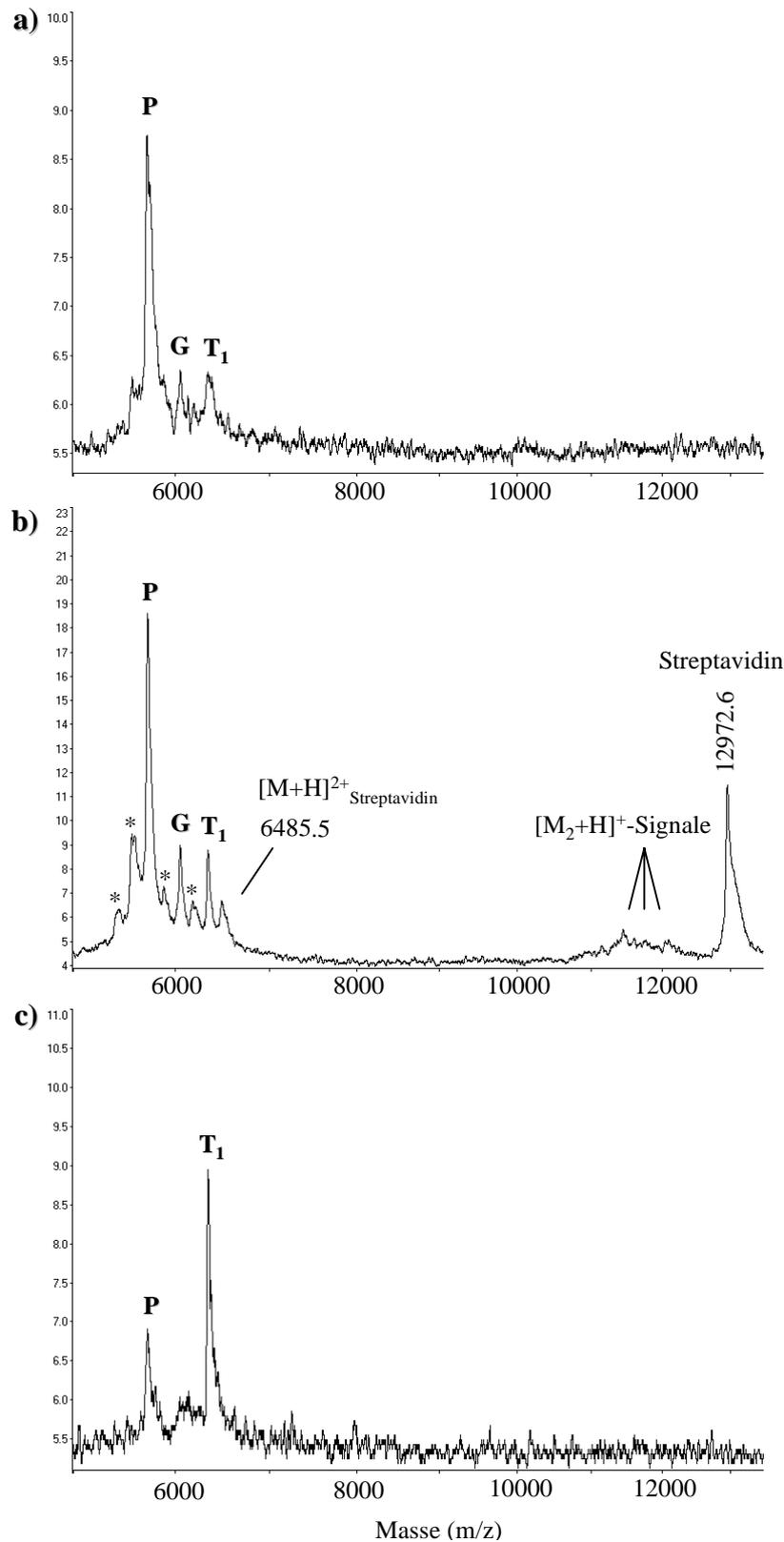


Abb. 47: MALDI-TOF-Spektren der T-Reaktion des PROBE-Assays: a) 3 pmol Primer (P) 10 pmol Template (T) 2 min. Reaktionszeit (RZ). b) je 15 pmol P u.T, 25 min. RZ. c) je 8 pmol P u. T, 50 min. RZ, doppelte Enzymmenge.

geht bei der Abspaltung des biotinylierten Stranges (Behandlung mit Ammoniumhydroxid bei 60°C) ebenfalls ein geringer Anteil an Streptavidin in Lösung. Die Intensität des Streptavidin-Signals bei der MALDI-TOF-Analyse variiert von Probe zu Probe unter gleichen Aufarbeitungsbedingungen sehr stark (vgl. Abb. 47b, Abb. 46b₁ und Abb. 46b₂). Das einfach geladene Molekülion liegt in einem Massenbereich, der sich in keinster Weise mit den Massen der zu erwartenden Produkte überschneidet, und hat daher auf die MALDI-Analyse des Reaktionsansatzes keine negativen Auswirkungen. Vielmehr kann dieses Signal zusätzlich zum Primer-Signal für die interne Kalibrierung verwendet werden. Das doppelt geladene Molekülionensignal des Streptavidins hingegen liegt im Massenbereich der Produkte, weist jedoch eine genügend große Massendifferenz zu den Terminationsprodukten der T-Reaktion auf, um eindeutig aufgelöst und identifiziert zu werden. Schwierigkeiten sind jedoch bei dem Einsatz der modifizierten Triphosphate zu erwarten. So weist das Terminationsprodukt T₁ der ddT(BOC)TP-Verbindung eine berechnete Masse des [M+H]⁺-Signals von 6482.5 Da auf. Die Massendifferenz von 3.6 Da zum doppelt geladenen Streptavidin-Molekülionensignal kann in diesem Massenbereich nicht mehr aufgelöst werden, so daß hier keine eindeutige Zuordnung der Signale möglich wäre. Um erstens Schwierigkeiten bei der Identifizierung der Signale und zweitens zusätzliche Signale bei der späteren Multiplex-Sequenzierung zu vermeiden, sollte das Auftreten von Streptavidin-Signalen durch eine entsprechende Reaktionsführung unterbunden werden. Blindversuche für die Aufreinigung mit unterschiedlichen Mengen an Dynabeads zeigten, daß beim Einsatz von bis zu max. 10 µl Beadslösung pro Ansatz das Streptavidin-Signal bei der anschließenden MALDI-TOF-Analyse nicht oder aber nur in sehr geringen Intensitäten (kein doppelt geladenes Molekülion) nachgewiesen werden konnte. Dabei ist nicht auszuschließen, daß dieser Wert von der jeweiligen Charge der Streptavidin-beschichteten Dynabeads abhängig ist.

Abb. 46b₁) zeigt die Sanger-Sequenzierung unter den gleichen, oben aufgeführten Reaktionsbedingungen. Beide Terminationsprodukte sind gut detektierbar. Zusätzlich tritt wie schon beim PROBE-Assay beobachtet das Signal bei 6051 Da für das P-dG-Fragment auf. Auch das vollständig synthetisierte, nicht terminierte 27-mer (Durchlauf/run-through) mit einer Masse von 8836 Da ([M+H]⁺_{ber.}: 8835.9 Da) ist nachweisbar, allerdings in relativ geringer Intensität. Darüber hinaus sind zwei weitere Signale mit einer Masse von 8522 und 9141 Da zu beobachten. Die Masse von 8522 Da entspricht dabei dem unvollständig synthetisierten, auf dA endenden 26-mer ([M+H]⁺_{ber.}: 8522.7 Da). Nicht-Basen-spezifischer Einbau von dCTP, dGTP, dTTP oder auch ddTTP läßt sich eindeutig über die Massen der resultierenden, möglichen Fragmente ausschließen, so daß hier analog zum P-dG-Fragment eine Verzögerung der enzymatischen Reaktion auftritt (Full-stop der Primer-Extension). Das Signal bei 9141 Da hingegen ist vermutlich auf die nicht-Template-spezifische Addition eines

weiteren Nucleotids zum vollständig synthetisierten 27-mer zurückzuführen. Die unspezifische Addition eines weiteren dNTPs oder auch ddNTPs zum vollständig verlängerten, nicht terminierten Produkt (hier 27-mer) ist in der Literatur für mehrere Polymerasen beschrieben worden^{177,178} und wurde ebenfalls in MALDI-TOF-Spektren von Sequenzierungsprodukten beobachtet^{67, 69, 51}.

Abb. 46b₂) zeigt die gleiche Reaktion mit doppelter Reaktionszeit und doppelter Enzymmenge. Die Relation der Signalintensitäten untereinander ist auch hier innerhalb der typischen Schwankungsbreite relativ gut reproduzierbar. Zwar stellt der nicht umgesetzte biotinylierte Primer noch immer das Signal höchster Intensität dar, im Vergleich zu Abb. 46b₁) lassen sich die beiden Terminationsprodukte T₁ und T₂ jedoch mit deutlich höheren Intensitäten (in Relation zur Primersignalintensität) und zudem mit einer besseren Massenauflösung nachweisen. Während im Spektrum b₁) das nicht terminierte, vollständig verlängerte 27-mer lediglich in vergleichsweise geringer Intensität zu beobachten war, treten hier die Signale des 26-mers, 27-mers und des durch unspezifische Addition eines weiteren Nucleotids verlängerten 27-mers in ähnlich hohen Intensitäten wie die beiden Terminationsprodukte auf, was vermuten läßt, daß die enzymatische Umsetzung weitaus besser abgelaufen ist. Signale, die mit einem Sternchen markiert sind, sind dabei auf den Verlust von ein oder zwei Basen zurückzuführen. Da die Abspaltung von A,G oder C mit Massenverlusten von 111-151 Da bzw. bei zusätzlicher Abspaltung von H₂O bis zu 169 Da verbunden ist, korreliert ein zweifacher Basenverlust mit einer Massendifferenz von ~1 Nucleotideinheit. Das Signal des nicht terminierten, verlängerten 26-mers mit einer Masse von 8522.9 Da (berechnet: 8522.7 Da) könnte daher ebenfalls auf zweifachen Basenverlust zurückzuführen sein. Da Depurinierungssignale mit zunehmender Anzahl an abgespaltenen Basen abnehmende Intensitäten zeigen, dieses Signal jedoch eine deutlich höhere Intensität als das des auf einfachem Basenverlust basierenden Fragmentations aufweist, muß es sich hier um das nicht vollständig verlängerte 26-mer handeln. Zweifacher Basenverlust tritt hier vermutlich in geringerem Anteil zusätzlich auf, kann jedoch nicht vom Hauptsignal aufgelöst und identifiziert werden.

Zur Vermeidung von Depurinierungen (Erhöhung der Ionenstabilität) würde sich der Einsatz von C⁷-dATP und C⁷-dGTP bei der enzymatischen Reaktion anbieten. Aufgrund des unmodifizierten Primers (enthält 11 A/G) und der kurzen Fragmentlängen der Produkte ist jedoch das Verhältnis von modifizierten 7-Desazapurinbasen zu unmodifizierten A und G sehr klein. Tatsächlich zeigten Spektren von Reaktionen mit C⁷-dATP und C⁷-dGTP keinen signifikanten Unterschied zu den hier dargestellten Spektren.

In Anbetracht der Tatsache, daß die Erhöhung der Primer/Template-Konzentration bei

gleicher Reaktionszeit (2 min.) wenig effektiv war und erst die zusätzliche Verlängerung der Reaktionszeit und/oder die Erhöhung der Enzymmenge den Nachweis der Sequenzierungsprodukte ermöglichte, wurde davon ausgegangen, daß ab einer Mindestkonzentration an Primer und Template hauptsächlich die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung ausschlaggebend für die Produktausbeute ist. Wie Abb. 46b₂) zeigt, ist unter Verwendung von 15 pmol Primer und Template trotz verlängerter Reaktionszeit und erhöhter Enzymmenge noch ein relativ hoher Anteil an Primer nicht umgesetzt. Im folgenden wurde daher die Primer und Template Konzentration auf die Hälfte reduziert. Abb. 46c) zeigt das Spektrum der Reaktion mit 8 pmol Primer und Template unter sonst gleichen Bedingungen. Auch hier läßt sich der nicht umgesetzte biotinylierte Primer gut nachweisen, allerdings in ähnlichen Intensitäten wie die beiden Terminationsfragmente und das nicht terminierte 27-mer mit einem weiteren Nucleotid (27-mer+1). Letzteres ist in diesem Spektrum im Vergleich zum vollständig verlängerten 27-mer dominierend. Das 26-mer ist hier nicht mehr nachweisbar. Auch das P-dG-Fragment tritt nur in vergleichsweise geringen Intensitäten auf, was vermuten läßt, daß möglicherweise das Auftreten unspezifischer Fragmente durch optimierte Reaktionsbedingungen vermieden werden kann. Aufgrund der geringeren Primer-Konzentration lag die für die Aufreinigung verwendete Menge an Dynabeadslösung unterhalb von 10 µl, so daß das Streptavidin-Signal hier nicht nachweisbar war. Die Relation der Intensitäten der auftretenden Signale war über die gesamte Probenoberfläche innerhalb geringer Schwankungen relativ gut reproduzierbar. Die beobachteten, abnehmenden Signalintensitäten der Terminationsprodukte mit zunehmender Fragmentlänge können daher sowohl auf den Ablauf der enzymatischen Reaktion als auch auf die mit zunehmender Fragmentlänge abnehmende Nachweiseffizienz bei MALDI-Analysen von Oligonucleotiden zurückzuführen sein. Zusätzliche Untersuchungen, die eine Quantifizierung der einzelnen Produkte erlauben, sind notwendig, um derartige Fragestellungen zu klären.

Wie ein Vergleich von Abb. 46b₂) und c) verdeutlicht, führt unter den gewählten Bedingungen die Verringerung der Primer/Template-Konzentration bei gleicher Reaktionszeit und Enzymmenge zu einer effektiveren enzymatischen Umsetzung. Theoretisch ließe sich die Primer/Template-Konzentration noch weiter verringern. Bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen würde wahrscheinlich die Intensität des 27+1-mers zunehmen, so daß für die Beibehaltung der hier erzielten Relation der Signalintensitäten Reaktionsdauer und Enzymmenge ebenfalls verkleinert werden müßten. Das Verhältnis der Signalintensitäten von Durchlauf bzw. Durchlauf+1 und Terminationsfragmenten wird neben der enzymatischen Umsatzgeschwindigkeit vermutlich über das dNTP/ddNTP-Verhältnis beeinflusst. Weiterhin wäre es interessant zu überprüfen, inwieweit sich eine Erhöhung der dNTP-Konzentration auf

die Produktausbeuten auswirkt. Aus zeitlichen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine weiteren Untersuchungen zur Optimierung der enzymatischen Reaktion durchgeführt. Die hier gefundenen Reaktionsbedingungen erfüllten die gestellten, zuvor erläuterten Anforderungen und wurden daher beibehalten und für die Untersuchungen der modifizierten Verbindungen eingesetzt. Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen stand genügend Material für Vergleichsmessungen zur Verfügung. Summenspektren von ~10 Einzelmessungen lieferten gute Signalintensitäten der Produkte und ermöglichten eine schnelle und verlässliche MALDI-TOF-Analyse.

Abb. 47c) zeigt den PROBE-Assay unter den gleichen Reaktionsbedingungen. Das Terminationsprodukt war mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis und guter Massenauflösung detektierbar, so daß mögliche Fragmentationen gut nachweisbar sein sollten. Einzelmessungen bei erhöhter Laserenergie demonstrierten verstärkte Fragmentierung, basierend auf dem Verlust einer oder zweier Basen. Im Vergleich zur Sequenzierungsreaktion traten hier bei Einzelmessungen über die gesamte Probenoberfläche größere Schwankungen im Verhältnis der Signalintensitäten auf. Dennoch lag das Signal des nicht umgesetzten, biotinylierten Primers stets in niedrigerer Intensität vor als das Signal des Terminationsproduktes. Das hier dargestellte Spektrum stellt ein Summenspektrum von 10 Einzelmessungen dar, aufgenommen an unterschiedlichen Stellen des Proben-Matrix-Kristallisats.

Für die Probenpräparation bei der MALDI-TOF-Analyse der enzymatischen Reaktionen mit Primer/Template-Konzentrationen > 3 pmol erwies sich ein Verhältnis von Proben- und Matrixlösung von 1:2 häufig als vorteilhaft (gegenüber 1:1 bei der Standardpräparation). Mischungen von 0.5 μ l Probenlösung und 1 μ l Matrixlösung oder auch 0.3/0.6 μ l führten reproduzierbar zu einer guten Kristallisation. Häufig waren niedrigere Laserenergien für die Messung und ein geringerer Untergrund die Folge.

Abb. 48A) und B) zeigen die MALDI-TOF Spektren der C-Reaktionen unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie Abb. 46c) und Abb. 47c). Auch hier sind Terminationsfragmente, biotinylierter Primer und das 27-mer, das mit einem weiteren Nucleotid unspezifisch verlängert wurde, mit guten Signalintensitäten und guter Auflösung detektierbar. Während beim PROBE-Assay der T-Reaktion das Terminationsfragment stets in höherer Intensität als der Primer nachzuweisen war, treten hier die Molekülionensignale des nicht umgesetzten Primers und des C₁-Fragmentes in ähnlichen Intensitäten auf. Die experimentell bestimmten Massen der DNA-Fragmente der Spektren der T- und C-Reaktionen unter optimierten Bedingungen sind zusammen mit den berechneten Massen der jeweiligen [M+H]⁺-Signale in Tab. 7 aufgeführt.

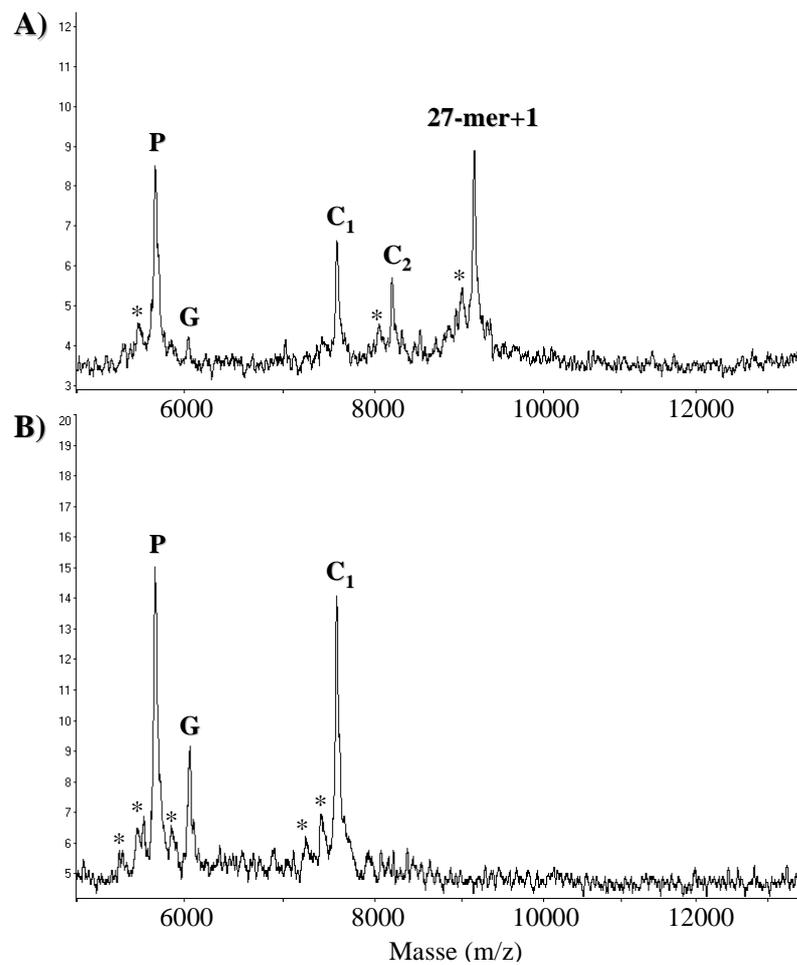


Abb. 48: MALDI-TOF-Spektren der C-Reaktion für Sanger-Sequenzierung und PROBE-Assay unter optimierten Bedingungen.

Tab. 7: Berechnete und experimentell bestimmte Massen der zu erwartenden DNA-Fragmente für die T- und C-Reaktion der Sanger-Sequenzierung bzw. des PROBE-Assays:

$[M+H]^+_{\text{exp}}$ [Da]				$[M+H]^+_{\text{be}}$ r [Da]	DNA-Fragmente
Abb. 46c	Abb. 47c	Abb. 48A	Abb. 48B		
5722	5722	5722	5722	5721.9	Biotinylierter Primer
			6051	6051.1	Biotinylierter Primer +G
6339	6339			6339.3	T ₁
6975				6972.7	T ₂
		7576	7575	7575.1	C ₁
		8192		8193.5	C ₂
8835				8835.9	27-mer (run-through)
9148		9149			27-mer+1 (mit 1= C (289.2), T (304.2), A (313.2), G (329.2) oder ddT (288.2) bzw. ddC (273.2 Da)

2 PROBE-Assay mit massenmodifizierten Terminatoren

Im folgenden sollte mit Hilfe des PROBE-Assays untersucht werden, ob die modifizierten 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate (s. Abb. 49) von der Polymerase akzeptiert und eingebaut werden und inwieweit die resultierenden Terminationsprodukte während des MALDI-Prozesses stabil sind.

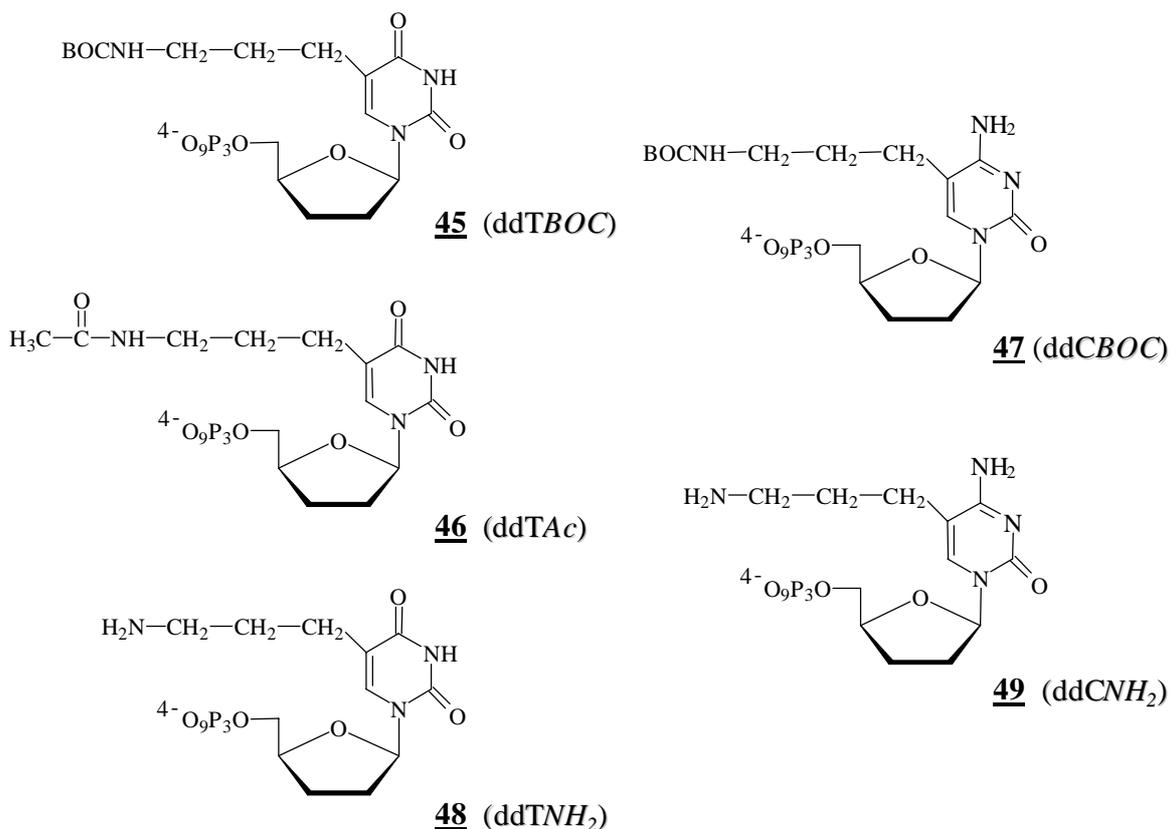


Abb. 49: Strukturen der massenmarkierten 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate

Abb. 50 zeigt die MALDI-TOF-Spektren der PROBE-Assays der modifizierten ddTTP-Verbindungen, Abb. 51 die der modifizierten ddCTP-Verbindungen. Tab. 8, S.117 gibt die berechneten und die experimentell bestimmten Massen der [M+H]⁺-Signale der modifizierten Terminationsprodukte wieder. Zum besseren Vergleich der Massen und der jeweiligen Massendifferenzen wurden die Massen der nicht modifizierten T- und C-Terminationsfragmente zusätzlich aufgeführt.

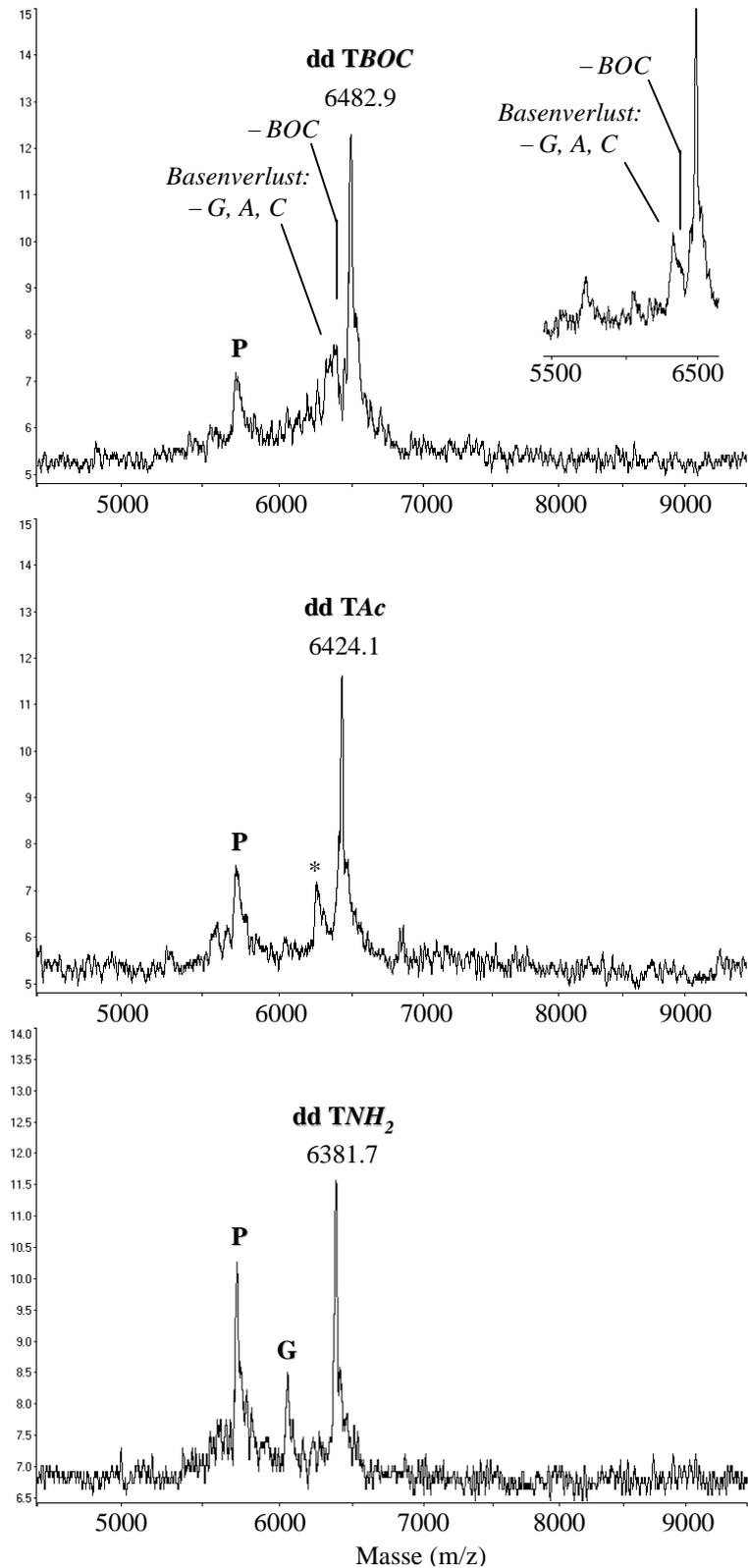


Abb. 50: MALDI-TOF-Spektren der PROBE-Assays unter Einsatz der modifizierten 2',3'-Dideoxyuridin-5'-triphosphate: ddTBOCTP, ddTACTP und ddTNH₂TP.

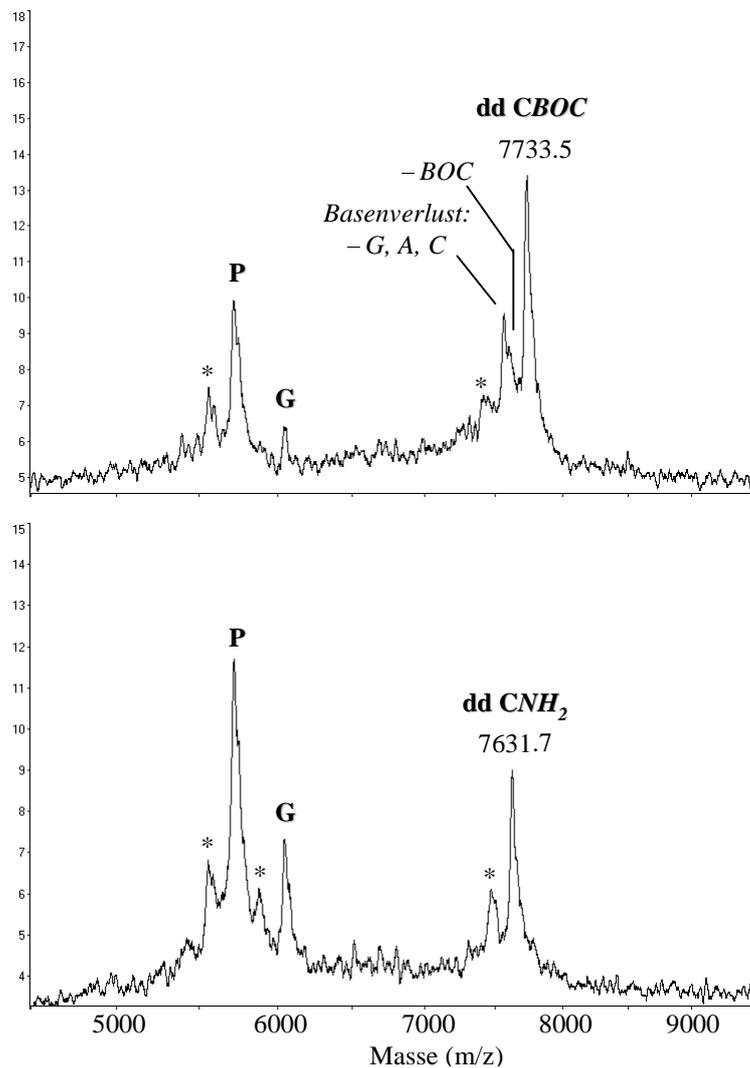


Abb. 51: MALDI-TOF-Spektren der PROBE-Assays unter Einsatz der modifizierten 2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphate: ddCBOCTP und ddCNH₂TP.

Wie die MALDI-TOF-Spektren der enzymatischen Reaktionen demonstrieren, werden alle Verbindungen von der Polymerase akzeptiert und führen zur Termination der Primer Extension. Nicht-Basen-spezifische Termination durch die modifizierten Verbindungen wurde nicht beobachtet. Die Signale der erwarteten Terminationsprodukte konnten mit guten Intensitäten und guter Massenauflösung nachgewiesen werden. Die Spektrenqualität war vergleichbar mit der von PROBE-Assays, welche mit nicht modifizierten Didesoxynucleosidtriphosphaten unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt wurden.

Tab. 8: Experimentell bestimmte und berechnete Massen der modifizierten und nicht modifizierten Terminationsprodukte.

$[M+H]^+_{\text{exp}}$ [Da]	$[M+H]^+_{\text{ber.}}$ [Da]	Terminationsprodukt
6482.9	6482.5	ddTBOC
6424.1	6424.4	ddTAc
6381.7	6382.4	ddTNH ₂
6339.5	6339.3	ddT (= T ₁)
7733.5	7732.3	ddCBOC
7631.7	7632.2	ddCNH ₂
7575.2	7575.1	ddC (= C ₁)

Während die *t*-Butyloxycarbonylschutzgruppe bei der MALDI-Analyse der Triphosphatverbindungen mit DHB als Matrix vollständig abgespalten wurde, erwies sich das entsprechend modifizierte Terminationsprodukt unter MALDI-Bedingungen (mit 3-HPA als Matrix) als relativ stabil (vgl. Abb. 50, ddTBOC). So konnte das einfach geladene Molekülion der ddTBOC-terminierten Verbindung mit einer Masse von 6483 Da (berechnet 6482.5 Da) einwandfrei nachgewiesen werden. Das Signal des Fragmentions, basierend auf der Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonylgruppe, wurde ebenfalls detektiert, allerdings lediglich in ähnlich geringen Intensitäten wie die Fragmentionensignale, die aus der Eliminierung einer Base hervorgehen. Aufgrund der mangelnden Massenauflösung in diesem Massenbereich ist es nicht möglich, die einzelnen Fragmentionen vollständig aufzulösen. Dennoch läßt sich bei Messungen mit sehr niedrigen Laserenergien zwischen der Abspaltung von C (Δm zum Hauptsignal = 111 Da) und der Abspaltung von *t*-BOC (Δm zum Hauptsignal = 100.12 Da) differenzieren. Bei höheren Laserenergien treten auch die Fragmentionensignale, die aus der Eliminierung einer Base resultieren (überwiegend G), in höheren Intensitäten auf, so daß der Verlust der *t*-BOC-Gruppe lediglich als geringe Verbreiterung dieser nicht aufgelösten Signale in relativ niedriger Intensität beobachtet werden kann (vgl. kleines Spektrum). Im höheren Massenbereich tritt Fragmentionenbildung durch Basenverlust verstärkt auf. Für das ddCBOC-terminierte Produkt, dessen Molekülionensignal hier ebenfalls mit guter Intensität nachgewiesen werden konnte, weist daher das Fragmentionensignal, welches aus der Abspaltung der *t*-BOC-Gruppe resultiert, eine eindeutig geringere Intensität auf als die Signale, die auf Basenverlust beruhen (vgl. Abb. 51, ddCBOC).

Wie das Spektrum der ddTAcTP-Reaktion zeigt, ist auch diese Massenmarkierung unter MALDI-Bedingungen stabil. Abspaltung der Acetylgruppe ($\Delta m = 42.04$) konnte selbst bei Messungen mit erhöhter Laserenergie nicht nachgewiesen werden. Terminierte Produkte, die als Massenmarkierung den Aminopropyl linker tragen, sind, wie erwartet, ebenfalls stabil.

3 Sanger-Sequenzierung mit massenmodifizierten Terminatoren

Die folgenden Untersuchungen demonstrieren die Eigenschaften der hier dargestellten modifizierten Didesoxynucleosidtriphosphate als potentielle Terminatoren bei der Sanger-Sequenzierung am Beispiel der ddTAcTP und ddTBOCTP-Verbindungen.

Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: Erstens wurden die modifizierten Didesoxynucleosidtriphosphate im Vergleich zur Standard-T-Reaktion für die Sequenzierung von einzelsträngiger M13mp18 DNA eingesetzt. Die resultierenden Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und über die radioaktive Markierung mittels α -³⁵SdATP nachgewiesen. Aufgrund der naheliegenden Annahme, daß die modifizierten Verbindungen von der Polymerase schlechter eingebaut werden als das entsprechende ddTTP, wurden pro Verbindung sechs Sequenzierungen mit steigender Endkonzentration (EK) an modifizierten ddTTP durchgeführt (Verkleinerung des dNTP/ddNTP-Verhältnisses). Zweitens sollten die modifizierten Verbindungen für die Sequenzierung des synthetischen Templates eingesetzt werden, wobei der Nachweis der Reaktionsprodukte mittels MALDI-TOF-MS erfolgte.

3.1 Sequenzierung von M13mp18

In Abb. 52 ist das Autoradiogramm des Sequenzgels der radioaktiven Sequenzierung von M13mp18 dargestellt. Abb. 52A) demonstriert, als Kontrolle, die Standard-A-,C-,G- und T-Reaktion, und zwar mit und ohne Zugabe von 1 μ l Manganpuffer zum Reaktionsansatz. Die Verschiebung der Produktausbeute zu kleineren Fragmenten in Anwesenheit von Mn^{2+} ist deutlich erkennbar. Abb. 52B) hingegen zeigt die Sequenzierungsreaktionen mit unterschiedlichen Endkonzentrationen der ddTAcTP und ddTBOCTP-Verbindung (Endkonzentrationen von 5, 10, 15, 20, 50 und 100 μ M) im Vergleich zur Standard-T-Reaktion (8 μ M Endkonzentration an ddTTP). Auch diese Reaktionen erfolgten mit und ohne Zusatz von Manganpuffer.

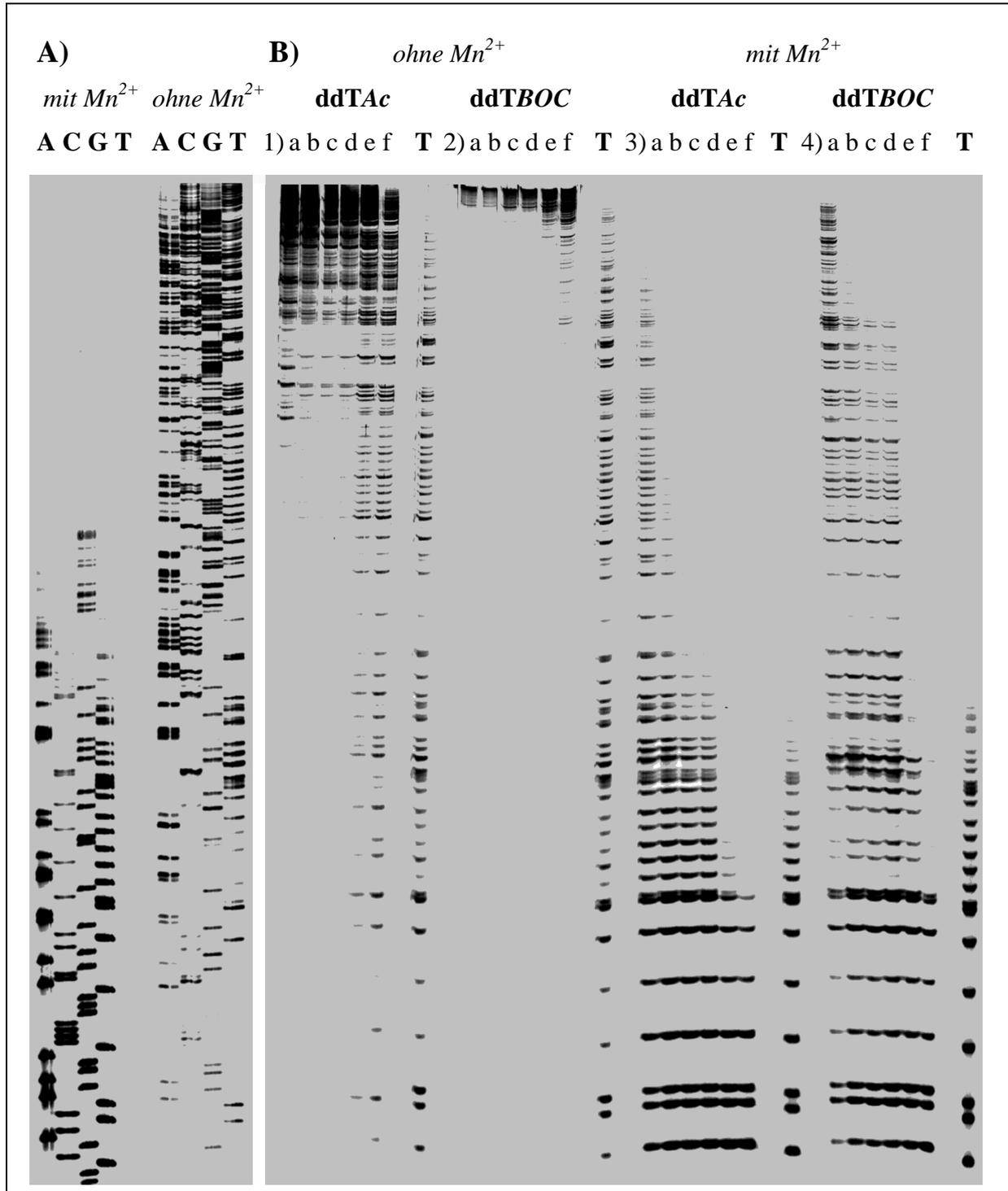


Abb. 52: Autoradiogramm eines Sequenz Gels. Sequenzierung von M13mp18ss. A): Standard-A,C,G und T-Reaktionen mit und ohne Mn^{2+} -Zusatz (Kontrolle). B) Sequenzreaktionen der modifizierten T-Terminatoren ddT_{Ac} und ddT_{BOC} unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen (a): 5 μ M, b): 10 μ M, c): 15 μ M, d): 20 μ M, e): 50 μ M und f): 100 μ M Endkonzentration ddTTP_{mod}). Dazwischen, zum besseren Vergleich, nochmals die Standard-T-Reaktion (8 μ M Endkonzentration), mit und ohne Mn^{2+} -Zusatz.

Beide modifizierten Verbindungen wurden von der Polymerase eingebaut und führten zu Terminationsprodukten, welche die T-Sequenzleiter wiedergeben. Nicht Basen-spezifische Termination wurde nicht beobachtet. Treten innerhalb der Sequenz mehrere, aufeinanderfolgende Thymidinbasen auf, weisen die entsprechenden Banden der modifizierten Terminationsprodukte zum Teil leicht unterschiedliche Intensitäten auf, wobei diese Intensitätsunterschiede bei verschiedenen Endkonzentrationen variieren. Bei "idealer" Endkonzentration sind alle aufeinanderfolgenden Fragmente detektierbar. Mit abnehmender Konzentration nimmt oftmals die Bandenintensität der oberen Bande ab, bis diese nicht mehr (bzw. nur noch bei verlängerter Filmexpositionsdauer) nachweisbar ist. Speziell die Sequenzierungen ohne Zusatz von Mn^{2+} veranschaulichen, daß die Einbaurate von ddTTP über ddTAcTP zu ddTBOCTP stark abnimmt. So konnte für die ddTAc-terminierten Produkte unter Verwendung von 100µM Endkonzentration (Spur f) auch das kleinste Fragment noch nachgewiesen werden, wenn auch mit geringerer Bandenintensität als die entsprechende ddT-Verbindung (Abb. 52B, ohne Mn^{2+} , ddTAc, unterster Spot). ddTBOC-terminierte Produkte sind dagegen erst ab dem vierten T-Fragment mit sehr schwachen Bandenintensitäten nachweisbar (100µM EK, Spur f; infolge des Qualitätsverlustes beim Scannen des Gels hier jedoch nicht sichtbar). Weiterhin ist auffallend, daß längere Terminationsprodukte (gegenüber kürzeren) auch schon mit zunehmend niedrigeren Endkonzentrationen der modifizierten Verbindungen (100µM-5µM) nachgewiesen werden können. Das bedeutet, längere Fragmente lassen sich selbst mit abnehmenden Endkonzentrationen zunehmend besser detektieren. Dieser Effekt ist für die Umsetzungen beider modifizierter Verbindungen zu beobachten, bei den ddTBOC-terminierten Produkten jedoch zu höheren Fragmenten verschoben. Vermutlich wird infolge der schlechteren Einbaurate die Produktausbeute zu längeren Fragmenten verschoben, so daß im höheren Massenbereich auch mit niedrigeren Endkonzentrationen (5µM EK) gute Produktausbeuten erzielt werden.

In Anbetracht der, gegenüber der Acetylgruppe, sterisch anspruchsvolleren t-Butyloxycarbonylverbindung, erscheint es sinnvoll, daß die Verbindungen in der Reihe ddTTP>ddTAcTP>ddTBOCTP mit abnehmender Effizienz eingebaut werden. Aufgrund der zunehmend schlechteren Struktur-Komplementarität (Watson-Crick-Geometrie) in dieser Reihe war anzunehmen, daß Verbindungen mit voluminöseren Gruppen in Position 5 durch die Polymerase stärker diskriminiert werden. Die Folge ist, ähnlich wie bei einer Erhöhung des dNTP/ddNTP-Verhältnisses, eine Verschiebung der Produktausbeuten zu längeren Fragmenten.

Wie schon erwähnt, führt die Anwesenheit von Mn^{2+} zu einer geringeren Diskriminierung der ddNTPs im Vergleich zu den dNTPs durch die Polymerase. Dieser Effekt ist bei den modifizierten Verbindungen ebenfalls zu beobachten. So konnten für Sequenzierungen, die

unter Zusatz von Manganpuffer durchgeführt wurden, für beide modifizierten Verbindungen mit allen hier verwendeten Endkonzentrationen kleine Fragmente sehr gut nachgewiesen werden. Angesichts der höheren Massen nahm die Laufgeschwindigkeit im Gel von ddT- über ddTAc- zu ddTBOC-terminierten Fragmenten ab, so daß die Banden der modifizierten Verbindungen im Gel geringfügig oberhalb der Banden der ddT-Reaktionsprodukte lagen. Bei längeren Fragmenten spielt das Verhältnis der Masse der Markierung zur Gesamtmasse kaum eine Rolle, und die jeweiligen Produktbanden liegen im Gel auf gleicher Höhe.

Während für die kleineren ddTAc-terminierten Fragmente die Produktausbeuten für Umsetzungen mit 5-100µM Endkonzentrationen in einem Bereich lagen, wo kaum Unterschiede in den Bandenintensitäten feststellbar waren, konnten für die kleineren ddTBOC-terminierten Fragmente zunehmende Bandenintensität mit steigender ddTBOCTP-Endkonzentration beobachtet werden. Im Vergleich zu Sequenzierungen ohne Zusatz von Manganpuffer, bei denen eine hohe Endkonzentration erforderlich war (100µM), um kleine Fragmente nachzuweisen, lange Fragmente dagegen sowohl mit hohen als auch mit niedrigen Endkonzentrationen detektiert werden konnten, ist hier, bei Umsetzungen mit Mn^{2+} , das umgekehrte Phänomen zu beobachten. Anscheinend wurden die Produktausbeuten so drastisch zu kleineren Fragmenten verschoben, daß sie in einem Bereich liegen, wo eine Erhöhung der Endkonzentration der modifizierten Verbindung (Verminderung des dNTP/ddNTP-Verhältnisses) zu einem frühzeitigen Kettenabbruch führt. Das bedeutet, eine Erhöhung der Endkonzentration hat hier eine weitere Verschiebung der Produktausbeuten zu kleineren Fragmenten zur Folge. Terminationsprodukte mit zunehmender Fragmentlänge sind daher nur noch mit abnehmenden Endkonzentrationen nachweisbar. Wie das Autoradiogramm demonstriert, können Fragmentlängen die bei ddTAcTP-Sequenzierungen lediglich mit einer Endkonzentration von 5 oder 10µM detektierbar sind, bei Umsetzungen mit ddTBOCTP durchaus noch mit höheren Endkonzentrationen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu ist die Länge der nachzuweisenden Fragmente für die Standard-T-Reaktion (8µM EK) deutlich geringer (vgl. Abb. 52B: Die beiden rechten T-Spuren entsprechen der Kontroll-T-Reaktion mit Mn^{2+} , 3a/b und 4a/b den Umsetzungen der mod. Verbindungen unter gleichen Bedingungen). Dieser Sachverhalt stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Akzeptanz der Polymerase in der Reihe ddTTP > ddAcTP >> ddTBOCTP abnimmt. Aufgrund der schlechteren Akzeptanz der Polymerase für die modifizierten Triphosphate verschiebt sich die Produktausbeute zu entsprechend höheren Fragmenten und zwar für die ddTBOC-Verbindung stärker als für die ddTAc-Verbindung. Dieser Effekt überlagert sich hier mit der Wirkung des Mn^{2+} -Zusatzes, der für die Verschiebung der Produktausbeuten zu kleineren Fragmenten verantwortlich ist.

Um vergleichbare Produktausbeuten zur Standard-ddT-Reaktion zu erzielen (ähnliche

Intensitäten und Fragmentlängenverteilung), bieten sich daher zwei Möglichkeiten an: Die Verminderung des dNTP/ddNTP-Verhältnisses (Erhöhung der Endkonzentration an ddNTP) oder/und der Zusatz von Manganpuffer. Wie das Sequenzgel zeigt, sind für Sequenzierungen ohne Mn^{2+} -Zusatz ddTAcTP-Konzentrationen von $\geq 100\mu M$ erforderlich, um eine ähnliche Fragmentlängenverteilung zur T-Reaktion zu erhalten. Für die *t*-Butyloxycarbonylverbindung hingegen sind noch deutlich höhere Konzentrationen notwendig. Zwar sind für die Umsetzung mit $100\mu M$ ddTBOCTP bis auf die untersten vier T-Fragmente alle Produkte nachweisbar, im Vergleich zu den ddT-Produkten jedoch mit sehr geringen Intensitäten im unteren Fragmentlängenbereich. Sequenzierungsreaktionen unter Zusatz von Mn^{2+} hingegen liefern für beide modifizierten Verbindungen bei der Verwendung von 5 oder $10\mu M$ Endkonzentration vergleichbare Produktausbeuten zur T-Reaktion ohne Zusatz von Manganpuffer.

3.2 Sequenzierungen mittels MALDI-TOF-MS

Abb. 53A) zeigt die MALDI-TOF-Spektren der Sanger-Sequenzierung mit ddTTP, ddTAcTP und ddTBOCTP als Terminatoren unter den gewählten, optimierten Bedingungen (dNTP/ddNTP-Verhältnis: $80\mu M/20\mu M$). Wie schon zuvor demonstriert, sind für die enzymatische Umsetzung mit ddTTP die Signale des Primers, der Terminationsprodukte und des um ein weiteres Nucleotid unspezifisch verlängerten 27-mers (27-mer+1) in relativ ähnlichen Intensitäten gut nachweisbar. Demgegenüber weisen die Spektren der Sequenzierungsreaktionen mit ddAcTP und ddTBOCTP ein gänzlich anderes Verhältnis der Signalintensitäten auf. Zwar sind die ddTAc-terminierten Produkte gut nachweisbar, die vergleichsweise hohe Intensität des 27-mer+1-Signals legt jedoch nahe, daß bei der enzymatischen Reaktion hauptsächlich das nicht-terminierte, vollständig verlängerte und um ein Nucleotid erweiterte Produkt entstanden ist. Im Vergleich dazu ermöglicht das Spektrum der ddTBOCTP-Sequenzierung unter gleichen Reaktions- und Meßbedingungen lediglich den Nachweis des Primers und des ersten Terminationsproduktes, allerdings nur mit sehr geringen Signalintensitäten. Im Vergleich dazu tritt ein sehr intensives 27-mer+1-Signal auf. Das 27-mer selbst ist nicht mehr eindeutig nachweisbar. Statt dessen tritt ein weiteres Signal auf, welches auf die zusätzliche unspezifische Addition eines weiteren Nucleotids zum 27+1-mers schließen läßt (im Spektrum: 27-mer+2). Wie klar erkennbar ist, läuft die enzymatische Reaktion gut ab. Schwache Signale für die Terminationsfragmente müssen daher auf einen geringeren Einbau der Verbindungen durch die Polymerase zurückzuführen sein.

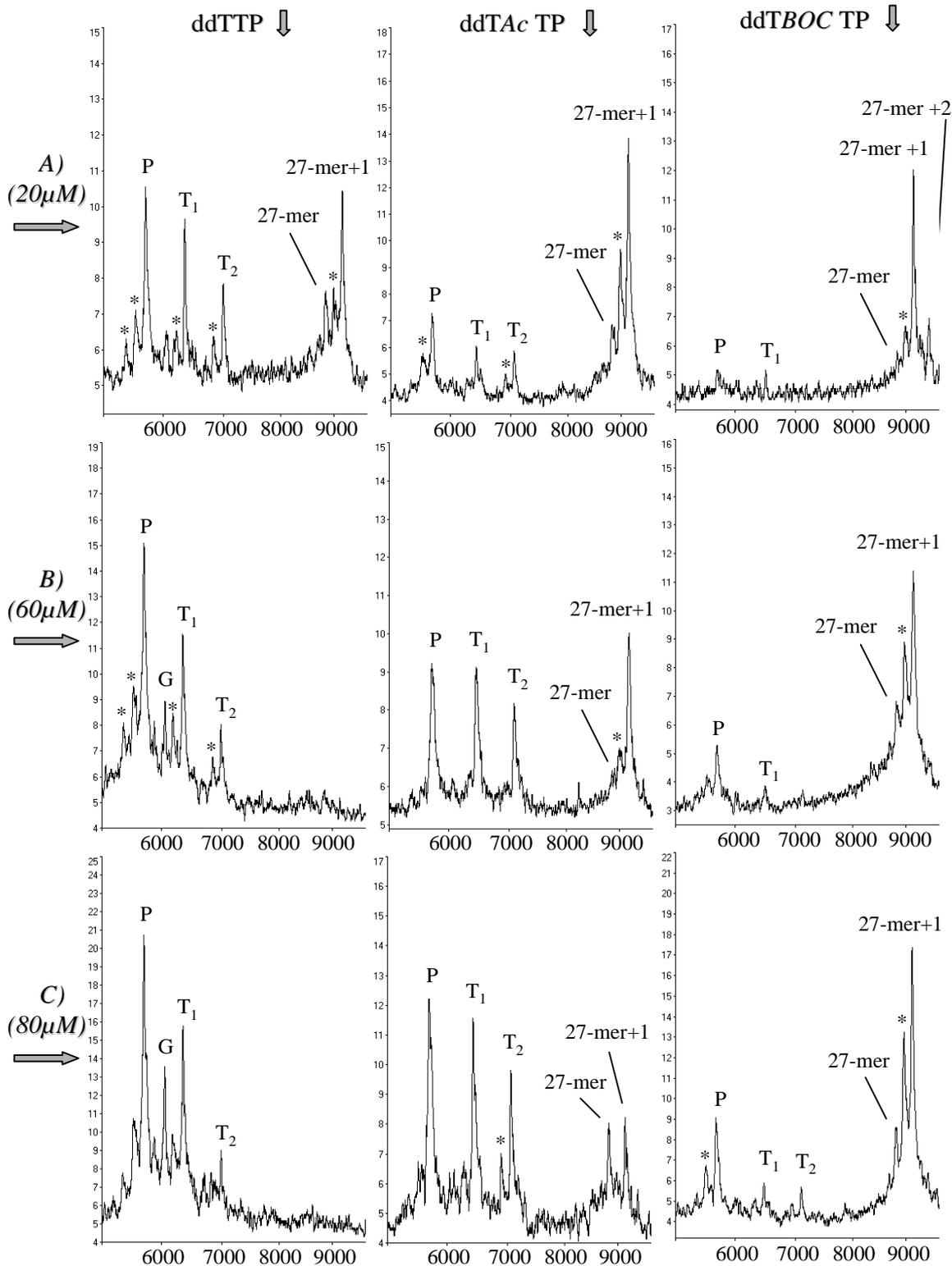


Abb. 53: MALDI-TOF-Spektren der Sanger-Sequenzierung mit ddTTP, ddAcTP und ddTBOCTP als Terminatoren unter Verwendung von steigenden Endkonzentrationen an der jeweilig terminierenden Verbindung. Das dNTP/ddXTP-Verhältnis betrug für Spektren der A)-Reihe: 80μM/20μM, für die der B)-Reihe: 80μM/60μM und für die der C)-Reihe: 80μM/80μM (mit X= T, TAc oder TBOC).

Ein Vergleich der drei Spektren (ddTTP→ddTAcTP→ddTBOCTP) demonstriert deutlich abnehmende Signalintensitäten der beiden Terminationsprodukte in Relation zur Signalintensität des nicht terminierten Produktes (27-mer+1). Analog zu den Ergebnissen bei der Sequenzierung von M13mp18 zeigt sich auch hier eine abnehmende Akzeptanz der Polymerase in der Reihe ddTTP > ddAcTP >> ddTBOCTP, was zu einem schlechteren Einbau der modifizierten Verbindungen und damit zu geringeren Ausbeuten der markierten Terminationsprodukte im Vergleich zum nicht terminierten Produkt (Durchlauf) führt.

Um zu überprüfen, inwieweit eine Erhöhung der Produktausbeute über eine Verkleinerung des dNTP/ddNTP-Verhältnisses erzielt werden kann, wurden nachfolgend unter sonst gleichen Bedingungen Sequenzierungen mit 40, 60 und 80 µM Endkonzentrationen an ddXTP durchgeführt (mit X= T, TAc und TBOC). Abb. 53B) und C) zeigen die Spektren der Umsetzungen mit 60 und 80µM Endkonzentrationen. Ein Vergleich der Spektren A), B) und C) veranschaulicht den Einfluß steigender ddXTP-Konzentrationen auf die Ausbeute an Sequenzierungsprodukten. Alle Spektren demonstrieren eine Erhöhung der Signalintensitäten der Terminationsprodukte in Relation zum nicht terminierten 27-mer+1-Signals mit steigender Endkonzentration an ddXTP. Da die optimierten Reaktionsbedingungen (ddNTP/ddNTP: 80µM/20µM) für die ddT-Reaktion so gewählt waren, daß eine relativ gleichmäßige Verteilung von Primer, Terminationsprodukten und nicht terminiertem Produkt vorlag (vergleichbare Signalintensitäten) führte die Erhöhung der ddTTP-Konzentration hier zu einer vollständigen Verschiebung der Produktausbeuten zu den Terminationsfragmenten bzw. zu T₁. Schon bei einer ddTTP-Konzentration von 40µM (hier aus Platzgründen nicht dargestellt) sind die Signale des 27-mers und des 27-mers +1 im Vergleich zu denen des Primers und der Terminationsprodukte nur noch in sehr geringen Intensitäten nachweisbar. Bei einer weiteren Erhöhung der ddTTP-Konzentration (60 und 80µM) konnten diese Signale nicht mehr detektiert werden. Zudem traten Primer, P-dG-Fragment und T₁ im Vergleich zum T₂-Produkt mit zunehmenden Signalintensitäten auf. Das läßt vermuten, daß bei der enzymatischen Reaktion aufgrund der hohen ddTTP-Konzentration sofortiger Kettenabbruch eintritt (Verschiebung der Produktausbeuten zu kleineren Fragmenten). Erstaunlicherweise ist ebenfalls ein Anstieg der Signalintensität des Primers zu beobachten.

Demgegenüber demonstrieren die Spektren der Sequenzierungen mit ddTAcTP und ddTBOCTP mit steigender ddNTP-Konzentration einen deutlichen Anstieg der Signalintensitäten der Terminationsprodukte im Vergleich zum nicht terminierten Produkt, wobei auch hier ein ähnlicher Anstieg des Primersignals beobachtet werden kann. Für die Umsetzung mit ddTAcTP konnten bei einer Endkonzentration von 60µM ähnliche Spektren erzielt werden, wie die der ddT-Reaktion mit 20µM Endkonzentration. Eine weitere Erhöhung an [ddTAcTP] führte zu abnehmender Intensität des 27-mer+1-Signals. Zudem trat hier, im

Vergleich zu den anderen Spektren, das nicht terminierte 27-mer verstärkt auf.

Die MALDI-TOF-Spektren der Sequenzierungen mit ddTBOCTP zeichneten sich trotz erhöhter Konzentration durch vergleichsweise schlechte Signalintensitäten von T₁ und T₂ in Relation zum 27-mer+1-Signal auf. Sequenzierungen mit 80µM ddTBOCTP-Konzentration führten dabei zu geringfügig schlechteren Intensitäten der Terminationsprodukte als die der 20µM ddTAc-Reaktion. Für eine zur optimierten T-Reaktion vergleichbaren enzymatischen Umsetzung sind hier schätzungsweise Konzentrationen an ddTBOCTP von ≥120µM erforderlich.

4 Multiplex-PROBE-Assay

Im folgenden sollte untersucht werden, ob die Massendifferenzen der hier dargestellten Verbindungen hinreichend groß sind, um bei der Multiplex-PROBE-Sequenzierung eine eindeutige Zuordnung und Identifizierung der Terminationsprodukte zu gewährleisten (Massendifferenzen der jeweiligen Verbindungen sind in Tab. 3, S. 74 wiedergegeben). Hierfür wurden zunächst die aufgereinigten Reaktionsansätze der zuvor beschriebenen, durchgeführten PROBE-Assays (mit modifizierten und nicht modifizierten ddTTP und ddCTP) einer gemeinsamen massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Folgende PROBE-Assays wurden gemeinsam analysiert: (ddT, ddTBOC), (ddT, ddTAc, ddTBOC), (ddT, ddTNH₂, ddTAc, ddTBOC) sowie (ddC, ddCBOC) und (ddC, ddCNH₂, ddCBOC), wobei jeweils 250 nl der entsprechenden, aufgereinigten Reaktionsansätze auf dem Probenträger gut durchmischt und anschließend mit der Matrix versetzt wurden.

Da eine gemeinsame Probenaufreinigung der Reaktionsansätze eine Reduzierung des Arbeits- und Kostenaufwandes beinhaltet, erfolgte zusätzlich die Durchführung der entsprechenden PROBE-Assays mit gemeinsamer Probenaufreinigung. Hierbei war es wichtig, die Menge an Streptavidin-beschichteten Dynabeads auf 5µl pro Reaktionsansatz zu reduzieren, da anderenfalls das doppelt geladene Molekölion des Streptavidins die Zuordnung des ddTBOC-terminierten Produktes verhinderte. Für beide Verfahren (gemeinsame Analyse der getrennt aufgereinigten Proben und Analyse der gemeinsam aufgereinigten Proben) wurden Spektren vergleichbarer Qualität erhalten.

Abb. 54 zeigt die MALDI-TOF-Spektren der Multiplex-PROBE-Reaktionen der ddT-Verbindungen (die berechneten Massen der [M+H]⁺-Signale der Terminationprodukte sind in Tab. 8, S. 117 angegeben).

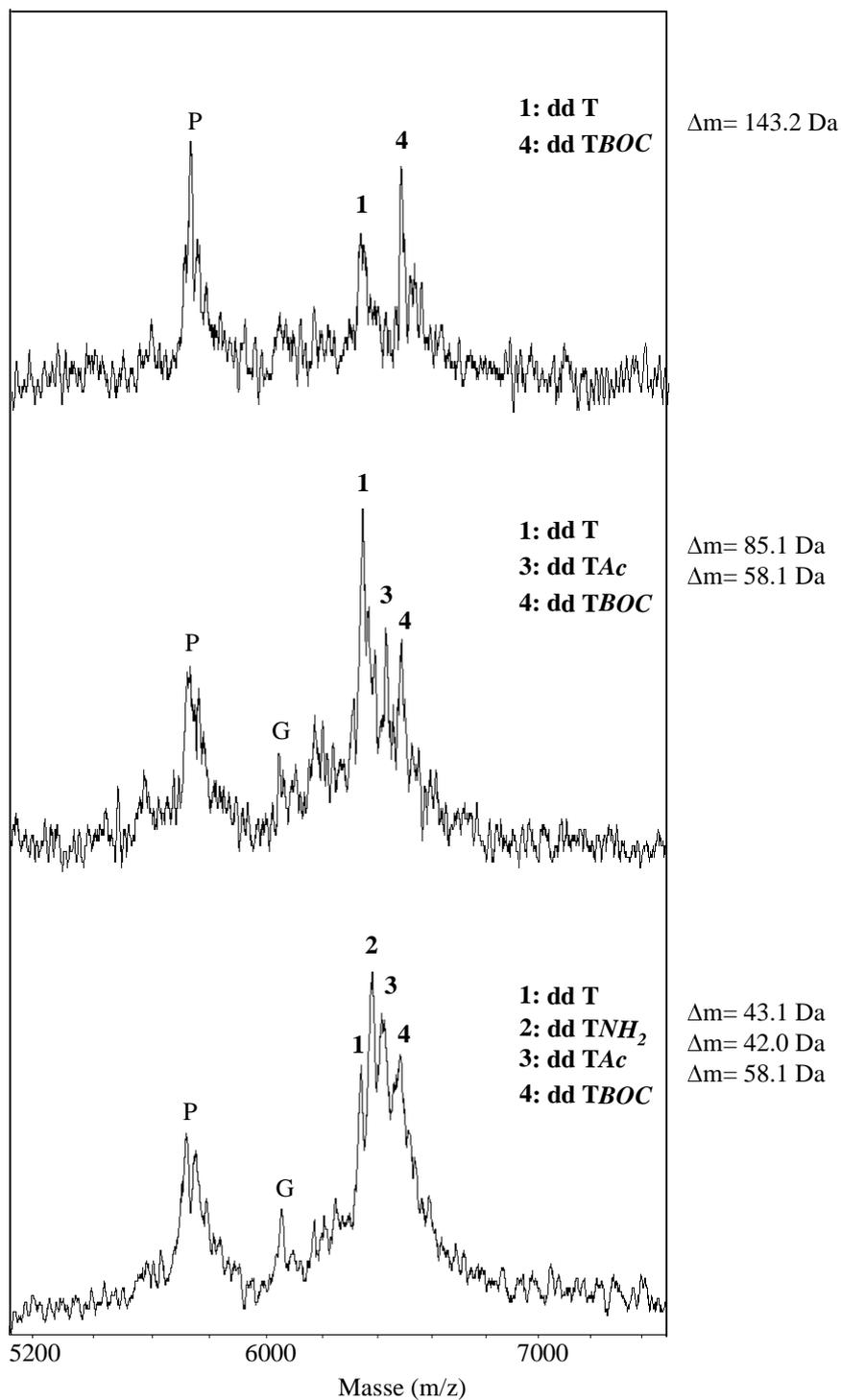


Abb. 54: MALDI-TOF-Spektren der Multiplex-PROBE-Reaktionen der ddT-Verbindungen

Alle Terminationsprodukte konnten eindeutig zugeordnet und identifiziert werden. Während

Produkte mit Massendifferenzen von 143 Da in diesem Massenbereich sehr gut aufgetrennt werden können, lassen sich jedoch Verbindungen mit Massenunterschieden von ~40 Da hier nur noch unter optimalen Meßbedingungen getrennt voneinander darstellen. Daher ist anzunehmen, daß diese Verbindungen im höheren Massenbereich mit dem hier verwendeten Gerät nicht mehr aufgelöst werden können. Tatsächlich konnte für die Multiplex-PROBE-Reaktionen der C-terminierten Fragmente, deren Masse ca. 1 kDa höher liegt, lediglich das ddC- und ddCBOC-terminierte Produkt aufgelöst und eindeutig identifiziert werden (vgl. Abb. 55). Bei der gemeinsamen MALDI-TOF-Analyse der (ddC, ddCNH₂, ddTBOC)-Reaktion trat für das ddC- und das ddCNH₂-terminierte Produkt ein einheitliches, nicht aufgelöstes Signal auf (Spektrum hier nicht dargestellt). Möglicherweise wäre die entsprechende acetylierte Verbindung mit einer Massendifferenz von 58 Da zur ddCBOC- und 85 Da zur ddC-Verbindung gerade noch aufzulösen (Vergleich zur Multiplex-T-Reaktion), eine Differenzierung zwischen ddC- und ddCNH₂-terminierten Produkt war jedoch nicht möglich ($\Delta m = 43$ Da).

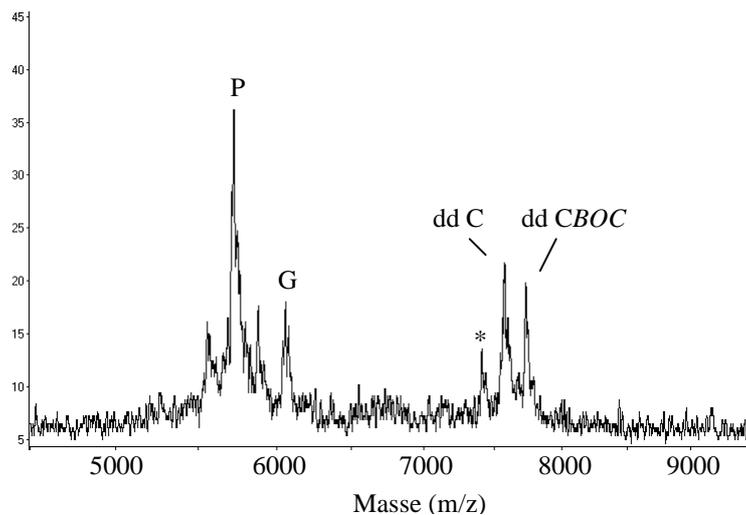


Abb. 55: MALDI-TOF-Spektrum der Multiplex-PROBE-Reaktion unter Verwendung von ddCTP und ddCTBOCTP als Terminatoren.

Da das Auflösungsvermögen im jeweiligen Massenbereich entscheidend von den Geräteparametern und damit ebenfalls vom verwendeten Gerät abhängig ist, wurden anhand der Multiplex-T-Reaktionen MALDI-TOF-Analysen unter gleichen Bedingungen der Probenpräparation an unterschiedlichen Geräten durchgeführt.

Vergleichsmessungen erfolgten an:

- einem baugleichem Vision 2000, ausgerüstet mit verzögerter Ionenextraktion im Linear-Modus (DE-LTOF). Spektren wurden a) im Reflektor-Modus mit kontinuierlicher Ionenextraktion (CE) analog zum hier verwendeten Gerät oder aber b) im DE-Linear-Modus aufgenommen.
- dem DYNAMO (Nachfolger des Vision 2000). Spektrenaufnahme erfolgte a) im Reflektor-Modus (CE) und b) im DE-Linear-Modus.
- dem De-Voyager. Die Messungen erfolgten im DE-Linear-Modus.

Ein Vergleich der erhaltenen Spektren mit den in Abb. 54 dargestellten Spektren der Multiplex-PROBE-Reaktionen zeigte folgendes:

Messungen im Reflektor-Modus bei kontinuierlicher Ionenextraktion, wie sie im Rahmen dieser Arbeit mit dem hier verwendeten Gerät durchgeführt wurden, lieferten mit dem ausgerüsteten Vision 2000 und dem Nachfolge-Modell (Dynamo) wenig schlechtere Ergebnisse. Während die drei T-Terminationsprodukte durchaus noch aufgelöst werden konnten, war dies für das Gemisch, bestehend aus vier T-terminierten Produkten, gerade eben nicht mehr möglich. Demgegenüber erlaubte die Spektrenaufnahme im DE-Linear-Modus bei beiden Geräten die eindeutige Zuordnung und Identifizierung des vierer-Gemisches, und zwar mit einer geringfügig besseren Signalauftrennung als die der in Abb. 54 dargestellten Spektren. Dennoch war auch hier keine Grundlinien-Trennung der einzelnen Signale zu erzielen.

Die besten Ergebnisse wurden für MALDI-DE-LTOF-Analysen mit dem De-Voyager der Firma PerSeptive Biosystems erhalten. Die Spektren sind in Abb. 56 dargestellt und demonstrieren ein deutlich besseres Auflösungsvermögen des Gerätes.

Neben den einfach geladenen Molekülionensignalen sind hier ebenfalls die $[M+Na]^+$ - und $[M+K]^+$ -Signale der Verbindungen gut aufgetrennt und eindeutig zuzuordnen (vgl. Spektrum der ddT/ddTBOC-Reaktion: Die beiden nicht beschrifteten, den Molekülionen nachfolgenden Signale geringerer Intensität entsprechen dem jeweiligen Na- und K-Addukt). Bei der Analyse der vier T-terminierten Verbindungen kann das $[M+K]^+$ -Signal des ddT- und des ddTNH₂-terminierten Produktes aufgrund der geringen Massendifferenz zum nächst höheren Terminationsprodukt nicht aufgelöst werden ($\Delta m (+K) = 38$ Da, $\Delta m (\text{Peak 1/2}) = 43$ Da, $\Delta m (\text{Peak 2/3}) = 42$ Da). Die Molekülionensignale der vier Terminationsprodukte sind im Vergleich zu den in Abb. 54 dargestellten Spektren sehr gut aufgelöst und lassen vermuten,

daß in diesem Massenbereich auch noch kleinere Massendifferenzen ($\Delta m = 30-40$ Da) aufgetrennt werden können.

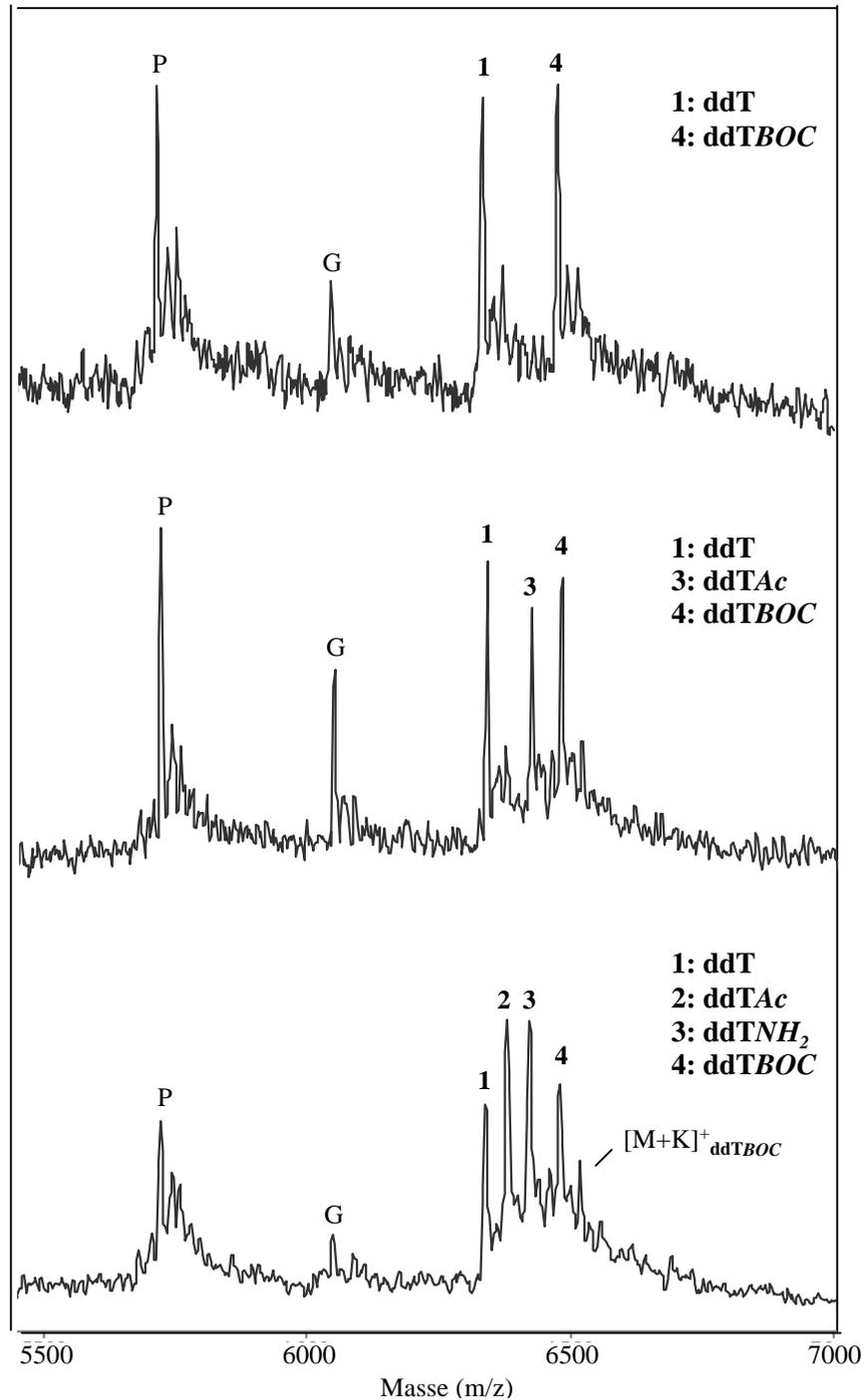


Abb. 56: DE-MALDI-LTOF-Spektren der Multiplex-PROBE-Reaktionen der ddT-Verbindungen

5 Untersuchungen zur Triphosphatsynthese

Wie in Abb. 40, S.88 unter "Triphosphatsynthese" dargestellt, weisen die IE-HPLC-Chromatogramme der ddTBOCTP- (**45**) und ddCBOCTP-Verbindung (**47**) zusätzlich zum Hauptsignal mit einer Retentionszeit von 17.13 bzw. 12.85 min. ein weiteres Signal sehr geringer Intensität bei 9.19 min. auf. Für die eindeutige Zuordnung und Absicherung der Retentionszeiten der Verbindungen wurden beide Triphosphatderivate nochmals mittels IE-HPLC aufgetrennt. Die beiden Verbindungen mit Retentionszeiten von 9.19 und 17.13 min. (ddTBOCTP) bzw. 9.19 und 12.85 min. (ddCBOCTP) wurden getrennt aufgefangen, lyophilisiert und über Gelfiltration entsalzt. Anschließend wurden alle vier Proben mit Hilfe des PROBE-Assays untersucht. Hierbei zeigte sich, daß keine der beiden Verbindungen mit der Retentionszeit von 9.19 min zur Termination führte. Hier konnte lediglich der biotinylierte Primer oder auch zusätzlich das P-dG-Fragment nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu lieferten die Komponenten, die bei 12.85 bzw. 17.13 min eluierten, terminierte Oligonucleotidfragmente mit den jeweils erwarteten Massenverschiebungen für das ddTBOC- und das ddCBOC-terminierte Produkt.

Auf die gleiche Weise konnte gezeigt werden, daß bei der Triphosphatsynthese der *t*-Butyloxycarbonylderivate die Schutzgruppe zum Teil abgespalten wurde. Bei der Aufreinigung der modifizierten Triphosphate an DEAE-Cellulose wurden Grundliniengetrennte-Signale für Mono-, Di-, Tri- und Polyphosphate erhalten. Die IE-HPLC-Analyse der "Diphosphat-Fraktion" des ddCBOC-Derivates wies jedoch überraschenderweise zwei Signale mit Retentionszeiten von 2.52 bzw. 6.03 min. auf (vgl. Abb. 57). Das Signal bei 6.03 min zeichnet sich durch ein sehr starkes Tailing aus und läßt daher das Diphosphat der *t*-Butyloxycarbonylverbindung vermuten. Das zweite, relativ scharfe Signal hingegen wies reproduzierbar eine um 0.41 min. höhere Retentionszeit auf, als die der ddCNH₂TP-Verbindung (2.12 min.). Um eindeutig festzustellen, ob es sich hier um das ddCNH₂TP-Derivat handelt, wurde diese Verbindung über IE-HPLC aufgetrennt, entsalzt und anschließend für den PROBE-Assay eingesetzt. Das MALDI-TOF-Spektrum dieser Reaktion weist unmißverständlich das Molekülion des ddCNH₂-terminierten Produktes auf. Da die Nucleoside in entsprechend aufgereinigter Form für die Triphosphat-Synthese eingesetzt wurden, muß davon ausgegangen werden, daß die *t*-Butyloxycarbonylschutzgruppe während der Synthese zum Teil abgespalten wird. Bei der Aufreinigung an DEAE-Cellulose wird das entschützte Triphosphat vermutlich aufgrund der freien NH₂-Gruppe zusammen mit dem Diphosphat eluiert.

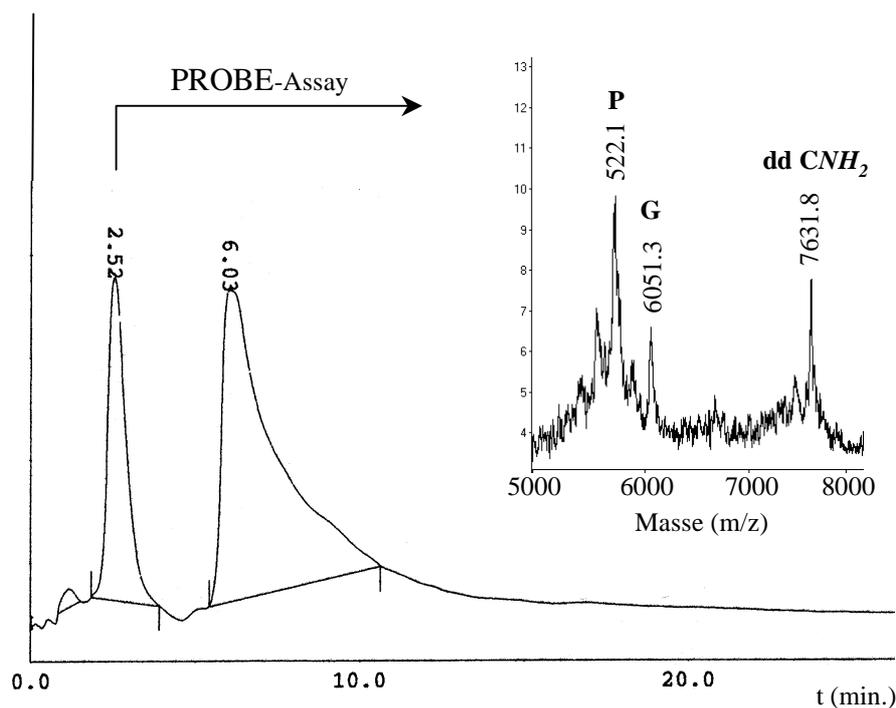


Abb. 57: IE-HPLC-Chromatogramm der "Diphosphat-Fraktion" welche bei der Aufreinigung des Triphosphatansatzes der ddCBOCTP-Verbindung an DEAE-Cellulose gewonnenen wurde (eluierte bei 0.23M TEBK-Puffer). IE-HPLC-Bedingungen sind in Abb. 40, S. 88 aufgeführt. Das MALDI-TOF-Spektrum des PROBE-Assays der Verbindung mit einer Retentionszeit von 2.52 min. demonstriert deutlich, daß hier die entschützte Triphosphat-Verbindung (ddCNH₂TP) vorliegt.

Anhand dieser Untersuchungen werden die schlechteren Ausbeuten der Triphosphatsynthesen der Verbindungen **45** (23%) und **47** (15.3%) verglichen mit dem Acetylderivat **46** (32%) verständlich. Dennoch liegen die hier erzielten Ausbeuten durchaus im Bereich der Literaturwerte für die Darstellung von Triphosphaten ähnlich modifizierter Nucleoside (8-40%)^{168,126}.

VI Diskussion

Aufgrund der ständig wachsenden Anforderungen der diagnostischen DNA-Sequenzierung und des verstärkten Interesses an größeren Sequenzierungsprojekten kommt der Entwicklung neuer und effizienter Sequenzierungsverfahren eine zentrale Bedeutung zu. Äußerst vielversprechend ist hier der Ersatz der zeit- und durchsatzlimitierenden gelelektrophoretischen Auftrennung durch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Die massenspektrometrische Analyse von DNA ist jedoch mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Mangelndes Auflösungsvermögen im höheren Massenbereich (>50 nt) und die niedrige Empfindlichkeit gegenüber den bei Sequenzierungsreaktionen anfallenden geringen Mengen stellen erhebliche Schwierigkeiten für die MALDI-Analyse von Sequenzierungsprodukten dar. Weitere Verbesserungen auf den Gebieten der Geräteentwicklung, der Probenaufreinigung und Präparation, der Einführung von Modifikationen, die einen stabilisierenden Effekt auf die resultierenden Oligonucleotide während des MALDI-Prozesses haben, und auch der Optimierung der Sanger-Sequenzierungsreaktion hinsichtlich der Produktausbeuten sind daher erforderlich, damit die MALDI-TOF-MS-Analyse eine echte Alternative zur Gelelektrophorese darstellt. Zudem ist es denkbar, über die Multiplex-Sequenzierung eine weitere Erhöhung des Probendurchsatzes zu erzielen, so daß der Zeitvorteil der massenspektrometrischen Analyse noch verstärkt wird.

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit der Einsatz massenmarkierter Terminatoren für die Multiplex-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS realisierbar ist. Da der zugängliche Massenbereich und die Wahl der Massenmodifikation entscheidend vom Auflösungsvermögen des Gerätes und der Probenpräparation abhängig ist, die erfolgreiche MALDI-Analyse von Sequenzierungsprodukten hingegen vom jeweiligen Aufreinigungsverfahren und von der Nachweisgrenze des Gerätes bei der Analyse komplexer Gemische, wurden zunächst Meßbedingungen und Probenpräparation für die MALDI-TOF-MS-Analyse von Oligonucleotiden optimiert und anschließend Auflösungsvermögen, Empfindlichkeit und Massengenauigkeit für die Analyse von synthetischen Oligonucleotiden, Oligonucleotidgemischen und PCR-Produkten mit dem hier zur Verfügung stehenden Gerät untersucht.

Dabei konnte der in der Literatur beschriebene Sachverhalt⁸⁴, daß reflektierende Ionengeometrie bei kleineren Oligonucleotiden (bis ~25nt) höhere Auflösung zeigt, während die lineare im höheren Massenbereich (> 25 nt) bezüglich Auflösung und Empfindlichkeit deutlich überlegen ist, hier nicht bestätigt werden. Das hier verwendete Gerät lieferte generell

im Reflektor-Modus für kleinere Oligonucleotide höhere Auflösungen und für Oligonucleotide >30 nt bessere Auflösungen und bessere Empfindlichkeiten.

Wie auch schon in Kapitel III4, S. 48 erläutert, nehmen Auflösungsvermögen, Massengenauigkeit und Empfindlichkeit mit zunehmendem Molekulargewicht ab. Hierfür sind sowohl instrumentelle Faktoren als auch nicht aufgelöste Signale der natürlichen Isotopenverteilung, Heterogenität im Gegenkation und Fragmentierungen verantwortlich.

Dabei wird die Richtigkeit der Massenbestimmung letztendlich durch mehrere Faktoren beeinflusst. Erstens durch die absolute Richtigkeit der Massenskala, was durch eine exakte Kalibrierung mit Standardverbindungen bekannter Masse gewährleistet wird. Zweitens durch die Genauigkeit, mit der die Flächenmitte (Zentroid) des Signals bestimmt werden kann. Und drittens durch Faktoren, die die Flächenmitte des (breiten) Molekülionensignals systematisch zu höheren oder tieferen Werten verschieben und deshalb zu systematischen Fehlern bei der Molekulargewichtsbestimmung führen.

Mit steigendem Molekulargewicht wird es zunehmend schwieriger, für die Kalibrierung einheitliche, reine Standardverbindungen mit genau bekannter Masse zu beziehen. Zudem erschweren breite, unsymmetrische Signale die genaue Bestimmung der Flächenmitte, und zwar sowohl bei den Signalen des Kalibrierungsstandards als auch bei denen des Analyten. Im höheren Massenbereich (~15kDa) treten außerdem Kationenaddukte und Fragmentionen in höheren Intensitäten auf. Erscheinen Molekülion und Adduktionen als einheitliches breites Signal, so repräsentiert die am häufigsten auftretende Masse ein Molekulargewicht, das im Vergleich zur Masse des Molekülions systematisch zu höheren Massen verschoben ist. Können, bei der Analyse von Oligonucleotiden >50 nt, Fragmentionen ebenfalls nicht mehr aufgelöst werden, so ist dementsprechend eine systematische Verschiebung zum niedrigeren Massenbereich die Folge. Die detektierte Masse des Signals ist somit im höheren Massenbereich stark abhängig von der Peakform und dem Ausmaß der Fragmentierungen und Adduktbildung.

Dieser systematische Fehler läßt sich zum Teil kompensieren, indem für die Massenkalisierung Oligonucleotide mit ähnlicher Masse und Zusammensetzung wie die zu analysierende Probe verwendet werden. Auf diese Weise wird die systematische Massenverschiebung in die Kalibrierung mit einbezogen und auf die Massenskala übertragen. Da das Ausmaß von Fragmentierung und Adduktbildung für Oligonucleotide unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung stark variiert (z.B.: d(T_n): weniger Fragmentionen, stärkere Adduktbildung, G-reiche Oligonucleotide: stärkere Fragmentierung), ist die Richtigkeit bei der Massenbestimmung größer, wenn die Kalibrierungsstandards im

Massenbereich des Analytens liegen bzw. diesen Massenbereich eingrenzen und eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen. Da selbst innerhalb der gleichen Probe Ausmaß, Anteil und Auflösung der Fragment- und Adduktionen sowie die Peakform leicht variieren, lassen sich zunehmende Ungenauigkeiten bei der Molekulargewichtsbestimmung im höheren Massenbereich jedoch nicht vermeiden.

Während im unteren Massenbereich standardmäßig Auflösungen von ~3000 und Massengenauigkeiten von 0.1 bis zu 0.01% erzielt werden konnten, ließen sich bei der Analyse des 50-mers (~15kDa) lediglich Genauigkeiten bis zu 0.1% bei Auflösungen um die 200 erreichen. Zwar sind in Einzelmessungen bessere Ergebnisse möglich, stellen aber nicht die Regel dar.

Wie auch in der Literatur beschrieben, lassen sich die beobachteten Fragmentierungen hauptsächlich auf den Verlust einer oder mehrerer Basen zurückführen, wobei die Abspaltungstendenz in der Reihe G>A>C>>T, analog zur Säurestabilität der N-glycosidischen Bindung, abnimmt.

Aufgrund der höheren Säurestabilität von 7-Desaza-Purinen gegenüber Purinen, war anzunehmen, daß 7-Desaza-Purin-modifizierte Oligonucleotide ebenfalls eine erhöhte Ionenstabilität und damit verringerte Fragmentierungen während des MALDI-Prozesses aufweisen. Speziell Verbindungen, die vor der MALDI-Analyse enzymatisch hergestellt werden, wie PCR- oder auch Sequenzierungsprodukte, ermöglichen hierbei die schnelle, einfache und kostengünstige Einführung von 7-Desaza-Purinen durch den Einsatz der entsprechend modifizierten Nucleosidtriphosphate (dNTPs), vorausgesetzt, daß diese von der Polymerase als Substrat akzeptiert werden. Da 7-Desaza-Purin dNTPs bereits bei der Sanger-Sequenzierung eingesetzt werden, um Bandenkompressionen während der Gelelektrophorese zu vermeiden, sind sie kommerziell zu moderaten Preisen erhältlich und ermöglichen eine schnelle und universelle Anwendung. Zudem existieren für Sequenzreaktionen Standardprotokolle¹⁷⁹, die zeigen, daß diese Verbindungen von der jeweiligen Polymerase durchaus akzeptiert und eingebaut werden.

In Zusammenarbeit mit C. Siegert konnte gezeigt werden, daß für die MALDI-Analyse von PCR-Produkten deutlich bessere Ergebnisse bezüglich Massenauflösung, Empfindlichkeit und Massengenauigkeit erzielt werden können, wenn bei der enzymatischen Synthese dATP und dGTP vollständig durch die entsprechenden 7-Desaza-Verbindungen ersetzt werden. Peak-Tailing zu niedrigeren Massen infolge von Fragmentierungen war deutlich reduziert. Geringere Laserenergien waren erforderlich, um die modifizierten Verbindungen zu desorbieren/ionisieren. Infolge der geringeren Fragmentationbildung wird das eigentliche

Molekülen weniger stark aufgespalten, so daß insgesamt eine höhere Empfindlichkeit bei der MALDI-TOF-Analyse resultiert. Aus diesem Grund ist es denkbar, daß durch den Ersatz von A und G durch die entsprechenden C^7 -Verbindungen der für Nucleinsäuren zugängliche Massenbereich erheblich erweitert werden kann. Dabei wurden für alle PCR-Produkte unmodifizierte Primer eingesetzt. Allein durch die enzymatische Reaktion ließen sich bei PCR-Produkten mit einer Länge von 100-200 nt 80-90 % der Purinbasen durch die entsprechenden 7-Desaza-Verbindungen ersetzen. Dies ist durchaus ausreichend, um eine signifikante Verbesserung bei der MALDI-Analyse zu erzielen. Die Kombination von unmodifizierten Primern und den kommerziell erhältlichen 7-Desaza-Purin dNTPs bietet somit eine allgemein anwendbare Methode zur Verbesserung der MALDI-Analyse von PCR-Produkten. Eine weitere Verbesserung läßt sich durch den Einsatz von Primern mit Ribomodifikation am vorletzten Nucleotid erzielen. Wie gezeigt wurde, können diese nach der PCR mittels NaOH abgespalten werden. Das resultierende, hydrolysierte Produkt enthält ausschließlich 7-Desaza-Purinbasen und weist zudem eine geringere Masse auf. Da bei der MALDI-TOF-Analyse von PCR-Produkten hauptsächlich die einzelsträngigen Verbindungen nachgewiesen werden, diese jedoch infolge ihrer geringen Massendifferenz meist nicht mehr aufgetrennt werden können, hängt die Auflösung ($m/\Delta m$) des Signals ebenfalls von der Massendifferenz der beiden Einzelstränge ab. Bei ähnlichen Massendifferenzen der Einzelstränge von PCR- und Hydrolyseprodukt läßt sich allein durch die Verschiebung des Produktes in den kleineren Massenbereich eine Verbesserung der Auflösung erzielen. Weitere Untersuchungen, bei denen die hier erzielten Ergebnisse auf die Sanger-Sequenzierung übertragen werden, stehen noch aus. Zwar wurden aufgrund der nachgewiesenen, höheren Ionenstabilität von 7-Desaza-Purin-modifizierten Oligonucleotiden in unserer Arbeitsgruppe C^7 -dATP und C^7 -dGTP als Substrate für die Sanger-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS eingesetzt, die mögliche, zusätzliche Abspaltung des Primers bietet jedoch weitere Vorteile: Zum einen werden die Sequenzierungsprodukte in den niedrigeren Massenbereich verschoben, zum anderen kann durch die Abspaltung des Primers die für MALDI-Analysen von Sequenzierungsprodukten übliche, geringe Leselänge um die Länge des Primers erweitert werden.

In guter Übereinstimmung mit dem hier demonstrierten Einfluß von C^7 -Purinen auf die Ionenstabilität bei der MALDI-Analyse von PCR-Produkten stehen die parallel zu unseren Untersuchungen veröffentlichten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die für 7-Desaza-Purin-modifizierte Oligonucleotide bis zu einer Länge von 30 nt ebenfalls eine erhöhte Ionenstabilität und damit erhöhte Empfindlichkeit und Auflösung nachweisen konnten^{47, 180}.

Die MALDI-Analyse des nicht modifizierten 200-mers zeigte, daß der Nachweis von DNA-Doppelsträngen mit dem hier verwendeten Gerät ebenfalls möglich ist. Wie auch in der

Literatur beschrieben^{49,50}, wurden bei der Analyse von doppelsträngiger DNA (PCR-Produkten) hauptsächlich die einfach geladenen Molekülonen der Einzelstränge beobachtet. Signale von Dimeren und Trimeren traten ebenfalls auf, allerdings immer in geringerer Intensität. Deshalb wurde allgemein angenommen, daß nicht-kovalente Wechselwirkungen wie die Watson-Crick-Basenpaarung entweder infolge der physikalischen und chemischen Bedingungen während der Probenpräparation oder aber durch überschüssige Laserenergie während des Desorptions/Ionisationsprozesses zerstört werden. Das Auftreten des intensiven Signals in der $[M_2+H]^+$ -Region bei der Analyse des 200-mer PCR-Produktes hingegen ließ sich nur durch die Desorption/Ionisation des DNA-Duplexes erklären und legte die Vermutung nahe, daß mit zunehmender Stabilität des Doppelstranges dieser, in Relation zu den Molekülonensignalen der Einzelstränge, mit zunehmender Intensität nachgewiesen werden kann. Allein Lecchi und Pannel¹⁸¹ lieferten einen deutlichen Beweis für den Nachweis von DNA-Duplexen, basierend auf Watson-Crick-Basenpaarung, unter Verwendung von 6-Aza-2-thiothymin als Matrix. Mit 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon oder 3-HPA als Matrix konnten jedoch auch sie keine intakten Doppelstränge beobachten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit einem komplementären und nicht komplementären, synthetischen Oligonucleotidgemisch (50- und 27-mer) erlaubten die eindeutige Differenzierung zwischen den Signalen von unspezifisch ko-desorbierten Homo- (AA, BB) und Heterodimeren (AB) und intakten DNA-Doppelsträngen (AB_{DS}). Doppelsträngige DNA konnte in Abhängigkeit zur Konzentration der eingesetzten Verbindungen mit dem hier verwendeten Gerät unter Standardbedingungen der Probenpräparation bei nicht optimalen Hybridisierungsbedingungen eindeutig nachgewiesen werden. Da bei Sequenzierungsreaktionen lediglich sehr geringe Substanzmengen anfallen, ist hier unter gleichen Meßbedingungen das Auftreten der (nicht erwünschten) doppelsträngigen Ionen nicht zu erwarten. Durch den Einsatz von Aufreinigungsverfahren, die eine Strangtrennung erlauben, ließe sich das Auftreten von Duplex-Ionen definitiv ausschließen. Für andere Anwendungen, wie sie z.B. Hybridisierungsstudien auf dem Gebiet der Antisense Oligonucleotide darstellen, ist es von großer Wichtigkeit doppelsträngige DNA zu detektieren und zu charakterisieren. Die Verwendung konzentrierterer Lösungen (10-20 pmol/ μ l) oder auch stärkerer Hybridisierungsbedingungen erlaubt mit dem hier eingesetzten Gerät den Nachweis dieser Verbindungen und erweitert somit möglicherweise den Einsatzbereich der MALDI-TOF-MS in der Nucleinsäureanalytik. Parallele Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß tiefe Temperaturen während der Kristallisation ebenfalls den Nachweis des Doppelstranges begünstigen. Die Tatsache, daß andere Arbeitsgruppen lediglich einzelsträngige DNA nachweisen konnten, läßt vermuten, daß Geräteparameter wie z.B. die Beschleunigungsspannung ebenfalls einen Einfluß auf den Nachweis doppelsträngiger DNA

ausüben. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die gezielte Analyse der Einzelstränge oder aber des Doppelstranges zu ermöglichen. Die von uns erzielten Ergebnisse auf diesem Gebiet wurden veröffentlicht¹⁸² und sind dort ausführlicher diskutiert.

Wie schon im Kapitel III4, S. 48 ausgiebig erläutert, ist eine effektive Erhöhung des Probendurchsatzes durch Multiplex-Sequenzierung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von ~50 nt aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens zur Zeit nicht realisierbar. Für Fragmente bis zu einer Länge von 30 nt wäre sie mittels DE-MALDI-TOF-MS denkbar. Das ist durchaus ausreichend für viele Anwendungen im diagnostischen Bereich, die darauf beruhen nur kurze, charakteristische Bereiche eines Gens anzusequenzieren um dieses dann mit Hilfe von existierenden Datenbanken zu identifizieren oder auch als neues Produkt zu klassifizieren.

Eine deutlich flexiblere Massenwahl und damit höheren Probendurchsatz erlaubt der Einsatz markierter Terminatoren für den Multiplex-PROBE-Assay oder ähnlichen Methoden bei denen nur ein terminiertes Produkt entsteht. Die optimale Massendifferenz der Terminatoren richtet sich hier nach dem zu erreichenden Auflösungsvermögen in dem Massenbereich des zu erwartenden, terminierten Produktes und nimmt somit mit steigender Masse des Produktes zu. Im Massenbereich zwischen 6 und 15 kDa erscheinen Mindestmassendifferenzen von 40-150 Da zweckmäßig. Oberhalb von 15 kDa sinkt das Auflösungsvermögen relativ schnell ab. Im Massenbereich von 30 kDa konnten Massendifferenzen von 526 Da lediglich unter Einsatz von 7-Desaza-Purinen aufgetrennt und zugeordnet werden.

Da die optimale Größe der Massendifferenzen der hier darzustellenden Terminatoren entscheidend von der Länge der zu erwartenden terminierten Produkte sowie des Auflösungsvermögens des verwendeten Gerätes abhängig ist, wurde im Hinblick auf eine möglichst hohe Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Problemstellung ein Syntheseverfahren entwickelt, das die Einführung unterschiedlicher Massenmodifikationen direkt vor der Triphosphatsynthese auf schnelle und einfache Art erlaubt. Für die Einführung der Massenmodifikation kam eine Derivatisierung der C-5 oder aber der C-3'-Position in Frage. Da die Akzeptanz der resultierenden Verbindungen durch die Polymerase ein wichtiges Kriterium darstellt, für 3'-O-modifizierte Verbindungen jedoch bekannt war, daß diese bei der enzymatischen Reaktion selbst unter Verwendung unterschiedlicher Polymerasen in einigen Fällen nicht eingebaut werden oder nicht zum Kettenabbruch führen, lag der Schwerpunkt im Rahmen dieser Arbeit auf der Synthese C-5-substituierter 2',3'-Dideoxy-pyrimidinnucleosid-5'-triphosphate.

Das hier entwickelte Syntheseverfahren basiert auf der zuverigen Einführung eines

Alkynylaminolinkers, der die spätere Umsetzung mit einer Vielzahl von weiteren definierten Massenmodifikationen direkt vor der Triphosphatsynthese sowie die denkbare Derivatisierung der modifizierten Triphosphate oder auch der entsprechenden terminierten Sequenzierungsprodukte ermöglicht. Diese Synthesestrategie bietet im Vergleich zu der direkten Einführung einer definierten Massenmodifikation ohne funktionelle Gruppe und anschließender Triphosphatsynthese viele Vorteile. Dazu gehören vor allem die höhere Flexibilität in der späteren Anwendung der Verbindungen durch die Möglichkeit, auch nachträglich noch Derivatisierungen vorzunehmen, und der geringere Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand für die Darstellung unterschiedlich massenmodifizierter Verbindungen durch die vorherige, einheitliche Synthese eines "Stammoleküls".

Die Synthese des 5-(3-*t*-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-DMT-2',3'-didesoxyuridins **23** konnte soweit optimiert werden, daß diese "Schlüsselverbindung" mit wenigen Reaktionsschritten in guten Ausbeuten sowohl in kleinen als auch in größeren Ansätzen gut zugänglich ist. Da 2',3'-Didesoxynucleoside relativ teuer sind, erwies es sich als wesentlich kostengünstiger, von der entsprechenden 2'-Desoxyverbindung auszugehen. Zwar war eine Reduktion mit Tributylzinnhydrid für die Abspaltung der 3'-Hydroxylfunktion nicht erfolgreich, die Eliminierung mittels Kalium-*t*-Butanolat führte jedoch in guten Ausbeuten zu der 2',3'-ungesättigten Verbindung, die dann mittels H₂ unter Verwendung von Pd/C als Katalysator hydriert werden konnte.

Die Einführung des *t*-Butyloxycarbonyl-geschütztem Alkynylaminolinkers ist sowohl unter den Reaktionsbedingungen nach Haralambidis und Mitarbeitern mittels Bis(triphenylphosphin)palladium(II)chlorid in Ethylacetat (**3**) als auch nach Hobbs unter Verwendung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in DMF (**22**) in guten Ausbeuten möglich. Obwohl hier im Ergebnisteil nicht weiter ausgeführt, kann die Kopplung mit dem Alkynylaminolinker sowohl vor als auch nach der Eliminierung der 3'-Hydroxylfunktion mittels Kalium-*t*-Butanolat erfolgen. Die Anwesenheit des Iods oder auch des Linkers in Position 5 führt zu keinerlei Nebenreaktionen bei der Eliminierung. Für die Einführung des Linkers war der Schutz der 3'-Hydroxylfunktion wie erwartet nicht erforderlich. Kopplungen mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in DMF zeichneten sich durch erheblich kürzere Reaktionszeiten aus (0.5-6h gegenüber von 40-90h). Auch das von Robins und Barr beschriebene, zyklische Nebenprodukt, welches die chromatographische Aufreinigung des Produktes bei der Umsetzung mit (Ph₃P)₂PdCl₂ erschwerte, konnte hier nicht beobachtet werden. Dennoch lagen die Ausbeuten mit 75-80% knapp unter denen der Kopplungen mit Bis(triphenylphosphin)palladium(II)chlorid (87%), wobei dieser Katalysator zudem kostengünstiger ist. Für die Kopplung der 2',3'-ungesättigten Verbindung ist aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung in Ethylacetat auf jeden Fall die Umsetzung in DMF mit

(Ph₃P)₄Pd als Katalysator zu bevorzugen.

Einen weiteren Vorteil der hier verfolgten Synthesestrategie stellt die Möglichkeit dar, die modifizierte 2',3'-Didesoxyuridinverbindung direkt über eine Thymidin (bzw. Uridin)-Cytidin-Konversion in das zur Verbindung **23** analoge Cytidinderivat **33** zu überführen. Auf diese Weise läßt sich der synthetische Arbeits- und Zeitaufwand für die parallele Darstellung von 5-(3-*t*-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-DMT-2',3'-didesoxycytidin **33** erheblich reduzieren. Dabei entfällt sowohl die Umsetzung mit einer Schutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion der Base, welche für die Eliminierung der 3'-Hydroxylfunktion durchaus erforderlich wäre, sowie deren spätere Abspaltung als auch die Umsetzung mit der DMT-Schutzgruppe für die 5'-Hydroxylfunktion, die Kopplung mit dem geschütztem Alkynylaminolinker und die Abspaltung der 3'-Hydroxylfunktion mit anschließender Hydrierung (insgesamt 7 Reaktionsschritte). Die Vermutung, daß der sterisch anspruchsvolle *t*-Butyloxycarbonylaminopropyl linker in Position 5 die Umsetzung zum Triazol-Derivat negativ beeinflußt, wurde widerlegt. Ausgehend von den Reaktionsbedingungen nach Kim und Sung war es möglich, die Umsetzung zum Triazol-Derivat soweit zu optimieren, daß hier Ausbeuten von ca. 90 % erzielt werden konnten. Lediglich für die nachfolgende Umsetzung mit Ammoniak zum modifizierten Cytidinderivat war die Ausbeute im Vergleich zur unmodifizierten T-C-Konversion etwas geringer (68% gegenüber 88%). Die chromatographische Aufreinigung des Triazolderivates erwies sich für die weitere Umsetzung mit Ammoniak als nicht unbedingt erforderlich, so daß das modifizierte Cytidinderivat mit wenig synthetischem Aufwand in guten Ausbeuten zugänglich ist.

Wie gezeigt werden konnte, ermöglicht der Einsatz der *t*-BOC-Schutzgruppe die selektive Abspaltung der 5'-O-DMT-Schutzgruppe mittels 80%-iger Essigsäure vor der Triphosphatsynthese. Alternativ dazu können ebenfalls beide Schutzgruppen simultan mit Trifluoressigsäure abgespalten werden. Die schnelle und einfache Einführung von weiteren Massenmodifikationen vor der Triphosphatsynthese wurde anhand der Umsetzung mit Essigsäureanhydrid unter Verwendung der "transient-protection" Methode demonstriert. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Abspaltung der *t*-BOC-Schutzgruppe nach der Triphosphatsynthese mit Trifluoressigsäure ebenfalls problemlos möglich ist.

Die Einführung weiterer Massenmodifikationen über die Aminogruppe des Triphosphates würde eine zusätzliche Verringerung des synthetischen Aufwandes bedeuten und wäre daher ebenfalls von großem Interesse. Auch die Derivatisierung der terminierten Sequenzierungsprodukte über die freie Aminogruppe würde vielfältige Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Werden z.B. Verbindungen mit sehr voluminösen Modifikationen in Position 5 von der Polymerase nicht mehr oder aber nur sehr schlecht

eingebaut, wäre es denkbar, zunächst das Didesoxynucleosidtriphosphat mit dem freien Aminolinker als Masseterminator zu verwenden und anschließend das Sequenzierungsprodukt mit der entsprechenden Markierung umzusetzen. Zur genauen Untersuchung der Einbauraten von modifizierten Verbindungen, die eine freie Aminofunktion tragen, könnten die resultierenden Produkte mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Fluorescein oder Rhodamin umgesetzt werden, der eine Quantifizierung erlaubt. Auch eine Umsetzung des Triphosphates oder des Terminationsproduktes mit Biotin wäre sinnvoll, da hier auf einfache und schnelle Weise Sequenzierungsprodukte zugänglich sind, die eine Biotin-Markierung an der Kettenabbruchstelle tragen. Basierend auf der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung ließe sich somit ein Aufreinigungsverfahren für die MALDI-TOF-Analyse von Sequenzierungsprodukten entwickeln, das es erlaubt, lediglich die terminierten Produkte zu isolieren. Auf diese Weise könnte die MALDI-TOF-Analyse von Sequenzierungsprodukten erheblich verbessert werden. Nicht umgesetzter Primer oder auch Produkte, die durch unspezifische Kettenabbrüche entstehen, ließen sich hier zusätzlich zu anderen Verunreinigungen abtrennen. Auch die Entwicklung alternativer Aufreinigungsverfahren durch die Derivatisierung der freien Aminofunktion wie z.B. die kurzzeitige Anbindung an einer festen Phase oder die Umsetzung mit hydrophoben Resten zur Veränderung der Laufeigenschaften bei chromatographischen Abtrennungsmethoden, wäre denkbar.

Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind daher von großem Interesse. Die selektive Acylierung¹²¹ oder auch Biotinylierung der NH₂-Gruppe¹⁶³ eines modifizierten Triphosphates ist in der Literatur beschrieben worden. Auch über selektive Umsetzungen der freien primären Aminofunktion derivatisierter Oligonucleotide mit Biotin, Digoxigenin, Rhodamin und Fluorescein wurde berichtet, wobei die entsprechenden NHS-Ester^{183,184} oder auch die Isothiocyanate¹²⁸ für die Kopplungen eingesetzt wurden. Die Übertragung dieser Reaktionsbedingungen auf die hier dargestellten modifizierten 2',3'-Didesoxypyrimidinnucleosidtriphosphate ist daher äußerst vielversprechend und stellt eine Weiterentwicklung des hier vorgestellten Syntheseverfahrens dar.

Im Vergleich zur Darstellung C-5-substituierter Verbindungen ist die Einführung der Massenmodifikation in Position 3' durch Derivatisierung der 3'-Hydroxylfunktion mit einem beträchtlich geringeren Arbeits- Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Da die 3'-Hydroxylfunktion derivatisiert wird, kann ohne zusätzliche Reaktionsschritte von der kostengünstigen 2'-Desoxyverbindung ausgegangen werden. Die hier dargestellten Fmoc-Ester wurden in Ausbeuten von 50-60% erhalten, wobei zu bedenken ist, daß es sich im Prinzip um eine 3-Stufen-Eintopfreaktion handelt. Weitere Erhöhung der Produktausbeute ist durch eine Optimierung der Aufarbeitung des detritylierten Produktes denkbar. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Fmoc-Derivaten in den gängigen Lösungsmitteln traten Schwierigkeiten bei

der Wiederaufnahme des in Eiswasser gefällten Produktes auf. Besser geeignet wäre das Abdestillieren der Essigsäure (Koevaporation mit Toluol) mit nachfolgender chromatographischer Aufreinigung. Diese Methode ist auch vom Arbeitsaufwand her vorzuziehen. Selbst bei schlechteren Gesamtausbeuten stellt die Modifizierung der 3'-Hydroxylfunktion aufgrund der kostengünstigen Edukte und des geringen synthetischen Aufwandes die günstigere Variante zur Einführung von Massenmodifikationen dar. Aufgrund der schlechten Löslichkeitseigenschaften der Fmoc-Derivate traten jedoch Schwierigkeiten bei der Triphosphatsynthese auf. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen, z.B. durch den Einsatz von DMF oder auch Anteilen an DMF als Lösungsmittel für die Monophosphorylierung oder auch die Umsetzung nach Eckstein, ist sicherlich möglich, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr verfolgt. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob diese Verbindungen unter MALDI-Bedingungen stabil sind und von der Polymerase als Substrat akzeptiert werden.

Zur Untersuchung der hier dargestellten, modifizierten 2',3'-Didesoxypyrimidinnucleosid-5'-triphosphate hinsichtlich ihrer Eigenschaften als potentielle Kettenabbruchreagenzien und ihrer Stabilität während des MALDI-Prozesses erwies sich ein kurzes Primer-Template-System als geeignet. Die resultierenden Terminationsprodukte lagen hier in einem Massenbereich, in dem Fragmentierungen, die auf die Abspaltung der Massenmodifikation zurückzuführen sind, noch aufgelöst und identifiziert werden konnten. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stellt die Kombination von PROBE-Assay und Sanger-Sequenzierung des kurzen synthetischen Templates ein einfaches und effizientes Verfahren zur Untersuchung neuer, modifizierter Nucleosidtriphosphate dar. Vor allem der PROBE-Assay lieferte eine schnelle Aussage zur Polymerase Akzeptanz und erlaubte die schnelle Identifizierung und Charakterisierung der hier dargestellten Verbindungen. Da hier neben den drei dNTPs lediglich das terminierende, modifizierte Triphosphat vorliegt, konnten auch für Verbindungen, die von der Polymerase weniger gut eingebaut wurden oder aber in geringeren Konzentrationen vorlagen, intensive Signale erhalten werden. Während bei der gelelektrophoretischen Auftrennung kleinere Modifikationen lediglich eine geringe Verschiebung der Laufeigenschaften zur Folge haben, die sich zudem bei längeren Fragmenten im Gel nicht weiter auswirken, können hier über die Masse des terminierten Produktes eindeutige Aussagen zur Derivatisierung von Oligonucleotiden getroffen werden. Aus diesem Grund ist diese Methode auch für die Analyse von Nebenprodukten, wie sie z.B. bei der Synthese derivatisierter Triphosphate auftreten, geeignet. So konnte gezeigt werden, daß bei der Umsetzung der *t*-Butyloxycarbonyl-geschützten Derivate zum 5'-Triphosphat die *t*-BOC-Schutzgruppe zum Teil abgespalten wurde. Das aufgereinigte Nebenprodukt führte zur

Termination, wobei über die Bestimmung der Masse des terminierten Produktes eindeutig nachgewiesen werden konnte, daß hier das Aminopropylderivat als terminierendes Reagenz eingebaut wurde. Bei derartigen Untersuchungen ist allerdings zu berücksichtigen, daß modifizierte Triphosphate, die von der Polymerase nicht akzeptiert werden, nicht zur Termination führen und damit über dieses Verfahren nicht nachweisbar sind. Sind die Modifikationen während des MALDI-Prozesses nicht stabil, kann es ebenfalls zu Fehlinterpretationen kommen. Dennoch liefert dieses Verfahren über die Massenbestimmung des Produktes sehr viel genauere Informationen als die übliche gelelektrophoretische Auftrennung.

Wie sich zeigte, wurden alle hier dargestellten modifizierten 2',3'-Didesoxypyrimidinnucleosidtriphosphate von dem hier verwendeten Enzym (Sequense 2.0) eingebaut und führten zur Termination der enzymatischen Reaktion. Zudem waren alle Verbindungen während des MALDI-Prozesses stabil und erfüllten somit die gestellten Anforderungen. Zwar demonstrierten die MALDI-Spektren der Terminationsprodukte der *t*-Butyloxycarbonylamidopropylverbindungen eine partielle Abspaltung der *t*-BOC-Schutzgruppe, die Signalintensitäten der resultierenden Fragmentionen waren jedoch sehr gering. Im Massenbereich von ~6 kDa waren sie vergleichbar mit den Fragmentierungen, die auf dem Verlust einer Base basieren. Im höheren Massenbereich hingegen überwiegen eindeutig Fragmentierungen infolge von Basenverlust. Die Tatsache, daß bei der MALDI-Analyse der entsprechenden Triphosphatverbindungen unter Einsatz von DHB als Matrix, die *t*-BOC-Schutzgruppe vollständig abgespalten wurde, zeigt deutlich, daß die Analyse der Triphosphate, zudem mit anderen Matrices, keine definitiven Aussagen über die Stabilität der terminierten Produkte erlaubt. Für die terminierten Produkte des freien und auch des acetylierten Aminopropylderivates konnten keine Fragmentierungen beobachtet werden.

Um Aussagen über die Einbauraten der Verbindungen treffen zu können, wurde die Sanger-Sequenzierung soweit optimiert, daß Primer, Terminationsprodukte und nicht-terminierte, vollständig verlängerte Produkte für die Standard-T-Reaktion in vergleichbaren Signalintensitäten auftraten. Dabei zeigte sich, daß der Optimierung der enzymatischen Reaktion speziell für kleine Templates eine wichtige Rolle zukommt. Reaktionsdauer, Enzymmenge, und Edukt-Konzentrationen haben entscheidenden Einfluß auf den Ablauf der enzymatischen Reaktion und sollten optimal aufeinander abgestimmt werden. Vermutlich spielen Templatelänge und natürlich die Enzymaktivität ebenfalls eine wichtige Rolle. Sowohl durch Verlängerung der Reaktionszeit als auch durch Erhöhung der Enzymmenge konnte eine Erhöhung der Ausbeute an Sequenzierungsprodukten und damit eine bessere Qualität der MALDI-Spektren erzielt werden. Durch den Einsatz von $MnCl_2$ und Erhöhung der ddNTP-Konzentration gegenüber den dNTP-Konzentrationen konnte die Ausbeute zu kleineren

Fragmenten verschoben werden. Wie die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, ist es durchaus möglich, durch geeignete Bedingungen eine nahezu vollständige Umsetzung des Primers zu erzielen (PROBE-Assay). Vermutlich lassen sich auch unspezifisch-terminierte Produkte durch eine geeignete Reaktionsführung reduzieren.

Im Vergleich zu den hier verwendeten optimierten Reaktionsbedingungen lassen sich für normale Sequenzierungen deutlich geringere Primer-Template-Konzentrationen und Reaktionszeiten verwenden. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt jedoch auf der Untersuchung neuer Verbindungen. Hohe Reaktionsausbeuten ermöglichen Parallelbestimmungen und gewährleisten eine schnelle, reproduzierbare, zuverlässige MALDI-TOF-Analyse, selbst wenn die Verbindungen möglicherweise eine erhöhte Fragmentierung oder schlechte Einbaurate aufweisen. Dennoch wäre auch hier, vor allem für den PROBE-Assay, eine deutliche Verringerung der Primer/Template Konzentration möglich, was vermutlich mit einer Verringerung der Reaktionszeit/Enzymmenge einhergeht. Weitere Untersuchungen sind ebenfalls erforderlich, um eindeutig festzustellen, inwieweit das Auftreten von nicht spezifisch terminierten Produkten durch Optimieren der Reaktionsbedingungen vermieden werden kann.

Untersuchungen zur Polymerase-Akzeptanz am Beispiel der modifizierten 2',3'-Dideoxyuridinderivate zeigten, daß gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsprodukte von M13mp18 und MALDI-TOF-Analyse der Sequenzierungsprodukte des synthetischen Templates zu vergleichbaren Aussagen über die Einbaurate der modifizierten Verbindungen führten. Beide Verfahren demonstrierten deutlich zunehmende Diskriminierung durch die Polymerase in der Reihe ddTTP < ddAcTP << ddTBOCTP. Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit der in dieser Reihe auftretenden, abnehmenden Struktur-Komplementarität der Verbindungen.

Dennoch ist hier zu bedenken, daß beide Verfahren keine Quantifizierung der Sequenzierungsprodukte erlauben und daher nur eine Abschätzung möglich ist. Wesentliche Voraussetzung für eine solche Abschätzung bei der MALDI-Analyse ist eine reproduzierbar gute Probenkristallisation und die Aufnahme von Einzelmessungen über die gesamte Probenoberfläche, um auszuschließen, daß an unterschiedlichen Stellen des Proben-Matrix-Gemisches unterschiedliche Signal-Intensitäten auftreten. Außerdem wies das IE-HPLC-Chromatogramm der acetylierten Verbindung ein scharfes Signal mit einer Peakfläche von 100 % auf, während bei der ddTBOCTP-Verbindung stets ein zusätzliches Signal bei 9.19 min auftrat, dessen Peakfläche ca. 3-4% betrug. Obwohl sicher gestellt wurde, daß es sich bei der Verbindung mit der Retentionszeit von 9.19 min um kein Triphosphat handelte, war es nicht möglich, diese Verbindung genau zu identifizieren oder auch eindeutig zu klären, ob es sich

hierbei um ein Zersetzungsprodukt handelt, das lediglich bei der IE-HPLC gebildet wird. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Fragestellungen zu klären.

Der Einfluß von MnCl_2 auf die Produktausbeute konnte auch für die modifizierten Verbindungen nachgewiesen werden, überlagert sich jedoch hier mit der Verschiebung zu höheren Fragmentlängen aufgrund der schlechteren Einbauraten. Wie gezeigt werden konnte, läßt sich daher für modifizierte Verbindungen, die von der Polymerase schlecht eingebaut werden, durch den Einsatz von Mn^{2+} die Endkonzentration an ddNTPs reduzieren. Da modifizierte Verbindungen in der Regel recht kostenintensiv sind und normalerweise schlechte Einbauraten durch niedrige dNTP/ddNTP-Verhältnisse kompensiert werden, ist durch den Einsatz von MnCl_2 eine Reduzierung der Kosten möglich (vermutlich auch für fluoreszenzmarkierte Terminatoren anwendbar).

Der erfolgreiche Einsatz der hier dargestellten massenmarkierten Terminatoren für die Multiplex-PROBE-Sequenzierung bestätigte die Vermutung, daß mit dem hier verwendeten Gerät im Massenbereich zwischen 6 und 15 kDa Mindestmassendifferenzen von 40-150 Da zweckmäßig sind. Im Massenbereich von ~6 kDa konnten die vier T-Terminationsprodukte mit Massendifferenzen von 42-58 Da gerade eben noch aufgelöst und eindeutig identifiziert werden.

Ein Gerätevergleich zeigte, daß mit dem Folgemodell oder auch dem nachgerüsteten Modell des hier verwendeten Gerätes im Reflektor-Modus ähnliche bzw. etwas schlechtere Ergebnisse, im DE-Linear-Modus hingegen geringfügig bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Die besten Resultate hinsichtlich des instrumentellen Auflösungsvermögens lieferte das DE-Voyager der Fa. Perseptive. Hier konnten alle vier Verbindungen Grundliniengetrennt werden. Die Auflösung von Natrium und Kalium-Ionen ist in diesem Massenbereich ebenfalls möglich, so daß hier vermutlich auch kleinere Massendifferenzen der terminierten Produkte von 25-30 Da noch eindeutig zugewiesen werden könnten. Obwohl der Einsatz der verzögerten Ionenextraktion im unteren Massenbereich zu deutlich höherem Auflösungsvermögen führt, nimmt auch hier für Oligonucleotide > 50 nt das Auflösungsvermögen drastisch ab, so daß selbst mit DE-MALDI-TOF-MS der für die Sanger-Sequenzierung zugängliche Massenbereich nicht erheblich erweitert werden konnte.

Nach dem jetzigen Stand der Forschung wären für die hier dargestellten massenmarkierten Terminatoren folgende Einsatzgebiete zur Verbesserung der DNA-Analyse im diagnostischen Bereich mittels MALDI-TOF-MS denkbar:

- *"Multiplex-Sequenzierung" für diagnostische Assays (PinPoint, PROBE und COSBE) sowie für die Sanger-Sequenzierung kleiner, bekannter Sequenzen im diagnostischen*

Bereich. Speziell für die Sanger-Sequenzierung läßt sich die Anwendbarkeit erhöhen, wenn C^7 -dATP und C^7 -dGTP eingesetzt werden und nach Möglichkeit eine Abspaltung des Primers erfolgt.

- *Optimierung der Massendifferenzen zwischen den einzelnen terminierenden Basen bzw. den einzelnen Terminationsprodukten:* Die MALDI-MS-Analyse von Sequenzierungsprodukten ist in einigen besonderen Fällen durch die Notwendigkeit, kleine Massendifferenzen zu bestimmen, auf den unteren Massenbereich limitiert (Δm : ddATP/ddTTP: 9 Da; Δm : ddCTP/ddGTP: 40 Da). Der Nachweis von A/T-Polymorphismen mit Hilfe des PinPoint Assays oder aber die Durchführung der vier basenspezifischen Sanger-Sequenzierungsreaktionen in einem Ansatz stellen hierfür Beispiele dar. Durch den gezielten Einsatz unterschiedlicher Massenmodifikationen für die vier basenspezifischen ddNTP's (beim PinPoint Assay z.B. ddATP und modifiziertes ddTTP) lassen sich die Massendifferenzen der terminierten Produkte so gestalten, daß sie auch im höheren Massenbereich bzw. mit niedrig auflösenden MALDI-MS-Geräten aufgetrennt und eindeutig identifiziert werden können. (Durch die Wahl der Modifikation für ddTTP läßt sich die Massendifferenz zu ddATP beliebig vergrößern.) Für den PinPoint-Assay wurde die Multiplex-Genotypisierung von PCR-Produkten unter Einsatz von 5'-oligo(dT)Sequenzen als Primer-Massenmarkierung beschrieben¹⁸⁵. Da hier generell Massendifferenzen zwischen 9 und 40 Da bestimmt werden müssen, kann eine Kombination mit markierten Terminatoren den für diese Anwendung zugänglichen Massenbereich erweitern.
- *Verschieben des Massenfensters terminierter Produkte gegenüber unspezifisch verlängerter/terminierter Produkte:* Wie in dieser Arbeit gezeigt und auch in der Literatur beschrieben, können bei Sequenzierungsreaktionen auch nicht-spezifisch terminierte Produkte auftreten. Obwohl es im Gegensatz zur Gelelektrophorese mittels MALDI-MS-Analyse durchaus *möglich* ist, im unteren Massenbereich zwischen dem Einbau eines dNTP's und eines ddNTP's zu unterscheiden (Δm : 16 Da), ist eine solche Differenzierung im "höheren" Massenbereich infolge der mangelnden Auflösung nicht mehr möglich. Die Unterscheidung zwischen ddTTP (288.2 Da) und dCTP (289.2 Da) ist ebenfalls nicht möglich, so daß bei unbekanntem Sequenzen "Full stops" der Primer Extension, die mit dem Einbau eines dCTP enden, nicht eindeutig identifiziert werden können. Der Einsatz eines modifizierten ddNTP's führt zu einer Massenverschiebung des "richtig" terminierten Produktes und damit zu separaten, eindeutig zuzuordnenden Signalen.

- *Entwicklung neuer Aufreinigungsverfahren für Sequenzierungsprodukte z.B. an festen Phasen:* Wird die *Massenmodifikation* des ddNTP derart gewählt, daß sie eine freie funktionelle Gruppe enthält, so lassen sich die terminierten Fragmente über Anbindung an eine feste Phase isolieren und nach anschließender Abspaltung einer MALDI-MS-Analyse unterziehen. Kombination mit der Multiplex-Sequenzierung durch Einsatz unterschiedlich massenmodifizierter ddNTP's mit gleicher funktioneller Gruppe oder auch durch Einsatz massenmarkierter Primer, die bei diesem Aufreinigungsverfahren abgetrennt werden und daher nicht zu separaten Signalen bei der MALDI-MS-Analyse führen würden, wäre ebenfalls denkbar.

Theoretisch wäre jede Kombination dieser Einsatzmöglichkeiten sowie die zusätzliche Verwendung massenmarkierter Primer vorstellbar. Speziell für diagnostische Assays, wie PinPoint, PROBE oder COSBE, ergibt sich daraus hoher Probendurchsatz und Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Problemstellung bzw. zu analysierende Sequenz. Aber auch für die Sanger-Sequenzierung im diagnostischen Bereich lassen sich z.B. durch effizientere Aufreinigungsverfahren oder multiplexen beim vergleichenden Sequenzieren kleiner Verbindungen Verbesserungen erzielen.

VII Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit massenmodifizierte Terminatoren für die DNA-Analyse mittels MALDI-TOF-MS eingesetzt werden können. Zu diesem Zweck wurden Untersuchungen hinsichtlich Auflösungsvermögen, Empfindlichkeit und Massengenauigkeit für die Analyse von Oligonucleotiden, Oligonucleotidgemischen und PCR-Produkten durchgeführt. In Zusammenarbeit mit C. Siegert wurde der Einfluß von 7-Desazapurinbasen auf die Ionenstabilität von Nucleinsäuren während des MALDI-Prozesses untersucht. Deutlich verminderte Fragmentierung und damit höhere Massenauflösung und Empfindlichkeit konnte für 7-Desaza-Purin-modifizierte PCR-Produkte nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit erstmals demonstriert, daß auch doppelsträngige DNA mittels MALDI-TOF-MS unter Verwendung von 3-HPA als Matrix nachgewiesen werden kann. Die hier durchgeführten Untersuchungen zum Auflösungsvermögen zeigten, daß für den Einsatz markierter Terminatoren für Multiplex-Assays mit dem hier zur Verfügung stehenden Gerät (Vision 2000, Fa Finnigan) im Massenbereich von 6-15 kDa Mindestmassendifferenzen zwischen den Terminatoren von 40-150 Da erforderlich sind (steigend mit zunehmendem Molekulargewicht der Terminationsprodukte). Oberhalb von 15 kDa nimmt das Auflösungsvermögen stark ab, so daß der Einsatz markierter Terminatoren für die Multiplex-Sequenzierung zur Zeit auf kleine Verbindungen bis zu ~30 nt beschränkt ist (ausreichend für das vergleichende Sequenzieren kleiner Sequenzen im diagnostischen Bereich).

Parallel zu diesen Untersuchungen wurde ein schnelles und kostengünstiges Syntheseverfahren zur Darstellung von C-5-substituierten 2',3'-Didesoxypyrimidinnucleosid-5'-triphosphaten entwickelt. Ausgehend von 5-Iod-2'-Desoxyuridin wurde zunächst über eine Palladium-katalysierte Umsetzung ein t-Butyloxycarbonyl-geschützter Alkynylaminolinker in Position 5 eingeführt. Die Abspaltung der 3'-Hydroxylfunktion war über eine Eliminierung mittels Kalium-t-Butanolat möglich. Die resultierende 2',3'-Doppelbindung konnte in einer anschließenden Hydrierung zusammen mit der Alkinbindung des Linkers vollständig hydriert werden. Das so erhaltene 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxyuridin **23** stellt eine "Schlüsselverbindung" dar. Über eine Thymidin-Cytidin-Konversion konnte diese Verbindung in guten Ausbeuten und geringen Reaktionszeiten in das entsprechende Cytidinderivat **33** überführt werden, was eine erhebliche Reduzierung des synthetischen Aufwandes für die Darstellung C-5 substituerter 2',3'-Didesoxycytidinderivate bedeutet. Beide Verbindungen **23** und **33** wurden mittels 80%-iger Essigsäure selektiv entschützt und zum Triphosphat umgesetzt. Die Einführung weiterer Massenmodifikationen direkt vor der Triphosphatsynthese ließ sich durch die vollständige Entschützung mit Trifluoressigsäure und nachfolgender Derivatisierung erzielen. Die Abspaltung der t-BOC-Schutzgruppe der Triphosphatverbindungen konnte ebenfalls

demonstriert werden. Daher bietet diese Synthesestrategie auch die Möglichkeit, nachträglich über die freie Aminofunktion des Triphosphates oder auch des terminierten Produktes weitere Massenmodifikationen einzuführen bzw. Derivatisierungen vorzunehmen.

Als Alternative zu den C-5-substituierten Verbindungen wurden 3'-O-modifizierte Thymidinderivate dargestellt. 3'-O-(N-Fmoc-glycyl bzw. alanyl)-2'-desoxythymidin **41** bzw. **42** konnten in einer 3-Stufen-Eintopfreaktion in Ausbeuten von 50-60% erhalten werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeitseigenschaften der Fmoc-Derivate traten jedoch erhebliche Schwierigkeiten bei der Triphosphatsynthese auf.

Die dargestellten C-5-substituierten 2',3'-Didesoxypyrimidinnucleosidtriphosphate wurden hinsichtlich ihrer Eignung als potentielle Terminatoren für Multiplex-Assays im diagnostischen Bereich untersucht. Zu diesem Zweck wurden der PROBE (Primer-Oligo-Base-Extension)-Assay und die Sanger-Sequenzierung via MALDI-TOF-MS unter Verwendung eines kurzen synthetischen Templates (50-mer) bezüglich der Produktausbeuten optimiert. Wie der Einsatz der modifizierten Triphosphate beim PROBE-Assay zeigte, wurden alle Verbindungen von der Polymerase (Sequenase 2.0) als Substrat akzeptiert und führten zum Kettenabbruch. Zudem waren die Massenmodifikationen während des MALDI-Prozesses stabil, so daß alle Verbindungen den gestellten Anforderungen genügten. Die modifizierten Thymidintriphosphate wurden mit variierenden dNTP/ddNTP-Verhältnissen sowohl für die Sanger-Sequenzierung des kurzen Templates mittels MALDI-TOF-MS als auch für die Sequenzierung von M13mp18 (radioaktive Markierung, gelelektrophoretische Auftrennung) eingesetzt. Beide Verfahren demonstrierten, daß die Verbindungen mit zunehmender Größe des Restes in Position 5 von der Sequenase 2.0 mit abnehmender Effizienz eingebaut werden.

Weiterhin wurden die massenmarkierten Terminatoren für den Multiplex-PROBE-Assay eingesetzt. Mit dem hier zur Verfügung stehenden Gerät konnten die vier Terminationsprodukte der T-Reaktionen mit Massendifferenzen von ~42 Da im Massenbereich von 6.4 kDa aufgelöst und zugeordnet werden. Vergleichende Messungen mit unterschiedlichen Geräten wurden durchgeführt.

Die hier dargestellten Verbindungen bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten (vgl. S. 144) für die DNA-Analyse mittels MALDI-TOF-MS im diagnostischen Bereich (Mutations-Screening, Nucleotid-Repeatlängenbestimmung etc.). Mit steigender Massenauflösung und Sensitivität, wie sie Entwicklungen im Bereich von Chip-Systemen und Nanoliter-Präparationen sowie der Gerätetechnik (verzögerte Ionenextraktion, FT-MS etc.) erwarten lassen, wird der hier erstmals erfolgreich demonstrierte Einsatz massenmarkierter Terminatoren für Multiplex-Assays bei der DNA-Analyse mittels moderner massenspektrometrischer Methoden zunehmend an Bedeutung gewinnen.

VIII Summary

MALDI-TOF MS has been proposed as substitute for the gel electrophoretic separation and detection for sanger sequencing products. Due to the high accuracy for the analysis of smaller fragments and the speed of the method there is a high potential for diagnostic applications, e.g. analysis of gene products, genetic mapping and genetic defects. Further improvements in this field could be expected of the use of mass tagged terminators, which may allow multiplex-sequencing via MALDI-TOF-MS. Therefore the main object of this study was to investigate to which extent mass tagged terminators can be employed for the DNA-analysis via MALDI-TOF-MS. For this purpose mass resolution and sensitivity of MALDI-TOF-MS analysis of synthetic oligonucleotides, complex mixtures of oligonucleotides and PCR products were examined. In cooperation with C. Siegert the influence of 7-deazapurine moieties on ion stability of nucleic acids during the MALDI process was studied. Clearly increased sensitivity and higher mass resolution for 7-deazapurine-modified PCR products could be demonstrated. Additionally, the formation of homo/heterodimeric and double stranded ions was examined and it could be shown for the first time that the detection of intact double stranded DNA with MALDI-TOF-MS is also possible (matrix: 3-hydroxy picolinic acid). Analysis of complex mixtures of oligonucleotides indicated that for multiplex assays with the given instrument (Vision 2000, Finnigan) mass differences between the terminators of 40 – 150 Da in the mass region from 6-15 kDa should be useful (increasing with increasing mass). Above 15 kDa mass resolution decreases dramatically. Therefore the use of mass tagged terminators for multiplex sequencing is at present limited to small fragments up to ~30 nt, which is absolutely sufficient for diagnostic applications.

Furthermore, a fast and cost-effective concept for the synthesis of C-5-substituted 2',3'-dideoxypyrimidinenucleoside 5'-triphosphates was developed. A *t*-butyloxycarbonyl-protected alkynylaminolinker was introduced via a palladium catalysed reaction in the 5 position of 5-iodo-2'-deoxyuridine. Elimination of the 3'-hydroxy group was possible by treatment of the 3'-O-mesylderivative with potassium *t*-butoxide. Hydrogenation of both the resulting 2',3'-double-bond and the alkynyl bond led to the "key compound" 5-(3-*tert*-butyloxy-carbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridine **23**. This compound could directly be converted into the corresponding cytidinederivative. 5-(3-*tert*-butyloxy-carbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxycytidine **33** was obtained in good yields and with minimal synthetic expenditure (two step synthesis). After treatment with acetic acid, which allowed selectiv deprotection of the 5'-hydroxy group, both compounds **23** and **33** were transferred into the 5'-triphosphates. Deprotection of the aminofunction of the triphosphates was possible, too. Therefore this strategy also gives a chance to modify the

masses of the triphosphates or the resulting terminated products via the free aminofunction of the linker. Introduction of additional mass modifications right before triphosphate synthesis was demonstrated by complete deprotection of compound **23** with trifluoroacetic acid and following reaction of the free amino group with acetic acid anhydride.

In addition to the C-5-substituted 2',3'-dideoxypyrimidinenucleosides, 3'-O-modified thymidinederivatives were synthesized. 3'-O-(N-Fmoc-glycyl/alanyl)-2'-deoxythymidine **41/42** were obtained in a three step synthesis in yields of 50-60%. However, because of the small solubility of the Fmoc-esters in common solvents, triphosphate synthesis of these compounds was not successful.

The synthesized C-5-substituted 2',3'-dideoxypyrimidinenucleosidetriphosphates were investigated as to their qualification as potential chain terminating reagents for multiplex-assays via MALDI-TOF-MS. Therefore PROBE (primer-oligo-base-extension) assay and sanger sequencing reaction were optimized with regard to high yields of termination products with a short synthetic 50-mer template being used. PROBE assays with mass tagged compounds showed that all triphosphates were accepted by the polymerase (sequenase 2.0) and resulted in chain termination. Furthermore, the introduced mass modifications proved to be stable during the MALDI process. Hence the synthesized compounds meet all requirements for mass tagged terminators.

Mass modified thymidinetriphosphates were employed in sanger sequencing reactions with varying dNTP/ddNTP relations. Sequencing reactions of both the short synthetic template (MALDI-TOF-MS) and single stranded M13mp18 DNA (gelelectrophoretic separation) demonstrated decreasing efficiency of insertion by sequenase 2.0 with increasing size of the residue in position 5 of the modified triphosphates.

The mass tagged terminators were also used for multiplex PROBE assays. In the mass region of 6.4 kDa termination products with mass differences of ~42 Da could be resolved and assigned. Comparative measurements with different instruments were carried out.

The compounds synthesized here offer varied possibilities for the DNA analysis via MALDI-TOF-MS in the field of diagnostic applications (s. S. 144). They have proved to be successful for multiplex assays - as demonstrated here for the first time. However, mass tagged terminators will gain even further significance with increasing mass resolution and sensitivity, which can be expected by the rapid developments in the fields of nanoliter sample preparation and chip-systems as well as MS-technology (DE-MALDI, FT-MS).

IX Experimenteller Teil

1 Allgemeine Hinweise

Chemische Umsetzungen wurden unter Feuchtigkeitsausschluß und gegebenenfalls in geschlossenen Apparaturen mit Hg-Überdruckventilen unter Argon durchgeführt.

Grundsätzlich wurden alle Reaktionen dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Das Einengen von Desoxynucleosid- bzw. Desoxynucleotidlösungen erfolgte bei Temperaturen $\leq 40^\circ\text{C}$. Die Trocknung der Substanzen erfolgte im Ölpumpenvakuum bei Temperaturen bis zu 40°C .

1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den folgenden Firmen bezogen:

Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Aldrich (Steinheim), Fluka (Deisenhofen), Lancaster (Mühlheim am Main)

Für Triphosphatsynthesen eingesetzte Reagenzien (Pyridiniumhydrochlorid, pulverisiertes Molekularsieb und das umzusetzende modifizierte Nucleosid) wurden vor der Umsetzung mindestens 12 Stunden im Exsikkator über Phosphorpentoxid unter Ölpumpenvakuum getrocknet. Diethylether (Trocknung siehe S. 152) und Tri-n-butylamin (abs., Fa. Merck) wurden unmittelbar vor Gebrauch über eine kurze Säule von Aluminiumoxid "Wölm", stark basisch, gegeben.

0.5 M Lösung von Tetrakis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat in N,N-Dimethylformamid (DMF) wurde wie folgt hergestellt:

Eine Lösung von 445 mg (2.5 mmol) Pyrophosphorsäure in 35 ml Diethylether (abs.) wurde unter Argon mit 2.37 ml (10 mmol) Tri-n-butylamin (abs.) versetzt, 5 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel abdestilliert. Nicht umgesetztes Tri-n-butylamin wurde im Argongegenstrom abpipettiert, der Rückstand in DMF (abs.) gelöst und auf ein Volumen von 5 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei 4°C unter Argon gelagert (nicht länger als 4 Wochen).

Folgende Verbindungen wurden nach Literaturvorschriften synthetisiert und anschließend weiter umgesetzt:

- 3-Aminopicolinsäure¹⁸⁶
- 3',5'-Di-O-p-toluoyl-5-iod-2'-desoxyuridin¹²⁰
- 5-(3-*t*-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-3',5'-Di-O-p-toluoyl-2'-desoxyuridin¹²⁰
- 4,4'-Dimethoxytritylthymidin¹²⁷ (**28**)

Lösungsmittel

Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders erwähnt, grundsätzlich in absolutierter Form verwendet und über Molekularsieb (0.3 bzw. 0.4 nm) gelagert. Die Trocknung der Lösungsmittel wurde wie folgt durchgeführt:

Acetonitril:	Erst über Phosphor(V)oxid, dann über Calciumhydrid unter Rückfluß zum Sieden erhitzen und anschließend destillieren
Dichlormethan:	2 h über Phosphor(V)oxid unter Rückfluß erhitzen und destillieren
Diethylether, THF, Dioxan:	mit Natrium versetzen und solange unter Rückfluß erhitzen, bis die charakteristische blaue Farbe bei der Zugabe von Benzophenon auftritt. Anschließend unter Argon destillieren
Ethylacetat	portionsweise mit Phosphor(V)oxid versetzen, filtrieren und anschließend über eine 40 cm Vigreux-Kolonnen destillieren
Pyridin	2 h unter Rückfluß über Tosylchlorid (15 g/l) erhitzen und destillieren, dieser Vorgang wird mit Kaliumhydroxid (20 g/l) wiederholt und anschließend 6 h über Calciumhydrid (15 g/l) zum Sieden erhitzt und über eine 40 cm Vigreux-Kolonnen destilliert
Toluol	über Calciumhydrid destillieren
Triethylamin	zunächst über Tosylchlorid (20g/l) und anschließend über Kaliumhydroxid (20 g/l) erhitzen und über eine 40 cm Vigreux-Kolonnen destillieren

Bei längeren Lagerzeiten wurde das absolute Triethylamin unmittelbar vor Gebrauch über eine kurze Säule von Aluminiumoxid "Wölm", stark basisch, gegeben.

DMF und DMSO wurden in absolutierter Form von der Firma Fluka bezogen.

Für die Säulenchromatographie verwendete Lösungsmittel wurden vorher am Rotationsverdampfer destilliert. Tetrahydrofuran und Methanol (beides HPLC-Grade) für die Gelpermeationschromatographie sowie Acetonitril (DNA Grade) für den DNS-Synthesizer wurden von der Firma Labscan bezogen.

Lösungsmittel, die für die Proben- und Matrixpräparation bei MALDI-TOF-MS-Messungen zum Einsatz kamen, wurden von der Firma Merck in "Uvasol-Qualität" bezogen.

Die Aufreinigung von Wasser für Chromatographie, Sequenzierungen und MALDI-MS-Präparationen erfolgte mit Hilfe der Reinstwasseranlage Milli-Q UF Plus (Fa. Millipore, Eschborn).

Puffer

Für die Herstellung von Puffern diente, wenn nicht anders erwähnt, Reinstwasser als Lösungsmittel. Puffer für die Ionenaustauschchromatographie wurden frisch hergestellt und vor Gebrauch über Nitrocellulose-Membranen (Porengröße: 0.45µm, Durchmesser: 50 mm) der Firma Schleicher und Schuell filtriert. Das Entgasen erfolgte mittels Helium oder aber durch Wasserstrahlpumpenvakuum. Speziell bei dem 1M TEBK-Puffer für die IEC wurde der pH-Wert und die UV-Absorption vor jeder Chromatographie überprüft.

1M Triethylammoniumhydrogencarbonat Puffer für die präparative IEC: 138 ml (1 mol) Triethylamin (p.a., Fa. Fluka) wurden mit 800 ml reinst Wasser versetzt. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von CO₂ in Form von Trockeneis, bis die Lösung einen pH-Wert von 8.4 erreicht hatte. Anschließend wurde das Volumen der Lösung durch Zugabe von reinst Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Die Zusammensetzung aller anderen hier verwendeten Puffer wird an gegebener Stelle direkt angegeben. Die Herstellung erfolgte standardmäßig.

Oligodesoxynucleotide

Oligodesoxynucleotide wurden entweder in aufgereinigter Form von den Firmen Pharmacia (Freiburg, Deutschland), Biometra (Göttingen, Deutschland), MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) und Eurogentec bezogen oder am DNA-Synthesizer Typ 7500 der Firma Millipore (Bedford, MA) dargestellt. Die anschließende Aufreinigung über RP-HPLC (Delta Prep 4000 der Firma Waters, Trennsäule RP18 Partisil ODS2 der Firma Whatman) und Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte nach Standardprotokollen. Die Oligodesoxynucleotide

wurden dann in Reinstwasser aufgenommen und 100 oder 200 μM Stammlösungen hergestellt. Konzentrationsbestimmungen erfolgten über UV-Absorption bei 260 nm. Die Lösungen wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Bei Gebrauch wurde darauf geachtet, daß die Verbindungen vollständig in Lösung gehen (gute Durchmischung, falls nötig: 5 min im Ultraschallbad). Alle Verbindungen wurden (in verdünnter Lösung: $\sim 10\text{pmol}/\mu\text{l}$) zusätzlich mittels MALDI-MS-Analyse auf ihre Reinheit überprüft.

1.2 Meßgeräte und Methoden

pH-Messungen, Schmelzpunktbestimmung und Lyophilisation

Die Messung der pH-Werte erfolgte mit dem pH-Meter: pH537 von WTW GmbH, Weinheim, mit der pH-Elektrode InLab 410 von Mettler-Toledo.

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden mit einem Reichert Heitztischmikroskop ermittelt.

Die Lyophilisation der Proben erfolgte mit einem "Speed Vac Concentrator" der Firma Savant wahlweise unter Wasserstrahl- oder Ölpumpenvakuum.

UV/VIS-Spektrometrie

UV/VIS-Spektren wurden an einem Biochrom LKB 4060 Photometer der Firma Pharmacia aufgenommen. Bestimmung der UV-Absorption bei 260 nm zur Erstellung der Elutionsdiagramme bei der GPC oder IEC erfolgte an einem GeneQuant-Photometer der Firma Pharmacia.

IR-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte an einem Gerät der Firma Perkin-Elmer, Typ 399

NMR-Spektroskopie

Die Messungen der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erfolgten an den Geräten WM 250 (^1H : 250 MHz, ^{13}C : 62.89 MHz) und WM 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100.62 MHz) der Firma Bruker. Deuterierte Lösungsmittel und Tetramethylsilan, welches als interner Standard diente, wurden von der Firma Merck bezogen. Zur eindeutigen Zuordnung der Signale wurden neben dem ^1H -

und ^{13}C -NMR-Spektrum für fast alle Verbindungen ein ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum aufgenommen und ein ^1H - ^1H - und ein ^1H - ^{13}C - COSY-Experiment durchgeführt.

^{31}P -NMR-Spektren wurden mit dem Gerät Varian Gemini 200BB aufgenommen. Deuteriertes Wasser der Firma Merck diente als Lösungsmittel und eine Lösung von 85%iger H_3PO_4 in D_2O als externer Standard.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren im Direkteinlaßverfahren wurden unter EI-Bedingungen mit dem Massenspektrometer 311A der Firma Varian MAT gemessen. Die Aufnahme der FAB-Massenspektren erfolgte unter Verwendung von m-Nitrobenzylalkohol als Matrix mit dem Gerät VG 70-250S der Firma VG-Analytical.

Für die Aufnahme von MALDI-TOF Spektren standen folgende Massenspektrometer zur Verfügung:

- Vision 2000, Firma Finnigan MAT GmbH, Bremen
- Dynamo, Firma Thermo Bioanalysis, Hemstead, England
- DE-Voyager, Firma PerSeptive Biosystems, Framingham, MA

HPLC

Folgende HPLC-Systeme wurden verwendet:

- Delta Prep 4000 der Firma Waters mit Tunable Absorbance Detector 486 bei 254 nm
- Waters 625 LC-System (Fa. Waters) mit 996 PDA Photodiodearray Detector
- SMART-System (Fa. Pharmacia)

Dünnschichtchromatographie

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurde das Kieselgel 60 F254 auf Aluminiumfolie (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck verwendet. Die Detektion erfolgte durch:

- 1) UV-Licht
- 2) Ansprühen mit Anisaldehyd-Zuckerreagenz (4 ml Anisaldehyd, 2 ml konz. H_2SO_4 , 0.5 ml Eisessig, 80 ml Ethanol) und anschließender Erwärmung mit einem Heißluftfön. (Orangefärbung DMT-haltiger Komponenten, Blaufärbung

nucleosidischer und nucleotidischer Verbindungen bzw. Grün-Schwarzfärbung bei DMT-Nucleosid- und DMT-Nucleotidderivaten durch Überlagerung beider Farbkomponenten)

3) Ansprühen mit Ninhydrin und anschließender Erwärmung mit einem Heißluftfön

Präparative Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel 60 F254-beschichteten Glasplatten (Größe: 20X20 cm, Schichtdicke 2mm) der Firma Merck durchgeführt.

Für die dünnschichtchromatographische Trennung von Mono-, Di- und Triphosphaten wurden zusätzlich RP-18 F₂₅₄S-Platten (5X10 cm, Schichtdicke 0.25 mm) und PEI-Cellulose-F-Folien der Firma Merck eingesetzt.

Säulenchromatographie (Normal-Phase)

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) der Firma Merck durchgeführt. Die Elution erfolgte bei leichtem Überdruck (0.05 - 0.35 bar). In Abhängigkeit von der Komplexität des Trennproblems wurden 1-5 g Kieselgel pro Gramm der zu trennenden Mischung verwendet. Für die Chromatographie 5'-dimethoxytritylierter Verbindungen wurde dem Laufmittel ein geringer Anteil an Pyridin zugesetzt (0.5-1%).

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Gelpermeationschromatographische Trennungen wurden mittels einer HPLC-Anlage der Firma Waters (Delta Prep 4000) unter Verwendung von Säulen der Firma Kronwald Separationstechnik GmbH an Sephadex LH-20 (Fa. Pharmacia) durchgeführt. Die Vorbehandlung des Säulenmaterials erfolgte, wie vom Hersteller empfohlen¹⁸⁷. Vor jeder Trennung wurde die Säule (46 cm x 3 cm ID) 2 h mit dem jeweiligen Laufmittel equilibriert. Die Trennung selbst erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml /min, wobei das Eluat in 5 ml Fraktionen gesammelt wurde. Zur Erstellung der Elutionsdiagramme wurde nach dem Verdünnen der einzelnen Fraktionen mit dem jeweiligen Laufmittel im Verhältnis 1:200 (5µl auf 1ml) mittels eines GeneQuant-Photometers (Fa. Pharmacia) die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt.

Ionenaustauschchromatographie (IEC) (präparativ)

Für die präparative Ionenaustauschchromatographie zur Trennung modifizierter Nucleosidtriphosphate wurde eine Anlage verwendet, die sich aus folgenden Geräten

zusammensetzte: Gradient Master Model 1601, constametric HPLC pumps, Pumpenmodel III und ein UV-Monitor III, Model 1203 der Firma Milton Roy (Florida), ein X,Y-Schreiber REC-2 der Firma Pharmacia sowie Omnifit-Schläuche und -Fittings der Firma Macherey und Nagel.

Die Trennung erfolgte an DEAE-Cellulose 52 (Fa. Whatman) bei 4°C. Die Säule wurde so konzipiert, daß Reaktionsansätze von 0.1-0.4 mmol Nucleosid ohne Überladungseffekte aufgetrennt werden konnten. Die Vorbehandlung des Anionenaustauschers und Beschickung der Säule erfolgte nach Standardvorschriften¹⁸⁸. Vor jeder Trennung wurde die Säule (20cm x 2.5 cm ID) mit 0.1M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer equilibriert. Die Auftrennung erfolgte mittels eines linearen Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min (Laufmittel A: Wasser, Laufmittel B: 1M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH:8.4-8.6), lin. Gradient: 10-40% B in 16 h (bzw. 10 h bei kleinen Reaktionsansätzen von 0.1 mmol Nucleosid)). Elutionsdiagramme wurden über die UV-Absorption bei 280 nm erstellt. Anschließend wurde die Säule regeneriert (lin Gradient: 40-70% B in 1 h, 3 h mit 70% B eluieren, dann mit 10% B equilibrieren). Lagerung der Säule über 0.1M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer unter Zusatz von 0.02% Natriumazid bei 4°C.

IE-HPLC

Die dargestellten modifizierten Nucleosidtriphosphate wurden über IE-HPLC unter Verwendung eines SMART-Systems (Fa. Pharmacia, Freiburg) charakterisiert. Säule: MonoQ, PC 1.6/5 (Fa. Pharmacia); Laufmittel: Puffer A: 25 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.3M NaCl, pH 8; Puffer B: wie Puffer A, nur 1M NaCl. Die Auftrennung erfolgte mit Substanzmengen von 2.5–5 nmol Nucleosidtriphosphat, gelöst in 50-100µl Startpuffer (10% B). Nach der Probeninjektion wurde die Säule 5 min mit 10% B eluiert. Anschließend wurde die Konzentration von B linear erhöht (10-30% B in 20 min). Regenerieren der Säule: 30-100% B in 2 min (linearer Gradient), weitere 2min mit 100% B eluieren und dann mit 10% B equilibrieren.. Die Flußrate betrug 100 µl/min. Detektion erfolgte über UV-Absorption bei 260 und 280 nm. Aufgetrennte Triphosphate konnten zur Rückgewinnung in 100 µl-Fractionen gesammelt werden. Nach der Lyophilisation der Proben erfolgte eine Entsalzung mittels Gelfiltration.

Gelfiltration: Für die Gelfiltration wurde das SMART-System mit einer Fast Desalting 3.2/10 Säule der Firma Pharmacia verwendet. Die lyophilisierten Proben der IE-HPLC wurden in 20 µl Wasser gelöst, injiziert und mit einer Flußrate von 100 µl/min mit Reinstwasser als Eluent entsalzt. Die Gesamtdauer der Chromatographie lag bei 15 min. Die Detektion erfolgte bei

260 und 280 nm. Die Triphosphate wurden in 100 µl- Fraktionen gesammelt und lyophilisiert.

RP-HPLC

Analytisch: Standardlösungen von UMP, UDP und UTP (150 pmol/µl in 0.1M Triethylammoniumacetatpuffer (TEAA) bzw. UMP/UDP/UTP-Gemisch mit jeweils 50 pmol/µl in 0.1M TEAA-Puffer) wurden über RP-HPLC unter Verwendung eines Waters 625 Chromatographie-Systems (Fa. Waters) mit 996 PDA (photodiodearray) Detektor und einer *reversed phase* Säule (Waters, Nova Pak C-18; 3.9 x 300 mm, Partikelgröße: 4µm) analysiert. Als Eluenten dienten 0.1M TEAA-Puffer und Acetonitril. Nach der Injektion von 50µl der jeweiligen Standardlösung wurde bei einem Durchfluß von 1 ml/min. die Konzentration des Acetonitrils innerhalb von 20 min. von 0 auf 15 % linear erhöht. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der zugehörigen Software Millennium 2.0.

Präparativ: 100 µl einer Standardlösung (UMP/UDP/UTP jeweils 3.3 nmol/µl in 0.1M TEAA-Puffer) wurden mit Hilfe des Chromatographie-Systems Delta Prep 4000 (Fa. Waters) mit Tunable Absorbance Detector 486 bei 254 nm unter Verwendung einer *reversed phase* Säule (Fa. Whatman; 9.4 x 500 mm; Packungsmaterial: Partisil 10ODS2 M9, Korngröße: 10µM) chromatographiert. Als Eluenten dienten 0.1M TEAA-Puffer und Acetonitril. Bei einer Flußrate von 5 ml/min. wurde die Konzentration des Acetonitrils unter Verwendung eines nicht-linearen Gradienten (Kurve 9) innerhalb von 30 min. von 0 auf 15% erhöht.

(Linearer Gradient:  Nicht-linearer Gradient(Kurve 9): )

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

6%-ige denaturierende Polyacrylamid-Sequenzgele wurden mit Hilfe eines Fertig-Lösungs-Systems der Fa. Roth (Rotiphorese DNA-Sequenziersystem) hergestellt (18 ml Konzentrat, 50 ml Verdünner, 7.5 ml Puffer-Konzentrat, 25µl TEMED und 600 µl APS (10%-ige Lösung)). Die Vorbehandlung der verwendeten Glasplatten und das Gelgießen erfolgte nach Maniatis¹⁸⁹. Nach dem Einspannen in die Elektrophoreseapparatur (Fa. Keutz GmbH, Gießen) wurden die Puffer-Reservoirs mit TBE-Puffer (1x) beschickt. Das Gel wurde durch einen 30-minütigen Vorlauf bei konst. 60W temperiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen denaturiert (5 min auf 95°C, dann auf Eis) und anschließend der Gellauf bei konst. 60W gestartet.

Das Fixieren der aufgetrennten DNA im Gel erfolgte durch Einlegen in 10%-ige (v/v)

Essigsäure/15%-ige (v/v) Methanol-Lösung (30 min). Nach dem Trocknen des Gels für 1.5 h bei 80°C im Trockenschrank wurde zur Detektion der Sequenzierfragmente ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Dauer der Filmexposition wurde für jedes Sequenziergel optimal angepaßt und lag zwischen 1-4 Tagen.

Autoradiographie

Für die Entwicklung von Autoradiographien kam die Filmentwicklungsmaschine FPM-100A von Fuji Photo Filme GmbH, Düsseldorf zum Einsatz. Es wurden Röntgenfilme des Typs X-omat XR der Firma Kodak verwendet.

2 Synthesen

2.1 Synthese von C-5 substituiertem 2',3'-Dideoxyuridin

2.1.1 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2'-desoxyuridin 2

7.41 g (20.9 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin in 23 ml Pyridin wurden mit 8.50 g (25.1 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt und bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß 4 h gerührt. Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 ml Methanol. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt aus Toluol umkristallisiert.

M= 656.1 g/mol; C₃₀H₂₉O₇N₂I

Ausbeute: 11.2 g (17.1 mmol) 81.8%

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.49

Schmelzpunkt: 116°C

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 2.3 und 2.55 (m, 2H, H2'), 3.38 (m, 2H, H5'), 3.77 (s, 6H, OCH₃), 4.11 (m, 1H, H4'), 4.55 (m, 1H, H3'), 6.32 (t, 1H, H1'), 6.82-7.4 (m, 13H, H-arom.), 8.15 (s, 1H, H6), 9.2 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 41.4 (C2'), 55.3 (OCH₃), 63.6 (C5'), 68.9 (C5), 72.5 (C3'), 85.7 (C4'), 86.7 (C1'), 87.0 (C-zentral_{DMT}) 113.4-130.1 (CH-arom._{DMT}), 135.3, 137.8 u. 139.4 (C-arom._{DMT}), 144.41 (C6); 147.3 u. 150.3 (O-C-arom._{DMT}), 158.58 (C2), 160.37 (C4)

FAB-MS: m/z [Da] = 656 ([M]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.2 3-*t*-Butyloxycarbonylamidopropin **10**

2.75 g (50 mmol) 3-Aminopropin und 10.92 g (50 mmol) Di-*t*-butylpyrocarbonat wurden in 200 ml Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur 3 Stunden gerührt. Nach dem Einengen des Reaktionsgemisches zu einem Sirup erfolgte das Auskristallisieren bei -20°C . Das Produkt wurde abfiltriert, mit Hexan gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5.7 g (36.8 mmol) 73.6%

Schmelzpunkt: 42°C

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.21 (t, 1H, CH), 3.91 (dd, 2H, CH₂), 4.68 (br s, 1H, NH),

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 28.4 (C(CH₃)₃), 30.6 (CH₂), 71.2 (C1), 80.1 (C(CH₃)₃), 80.2 (C2), 155.3 (C=O)

2.1.3 5-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin **3**

Eine Lösung von 656 mg (1 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2'-desoxyuridin **2**, 313 mg (2 mmol) 3-*tert*-Butyloxycarbonylamidopropin **10** und 0.67 ml (5 mmol) Triethylamin in 50 ml entgastem Ethylacetat wurde unter Argon mit 15 mg Kupfer-(I)-iodid und 15 mg Bis-(triphenylphosphin)-palladium-(II)-chlorid versetzt. Die Umsetzung fand unter Rühren bei Raumtemperatur statt und war nach 40 h abgeschlossen. Es folgte der Zusatz von weiteren 20 ml Ethylacetat und das Waschen mit 5%-iger wässriger Na₂EDTA-Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel abdestilliert und

der zurückbleibende Sirup chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH: 98:2, 0.1% Pyridin).

M= 683.28 g/mol; C₃₈H₄₁O₉N₃

Ausbeute: 594 mg (0.87 mmol) 87%

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.3 und 2.55 (m, 2H, H2'), 3.38 (m, 2H, H5'), 3.78 (s, 8H, OCH₃, CH₂), 4.11 (m, 1H, H4'), 4.6 (m, 2H, H3', BOC-NH), 6.3 (t, 1H, H1'), 6.83-7.45 (m, 13 H, H-arom.), 8.1 (s, 1H, H6)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 28.35 (C(CH₃)₃), 31.0 (CH₂), 41.68 (C2'), 55.28 (OCH₃), 63.74 (C5'), 72.13 (C3'), 73.13 (C5), 74.08 (C≡C), 85.74 (C4'), 86.61 (C1'), 87.02 (C-zentral_{DMT}), 89.67 (C≡C), 113.38-135.54 (CH- u. C-arom._{DMT}), 142.96 (C6); 144.64 u. 149.62 (O-C-arom_{DMT}), 158.63, 158.66 (C=O_{BOC}, C2), 161.5 (C4)

FAB-MS: m/z [Da] = 685 ([M+H]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.4 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-phenoxythiocarbonyl-2'-desoxyuridin 12

200 mg (0.29 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin 3 und 72 mg (0.59 mmol) 4-Dimethylaminopyridin wurden unter Argonatmosphäre in 3 ml Pyridin gelöst, mit 78 µl (0.58 mmol) Phenoxythiocarbonylchlorid versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion war nach 48 Stunden abgeschlossen. Es folgte das Abdestillieren des Lösungsmittels und die chromatographische Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2, 1%-ig an Et₃N).

M= 819.28 g/mol; C₄₅H₄₅O₁₀N₃S

Ausbeute: 115 mg (0.14 mmol) 48%

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.6 und 2.85 (m, 2H, H2'), 3.4 und 3.55 (m, 2H, H5'), 3.8 (8H, OCH₃, CH₂), 4.09 (bs, 1H, BOC-NH), 4.32 (m, 1H, H4'), 5.99 (m, 1H, H3'), 6.5 (t, 1H, H1'), 6.8-7.52 (m, 18 H, H-arom.), 8.3 (s, 1H, H6)

FAB-MS: m/z [Da]= 820 ([M+H]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.5 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin **13**

Eine Lösung von 80 mg (0.1 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-phenoxythiocarbonyl-2'-desoxyuridin **12** in 3 ml Toluol wurde unter Argonatmosphäre mit 5 mg (0.03 mmol) AIBN und 6 µl (0.20mmol) Tributylzinnhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 80⁰C erwärmt und 2 Stunden gerührt. Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1) zeigte das gleichzeitige Entstehen mehrerer Produkte mit unterschiedlichen Laufeigenschaften an. Isolierung der beiden Hauptprodukte der Reaktion erfolgte mittels chromatographischer Aufreinigung (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2, 1%-ig an Et₃N). Eine massenspektrometrische Untersuchung durch FAB-MS ergab, daß beide Verbindungen größere Massen als Verbindung **13** hatten (FAB-MS: m/z= 898 und 953; $Z_{\text{ber.}}$ = 667). 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin **13** konnte auf diesem Wege nicht gewonnen werden.

2.1.6 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin **14**

Zu 200 mg (0.29 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin **3** in 7ml Dichlormethan wurden 2 ml Pyridin und 27 µl (0.34 mmol) Mesylchlorid (Methansulfonylchlorid) gegeben. Nach 8-stündigem Rühren bei Raumtemperatur war die Reaktion laut Dünnschichtchromatogramm quantitativ abgelaufen. (Unter Verwendung eines höheren Mesylchlorid-Anteils –Nucleosid/Mesylchlorid im Verhältnis 1:2 statt 1:1.2 - läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit steigern, ohne daß weitere Nebenprodukte auftreten.) Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Methanol. Das Reaktionsgemisch wurde unter Vakuum eingengt, in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abdestillieren des

Lösungsmittels chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2, 0.1% Pyridin).

M= 761.26 g/mol; C₃₉H₄₃O₁₁N₃S

Ausbeute: 137 mg (0.18 mmol) 62.1%

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.5 und 2.79 (m, 2H, H₂'), 3.41 und 3.49 (m, 2H, H₅'), 3.78 (s, 6H, OCH₃), 3.82 (m, 2H, CH₂), 4.05 (bs, 1H, BOC-NH), 4.44 (m, 1H, H₄'), 5.39 (m, 1H, H₃'), 6.39 (t, 1H, H₁'), 6.83-7.45 (m, 13 H, H-arom.), 8.14 (s, 1H, H₆)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 28.36 (C(CH₃)₃), 30.9 (CH₂), 38.67 (SO₂CH₃), 39.27 (C₂'), 55.28 (OCH₃), 63.11 (C₅'), 74.26 (C≡C), 80.15 (C₃'), 84.29 (C₄'), 85.16 (C₁'), 87.87 (C-zentral_{DMT}), 89.39 (C≡C), 100.35 (C₅), 125.01-135.54 (CH- u. C-arom._{DMT}), 143.86 (C₆); 144.64 u. 150.1 (O-C-arom_{DMT}), 150.33, 150.41 (C=O_{BOC}, C₂), 162.6 (C₄)

2.1.7 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin-2'-en 15

50 mg (0.07 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin 14 wurden unter Argonatmosphäre in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 770 µl Bu₄NF-Lösung (1M in THF) versetzt und unter Rühren auf 80°C erwärmt. Mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH: 9:1) konnte festgestellt werden, daß sich das Edukt schon in den ersten 10 min quantitativ zu einer Reihe von DMT-geschützten nucleosidischen Produkten umsetzte (Grünfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz). Das Produktgemisch wurde nicht weiter aufgearbeitet.

Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen:

Jeweils 20 mg (0.028 mmol) 14 (im Eppendorf-tube) wurden unter folgenden Bedingungen wie oben beschrieben umgesetzt:

- Zugabe von 33.6µl Bu₄NF (Verhältnis Nucleosid/ Bu₄NF: 1:1.2), 60°C, 3 h
- Zugabe von 112 µl Bu₄NF (Verhältnis Nucleosid/ Bu₄NF: 1:4), 60°C, 3 h

c) Zugabe von 140 μ l Bu₄NF (Verhältnis Nucleosid/ Bu₄NF: 1:5), RT, 24 h

Unter den Bedingungen von a) bildet sich aus Verbindung **14** ein einziges Reaktionsprodukt. Die Umsetzung verläuft nicht quantitativ, es treten jedoch auch keine weiteren Reaktionsprodukte auf. Eliminierungen unter den Bedingungen b) und c) führten beide zu einem Produktgemisch, wobei die Verbindung, die unter a) gebildet wurde, zusammen mit zwei weiteren den Hauptanteil bildete. Alle anderen Nebenprodukte lagen nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Aufreinigung dieser 3 "Hauptprodukte" an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2, 0.5% Pyridin) und Analyse mittels ¹H-NMR zeigte, daß es sich bei keiner der gebildeten Verbindungen um das gewünschte Produkt **15** handelte.

2.1.8 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-phenoxythiocarbonyl-5-iod-2'-desoxyuridin **17**

200 mg (0.31 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2'-desoxyuridin **2** wurden unter Argon in 3 ml Pyridin gelöst und mit 77 mg (0.63 mmol) 4-Dimethylaminopyridin und 83 μ l (0.62 mmol) Phenoxythiocarbonylchlorid versetzt. Nach 48 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2, 0.5% Pyridin).

Ausbeute: 166 mg (0.21 mmol) 68%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 2.6 und 2.95 (m, 2H, H2'), 3.5 und 3.62 (m, 2H, H5'), 3.8 (s, 6H, OCH₃), 4.44 (m, 1H, H4'), 5.93 (m, 1H, H3'), 6.45 (t, 1H, H1'), 6.82-7.5 (m, 18 H, H-arom.), 8.3 (s, 1H, H6)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 38.36 (C2'), 54.70 (OCH₃), 63.13 (C5'), 68.31 (C5), 83.56 (C3'), 84.11 (C4'), 85.48 (C1'), 87.02 (C-zentral_{DMT}) 112.92-147.53 (CH- u. C-arom), 144.24 (C6); 156.77 (C2), 158.22 (C4)

2.1.9 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-3'-O-mesyl-2'-desoxyuridin **19**

8.60 g (13.4 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2'-desoxyuridin **2** wurden in 330 ml Dichlormethan gelöst und mit 100 ml Pyridin und 2.65 ml (27.7 mmol) Mesylchlorid versetzt. Nach 6-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Nacht im

Kühlschrank gelagert. Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Methanol. Das Reaktionsgemisch wurde unter Vakuum eingeeengt, in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2, 0.1% Pyridin).

M= 734.08 g/mol; C₃₁H₃₁O₉N₂SI

Ausbeute: 9.03 g (12.2 mmol) 91.3%

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.66

Schmelzpunkt: 112⁰C

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 2.6 (m, 2H, H2'), 3.22 (s, 3H, OCH₃), 3.31 (m, 2H, H5'), 3.76 (s, 6H, OCH₃), 4.2 (m, 1H, H4'), 5.28 (m, 1H, H3'), 6.13 (t, 1H, H1'), 6.9-7.45 (m, 13H, H-arom.), 8.05 (s, 1H, H6)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 36.95 (C2'), 37.63 (SO₂CH₃), 54.95 (OCH₃), 62.65 (C5'), 70.17 (C5), 79.89 (C3'), 82.79 (C4'), 84.52 (C1'), 86.04 (C-zentral_{DMT}) 113.19-135.1 (CH- u. C-arom_{DMT}), 144.24 (C6); 144.47 u. 149.9 (O-C-arom.) 158.03 (C2), 160.38 (C4)

FAB-MS: m/z [Da]= 638 ([M - (CH₃SO₂OH)]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.10 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2',3'-dideoxyuridin-2'-en 20

Eine Lösung von 9.00 g (12.26 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-3'-O-mesy-2'-desoxyuridin 19 in 106 ml DMSO wurde mit 2.75 g (24.58 mmol) Kalium-*tert*-Butanolat versetzt, worauf sich das Reaktionsgemisch dunkelrot bis braun färbte. Nach einer halben Stunde Rühren bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß wurde der gesamte Ansatz in 1 l Eiswasser gegeben, woraufhin das Produkt ausfiel. Die Lösung wurde mit verdünnter Essigsäure neutralisiert, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde chromatographisch aufgereinigt. (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 99:1, 0.1% Pyridin)

M= 638.09 g/mol; C₃₀H₂₇O₆N₂I

Ausbeute: 5.76 g (9.01 mmol) 73.5%

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.68

Schmelzpunkt: 103⁰C

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 3.38 (m, 2H, H5'), 3.8 (s, 6H, OCH₃), 5.0 (m, 1H, H4'), 5.95 (dd, 1H, H3'), 6.41 (dd, 1H, H2'), 6.98 (d, 1H, H1'), 6.8-7.45 (m, 13H, H-arom.), 7.89 (s, 1H, H6) 8.65 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 54.82 (OCH₃), 64.37 (C5'), 68.32 (C5), 85.79 (C-zentral_{DMT}) 86.14 (C4'), 89.96 (C1'), 112.87-127.72 (CH-arom._{DMT}), 125.36 (C3'), 134.77 (C2'), 127.76, 134.86 u 135.03 (C-arom_{DMT}), 143.8 u. 149.76 (O-C-arom_{DMT}), 144.13 (C6); 158.25 (C2), 159.35 (C4)

FAB-MS: m/z [Da]= 638 ([M]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.11 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin-2'-en 22

5.00 g (7.8 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-iod-2',3'-dideoxyuridin-2'-en 20, 3.65 g (23.5 mmol) 3-tert-Butyloxycarbonylamidopropin 10 und 2.1 ml (15.7 mmol) Triethylamin wurden unter Argon in 40 ml entgastem DMF gelöst und mit 297 mg (1.56 mmol) Kupfer(I)-iodid und 905 mg (0.775 mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium-(0) versetzt. Die Umsetzung fand unter Rühren bei Raumtemperatur statt und war nach 90 min abgeschlossen. Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 500 mg Ionenaustauscher (DOWEX 1X8; HCO₃⁻), 15 ml Dichlormethan und 15 ml Methanol. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ionenaustauscher abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH: 98:2, 0.1% Pyridin).

Anmerkung: Die Reaktionszeit war stark abhängig von der Qualität der eingesetzten Reagenzien, speziell des Triethylamins und des Katalysators und bewegte sich zwischen 20 min und 6 Stunden. Da das Produkt sich nach vollständiger Umsetzung des Edukts wieder zersetzte, wurden Umsetzungen, die innerhalb von 20 min quantitativ abliefen, sofort durch

Verdünnen mit wenig Dichlormethan und anschließender Präzipitation in *n*-Hexan abgebrochen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit *n*-Hexan gewaschen und das Produkt chromatographisch gereinigt (siehe oben).

M= 665.27 g/mol; C₃₈H₃₉O₈N₃

Ausbeute: 3.88 g (5.83 mmol) 74.7%

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.73

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.39 (m, 2H, H5'), 3.69 (m, 2H, CH₂), 3.8 (s, 6H, OCH₃), 4.32 (t, 1H, BOC-NH), 4.99 (m, 1H, H4'), 5.97 (dd, 1H, H3'), 6.38 (dd, 1H, H2'), 6.98 (d, 1H, H1'), 6.82-7.46 (m, 13 H, H-arom.), 7.99 (s, 1H, H6), 9.15 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 28.36 (C(CH₃)₃), 31.0 (CH₂), 55.26 (OCH₃), 64.49 (C5'), 73.6 (C≡C) 86.41 (C4'), 86.48 (C-zentral_{DMT}), 89.96 (C≡C), 90.52 (C1'), 99.97 (C5), 113.32-135.47 (CH- u. C-arom._{DMT}), 126.5 (C3'), 134.66 (C2'), 143.2 (C6); 144.5 u. 149.5 (O-C-arom_{DMT}), 158.55, 158.6 (C=O_{BOC}, C2), 161.5 (C4)

FAB-MS: m/z [Da]= 665.8 ([M]⁺), 666.8 ([M+H]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.12 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin 23

3.7 g (5.58 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidoprop-1-ynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin-2'-en 22 wurden in 640 ml Ethanol gelöst und mittels Argon entgast. Nach der Zugabe von 1.9 g Pd/C (5%) wurde bei Raumtemperatur unter H₂-Atmosphäre hydriert, bis der Wasserstoffverbrauch einen Sättigungswert erreichte (4 h). Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Rohprodukt chromatographisch gereinigt.

M= 671.32 g/mol; C₃₈H₄₅O₈N₃

Ausbeute: 1.87 g (2.79 mmol) 50% 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin **23**

und

535 mg (1.45 mmol) 26% 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin **24** (Darstellung und Charakterisierung siehe S.168)

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.67

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.43 (m, 2H, C5-CH₂-CH₂) 1.84 (m, 1H, C5-CH_{2(a)}), 2-2.2 (m, 4H, H3', H2'_a, C5-CH_{2(b)}), 2.44 (m, 1H, H2'_b), 2.9 (m, 2H, CH₂-NH), 3.3 u. 3.49 (m, 2H, H5'), 3.8 (s, 6H, OCH₃), 4.25 (m, H4'), 4.62 (m, 1H, BOC-NH), 6.13 (t, 1H, H1'), 6.82-7.38 (m, 13 H, H-arom.), 7.6 (s, 1H, H6), 8.93 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 23.8 (C5-CH₂), 26.0 (C3'), 28.4 (C(CH₃)₃), 29.5 (C5-CH₂CH₂), 32.55 (C2'), 39.49 (CH₂-NH), 55.25 (OCH₃), 64.67 (C5'), 78.84 (C(CH₃)₃) 80.21 (C4'), 86.03 (C1'), 86.43 (C-zentral_{DMT}), 113.88 (C5), 136.4 (C6) 113.22-135.6 (CH- u. C-arom._{DMT}), 144.5 u. 150.3 (O-C-arom_{DMT}), 155.89, 158.64 (C=O_{BOC}, C2), 163.63 (C4)

FAB-MS: m/z [Da]= 694.2 ([M+Na]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.1.13 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin **24**

Je 160 mg (0.24 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin **23** wurden in 5 ml 80%-iger (v/v) Essigsäure gelöst und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Aufarbeitung 1): Das Reaktionsgemisch wurde auf 150 ml Eiswasser gegeben, das Produkt mit Ethylacetat extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels folgte die chromatographische Aufreinigung (Laufmittel:CH₂Cl₂/MeOH: 95:5).

M= 369.19 g/mol; C₁₇H₂₇O₆N₃

Ausbeute: 48 mg (0.13 mmol) 54.2%

Aufarbeitung 2): Die Essigsäure wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand zweimal mit Toluol koevaporiert und anschließend chromatographisch aufgereinigt (siehe oben).

Ausbeute: 63 mg (0.17 mmol) 70.8%

R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.39

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.7 (m, 2H, C5-CH₂-CH₂) 1.97 (m, 1H, H3'_a), 2.11 (m, 2H, H3'_b, H2'_a), 2.4 (m, 3H, H2'_b, C5-CH₂), 3.09 (m, 2H, CH₂-NH), 3.75 u. 4.06 (m, 2H, H5'), 4.19 (m, H4'), 4.9 (b, 1H, BOC-NH), 4.9 (bt, 1H, OH), 6.11 (t, 1H, H1'), 7.95 (s, 1H, H6), 9.22 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 23.28 (C5-CH₂), 24.68 (C3'), 28.39 (C5-CH₂-CH₂), 28.43 (C(CH₃)₃), 32.75 (C2'), 39.0 (CH₂-NH), 62.8 (C5'), 78.63 (C(CH₃)₃), 81.66 (C4'), 86.22 (C1'), 112.87 (C5), 137.23 (C6), 150.44, 156.76 (C=O_{BOC}, C2), 163.90 (C4)

FAB-MS: m/z [Da]= 370.1 ([M+H]⁺)

2.1.14 5-(3-Aminopropyl)-2',3'-didesoxyuridin 25

565 mg (1.53 mmol) 5-(3-t-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin 24 wurden in 2 ml Trifluoressigsäure gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum eingengt, der sirupartige Rückstand unter Eiskühlung hydrolysiert und mit Ammoniak (25%) neutralisiert. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels unter Vakuum wurde der Rückstand in 2 ml THF/H₂O 7:3 aufgenommen und zur vollständigen Abtrennung der Salze an Sephadex LH 20 (siehe Gelpermeationschromatographie S.:156) mit: THF/H₂O 7:3 als Laufmittel aufgereinigt (THF/MeOH 8:2 ist als Laufmittel ebenfalls geeignet). Umkristallisieren des Produktes aus EtOH/Diethylether ergab einen weißen Feststoff, der unter Ölpumpenvakuum bei 40⁰C über Phosphorpentoxid getrocknet wurde.

Ausbeute: 375 mg (1.39 mmol) 92%

R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.04

¹H-NMR (400MHz, D₂O):

δ [ppm] = 1.79 (m, 3H, C5-CH₂-CH₂, H3'_a), 2.0 (m, 2H, H3'_b, H2'_a), 2.32 (m, 3H, H2'_b, C5-CH₂), 2.89 (m, 2H, CH₂-NH), 3.65 u. 3.79 (m, 2H, H5'), 4.13 (m, H4'), 5.98 (t, 1H, H1'), 7.73 (s, 1H, H6)

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O):

δ [ppm] = 25.63 (C5-CH₂), 26.99 (C3'), 28.46 (C5-CH₂-CH₂), 33.78 (C2'), 41.19 (CH₂-NH), 64.62 (C5'), 84.56 (C4'), 88.79 (C1'), 115.32 (C5), 141.1 (C6), 154.07 (C2), 168.49 (C4)

2.1.15 5-(3-Acetylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin 26

300 mg (1.11 mmol) 5-(3-Aminopropyl)-2',3'-dideoxyuridin 25 wurden zweimal mit Pyridin koevaporiert, anschließend in 10 ml Pyridin gelöst und unter Eisbadkühlung mit 0.35 ml (2.78 mmol) Trimethylchlorsilan versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 0⁰C unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt und anschließend 0.16 ml (1.67 mmol) Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 0⁰C und 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt, erneut auf 0⁰C gekühlt und mit 2.5 ml Wasser und 2.5 ml Ammoniak (32%) versetzt. Nach weiteren 15 min Rühren wurde die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingengt und das erhaltene Rohprodukt in Ethanol aufgenommen, worauf ein weißer Niederschlag (Ammoniumacetat) ausfiel. Das Filtrat wurde eingengt und der Rückstand chromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/EtOH 95:5).

M= 310.95 g/mol; C₁₄H₂₁O₅N₃

Ausbeute: 190 mg (0.61 mmol) 55%

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.22

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.71 (m, 2H, C5-CH₂-CH₂), 1.98 (s, 3H, CH₃), 1.92 - 2.5 (m, 6H, H3', H2', C5-CH₂), 3.13 u. 3.32 (m, 2H, CH₂-NH), 3.7 u. 3.05 (dd, 2H, H5'), 4.19 (m, H4'), 4.78 (bs, 1H, OH), 6.09 (t, 1H, H1'), 6.26 (t, 1H, NH_{linker}), 7.99 (s, 1H, H6); 9.41 (s, 1H, NH-Base)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 23.39 (CH_3), 23.66 (C5-CH_2), 24.68 ($\text{C3}'$), 28.08 ($\text{C5-CH}_2\text{-CH}_2$), 33.03 ($\text{C2}'$), 37.98 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 62.96 ($\text{C5}'$), 82.0 ($\text{C4}'$), 86.35 ($\text{C1}'$), 112.41 (C5), 138.16 (C6), 150.63 (C2), 164.36 (C4), 171.65 (C=O_{Ac})

MS (EI, 70 eV): m/z = 311 [M] $^+$, 211 [$\text{M} - (\text{CH}_2)_3\text{NHAc}$] $^+$, 101 [$(\text{CH}_2)_3\text{NHAc} + \text{H}$] $^+$

FAB-MS : m/z [Da] = 312 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

2.2 Synthese von C-5 substituiertem 2',3'-Didesoxycytidin

2.2.1 3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin 29

3.00 g (5.03 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin 28 wurden in 20 ml Pyridin gelöst und mit 3 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die Acetylierung verlief unter Rühren bei Raumtemperatur und war nach 4 h abgeschlossen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonatlösung (5%), Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel erneut abdestilliert. Es folgte eine chromatographische Aufreinigung an Kieselgel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1, 0.1% Pyridin als Laufmittel.

Ausbeute: 2.95 g (5.03 mmol) 91.5%

R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 1.41 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Base}$); 2.1 (s, 3H, OCH_3); 2.46 (m, 2H, $\text{H2}'$); 3.49 (m, 2H, $\text{H5}'$); 3.8 (s, 6H, OCH_3); 4.14 (m, 1H, $\text{H4}'$); 5.45 (m, 1H, $\text{H3}'$); 6.45 (t, 1H, $\text{H1}'$); 6.87-7.42 (m, 13H, H-arom.); 7.61 (s, 1H, H6); 8.80 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 11.66 ($\text{CH}_3\text{-Base}$), 21.01 ($\text{OCH}_3\text{-Ac}$), 37.99 ($\text{C2}'$), 55.27 (OCH_3), 63.72 ($\text{C5}'$), 75.37 ($\text{C3}'$), 84.04 ($\text{C4}'$), 84.34 ($\text{C1}'$), 87.21 ($\text{C-zentral}_{\text{DMT}}$), 111.69 (C5), 113.34-135.1 (CH- u. $\text{C-arom}_{\text{DMT}}$), 144.24 (C6); 150.50 (O-C-arom.) 158.81, 163.62 (C2 u. C4), 170.45 (CO_{Ac})

2.2.2 1-[3'-O-Acetyl-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-5-methyl-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-pyrimidin-2-on 30

1) nach Sung:

100 mg (0.17 mmol) 3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin 29 und 38 mg (0.51 mmol) 1,2,4-Triazol wurden in 5 ml Pyridin gelöst und mit 50 μ l (0.26 mmol) p-Chlorphenyldichlorphosphat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 95:5 oder auch 9:1) konnte beobachtet werden, daß sich das Edukt sehr langsam zu einem Produktgemisch umsetzte. Die Reaktion wurde nach 72 h abgebrochen. Da anhand des Dünnschichtchromatogramms abgeschätzt werden konnte, daß die Ausbeute aller entstandenen Produkte weit unterhalb von 50% lag, wurde auf eine weitere Aufreinigung und Charakterisierung verzichtet. Umsetzungen mit 5.5 Äquivalenten 1,2,4-Triazol und 3 Äquivalenten p-Chlorphenyldichlorphosphat führten zu ähnlichen Ergebnissen.

2) nach Kim:

Optimale Ergebnisse hinsichtlich Ausbeute und Reaktionszeit ließen sich unter leicht modifizierten Reaktionsbedingungen nach Kim erzielen:

1.652 g (23.91 mmol) 1,2,4-Triazol wurden in 7 ml Acetonitril gelöst und mit 0.5 ml (5.48 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Nach dem Temperieren des Gemisches auf 0°C erfolgte die Zugabe von 3.2 ml (23.1 mmol) Triethylamin und einer Lösung von 500 mg (0.85 mmol) 29 in 3.5 ml Acetonitril. Die milchig-weiße Lösung wurde 90 min. bei 0°C und weitere 120 min bei Raumtemperatur gerührt. Dünnschichtchromatographie (Laufmittel:CH₂Cl₂/MeOH 9:1 bzw. 95:5) zeigte, daß Edukt und Produkt nahezu identisches Laufverhalten aufweisen. So liegt der R_F-Wert des Produktes in beiden Laufmitteln nur geringfügig niedriger als der des Eduktes. Beim Anfärben mit Anisaldehyd-Sprühreagenz hingegen zeichnet sich das Edukt durch eine charakteristische Grünfärbung, das Produkt durch eine bräunlich-grüne Färbung aus. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und einmal mit Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem erneuten Abdestillieren des Lösungsmittels folgte eine chromatographische Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel:CH₂Cl₂/MeOH 99:1; 0.1% Pyridin).

M= 637.25 g/mol; C₃₅H₃₅O₇N₅

Ausbeute: 497 mg (0.78 mmol) 91.8%

R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.58

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 2.00 (s, 3H, CH₃-Base); 2.1 (s, 3H, OCH₃); 2.41 u. 2.89 (m, 2H, H_{2'}); 3.45 u. 3.52 (m, 2H, H_{5'}); 3.8 (s, 6H, OCH₃); 4.39 (m, 1H, H_{4'}); 5.42 (m, 1H, H_{3'}); 6.40 (t, 1H, H_{1'}); 6.83-7.40 (m, 13H, H-arom.); 8.08, 8.3 u. 9.28 (je 1s, 3H, H₆, CH_{Triazol}, CH_{Triazol})

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 16.55 (CH₃-Base), 20.97 (OCH₃-Ac), 39.61 (C_{2'}), 55.27 (OCH₃), 63.43 (C_{5'}), 74.94 (C_{3'}), 85.05 (C_{4'}), 87.27 (C_{1'}), 87.42 (C-zentral_{DMT}) 106.09 (C₅), 113.38-135.2 (CH- u. C-arom_{DMT}), 145.10, 146.49 u. 153.46 (C₆, CH_{Triazol}, CH_{Triazol}); 153.96 (O-C-arom.) 158.31, 158.84 (C₂ u. C₄), 170.45 (CO_{Ac})

FAB-MS: m/z [Da]= 638.5 ([M+H]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.2.3 3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin 31

100 mg (0.16 mmol) **30** wurden in 3 ml Dioxan gelöst, langsam mit 1 ml 25%-iger wässriger Ammoniaklösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 45 min. war das Edukt quantitativ umgesetzt. Eine Deacetylierung trat unter diesen Bedingungen nicht auf. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/EtOH 95:5, 0.1% Pyridin; im Verlauf der Chromatographie wurde der EtOH-Anteil stufenweise auf CH₂Cl₂/EtOH 9:1 erhöht).

M= 585.25 g/mol; C₃₃H₃₅O₇N₃

Ausbeute: 81 mg (0.14 mmol) 87.5%

R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.31

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.49 (s, 3H, CH₃-Base); 2.05 (s, 3H, OCH₃); 2.31 u. 2.60 (m, 2H, H_{2'}); 3.40 u. 3.50 (m, 2H, H_{5'}); 3.8 (s, 6H, OCH₃); 4.17 (m, 1H, H_{4'}); 5.40 (m, 1H, H_{3'}); 6.46 (t, 1H, H_{1'}); 6.82-7.40 (m, 13H, H-arom.); 7.71 (s, 1H, H₆)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 12.54 (CH_3 -Base), 21.03 (OCH_3 -Ac), 38.96 ($\text{C}2'$), 55.27 (OCH_3), 63.68 ($\text{C}5'$), 75.38 ($\text{C}3'$), 83.89 ($\text{C}4'$), 85.59 ($\text{C}1'$), 87.01 (C-zentral_{DMT}) 102.07 (C5), 113.29-138.31 (CH- u. C-arom_{DMT}), 144.36 (C6); 155.70 (O-C-arom.) 158.73 (C2), 165.29 (C4), 170.48 (CO_{Ac})

FAB-MS: m/z = 1171.8 ($[\text{M}_2+\text{H}]^+$), 586.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 303.2 ($[\text{DMT}]^+$)

2.2.4 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-pyrimidin-2-on 32

1.39 g (20.18 mmol) 1,2,4-Triazol wurden in 6 ml Acetonitril gelöst, auf 0°C heruntergekühlt und mit 2.7 ml (19.35 mmol) Triethylamin und 0.405 ml (4.49 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Nach der Zugabe von 0.5 g (0.74 mmol) 5-(3-t-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyuridin 23 in 3 ml Acetonitril wurde das Reaktionsgemisch 150 min bei 0°C und anschließend weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit Natriumhydrogencarbonat- und einmal mit Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach erneutem Abdestillieren des Lösungsmittels folgte eine chromatographische Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1; 0.1% Pyridin).

M = 721.98 g/mol; $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{N}_6$

Ausbeute: 475 mg (0.66 mmol) 89.2%

R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.48

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 1.35 (m, 2H, C5- CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$) 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.04 (m, 3H, C5- $\text{CH}_{2(a)}$, $\text{H}3'$), 2.32 (m, 1H, $\text{H}2'_a$), 2.65 (m, 2H, $\text{H}2'_b$ C5- $\text{CH}_{2(b)}$), 2.83 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ -NH), 3.33 u. 3.59 (d, 2H, $\text{H}5'$), 3.8 (s, 6H, OCH_3), 4.36 (m, 1H, $\text{H}4'$), 4.58 (m, 1H, BOC-NH), 6.13 (t, 1H, $\text{H}1'$), 6.82-7.38 (m, 13 H, H-arom.), 8.09, 8.38 u. 9.29 (s, 3H, $\text{H}6$, $\text{CH}_{\text{Triazol}}$, $\text{CH}_{\text{Triazol}}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 25.01 ($\text{C}3'$), 26.58 ($\text{C}5\text{-CH}_2$), 28.45 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.48 ($\text{C}5\text{-CH}_2\text{CH}_2$), 33.49 ($\text{C}2'$), 39.89 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 55.28 (OCH_3), 63.91 ($\text{C}5'$), 78.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82.11 ($\text{C}4'$), 86.61 ($\text{C-zentral}_{\text{DMT}}$), 88.73 ($\text{C}1'$), 109.02 ($\text{C}5$), 113.34-135.45 (CH- u. $\text{C-arom.}_{\text{DMT}}$), 145.3, 147.26, 153.69 ($\text{C}6$, $\text{CH}_{\text{Triazol}}$, $\text{CH}_{\text{Triazol}}$), 144.36 u. 153.88 ($\text{O-C-arom.}_{\text{DMT}}$), 155.82, 157.66 (C=O_{BOC} , $\text{C}2$), 158.78 ($\text{C}4$)

FAB-MS: m/z [Da] = 723 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 303 ($[\text{DMT}]^+$)

2.2.5 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxycytidin 33

450 mg (0.62 mmol) 32 wurden in 10 ml Dioxan gelöst, langsam unter Rühren mit 4.1 ml 25%-iger Ammoniaklösung versetzt und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen, zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Produkt chromatographisch gereinigt (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 95:5, 0.1% Pyridin; im Verlauf der Chromatographie wurde der EtOH-Anteil stufenweise auf $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 9:1 erhöht).

$M = 670.34$ g/mol; $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{N}_4$

Ausbeute: 279 mg (0.42 mmol) 67.6%

R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.21

Schmelzpunkt: 115°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 1.39 (m, 2H, $\text{C}5\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) 1.42 (s, 9H $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.8 (m, 1H, $\text{C}5\text{-CH}_2(\text{a})$), 1.96 (m, 3H, $\text{H}3'$, $\text{C}5\text{-CH}_2(\text{b})$), 2.15 u. 2.46 (m, 2H, $\text{H}2'$), 2.87 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.29 u. 3.48 (m, 2H, $\text{H}5'$), 3.8 (s, 6H, OCH_3), 4.25 (m, 1H, $\text{H}4'$), 4.68 (m, 1H, BOC-NH), 6.13 (t, 1H, $\text{H}1'$), 6.82-7.48 (m, 13 H, H-arom.), 7.69 (s, 1H, $\text{H}6$)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 24.26 (C3'), 25.25 (C5-CH₂), 27.97 (C(CH₃)₃), 28.35 (C5-CH₂CH₂), 32.83 (C2'), 39.56 (CH₂-NH), 54.81 (OCH₃), 64.15 (C5'), 78.75 (C(CH₃)₃), 80.2 (C4'), 85.86 (C-zentral_{DMT}), 86.64 (C1'), 104.45 (C5), 112.78-135.33 (CH- u. C-arom._{DMT}), 138.02 (C6), 144.36 u. 153.88 (O-C-arom._{DMT}), 155.70 (C=O_{BOC}), 158.17 (C2), 164.40 (C4)

FAB-MS: m/z [Da] = 1340 ([M₂]⁺), 671 ([M+H]⁺), 303 ([DMT]⁺)

2.2.6 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxycytidin 34

200 mg (0.3 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-didesoxycytidin 33 wurden in 5 ml 80%-iger Essigsäure gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Die Abspaltung der DMT-Schutzgruppe erfolgte quantitativ innerhalb von 2 h. Anschließend wurde die Lösung unter Eiskühlung hydrolysiert und mit Ammoniak (25%) versetzt, bis ein pH-Wert von 8 erreicht war. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand mit Dioxan koevaporiert und anschließend chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/EtOH 95:5; im Verlauf der Chromatographie wurde der EtOH-Anteil stufenweise auf CH₂Cl₂/EtOH 9:1 erhöht).

M = 368.21 g/mol; C₁₇H₂₈O₅N₄

Ausbeute: 79 mg (0.214 mmol) 71.4%

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.08

¹H-NMR (400 MHz, DMSO):

δ [ppm] = 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.52 (m, 2H, C5-CH₂-CH₂) 1.85 (m, 3H, H3', H2'_a), 2.24 (m, C5-CH₂, H2'_b), 2.92 (m, 2H, CH₂-NH), 3.55 u. 3.69 (m, 2H, H5'), 4.0 (m, 1H, H4'), 5.95 (t, 1H, H1'), 6.8 (t, 1H, BOC-NH), 7.66 (s, 1H, H6)

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO):

δ [ppm] = 25.08 (C5-CH₂), 25.73 (C3'), 29.07 (C5-CH₂CH₂), 29.15 (C(CH₃)₃), 33.09 (C2'), 40.28 (CH₂-NH), 63.09 (C5'), 78.34 (C(CH₃)₃), 82.17 (C4'), 86.41 (C1'), 105.14 (C5), 139.37 (C6), 155.80 u. 156.49 (C=O_{BOC}, C2), 165.53 (C4)

MS (EI, 70 eV): m/z [Da] = 368 ([M]⁺)

2.3 Synthese von C-3'-0-modifizierten Thymidinderivaten

2.3.1 N-Fmoc-Glycin 35 und N-Fmoc-Alanin 36

Je Ansatz wurden 0.9 mmol der Aminosäure (67 mg Glycin oder aber 79 mg Alanin) und 0.9 mmol (75 mg) Natriumhydrogencarbonat in einem Gemisch aus 1.2 ml Wasser und 1.2 ml Aceton gelöst und mit 0.9 mmol (300 mg) Fluorenylmethyl-succinimidylcarbonat versetzt. Nach dem Rühren bei RT über Nacht wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Salzsäure auf ~2 eingestellt und das Aceton am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, die organische Phase mit 0.1N Salzsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Das verbleibende Rohprodukt wurde aus Chloroform/Petrolether umkristallisiert.

N-Fmoc-Glycin 35:

Ausbeute: 156 mg (0.74 mmol) 83 %

¹H-NMR (400MHz, DMSO):

δ [ppm] = 3.68 (d, 2H, CH₂ Glycin), 4.25 (t, 1H, CH_{Fmoc}), 4.30 (d, 2H, CH₂ Fmoc), 7.33, 7.41, 7.71 u. 7.9 (t, t, d, d, jeweils 2H, CH_{arom.Fmoc}), 7.64 (t, 1H, NH_{Glycin})

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO):

δ [ppm] = 41.99 (CH₂ Glycin), 46.54 (CH_{Fmoc}), 65.61 (CH₂- Fmoc), 120.01, 125.12, 126.9 u. 127.54 (CH_{arom. Fmoc}), 140.64, 143.7, 156.31 (C_q Fmoc), 174.3 (C=O_{Fmoc})

N-Fmoc-Alanin 36:

Ausbeute: 180 mg (0.75 mmol) 83 %

¹H-NMR (400MHz, DMSO):

δ [ppm] = 1.3 (d, 3H, CH₃ Alanin), 4.03 (t, 1H, CH_{Alanin}), 4.22 (t, 1H, CH_{Fmoc}), 4.3 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 5.21 (t, 1H, OH_{C5'}), 5.27 (m, 1H, H_{3'}), 6.21 (t, 1H, H_{1'}), 7.33, 7.42, 7.72 u. 7.9 (t, t, m, d, jeweils 2H, CH_{arom.Fmoc}), 7.66 (d, 1H, NH_{Alanin})

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO):

δ [ppm] = 16.99 (CH₃ Alanin), 46.55 (CH_{Fmoc}), 49.11 (CH_{Alanin}), 65.48 (CH₂- Fmoc), 120.02, 125.02, 125.17, 126.99 u. 127.54 (CH_{arom. Fmoc}), 140.64, 143.73, 155.76 (C_q Fmoc), 143.77 (C_q Alanin), 174.3 (C=O_{Fmoc})

2.3.2 3'-O-(N-Fmoc-glycyl)-2'-desoxythymidin 41 und 3'-O-(N-Fmoc-alanyl)-2'-desoxythymidin 42 (2-Stufen-Reaktion)

1.43 g (6.9 mmol) DCC wurden unter Feuchtigkeitsausschluß und Argonatmosphäre schnell in 12.5 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit einer Lösung von 5 mmol der jeweiligen N-Fmoc-Aminosäure (1.45 g N-Fmoc-Glycin oder aber 1.55 g N-Fmoc-Alanin) in 12.5 ml DMF versetzt. Nach 30-minütigem Rühren bei RT erfolgte die Zugabe von 2.5 mmol DMTT (1.36 g in 12.5 ml Pyridin) über ein Septum. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Stunden bei RT gerührt, bis das Dünnschichtchromatogramm keine weitere Umsetzung zum Produkt mehr anzeigte. Da immer noch Edukt vorhanden war, wurden zusätzliche 419 mg (2.03 mmol) DCC zugesetzt und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das bei der Reaktion gebildete Harnstoffderivat fiel als Niederschlag an und wurde abfiltriert. Nach dreimaligem Waschen des Filtrerrückstandes mit Dichlormethan wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeeengt.

Der resultierende Sirup (Rohprodukt von 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(N-Fmoc-glycyl)-2'-desoxythymidin 39 bzw. 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(N-Fmoc-alanyl)-2'-desoxythymidin 40) wurde ohne weitere Aufreinigung zur Dedimethoxytritylierung direkt in 20 ml 80%-iger Essigsäure aufgenommen und bei RT gerührt. Die Abspaltung der Schutzgruppe war innerhalb von 4 h abgeschlossen. Der Reaktionsansatz wurde in Eiswasser gegeben und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Da mittels Dünnschichtchromatographie noch Produkt in der wässrigen Phase nachweisbar war, wurde zusätzlich mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Waschen der vereinigten organischen Lösungen mit 5%-iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser erfolgte das Trocknen über CaCl₂. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand chromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol: 98:2). Auf diese Weise konnten beide Produkte in reiner Form erhalten werden. Falls erforderlich, lassen sich beide Produkte in der Wärme aus Chloroform/Petrolether umkristallisieren.

3'-O-(N-Fmoc-glycyl)-2'-desoxythymidin 41:

M= 521.17 g/mol, C₂₇H₂₇O₈N₃

Ausbeute: 641 mg (1.23 mmol) 49.2 %

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.36

¹H-NMR (400MHz, DMSO):

δ [ppm] = 1.8 (s, 3H, CH₃ Thymidin), 2.21 u. 2.31 (m, m, 2H, H2') 3.65 (m, 2H, H5'), 3.84 (d, 2H, CH₂ Glycin), 3.99 (m, 1H, H4'), 4.27 (t, 1H, CH_{Fmoc}), 4.37 (d, 2H, CH₂ Fmoc), 5.21 (t, 1H, OH C5'), 5.29 (m, 1H, H3'), 6.2 (t, 1H, H1'), 7.35, 7.41, 7.71 u. 7.9 (t, t, d, d, jeweils 2H, CH_{arom.}Fmoc), 7.72 (s, 1H, H6 Thymidin), 7.79 (t, 1H, NH_{Glycin})

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO):

δ [ppm] = 12.2 (CH₃ Thymidin), 36.33 (C2'), 42.25 (CH₂ Glycin), 46.48 (CH_{Fmoc}), 61.2 (C5'), 65.7 (CH₂₋ Fmoc), 75.33 (C3'), 83.54 (C1'), 84.34 (C4'), 109.66 (C5), 120.04, 124.8, 125.08, 127.0 u. 127.54 (CH_{arom.} Fmoc), 135.71 (C6), 140.64, 143.7, 156.44 (C_q Fmoc), 150.39 (C2), 163.56 (C4), 172.3 (C=O_{Fmoc})

FAB-MS: m/z [Da] = 522.4 ([M+H]⁺), 1042.8 ([M₂+H]⁺)

3'-O-(N-Fmoc-alanyl)-2'-desoxythymidin 42:

M = 535.19 g/mol, C₂₈H₂₉O₈N₃

Ausbeute: 795 mg (1.49 mmol) 59.6 %

R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.21

¹H-NMR (400MHz, DMSO):

δ [ppm] = 1.31 (d, 3H, CH₃ Alanin), 1.79 (s, 3H, CH₃ Thymidin), 2.21 u. 2.31 (m, m, 2H, H2') 3.63 (m, 2H, H5'), 3.93 (m, 1H, H4'), 4.1 (t, 1H, CH_{Alanin}), 4.23 (t, 1H, CH_{Fmoc}), 4.35 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 5.21 (t, 1H, OH C5'), 5.27 (m, 1H, H3'), 6.21 (t, 1H, H1'), 7.33, 7.41, 7.71 u. 7.89 (t, t, d, d, jeweils 2H, CH_{arom.}Fmoc), 7.72 (s, 1H, H6 Thymidin), 7.87 (d, 1H, NH_{Alanin})

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO):

δ [ppm] = 12.17 (CH₃.Thymidin), 16.6 (CH₃ Alanin), 36.37 (C2'), 46.54 (CH_{Fmoc}), 49.31 (CH_{Alanin}), 61.23 (C5'), 65.58 (CH₂₋ Fmoc), 75.27 (C3'), 83.6 (C1'), 84.36 (C4'), 109.66 (C5), 120.02, 125.06, 126.99 u. 127.53 (CH_{arom.} Fmoc), 135.72 (C6), 140.65, 143.68, 155.81 (C_q Fmoc), 143.76 (C_q Alanin), 150.39 (C2), 163.56 (C4), 172.3 (C=O_{Fmoc})

FAB-MS: m/z [Da] = 536.5 ([M+H]⁺)

2.3.3 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(2-methoxy-ethoxy-methyl)-2'-desoxythymidin 43

500 mg (0.92 mmol) 4,4'-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin **28** wurden in 15 ml Dichlormethan suspendiert. Nach der Zugabe von 235 μ l (1.38 mmol) Diisopropylethylamin und 156 μ l (1.38 mmol) 2-Methoxyethoxymethylchlorid (MEMCl) wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Da die Umsetzung nach 4 h erst zu ca. 50 % abgelaufen war, erfolgte die Zugabe von weiteren 200 μ l Diisopropylethylamin und 100 μ l MEMCl. Nach einer Gesamtreaktionsdauer von 8 h wurde das Reaktionsgemisch mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung des zurückbleibenden Sirups erfolgte chromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH: 98:2; 0.5% Pyridin). Als Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie (Reaktionskontrolle) wurde CH₂Cl₂/MeOH: 9:1 eingesetzt.

M= 632.27 g/mol; C₃₅H₄₀O₉N₂

Ausbeute: 253 mg (0.4 mmol) 43.5%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1.49 (s, 3H, CH₃-Base); 2.3 u. 2.42 (m, 2H, H_{2'}); 3.34 (s, 3H, OCH₃ MEM); 3.39 u. 3.49-3.57 (m, 4H, H_{5'} (2H), O-(CH₂)₂-O_{MEM} (2H)); 3.79 (s, 8H, OCH₃ (6H) u. O-(CH₂)₂-O_{MEM} (2H)); 4.04 (m, 1H, H_{4'}); 4.58 (m, 1H, H_{3'}); 5.47 (d, 2H, O-CH₂-O_{MEM}), 6.41 (t, 1H, H_{1'}); 6.81-7.41 (m, 13H, H-arom.); 7.59 (s, 1H, H₆)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 12.69 (CH₃-Base), 41.24 (C_{2'}), 55.43 (OCH₃ DMT), 59.17 (OCH₃ MEM), 63.62 (C_{5'}), 69.91, 71.34 u. 71.89 (sek. C_{MEM}:OCH₂OCH₂CH₂O), 72.47 (C_{3'}), 85.47 u. 86.17 (C_{4'}/C_{1'}), 87.1 (C-zentral_{DMT}), 110.67 (C₅), 113.44-135.55 (CH- u. C-arom_{DMT}), 144.46 (C₆); 151.2 (O-C-arom._{DMT}) 158.88 (C₂), 163.71 (C₄)

2.3.4 3'-O-(2-methoxy-ethoxy-methyl)-2'-desoxythymidin 44

253 mg (0.4 mmol) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(2-methoxy-ethoxy-methyl)-2'-desoxythymidin **43** wurden in 3 ml 80 %-iger Essigsäure gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2.5 h war die Schutzgruppe quantitativ abgespalten. Das Reaktionsgemisch wurde auf 10 ml Eiswasser gegeben und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Wie das Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 9:1) der wässrigen

und der organischen Phase zeigte, konnte mit Ethylacetat lediglich ein sehr geringer Anteil des Produktes extrahiert werden. Auch durch Aussalzen war keine quantitative Überführung des Produktes in die organische Phase möglich. Deshalb wurde die wässrige Phase abgetrennt, am Rotationsverdampfer eingengt und der resultierende Rückstand einer präparativen Dünnschichtchromatographie unterzogen (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 9:1). Nach der Entwicklung in der Chromatographiekammer und kurzem Trocknen der mit Kieselgelbeschichteten Glasplatte erfolgte die Lokalisierung des Produktes mittels UV-Absorption. Der Produktpot wurde isoliert, die Verbindung konnte jedoch nicht quantitativ vom Kieselgel abgetrennt werden. Eine weitere Aufreinigung fand nicht statt.

2.4 Synthese von massenmarkierten Nucleosidtriphosphaten

2.4.1 Massenmodifizierte 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate 45-49

106 mg pulverisiertes Molekularsieb (0.4 nm) wurden unter Argonatmosphäre in 2.5 ml Acetonitril suspendiert und mit 111 mg (0.97 mmol) Pyridiniumhydrochlorid versetzt. Es folgte die Zugabe von 0.2 mmol des entsprechenden Didesoxynucleosids. Nach 10 min Rühren bei RT wurde die Suspension auf 0°C abgekühlt und mit 50 µl (0.53 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Unter Rühren bei 0°C erfolgte die Umsetzung zum entsprechenden Dichlorophosphat für alle 2',3'-Didesoxynucleosidderivate innerhalb von 2 Stunden. (Dünnschichtchromatographische Kontrolle: Laufmittel: Chloroform/Methanol 3:2).

Für die weitere Umsetzung zum Triphosphat wurden 213 mg pulverisiertes Molekularsieb (0.4 nm) in 2.2 ml DMF suspendiert und mit 2.1 ml 0.5 M Tetrakis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat-lösung (Darstellung siehe Seite 151) versetzt. Die Suspension wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt, auf 0°C abgekühlt, weitere 10 min gerührt und anschließend unter Argon zu der ebenfalls gekühlten Reaktionslösung des oben dargestellten Dichlorophosphats gegeben. Nach 15 min Rühren unter Eiskühlung wurde das Reaktionsgemisch langsam innerhalb von 60 min auf Raumtemperatur erwärmt. Durch Zugabe von 600 µl Wasser unter Eiskühlung wurde die Reaktion abgebrochen und das Molekularsieb über eine Glasfritte abgetrennt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 5-10 ml 0.1M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH: 8.4, Herstellung: siehe S.153) gelöst und mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose aufgetrennt (siehe S. 156). Die produkthaltigen Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert, in 700µl Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Um Rückstände an Triethylammoniumhydrogencarbonationen zu vermeiden, wurde das Produkt noch einmal in

700 μl Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Triphosphate wurden als farblose, glasartige Triethylammoniumsalze erhalten. Charakterisierung erfolgte über UV-Spektroskopie, ^{31}P -NMR und IE-HPLC (siehe S.157).

Für den weiteren Einsatz der modifizierten Didesoxynucleosidtriphosphate als Terminatoren in Sequenzierungsreaktionen wurden 5 mM Stammlösungen angesetzt (Lösungsmittel: Reinstwasser), die bei -20°C gelagert wurden. Die Reinheit der 5'-Triphosphate wurden vor den Sequenzierungsreaktionen mittels IE-HPLC überprüft. Zersetzung zum Di- oder auch Monophosphat konnte auch bei längeren Lagerungszeiten (\sim zwei Monate, -20°C) nicht beobachtet werden.

5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin-5'-triphosphat 45

73 mg (0.2 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin 24 wurden wie oben beschrieben zum Triphosphat umgesetzt und über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose aufgereinigt. Das Produkt eluierte bei 0.30M TEBK-Puffer (30% B).

Ausbeute: 62 μmol (23%)

R_f-Wert (2-Propanol/Ammoniak (25%)/H₂O 3:1:1): 0.19

UV (H₂O): $\lambda_{\text{max}} = 269.0 \text{ nm}$

^{31}P -NMR (80.97 MHz, D₂O): $\delta = -10.29$ und -10.7 (2P, P $_{\gamma}$, P $_{\alpha}$), -21.17 (1P, P $_{\beta}$)

IE-HPLC: Bedingungen: siehe S.157, Retentionszeit: 17.13 min

MALDI-TOF-MS: m/z [Da] = 548.4 [(M-BOC)+K]⁺, 532.5 [(M-BOC)+Na]⁺, 510.5 [(M-BOC)+H]⁺, 430.4 [(M-(BOC+HPO₃))+H]⁺, 372.5 [(M-(BOC+H₂P₂O₆))+Na]⁺

Mit M= Molekulargewicht der freien Säure des Triphosphates (H⁺-Form).

5-(3-acetylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin-5'-triphosphat 46

31 mg (0.1 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxyuridin 24 wurden wie oben beschrieben zum Triphosphat umgesetzt und über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose aufgereinigt. Das Produkt eluierte bei 0.29M TEBK-Puffer (29% B).

Ausbeute: 32 μmol (32%)

R_f-Wert (2-Propanol/Ammoniak (25%)/H₂O 3:1:1): 0.12

UV (H_2O): $\lambda_{\max} = 268.5$ nm

^{31}P -NMR (80.97 MHz, D_2O): $\delta = -10.06$ und -10.73 (2P, P_γ , P_α), -21.14 (1P, P_β)

IE-HPLC: Bedingungen: siehe S.157, 8. 81 min

MALDI-TOF-MS: m/z [Da] = 628.4 [(M-H)+2K]⁺, 612.5 [(M-H)+Na+K]⁺, 596.4 [(M-H)+2Na]⁺, 590.5 [M+K]⁺, 574.5 [M+Na]⁺, 551.5 [M]⁺, 510.3 [(M-HPO₃)+K]⁺ oder [(M-Ac)+H]⁺, 509.0 [M-Ac]⁺

Mit M= Molekulargewicht der freien Säure des Triphosphates (H^+ -Form).

5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxycytidin-5'-triphosphat **47**

26 mg (0.07 mmol) 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-didesoxycytidin **34** wurden wie oben beschrieben zum Triphosphat umgesetzt und über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose aufgereinigt. Das Produkt eluierte bei 0.275 M TEBK-Puffer (27.5% B).

Ausbeute: 10.8 μ mol (15.3%)

R_f -Wert (2-Propanol/Ammoniak (25%)/ H_2O 3:1:1): 0.3

UV (H_2O): $\lambda_{\max} = 289.0$ nm

^{31}P -NMR(80.97 MHz, D_2O): $\delta = -10.30$ (2P, P_γ u. P_α), -21.21 (1P, P_β)

IE-HPLC: Bedingungen: siehe S.157, 12.85 min

MALDI-TOF-MS: m/z [Da] = 547.5 [(M-BOC)+K]⁺, 531.6 [(M-BOC)+Na]⁺, 509.6 [(M-BOC)+H]⁺, 451.1 [(M-(BOC+HPO₃))+Na]⁺, 371.4 [(M-(BOC+H₂P₂O₆))+Na]⁺

Mit M= Molekulargewicht der freien Säure des Triphosphates (H^+ -Form).

2.4.2 Abspaltung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe **48, 49**

10 μ l einer 5 mM Lösung von 5-(3-tert-Butyloxycarbonylamidopropyl)-2',3'-dideoxyuridin- (bzw. -cytidin-)5'-triphosphat **45** bzw. **47** wurden lyophilisiert und der Rückstand in 5 μ l Trifluoressigsäure gelöst. Nach 3 min Stehen bei Raumtemperatur wurde die Lösung lyophilisiert, der Rückstand unter Eiskühlung in 10 μ l Wasser aufgenommen und mit Ammoniak (25%) neutralisiert. Anschließend wurde erneut lyophilisiert, in 50 μ l Wasser

aufgenommen, relyphilisiert und das Produkt in 10 μl Wasser gelöst. Die so erhaltenen Lösungen wurden mittels IE-HPLC analysiert und anschließend für Sequenzierungen eingesetzt.

3 MALDI-TOF-Analysen

3.1 Probenpräparation und Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren

Untersuchungen mit Kationenaustauscherbeads¹⁹⁰ und Nitrocellulose-Membranen^{49, 50} wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt. Für alle hier dargestellten Spektren von Oligonucleotiden erfolgte die Probenpräparation unter Zusatz von Diammoniumhydrogencitrat zur Matrixlösung. (Matrixlösung: 0.7M 3-HPA, 0.07M Diammoniumhydrogencitrat in Reinstwasser/Acetonitril 1:1 (v/v)). Matrixlösungen wurden täglich frisch angesetzt oder in Portionen von 50 μl bei -20°C bis zum Verbrauch gelagert.

Standardmäßig wurden 0.3-0.5 μl der zu analysierenden Lösung (Konzentration typischerweise 1-10 pmol/ μl) auf dem Probenträger mit 0.3-0.5 μl der Matrixlösung vermischt (Verhältnis Proben-/Matrixlösung: 1:1, (v/v)). Für die Analyse komplexer Gemische wurde bei schlechtem Kristallisationsverhalten oder hohem Untergrund der resultierenden Spektren das Verhältnis Proben-/Matrixlösung von 1:1 bis auf maximal 1:3 erhöht. Das Proben-Matrix-Gemisch wurde an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in das MALDI-TOF-MS eingeschleust. Das im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Gerät (Vision 2000 der Firma Finnigan MAT GmbH, Bremen) arbeitete mit kontinuierlicher Ionenextraktion und war mit einem N_2 -Laser (337 nm, Pulsdauer ca. 3 ns mit maximaler Pulsenergie von 250 μJ) ausgestattet. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die Spektrenaufnahme im positiven Ionenmodus mit zugeschaltetem Reflektor, einer Beschleunigungsspannung von 5kV und einer Nachbeschleunigungsspannung von 20 kV (bzw. 5-6 kV bei Verbindungen bis zu 2kDa). Messungen im Linear-Modus wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 30 kV durchgeführt. Die Spektrenauswertung erfolgte mit der Software des Vision 2000, Version 3.40 oder aber mit der PSD Software des Vision 2000, Version 0.1.51.

MALDI-TOF-Analyse der massenmarkierten Didesoxynucleosidtriphosphate (10, 50 und 100 μM Lösungen der jeweiligen Verbindungen) erfolgte mittels 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix (10 mg/ml in Reinstwasser /Acetonitril 70/30 (v/v)). Zusätzlich wurden Untersuchungen mit 3-Hydroxypicolinsäure (s. oben) und 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure (10

mg/ml in Reinstwasser/Acetonitril 70/30 (v/v)) als Matrix durchgeführt. Die Kalibrierung der Massenskala erfolgte hier intern über die Matrixsignale. Die Spektren wurden im Reflektor-Modus mit einer Nachbeschleunigungsspannung von 6 kV aufgenommen (positiver Ionenmodus).

Für die Berechnung der theoretischen Molekulargewichte wurden die relativen Durchschnittsmassen (chemische Masse) eingesetzt. Lediglich für Verbindungen < 2 kDa, für die Isotopenauflösung erzielt werden konnte, wurden die relativen Isotopenmassen (phys. Masse) verwendet. Kalibrierung der Massenskala erfolgte in der Regel extern über Standardlösungen gemischter, synthetischer Oligonucleotide variierender Länge. Bei der Analyse enzymatischer Reaktionsprodukte erfolgte die Kalibrierung gegebenenfalls auch intern über die Signale des Primers und der Matrix. In Abhängigkeit des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden gegebenenfalls bis zu 50 Einzelmessungen zum Summenspektrum aufaddiert.

Bei der direkten MALDI-Analyse "controlled pore glas" (CPG-Beads)- oder Streptavidin-Biotin-gebundener Oligonucleotidproben war es erforderlich, den Abstand Probenträgeroberfläche/Lochblende neu zu justieren. Streptavidin-beschichtete magnetische Beads mit immobilisierten DNA-Duplexen⁵⁸ wurden resuspendiert und in Lösung auf den Probenträger aufgetragen. Probenpräparation erfolgte hier wie oben beschrieben (Standardpräparation).

Für die MALDI-Analyse von massenmarkierten Terminationsprodukten kamen zusätzlich weitere Geräte zum Einsatz. Diese waren ebenfalls mit einem N₂-Laser (337 nm) ausgerüstet und wurden im positiven Ionenmodus betrieben:

- Baugleiches Vision 2000, Fa. Thermo Bioanalysis, England, aufgerüstetes Gerät mit verzögerter Ionenextraktion im Linear-Modus. Spektrenaufnahme erfolgte a) im DE-Linear-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 30 kV und b) im Reflektor-Modus (kontinuierliche Ionenextraktion) mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV und einer Nachbeschleunigungsspannung von 20 kV.
- Dynamo, Fa. Thermo Bioanalysis, England. Spektrenaufnahme erfolgte a) im Reflektor-Modus mit kontinuierlicher Ionenextraktion. Verwendete Beschleunigungsspannung 10 kV; Nachbeschleunigungsspannung 20 kV und b) mit verzögerter Ionenextraktion im Linear-Modus (DE-LTOF).
- DE-Voyager, Fa. PerSeptive Biosystems, USA. Spektrenaufnahme erfolgte im DE-Linear-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV.

3.2 Analyse synthetischer Oligonucleotide und Oligonucleotidgemische

Massen und Sequenzen der eingesetzten Oligodesoxynucleotide sind in Tab. 1, S.24 wiedergegeben. Konzentrationsbestimmungen erfolgten über UV-Absorption bei 260 nm. Für die Analyse von Gemischen wurden zunächst die einzelnen Oligonucleotide gut miteinander durchmischt und anschließend Aliquots dieser Lösungen einer MALDI-Analyse unterzogen.

Für die Untersuchungen zur Empfindlichkeit bei der Analyse von komplexen Gemischen im Linear/Reflektor-Modus wurde zunächst eine Stammlösung bestehend aus dem 7-, 10-, 11-, 19-, 20-, 24-, 26-, 33-, 37-, 38-, 42-, 46- und 50-mer mit einer Konzentration von 10 pmol/μl je Verbindung hergestellt. Diese wurde dann auf Konzentrationen von 4, 2 und 1 pmol/μl verdünnt. Konzentrationen von 0.4, 0.2 und 0.1 pmol/μl wurden durch weitere Verdünnung dieser Lösungen um Faktor 10 hergestellt.

Die hier abgebildeten Spektren zeigen Probenpräparation mit 0.5μl der zu analysierenden Lösung und 0.5μl der Matrixlösung. Es wurden zudem Probenpräparationen mit 0.1-0.5 μl je Lösung (Probe und Matrix) analysiert.

3.3 Analyse von doppelsträngiger DNA

3.3.1 PCR-Produkte⁵⁹

PCR-Produkte wurden von C. Siegert wie folgt dargestellt:

Das 99-mer und das 200-mer PCR-Produkt (modifiziert und nicht modifiziert) sowie das 100-mer PCR-Produkt mit Ribose und 7-Desaza-Purin-Modifikation wurden amplifiziert von pRFc1 DNA (10 ng, zur Verfügung gestellt von S. Feyerabend, Universität Hamburg). Endkonzentrationen der in einem 100μl Reaktionsansatz enthaltenen Komponenten: 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgSO₄ (exo(-)Pfu-Puffer, Pharmacia), 0.2 mM jedes dNTP, 1 μM der jeweiligen Primer und 1 unit der exo(-)Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland). Sequenzen der verwendeten Primer waren wie folgt:

Primer 1: 5'-GTCACCCTCGACCTGCAG

Primer 2: 5'-TTGTAAAACGACGGCCAGT

Primer 3: 5'-CTTCCACCGCGATGTTGA

Primer 4: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC

Primer 5: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT

Primer 6: 5'-GTCACCCTCGACCTGCAGC (g: RiboG)

Primer 7: 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAgT (g: RiboG)

Für die Synthese des 99-mers wurden Primer 1 und 2 verwendet, für die des 200-mers Primer 1 und 3 und für die des 100-mers Primer 6 und 7. Ein Sequenzausschnitt von pRFc1 DANN, der die Sequenz der gewählten Templates wiedergibt, ist in der Veröffentlichung aufgeführt⁵⁹. Für die Darstellung von 7-Desaza-Purin modifizierten Oligonucleotiden wurde dATP und dGTP bei der PCR unter Verwendung gleicher Konzentrationen vollständig durch C⁷-dATP und C⁷-dGTP ersetzt. Für alle PCRs wurden 30 Zyklen durchgeführt. Zyklus: 1 min bei 95⁰C (Denaturierung), 1 min bei 51⁰C (Annealing) und 1 min bei 72⁰C (Kettenverlängerung). Abschließende Kettenverlängerung bei weiteren 10 min bei 72⁰C.

Das 103-mer PCR-Produkt (modifiziert und nicht modifiziert) wurde von M13mp18RF1 DNA (100 ng, Pharmacia) unter Verwendung von Primer 4 und 5 amplifiziert. Reaktionsvolumen und Konzentrationen waren wie oben angegeben. Für die Synthese der unmodifizierten Verbindung wurden 30 Zyklen, für die modifizierte Verbindung 40 Zyklen durchgeführt. Zyklus: 1 min bei 95⁰C (Denaturierung), 1 min bei 40⁰C (Annealing) und 1 min bei 72⁰C (Kettenverlängerung). Abschließende Kettenverlängerung bei weiteren 10 min bei 72⁰C.

Die Aufreinigung der Reaktionsgemische erfolgte über Ultrafree-MC-Filtereinheiten (30000 NMWL) (Millipore, Eschborn, Deutschland) nach den vom Hersteller empfohlenen Anweisungen. Nach der Lyophilisation wurden die PCR-Produkte in 5µl Reinstwasser (das 200-mer in 3µl) gelöst. Aliquots von 0.5 µl dieser Lösungen wurden wie vorher beschrieben für die MALDI-Analyse eingesetzt.

Abspaltung der Ribo-modifizierten Primer:

Das amplifizierte, aufgereinigte 100-mer PCR-Produkt mit 7-Desaza-Purin- und Ribose-Modifikation wurde in 100µl 0.2 M NaOH gelöst und für 25 min auf 95⁰C erhitzt. Die Lösung wurde mit 1M HCl neutralisiert und über eine Ultrafree-MC-Filtereinheit (10000 NMWL) wie oben beschrieben für die MALDI-Analyse aufgereinigt.

3.3.2 Untersuchungen zum Nachweis von doppelsträngiger DNA

Sequenzen und berechnete Massen der verwendeten Oligodesoxynucleotide:

- 50-mer (M = 15337 g/mol):

5'-TTGCGTACACACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCT

- 27-mer_k (komplementär) (M = 8343 g/mol):
5'-GTAAAACGACGGCCAGTGTGTACGCAA
- 27-mer_{nk} (nicht-komplementär) (M = 8293 g/mol):
5'-TACTGGAAGGCGATCTCAGCAATCAGC

Probenvorbereitung: Die jeweiligen Oligonucleotide wurden in Reinstwasser gelöst, so daß Stammlösungen von 100 pmol/µl resultierten. Diese wurden auf Konzentrationen von 20, 10, 5 und 2.5 pmol/µl verdünnt. 2µl von jeweils äquimolaren Lösungen des 50-mers und des 27-mers (entweder 27-mer_k oder 27-mer_{nk}) wurden bei Raumtemperatur gut durchmischt und 10 min stehen gelassen. 0.5 µl dieser Gemische wurden dann mit 0.5 µl der Matrixlösung auf dem Probenträger vermischt und mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

4 Sanger-Sequenzierungen

4.1 Sequenzierung von M13mp18

Sequenzierungen mit einzelsträngiger M13mp18 DNA als Template erfolgten unter Verwendung des DNA-Sequenzier-Kits Sequenase 2.0 (United States Biochemicals (USB)) nach dem vom Hersteller gelieferten Standardprotokoll. Als Primer wurde der im Kit enthaltene (-40)Primer eingesetzt (Sequenz: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC). Zur Herstellung der Terminationsgemische massenmarkierter Terminatoren wurden dNTP- (100mM) und ddNTP-Lösungen (5mM) der Firma Pharmacia verwendet.

Standardsequenzierung (Kontrolle):

Für die Hybridisierung wurden 1µg M13mp18 DNA (5µl) mit 0.5 pmol Primer (1µl) unter Zugabe von 2µl Sequenase-Reaktionspuffer (5X) und 2µl Reinstwasser vermischt, bei 65⁰C für 2 min inkubiert, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend auf Eis gelagert. Für die radioaktive Markierung der Fragmente wurden zu der Annealing-Lösung 0.5µl [α -³⁵S]-ATP (DuPont), 1µl 0.1M DTT, 2µl Labelling Mix (C⁷-dGTP, dCTP, dTTP je 7.5 µM; 1:5 verdünnt) und 2µl Sequenase 2.0 (1:8 verdünnt, ohne Pyrophosphatase) gegeben und 4 min bei RT inkubiert.

Für die Untersuchung des Einflusses von Mn²⁺ wurde parallel der gleiche Ansatz unter Zugabe von 1µl Mangan-Puffer durchgeführt.

Aliquots von 3.5µl des Reaktionsgemisches wurden auf jeweils 2.5µl der vorbereiteten, auf

37⁰C temperierten Terminationsgemische (A, C, G und T: jeweils 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M C⁷-dGTP, 80 μ M dTTP, 50mM NaCl und 8 μ M ddNTP) gegeben, 4 min bei 37⁰C inkubiert und anschließend mit 4 μ l Stopplösung versetzt.

Nach dem Denaturieren der Proben wurden jeweils 6 μ l der Lösungen auf das Sequenzgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Bedingungen s. S. 158 (PAGE)).

Sequenzierungen mit massenmarkierten Terminatoren:

Für die Sequenzierungen mit massenmarkierten Didesoxynucleosidtriphosphaten wurden Terminationsgemische mit folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M C⁷-dGTP, 80 μ M dTTP, 50mM NaCl und X μ M ddTTP_{mod} (mit X= 5, 10, 15, 20, 50 und 100). Sequenzierungen wurden genau wie oben beschrieben mit und ohne Mn²⁺-Zusatz durchgeführt.

4.2 Sequenzierungen mittels MALDI-TOF-MS

Der biotinylierte Primer (Universal Sequencing Primer d(bio-GTAAAACGACGGCCAGT) M= 5721 g/mol) wurde HPLC-gereinigt von der Fa. Pharmacia Biotech bezogen. Für die Sequenzierungsreaktionen kamen Reagenzien des Sanger-Sequenzierungs-Kits Sequenase 2.0 (USB) sowie dNTPs und ddNTP's der Fa. Pharmacia zum Einsatz. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels DynaBeads M-280 Streptavidin (Dyna, Hamburg, Deutschland). Als Bindungskapazität für biotinylierte Oligonucleotide wurde 1-2 pmol/10 μ g Dynabeads zugrunde gelegt.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen auf die gegebene Problemstellung wurden Sequenzierungen mit unterschiedlichen Mengen an Primer und Template, einfacher und doppelter Enzymmenge und unterschiedlichen Reaktionszeiten (2, 25, 50 und 100 min) durchgeführt. Im folgenden ist das daraus resultierende Standardprotokoll wiedergegeben.

Sanger-Sequenzierung

8 pmol Primer (0.8 μ l), 8 pmol Template (0.8 μ l) (synthetisches 50-mer, M=15337 g/mol, d(TTGC GTACACACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCT)), 2 μ l Sequenase-Reaktionspuffer (5X) und 6.4 μ l Reinstwasser wurden zusammengegeben, bei 67⁰C für 2 min. inkubiert, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend auf Eis gelagert. Diese Lösung wurde mit 1 μ l 0.1M DTT, 1 μ l Mn²⁺-Puffer und 2 μ l verdünnter

Sequenase 2.0 (6 units, mit Pyrophosphatase) versetzt und anschließend auf 10µl Terminationsgemisch gegeben (80µM dATP, 80µM dCTP, 80µM dGTP, 80µM dTTP, 50mM NaCl und 20µM ddTTP). Nach einer Inkubationszeit von 50 min. bei 37⁰C erfolgte die Probenaufreinigung durch Zugabe der vorbereiteten Streptavidin Dynabeadslösung wie unten beschrieben.

Für Sequenzierungen mit massenmarkierten Didesoxynucleosidtriphosphaten wurden die jeweiligen Terminationsgemische dieser Verbindungen in gleichen Endkonzentrationen wie oben angegeben eingesetzt. Sequenzierungen mit variierendem dNTP/ddNTP-Verhältnis erfolgten mit folgenden Endkonzentrationen des jeweiligen Terminationsgemisches: 80µM dATP, 80µM dCTP, 80µM dGTP, 80µM dTTP, 50mM NaCl und entweder a) 20µM, b) 40µM, c) 60µM oder d) 80µM ddT_xTP (mit ddT_xTP = jeweils eingesetztes Didesoxynucleosidtriphosphat; unterschiedlich massenmodifiziert oder nicht modifiziert).

Aufreinigung der Proben

Ein Aliquot von 8µl Streptavidin Dynabeads-Lösung (10µg/µl) wurde im Eppendorf-Tube mit B/W Puffer (1X) (5mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1M NaCl) vorgewaschen. Hierfür wurden die Beads mittels eines MPCs (magnetic particel collector, Dynal) an der Gefäßwand "gebunden", der Überstand abgetrennt und anschließend die Beads in B/W-Puffer suspendiert. Der Vorgang erfolgte zweimal. Danach wurde der Überstand abgetrennt, die Beads in 24 µl B/W Puffer (2X) suspendiert und zu dem Sequenzierungsansatz gegeben. Immobilisierung der biotinylierten Fragmente erfolgte bei Raumtemperatur über 20 min. unter leichtem Schwenken. Nachfolgend wurde der Überstand abgetrennt und die Beads zweimal mit 50µl B/W-Puffer (1X) gewaschen. Denaturierung erfolgte unter Zugabe von 30µl Ammoniumhydroxidlösung (25%, suprapur, Merck) für 1 min. bei Raumtemperatur. Das Template wurde mit dem Überstand abgetrennt, der Vorgang noch einmal wiederholt. Die Abspaltung des biotinylierten Stranges von den Beads erfolgte durch zweimalige Inkubation mit 30µl 25%-iger Ammoniumhydroxidlösung bei 60⁰C für 8 min. Die Überstände wurden gepoolt und die Probe entweder durch Lyophilisation (zunächst unter Wasserstrahl- dann unter Ölpumpenvakuum) oder aber durch Ethanol-fällung aufkonzentriert. Das Lyophilisat (oder auch Präzipitat) wurde in 1-3µl Reinstwasser aufgenommen. Aliquots dieser Lösung (0.3-0.5µl) wurden mittels MALDI-TOF-MS wie oben beschrieben analysiert. Die Spektrenqualität von lyophilisierten und präzipitierten Proben war in der Regel vergleichbar. Speziell für Ansätze die lediglich in 1µl Reinstwasser aufgenommen wurden, erwies sich ein Verhältnis von Proben- und Matrixlösung von 1:2 als vorteilhaft (gegenüber 1:1 bei der Standardpräparation). Mischungen von 0.5 µl Probenlösung und 1 µl Matrixlösung oder auch

0.3/0.6 μl führten reproduzierbar zu einer guten Kristallisation. Auch bei Ansätzen die in 3 μl Reinstwasser aufgenommen wurden, konnte für schlecht kristallisierende Proben durch Erhöhung der Matrixlösungsmenge oftmals eine Verbesserung der MALDI-TOF-Analyse erzielt werden (verminderter Untergrund, bessere Signalauftrennung).

4.2.1 *PROBE Assay*

Für die T-Reaktionen wurden Terminationsgemische mit Endkonzentrationen von 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dGTP, 50mM NaCl und 80 μM ddT_XTP hergestellt (mit ddT_XTP = ddTTP, ddTBOCTP (**45**), ddTA_cTP (**46**) oder ddTNH₂TP (**48**)). Endkonzentrationen der Terminationsgemische für die C-Reaktionen waren: 80 μM dATP, 80 μM dTTP, 80 μM dGTP, 50mM NaCl und 80 μM ddC_XTP (mit ddC_XTP = ddCTP, ddCBOCTP (**47**) oder ddCNH₂TP (**49**)).

Der PROBE-Assay wurde analog zur oben beschriebenen Sequenzierung mit biotinyliertem Primer und synthetischem 50-mer Template jeweils mit einem der hergestellten Terminationsgemische durchgeführt. Die Aufreinigung der Produkte für die MALDI-TOF-Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

4.2.2 *Multiplex-PROBE-Assay*

Primer Oligo Base Extension Reaktionen wurden mit den Terminationsgemischen der nicht modifizierten ddTTP- und ddCTP-Verbindungen und der einzelnen massenmarkierten Verbindungen analog zum oben beschriebenen PROBE Verfahren durchgeführt. Die Probenaufreinigung wurde entweder getrennt durchgeführt, die entsprechenden Ansätze anschließend gepoolt, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert oder aber gemeinsam aufgereinigt: Hierfür wurden pro Reaktionsansatz 5 μl Dynabeads mit B/W Puffer (1X) zweimal vorgewaschen in 24 μl B/W Puffer (2X) suspendiert und direkt zur Reaktionslösung gegeben. Nach der Immobilisierung der Proben (20 min unter leichtem Schwenken) erfolgte die Abtrennung des Überstandes. Die Beads der einzelnen Reaktionsansätze wurden jeweils in 50 μl B/W-Puffer (1X) suspendiert und nachfolgend die jeweiligen Ansätze gepoolt. (Poolen der Reaktionen von: {ddT, ddTBOC}; {ddT, ddTA_c}, ddTBOC}; {ddT, ddTNH₂, ddTA_c, ddTBOC}; {ddC, ddCBOC} und {ddC, ddCNH₂, ddCBOC}) Anschließend wurde der Überstand abgetrennt und die Beads zweimal mit 50 μl B/W-Puffer (1X) gewaschen. Denaturierung erfolgte durch Inkubation mit 40 μl 25%-iger

Ammoniumhydroxidlösung für 1 min. bei Raumtemperatur. Das Template wurde mit dem Überstand abgetrennt, der Vorgang noch einmal wiederholt. Die Abspaltung der biotinylierten Produkte von den Dynabeads erfolgte durch Inkubation mit 40µl 25%-iger Ammoniumhydroxidlösung für 8 min. bei 60⁰C. Der Überstand wurde zurückbehalten, die Beads mit 25%-iger Ammoniumhydroxidlösung für 1 min. bei 60⁰C inkubiert (Nachwaschen). Die Überstände der NH₄OH-Behandlung bei 60⁰C wurden zusammengegeben und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 4µl Reinstwasser gelöst und Aliquots von 0.3-0.5µl der MALDI-TOF-Analyse zugeführt. Zwecks Gerätevergleich wurden MALDI-TOF-Messungen von Aliquots der gleichen Probenlösung unter gleichen Bedingungen der Probenpräparation an unterschiedlichen Massenspektrometern analysiert.

X Literatur

- 1) Ottspeich, F.; Zorbas, H.
Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH (1998) 705
- 2) Barrell, Bart
FASEB J. 5, 40 (1991)
- 3) Heinrich, P.; Domdey, H.
Nachr. Chem. Tech. Lab. 36, 1198 (1988)
- 4) Trainor, G. L.
Anal Chem. 62, 418 (1990)
- 5) Drmanac, R.; Labat, I.; Brunker, I.; Crkvenjakov, R.
Genomics 4, 114 (1989)
- 6) Cantor, C. R. et al.
Nucleosides & Nucleotides 16, 591 (1997)
- 7) Lindsay, S. M.; Phillip, M.
Gen. Anal. Tech Appl. 8, 8 (1991)
- 8) Goodwin, P. M. et al
Nucleosides & Nucleotides 16, 543 (1997)
- 9) Drossman, H; Luckey, J. A.; Kostichka, A. J.; D'Cunha, J.; Smith, L. M.
Anal. Chem. 62, 900 (1990)
- 10) Pastinen, T. et al.
Clin. Chem. 42, 1391 (1996)
- 11) Jalanko, A. et al.
Clin. Chem. 38, 39 (1992)
- 12) Beckey, H. D.
Int. J. Mass Spectrom.Ion Phys. 2, 500 (1969)
- 13) Lattimer, R. P.; Schulten, H. R.
Int. J. Mass Spectrom.Ion Phys. 67, 227 (1985)
- 14) Lattimer, R. P.
Int. J. Mass Spectrom.Ion Proc. 55, 221 (1983)
- 15) Feld, H.; Leute, A.; Zurmühlen, R.; Benninghoven, A.
Anal. Chem. 63, 903 (1991)

- 16) Fenn, J. B. et al.
J. Phys. Chem. 88, 4451 (1984)
- 17) Karas, M.; Hillenkamp, F.
Anal. Chem. 60, 2299 (1988)
- 18) Metzger, J. O.; Woisch, R.; Tuszynski, W.; Angermann, R.; Puls, J.
Rapid Commun. Mass Spektrom. 7, 1041 (1993)
- 19) Jungclas, H.; Schmidt, L.; Fritsch, H. W.; Köhl, P.
BioTec Analytik 30 (03.1990)
- 20) McNeal, C. J. et al.
Proc. Natl. Acad. Science USA 77, 735 (1980)
- 21) McNeal, C. J.; Oglivie, K. K.; Theriault, M. Y.; Nemer, M. J.
J. Am. Chem. Soc. 104, 976 (1982)
- 22) Viari, A. et al
Biomed. Environ. Mass Spectrom. 16, 225 (1988)
- 23) Matsuo, T. et al
Proceedings of the 34th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics,
Cincinnati, Ohio 329 (1986)
- 24) Jardine, I.
Nature 345, 747 (1990)
- 25) Edmonds, C. G.; Smith, R.D.
Methods Enzymol. 193, 412 (1990)
- 26) Smith, R. D.; Loo, J. A.; Edmonds, C. G.; Barinaga, C. J.; Udseth, H. R.
Anal. Chem. 62, 882 (1990)
- 27) Wilm, M. S.; Mann, M.
Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 136, 167 (1994)
- 28) Valaskovic, G. A.; Kelleher, N. L.; Little, D. P.; Aaserud, D. J.; Mc Lafferty, F. W.
Anal. Chem. 67, 3802 (1995)
- 29) Little, D.; Thannhauser, T. W.; Mc Lafferty, F. W.
Proc. Natl. Acad. Science USA 92, 2318 (1995)
- 30) Limbach, P. A.; Crain, P. F.; Mc Closkey, J. A.
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6 27 (1995)
- 31) Chen, R. et al.
Anal. Chem. 67, 1159 (1995)

- 32) Fuerstenau, S. D.; Benner, W. H.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 1528 (1995)
- 33) Hillenkamp, F.; Karas, M.
Anal. Chem. 63, 1196 (1991)
- 34) Cotter, R. J.
Anal. Chem. 64, 1027 (1992)
- 35) Spengler, B.; Pan, Y.; Cotter, R.J.; Kann, L. S.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 4, 99 (1990)
- 36) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Ingendoh, A.; Stahl, B.
In: Biological Mass Spectrometry; Burlingam, A.; McCloskey, J. A., Eds.;
Elsevier: Amsterdam 49 ff (1990)
- 37) Karas, M.; Bahr, U.
Trends Anal. Chem. 9, 321 (1990)
- 38) Nordhoff, E. et al.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 6, 771 (1992)
- 39) Schieltz, D. M.; Chou, C. W.; Luo, C. W.; Thomas, R. M.; Williams, P.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 6, 631 (1992)
- 40) Schieltz, D. M.; Williams, P.
Proceedings of the 42th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics,
Chicago, Illinois 141 (1994)
- 41) Lecchi, P.; Le, H. M. T.; Pannell, L. K.
Nucleic Acids Res. 23, 1276 (1995)
- 42) Pieles, U.; Zürcher, W., Schär, M.; Moser, H. E.
Nucleic Acids Res. 21, 3191 (1993)
- 43) Tang, K.; Taranenko, N.I.; Allman, S.L.; Chen, C. H.; Chang, L. Y.; Jacobson, K. B.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 8, 673 (1994)
- 44) Wu, K. J.; Steding, A.; Becker, C. H.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 7, 142 (1993)
- 45) Vestal, M. et al.
Proceedings of the 43rd ASMS conference of mass spectrometry and allied topics,
Atlanta, Georgia 195 (1995)
- 46) Ingendoh, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U.
Int. J. Mass Spectrom. 131, 345 (1994)

- 47) Schneider, K. Chait, B.
Nucleic Acids Res. 23, 1570 (1995)
- 48) Tang, K.; Taranenko, N. I.; Allman, S. L.; Chang, L. Y.; Chen, C. H.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 8, 727 (1994)
- 49) Liu, Y. H.; Bai, J.; Lubman, D. M.; Venta, P. J.
Anal. Chem. 67, 3482 (1995)
- 50) Bai, J.; Liu, Y. H.; Liang, X.; Zhu, Y.; Lubman, D. M.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 1172 (1995)
- 51) Roskey, M. T.; Juhasz, P.; Smirnov, I. P.; Takach, E. J.; Martin, S. A.; Haff, L. A.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4724 (1996)
- 52) Juhasz, P.; Roskey, M. T.; Smirnov, I. P.; Haff, L. A.; Vestal, M.L.; Martin, S. A.
Anal. Chem. 68, 941 (1996)
- 53) Stemmler, E. A.; Hettich, R. L.; Hurst, G. B.; Buchanan, M. V.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 7, 828 (1993)
- 54) Li, Y. et al.
Anal. Chem. 68, 2090 (1996)
- 55) Wang, B. H.; Biemann, K.
Anal. Chem. 66, 1918 (1994)
- 56) Hathaway, G. M.
BioTechniques 17, 150
- 57) Kirpekar, F. et al.
Nucleic Acids Res. 22, 3866 (1994)
- 58) Jurinke, C.; v. d. Boom, D.; Jacob, A.; Tang, K.; Wörl, R.; Köster, H.
Anal. Biochem. 237, 174 (1996)
- 59) Siegert, C. W.; Jacob, A.
Anal. Biochem. 243, 55 (1996)
- 60) Jurinke, C.; van den Boom, D.; Köster, H.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 50 (1998)
- 61) Nordhoff, E. et al.
J. Mass Spectrom. 30, 99 (1995)
- 62) Talbo, G.; Mann, M.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 10, 100 (1996).

- 63) Bentzley, C. M.; Johnson, M. V.; Larsen, B. S.; Gutteridge, S.
Anal. Chem. 68, 2141 (1996)
- 64) Juhasz, P.; Vestal, M.; Takach, E.; Roskey, M.; Smirnov, I.; Haff, L.; Martin, S.
Proceedings of the 43rd ASMS conference of mass spectrometry and allied topics,
Atlanta, Georgia 364 (1995)
- 65) Köster, H.; van den Boom, D.; Braun, A.; Jacob, A.; Jurinke, C.; Little, D. P.; Tang, K.
Nucleosides & Nucleotides 16, 563 (1997)
- 66) Hurst, G. B.; Doktycz, M. J.; Vass, A. A.; Buchanan, M. V.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 10, 377 (1996)
- 67) Shaler, T. A.; Tan, Y.; Wickham, J. N.; Wu, K. J.; Becker, C. H.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 942 (1995)
- 68) Fitzgerald, M.; Zhu, L.; Smith, M. L.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 7, 895 (1993)
- 69) Köster, H. et al.
Nature Biotech. 14, 1123 (1996)
- 70) Liu, Y.-H. et al.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 735 (1995)
- 71) Ross, P. L.; Belgrader, P.
Anal. Chem. 69, 3966 (1997)
- 72) Jurinke, C. et al.
Genet. Anal. 13, 67 (1996)
- 73) Jiang-Baucom, P.; Girard, J. E.; Butler, J.; Belgrader, P.
Anal. Chem. 69, 4894 (1997)
- 74) Haff, L. A.; Smirnov, I. P.
Genome Res. 7(4), 378 (1997)
- 75) Little, D. P.; Braun, A.; Darnhofer-Demar, B.; Köster, H.
Eur. J. Clin. Chem. Biochem. 35, 545 (1997)
- 76) Braun, A.; Little, D. P.; Köster, H.
Clin. Chem. 43, 1151 (1997)
- 77) Braun, A.; Little, D. P.; Reuter, D.; Müller-Mysok, B.; Köster, H.
Genomics 46, 18 (1997)
- 78) Little, D. P. et al.
BioTechniques 23, 710 (1997)

- 79) Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F.
Org. Mass Spectrom. 27, 472 (1992)
- 80) Metzger, J. O.; Woisch, R.; Tuszynski, W.; Angermann, R.
Fresenius J. Anal. Chem. 349, 473 (1994)
- 81) Michalak, L. et al.
Org. Mass Spectrom. 29, 512 (1994)
- 82) Fitzgerald, M.C.; Parr, G.R.; Smith, L. M.
Anal. Chem. 65, 3204 (1993)
- 83) Nordhoff, E. et al.
Nucleic Acids Res. 22, 2460 (1994)
- 84) Wu, K. J.; Shaler, T. A.; Becker, C. H.
Anal. Chem. 66, 1637 (1994)
- 85) Doktycz, M. J. et al.
Anal. Biochem. 230, 205 (1995)
- 86) Stults, J. T.; Marsters, J. C.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 5, 359 (1991)
- 87) Bai, J.; Liu, Y. H.; Lubman, D. M.; Siemieniak, D.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 8, 687 (1994)
- 88) Gusev, A. I.; Wilkenson, W. R.; Proctor, A.; Hercules, D. M.
Anal. Chem. 67, 1034 (1995)
- 89) Vorm, O.; Mann, M.
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5, 955 (1994)
- 90) Zoltewicz, J. A.; Clark, D. F.; Sharpless, T. W.; Grahe, G.
J. Am. Chem. Soc. 92, 1741 (1970)
- 91) York, J. L.
J. Org. Chem. 46, 2171 (1981)
- 92) Zhu, L.; Parr, G. R.; Fitzgerald, M. C.; Nelson, C. M.; Smith, L. M.
J. Am. Chem. Soc. 117, 6048 (1995)
- 93) Kochetkov, N. N.; Budovskij, E. I.
Organic Chemistry of Nucleic Acids, Part A, Chap. 3, Plenum, New York
- 94) Seela, F.; Steker, H.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2573 (1985)

- 95) Köster, H.; Albersmeyer, K.; Skroch, D.
Z. Physiol. Chem. 359, 1570 (1978)
- 96) Seela, F.; Kehne, A.
Biochemistry 26, 2232 (1987)
- 97) Mizusawa, S.; Nishimura, S.; Seela, F.
Nucleic Acids Res. 14, 1319 (1986)
- 98) Chidgeavadze, Z. G. et al.
Nucleic Acids Res. 12, 1671 (1984)
- 99) Chidgeavadze, Z. G. et al.
FEBS Lett. 183, 275 (1985)
- 100) Metzger, M. L.; Raghavachari, R.; Richards, S.; Jacutin, S. E.; Civitello, A.;
Burgess, K.; Gibbs, R. A.
Nucleic Acids Res. 22, 4259 (1994)
- 101) Wojczewski, C.; Faulstich, K.; Engels, J. W.
Nucleosides & Nucleotides 16, 751 (1997)
- 102) Tabor, S.; Richardson, C. C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6339 (1995)
- 103) Moran, S.; Ren, R. X.-F.; Kool, E. T.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10506 (1997)
- 104) Petruska, J.; Goodman, M. F.; Boosalis, M. S.; Sowers, L. C.; Cheong, C. & Tinoco, I. Jr.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6252 (1988)
- 105) Petruska, J.; Goodman, M. F.
J. Biol. Chem. 270, 746 (1995)
- 106) Dale, R. M. K. et al
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2238 (1993)
- 107) Prober, J. M. et al.
Science 238, 336 (1987)
- 108) Bergot, J. B. et al.
PCT, Publ. No.: WO 91/05060 (1991)
- 109) Nordhoff, E.; Cramer, R.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Kirpekar, F.; Kristiansen, K.;
Roepstorff, P.
Nucleic Acids Res. 21, 3347 (1993)

- 110) Ono, T.; Scalf, M.; Smith, L. M.
Nucleic Acids Res. 25, 4581 (1997)
- 111) Montgomery, J. A.; Hewson, K.
J. Heterocycl. Chem. 2, 313 (1965)
- 112) Seela, F.
Liebigs. Ann. Chem. 876 (1983)
- 113) Soula, G.
J. Org. Chem. 50, 3717 (1985)
- 114) Kazimierczuk, Z.; Revankar, G. R.; Robins, R. K.
J. Am. Chem. Soc. 106, 6379 (1984)
- 115) Heck, R.F.
Acc. Chem. Res. 12, 146 (1979)
- 116) Heck, R. F.
J. Am. Chem. Soc. 90, 5531 (1968)
- 117) Larock, R. C.; Bernhardt, J. C.; Driggs, R. J.
J. Organomet. Chem. 156, 45 (1978)
- 118) Ruth, J. L.; Bergstrom, D. E.
J. Org. Chem. 43, 2870 (1978)
- 119) Robins, M. J.; Barr, P. J.
J. Org. Chem. 48, 1854 (1983)
- 120) Haralambidis, J.; Chai, Miao; Tregear, G. W.
Nucleic Acids Res. 15, 4857 (1987)
- 121) Hobbs, F. W.
J. Org. Chem. 54, 3420 (1989)
- 122) Hartley, F. R.; Jones, S. R.
J. Organomet. Chem. 66, 465 (1974)
- 123) Chalk, A. J.; Magennis, S. A.
J. Org. Chem. 41, 273 (1976)
- 124) Nelson, D. J.; Yeagle, P. L.; Miller, T. L.; Martin, R. B.
Bioinorg. Chem. 5, 353 (1976)
- 125) Sonogashira, K.; Thoda, Y.; Hagihara, N.
Tetrahedron Lett. 50, 4467 (1975)

- 126) Seela, F.; Gumbiowski, R.;
Helv. Chim Acta 74, 1048 (1991)
- 127) Wörl, R.
Diplomarbeit, Universität Hamburg (1992)
- 128) Smith, L. M.; Fung, S. Hunkapiller, M. W.; Hunkapiller, T. J.; Hood, L. E.
Nucleic Acids Res. 13, 2439 (1985)
- 129) Barton, D. H. R.; McCombie, S. W.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1574 (1975)
- 130) Barton, D. H. R.; Subramanian, R.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1718 (1977)
- 131) Lessor, R. A.; Leonhard, N. J.
J. Org. Chem. 46, 4300 (1981)
- 132) Robins, M. J.; Wilson, J. S.; Hanske, F.
J. Am. Chem. Soc. 105, 4059 (1983)
- 133) Robins, M. J.; Wilson, J. S.
J. Am. Chem. Soc. 103, 932 (1981)
- 134) Samukov, V. V.; Ofitserov, V. I.
Sov. J. Bioorg. Chem. 9, 36 (1983)
- 135) Prisbe, E. J.; Martin, J. C.
Synthet. Commun. 15, 401 (1985)
- 136) Webb, R. R.; Wos, J. A.; Martin, J. C.; Brodfuehrer, P. R.
Nucleosides, Nucleotides 7, 147 (1988)
- 137) Mc Carthy, J. R. Jr.; Robins, M. J.; Townsend, L. B.; Robins, L. K.
J. Am. Chem. Soc. 88, 1549 (1966)
- 138) Horwitz, J. P.; Chua, J.; Klundt, I. L.; Da Rooge, M. A.; Noel, M.
J. Am. Chem. Soc. 86, 1896 (1964)
- 139) Horwitz, J. P.; Chua, J. Noel, M.; Donatti, J. T.
J. Org. Chem. 32, 817 (1967)
- 140) Horwitz, J. P.; Chua, J.; Da Rooge, M. A.; Noel, M.; Klundt, I. L.
J. Org. Chem. 31, 205 (1966)
- 141) Blackburn, G. M.
Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press, 109 (1990)

- 142) Ti, G. S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A.
J. Am. Chem. Soc. 104, 1316 (1982)
- 143) Fox, J. J. et al.
J. Am. Chem. Soc. 81, 178 (1959)
- 144) Zemlicka, J.; Sorm, F.
Collect. Czech. Chem. Commun. 30, 2052 (1965)
- 145) Vobrüngen, H.; Krolikiewicz, K.
in 'Nucleic Acid Chemistry', part 1, eds. Townsend, L. and Tipson, R.
Wiley-Interscience, p 227 (1978)
- 146) Sung, W. L.
J. Org. Chem. 47, 3623 (1982)
- 147) Xu, Y.-Z.; Zheng, Q.; Swann, P. F.
J. Org. Chem. 57, 3839 (1992)
- 148) Li, B. F. L.; Reese, C. B.; Swann, P. F.
Biochemistry 26, 1086 (1987)
- 149) Reese, C. B.; Ubasawa, A.
Tetrahedron Lett. 21, 2265 (1980)
- 150) Kim, C.-H.; Marquez, V. E.; Broder, S.; Mitsua, H.; Driscoll, J. S.
J. Med. Chem. 30, 862 (1987)
- 151) Divakar, K. J.; Reese, C. B.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1171 (1982)
- 152) Sung, W. L.
J. C. S. Chem. Commun. 1089 (1981)
- 153) Paquet, A.
Can. J. Chem. 60, 976 (1982)
- 154) Leikauf, E.
Diplomarbeit, Universität Hamburg 80 (1988)
- 155) Hudson, D.
J. Org. Chem. 53, 617 (1988)
- 156) Benoiton, N. L.; Chen, F. M.
Can. J. Chem. 59, 384 (1981)

- 157) Barany, G.; Merrifield, R.
In: The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology; Groß, E.; Meienhofer, J.;
Eds.; Academic: New York 1980, Vol. 2A, 123
- 158) Ohno, K.; Nishiyama, H.; Nagase, H.
Tetrahedron Lett. 45, 4405 (1979)
- 159) Johnstone, R. A. W.; Rose, M. E.
Tetrahedron 35, 2169 (1979)
- 160) Corey, E. J.; Gras, J. L.; Ulrich, P.
Tetrahedron Letters 11, 809 (1976)
- 161) Cannellakis, E.S.; Gottesmann, M. E.; Kamman, H. O.
Biochim. Biophys. Acta 39, 82 (1960)
- 162) Preiss, J.; Dieckmann, M.; Berg, P.
J. Biol. Chem. 236, 1748 (1961)
- 163) Sarfati, S. R.; Pochet, S.; Guerreiro, C.; Namane, A.; Huynh-Dinh; T.; Igolen, J.
Tetrahedron 43, 3491 (1987)
- 164) Eckstein, F.; Goody, R. S.
Biochemistry 15, 1685 (1976)
- 165) Hoard, D. E.; Ott, D. G.
J. Am. Chem. Soc. 87, 1785 (1965)
- 166) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T.
Bull. Chem. Soc. Japan 42, 3505 (1969)
- 167) Ludwig, J.
Acta Biochim. Et Biophys. Acad. Sci. Hung. 16, 131 (1981)
- 168) Ruth, J. L.; Cheng, Y.-C.
Molecular Pharmacology 20, 415 (1981)
- 169) Ludwig, J.; Eckstein, F.
J. Org. Chem. 54, 631 (1989)
- 170) Susanne Jahneke
Diplomarbeit, Universität Hamburg (1992)
- 171) Tong, X.; Smith, L. M.
Anal. Chem. 64, 2672 (1992)
- 172) Jurinke, C.; Zöllner, B.; Feucht, H.-H.; v.d.Boom, D.; Jacob, A.; Polywka, S.; Köster, H.
Gen. Anal. 14, 97 (1998)

- 173) Tang, K.; Fu, D.; Kötter, S.; Cotter, R. J.; Cantor, C. R.; Köster, H.
Nucleic Acids Res. 23, 3126 (1995)
- 174) Jurinke, C.; v.d.Boom, D.; Collazo, V.; Lüchow, A.; Jacob, A.; Köster, H.
Anal. Chem. 69, 904 (1997)
- 175) Kötter, S.
Diplomarbeit, Universität Hamburg (1995)
- 176) Tabor, S.; Richardson, C. C.
J. Biol. Chem. 265, 8322 (1990)
- 177) Hu, G.
DNA Cell Biol. 12, 763 (1993)
- 178) Clark, J. M.
Nucleic Acids Res. 16, 9677 (1988)
- 179) Mizusawa, S.; Nishimura, S.; Seela, F.
Nucleic Acids Res. 22, 3866 (1986)
- 180) Kirpekar, F.; Nordhoff, E.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Hahner, S.; Hillenkamp, F.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 525 (1995)
- 181) Lecchi, P.; Pannell, L. K.
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6, 972 (1995)
- 182) Little, , D. P. et al.
Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 169/170, 133 (1997)
- 183) Coull, J.; Weith, H. L.; Bischoff, R.
Tetrahedron Lett. 27, 3391 (1986)
- 184) Olejnik, J.; Krzymanska-Olejnik, E.; Rothschild, K. J.
Nucleic Acids Res. 26, 3572 (1998)
- 185) Haff, L. A.; Smirnov, I. P.
Nucleic Acids Res. 25, 3749 (1997)
- 186) Sucharda, E.
Ber. 58, 1727 (1925)
- 187) Sephadex LH 20, Chromatography in organic solvents,
Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala (1991)
- 188) Cooper, T. G.
Biochemische Arbeitsmethoden, New York: de Gruyter 1981

- 189) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.
Molecular Cloning, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.39 ff (1989)
- 190) Nordhoff, E.; Ingendoh, A.; Overberg, A.; Stahl, B.; Karas, M.; Hillenkamp, F.;
Crain, P.F.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 6, 771 (1992)