

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).