

V Zusammenfassung

Bei Untersuchungen von Oligonukleotiden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie stellt die mit steigender Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente abnehmende Massenauflösung und Massengenauigkeit den limitierenden Faktor dar, ausgelöst durch die Adduktbildung des ionisierten DNA-Fragmentes und Fragmentierungsreaktionen wie zum Beispiel die Depurinierung.

Die bisher zur Verhinderung der Depurinierung verwendeten 7-Deazamodifizierten DNA-Fragmente besitzen den entscheidenden Nachteil, daß Restriktionsendonukleasen nicht mehr in der Lage sind, sie zu spalten, da das N-7-Stickstoffatom an der Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz beteiligt ist. Diese Enzyme spielen jedoch in der DNA-Diagnostik und in molekularbiologischen Techniken eine bedeutende Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Synthese eines 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates **50** (dA*TP) durch den Aufbau des Ringsystems an der geschützten Ribose, eine 2'-Desoxygenierung und eine Umwandlung des 2'-Desoxynukleosids in das entsprechende 2'-Desoxynukleosid-5'-O-triphosphat entwickelt. Dieses Molekül, welches eine C-glykosidische Bindung und ein Sauerstoffatom in Position 7 besitzt, sollte von DNA-Polymerasen akzeptiert werden und zu DNA-Fragmenten führen, die sowohl eine erhöhte Stabilität im Sinne der massenspektrometrischen Analyse aufweisen als auch von Restriktionsendonukleasen gespalten werden.

Die Darstellung des 7,9-Dideaza-7-oxoadenosins **11** gelang in einer neunstufigen linearen Synthese durch den Aufbau des modifizierten Ringsystems an der freien 1-OH-Gruppe einer ansonsten vollständig geschützten Ribose und die abschließende Entschützung der Hydroxylfunktionen mit einer Ausbeute von insgesamt 5,87 % über alle Schritte.

Nachdem die vierstufige Desoxygenierung der 2'-OH-Gruppe sowohl an Uridin als auch an Adenosin erfolgreich getestet worden war, wurde das modifizierte Nukleosid **11** desoxygeniert und das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** in 43,5 %iger Ausbeute erhalten.

Eine probeweise durchgeführte Triphosphatsynthese von 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** unter Verwendung von ungeschütztem 2'-Desoxyadenosin **26** als Ausgangsmaterial war nicht erfolgreich und führte zu der Erkenntnis, daß das 2'-Desoxynukleosid vor der Triphosphatsynthese in das entsprechende N⁶-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxynukleosid umgewandelt werden mußte.

Die Darstellung von N⁶-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **39** verlief am erfolgreichsten, wenn zuerst die exozyklische Aminofunktion nach der Methode der Peracylierung mit abschließender selektiver Verseifung protektiert wurde. Anschließend wurde die 5'-OH-Gruppe temporär mit Dimethoxytritylchlorid geschützt, die 3'-Hydroxylfunktion mit Methoxyessigsäureanhydrid **35**, welches durch Umsetzung von Methoxyessigsäure mit Dicyclohexylcarbodiimid gewonnen worden war, verestert und abschließend die 5'-OH-Gruppe wieder entschützt. Die Ausbeute dieser fünfstufigen Synthese lag dann bei 27 %.

Im Rahmen der Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein wurde das geschützte 2'-Desoxynukleosid unter Verwendung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on und Bis(tri-*n*-butylamin)pyrophosphat, der Entschützung der exozyklischen Aminofunktion und der 3'-OH-Gruppe in das Triphosphat umgewandelt und abschließend durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die probeweise durchgeführte Synthese von 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** gelang in 30 %iger Ausbeute, die vierstufige Darstellung von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** in 44,7 %iger Ausbeute.

Insgesamt wurde 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** in einer zweiundzwanzigstufigen, linearen Synthese mit einer Ausbeute von 0,3 % hergestellt. Die Synthese erfolgte, um ein Nukleosidtriphosphat zu entwickeln, welches als Grundvoraussetzung von DNA-Polymerasen in enzymatischen Tests akzeptiert werden konnte, welches dann aber vor allem zu DNA-Fragmenten führen sollte, die trotz Modifikation von Restriktionsendonukleasen gespalten werden und die nicht so leicht der Depurinierung unterliegen.

Im biochemischen Teil dieser Arbeit wurde das modifizierte Triphosphat **50** daher zuerst exemplarisch in PROBE-Reaktionen (**P**rimers **O**ligo **B**ase **E**xtension) eingesetzt. Hiermit konnte die Inkorporation in einen DNA-Strang mittels MALDI-TOF und die Verwendbarkeit des Nukleosid-5'-O-triphosphates **50** für enzymatische Reaktionen nachgewiesen werden.

Anschließend wurden 10 verschiedene DNA-Polymerasen auf ihre Inkorporationsfähigkeit in bezug auf das modifizierte 2'-Desoxynukleosid-5'-O-triphosphat **50** an einem bestehenden PCR-System mit einem kurzen DNA-Abschnitt als Template untersucht. Die Hälfte der getesteten thermostabilen DNA-Polymerasen - nämlich *ThermoSequenase*, (exo-) *DeepVent*, (exo-) *Vent*, *Ultma* und *Pwo* - waren in der Lage, die Modifikation gut einzubauen.

In den nächsten Versuchen wurden (exo-) *DeepVent*, (exo-) *Vent*, *ThermoSequenase* und *Pwo* auf ihre Einbaufähigkeit für das modifizierte 2'-Desoxynukleosid-5'-O-triphosphat **50** bzw. die Schnelligkeit der Inkorporation in bezug auf steigende Templatelängen unter Beibehaltung der PCR-Bedingungen hin untersucht. Dazu wurden durch geeignete Primer/Template-Systeme doppelsträngige DNA-Fragmente von 121 bis 729 Basenpaaren dargestellt. Die Versuche wurden parallel mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50**, 2'-Desoxy-7-deazaadenosin-5'-O-triphosphat und 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat durchgeführt. Bei Verwendung des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates **50** konnten ein 121mer und 122mer von (exo-) *DeepVent*, (exo-) *Vent* und *Pwo* - nicht aber von *ThermoSequenase* -, ein 391mer und ein 729mer nur noch von *Pwo* gut amplifiziert werden. Die so gewonnenen doppelsträngigen DNA-Abschnitte enthielten an allen Positionen in der Sequenz - mit Ausnahme der kurzen Primersequenzen - anstelle des 2'-Desoxyadenosins das modifizierte Desoxynukleosid.

Nachdem mit *Pwo* eine thermostabile DNA-Polymerase gefunden worden war, die das modifizierte Nukleosidtriphosphat **50** sehr gut inkorporierte, wurden an den doppelsträngig mit dA*TP **50** oder mit c⁷dATP modifizierten oder den mit natürlichem dATP hergestellten 121meren und 122meren Restriktionsexperimente unter Verwendung von sechs Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Restriktionsendonuklease *Sma* I, welche kein A in der Erkennungssequenz enthält, schnitt alle untersuchten DNA-Abschnitte. Mit *Alu* I gelang die Spaltung der unter Verwendung von dATP oder dA*TP **50** hergestellten DNA-Abschnitte, während die mit c⁷dATP amplifizierten DNA-Abschnitte nicht geschnitten wurden.

Außerdem war *Hind* III in der Lage, das mit dA*TP 50 hergestellte 122mer partiell zu spalten. Aus diesen Vergleichen ging hervor, daß unter Verwendung von dA*TP 50 hergestellte DNA-Fragmente besser von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden als unter Einsatz von c^7 dATP amplifizierte DNA-Abschnitte.

Um die Auswirkung der Modifikationsinkorporation auf die Restriktionsendonukleasen weiter zu untersuchen, wurde ein doppelsträngiges DNA-Fragment, bei welchem nur ein Strang mit dA*TP 50 modifiziert war, synthetisiert. Von den vier getesteten Restriktions-endonukleasen waren *Alu* I und *Bam*H I dazu in der Lage, den Heteroduplex vollständig zu schneiden, während *Hind* III die Spaltung beider Stränge des Heteroduplexes nur partiell gelang. Beim Einsatz von *Eco*R I konnte beobachtet werden, daß teilweise beide Stränge des Heteroduplexes geschnitten und teilweise nur der unmodifizierte Strang genickt wurde. Insgesamt wurde der nur einzelsträngig modifizierte Doppelstrang wesentlich besser gespalten als das doppelsträngig modifizierte PCR-Produkt.

Nach den Restriktionsexperimenten wurde die Stabilität von DNA-Abschnitten, die durch dA*TP 50 oder c^7 dATP modifiziert worden waren, im Vergleich zu natürlichen DNA-Fragmenten untersucht. Dazu wurde ein Poly-T-Primer durch Zugabe von dATP oder c^7 dATP oder dA*TP 50 verlängert. Mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie konnte bei erhöhter Laserenergie gezeigt werden, daß sowohl mit dA*TP 50 als auch mit c^7 dATP deutlich weniger Depurinierungsprodukte zu beobachten waren als beim Einsatz des natürlichen Nukleosidtriphosphates.

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein modifiziertes Nukleosidtriphosphat 50 synthetisiert und in biochemische Experimente eingesetzt. Mittels gezielter Tests wurde gezeigt, daß die an die Modifikation gestellten Erwartungen, nämlich die Amplifikation von DNA-Abschnitten, die eine erhöhte Stabilität gegenüber der Depurinierung aufweisen und von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden können, erfüllt wurden.

VI Summary

Today MALDI-TOF analysis of DNA is still limited by the decrease of mass accuracy and mass resolution with increasing length of the nucleic acid. The achievable mass resolution is reduced by adduct formation of the ionized DNA fragment and by fragmentations such as depurination.

7-Deaza-modified DNA fragments, which are used to prevent depurination, have the disadvantage of not being cleaved by restriction endonucleases, because the N-7 nitrogen atom is involved in the base specific recognition of the DNA sequence.

This thesis documents the synthesis of a 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50** (dA*TP) by constructing the corresponding hetero cycle at the protected ribose ring, followed by 2'-deoxygenation and transformation of the 2'-deoxynucleoside into the corresponding 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate. This molecule, which possesses a C-glycosidic bond and an oxygen in position 7, should be accepted by DNA polymerases and restriction endonucleases and should lead to DNA fragments exhibiting increased stability for the purposes of MALDI-TOF mass spectrometry.

Preparation of 7,9-dideaza-7-oxoadenosine **11** was achieved by a linear nine-step synthesis via a modified ring system at the nonprotected 1-hydroxyl group of an otherwise fully protected D-ribose ring and the subsequent deprotection of the hydroxyl functions in 5.87 % overall yield.

The four-step deoxygenation of the 2'-hydroxyl group was first tested with uridine and adenosine. With that experience the modified nucleoside **11** was deoxygenated and the 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine **32** was obtained in 43.5 % yield.

The triphosphate synthesis of 2'-deoxyadenosine-5'-O-triphosphate **47** using the unprotected 2'-deoxyadenosine **26** as starting material proved unsuccessful, and lead to the conclusion that the 2'-deoxynucleoside must be transformed into the N⁶-benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-deoxynucleoside before the triphosphate synthesis.

Preparation of N⁶-benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine **39** proceeded most successfully upon initial protection of the exocyclic amino function of the modified 2'-deoxynucleoside via peracylation followed by selective saponification. The 5'-OH group was subsequently protected with dimethoxytritylchloride, the 3'-hydroxyl function was esterified with methoxyacetic acid anhydride **35**, which was obtained via treatment of methoxyacetic acid with dicyclohexylcarbodiimide, and finally the 5'-OH group was deprotected. The resulting product was obtained after five steps in 27 % overall yield.

Within the framework of the triphosphate synthesis of Ludwig and Eckstein, the protected 2'-deoxynucleoside was converted into the triphosphate by use of 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one and bis(tri-*n*-butylamino)pyrophosphate, deprotection of the exocyclic amino function and of the 3'-OH group, followed by purification via ion exchange chromatography. The analogous four-step conversion of 2'-deoxyadenosine into 2'-deoxyadenosine-5'-O-triphosphate **47** succeeded with 30 % yield and 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50** was obtained in 44.7 % overall yield.

The final product, 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50**, was obtained after a twenty-two-step linear synthesis in 0.3 % overall yield. The synthesis was carried out to develop a nucleoside triphosphate, that is a substrate for DNA polymerases and restriction endonucleases and that is more stable against depurination.

In the biochemical part of this thesis, the modified triphosphate **50** was first used in a PROBE-reaction (Primer Oligo Base Extension). The successful incorporation into a DNA strand has proven that the modified 2'-deoxynucleoside triphosphate **50** is a substrate for a primer extension reaction as verified by MALDI-TOF mass spectrometry.

Subsequently, the incorporation of the modified 2'-deoxynucleoside triphosphate **50** with ten different DNA polymerases on a well known PCR system with a short template was tested. Half of the thermostable DNA polymerases examined were able to incorporate the modified deoxyadenosine triphosphate **50**.

In follow-up experiments, the ability of the modified nucleoside triphosphate **50** to be incorporated and the speed of incorporation with respect to the increasing length of the template under standard PCR conditions were investigated. To this end, double-stranded DNA fragments with 121 to 729 basepairs have been prepared via suitable primer/template systems. The experiments with 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50**, 2'-deoxy-7-deazaadenosine-5'-O-triphosphate and 2'-deoxyadenosine-5'-O-triphosphate were performed in parallel. In the case of 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50**, a 121mer and a 122mer could be amplified with (exo-)*DeepVent*, (exo-)*Vent* and *Pwo* but not with *ThermoSequenase* and a 391mer and a 729mer could only be obtained with *Pwo*. The double-stranded DNA fragments generated contained the modified nucleoside instead of deoxyadenosine in every position of the sequence, with the exception of the short primer sequences.

Since the thermostable *Pwo* DNA polymerase incorporates the modified nucleoside triphosphate **50** very successfully, restriction experiments were performed using six restriction endonucleases on double-stranded 121 and 122mer DNA fragments, which were produced with dA*TP **50**, c⁷dATP or dATP. The restriction endonuclease *Sma* I, which contains no A in the recognition sequence, cuts all DNA sections examined. The cleavage of DNA fragments that were obtained using dATP or dA*TP **50** was successful with *Alu* I, whereas c⁷dATP-amplified DNA was not cleaved. In addition *Hind* III was able to partially cleave the 122mer generated by the use of dA*TP **50**. From this observation it follows that dA*TP-prepared DNA was more easily cleaved by restriction endonucleases than the c⁷dATP-amplified DNA.

To further investigate the effect of modifications upon restriction endonucleases, a double-stranded DNA fragment was synthesised, in which only one strand was modified with dA*TP **50**. Of the four restriction endonucleases tested, *Alu* I and *Bam*H I were able to totally cleave the heteroduplex, whereas *Hind* III only partially succeeded in splitting both strands of the heteroduplex. It could be shown that *Eco*R I cleaved both strands of the heteroduplex in some molecules, while in others only the unmodified strand was nicked. In general, the double strands modified in only one strand could be cleaved much more easily than the double-stranded PCR products in which both strands were modified.

After the restriction experiments, the stability of DNA fragments modified by dA*TP **50** or c⁷dATP in comparison with the natural DNA sequence was examined. To this end, a poly-T-primer was elongated via addition of dATP, c⁷dATP or dA*TP **50**. MALDI-TOF mass spectrometry with increasing laser energy showed that depurination was significantly lower where dA*TP **50** or c⁷dATP was used instead of dATP.

Within the framework of this thesis, a modified 2'-deoxynucleoside triphosphate was synthesised and used in biochemical experiments. The hypotheses suggesting that the modification of DNA fragments, *i.e.*, their amplification, would increase their stability against depurination and allow the modified fragments to be cleaved by restriction endonucleases could be confirmed.