

Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften des Fachbereichs
Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Verena Collazo

Hamburg 2001



Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Köster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. Voss

Disputation: 08.02.2002

Die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Januar 1996 bis März 2001 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Köster am Institut für Organische Chemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg sowie bei der Firma Sequenom GmbH, Hamburg, durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Hubert Köster danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine inspirierenden Visionen.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das stets freundschaftliche Klima der Zusammenarbeit.

Der Mensch muss bei dem Glauben verharren,
dass das Unbegreifliche begreiflich sei,
er würde sonst nicht forschen.
Johann Wolfgang von Goethe

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	DEN GENEN AUF DER SPUR	1
1.2	DIE WACHSENDE BEDEUTUNG DER DNA-ANALYTIK UND IHRE GRENZEN	3
1.3	DIE MASSENSPEKTROMETRIE IN DER NUCLEINSÄURE-ANALYTIK	5
1.3.1	Entwicklung massenspektrometrischer Verfahren zur Analyse von Nucleinsäuren	5
1.3.2	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)	6
1.4	EINSATZMÖGLICHKEITEN DER MALDI-TOF MS IN DER DNA-ANALYTIK	9
1.4.1	Neuere Entwicklungen in der klinischen Diagnostik	9
1.4.2	Ansätze zur DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS	10
1.4.3	Das Prinzip der reversen Sanger Sequenzierung	13
2	Problemstellung	19
3	Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS	23
3.1	REVERSE SANGER SEQUENZIERUNG AM CFTR-MODELLSYSTEM	23
3.1.1	Amplifizierung des CFTR-Modellsystems mittels PCR	23
3.1.2	Aufreinigung biotinylierter DNA an der Festphase	24
3.1.3	Gesamtkonzept zur Sequenzierung immobilisierter Templates	26
3.1.4	Die Polymerasekettenreaktion	28
3.1.4.1	Reaktionsführung	29
3.1.4.2	MALDI-TOF Analyse der PCR-Produkte	31
3.1.5	Exonuclease III-Reaktion am immobilisierten PCR-Produkt	34
3.1.5.1	Optimierung der Probenkonditionierung für die MALDI-TOF Analyse	36
3.1.5.2	Vollständige Sequenzierung des PCR-Produktes mittels MALDI-TOF MS	43
3.1.5.3	Sequenzierung von genomischer DNA	50
3.2	REVERSE SANGER SEQUENZIERUNG AM β -ACTIN-SYSTEM	52
3.2.1	Das Konzept zur Einzelstrangsequenzierung am β -Actin-System	52
3.2.2	Versuche zur Sequenzierung am immobilisierten Template	55
3.2.2.1	Amplifizierung des doppelsträngigen 160-mers	55
3.2.2.2	Primer Extension Reaktion	56

4	Massenmodifizierte Nucleotide für die reverse Sanger Sequenzierung.....	59
4.1	ALLGEMEINE ANFORDERUNGEN AN MODIFIZIERTE NUCLEOTIDE.....	59
4.1.1	Modifizierung der Riboseeinheit.....	60
4.1.2	Modifizierung der Base.....	63
4.2	WAHL GEEIGNETER NUCLEOTIDE FÜR DEN MASSENAUSGLEICH.....	64
4.3	CHEMISCHE SYNTHESE EINES MASSENMODIFIZIERTEN TRIPHOSPHATES.....	67
4.3.1	Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat nach Shirokova.....	67
4.3.2	Versuch zur Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat nach Eckstein.....	69
5	Suche nach geeigneten Polymerasen.....	71
5.1	PRIMER EXTENSION ASSAY.....	71
5.2	POLYMERASEKETTENREAKTION.....	79
5.2.1	PCR mit massenmodifizierten Nucleotiden.....	80
5.2.2	Kombinierter Einsatz von massenmodifizierten dNTPs und α -Thio-Terminatoren in der PCR.....	84
5.2.3	Analyse massenmodifizierter PCR-Produkte mittels MALDI-TOF MS.....	86
6	Reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich.....	91
6.1	FESTPHASENSEQUENZIERUNG MIT EXONUCLEASE III	91
6.1.1	Die C-Reaktion mit 5-OH-dCTP oder 2-S-dCTP zum Massenausgleich.....	91
6.1.2	Die T-Reaktion mit 2-S-dTTP zum Massenausgleich.....	98
6.2	SEQUENZIERUNG MIT EXONUCLEASE III IN LÖSUNG.....	103
7	Diskussion.....	107
8	Zusammenfassung.....	115
9	Summary.....	119
10	Experimenteller Teil.....	121
10.1	ALLGEMEINE HINWEISE.....	121
10.1.1	Geräte und Methoden.....	121
10.1.2	Chemikalien.....	123
10.2	BIOCHEMISCHE REAKTIONEN.....	125
10.2.1	Materialien.....	125
10.2.1.1	Enzyme und DNA.....	125

10.2.1.2 Pufferlösungen und Chemikalien.....	126
10.2.1.3 Oligonucleotide.....	128
10.2.2 Allgemeine Methoden.....	129
10.2.2.1 Gelelektrophorese.....	129
10.2.2.2 Das Streptavidin-Biotin-Festphasensystem	132
10.2.2.3 Ethanolpräzipitation.....	134
10.2.2.4 Ultrafiltration.....	134
10.2.2.5 MALDI-TOF MS Probenvorbereitung.....	135
10.2.3 PCR.....	135
10.2.3.1 PCR am CFTR-System.....	135
10.2.3.2 PCR am β -Actin-System.....	140
10.2.4 Primer Extension Reaktionen.....	141
10.2.4.1 Polymerase Extension Reaktion am β -Actin-Template.....	141
10.2.4.2 Polymerase Extension Assay.....	142
10.2.5 Reverse Sanger Sequenzierung am CFTR-System.....	144
10.2.5.1 Exonuclease III-Reaktion an den Festphasenbeads.....	144
10.2.5.2 Untersuchung von PCR-Produkten mittels MALDI-TOF MS.....	146
10.2.5.3 Exonuclease III-Reaktion an PCR-Produkten in Lösung	147
10.2.6 Konventionelle Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS.....	147
10.3 CHEMISCHE SYNTHESSEN.....	149
10.3.1 Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat nach Shirokova und Yoshikawa.....	149
10.3.1.1 5'-Acetylthio-5'-desoxythymidin <u>2</u>	149
10.3.1.2 5'-Thio-5'-desoxythymidin <u>3</u>	150
10.3.1.3 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat <u>5</u>	150
10.3.2 Versuch zur Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S- Triphosphat nach Eckstein.....	152
10.3.2.1 5'-Tosyl-5'-desoxythymidin <u>6</u>	152
10.3.2.2 5'-Tosyl-5'-desoxythymidin-5'-S-monophosphat <u>7</u>	153
11 Anhang	155
11.1 MASSENTABELLEN.....	155
11.2 GEFÄHRSTOFFANHANG.....	159
12 Literaturverzeichnis	161

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung (NMR)
α -S-dNTP	α -Thio-2'-desoxynucleosid-5'-triphosphat
μ l	Mikroliter
2-S-dCTP	2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat
2-S-dTTP	2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
5'-S-dTTP	5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat
5-OH-dCTP	5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat
A	Adenosin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolutiert
<i>Alu</i>	<i>Atrthrobacter luteus</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B/W	<i>Binding and Wash</i>
Bio	Biotinyl-
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytidin, 2'-Desoxycytidin
CDCl ₃	deutertes Chloroform
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat, Thymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
Et ₃ N	Triethylamin
EtBr	Ethidiumbromid (5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid)
EtOH	Ethanol
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
G	Guanosin, 2'-Desoxyguanosin
g	Gramm
IV	

IR	Infrarot
keV	Kiloelektronenvolt
M	Molmasse (mol/l)
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
MPC	<i>Magnetic Particle Collector</i> TM
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NMWG	Nominale Molekulargewichtsausschlussgrenze
nt	Nucleotide
Oligo	Desoxyoligoribonucleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PROBE	<i>primer oligonucleotide base extension</i>
RF	Replikative Form
R _F -Wert	<i>ratio of fronts</i> (Retentionsfaktor)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonucleinsäure)
sek	Sekunden
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
T	Thymin, 2'-Desoxythymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEAB	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
<i>ThermoSequenase</i>	In E.coli klonierte und exprimierte DNA Polymerase
TOF	<i>time-of-flight</i> (Flugzeitanalysator)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivität)
USP	Universeller Sequenzierprimer
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen zu Volumen

1 Einleitung

1.1 Den Genen auf der Spur

„The human genome underlies the fundamental unity of all members of the human family, as well as the recognition of their inherent dignity and diversity. In a symbolic sense, it is the heritage of humanity.“

Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights

Die Nachricht erregte nicht nur die Aufmerksamkeit der Fachwelt: Das menschliche Genom ist entschlüsselt^[1, 2] und enthält weniger Gene als gedacht.

Auf den ersten Blick mag es enttäuschen, was da über das menschliche Erbgut offenbar wird: Aus Füllmaterial besteht es vor allem; und Gene finden sich allenfalls 40 000 darin. Dabei ging man noch 1999 bei der Entschlüsselung des ersten menschlichen Chromosoms^[3] (Chromosom 22) von bis zu 140 000 Genen im menschliche Erbgut aus.

Doch mit der Sequenzierung von nun 90 bis 95 Prozent der rund 3,2 Milliarden Basenpaare wird klar: Der Mensch hat gerade mal doppelt so viele Erbanlagen wie eine Fruchtfliege (ca. 13 000) und kaum mehr als eine Pflanze (ca. 26 000). In weniger als 2 Prozent seiner Erbmasse finden sich Gene, die Proteine exprimieren; der Rest besteht zum Großteil aus Wiederholungen einiger weniger Basensequenzen, deren Aufgabe man noch nicht kennt. Zudem sind die Gene des Menschen im Vergleich zu denen von Wurm oder Fliege fast bis zur Unkenntlichkeit zerstückelt – so als würde ein Spielfilm nach jedem kurzen Dialog von stundenlangen Werbepausen unterbrochen. Darüber hinaus teilt der Mensch sich die allermeisten Gene mit anderen Organismen; etwas Besonderes ist sein Erbgut nur in wenigen Bereichen.

Zu diesem Schluss kommen die beiden konkurrierenden Arbeitsgruppen, die sich in den vergangenen Jahren mit der Dechiffrierung des menschlichen Erbguts befassten: die aus öffentlichen Forschungsgeldern finanzierte „Human Genome Organization“^[4,5,6] (HUGO), zu der sich ein internationales Wissenschaftlerkonsortium zusammengeschlossen hat, und die US-Firma „Celera Genomics“^[7]. Beide nun veröffentlichten Versionen des menschlichen Genoms sind jedoch als Rohdaten anzusehen; 94 Prozent der Sequenz sind bislang in den öffentlichen Datenbanken zugänglich^[8]. Noch gibt es Lücken und fehlerhafte Stellen. Die

Fehlerrate liegt bei einem Fehler auf 1000 bis 10 000 Basenpaaren. Dies entspricht im schlechteren Fall in etwa der Differenz in der Sequenz zweier Individuen zueinander.

Tatsächlich ist von den meisten Genen noch kaum bekannt, welche Bedeutung ihre Sequenz hat, d.h. welche biochemischen Aufgaben die Proteine nach ihrer Expression via Transkription und Translation im Körper übernehmen. Mit der Aufklärung vieler prokaryotischer und eukaryotischer Genome, und schließlich mit dem Vorliegen eines Grundrisses für das menschliche Erbgut, werden Ansätze zur Erforschung von Protein-Funktionen und Protein-Protein-Interaktionen (Proteomics) zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Organismus	Jahr	Sequenzierte Basen (in Millionen)	Insgesamt sequenzierte Menge (%)	Sequenzierte Gen-reiche Bereiche (Euchromatin) (%)	Vorher-gesagte Anzahl an Genen	Anzahl Gene pro Million sequenzierte Basen
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	1996	12	93	100	5 800	483
<i>Caenorhabditis Elegans</i>	1998	97	99	100	19 099	197
<i>Drosophila Melanogaster</i>	2000	116	64	97	13 601	117
<i>Arabidopsis Thaliana</i>	2000	115	92	100	25 498	221
Humanes Chromosom 21	2000	34	75	100	225	7
Humanes Chromosom 22	1999	34	70	97	545	16
Humanes Genom (Rohsequenz) öffentl. Sequenz	2001	2 693	84	90	31 780	12
Humanes Genom (Rohsequenz) Celera-Sequenz	2001	2 654	83	88-93	39 114	15

Tabelle 1-A^[1]: Bisher sequenzierte eukaryotische Genome. Der insgesamt sequenzierten Menge an Basen liegt ein Schätzwert für die Gesamtgröße des untersuchten Genoms zugrunde; der Wert beinhaltet auch gen-arme, hochrepetitive Regionen eines Genoms (Heterochromatin), die ursprünglich durch Färbetechniken charakterisiert wurden. Alle Zahlen können ständig leichten Veränderungen unterliegen, da die Sequenzierungsarbeiten noch nicht abgeschlossen sind.

Die Zerstückelung der einzelnen Gene im menschlichen Genom sorgt auch dafür, dass das fernste Ziel des HUGO-Projekts – eine Kartierung aller menschlichen Gene – vermutlich erst

in einigen Jahren erreicht sein wird. Doch auch eine Genbibliothek ist nur ein Teilerfolg. Wichtiger ist die Erforschung der einzelnen Funktionen aller Gene und ihres Zusammenspiels im Körper.

Die geringe Zahl an Genen vereinfacht hierbei die Suche nach neuen Therapien genetisch bedingter Krankheiten nicht: Nach den bisherigen Analysen besteht die Besonderheit des menschlichen Genoms darin, dass ein Gen im Durchschnitt drei Proteine hervorbringt, von denen jedes wiederum mehrere Aufgaben übernehmen kann, während die Proteine niedriger Spezies nur eine einzige Funktion erfüllen. Gerade die geringe Menge an Informationsträgern macht die Komplexität unseres Erbguts aus. Durchaus möglich ist auch, dass in dem früher „junk-DNA“ genannten Füllmaterial Informationen versteckt sind, die bislang niemand zu deuten vermag.

1.2 Die wachsende Bedeutung der DNA-Analytik und ihre Grenzen

Das Verständnis des menschlichen Genoms verspricht, die Medizin auf eine völlig neue Basis zu stellen, in der zielgerichtete Ansätze für Vorbeugung, Diagnose und Behandlung einer Großzahl von Erkrankungen möglich werden. Nahezu 4000 genetisch bedingte Krankheiten des Menschen sind inzwischen bekannt^[9], von denen viele auf Mutationen, d.h. Veränderungen der DNA-Sequenz durch Nucleotiddeletion, –insertion oder –austausch (Punktmutation) zurückzuführen sind. Neben Krankheiten wie Sichelzellenanämie^[10], Duchenne-Muskeldystrophie^[11] oder Cystischer Fibrose (Mukoviszidose^[12,13]), deren genetische Defekte durch Mutation auf einem bestimmten Gen lokalisiert sind, gibt es auch komplexe Krankheiten wie Asthma^[14,15], Diabetes^[16], Alzheimer^[17] und nicht zuletzt Krebs^[18,19], die zumindest teilweise durch Fehler oder Veränderungen in der DNA-Sequenz ausgelöst werden. Welche genaue Rolle die Gene dabei spielen oder wieviele Gene beteiligt sind, ist jedoch noch unklar. Die Entschlüsselung der Sequenz des menschlichen Genoms markiert demnach für das Genomprojekt den Beginn der sich anschließenden zweiten Phase, mit dem Ziel der Aufklärung pathogenetischer Prozesse bei Menschen und Modellorganismen, verbunden mit der kosteneffizienten Entwicklung und Nutzung von High-Throughput-Technologien zur systematischen Analyse von genetischen Variationen in Genomen und Genen ("High Throughput Functional Genomics")^[20].

Die Biomedizinische Diagnostik, z.B. in der Krebsforschung, nutzt die heute zugänglichen Sequenzinformationen aus DNA-Datenbanken, und hat mit Hilfe der vergleichenden Erbgut-Analyse in kleinerem Maßstab bereits Auffälligkeiten in den Genen von Tumorzellen gefunden. In vielen Bereichen der genetischen Diagnostik ist eine vollständige Sequenzierung des jeweils betroffenen DNA-Abschnitts dabei gar nicht erforderlich. Für einfache „ja-oder-nein“-Antworten über die An- bzw. Abwesenheit bekannter Mutationen ist ein Screening der DNA mit entsprechenden Assays zumeist ausreichend. Beispiele hierfür sind der genetische Fingerabdruck^[21,22], der z.B. bei Vaterschaftsbestimmungen oder in der forensischen Wissenschaft^[23-25] zum Standardrepertoire gehört, oder diagnostische Verfahren, die Viren oder andere infektiöse Mikroorganismen aufgrund ihrer spezifischen Sequenzen, die sich von denen des Trägerorganismus unterscheiden, aufspüren können^[26,27].

Gerade in der Krebsforschung könnte ein einfaches Screening der Sequenz nach Ähnlichkeiten zu bekannten Oncogenen wegen der großen Varianz der entarteten Zellen jedoch nicht ausreichen. Da viele komplexe Krankheiten auf mehreren Veränderungen der Nucleotidsequenz – teilweise lokalisiert in verschiedenen Genen – beruhen, wird in vielen Fällen die Sequenzierung des betroffenen Gens oder sogar mehrerer Genkombinationen notwendig sein^[28,29]. Bei der Suche nach genetisch bedingten Krankheitsursachen wird die *diagnostische de novo*-DNA-Sequenzierung daher zunehmend an Bedeutung gewinnen. In diesem Bereich sind jedoch kurze Leselängen von nur 50 nt zur Sequenzbestimmung ausreichend. Statistische Berechnungen zeigen, dass bereits eine Sequenz von 17 nt im menschlichen Genom einzigartig und somit charakteristisch für den jeweiligen Genabschnitt ist.

Mit den konventionellen, auf Gelelektrophorese basierenden Sequenziertechniken ist die Bewältigung des großen Umfangs an zu analysierender DNA in den kommenden Jahren kaum mit dem nötigen hohen Probendurchsatz in einer angemessenen Zeit zu bewältigen. Die Vielzahl möglicher Anwendungen macht die Entwicklung schnellerer und effektiverer Verfahren zur DNA-Analytik notwendig. Während jedoch bei der *de novo*-DNA-Sequenzierung lange Leselängen ein wichtiges Kriterium stellen, sind in der klinischen DNA-Diagnostik neben Schnelligkeit und Kosteneffizienz vor allem ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, Genauigkeit sowie Anpassungsfähigkeit auf die jeweilige analytische Problemstellung relevant.

Alle derzeit etablierten Verfahren zur DNA-Sequenzierung basieren auf der automatisierten gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente. Der Nachweis der DNA kann dabei durch Markierung der Fragmente mittels Radioaktivität^[18], Fluoreszenz^[30,31] oder Chemilumineszenz^[32] erfolgen. Um nicht von der zeitintensiven und fehlerbehafteten Elektrophoresetechnik^[33] zur Auftrennung der DNA-Fragmente abzuhängen, wurden bereits neue Verfahren zur DNA-Analytik entwickelt. Ein neuerer Ansatz zum DNA-Screening ist die Sequenzierung durch Hybridisierung^[34-37] (SBH), bei dem Silizium-Chips verwendet werden, auf deren Oberfläche ein Array von kurzen Oligonucleotiden gebunden ist, deren Sequenzen auf das jeweilige analytische Problem zugeschnitten sind. Das Hybridisierungsmuster der zu untersuchenden Target-DNA wird meist durch Fluoreszenz ermittelt. Die Identifizierung der DNA erfolgt jedoch bei diesen Verfahren stets indirekt und ist somit fehleranfällig, da z.B. die Intensität des erzeugten Signals im Laufe der Zeit abnimmt (Radioaktivität) oder Empfindlichkeit und Signalstärke der Marker von der Intensität des zur Anregung verwendeten Lasers abhängen (Fluoreszenz).

Eine andere Wahl für die schnelle DNA-Sequenzierung ist die Massenspektrometrie. Massenspektrometrische Verfahren wie die MALDI-Technik können ebenfalls den zeitaufwendigen Schritt der Trennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese ersetzen, bieten zudem ein hohes Automatisierungspotenzial und die Möglichkeit der parallelen Datenprozessierung, so dass eine deutliche Erhöhung des Probendurchsatzes erreichbar ist. Darüber hinaus handelt es sich hierbei um ein direktes Nachweisverfahren, da das Molekulargewicht, eine definierte physikalische Größe, der DNA-Fragmente detektiert wird.

1.3 Die Massenspektrometrie in der Nucleinsäure-Analytik

1.3.1 Entwicklung massenspektrometrischer Verfahren zur Analyse von Nucleinsäuren

Die Massenspektrometrie zählt aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit zu den leistungsfähigsten Methoden in der instrumentellen Analytik. Die Charakterisierung von Nucleinsäuren mittels Massenspektrometrie ist bereits seit 1962 bekannt^[38], als eine erste Untersuchung von Nucleosiden mit der klassischen Elektronenstoßionisation (*electron impact*, EI) gelang. Seitdem hat die Massenspektrometrie in der Nucleinsäure-Analytik enorm

an Bedeutung gewonnen^[39-41]. Klassische Ionisationstechniken wie EI oder chemische Ionisation (CI) bleiben jedoch wegen der polaren Natur der Analyt-Moleküle und ihrer Tendenz zur Fragmentierung auf die Analyse von Dinucleotiden beschränkt: Die thermische Zersetzung überwiegt bei größeren Molekülen gegenüber der unzersetzten Verdampfung.

Die massenspektrometrische Untersuchung von Oligonucleotiden wurde erst mit der Entwicklung schonenderer Verfahren wie Plasmadesorption^[42] (PD), Felddesorption^[43,44] (FD), oder der FAB-Technik^[45] (*Fast Atom Bombardment*) möglich. Obwohl die FAB-MS zur Sequenzanalyse von Oligonucleotiden eingesetzt wurde^[46,47], blieb der zugängliche Massenbereich bei dieser Methode auf relativ kurze Oligonucleotide bis maximal zum 24-mer^[48] beschränkt.

Mit der Einführung der Elektrosprayionisation^[49] (ESI) und der matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation^[50,51] (MALDI) Ende der achtziger Jahre begann ein neues Kapitel in der massenspektrometrischen Analyse von Nucleinsäuren: Innerhalb kürzester Zeit konnten der zugängliche Massenbereich, Auflösung und Nachweisempfindlichkeit beträchtlich erhöht werden^[52-55]. Sowohl ESI- als auch MALDI-MS finden trotz ihrer unterschiedlichen Techniken gleichermaßen in der Analyse von Nucleinsäuren Verwendung, wobei der Hauptanwendungsbereich der MALDI-MS bislang vor allem im Bereich der klinischen Diagnostik, der Mutationsanalyse sowie bei Abstammungsnachweisen lag.

1.3.2 Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Das 1988 von Hillenkamp und Karas^[51,56] sowie Tanaka^[57] eingeführte Matrix-unterstützte Laserdesorptionsverfahren eröffnete bei der Analyse von Biomolekülen durch die Verwendung einer Matrix den Zugang zu Massenbereichen bis in den Megadalton-Bereich^[58]. Die zu untersuchende Probe wird hierbei mit dem 100- bis 1000-fachen Überschuss an Matrix versetzt, auf einem Probenhalter kokristallisiert und anschließend im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Laserimpuls von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Der Matrix kommt in diesem Prozess eine entscheidende Bedeutung zu, sie soll:

1. die zugeführte Laserenergie absorbieren und die Ionisierung des Analytmoleküls unterstützen bzw. induzieren.

2. eine photolytische Beschädigung des Analyten verhindern und
3. Interaktionen zwischen den Analytmolekülen sowie zwischen Analyt und Probenträger reduzieren

Für den Vorgang der Desorption/Ionisation der Analytmoleküle wurden bereits verschiedene Modelle für die UV-MALDI MS diskutiert^[59-61], jedoch gilt der Prozess bis heute als nicht vollständig aufgeklärt. Tatsächlich werden bei der Übertragung der Laserenergie auf die in der Matrix eingebetteten Probenmoleküle hauptsächlich einfach geladene Molekülionen erzeugt, deren Molekulargewichte in der Regel mit einem Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF) ermittelt werden^[62]. Hierfür muss eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zu ihrem Eintreffen im Detektor erfolgen. Eine deutliche Verbesserung der Massenauflösung kann man dabei durch Verwendung eines Ionenreflektors zur Verlängerung der Flugstrecke erzielen (vgl. Abbildung 1-1 zum Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers)^[63].

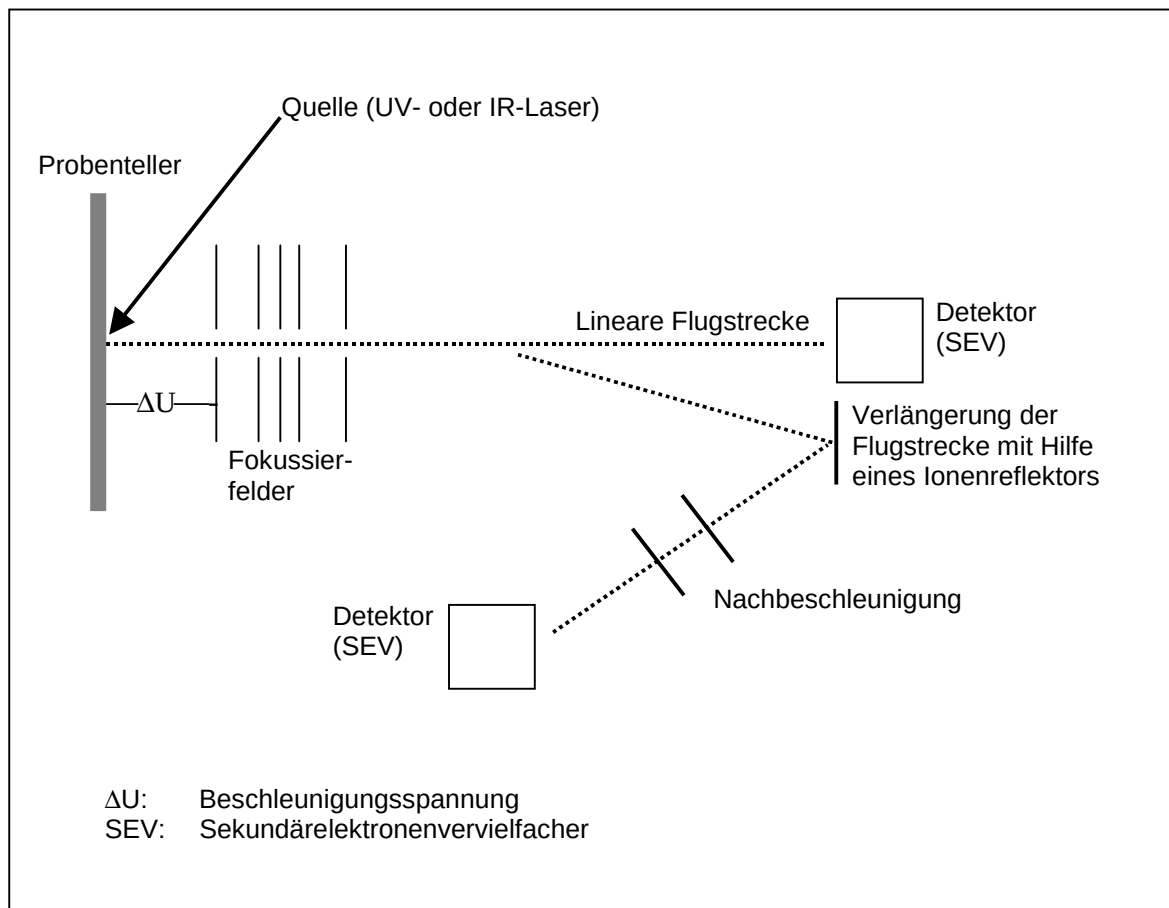


Abbildung 1-1: Die wichtigsten Elemente eines MALDI-TOF Massenspektrometers

In der MALDI-TOF MS kommen UV- und IR-Laser zum Einsatz. Geeignete Matrixsubstanzen sind kleinere aromatische Verbindungen, die mit ihrem π -Elektronensystem Licht im Wellenlängenbereich des jeweiligen Lasers absorbieren können. Als UV-sensitive Matrices lassen sich 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon^[64], 2,5-Dihydroxybenzoesäure^[65] (DHB), Picolinsäure^[66] und 3-Hydroxypicolinsäure^[67] (3-HPA) verwenden, wobei letztere derzeit die Matrix der Wahl für die DNA-Analyse mittels MALDI-TOF MS ist. Routinemäßige Anwendung in der MALDI-TOF MS finden UV-Laser mit Wellenlängen im Bereich von 266 – 355 nm. Neben Nd-YAG-Lasern (im Wellenlängenbereich von 266 bzw. 355 nm) werden vor allem Stickstoff-Gaslaser (mit einer Wellenlänge von 337 nm) eingesetzt, da diese sich als zuverlässig und kostengünstig erwiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Massenspektrometer mit Stickstoffgaslasern eingesetzt.

Neben der richtigen Wahl der Geräteparameter (Einfallswinkel des Laserstrahls, Laserenergie, Beschleunigungsspannung etc.) und einer geeigneten Matrix in Abstimmung mit der eingesetzten Laserenergie hängen Empfindlichkeit, Massengenauigkeit und –auflösung noch von mehreren weiteren Faktoren ab:

Aufgrund der größeren Stabilität der N-glykosidischen Bindung nimmt die Ionenstabilität in der Reihenfolge Oligothymidinsäure>RNA>DNA ab^[68], so dass RNA-Moleküle leichter als DNA analysiert werden können. Entsprechendes gilt für die Analyse modifizierter Oligonucleotide, deren Modifikation eine Stabilisierung der N-glykosidischen Bindung zur Folge hat (wie z.B. bei 7-Deaza-^[69] oder 9-Deaza-purinbasen^[70]).

Ein weiteres Charakteristikum von Nucleinsäuren ist ihre hohe Affinität zu Alkali- und Erdalkaliionen. Heterogene Kationenanlagerung, z.B. des ubiquitären Na^+ oder K^+ , stört die MALDI-Messung empfindlich. Von entscheidender Bedeutung für die Qualität der Spektren ist daher auch die Probenvorbereitung^[71]. Der quantitative Austausch von Alkali- gegen Ammoniumionen ist günstig für die MALDI-TOF Analyse, da die Ammoniumsalze in der Gasphase Ammoniak freisetzen und die Oligonucleotide so als freie Säuren detektiert werden können.

Ganz allgemein nehmen Sensitivität, Massengenauigkeit und Auflösungsvermögen mit zunehmender Molekülgröße ab. Zum einen wird ein vollständiger Austausch von Alkali-

gegen Ammoniumionen mit steigender Kettenlänge schwieriger, zum anderen kommt es zunehmend zu Fragmentierungen, insbesondere durch Basenverlust. Kationenheterogenität, Fragmentierungen und Basen-Addukte führen im Spektrum zu separaten Signalen, die dem eigentlichen Molekülion vor- bzw. nachgelagert sind. Es kommt zu einer Verringerung des Signal/Rausch-Verhältnisses, das bei größeren Molekülen zu einem einheitlichen, verbreiterten Signal führt, da die einzelnen Peaks aufgrund der mangelnden Geräteauflösung nicht mehr aufgetrennt werden.

Eine nachhaltige Verbesserung der Massenauflösung kann z.B. durch die Technik der verzögerten Ionenextraktion^[72] (*delayed extraction*, DE) erzielt werden. Allerdings bietet diese Methode nur in geringeren Massenbereichen (bis maximal zum 50-mer) entscheidende Vorteile.

1.4 Einsatzmöglichkeiten der MALDI-TOF MS in der DNA-Analytik

1.4.1 Neuere Entwicklungen in der klinischen Diagnostik

Die kontinuierliche Verbesserung massenspektrometrischer Parameter wie Sensitivität, Auflösungsvermögen und zugänglicher Massenbereich haben die Massenspektrometrie zu einem weit verbreiteten Werkzeug in der Nucleinsäure-Analytik gemacht. Eine Vielzahl von Applikationen für die MALDI MS sind bereits seit längerem bekannt, darunter die Analyse von Oligonucleotiden^[63,73-75], PCR-^[76,77] oder LCR-Produkten^[78].

In jüngerer Zeit gelang die Entwicklung einiger schneller Assays zur Identifizierung von Mutationen oder Polymorphismen via MALDI Massenspektrometrie:

Beim so genannten PinPoint-Assay^[79], einer Methode zur Detektion von Punktmutationen (auch *SNP* = *single nucleotide polymorphism* genannt), wird ein spezifischer Primer unterhalb der betroffenen Mutationsstelle angelagert und in einer Primer Extension Reaktion von einer DNA-Polymerase verlängert. Da dem Ansatz nur die vier Didesoxynucleotide (ddNTPs),

jedoch keine natürlichen Desoxynucleotide (dNTPs) zugegeben werden, bricht die Reaktion nach Verlängerung des Primers um nur ein Nucleotid ab. Die mittels MALDI-TOF ermittelte Massendifferenz zwischen Primer und Terminationsprodukt erlaubt eine Aussage über das eingebaute Nucleotid.

Eine flexiblere Alternative zum Screening bekannter Mutationsstellen stellt der PROBE (= *primer oligo base extension*)-Assay^[80] dar. Bei diesem Verfahren wird dem Primer neben drei dNTPs das vierte Nucleotid nur in seiner Didesoxyform zugegeben. Analog zu Sanger^[81] wird der Primer bis zum Einbau des ersten Didesoxynucleotids verlängert. Mutationen manifestieren sich durch die Länge des Terminationsproduktes, und die Anzahl der Signale erlaubt Rückschlüsse auf Heterozygotie der Allele. Seit seiner Einführung hat der PROBE-Assay in der Analyse von mehr als 100 Mutationen bzw. Polymorphismen auf humanen Genen Anwendung gefunden^[82,83].

Eine etwas andere Strategie verfolgt der COSBE (= *competitive oligonucleotide single base extension*)-Assay^[84]: Hier werden zwei Primer eingesetzt, deren 3'-terminale Base entweder zur „gesunden“ oder aber zur mutierten Base komplementär ist. In der anschließenden Primer Extension Reaktion wird nur der Primer verlängert, dessen Sequenz komplementär zur Mutationsstelle ist, da nur dieser vollständig hybridisieren kann. Die Masse des Terminationsproduktes gibt Aufschluss über die vorliegende Sequenz.

Alle hier beschriebenen Verfahren können leicht mit neuen Chiptechnologien kombiniert werden und bieten so die Möglichkeit zur parallelen Prozessierung, die eine High-Throughput DNA-Diagnostik ermöglicht. Allerdings ist die Anwendung dieser Assays auf zuvor sehr gut charakterisierte Mutationsstellen beschränkt. Bei der Suche nach neuen, bislang unbekannten Mutationsstellen können sie nicht verwendet werden.

1.4.2 Ansätze zur DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger^[81,85] stellt nach wie vor die Standardmethode zur *de novo*-Sequenzierung langer DNA-Sequenzen dar, wie sie beispielsweise im Humangenomprojekt routinemäßig zur Anwendung kommt. Die Methode basiert auf der enzymatischen Erzeugung einer komplementären Fragmentleiter zu einem einzelsträngigen DNA-Abschnitt,

der sequenziert werden soll. Der statistische Einbau je eines Didesoxynucleotids (ddNTP) in vier parallelen Reaktionsansätzen als *Chain Terminator* (Kettenabbruchbase) führt zum Abbruch der enzymatischen DNA-Synthese, und somit zur Erzeugung einer Population basenspezifisch terminierter Oligonucleotide jeder möglichen Länge. Die Identifizierung der zuvor (fluoreszenz-)markierten Fragmente erfolgt gelelektrophoretisch. Heutige Sequenzierautomaten sind in der Lage, routinemäßig pro Sequenzierprodukt 500 bis 1000 Basenpaare zu bestimmen.

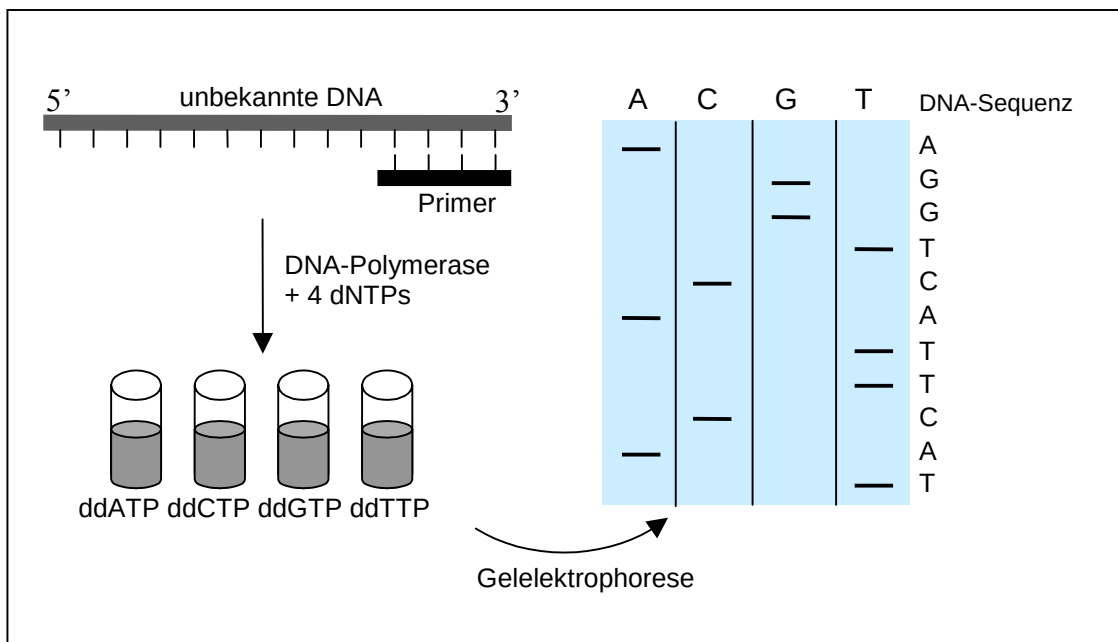


Abbildung 1-2: Grundlegende Schritte zur Sequenzierung nach Sanger

Eine Weiterentwicklung der Sanger-Methode stellt das Cycle-Sequencing^[86] dar, das durch Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase die Durchführung der Polymerisierungsreaktion bei hoher Temperatur gestattet. Hierdurch wird eine zyklische Wiederholung der DNA-Synthese ermöglicht, wobei das zu sequenzierende DNA-Fragment in jedem Zyklus erneut als Template fungiert. Selbst geringste Mengen an DNA können so noch sequenziert werden. Zusätzlich werden störende Sekundärstruktureffekte, wie Hairpin-Strukturen, verringert.

Aufgrund des zugänglichen Massenbereichs und der verringerten Auflösung bei steigender Fragmentlänge stellen massenspektrometrische Sequenziertechniken zurzeit noch keine

Herausforderung an konventionelle Verfahren zur Sequenzierung langer DNA-Bereiche dar. Dennoch bietet sich die Massenspektrometrie als genaues, empfindliches und vor allem schnelles Werkzeug zur Sequenzierung kürzerer DNA-Abschnitte an. Einer der Vorteile der Massenspektrometrie liegt in der Tatsache, dass die Masse eine intrinsische Eigenschaft eines Moleküls ist, im Gegensatz zur extrinsischen Eigenschaft der elektrophoretischen Mobilität. Zudem kann die Masse der Fragmente Aufschluss über eventuelle Fehlabbrüche oder andere Modifikationen geben.

Verschiedene Strategien zur massenspektrometrischen Sequenzierung wurden bisher entwickelt, darunter die direkte Strukturanalyse durch schnelle Fragmentierung oder PSD (= *post source decay*)-Analyse, die Sequenzierung durch enzymatische Spaltung mit Exo- oder Endonucleasen, sowie die massenspektrometrische Analyse von Sanger-Sequenzierprodukten.

PSD-Analyse

Obwohl sich Molekülfragmentierungen in der MALDI-TOF Analyse normalerweise als störend erweisen, kann man diesen Effekt bei der PSD-Analyse zur Gewinnung von Sequenzinformationen nutzen, wenn die Fragmentierung kontrolliert verläuft. Eine eindeutige Identifizierung der in der Gasphase auftretenden Fragmentierungsprodukte setzt jedoch eine hohe Signalauflösung und Massengenauigkeit voraus. Die PSD-Analyse wird routinemäßig bislang vor allem zur Sequenzierung von Peptiden und kleinen Proteinen eingesetzt^[87], Sequenzierungen von Oligonucleotiden bis zu einer Länge von 21 Nucleotiden (nt) sind jedoch möglich^[88].

Sequenzierung durch enzymatische Spaltung mit Exo- oder Endonucleasen

Die kontrollierte Spaltung von Oligonucleotiden mittels Exo- oder Endonucleasen führt zur Erzeugung eines Gemisches von Spaltprodukten, die sich um jeweils ein Nucleotid unterscheiden. Die Sequenz des Oligonucleotids ergibt sich direkt aus den Massendifferenzen der benachbarten Signale, vorausgesetzt, Signalauflösung und Massengenauigkeit sind hoch genug, um zwischen den abgespaltenen Nucleotiden (z.B. dTMP = 304 Da, dAMP = 313 Da, $\Delta M = 9$ Da) zu unterscheiden. Sequenzierungen von Oligonucleotiden unterschiedlicher Länge durch Exonuclease-Abbau sind bekannt^[89,90], und auch die partielle Sequenzanalysen mittels Endonucleasen^[91,92] konnte demonstriert werden.

Massenspektrometrische Analyse von Sanger-Sequenzierprodukten

Obwohl die konventionelle Sanger-Methode routinemäßig zur Sequenzierung von DNA-Segmenten bis 500 bp Länge eingesetzt wird, können Störungen durch sequenzspezifische Effekte, Bildung von Sekundärstrukturen oder andere Interaktionen mit der Gelmatrix auftreten. Zumindest bei der Sequenzierung kürzerer DNA-Abschnitte ist daher zur Vermeidung des zeitaufwendigsten und fehlerbehafteten Schrittes ein Ersatz der gelelektrophoretischen Auftrennung durch eine MALDI MS Analyse sinnvoll. Zudem bietet die Massenspektrometrie das Potenzial einer voll automatisierten High-Throughput Chiptechnologie, bei der mehrere hundert Proben parallel mit Hilfe von Robotern auf Silizium-Chips aufgetragen und innerhalb kürzester Zeit vermessen werden können.

Bereits 1993 wurde anhand eines synthetischen Oligonucleotidgemisches demonstriert, dass die klassische Sanger-Methode an eine MALDI-TOF Analyse adaptiert werden kann^[93]. Allerdings ist eine sorgfältige Aufreinigung der Proben (Entfernung störender Pufferbestandteile, Template-DNA, überschüssiger Nucleotide, Primer und Enzyme) vor der massenspektrometrischen Untersuchung von entscheidender Bedeutung. Erreicht werden kann dies durch den Einsatz biotinylierter PCR-Produkte, die durch Immobilisierung an eine feste Phase wie Streptavidin-Beads aufgereinigt werden können^[94]. Die massenspektrometrische Untersuchung von Sanger-Sequenzierprodukten bis zu einer Länge von ca. 80 nt ist inzwischen möglich; ein bleibendes Problem bei der MALDI-TOF Analyse von Fragmentgemischen ist jedoch die abnehmende Nachweisempfindlichkeit bei steigender Analytmasse. Zwar können durch eine Festphasenaufreinigung störende Substanzen wie Primer oder Enzyme weitgehend entfernt werden, jedoch enthält das Sequenziergemisch eine höhere Konzentration an kurzen Terminationsprodukten, da die Wahrscheinlichkeit, dass ein *Chain Terminator* in den DNA-Strang eingebaut wird, und die Polymerisierungsreaktion damit abbricht, am Anfang der Reaktion am größten ist. Dieser Überschuss an kurzen Oligonucleotiden unterdrückt zusätzlich die Signale der ohnehin mit geringerer Nachweiseffizienz detektierten längeren Moleküle.

1.4.3 Das Prinzip der reversen Sanger Sequenzierung

In Anlehnung an die Sanger-Methode wurde bereits 1986 von Labeit *et al.*^[95] ein Verfahren zur DNA-Sequenzierung mit Exonuclease III entwickelt, das auf der sequenzspezifischen

Termination einer enzymatischen Abbaureaktion durch α -Thiodesoxynucleotide beruht. Bei dieser heute als „reverse Sanger Sequenzierung“ bezeichneten Methode wird der zu sequenzierende DNA-Strang zunächst mittels PCR vollständig zum Doppelstrang aufgebaut und vervielfältigt. Während der Polymerisierungsreaktion, die wie bei Sanger in vier getrennten Reaktionen für die vier Basen durchgeführt wird, erfolgt der statistische Einbau je eines α -Thiodesoxynucleotids (α -S-dNTP), das analog zu den ddNTPs bei Sanger als *Terminator* in der sich anschließenden Sequenzierreaktion wirkt.

Der so modifizierte DNA-Doppelstrang wird nun einem 3'-exonucleolytischen Abbau mit Exonuclease III unterworfen. An Positionen mit α -Thionucleotiden bricht die enzymatische Reaktion ab, da die Phosphothioatbindung von dem Enzym ca. 100 mal langsamer gespalten wird als eine Phosphodiesterbindung. Diese Terminierung des Abbaus am Ort des ersten erreichten Thioanalogons resultiert in einer inversen Sanger Sequenzleiter. Die folgende Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Schritte der Sequenzierung von PCR-Produkten mit Exonuclease III:

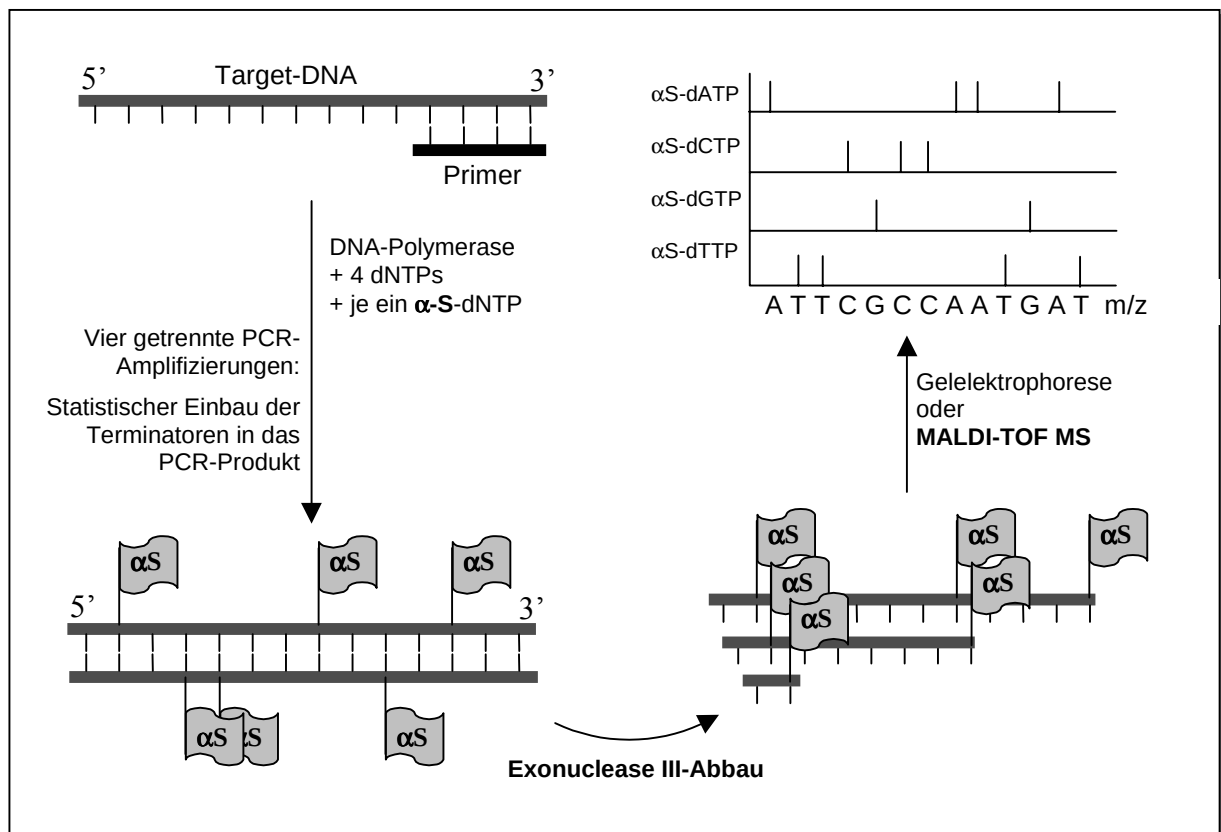


Abbildung 1-3: Sequenzierung von PCR-Produkten mit Exonuclease III

Ein Vorteil der reversen Sanger Sequenzierung ist in der Möglichkeit der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten^[96] ohne aufwendige Reinigungsverfahren zu sehen. Bisherige Methoden zur Sequenzierung von PCR-Produkten erfordern zeitaufwendige Maßnahmen zur Entfernung überschüssiger Primer, Nucleotide und Puffersubstanzen wie Säulenchromatographie oder Fällung, oder es können zusätzliche „nested Primer“ in der PCR notwendig werden. Außerdem kann dieses Verfahren durch den Einsatz biotinylierter Primer in der PCR leicht mit dem Streptavidin-Festphasensystem zur DNA-Aufreinigung^[89] kombiniert werden. In den vier Amplifizierungsreaktionen werden jeweils doppelsträngige PCR-Produkte generiert, die nach dem Abbau mit der doppelstrangspezifischen Exonuclease III zunächst denaturiert werden müssen, bevor die einzelsträngigen Terminationsprodukte anschließend massenspektrometrisch analysiert werden können. Im Gegensatz zur klassischen Sanger Sequenzierung erhält man bei der reversen Sanger Methode also Informationen über die Sequenzen des Template- und des Komplementärstranges. Im günstigsten Fall sollten daher zwei sequenzspezifischen Reaktionsansätze (z.B. A + G oder A + C, *nicht* jedoch der Komplementärbasen A + T, bzw. G + C) zur vollständigen Sequenzierung eines PCR-Produktes ausreichen.

Gerade für eine MALDI-MS Analyse der Fragmentgemische bietet das reverse Sanger-Verfahren noch einen weiteren Vorteil: Bei der Generierung einer Sequenzleiter durch Spaltung mit Exonuclease III wird eine höhere Konzentration an langen Terminationsprodukten im Reaktionsgemisch erzeugt. Bei der Detektion der Terminationsprodukte wirkt dieser Effekt der bei der MALDI-TOF MS beobachteten Tendenz zur quasiexponentiell abnehmenden Nachweisempfindlichkeit mit zunehmender Analytmasse entgegen. Im Gegensatz hierzu bringt die Sanger Sequenzierung präferenziell kleinere Fragmente hervor; lange Fragmente mit höherer Masse werden seltener generiert und zudem nur mit geringer Intensität detektiert. Im MALDI-TOF Spektrum beobachtet man daher bei der Detektion von Sanger-Sequenzierfragmenten einen starken Abfall der Signale hin zu höheren Massen bei ständiger Verringerung des Signal/Rauschverhältnisses. Stellt man die MALDI-TOF Spektren der beiden gegensätzlichen Sequenziertechniken – Sanger und reverse Sanger Methode – gegenüber, sollte sich folgendes Bild ergeben:

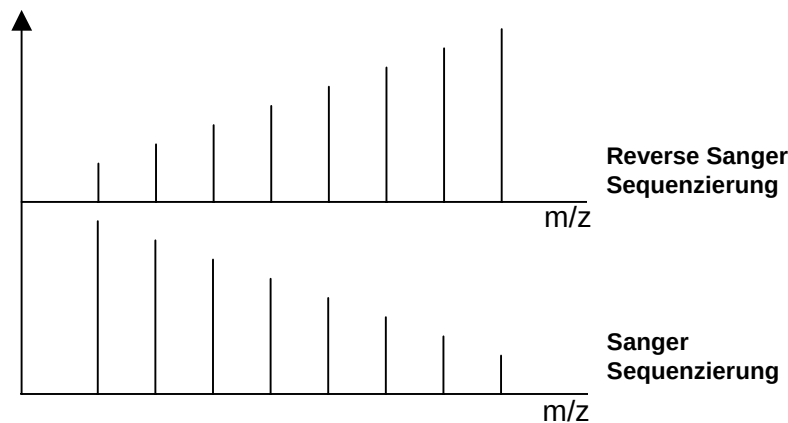
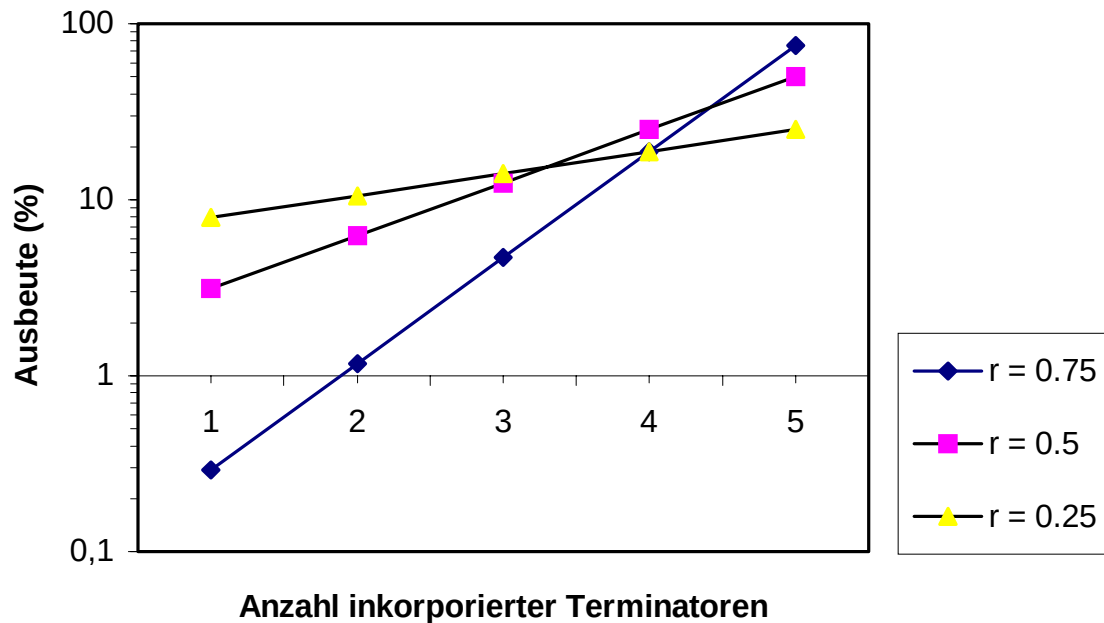


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der MALDI-TOF Massenspektren von Sequenzierprodukten aus der Sanger bzw. reversen Sanger Sequenzierung.

Der Grund für diese gegensätzliche Fragmentverteilung ist jeweils in der statistischen Verteilung der entsprechenden Terminatoren (ddNTP bei Sanger, α -S-dNTP bei reverser Sanger) in der Sequenz zu sehen^[97]. Bei der reversen Sanger Sequenzierung wird die durchschnittliche Anzahl inkorporierter α -S-dNTPs (Terminatoren) im PCR-Produkt durch das Verhältnis α -S-dNTP/dNTP im Reaktionsansatz bestimmt. Ist das Verhältnis groß, werden viele Positionen durch α -S-dNTPs besetzt, und die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Exonuclease frühzeitig auf ein nahe dem 3'-Terminus positioniertes α -S-dNTP stößt. Eine geringe Konzentration an α -S-Terminatoren führt hingegen zur Generierung von PCR-Produkten, die nur wenige modifizierte Nucleotide tragen. Dies wirkt sich auch auf die Gesamtausbeute an Terminationsfragmenten aus, da mehr PCR-Produkte generiert werden, die keine α -S-Terminatoren tragen, und somit von der Exonuclease vollständig abgebaut werden. Der Einfluss des Verhältnisses $r = \frac{\alpha\text{-S-dNTP}}{\text{dNTP}}$ auf die Ausbeute von Fragmenten unterschiedlicher Länge ist in Abbildung 1-5 für ein Oligonucleotid mit fünf möglichen Terminationsstellen dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit p (in Prozent) für die Generierung von Fragmenten mit einer spezifischen Anzahl an α -S-dNTPs kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$p(x) = r \cdot \bar{r}^{n-1} \quad \text{mit } n = \text{Anzahl eingebaute } \alpha\text{-S-dNTPs, } \bar{r} = 1 - \frac{\alpha\text{-S-dNTP}}{\text{dNTP}}$$



n	Ausbeute (%)		
	r = 0.75	r = 0.5	r = 0.25
1	0.29	3.13	7.91
2	1.17	6.25	10.55
3	4.69	12.5	14.06
4	18.75	25	18.75
5	75	50	25
Gesamtausbeute	99.9	96.9	76.3

Abbildung 1-5:

Oben: Ausbeute an Terminationsprodukten in Abhängigkeit von ihrer Länge und dem eingesetzten Verhältnis α -S-dNTP/dNTP. Die Berechnungen erfolgten für fünf mögliche Inkorporationsstellen n.

Unten: Tabellarische Darstellung der Ausbeuten von Fragmenten unterschiedlicher Länge.

Demnach erhält man bei einem Verhältnis von 75:25 (z.B. α -S-dATP/dATP) zu 75 % lange Fragmente mit 5 Terminationsstellen; die Gesamtausbeute an terminierten Fragmenten beträgt 99.9 %. Enthält der PCR-Reaktionsansatz jedoch nur zu einem Viertel den α -S-Terminator, werden noch 25 % der langen Fragmente generiert und die Gesamtausbeute sinkt auf 76.3 %. Diese Berechnungen setzen gleiche Einbauwahrscheinlichkeiten für die modifizierten und die natürlichen Nucleotide voraus. Es ist bereits bekannt, dass sowohl DNA- als auch RNA-Polymerasen nur wenig zwischen den Sp-Isomeren von α -S-dNTP und dNTP

diskriminieren^[98]. Die Thiophosphat-Gruppe kann in ihrer Sp- oder Rp-Form vorliegen. Abbildung 1-6 zeigt die Strukturen der Sp-Isomere der vier α -S-dNTPs:

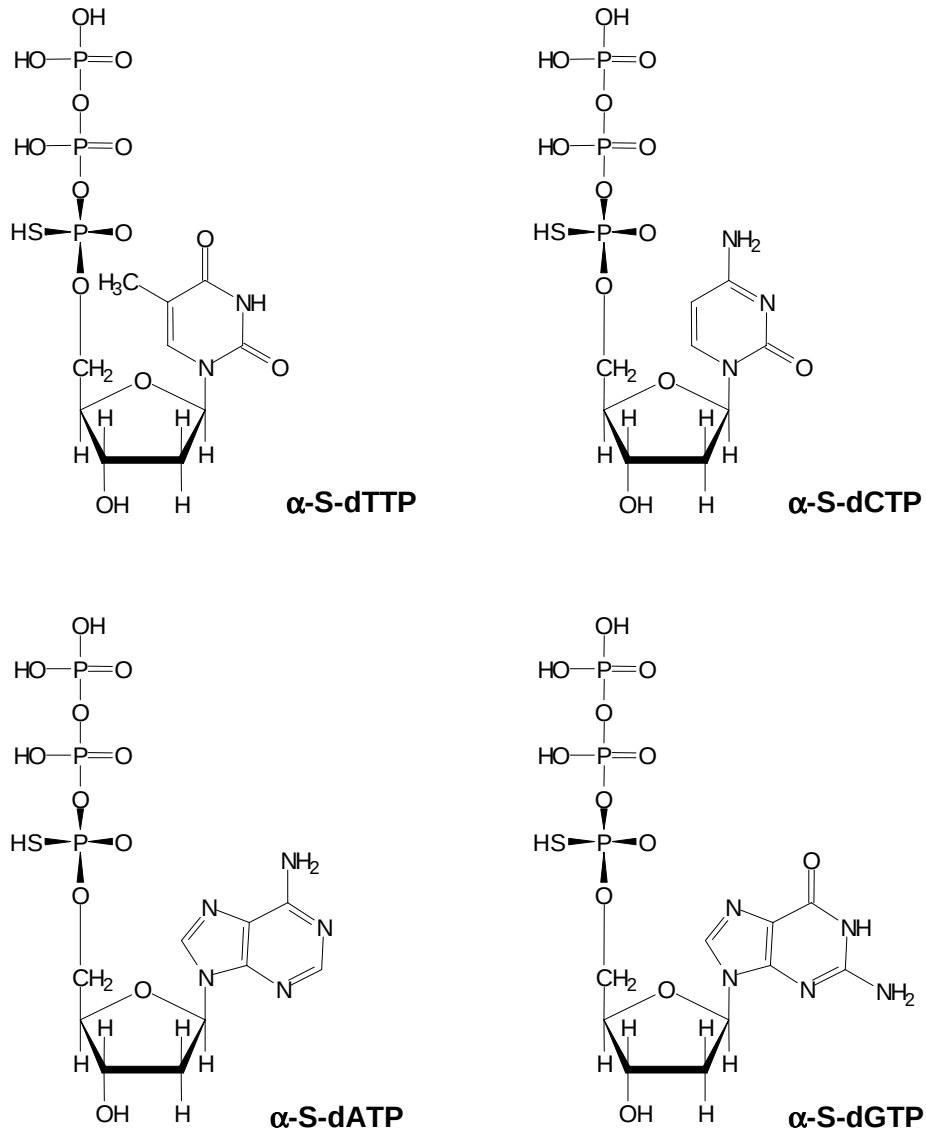


Abbildung 1-6: Struktur der Sp-Isomere der vier sequenzspezifischen Terminatoren für die reverse Sanger Sequenzierung.

Erste Untersuchungen zur Sequenzierung mit Exonuclease III an einem Modellsystem wurden bereits durchgeführt^[99], die vollständige Sequenzierung eines PCR-Produktes über alle vier Basen mittels MALDI-TOF MS wurde jedoch noch nicht beschrieben.

2 Problemstellung

Der Einsatz der MALDI-TOF MS bei der Untersuchung von Nucleinsäuren ist nach wie vor durch die Fragmentierung der Nucleinsäureionen, insbesondere bei längeren Oligonucleotiden, eingeschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine neue Methode zur enzymatischen DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS, basierend auf dem Konzept der reversen Sanger Sequenzierung, entwickelt werden.

Wegen ihrer für die MALDI-TOF MS idealen Fragmentverteilung bietet sich das reverse Sanger Verfahren zur massenspektrometrischen DNA-Sequenzierung als Alternative zur klassischen Sanger-Methode an. Bei einer massenspektrometrischen Analyse der Terminationsprodukte aus der reversen Sanger Sequenzierung ist jedoch zu beachten, dass während des statistischen Einbaus der α -S-Terminatoren in der PCR Amplifikationsprodukte entstehen, die eine unterschiedliche Anzahl an α -S-dNTPs enthalten können. Da sich die inkorporierten Terminatoren in ihrer Masse von ihrem natürlichen Analogon unterscheiden, können die anschließend durch Exonuclease III-Abbau erzeugten Fragmente gleicher Länge unterschiedliche Massen besitzen. Diese Massendifferenz führt im Massenspektrum insbesondere bei den längeren Fragmenten zu einer Verbreiterung des Signals und einer schlechteren Signalauflösung.

Besitzt ein Terminationsfragment zum Beispiel 10 Positionen, an denen theoretisch ein Thioanalogon eingebaut werden könnte, so entsteht bei statistischem Einbau der α -S-dNTPs eine Population von Fragmenten, die gemäß einer Gauß'schen Verteilung 1 bis 10 solcher Thioanaloga enthalten kann. Da die Massendifferenz zwischen dNTP und α -S-dNTP etwa 16 Dalton beträgt, kann bei der Detektion des „full length“-Oligonucleotids bereits eine Massendifferenz von $9 \times 16 = 144$ Dalton auftreten, die im MALDI Spektrum zu einer starken Verbreiterung des Signals führen sollte. Abbildung 2-1 verdeutlicht das Problem der Massenheterogenität beispielhaft an einem Oligonucleotid mit drei möglichen Positionen für den Einbau eines α -S-Terminators (α -S-dTTP). Zur Vereinfachung wird das PCR-Produkt hier einzelsträngig dargestellt. Es werden jedoch doppelsträngige PCR-Produkte generiert, die nach der Reaktion mit Exonuclease III denaturiert und getrennt voneinander mittels MALDI-TOF MS analysiert werden.

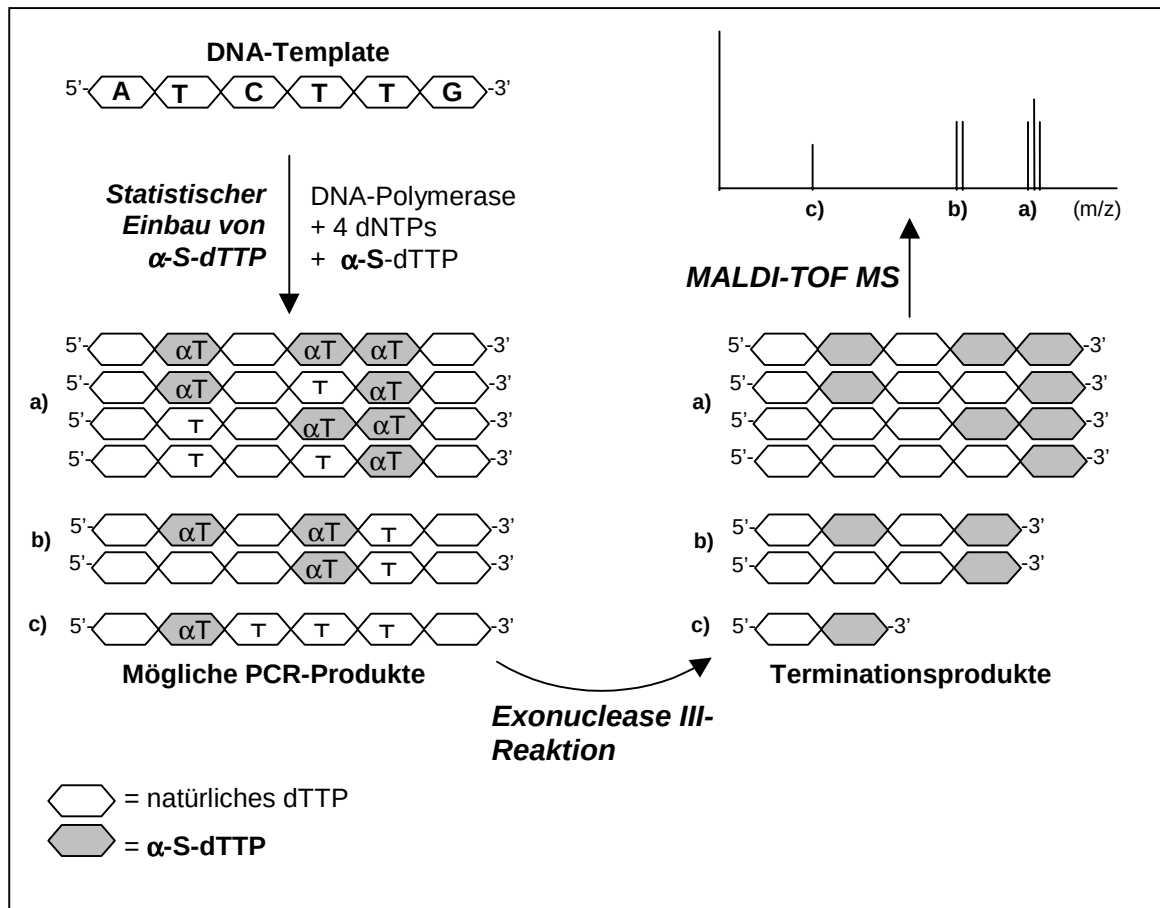


Abbildung 2-1: Massenheterogenität bei Terminationsprodukten gleicher Länge in der reversen Sanger Sequenzierung: Durch statistische Inkorporation eines sequenzspezifischen Terminators in der PCR kommt es nach Behandlung mit Exonuclease III zu Spaltfragmenten gleicher Länge jedoch unterschiedlicher Massen.

Der Ausgleich der Massenheterogenität bei Fragmenten gleicher Länge kann durch den Einsatz massenmodifizierter Nucleotide erreicht werden, die in ihrer Masse mit den Terminatoren (α -S-dNTPs) übereinstimmen, sich jedoch wie ihre natürlichen Analoga (dNTPs) verhalten. In jedem der vier sequenzspezifischen PCR-Ansätze wird dann ein natürliches dNTP *vollständig* durch den α -S-Terminator und ein weiteres, massenmodifiziertes Nucleotid ersetzt. Bei einer Untersuchung der Sequenzierprodukte mittels MALDI-TOF MS sollte dieser Massenausgleich zu einer deutlichen Verbesserung der Signalauflösung im Spektrum führen.

Abbildung 2-2 zeigt schematisch das Prinzip der reversen Sanger Sequenzierung mit sequenzspezifischen Terminatoren und massenmodifizierten Nucleotiden zum Massenausgleich für die T-Reaktion:

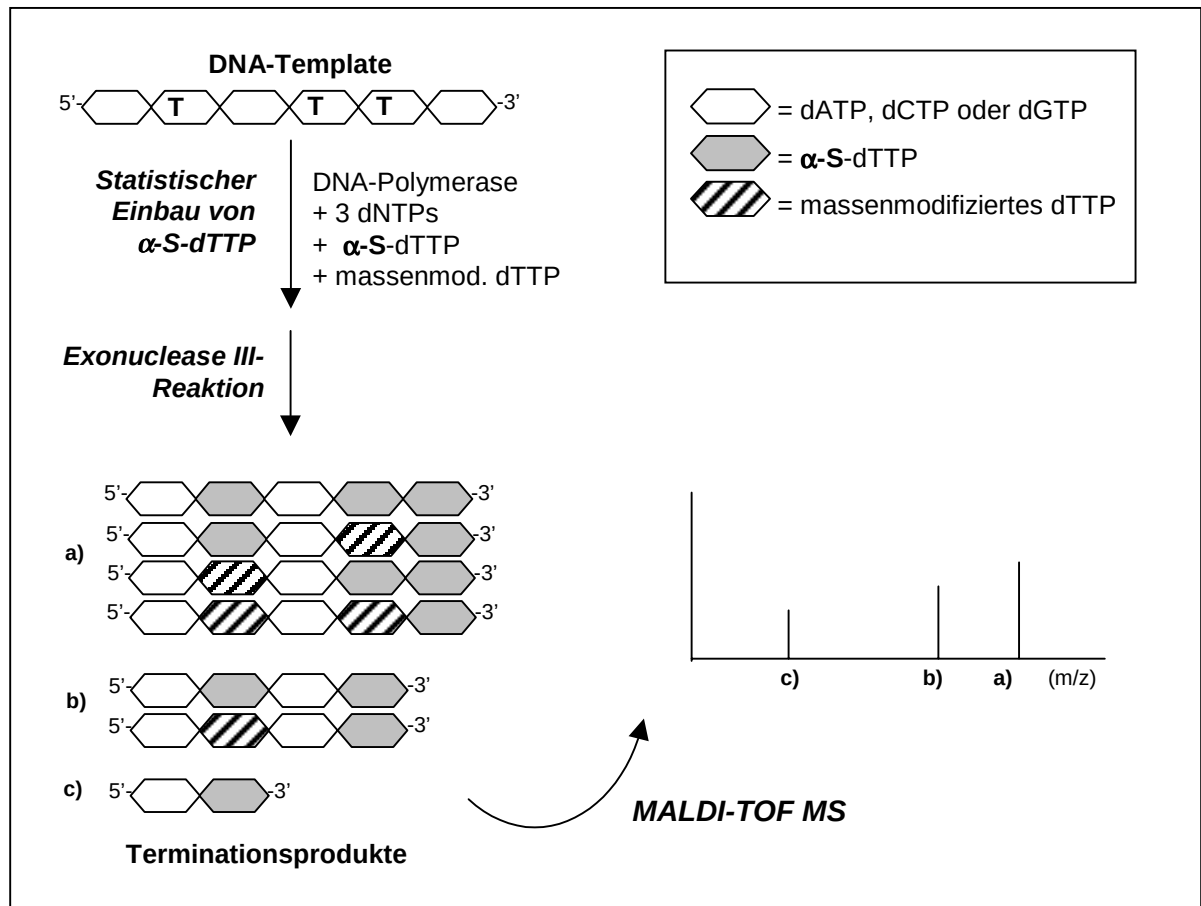


Abbildung 2-2: Reverse Sanger Sequenzierung mit α -S-dTTP und modifiziertem dTTP zum Massenausgleich für die anschließende MALDI-TOF Analyse.

Prinzipiell sind für den Massenausgleich alle Modifikationen denkbar, die die folgenden Bedingungen erfüllen:

1. Die Modifikationen müssen die Masse der Nucleotide um 16 Dalton erhöhen.
2. Die modifizierten dNTPs müssen von der DNA-Polymerase während der PCR als Substrat akzeptiert und in den neusynthetisierten DNA-Strang inkorporiert werden. Um einen statistischen Einbau der Terminatoren zu gewährleisten, darf die Polymerase nicht zwischen dem α -S-dNTP und dem massenmodifizierten dNTP diskriminieren.

3. Die modifizierten dNTPs müssen sich in der Exonuclease III-Reaktion wie ihre natürlichen Analoga verhalten. Sie dürfen nicht zu einem Abbruch der enzymatischen Reaktion führen, sondern müssen vom Enzym abgebaut werden.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich demnach in verschiedene Teilbereiche:

Zunächst sollen Konzepte zur reversen Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS entwickelt werden. Die enzymatische Reaktion soll dabei an einer festen Phase durchgeführt werden. Das Festphasensystem soll die spätere Aufreinigung und Vorbereitung der Proben auf eine MALDI-TOF Analyse erheblich verbessern. Neben synthetischen Templates soll auch genomische DNA in der Sequenzierung verwendet werden.

Anschließend erfolgt die Untersuchung verschiedener massenmodifizierter Desoxynucleosidtriphosphate hinsichtlich ihrer Eignung auf den angestrebten Massenausgleich in der reversen Sanger Sequenzierung. In diesem Zusammenhang werden verschiedene DNA-Polymerasen auf ihre Fähigkeit getestet, modifizierte dNTPs als Substrat zu akzeptieren. Neben verschiedenen im Handel erhältlichen Modifikationen soll hier auch ein im Rahmen dieser Arbeit synthetisiertes, 5'-thiomodifiziertes Desoxynucleosidtriphosphat an verschiedenen biochemischen Testsystemen untersucht werden.

Abschließend soll der kombinierte Einsatz der α -S-dNTPs und der verschiedenen, zum Massenausgleich geeigneten massenmodifizierten dNTPs in der reversen Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS erfolgen. Hierdurch soll eine Verbesserung der Auflösung im Spektrum erzielt werden.

3 Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

3.1 Reverse Sanger Sequenzierung am CFTR-Modellsystem

Für die reverse Sanger Sequenzierung mit Exonuclease III wurde zunächst ein Konzept entwickelt, dass die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten erlaubte:

3.1.1 Amplifizierung des CFTR-Modellsystems mittels PCR

Cystische Fibrose (auch Mukoviszidose) gilt als häufigster Letalfaktor bei Bevölkerungen europider Abstammung^[6] (ca. ein Fall auf 2500 Lebendgeborene). Das „Cystische Fibrose-Gen“ liegt auf dem humanen Chromosom 7 und führt bei einem gesunden Organismus zur Expression eines Regulatorproteins (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* = *CFTR*). Etwa 900 unterschiedliche Mutationen des CFTR-Gens sind heute bekannt, von denen die drei häufigsten auf Deletion jeweils eines Nucleotid-Tripletts beruhen^[100].

In dieser Arbeit wurde als Template für die PCR ein synthetisches 87-mer gewählt, dessen Sequenz dem Bereich des Cystischen Fibrose-Gens entspricht, auf dem die häufigsten Mutationen liegen. In einer Polymerasekettenreaktion wurde so ein doppelsträngiges 48-mer amplifiziert, das in der anschließenden Sequenzierung mit Exonuclease III als Template eingesetzt wurde. Der statistische Einbau der Terminatoren (α -S-dNTPs) erfolgte während der PCR. Zur späteren Aufarbeitung der Sequenzierprodukte über ein Festphasensystem wurde außerdem während der Amplifizierung an einem 5'-Terminus eine Biotinmarkierung eingeführt. Die Sequenzen des Templates und der beiden Primer zeigt Abbildung 3-1:

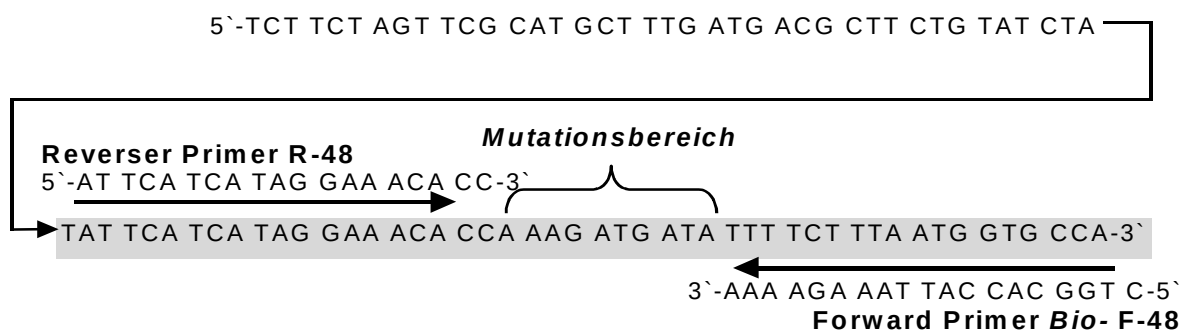


Abbildung 3-1: Sequenzen des synthetischen Templates (CFTR-T87-mer) und der eingesetzten Primer. Grau unterlegt die Sequenz des mittels PCR amplifizierten 48-mers.

3.1.2 Aufreinigung biotinylierter DNA an der Festphase

Für eine erfolgreiche MALDI-TOF Analyse von Fragmentpopulationen aus Sequenzierungsreaktionen ist eine schnelle und effiziente Aufreinigung der Reaktionsprodukte von großer Bedeutung. Einen besonderen Stellenwert haben dabei Aufreinigungsverfahren, die auf einer

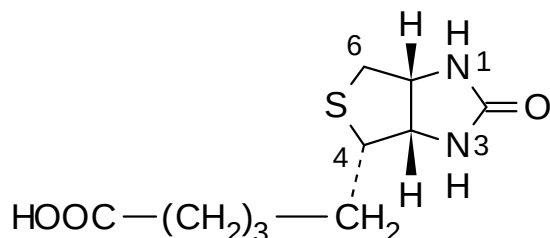


Abbildung 3-2:

Biotin (D-cis-Hexahydro-2-oxothieno-[3,4-d]imidazol-4-valeriansäure)

Immobilisierung der Probenmoleküle an eine feste Phase basieren. Sie weisen die für festphasengebundene Reaktionen allgemein bekannten Vorteile wie gute Reproduzierbarkeit, hohes Automatisierungspotenzial, hohe Effizienz und Spezifität etc. auf. Speziell die festphasengestützte Aufreinigung über das Streptavidin-Biotin-System^[101]

bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und konnte bereits zur Aufreinigung von LCR-^[78], PCR-^[76,77,102] und Sequenzierprodukten^[94] erfolgreich eingesetzt werden. Dieses System zur Isolierung Biotin-markierter DNA besteht aus uniformen superparamagnetischen Polystyrol-Partikeln von 2.8 µm Durchmesser, die über eine kovalente Bindung mit Streptavidin beschichtet sind (im folgenden auch Streptavidin-Beads genannt). Streptavidin ist ein bakterielles, von *Streptomyces avidinii* gebildetes Protein, das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede Untereinheit trägt eine hochaffine Bindungsstelle für Biotin bzw. Biotin-Konjugate. Obwohl der Streptavidin-Biotin-Komplex durch nicht-kovalente Bindungen gebildet wird, ist die Affinität von Streptavidin zu Biotin etwa um den Faktor eine Million stärker als die der meisten Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen ($K_d = 10^{-15}$ mol/l). Der Einsatz biotinylierter Templates in enzymatischen Reaktionen erlaubt eine schnelle und effiziente Isolierung der Biotin-markierten Targetmoleküle durch Immobilisierung an die Streptavidin-Dynabeads. Mit einem Magneten können die Streptavidin-beschichteten Partikel an der Gefäßwand zurückgehalten, und so leicht von Puffern, Lösungsmitteln, Enzymen oder unerwünschten Abbauprodukten separiert werden. Zeitaufwendige Methoden zur Isolierung und Reinigung, wie Präzipitation, Extraktion und Zentrifugation werden vermieden. Lässt sich die enzymatische Reaktion, z.B. bei der reversen Sanger Sequenzierung, direkt als Festphasensequenzierung an den Beads durchführen, können zudem Reaktion und anschließende Aufreinigung ohne größeren Substanzverlust in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Nach der Aufreinigung an der festen Phase können die Analytmoleküle wieder freigesetzt und massenspektrometrisch detektiert werden.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch das magnetische Trennverfahren zur Aufreinigung biotinylierter Moleküle:

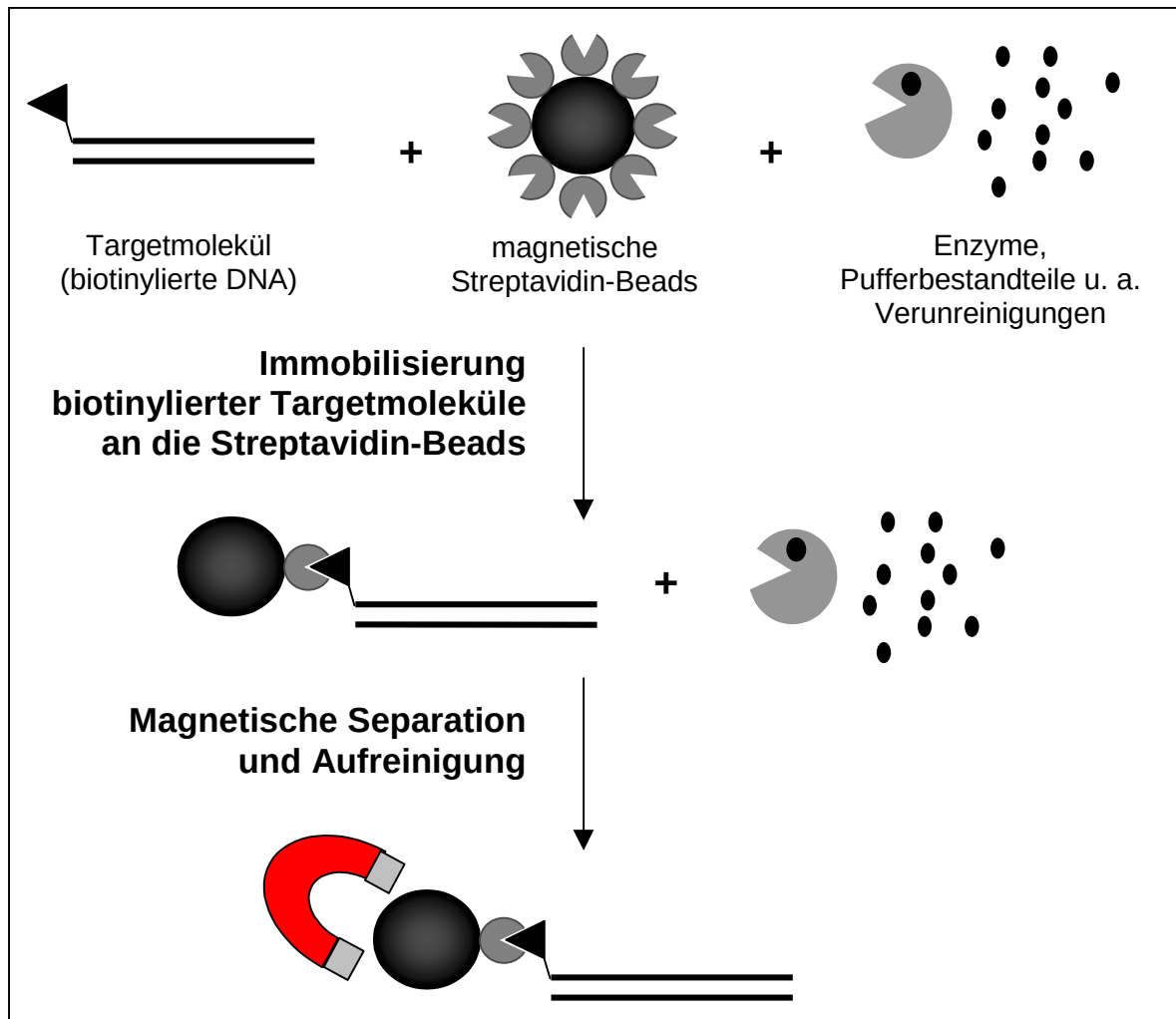


Abbildung 3-3: Aufreinigung biotinylierter Moleküle über magnetische Streptavidin-Beads

Die Freisetzung biotinylierter Nucleinsäuren aus immobilisierten Streptavidin-Biotin-Komplexen wurde zunächst durch Behandlung mit Phenol, Harnstoff oder Formamid etabliert^[103]. Für eine anschließende massenspektrometrische Analyse erwiesen sich diese Abspaltungsbedingungen jedoch als äußerst unvorteilhaft, da die verwendeten Substanzen den Kristallisationsvorgang von DNA und Matrix, der einen entscheidenden Schritt bei der MALDI-TOF Analyse darstellt, auf dem Probenträger des Massenspektrometers extrem negativ beeinflussen.

Eine deutliche Verbesserung der Analysebedingungen wurde erst durch die Verwendung von konzentriertem Ammoniak zur Freisetzung immobilisierter DNA erzielt^[89,104]. Durch Behandlung mit Ammoniak wird die in der Massenspektrometrie störende Kationenheterogenität des DNA-Stranges minimiert: Unerwünschte Metallkationen (Na^+ , K^+) werden durch „flüchtige“ Ammoniumionen ersetzt. In der Gasphase wird Ammoniak freigesetzt und die Oligonucleotide werden als freie Säuren detektiert. Ein zusätzlicher Schritt zum Ionenaustausch ist nicht mehr erforderlich^[68].

Diese Reaktionsbedingungen bieten zudem einen weiteren Vorteil: Unter milderen Bedingungen (Behandlung der Streptavidin-Beads mit Ammoniak bei Raumtemperatur) kann eine Strangtrennung (Denaturierung) von immobilisierter doppelsträngiger (ds)-DNA erwirkt werden, ohne hierbei den Streptavidin-Biotin-Komplex zu destabilisieren. Auf diese Weise gelingt es, selektiv den nicht-biotinylierten Strang freizusetzen. Die Behandlung der Festphasenpartikel mit Ammoniak bei erhöhter Temperatur führt dagegen zur Dissoziation der Streptavidin-Biotin-Bindung und setzt den biotinylierten Einzelstrang frei. Beide DNA-Stränge können so getrennt voneinander einer MALDI-TOF Analyse unterzogen werden.

3.1.3 Gesamtkonzept zur Sequenzierung immobilisierter Templates

Der Einsatz biotinylierter PCR-Produkte als Template in der Sequenzierung mit Exonuclease III in Kombination mit dem Streptavidin-Biotin-Festphasensystem erlaubt je nach Problemstellung eine flexible Reaktionsführung: Die enzymatische Reaktion kann entweder in Lösung, oder – nach Immobilisierung des biotinylierten 48-mers an die Streptavidin-Beads – direkt an der Festphase erfolgen. In beiden Fällen können die Spaltfragmente anschließend mit Hilfe der magnetischen Separation von Kontaminationen befreit werden. Immobilisierte Terminationsprodukte aus der enzymatischen Reaktion können an der Festphase aufgearbeitet, und die so gewonnenen Einzelstränge getrennt voneinander mittels MALDI-TOF MS analysiert werden. Abbildung 3-4 zeigt schematisch die beiden möglichen Reaktionsführungen:

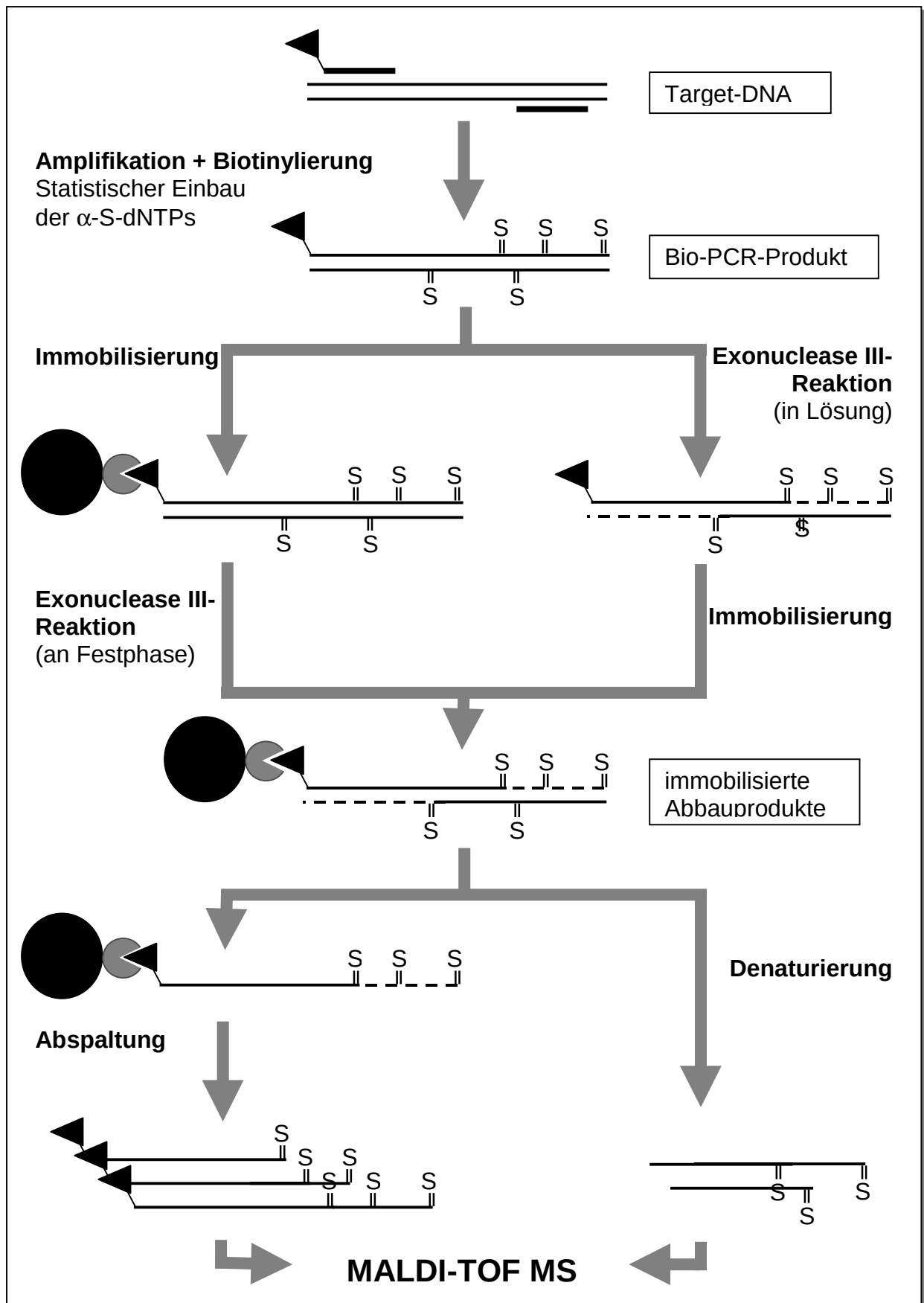


Abbildung 3-4: Das Streptavidin-Biotin-Festphasensystems in der reversen Sanger Sequenzierung: Die enzymatische Reaktion ist in Lösung oder als Festphasensequenzierung möglich.

3.1.4 Die Polymerasekettenreaktion

Die enzymatische Vervielfältigung spezifischer DNA gelingt mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Neben des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts als Matrize (engl. „Template“) werden hierzu eine thermostabile DNA-Polymerase, die vier Desoxynucleosidtriphosphate, sowie zwei kurze Oligonucleotide, die zum Anfang und Ende des gewünschten DNA-Bereichs komplementär sind, benötigt.

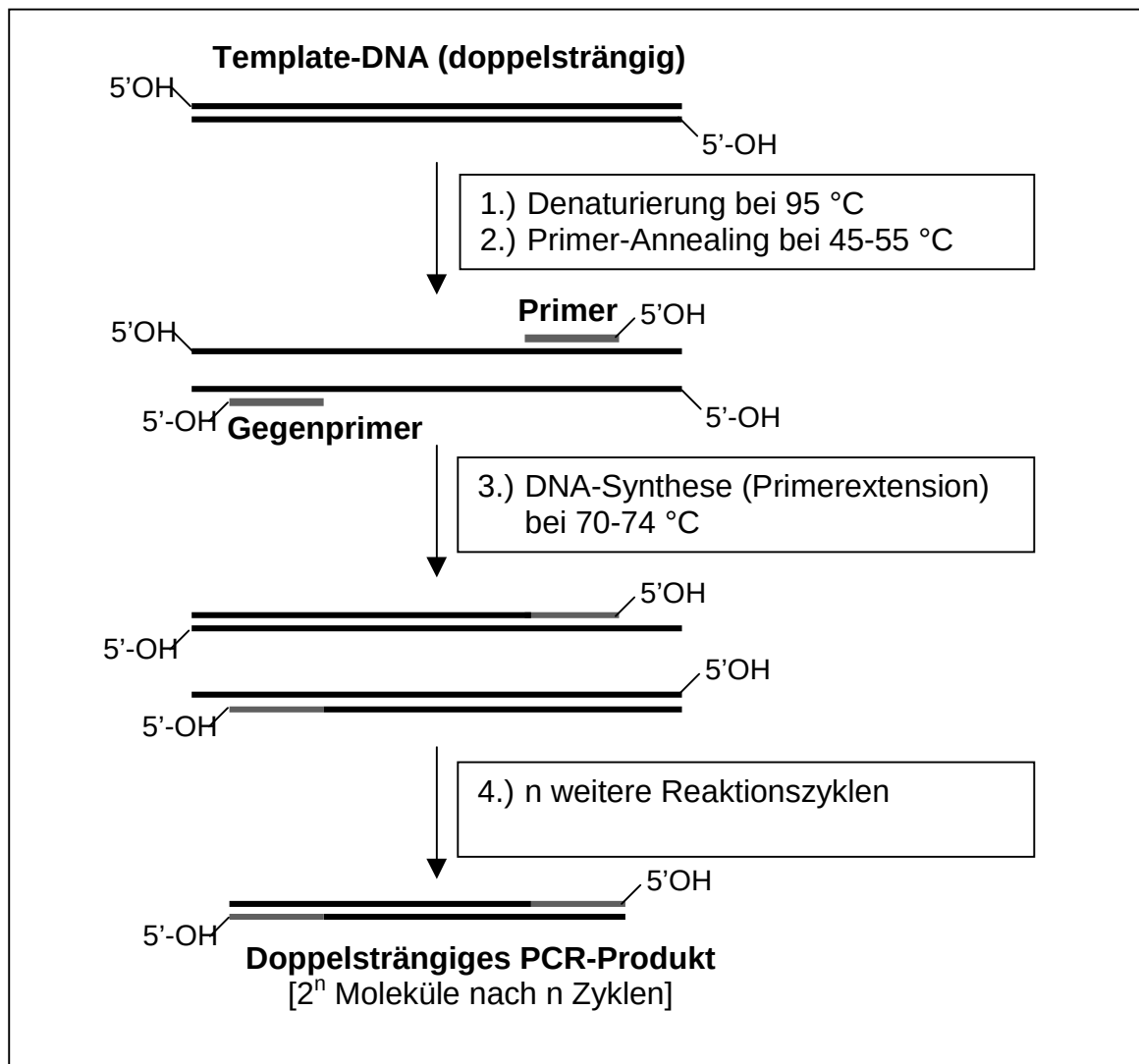


Abbildung 3-5: Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Jeder PCR-Zyklus beginnt mit der Hitzedenaturierung des zu amplifizierenden DNA-Fragments zu zwei einzelsträngigen Templates (vgl. Abbildung 3-5). Im zweiten Schritt des Zyklus wird durch Senken der Temperatur den beiden kurzen Oligonucleotiden (Primer) die

Hybridisierung an ihre jeweilige Zielsequenz auf dem Template ermöglicht. Diese „Paarung“ (engl. „Annealing“) der beiden Primer mit ihrem Template ist Voraussetzung für den anschließenden Aufbau des komplementären Stranges, da die Polymerase für die DNA-Synthese einen kurzen, doppelsträngigen DNA-Abschnitt benötigt. Durch geeignete Auswahl eines Primers lässt sich also der Startpunkt der Polymerisierungsreaktion festlegen und somit zielgerichtet eine bestimmte Region der DNA vervielfältigen. Die richtige Wahl der Annealingtemperatur ist dabei entscheidend für den Erfolg der Reaktion: Liegt sie zu niedrig, kann der Primer auch an Bereiche hybridisieren, deren Sequenzen nicht vollständig komplementär zu seiner eigenen sind: Es kommt zur Bildung falscher Amplifikate. Eine zu hohe Annealingtemperatur verhindert dagegen die Hybridisierung der Primer und somit auch die anschließende DNA-Synthese.

Im dritten Schritt des Zyklus erfolgt die Verlängerung der Primer (Extension) mit den dNTPs zu zwei doppelsträngigen DNA-Molekülen – jeweils identisch mit dem Original – die wiederum als Template im nächsten Reaktionszyklus dienen. Die enzymatische Verknüpfung der dNTPs verläuft ausschließlich in 5'→3' Richtung unter Abspaltung von Diphosphat.

Mit jedem Reaktionszyklus verdoppelt sich theoretisch die Zahl der entstehenden DNA-Moleküle. Nach n Zyklen erhält man demnach 2^n Zielmoleküle. 30 Zyklen würden also zur Bildung der 2^{30} -fachen Menge des eingesetzten Templates führen. In der Praxis ist jedoch häufig schon nach ca. 25 Zyklen^[105] ein Plateau mit der 2^{25} -fachen Menge erreicht.

3.1.4.1 Reaktionsführung

Zum statistischen Einbau der α -S-Terminatoren in das zur reversen Sanger Sequenzierung verwendete ds-48-mer wurde im PCR-Reaktionsansatz jeweils ein dNTP zu 50 Prozent durch sein entsprechendes α -S-Analogon ersetzt. Zur späteren Aufarbeitung der Terminationsprodukte über das Biotin-Streptavidin-Festphasensystem wurde außerdem der *forward* Primer in der PCR biotinyliert eingesetzt. Die Wahl der Reaktionsbedingungen in der PCR basierte hierbei auf einigen Vorversuchen, die am M13mp18-Phagen als Template durchgeführt wurden^[99]. Eine Optimierung der Reaktion war in Hinblick auf die Annealingtemperatur, sowie die eingesetzte Menge des nicht-biotinylierten Primers R-48 erforderlich.

Die höchste Ausbeute an PCR-Produkt ohne gleichzeitiges Auftreten unerwünschter Nebenprodukte wurde bei einer Annealingtemperatur von 50 °C erzielt. Aufgrund der höheren Affinität kürzerer Oligonucleotide zu Streptavidin und wegen der sinkenden Nachweiseffizienz von Fragmenten im unteren Konzentrationsbereich (bei den verwendeten Geräten liegt die Nachweisgrenze bei etwa 100-200 fmol je Verbindung), muss bei der Reaktionsführung darauf geachtet werden, dass der biotinylierte Primer vollständig eingebaut wird. Ein starker Überschuss an Primer wirkt sich negativ auf die Nachweiseffizienz von Substanzen im unteren Konzentrationsbereich aus und überlagert bei einer massenspektrometrischen Untersuchung die Signale der biotinylierten Abbauprodukte aus der Sequenzierung. Als vorteilhaft erwies sich daher die Durchführung der asymmetrischen PCR, bei der mit einem deutlichen Überschuss des nicht-biotinylierten Gegenprimers gearbeitet wird. Diese Variante garantiert den vollständigen Einbau des biotinylierten Primers. Die PCR-Reaktionen in der vorliegenden Arbeit wurden daher mit der 2- bis 4-fachen Menge an reversem Primer R-48 durchgeführt. Überschüssige Moleküle des Gegenprimers können während der Aufreinigung der PCR-Produkte am Festphasensystem entfernt werden. Die vollständigen Reaktionsparameter können Kapitel 10.2.3.1 entnommen werden.

Voraussetzung für die Generierung des phosphothioat-markierten PCR-Produktes ist die Akzeptanz der α -S-dNTPs als Substrat durch die DNA-Polymerase. Neben der *Pfu(exo-)* DNA-Polymerase wurden zwei weitere Enzyme (*HotStar Taq* und *AmpliTaq Gold*) in der Polymerisierungsreaktion eingesetzt. Alle Enzyme lieferten in der PCR mit natürlichen dNTPs ausreichend unmodifiziertes ds-48-mer als Produkt für eine anschließende Sequenzierung. Jedoch kam es bei Verwendung der Polymerasen *HotStar Taq* und *AmpliTaq Gold* in der PCR mit α -S-dNTPs teilweise zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Die *Pfu(exo-)* DNA-Polymerase lieferte dagegen stets phosphothioat-markierte PCR-Produkte in hoher Ausbeute ohne störende Nebenprodukte. Die Polymerisierungsreaktion wird durch die Thioanaloga scheinbar nicht beeinträchtigt. Ein Vergleich der α -thio-modifizierten PCR-Produkte mit den entsprechenden unmodifizierten PCR-Produkten, welcher routinemäßig mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt wurde, zeigte keine Unterschiede in der Qualität, bzw. Intensität der Banden im Gel (vgl. Abbildung 3-6).

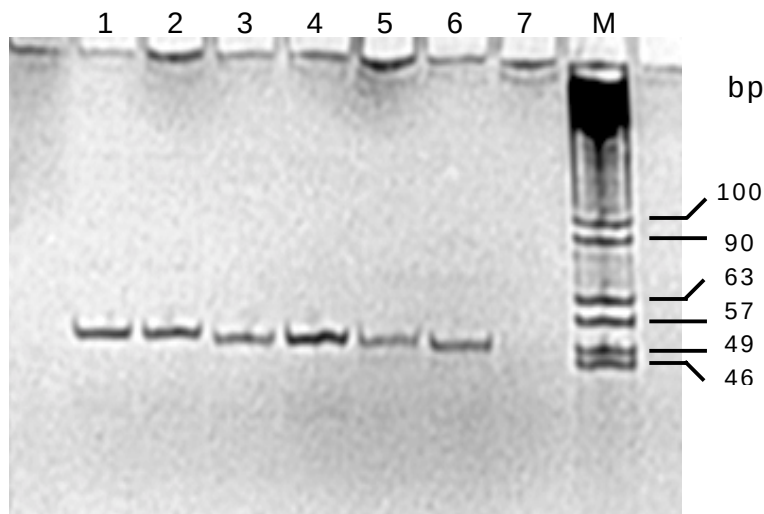


Abbildung 3-6: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von unmodifizierten und α -thio-modifizierten PCR-Produkten mit *Pfu(exo-)*-DNA-Polymerase. Jeweils $\frac{1}{10}$ eines PCR-Ansatzes (5 μ l) wurden auf das Gel aufgetragen.

Bahn 1: mit α -S-dGTP modifiziertes 48-mer	Bahn 5: unmodifiziertes 48-mer
Bahn 2: mit α -S-dATP modifiziertes 48-mer	Bahn 6: unmodifiziertes 48-mer
Bahn 3: mit α -S-dCTP modifiziertes 48-mer	Bahn 7: Negativkontrolle (ohne Template)
Bahn 4: mit α -S-dTTP modifiziertes 48-mer	Bahn M: Längenstandard pBR322, <i>Alu I</i> geschnitten

3.1.4.2 MALDI-TOF Analyse der PCR-Produkte

Einige PCR-Ansätze wurden neben der routinemäßigen Überprüfung auf einem Polyacrylamidgel auch massenspektrometrisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Produkte über das oben beschriebene Biotin-Streptavidin-System aufgearbeitet (vgl. auch Kapitel 10.2.5.2), um einzelsträngige DNA in für die MALDI-TOF MS erforderlicher Reinheit zu gewinnen. Die PCR-Produkte wurden zunächst mit 50 μ l einer Streptavidin-Beads-Lösung versetzt und zur Immobilisierung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach magnetischer Separierung der Festphasenpartikel und Abpipettieren des Überstands wurden die Streptavidin-Beads zur Denaturierung mit 50 μ l einer 25 %igen Ammoniaklösung für ca. 4 Minuten bei 40 °C inkubiert. Der Überstand, welcher den denaturierten Strang enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Denaturierung einmal wiederholt. Die Freisetzung des biotinylierten Stranges erfolgte durch zweimalige Behandlung mit je 50 μ l einer 25 %igen Ammoniaklösung bei 65 °C (ca. 6-8 Minuten). Zur

Aufkonzentrierung der DNA war im Anschluss eine Ethanolpräzipitation erforderlich (vgl. Kapitel 10.2.2.3). Die nach der Fällung erhaltene DNA wurde in je einem Mikroliter hochreinen Wassers aufgenommen und zur massenspektrometrischen Untersuchung zusammen mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix auf einen MALDI-TOF Probenträger aufgetragen.

Abbildung 3-7 zeigt die MALDI-TOF Massenspektren eines unmodifizierten, sowie eines mit α -S-dTTP thio-modifizierten PCR-Produktes. Beide Spektren zeigen jeweils den nicht-biotinylierten Strang. Die Peaks bei 14 904 bzw. 14 978 m/z repräsentieren jeweils das einzelsträngige (ss)-48-mer. Im Vergleich zum unmodifizierten Oligonucleotid (Spektrum I) zeigt das thiomodifizierte ss-48-mer (Spektrum II) eine um 74 Dalton erhöhte Masse bei gleichzeitiger deutlicher Peakverbreiterung. Beide Effekte werden durch den Einbau der Thioanaloga (Terminatoren) in der PCR bedingt. Die ermittelten Werte ergeben sich aus dem Massenmittelwert bei halber Peakhöhe (fwhm = full width at half maximum). Das modifizierte 48-mer besitzt 11 Positionen, an denen ein α -S-dTTP eingebaut werden kann. Da der Einbau der Thioanaloga statistisch erfolgt, entsteht eine Population von PCR-Produkten, die gemäß einer Gauß'schen Verteilung 1 bis 11 thio-modifizierte Terminatoren enthalten kann. Die Massendifferenz zwischen dNTP und α -S-dNTP beträgt etwa 16 Dalton. Somit kann sich das PCR-Produkt (Einzelstrang) mit nur einem eingebauten α -S-dTTP von dem mit 11 eingebauten α -S-dTTPs theoretisch bereits um 160 Dalton in seiner Masse unterscheiden.

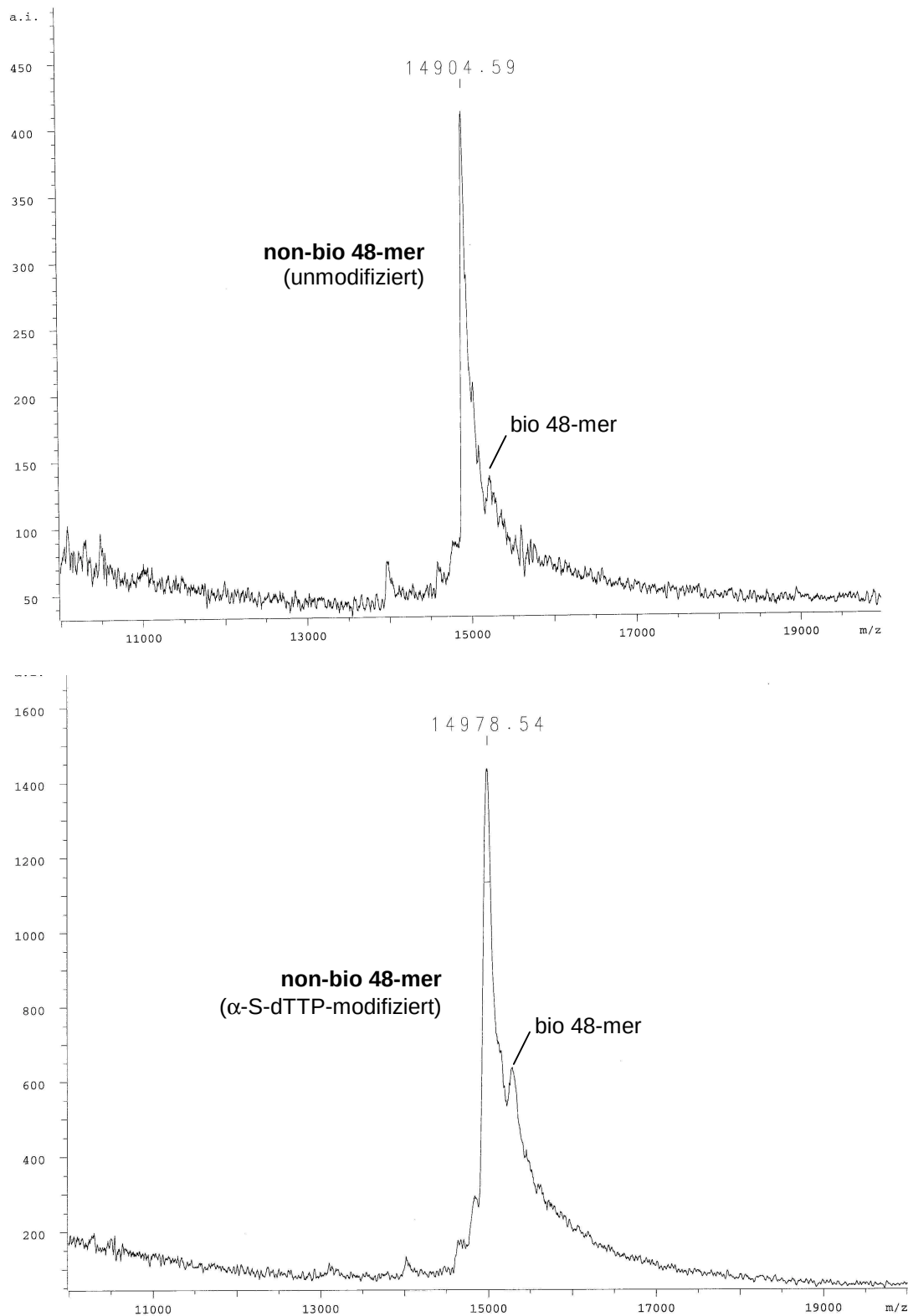


Abbildung 3-7: MALDI-TOF Massenspektren des nicht-biotinylierten 48-mers. Spektrum I zeigt das $[M+H]^+$ -Signal eines unmodifizierten Einzelstranges (14904 m/z), Spektrum II das eines α -thio-modifizierten Einzelstranges (14978 m/z). Bei jeweils ca. 15200 m/z wurden kleine Signale des nicht vollständig denaturierten biotinylierten Stranges detektiert.

3.1.5 Exonuclease III-Reaktion am immobilisierten PCR-Produkt

Zur Sequenzierung phosphothioat-markierter PCR-Produkte wurde der DNA-Duplex mit Exonuclease III behandelt, und die Sequenzierprodukte nach Aufreinigung und Trennung des Doppelstranges entweder gelelektrophoretisch oder via MALDI-TOF MS analysiert. Die enzymatische Reaktion muss dabei in einem für die Exonuclease III geeigneten Reaktionspuffer durchgeführt werden. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass der in der PCR verwendete *Pfu*(exo-)-Reaktionspuffer die Aktivität der Exonuclease III soweit herabsetzt, dass das PCR-Produkt nicht mehr ausreichend verdaut wird^[98]. Die Prozessivität der Exonuclease III wird durch die in vielen Reaktionspuffern enthaltenen Salze – wie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder MgSO_4 – in zunehmender Konzentration erheblich reduziert. Es zeigte sich, dass der Reaktionspuffer der *Taq* DNA-Polymerase keine für das Enzym störenden Sulfate enthält, und daher in der Sequenzierung mit Exonuclease III verwendet werden kann. Das Template (α -thio-modifiziertes PCR-Produkt) muss also zunächst umgepuffert werden. Hierfür stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

Die DNA kann durch eine Ethanolpräzipitation gefällt und das DNA-Pellet anschließend in *Taq*-Reaktionspuffer aufgenommen werden. Das so behandelte Template steht nun für eine Exonuclease III-Reaktion in Lösung zur Verfügung. Für die Festphasensequenzierung von PCR-Produkten wird das thiomodifizierte 48-mer dagegen zunächst, wie unter Kapitel 10.2.5.1 beschrieben, an die Streptavidin-Beads immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgt bei Raumtemperatur (ca. 30 min). Die Anbindung des PCR-Produktes an die feste Phase ermöglicht im Anschluss das Umpuffern des Targets mit Hilfe der magnetischen Separation. Bei dieser eleganteren Variante können die immobilisierten Targetmoleküle durch einfaches Waschen der Streptavidin-Beads von störenden *Pfu*(exo-)-Puffersubstanzen befreit und anschließend im gewünschten *Taq*-Reaktionspuffer resuspendiert werden.

Die Sequenzierreaktion mit Exonuclease III wurde mit hohen Enzymkonzentrationen (20 U) bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurden die Streptavidin-Beads mit dem immobilisierten DNA-Template in 48 μl *Taq*-Reaktionspuffer aufgenommen und mit 2 μl Exonuclease III-Lösung versetzt. Um die Streptavidin-Beads während der Enzymreaktion resuspendiert zu halten (die Beads sammeln sich sonst am Gefäßboden), wurde die 30-minütige Inkubation unter leichtem Schütteln der Reaktionsgefäße durchgeführt. Für eine

anschließende MALDI-TOF Analyse wurden die immobilisierten Terminationsfragmente zunächst durch Waschen mit Ammoniumcitrat- oder Tris-HCl-Lösung an der festen Phase aufgereinigt, und danach zur Denaturierung des Doppelstranges bzw. zur Freisetzung des biotinylierten Stranges von den Streptavidin-Beads mit Ammoniaklösung in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Bei Verwendung größerer Volumina Ammoniaklösung wurden die Abbauprodukte mittels Ethanolpräzipitation (siehe Kap. 10.2.2.3) aufkonzentriert und anschließend in dem für die massenspektrometrische Analyse gewünschten Volumen reinsten Wassers (ddH₂O, R = 18.2 mΩ) aufgenommen. Zur Vermeidung einer nachträglichen oder erneuten Kontamination mit Kationen wurde dieses hoch reine Wasser nur in Kunststoffgefäßen und nicht in Glasbehältnissen gelagert. Wurden kleinere Ammoniakvolumina zur Denaturierung bzw. Abspaltung der Spaltprodukte von der festen Phase verwendet, genügte ein Abdampfen des Ammoniaks bei Raumtemperatur, bevor die Proben auf den bereits mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix beladenen Probenträger des Massenspektrometers aufgetragen wurden. Matrix- und Analytlösung wurden entweder manuell mit einem Volumen von jeweils 500 nl oder automatisiert mit Hilfe eines Nanoplotters á 6 nl auf den Probenträger aufgetragen. Zur Kontrolle von enzymatischer Reaktion und Aufreinigungsbedingungen wurden parallel je ein unverdautes PCR-Produkt (α -thio-modifiziert), sowie ein mit Exonuclease III behandeltes unmodifiziertes PCR-Produkt (Vollverdau) mit analysiert.

Bei der Makropräparation können Signalintensität und –breite innerhalb eines Probenspots sowohl von einem Laserschuss zum nächsten, als auch zwischen verschiedenen Orten auf den Probenkristallen stark variieren. Der Grund hierfür ist zum einen in der Fluktuation der Stärke des Laserstrahls zu sehen, hauptsächlich jedoch sind Unterschiede in der Morphologie der Probenkristalle in lateraler und vertikaler Richtung für diesen Effekt verantwortlich. Das Kristallisationsverhalten des Analyt-Matrix-Gemisches ist für die Qualität des aufgenommenen Spektrums entscheidend. Eine erhöhte Umgebungstemperatur in Verbindung mit hoher Luftfeuchtigkeit führt generell zu schlechteren Kristallen. Auch die Oberfläche des Probentellers beeinflusst den Kristallisationsvorgang. Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen^[92] lieferten hier Probenträger der neueren Generation mit einer aufgerauten Oberfläche, verglichen mit herkömmlichen Trägern mit glatt polierter Edelstahloberfläche, die schlechteren Ergebnisse. Eine angeraute Oberfläche senkt möglicherweise die Oberflächenspannung des aufgetragenen Matrix-Tropfens und führt zu einem „Verlaufen“ des Spots auf dem Träger bevor die Kristallisation durch Abdampfen des Lösungsmittels einsetzt.

Die einzelnen Spots sind daher nicht so konzentriert und können mit der anschließend aufgetragenen Analytlösung keine kompakten Kristalle bilden.

Für die Aufnahme der auf den nächsten Seiten gezeigten Spektren wurde der jeweilige Probenkristall systematisch nach so genannten „sweet spots“ durchsucht, von denen dann eine Serie von Einzelspektren aufgenommen werden konnte. Die Spektren zeigen daher zur besseren Auflösung in der Regel die Aufsummierung mehrerer Einzelschuss-Spektren (meist zwanzig bis hundert). In einigen Fällen konnten jedoch auch Einzelschuss-Spektren für die Sequenzierung verwendet werden. Bei der automatisierten Mikropräparation auf den Silizium-Chips wurde im Regelfall ein reproduzierbares Kristallisationsverhalten, das kompakte Kristalle lieferte, beobachtet. Probleme bereitete hier die automatische Probenvermessung, bei der der Laser nur sieben Mal die Position wechselt, bevor er zur nächsten Probe wandert. Hier waren Nachmessungen von Hand erforderlich, die jedoch nachträglich gute Spektren lieferten.

3.1.5.1 Optimierung der Probenkonditionierung für die MALDI-TOF Analyse

Die Aspekte der Probenvorbereitung spielen, wie bei jedem Analyseverfahren, auch bei der MALDI-TOF MS eine wichtige Rolle. Anfänglich wurde zur Denaturierung der doppelsträngigen Terminationsprodukte aus der Sequenzierung sowie zur Spaltung des Streptavidin-Biotin-Komplexes 25 %ige wässrige Ammoniaklösung verwendet: Zur Denaturierung wurden die Streptavidin-Beads zweimal für je zwei Minuten mit je 50 µl der Ammoniaklösung bei 40 °C überschichtet. Die Freisetzung der biotinylierten Fragmente von der festen Phase erfolgte durch Behandlung mit dem gleichen Volumen an NH₄OH-Lösung, jedoch bei erhöhter Temperatur und längeren Inkubationszeiten (60-65 °C, 8 min). Zur Aufkonzentrierung der DNA war im Anschluss eine Ethanolpräzipitation erforderlich.

Unter diesen Bedingungen konnten zunächst nur biotinylierte Spaltprodukte mittels MALDI-TOF MS detektiert werden. Wie Abbildung 3-8 zeigt, konnten bereits 12 der 14 erwarteten Signale für die T-Reaktion eindeutig bestimmt werden. Durch die hohe Ammoniakkonzentration, die für die Freisetzung der biotinylierten Fragmente verwendet wurde, wurde jedoch auch nicht-kovalent an die Oberfläche der Polystyrol-Partikel adsorbiertes, freies Streptavidin freigesetzt. Streptavidin wird in der massenspektrometrischen Untersuchung leicht desorbiert und überlagert mit einer Masse von ca. 12 900 Dalton das ebenfalls bei

12 947 Dalton erwartete Signal von Fragment Nr. 12 aus der Sequenzierung des biotinylierten Stranges. Dieses Signal konnte daher nicht eindeutig bestimmt werden. Tabelle 3-A auf Seite 38 zeigt die detektierten Massen der einzelnen Fragmente im Vergleich zu den berechneten Fragmentmassen.

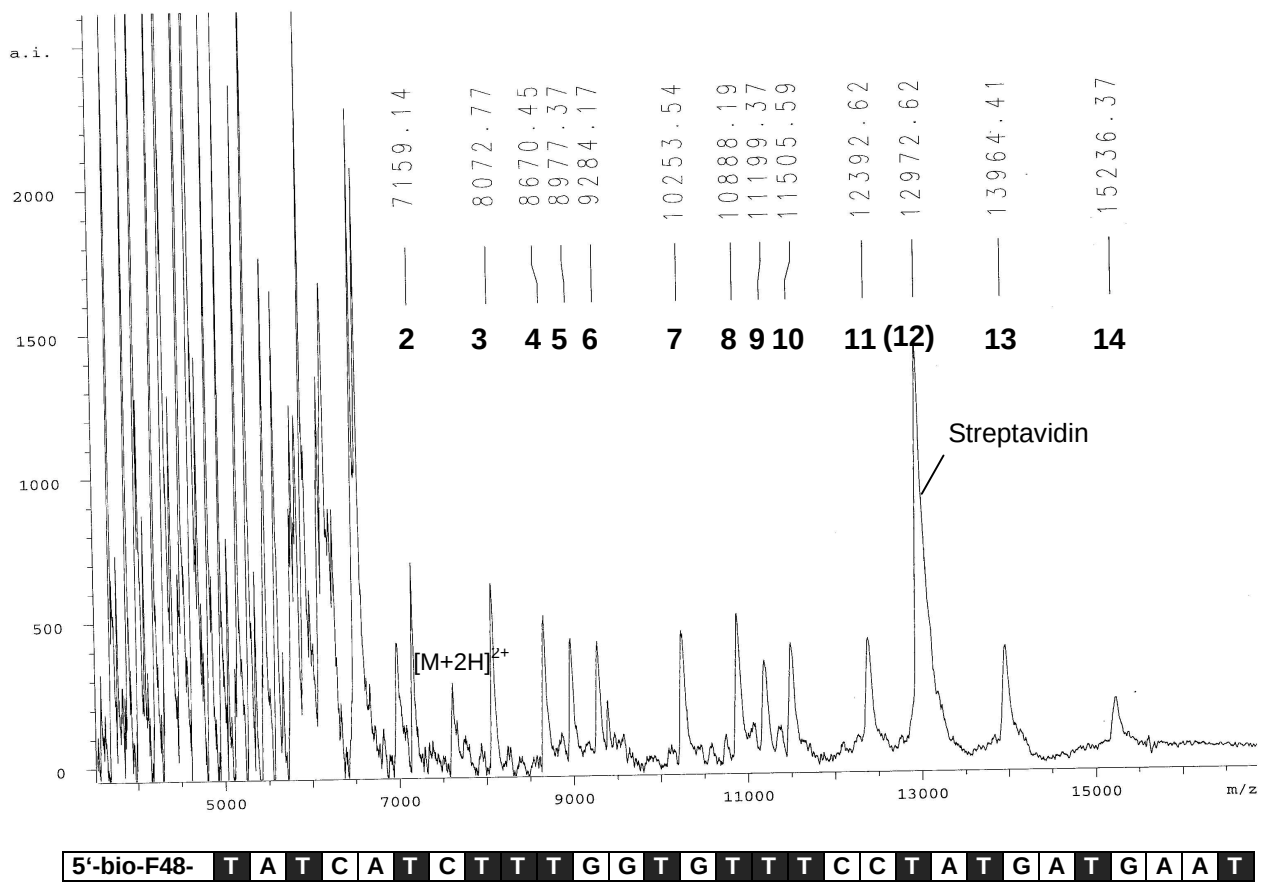


Abbildung 3-8: MALDI-TOF Massenspektrum der T-Reaktion einer reversen Sanger Sequenzierung (biotinylierter Strang). Das Spektrum zeigt 12 der erwarteten 14 Signale des biotinylierten Stranges, wobei Signal Nr. **12** von einem starken Streptavidin-Signal überlagert wird, das eine genaue Bestimmung der Masse des darunterliegenden Fragments verhindert.

Fragment-Nr.	M _{berechnet} [m/z]	M _{gemessen} (ΔM) [m/z]	Fragment-Nr.	M _{berechnet} [m/z]	M _{gemessen} (ΔM) [m/z]
Primer Bio-F48 (19-mer)	6 218	-	8 (34-mer)	10 844	10 888 (+44)
1 (20-mer)	6 528	-	9 (35-mer)	11 149	11 199 (+50)
2 (22-mer)	7 154	7 159 (+5)	10 (36-mer)	11 453	11 505 (+52)
3 (25-mer)	8 047	8 072 (+25)	11 (39-mer)	12 335	12 392 (+57)
4 (27-mer)	8 640	8 670 (+30)	12 (41-mer)	12 953	(12 972)
5 (28-mer)	8 944	8 977 (+33)	13 (44-mer)	13 899	13 964 (+65)
6 (29-mer)	9 248	9 284 (+36)	14 (48-mer)	15 159	15 236 (+77)
7 (32-mer)	10 211	10 253 (+42)	[M+H]⁺		

Tabelle 3-A: Vergleich der im MALDI-TOF Spektrum (Abb. 3-8) detektierten Massen der 14 Fragmente der T-Reaktion (biotinylierter Strang) mit den berechneten. Die Berechnung berücksichtigt nicht die Massendifferenz durch den statistischen Einbau der um 16 Dalton schwereren α -Thio-Terminatoren, sondern erfolgte auf Grundlage der Massen der natürlichen Monophosphate.

Die Verbreiterung der Signale zu höheren Massen kann auf die Massenheterogenität der Fragmente durch den statistischen Einbau der α -S-Terminatoren zurückgeführt werden. Erwartungsgemäß sind die detektierten Signale gegenüber den berechneten Werten leicht zu höheren Massen verschoben, dabei weicht das Signal des kürzesten detektierten Fragments (Nr. 2) nur um wenige Dalton vom berechneten Wert ab, während das längste Fragment (Nr. 14) – das gleichzeitig auch das 48-mer $[M+H]^+$ repräsentiert, da die Sequenz auf T endet – bereits um fast 80 Dalton verschoben ist.

Eine Sequenzierung des nicht-biotinylierten DNA-Stranges gelang zunächst nicht. Lediglich das zu Kontrollzwecken stets mit untersuchte, unverdaute *full length*-Produkt des thio-modifizierten 48-mers konnte nach Denaturierung mit 25 %iger Ammoniaklösung via MALDI-TOF MS analysiert werden. Der Verdacht lag nahe, dass die Aufreinigungsbedingungen für eine massenspektrometrische Detektion des empfindlichen Sequenziergemisches, in dem die Konzentrationen der einzelnen Fragmente nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze des Spektrometers liegen können, zu stringent gewählt waren. Durch eine Untersuchung sowohl der biotinylierten, als auch der nicht-biotinylierten Sequenzleitern mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Silberfärbung) konnte hier bestätigt werden, dass die enzymatische Reaktion an beiden DNA-Strängen erfolgreich verlaufen war (vgl.

Abbildung 3-9). Hierzu wurden die doppelsträngigen Fragmente nach der Festphasensequenzierung mit Exonuclease III, wie oben beschrieben, durch Behandlung mit 25 %iger Ammoniaklösung denaturiert und der biotinylierte Strang von der festen Phase abgespalten. Anschließend wurden die DNA-Stränge getrennt voneinander mittels Ethanolpräzipitation aufkonzentriert. Die DNA-Pellets wurden in je 5 µl Wasser aufgenommen und auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurden die Banden der einzelnen Fragmente durch eine Silberfärbung des Gels sichtbar gemacht (s. Kapitel 10.2.2.1).

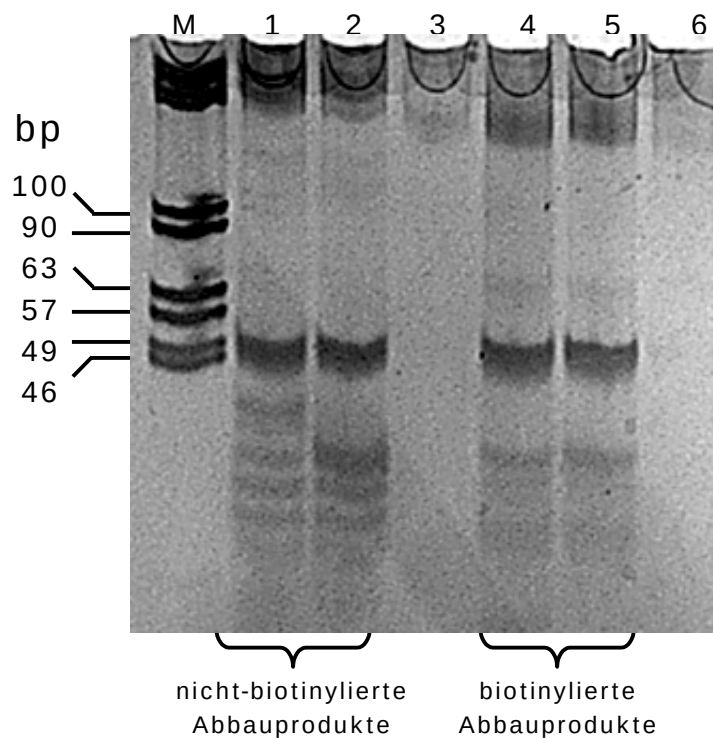


Abbildung 3-9: Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Spaltfragmente aus einer Exonuclease III-Reaktion. Das Gel zeigt die Abbauprodukte sowohl des biotinylierten, als auch des nicht-biotinylierten Stranges einer T-Reaktion, sowie als deutliche Bande bei 48 bp nicht umgesetztes PCR-Produkt.

Bahn M: Marker, pBR 322-DNA, *Alu I* geschnitten. Fragmentlängen zwischen 46 und 100 nt

Bahn 1+2: T-Leiter, nicht-biotinyl. Strang, Denaturierung mit 2 x 50 µl NH₄OH (25 %ig) bei 40 °C

Bahn 3: Kontrolle: Vollverdau an unmodifiziertem PCR-Produkt, denaturierter Strang

Bahn 4+5: T-Leiter, biotinylierter Strang, Denaturierung mit 2 x 50 µl NH₄OH (25 %ig) bei 60 °C

Bahn 6: Kontrolle: Vollverdau an unmodifiziertem PCR-Produkt, biotinylierter Strang

Als problematisch für die erfolgreiche massenspektrometrische Detektion der denaturierten Sequenzierprodukte erwies sich die notwendige Aufkonzentrierung der DNA durch Ethanolpräzipitation. Auch der Zusatz von Fällungshilfen wie *seeDNA*[™] statt des üblichen Glykogens führte hier nicht zu Verbesserungen in der Qualität der DNA-Pellets. Eine Fällung der DNA mit Ethanol und anderen Zusätzen birgt immer die Gefahr des nachträglichen Einbringens störender Kationen in die Analytlösung. Ein Verzicht dieser Methode schien daher erstrebenswert. Durch eine drastische Reduzierung des Ammoniakvolumens von 100 auf 5 µl konnte die Aufkonzentrierung der DNA vermieden werden. Ein einfaches Abdampfen des Ammoniaks bei Raumtemperatur für etwa 40 Minuten vor der Messung reicht hier aus. Diese Methode stellt sicher, dass in die Probe nur die für die MALDI-TOF Analyse günstigen Ammoniumionen eingebracht werden.

Unter derart optimierten Aufreinigungsbedingungen konnte auch die vollständige T-Leiter des nicht-biotinylierten Stranges detektiert werden (vgl. Abb. 3-10, Spektrum I). Die Sequenzierung gelang jedoch noch nicht reproduzierbar bei jedem untersuchten Analytgemisch. Die Aufnahme brauchbarer Spektren gestaltete sich zudem sehr zeitintensiv durch die notwendige Suche nach so genannten „sweet spots“. Hierfür kann die mangelhafte Qualität der Probenkristalle verantwortlich gemacht werden.

Erst durch eine Verdünnung des für die Denaturierung der Sequenzleitern verwendeten Ammoniaks auf 2 mol/l bei gleichzeitiger leichter Verlängerung der Inkubationszeit von zwei auf vier bis fünf Minuten wurde eine optimale Probenkonditionierung in Hinblick auf die Qualität der erhaltenen Probenkristalle erzielt, die verlässlich zur Detektion vollständiger Sequenzleitern des nicht-biotinylierten DNA-Stranges führte.

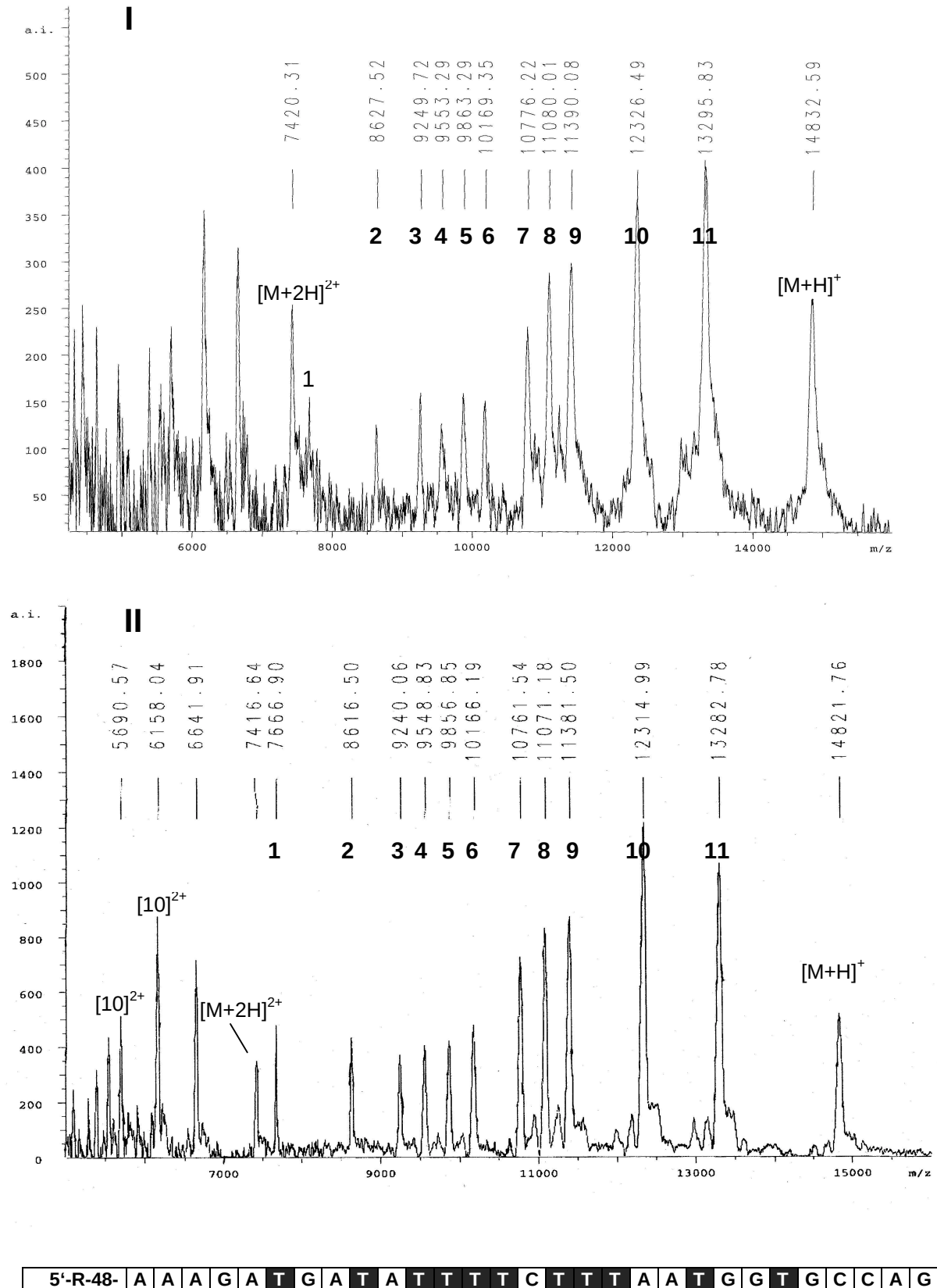


Abbildung 3-10: MALDI-TOF Massenspektren einer T-Reaktion (nicht-biotinylierter Strang). Die Denaturierung erfolgte durch Behandlung mit 5 µl NH₄OH-Lösung (25 %ig).

Spektrum I: Target-Präparation ohne Ionenaustauscher

Spektrum II: on-target-Addition von Kationenaustauscher-Beads (Ionex)

Fragment-Nr.	M _{berechnet} [m/z]	M _{gemessen} (ΔM) [m/z]	Fragment-Nr.	M _{berechnet} [m/z]	M _{gemessen} (ΔM) [m/z]
Primer R-48 (19-mer)	5 764	–	7 (35-mer)	10 721	10 761 (+40)
1 (25-mer)	7 651	7 666 (+15)	8 (36-mer)	11 025	11 071 (+46)
2 (28-mer)	8 597	8 616 (+19)	9 (37-mer)	11 329	11 381 (+52)
3 (30-mer)	9 215	9 240 (+25)	10 (40-mer)	12 260	12 314 (+54)
4 (31-mer)	9 519	9 548 (+29)	11 (43-mer)	13 222	13 282 (+60)
5 (32-mer)	9 823	9 856 (+33)	[M+H]⁺ (48-mer)	14 772	14 821 (+49)
6 (33-mer)	10 127	10 166 (+39)			

Tabelle 3-B: Berechnete und detektierte Massen aus der Sequenzierung des nicht-biotinylierten Stranges der T-Reaktion (vgl. Abb. 3-10).

Die Spaltung des Biotin-Streptavidin-Komplexes mit verringertem Ammoniakvolumen erwies sich ebenfalls als sinnvoll: Eine einmalige Behandlung der Streptavidin-Beads mit 10 µl Ammoniaklösung ist für eine vollständige Rückgewinnung biotinylierter DNA ausreichend und vermeidet die Ethanolpräzipitation zur Aufkonzentrierung. Um jedoch auch die unerwünschte Abspaltung von nicht-kovalent gebundenem Streptavidin von der Festphasenoberfläche zu unterdrücken, ist eine Verringerung des Ammoniakvolumens allein nicht ausreichend. Auch hier wurden durch Verdünnen der Ammoniaklösung auf 2 mol/l gute Ergebnisse erzielt: die Signalintensität des freien Streptavidins wurde stark verringert und zum Teil ganz verhindert. Selbst eine Ammoniakkonzentration von nur noch 100 mmol/l ist zur vollständigen Dissoziation der Streptavidin-Biotin-Bindung ausreichend, wenn die Inkubation bei 65 °C (statt zuvor 60 °C) und leicht verlängerter Reaktionszeit (10 min) stattfindet. Gleichzeitig sind diese Bedingungen für die Freisetzung biotinylierter Fragmente mild genug, um eine Abspaltung von Streptavidin von der Festphasenoberfläche in den meisten Fällen zu vermeiden. Generell soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass die Abspaltung von Streptavidin von der Oberfläche der Beads nicht allein von den Aufreinigungsbedingungen abhängig ist, sondern zum Teil durch den Herstellungsprozess der Streptavidin-Beads bedingt wird. Unterschiedliche Chargen des gleichen Herstellers führten bei gleichen Reaktionsbedingungen zu sehr verschiedenen Ergebnissen in Bezug auf die Intensität der detektierten Streptavidin-Signale.

Das Einbringen störender Kationen in den Analyten ist nicht nur während des Aufreinigungsverfahrens zur MALDI-TOF Probenvorbereitung möglich. Kaum zu verhindern sind Kontaminationen durch die Pipettenspitzen oder die metallische Oberfläche des Probenträgers. Ein eleganter Weg zur Entfernung von Metallionen ist die Verwendung von Kationenaustauscher-Beads. Diese Polymer-Partikel sind mit Ammoniumionen beladen und können sowohl Analyt-, als auch Matrixlösung entsalzen. Durch eine „on-target“ Addition eines kleinen Aliquots des Kationenaustauschers während der Präparation auf dem Träger können außerdem Kationen aus der Metalloberfläche des Probenträgers etc. eliminiert werden^[68,106]. Abbildung 3-10, Spektrum II auf Seite 41 zeigt, wie die Auflösung der MALDI-TOF Spektren durch die Verwendung eines Kationenaustauschers während der Targetpräparation verbessert werden kann (vgl. auch Tabelle 3-B, S. 42 für die berechneten und detektierten Massen der einzelnen Fragmente).

3.1.5.2 Vollständige Sequenzierung des PCR-Produktes mittels MALDI-TOF MS

Das Konzept der reversen Sanger Sequenzierung an einer festen Phase via MALDI-TOF MS konnte erfolgreich zur vollständigen Sequenzierung des phosphothioat-markierten PCR-Produktes aus CFTR-T87 eingesetzt werden. Unter optimierten Bedingungen für die Probenaufarbeitung konnten spezifische Sequenzleitern für die A-, C-, G- und T-Reaktion detektiert werden. Hierbei wurden Sequenzinformationen sowohl über den biotinylierten, als auch über den nicht-biotinylierten Strang des jeweiligen PCR-Produktes gewonnen. Bei dem Konzept der Doppelstrangsequenzierung von PCR-Produkten kann die vollständige Sequenz in nur zwei Sequenzierungsreaktionen (z.B. T- u. G-Reaktion oder T- u. C-Reaktion) bestimmt werden, da die Kenntnis der Sequenz des *forward* Stranges auf die Sequenz des Gegenstranges schließen lässt und umgekehrt. Natürlich gilt dies nur bei der Erzeugung zweier nicht-komplementärer Sequenzleitern.

Die Abbildungen 3-11 und 3-12 auf Seite 44 und 45 zeigen beispielhaft die MALDI-TOF Spektren der A- und C-Reaktion.

3 Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS

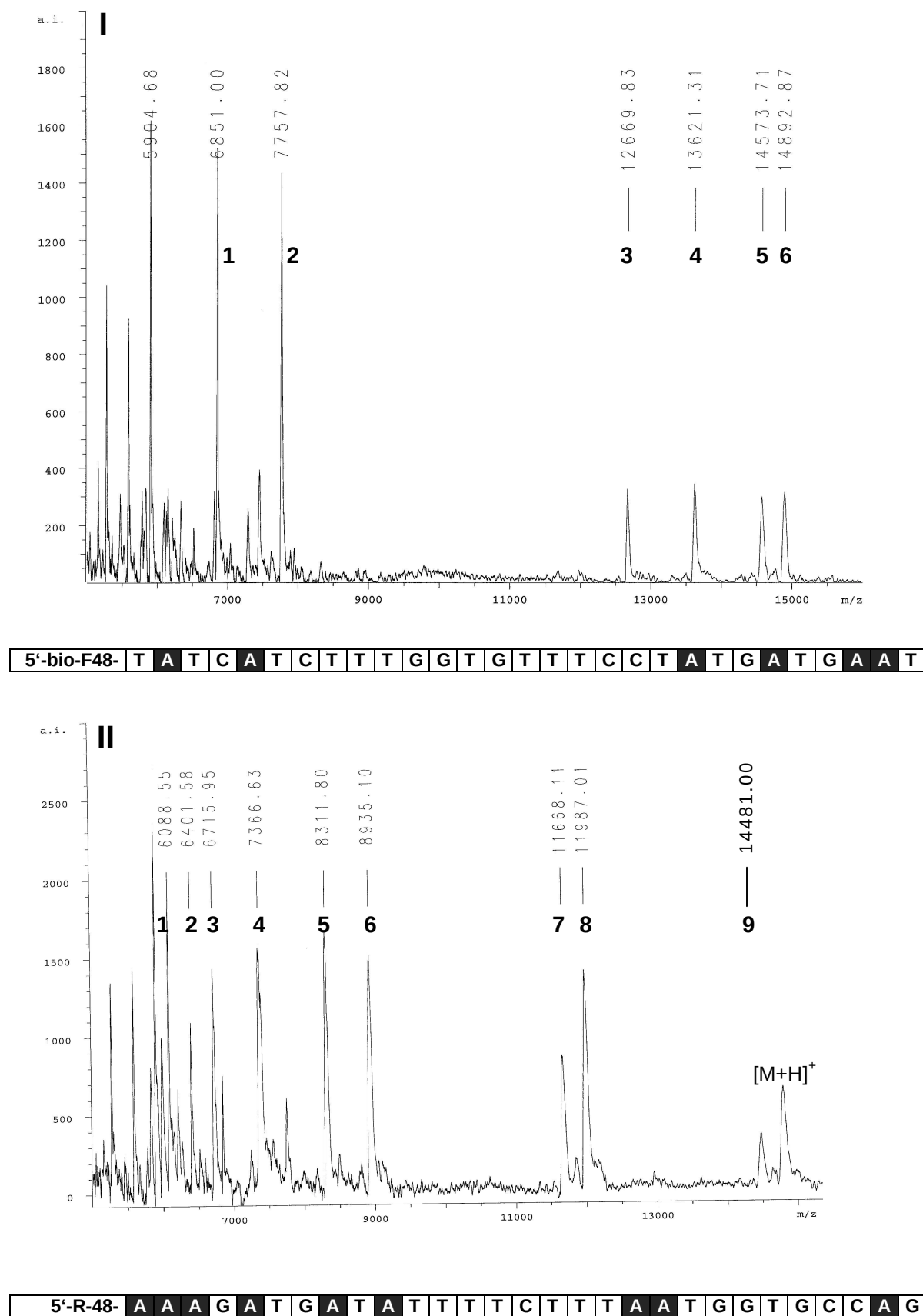


Abbildung 3-11: MALDI-TOF Spektren der A-Reaktion. Spektrum I zeigt die Signale des biotinylierten, Spektrum II die des nicht-biotinylierten Stranges. Alle erwarteten Signale konnten detektiert werden. Ein Vergleich der detektierten Fragmentmassen mit den berechneten findet sich in Tabelle 3-C auf Seite 46.

3 Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS

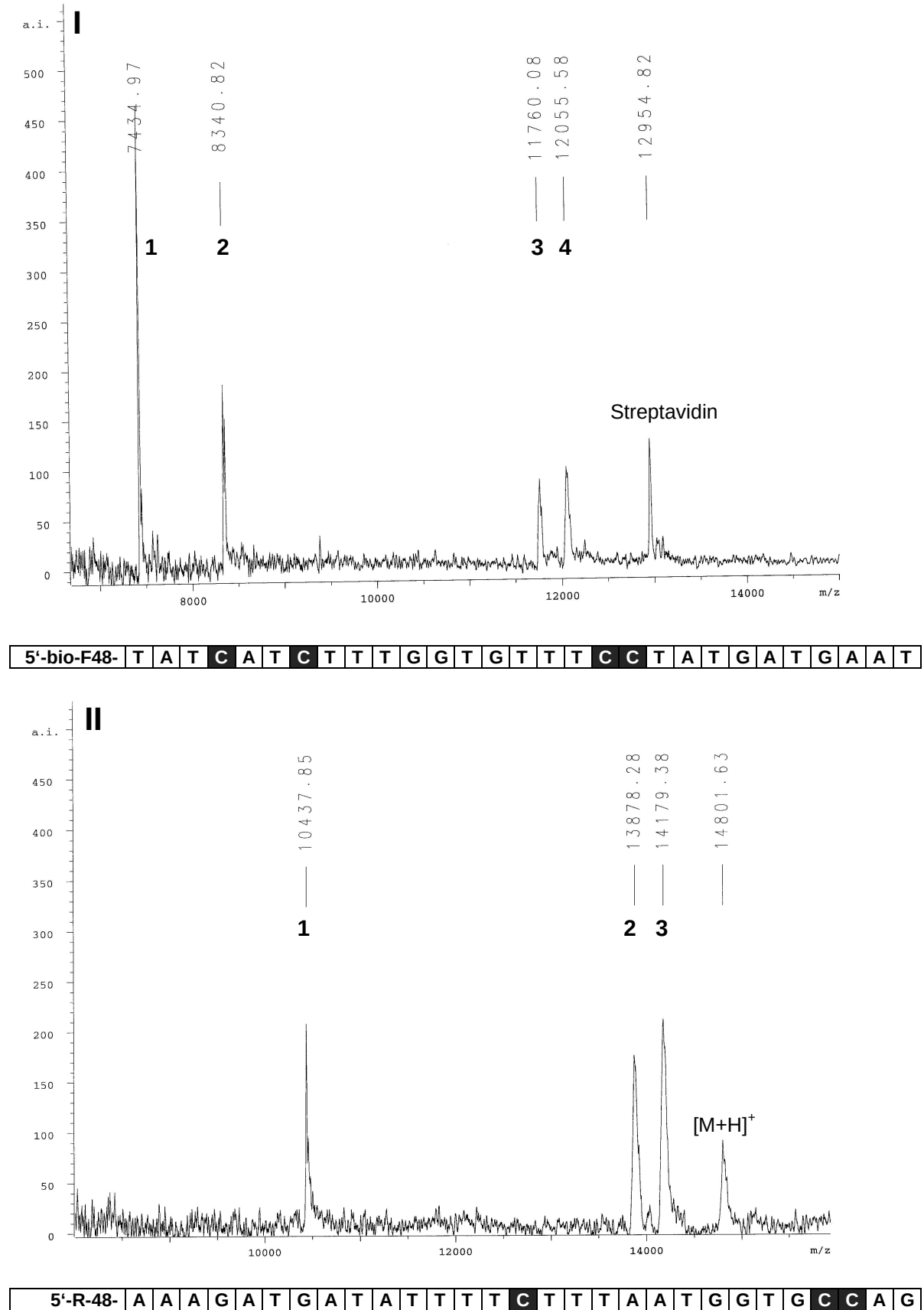


Abbildung 3-12: MALDI-TOF Spektren der C-Reaktion. Spektrum I zeigt die Signale des biotinylierten, Spektrum II die des nicht-biotinylierten Stranges. Das Signal bei 12954 m/z in Spektrum I zeigt eine leichte Verunreinigung durch Streptavidin. Für die berechneten Fragmentmassen vgl. Tabelle 3-C.

Im Gegensatz zu den Spektren der zuvor beschriebenen T-Reaktion ist insbesondere bei der Detektion der biotinylierten Fragmente aus der A- und C-Reaktion ein Abfall der Signalintensitäten in höheren Massenbereichen zu beobachten. Die größere Tendenz zur Fragmentierung durch Basenverlust führt bei Cytidin und den Purinbasen Adenosin und Guanin zu einer Reduzierung der Signalintensitäten langer Fragmente. Die säurekatalysierte Depurinierungsreaktion kann durch Wechselwirkung der DNA-Probe mit der sauren Matrix (z.B. 3-Hydroxypicolinsäure) oder durch intramolekularen Protonentransfer ausgehend vom Phosphatrückgrat des Oligonucleotides eingeleitet werden. Lediglich Thymidin ist von derartigen Fragmentierungen nicht betroffen.

Die folgende Tabelle zeigt die berechneten und detektierten Massen der einzelnen A- und C-terminierten Fragmente beider DNA-Stränge, die Daten der G-Reaktion befinden sich im Anhang, Kap.11.1.

<i>Biotinylierter Strang</i>			<i>Nicht-biotinylierter Strang</i>		
Fragment-Nr.	M_{berechnet} [m/z]	M_{gemessen} (ΔM) [m/z]	Fragment-Nr.	M_{berechnet} [m/z]	M_{gemessen} (ΔM) [m/z]
A - R e a k t i o n					
1 (21-mer)	6 836	6 851 (+15)	1 (20-mer)	6 078	6 088 (+10)
2 (24-mer)	7 742	7 757 (+15)	2 (21-mer)	6 391	6 401 (+10)
3 (40-mer)	12 649	12 669 (+20)	3 (22-mer)	6 704	6 715 (+11)
4 (43-mer)	13 595	13 621 (+26)	4 (24-mer)	7 346	7 366 (+20)
5 (46-mer)	14 542	14 573 (+31)	5 (27-mer)	8 293	8 311 (+18)
6 (47-mer)	14 855	14 892 (+37)	6 (29-mer)	8 910	8 935 (+25)
			7 (38-mer)	11 642	11 668 (+26)
			8 (39-mer)	11 955	11 987 (+32)
			9 (47-mer)	14 443	14 481 (+38)
			[M+H] ⁺	14 772	14 798 (+26)
C - R e a k t i o n					
1 (23-mer)	7 429	7 434 (+5)	1 (34-mer)	10 416	10 437 (+21)
2 (26-mer)	8 336	8 340 (+4)	2 (45-mer)	13 841	13 878 (+37)
3 (37-mer)	11 742	11 760 (+18)	3 (46-mer)	14 130	14 179 (+49)
4 (38-mer)	12 031	12 055 (+24)	[M+H] ⁺	14 772	14 801 (+29)

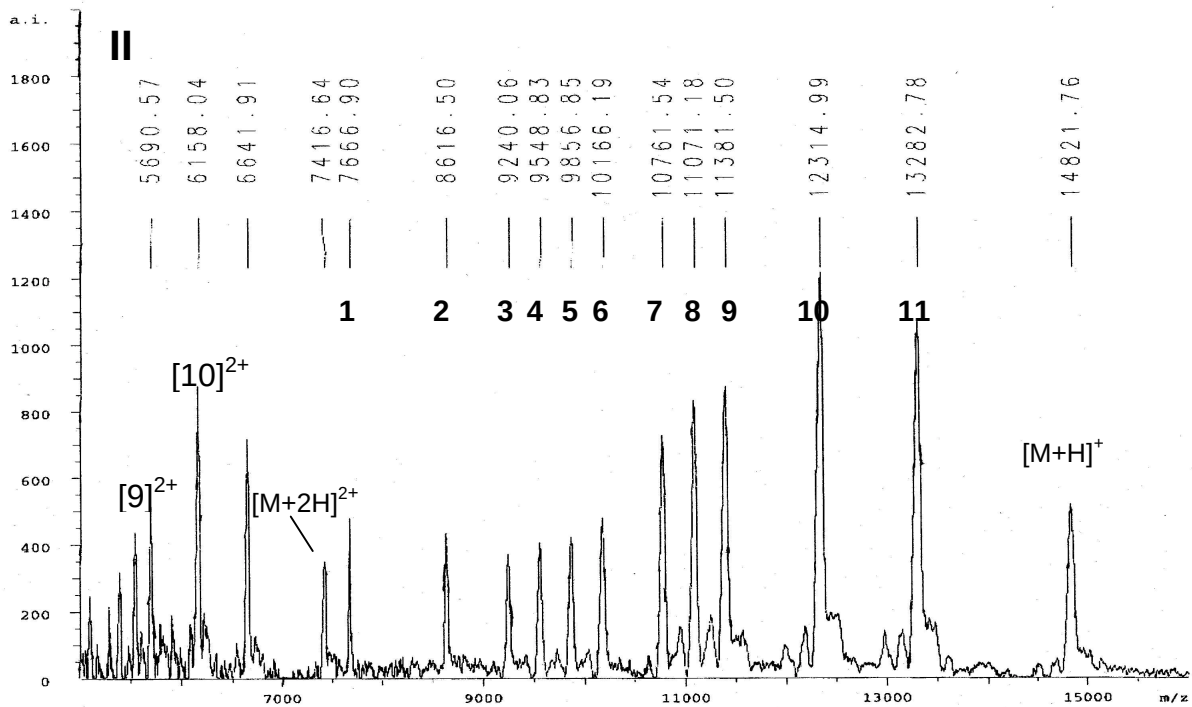
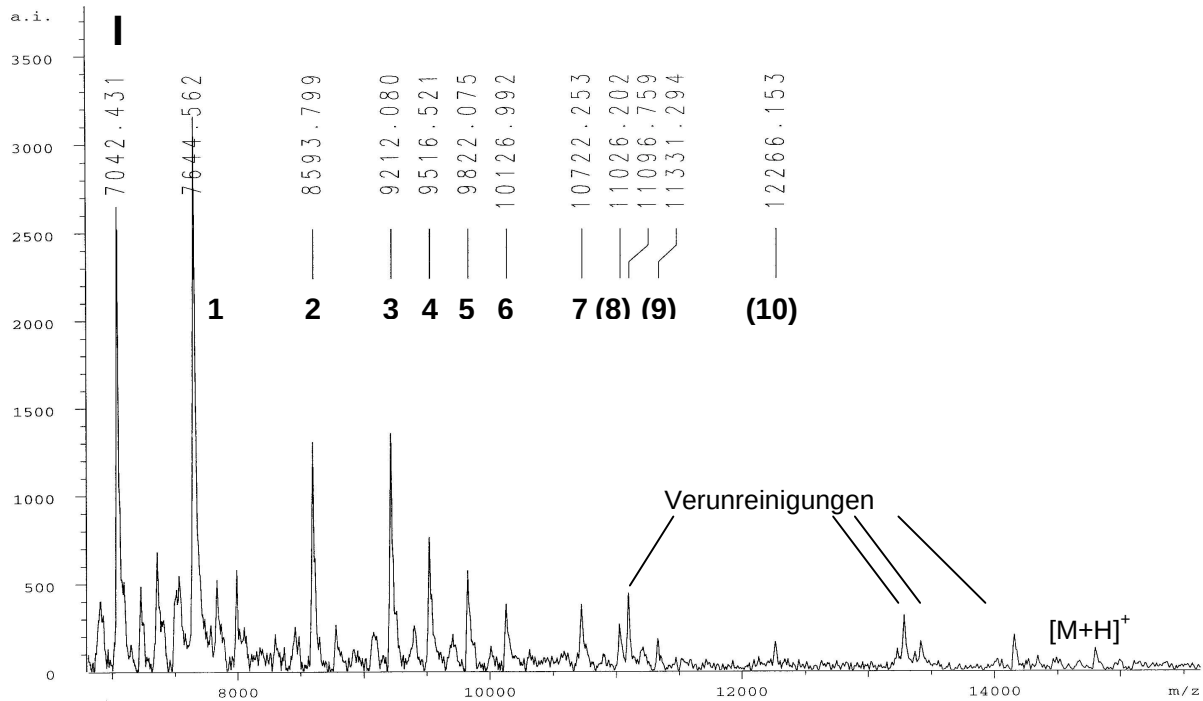
Tabelle 3-C: Berechnete und detektierte Massen der A- und C-Reaktion (vgl. Abb. 3-11 und 3-12).

Die Intensitäten aller detektierten Signale, auch in höheren Massenbereichen, waren für eine Sequenzierung ausreichend. Häufig waren die Signalniveaus über den gesamten Massenbereich ausgeglichen (vgl. z.B. Abb. 3-12, Spektrum II, S. 45). Die Signalintensitäten der T-Reaktion des nicht-biotinylierten 48-mers steigen sogar – wie nach der theoretischen Fragmentverteilung (vgl. Kapitel 1.4.3, Abb. 1-4) erwartet – zu höheren Massen an (Abb. 3-13, Spektrum II), da hier das Problem der Fragmentierung durch Basenverlust nicht auftritt.

Um die Vorteile des hier entwickelten Verfahrens zur Sequenzierung immobilisierter PCR-Produkte zu demonstrieren, wurde das CFTR-Template zum Vergleich auch nach der klassischen Sanger-Methode sequenziert. Die Sanger Sequenzierung wurde analog zur reversen Sanger Sequenzierung ebenfalls an der Festphase durchgeführt. Als Template für die Sequenzierung wurde das mittels PCR amplifizierte, unmodifizierte 48-mer verwendet. Das doppelsträngige Template wurde zunächst an die Streptavidin-Beads immobilisiert. Durch Behandlung mit zweimolarer Ammoniaklösung wurde der Doppelstrang denaturiert, der immobilisierte, Biotin-markierte Strang diente als Matrize in der anschließenden Sequenzierung mit *ThermoSequenase*. Neben dem Enzym, den vier dNTPs und dem Sequenzierprimer R-48 wurde dem Reaktionsansatz noch ein Didesoxynucleotid (ddTTP) als Terminator zugegeben (Verhältnis dNTP/ddNTP = 1:10). Die eigentliche Sequenzierung erfolgt durch eine einmalige Extension-Reaktion bei 72 °C für 4 Minuten. Die Aufreinigung der Terminationsprodukte wurde analog zur reversen Sanger-Methode über das Streptavidin-Biotin-System durchgeführt. Das Sanger-Verfahren erlaubt nur die Sequenzierung des nicht-biotinylierten Stranges.

Abbildung 3-13 auf Seite 48 zeigt die T-Reaktionen (jeweils des nicht-biotinylierten 48-mers) einer konventionellen Sanger Sequenzierung (Spektrum I) und einer reversen Sanger Sequenzierung (Spektrum II) im Vergleich. Die Gegenüberstellung der beiden MALDI-TOF Spektren demonstriert eindrucksvoll die Überlegenheit der reversen Sanger-Methode gegenüber dem klassischen Sanger-Verfahren in Hinblick auf die Signalintensitäten:

3 Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS



5'-R-48- A A A G A T G A T A T T T T C T T T A A T G G T G C C A G

Abbildung 3-13: MALDI-TOF Spektren einer konventionellen Sanger Sequenzierung (Spektrum I) und einer reversen Sanger Sequenzierung (Spektrum II) im Vergleich: Die Spektren zeigen jeweils die T-Reaktion des nicht-biotinylierten Stranges. Während beim klassischen Sanger-Verfahren die Signalintensitäten mit steigender Analytmasse stark abfallen, wirkt die günstige Fragmentverteilung bei einer Exonuclease III-Sequenzierung der Tendenz zur abnehmenden Nachweisempfindlichkeit mit zunehmender Fragmentmasse entgegen.

Bei der nach Sanger generierten Sequenzleiter sind die Signalintensitäten im vorderen Massenbereich hoch, eine genaue Zuordnung der detektierten Signale zu den erwarteten Fragmenten der T-Leiter ist bis etwa 10 000 m/z möglich, allerdings ist bereits in diesem Massenbereich eine dramatische Reduktion der Signalintensitäten zu beobachten. Schon ab ca. 11 000 m/z sind die Signalintensitäten zu gering, um eine eindeutige Zuordnung der Signale zu den Fragmenten zu gestatten. Selbst geringste Verunreinigungen überlagern hier mit höheren Intensitäten die erwarteten Fragmentsignale. In Massenbereichen über 12 000 m/z können keine Signale mehr eindeutig zugeordnet werden, die Sequenz kann nur unvollständig bestimmt werden. Dagegen ist die Intensitätsverteilung der Signale aus der reversen Sanger Sequenzierung genau gegenläufig: Mit zunehmender Analytmasse steigt auch die Intensität der detektierten Signale. Die günstige Fragmentverteilung wirkt erwartungsgemäß der bei der MALDI-TOF Analyse beobachteten Tendenz zur abnehmenden Nachweisempfindlichkeit mit zunehmender Molekülmasse entgegen (vgl. Kapitel 1.4.3, Abb. 1-4).

Man kann sich leicht vorstellen, dass die konventionelle Sanger-Methode bei längeren Sequenzen, die z.B. bei der Untersuchung größerer Mutationsbereiche bestimmt werden müssen, problematisch ist. Dagegen scheint eine Erweiterung der Leselänge für das reverse Sanger Verfahren möglich zu sein.

Die detektierten Fragmentmassen aus der Sanger Sequenzierung weisen jedoch, verglichen mit den Signalen der reversen Sanger Sequenzierung, eine höhere Übereinstimmung mit den berechneten Massen auf, da hier der Effekt der Massenheterogenität nicht zum Tragen kommt (vgl. Tabelle 3-D, S. 50). Hier bietet die reverse Sanger-Sequenzierung jedoch durch das Konzept des Massenausgleichs durch Einbau zusätzlicher, massenmodifizierter Nucleotide noch Optimierungspotenzial.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene massenmodifizierte Nucleosidtriphosphate auf ihre mögliche Verwendbarkeit in der reversen Sanger Sequenzierung untersucht.

Fragment-Nr.	$M_{\text{berechnet}}$ [m/z]	$M_{\text{gemessen}} (\Delta M)$ [m/z]	
		Sanger	Reverse Sanger
1 (25-mer)	7 651	7 644 (-7)	7 666 (+15)
2 (28-mer)	8 597	8 593 (-4)	8 616 (+19)
3 (30-mer)	9 215	9 212 (-3)	9 240 (+25)
4 (31-mer)	9 519	9 516 (-3)	9 548 (+29)
5 (32-mer)	9 823	9 822 (-1)	9 856 (+33)
6 (33-mer)	10 127	10 126 (-1)	10 166 (+39)
7 (35-mer)	10 721	10 722 (+1)	10 761 (+40)
8 (36-mer)	11 025	(11 026)	11 071 (+46)
9 (37-mer)	11 329	(11 331)	11 381 (+52)
10 (40-mer)	12 260	(12 266)	12 314 (+54)
11 (43-mer)	13 222	-	13 282 (+60)
$[M+H]^+$ (48-mer)	14 772	-	14 821 (+39)

Tabelle 3-D: Berechnete und detektierte Massen der T-Reaktionen einer konventionellen Sanger Sequenzierung und einer reversen Sanger Sequenzierung im Vergleich.

3.1.5.3 Sequenzierung von genomischer DNA

Nach der vollständigen Sequenzierung des synthetischen Templates (aus T87 amplifiziertes 48-mer) sollte die neue Methode zur DNA-Sequenzierung an genomischer DNA demonstriert werden. Insbesondere die Polymerasekettenreaktion zur Generierung des phosphothioat-markierten 48-mers stellt bei der Verwendung von genomischer DNA als Template höhere Anforderungen an die DNA-Polymerase, als der Einsatz des hochaufgereinigten synthetischen Templates T87. Im Rahmen dieser Arbeit stand genomische DNA von verschiedenen gesunden Individuen zur Verfügung.

Drei DNA-Polymerasen, die *Pfu(exo-)*-, die *HotStar Taq*- sowie die *AmpliTaq Gold* DNA-Polymerase wurden in der Amplifizierungsreaktion mit genomischer DNA eingesetzt. Zur Etablierung der Reaktionsbedingungen sollten zunächst nur unmodifizierte PCR-Produkte unter Übernahme der Reaktionsparameter aus der PCR mit synthetischem Template generiert werden. Eine gelelektrophoretische Untersuchung der PCR-Produkte ergab jedoch, dass bei

dem bisher verwendeten Temperaturprogramm (25 Zyklen á 95 °C, 50 °C und 72 °C, je eine Minute) kein oder nur sehr wenig PCR-Produkt entstand. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen war daher erforderlich. Zur Unterdrückung von unerwünschten Nebenreaktionen wurde daher zunächst die Reaktionszeit jedes einzelnen Temperaturzyklus auf 45 Sekunden verkürzt. Um eine genügend hohe Ausbeute an PCR-Produkt zu erzielen, wurde die Zahl der Zyklen in Fünferschritten von 25 auf 45 Zyklen erhöht. Mit diesem Programm konnte die Ausbeute an PCR-Produkt zwar gesteigert werden, jedoch wurden auch unerwünschte Nebenprodukte generiert. Daher wurden in einem zweiten Schritt die Reaktionszeiten für die Denaturierung sowie das Primer-Annealing weiter auf 20 Sekunden, die Reaktionszeit für die Polymerisierungsreaktion auf 30 Sekunden verkürzt. Eine Erhöhung der Annealingtemperatur auf 53-56 °C lieferte bei diesen Bedingungen mit *Pfu(exo-)* DNA-Polymerase nebenproduktfrei PCR-Produkte in genügender Ausbeute. Unter diesen optimierten PCR-Bedingungen konnten auch mit der *HotStar Taq* DNA-Polymerase gute Ergebnisse erzielt werden.

Die anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes mit Exonuclease III konnte analog zur Sequenzierung am immobilisierten synthetischen Template durchgeführt werden. Die MALDI-TOF Spektren der Sequenzierprodukte unterschieden sich in ihrer Massengenauigkeit hierbei nicht von denen des synthetischen Templates. Allerdings waren die Intensitäten der detektierten Signale gering, so dass Signale im vorderen Massenbereich wegen des schlechten Signal/Rauschverhältnisses nur schwer zu bestimmen waren. Zudem war eine Aufsummierung vieler Einzelschüsse erforderlich, um auswertbare Spektren zu erhalten. Die Aufnahme der Spektren war daher insgesamt zeitintensiver. Abbildung 3-14 zeigt als Beispiel das Spektrum der T-Leiter des nicht-biotinylierten Stranges.

Das neu etablierte Konzept zur Sequenzierung immobilisierter PCR-Produkte mit Exonuclease III konnte erfolgreich auch an genomischer DNA als Template demonstriert werden.

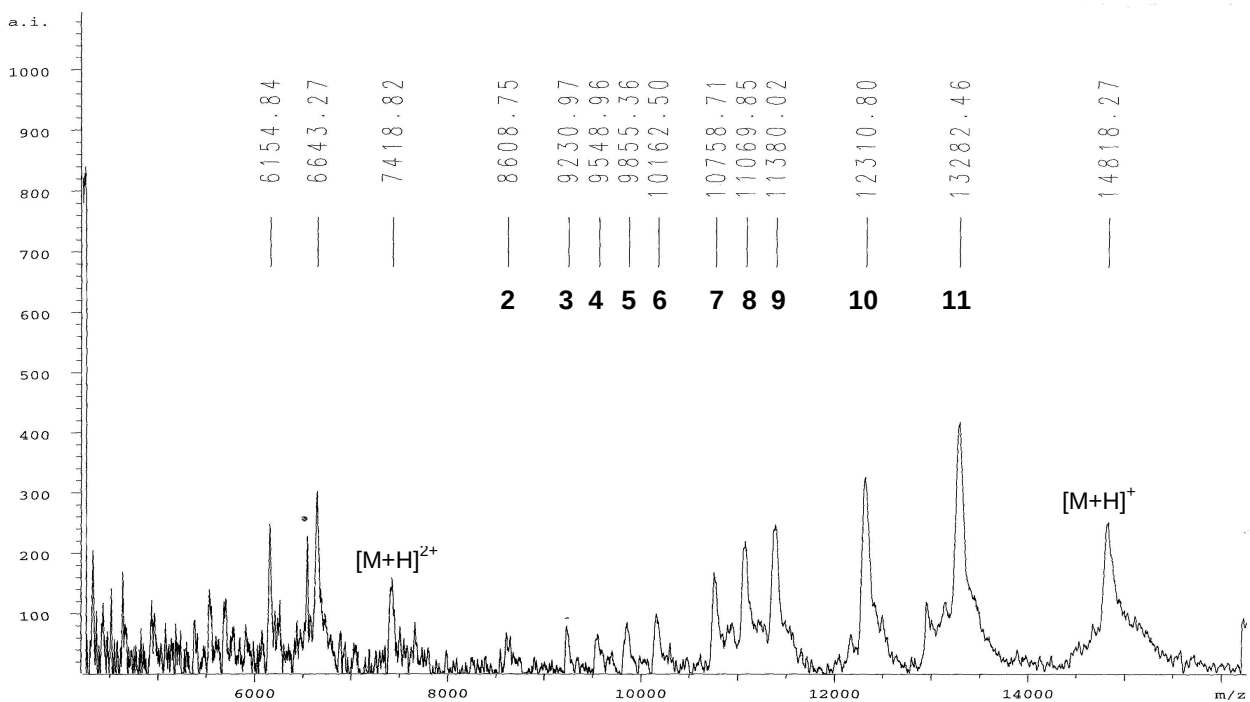


Abbildung 3-14: MALDI-TOF Massenspektrum der T-Reaktion des nicht-biotinylierten Stranges. Als Template in der PCR wurde genomische DNA eines gesunden Individuums verwendet. Das Spektrum erlaubt die genaue Zuordnung von 10 der erwarteten 11 Signale. Wegen der geringen Signalintensität im vorderen Massenbereich konnte das kürzeste Fragment (Nr. 1) nicht eindeutig bestimmt werden (vgl. Tabelle 3-B für die berechneten Massen).

3.2 Reverse Sanger Sequenzierung am β -Actin-System

3.2.1 Das Konzept zur Einzelstrangsequenzierung am β -Actin-System

Neben dem CFTR-System zur Sequenzierung kurzer doppelsträngiger PCR-Produkte wurde ein zweites Konzept zur Sequenzierung einzelsträngiger DNA mit Exonuclease III untersucht: Bei der Sequenzierung am β -Actin-System wird zunächst ein unmodifizierter DNA-Doppelstrang (160-mer) amplifiziert. Durch die Verwendung eines biotinylierten Primers wird hier analog zum CFTR-System eine Biotinmarkierung in das PCR-Produkt eingeführt, durch die das 160-mer an die Streptavidin-Festphasenbeads immobilisiert werden kann. Der Doppelstrang wird denaturiert, und in einer anschließenden Primerverlängerungsreaktion dient der biotinylierte Strang erneut als Template für den Aufbau eines phosphothioatmarkierten Gegenstranges.

Der in dieser zweiten Polymerisationsreaktion verwendete Primer ist dabei so gewählt, dass ein DNA-Duplex mit einem 3'-Überhang produziert wird, der einen Exonuclease-Verdau nur am thiomodifizierten Gegenstrang zulässt. Abbildung 3-15 zeigt das Konzept zur Einzelstrangsequenzierung am β -Actin-System.

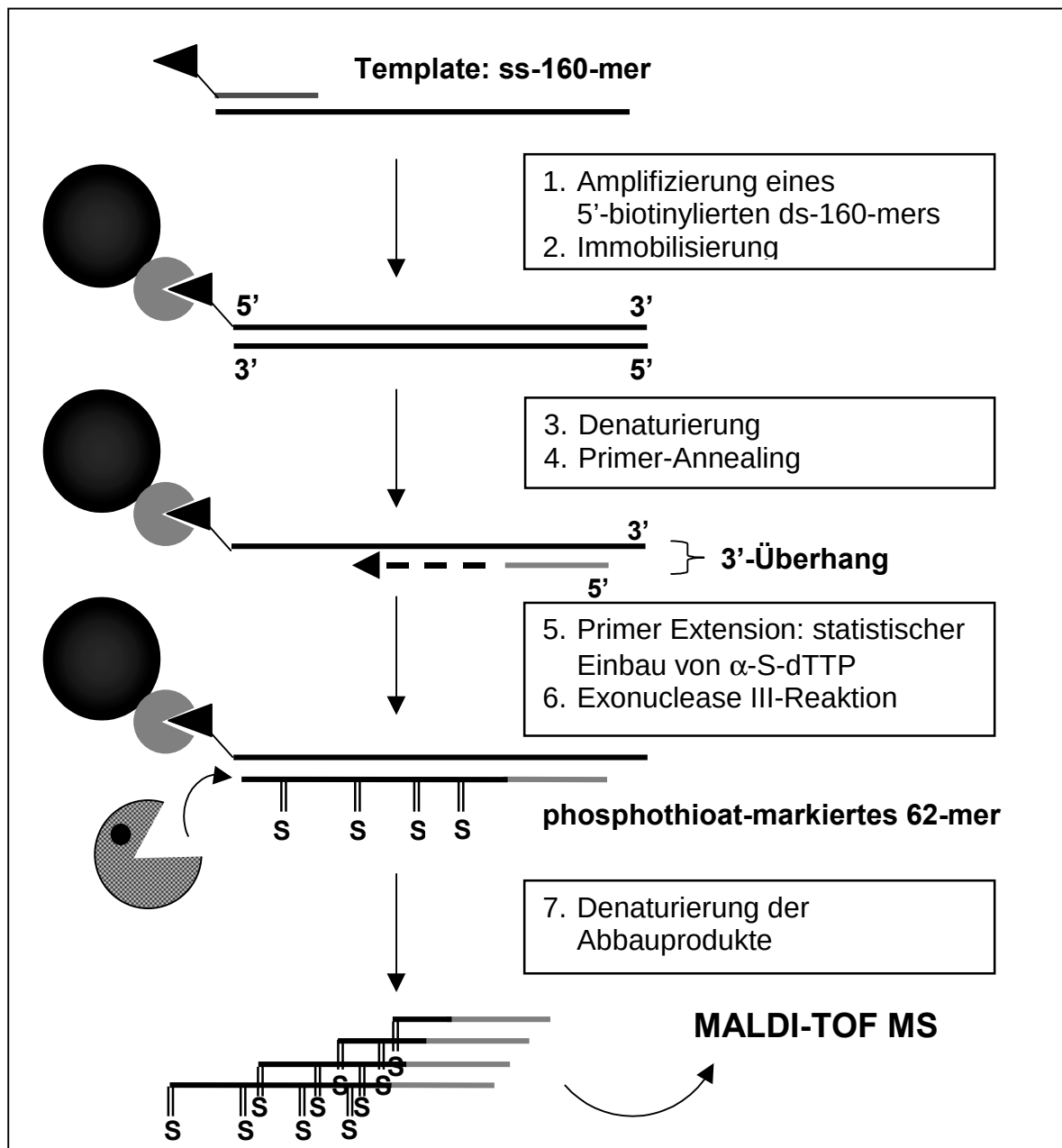


Abbildung 3-15: Konzept zur Einzelstrangsequenzierung am phosphothioat-markierten Primer-Extension-Produkt (ss-62-mer). Durch Anlagerung eines zweiten Primers an das immobilisierte Template entsteht ein 3'-Überhang, der einen Exonuclease III-Abbau nur noch an einem DNA-Strang erlaubt.

Analog zur klassischen Sanger-Methode kann bei diesem Konzept nur an einem Strang sequenziert werden; zur vollständigen Sequenzbestimmung sind hier also 4 basenspezifische Reaktionen notwendig. Es wurde jedoch erhofft, dass mit dieser Methode eine Erweiterung des Lesebereichs erzielt werden kann, da eine einmalige Primer Extension Reaktion zum statistischen Einbau der α -S-dNTPs weniger anspruchsvoll ist, als eine über mindestens 25 Zyklen erfolgende PCR.

Theoretisch kann es beim CFTR-Konzept zur Doppelstrangsequenzierung außerdem zu Fehlabbrüchen kommen, wenn die Exonuclease an einem der beiden DNA-Stränge frühzeitig auf eine Phosphothioatbindung trifft und ein langes DNA-Fragment erzeugt. Für die Sequenzierung am Gegenstrang entsteht so ein kurzes Teilstück, an welchem dem doppelstrangspezifischen Enzym nur noch der zu sequenzierende Einzelstrang zur Verfügung steht. Theoretisch müsste diese Situation zu einem Abbruch der enzymatischen Reaktion und somit zur Generierung eines unspezifisch terminierten Fragmentes führen. Abbildung 3-16 verdeutlicht das Problem, das bei einer Einzelstrangsequenzierung vermieden wird.

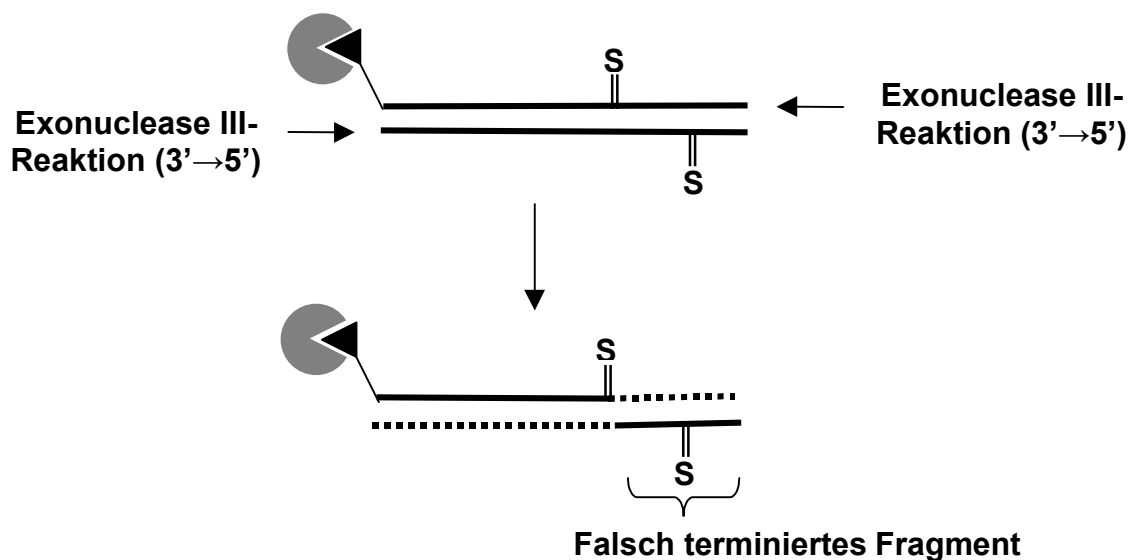


Abbildung 3-16: Durch den Mechanismus der DNA-Spaltung durch Exonuclease III können theoretisch bei ungünstiger Verteilung der Phosphothioatbindungen falsch terminierte Fragmente entstehen, wenn ein doppelsträngiges Template in der Sequenzierung verwendet wird.

3.2.2 Versuche zur Sequenzierung am immobilisierten Template

3.2.2.1 Amplifizierung des doppelsträngigen 160-mers

Das Konzept zur Einzelstrangsequenzierung sieht zunächst die Amplifizierung eines doppelsträngigen, unmodifizierten 160-mers in einer Polymerasekettenreaktion vor. Hierfür stand ein über PCR erhaltenes und aufgereinigtes, einzelsträngiges 160-mer als Template zur Verfügung. In einem zweiten Schritt erfolgt dann der Aufbau des zu sequenzierenden phosphothioat-markierten Einzelstranges in einer Primer Extension Reaktion. Die folgende Abbildung zeigt die Sequenzen der verwendeten Primer und des synthetischen Templates:

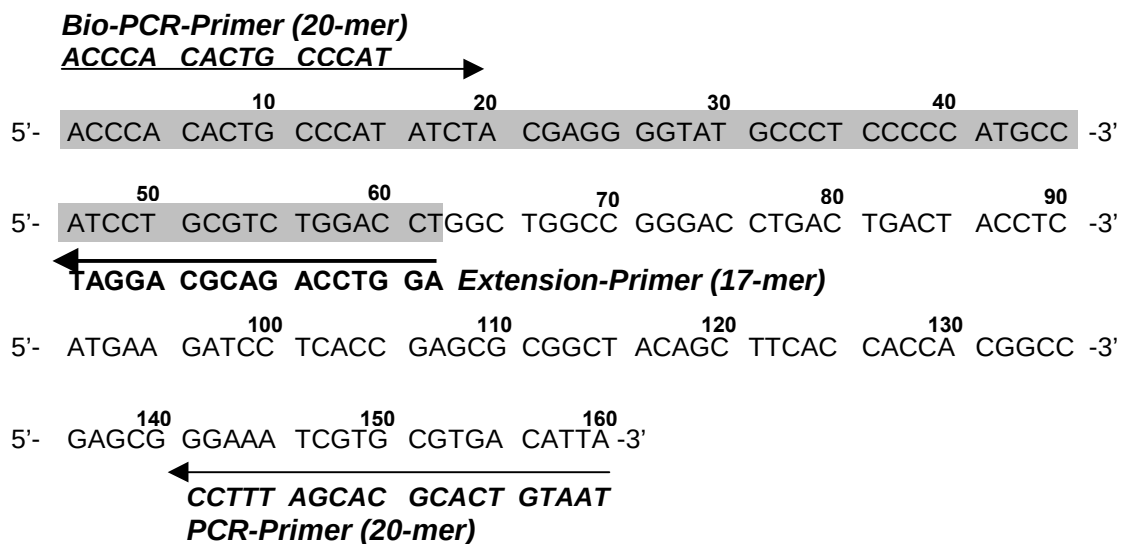


Abbildung 3-17: Sequenzen des synthetischen Templates (160-mer), der beiden PCR-Primer sowie des in der Primer Extension Reaktion verwendeten Primers. Grau unterlegt ist außerdem die Komplementärsequenz des Elongationsproduktes (ss-62-mer) dargestellt.

Die Amplifizierung des unmodifizierten 160-mers erfolgte in einer asymmetrischen PCR mit der zweifachen Menge des nicht-biotinylierten Gegenprimers. 40 pmol des reversen Primers und 20 pmol des biotinylierten forward Primers wurden mit dem Template (synthetisches 160-mer), dem dNTP-Mix sowie der DNA-Polymerase (*Pfu*(exo-) oder *Taq*) und dem jeweiligen Reaktionspuffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Das Temperaturprogramm wurde mit Zykluszeiten von je einer Minute bei 95, 50 und 70 °C und 25 Reaktionszyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch untersucht. Abbildung 3-18 zeigt ein 12 %iges Polyacrylamidgel mit den Banden des amplifizierten 160-mers:

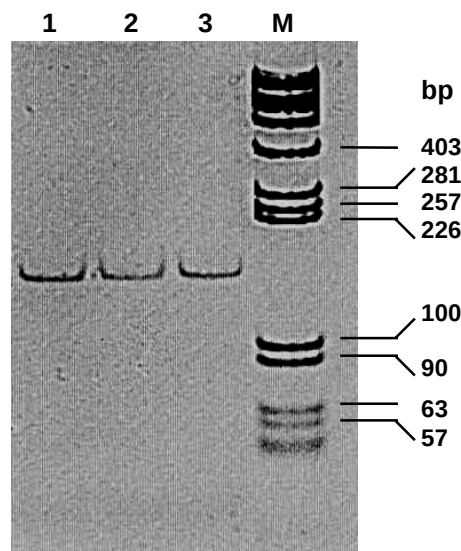


Abbildung 3-18: Aufnahme eines 12 %igen Polyacrylamidgels mit unmodifizierten PCR-Produkten (160 bp). Die Bahnen 1-3 zeigen jeweils die Banden des PCR-Produktes, aufgetragen wurde jeweils $\frac{1}{10}$ eines PCR-Ansatzes (5 μ l). Bahn M zeigt den Standard pBR 322, *Alu I*-geschnitten (2 μ l).

3.2.2.2 Primer Extension Reaktion

In der Primer Extension Reaktion zur Generierung des phosphothioat-markierten Einzelstranges dient der biotinylierte Strang des zuvor amplifizierten 160-mers als Template. Das doppelsträngige PCR-Produkt musste daher zunächst denaturiert werden. Hierzu wurde das PCR-Produkt zunächst durch Zugabe von 45 μ l einer Streptavidin-Beads-Lösung und 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur an die Festphase immobilisiert. Anschließend

erfolgte die Denaturierung durch Behandlung mit verdünnter Ammoniaklösung. Die denaturierte DNA wurde abpipettiert und der an der Festphase immobilisierte Strang (ss-160-mer) mit einer Tris-HCl-Lösung mehrfach gewaschen.

Für die Primer Extension Reaktion zur Generierung des phosphothioat-markierten Einzelstranges wurde ein Reaktionsmix bestehend aus dem Extension-Primer (20 pmol), der Polymerase, den vier Desoxynucleosidtriphosphaten sowie einem α -S-dNTP (in diesem Fall α -S-dTTP, 50 %) als Terminator hergestellt, und zu dem an den Streptavidin-Beads immobilisierten Template pipettiert. Die Primerverlängerung wurde in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 μ l mit einem Temperaturprogramm von 1 min bei 80 °C, 3 min bei 55 °C (Primer-Annealing) und 4 min bei 72 °C (Verlängerung) durchgeführt. Nach Abschluss des Programms wurde die Lösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, dabei hybridisiert der modifizierte Strang vollständig an den immobilisierten Strang.

Vor der nun folgenden Sequenzierung mit Exonuclease III wurde das phosphothioat-markierte Elongationsprodukt (ss-62-mer) massenspektrometrisch untersucht. Hierzu wurde der DNA-Duplex durch Behandlung der Streptavidin-Beads mit verdünnter Ammoniaklösung denaturiert und der modifizierte Strang in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Analog zur Probenpräparation unter Kapitel 3.1.5 wurden die Proben auf einen mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix beladenen Probenträger aufgetragen und in die Vakuumschleuse des Massenspektrometers eingeführt.

Die MALDI-TOF Analyse des Elongationsproduktes erwies sich als äußerst schwierig, da die Ausbeute des thio-modifizierten 62-mers sehr gering war, was bei der massenspektrometrischen Untersuchung eine schlechte Auflösung des Spektrums zur Folge hat. Statt der erwarteten Molekülmasse von ca. 19 447 m/z wurde ein Signal bei 18 068 m/z detektiert (vgl. Abb. 3-19, S. 58). Aufgrund der extremen Peakbreite lässt sich jedoch keine genaue Aussage darüber treffen, ob es sich hier um das erwartete 62-mer handelt, oder ob die Extension Reaktion möglicherweise unspezifisch abgebrochen wurde. Daneben wurde bei 6405 m/z ein weiteres Signal detektiert, das dem nicht-umgesetzten biotinylierten Primer aus der Amplifizierungsreaktion des 160-mers zugeordnet werden kann (Masse des Bio-Primers = 6388 Da). Eine Sequenzierung des Extensionsproduktes durch Inkubation mit Exonuclease III

(Reaktionsbedingungen wie unter Kap. 3.1.5) wurde durchgeführt, es konnten jedoch keine Terminationsfragmente mittels MALDI-TOF MS detektiert werden.

Eine Erhöhung der Ausbeute an Extensionsprodukt könnte möglicherweise durch die Einführung mehrere Elongationszyklen während der Primer Extension Reaktion erzielt werden. Hier ist jedoch viel Optimierungsarbeit in Hinblick auf die Reaktionsbedingungen zu leisten, so dass dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

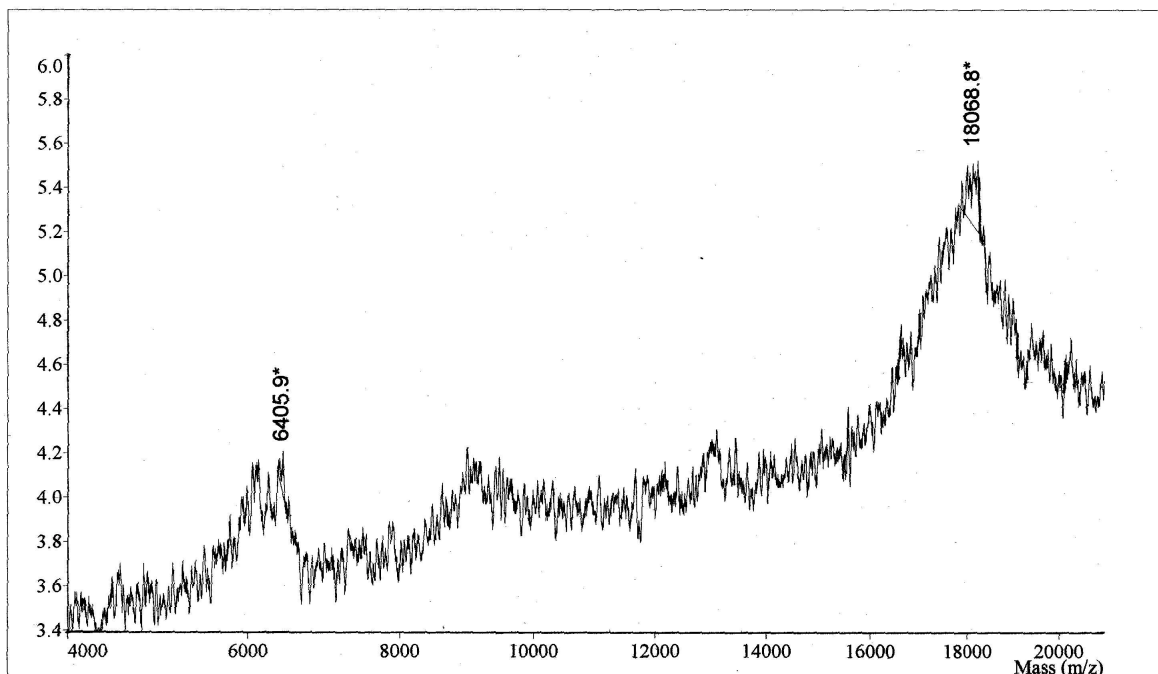


Abbildung 3-19: MALDI-TOF Spektrum des Primer-Extension-Produktes. Erwartet wurde eine Masse von etwa 19 447 m/z für das korrekte 62-mer. Aufgrund der schlechten Auflösung des Spektrums kann das detektierte Signal bei 18 068 m/z nicht eindeutig dem erwarteten Elongationsprodukt zugeordnet werden.

4 Massenmodifizierte Nucleotide für die reverse Sanger Sequenzierung

4.1 Allgemeine Anforderungen an modifizierte Nucleotide

Das Konzept der reversen Sanger Sequenzierung via MALDI-TOF MS sieht zum Ausgleich der Massenheterogenität den vollständigen Ersatz je eines der natürlichen Nucleosidtriphosphate durch den entsprechenden α -S-Terminator, sowie ein zweites massenmodifiziertes Nucleotidanalogen in den basenspezifischen Reaktionsansätzen vor.

Jedes Reaktionsgemisch für die Generierung eines phosphothioat-markierten Templates (48-mer) enthält demnach neben drei natürlichen dNTPs noch zwei auf unterschiedliche Weise modifizierte Nucleosidtriphosphate. Der Einbau *beider* Modifikationen in den DNA-Strang während der Polymerisierungsreaktion ist hierbei eine wichtige Voraussetzung. Modifizierte Nucleotide müssen daher verschiedene Anforderungen erfüllen, um für einen Einsatz in der reversen Sanger Sequenzierung in Frage zu kommen:

1. Massenmodifizierten dNTPs und α -S-Terminatoren müssen gemeinsam Substrat für mindestens eine DNA-Polymerase sein.
2. Modifikationen am Nucleotid sollten weder die Watson-Crick-Basenpaarung beeinträchtigen, noch dürfen sterische Wechselwirkungen mit der Polymerase auftreten.
3. Die Nucleotidanaloga müssen das natürliche Nucleotid in jeder Position der vorgegebenen Sequenz spezifisch ersetzen können.
4. Bei gleichzeitiger Verwendung beider Modifikationen darf die Polymerase nicht zwischen dem α -S-dNTP (Terminator) und dem massenmodifizierten dNTP diskriminieren, damit der statistische Einbau der Terminatoren gewährleistet ist. Ein leichte Bevorzugung einer Modifikation kann eventuell durch geschickte Wahl des Verhältnisses [α -S-dNTP/massenmodifiziertes dNTP] im PCR-Reaktionsansatz ausgeglichen werden.
5. Während der Sequenzierreaktion mit Exonuclease III müssen sich die massenmodifizierten Nucleotide – im Gegensatz zu den α -S-Terminatoren – wie ihre natürlichen Analoga verhalten. Es darf nicht zu einem Abbruch der enzymatischen Reaktionen kommen. Die Modifikation sollte also nicht an einer Position eingeführt werden, die direkt an der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes beteiligt ist.

Abbildung 4-1 zeigt das natürliche Thymidin-5'-triphosphat. An der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist bei enzymatischen Reaktionen wohl hauptsächlich der Triphosphat-Teil des Moleküls – bzw. bei inkorporierten Nucleotiden die α -Phosphatgruppe – als aktive Seite (Bindungsstelle) beteiligt. Modifikationen können theoretisch sowohl an der Base, als auch an der Zuckereinheit eingeführt werden.

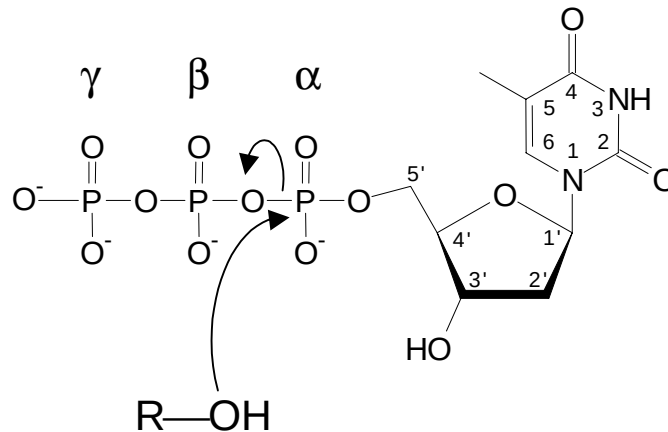


Abbildung 4-1: Thymidin-5'-triphosphat. Angedeutet der Mechanismus der von den DNA-Polymerasen katalysierten DNA-Synthese.

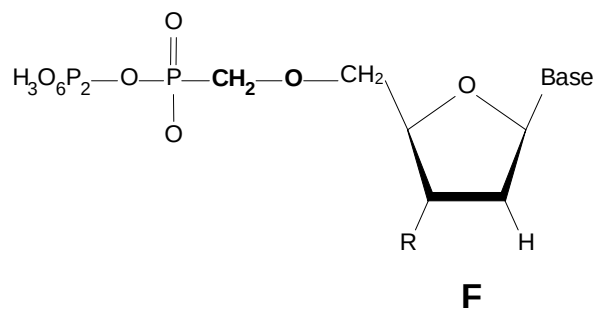
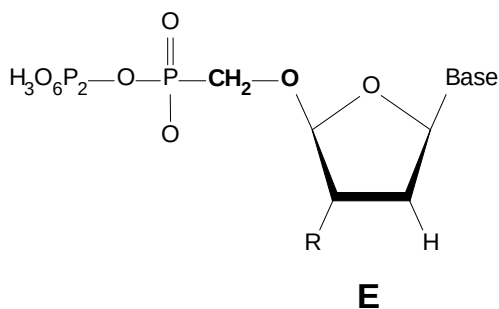
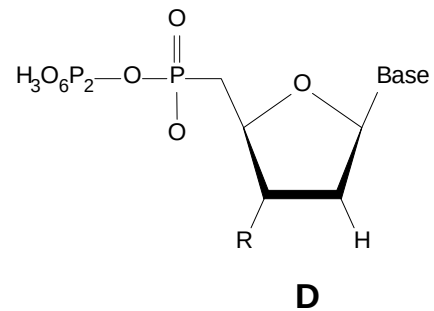
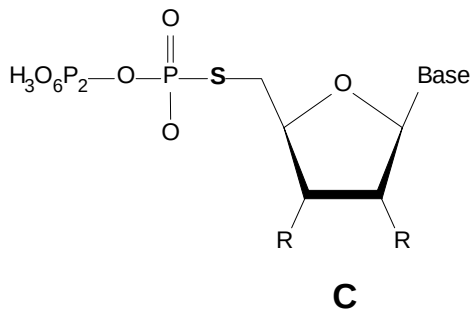
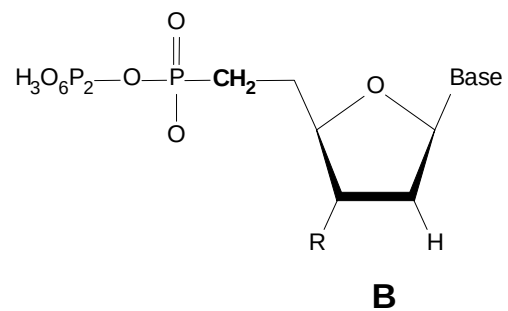
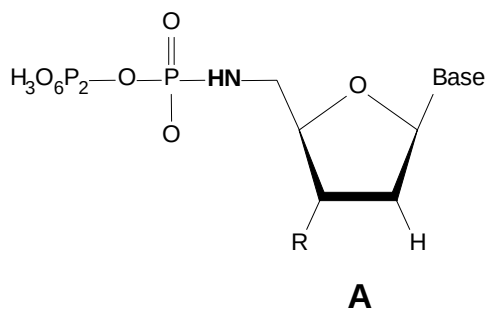
Bei der Suche nach Modifikationen, die die Masse des Nucleotids um 16 Dalton erhöhen und somit mit der Masse ihres α -S-Analogons (Terminator) übereinstimmen, sollten folgende Überlegungen berücksichtigt werden:

4.1.1 Modifizierung der Riboseeinheit

Die 2'-Desoxyribose ist direkt an der Bildung der Diesterbindungen für das Zucker-Phosphat-Rückgrat des DNA-Stranges beteiligt. Modifikationen an 2'- bzw. 3'-Position der Ribose sind bekannt, derart modifizierte Nucleotide werden häufig als Terminatoren bei Sequenzierungen verwendet^[107-109], da sie die Polymerasen inhibieren bzw. zum Kettenabbruch führen. Für die Modifizierung im Sinne der reversen Sanger Sequenzierung kommen jedoch nur solche Positionen am Zucker in Frage, die nicht in die Enzymerkennung oder Bindungsbildung eingreifen.

Mögliche Positionen sind zum einen der Ringsauerstoff am 4'-Kohlenstoff, sowie der neben der Phosphodiester-Bindungsstelle gelegene Kohlenstoff an Position 5' (vgl. Abbildung 4-1).

Bereits seit längerem bekannt sind der Ersatz des Sauerstoffs an Position C-5' in dNTPs und rNTPs durch eine NH-^[110] (A), CH₂-Gruppe^[111] (B) oder die Substitution durch Schwefel^[112,113] (C), die Eliminierung des Sauerstoffs zugunsten der Bildung einer P-C-Bindung^[114] (D), der Austausch der Positionen der 5'-O- und 5'-CH₂-Gruppe^[115] (E), sowie die Verlängerung um eine CH₂-Gruppe^[116] (F) (vgl. Abb. 4-2, Formeln A-F).



Mit R = H oder OH

Abbildung 4-2: C-5'-modifizierte Nucleosidtriphosphate

Nucleotidanaloga vom Typ A werden mit relativ hoher Effektivität von der *DNA-Polymerase I* in den DNA-Strang inkorporiert, während Komponenten vom Typ D von diesem Enzym nicht als Substrat akzeptiert werden. Modifikationen vom Typ E können natürliche dNTPs in Reaktionen mit *HIV Reverser Transcriptase* mit guten Inkorporationsraten ersetzen, während solche vom Typ F in der DNA-Synthese mit dem gleichen Enzym und anderen untersuchten Reversen Transcriptasen 100 bis 200 Mal weniger aktiv sind als dNTPs. Verbindungen vom Typ C, die an Position 5' ein Schwefel- statt des Sauerstoffatoms tragen, sind bereits seit 1974 bekannt und wurden ebenfalls an einigen wenigen DNA-Polymerasen getestet. Es erwies sich, dass diese thiomodifizierten Nucleotide kein Substrat für die *E.coli DNA-abhängige RNA-Polymerase* sowie die *DNA-Polymerase I* waren^[112,113]. Allerdings wurden diese Verbindungen lediglich dünnschichtchromatographisch charakterisiert. In jüngerer Zeit wurden zwei 5'-Thiothymidinderivate auf ihre Substrateigenschaften untersucht^[117]. Während die *DNA-Polymerase α* und die *DNA-Polymerase β* sowie die *HIV Reverse Transkriptase* mit diesen Verbindungen nicht interagierten, zeigte 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-triphosphat bei Untersuchungen mit *DNA-Polymerase I* sowie *AMV Reverser Transcriptase* schwache Substrataktivität. Eine Voraussage über die Substrateigenschaften dieser Verbindung bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DNA-Polymerasen zu treffen ist daher schwierig.

Ebenfalls seit den 1960er und 1970er Jahren besteht ein Interesse an der Synthese von biologisch aktiven Nucleosidanaloga mit alternativen Heteroatomen wie Stickstoff, Selen oder Schwefel in Position 4' der Ribose. Von den untersuchten Heteroatom-substituierten Zuckern zeigten die 4'-thio-modifizierten Nucleoside das beste biologische Profil^[118-121]. Aufgrund erheblicher präparativer Schwierigkeiten in der Synthese von 4-Thio-2-desoxy Kohlenhydratderivaten war 4'-Thio-5-fluoro-2'-desoxyuridin^[122] (vgl. Abb. 4-3, G) lange Zeit das einzige, synthetisch darstellbare 4'-Thio-2'-desoxyribonucleosid. 1996 gelang Walker und Mitarbeitern dann erstmals die Synthese eines 4'-Thio-2'-desoxynucleosid-5'-triphosphates: 4'-Thio-5-ethyl-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (TEDUTP)^[123] (H).

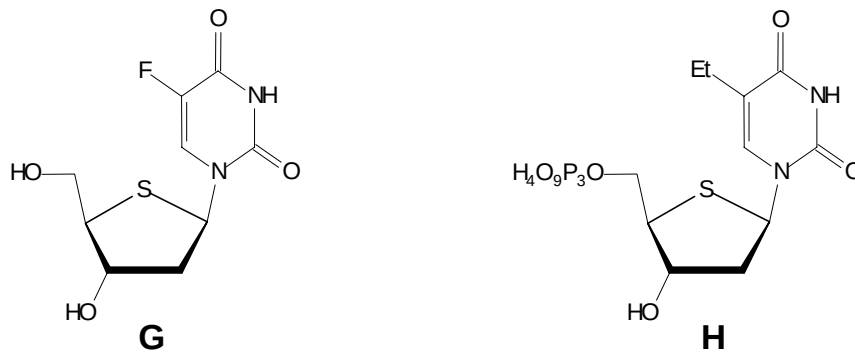


Abbildung 4-3: 4'-Thio-2'-desoxyribonucleosidanaloga

Über die Akzeptanz 4'-Thio-2'-desoxyribonucleotidanaloga durch DNA-Polymerasen ist bislang aufgrund der geringen Zahl an Modifikationen noch wenig bekannt, die Verbindung G wird jedoch von der *DNA-Polymerase α*, der *Terminalen Desoxynucleotidyl Transferase*, sowie der *AMV* und der *HIV Reversen Transcriptase* nur mit geringer Effektivität als Substrat akzeptiert.

4.1.2 Modifizierung der Base

Der Einfluss der Base im Enzym-Substrat-Komplex bei der DNA-Synthese ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Fähigkeit der Basen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit bestimmter räumlicher Ausrichtung allein das erkennende Element für die spezifische Basenpaarung repräsentieren. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Spezifität – insbesondere bei der Replikation – durch Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen allein nicht erklärt werden kann. So können z.B. die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen im Thymidintriphosphat (vgl. Abb. 4-1, Position 2 und 4) durch Fluor ersetzt werden, ohne dass die Sequenz-Selektivität bei der Basenpaarung deutlich herabgesetzt wird^[124]. Das derart modifizierte Triphosphat kann zwar keine „echten“ Watson-Crick-Wasserstoffbrücken mehr ausbilden, weist jedoch im Vergleich zum natürlichen Thymidintriphosphat keine signifikanten sterischen Veränderungen auf. Die relativ hohe Genauigkeit bei der Basenpaarung kann hier allein durch die Molekülgeometrie erklärt werden.

Dieses Ergebnis unterstützt auch die Annahme, dass die DNA-Polymerase die Spezifität bei der Insertion der Nucleotide erhöhen kann, wenn ihr aktives Zentrum so beschaffen ist, dass es die Ausbildung der Watson-Crick-Geometrie unterstützt^[125,126]. Letztlich wird die selektive Basenpaarung wohl durch beide Effekte – Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen komplementärer Basen (Wasserstoffbrückenbindungs-Komplementarität) und möglichst hohe Watson-Crick-Geometrie (Struktur-Komplementarität) – bestimmt.

Die Einführung einer Massenmodifikation in die Base darf nicht zu einer verminderten Selektivität bei der Basenpaarung in der Amplifizierungsreaktion führen, da durch Falschpaarungen falsche Sequenzinformationen erhalten werden. Modifikationen sollten möglichst die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen erlauben. Eingeführte Molekülgruppen sollten außerdem möglichst keine signifikante sterische Veränderung des Nucleotids darstellen, d.h. klein genug sein, um die Struktur-Komplementarität zu gewährleisten.

4.2 Wahl geeigneter Nucleotide für den Massenausgleich

Um einen Massenausgleich in der reversen Sanger Sequenzierung zu erzielen, müssen die eingeführten Modifikationen die Masse der Nucleotide um 16 Dalton erhöhen. Analog zur Modifikation des Terminators erschien hier der Austausch eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom sinnvoll. Doch auch die Einführung einer zusätzlichen Hydroxyl-Gruppe ($M_{OH} \approx 16 \text{ g/mol}$) in das Molekül ist möglich.

Basenmodifizierte Nucleotide

Verschiedene basenmodifizierte Triphosphate mit dem gewünschten Molekulargewicht sind bereits im Handel erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde je ein thiomodifiziertes Thymidinanalogon (2-Thiothymidin-5'-triphosphat, 2-S-dTTP) bzw. Cytidinanalogon (2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 2-S-dCTP) untersucht, deren Carbonylsauerstoffatome an Position 2 jeweils durch ein Schwefelatom substituiert waren^[127]. Zusätzlich wurde ein Cytidintriphosphat gewählt, das durch die Einführung einer OH-Gruppe an Position 5 modifiziert war^[128] (5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-OH-dCTP).

Zuckermodifizierte Nucleotide

Nucleotide mit geeigneten Modifikationen an der Ribose sind zurzeit noch nicht im Handel erhältlich. Bei den oben genannten 4'-Thio-2'-desoxynucleosid-5'-triphosphaten wird der Ringsauerstoff im Zucker durch ein Schwefelatom ersetzt und das Molekulargewicht des Nucleotids somit um die erforderlichen 16 g/mol erhöht. Der Syntheseweg ausgehend von Desoxyribose ist jedoch sehr aufwendig, zudem wurde 4'-Thiothymidin-5'-triphosphat aufgrund seiner schlechten Substrateigenschaften bereits als möglicher Terminator für die klassische Sanger Sequenzierung vorgeschlagen^[129]. Geeigneter erschien daher die Synthese eines 5'-Thio-2',5'-didesoxynucleosid-5'-triphosphates, da der Sauerstoff in 5'-Position der Desoxyribose exponierter für eine Substitution durch Schwefel ist, und eine Synthese daher ausgehend von dem gewünschten Nucleosid möglich ist. In den Abbildungen 4-4 und 4-5 sind die Strukturen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten massenmodifizierten Triphosphate, sowie der zugehörigen Terminatoren für die reverse Sanger Sequenzierung dargestellt.

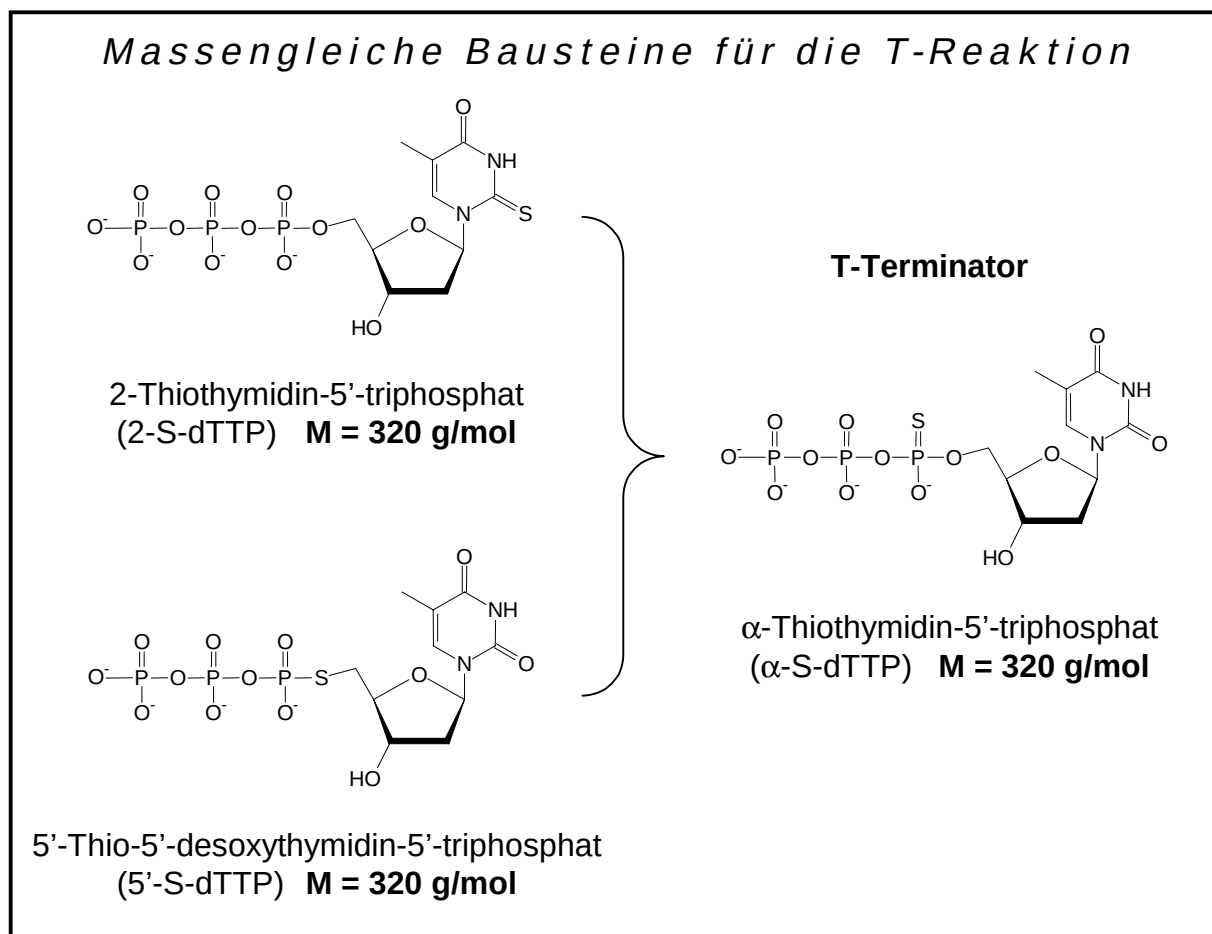


Abbildung 4-4: Struktur massengleicher Thymidintriphosphat-Analoga für den Einsatz in der reversen Sanger Sequenzierung (T-Reaktion).

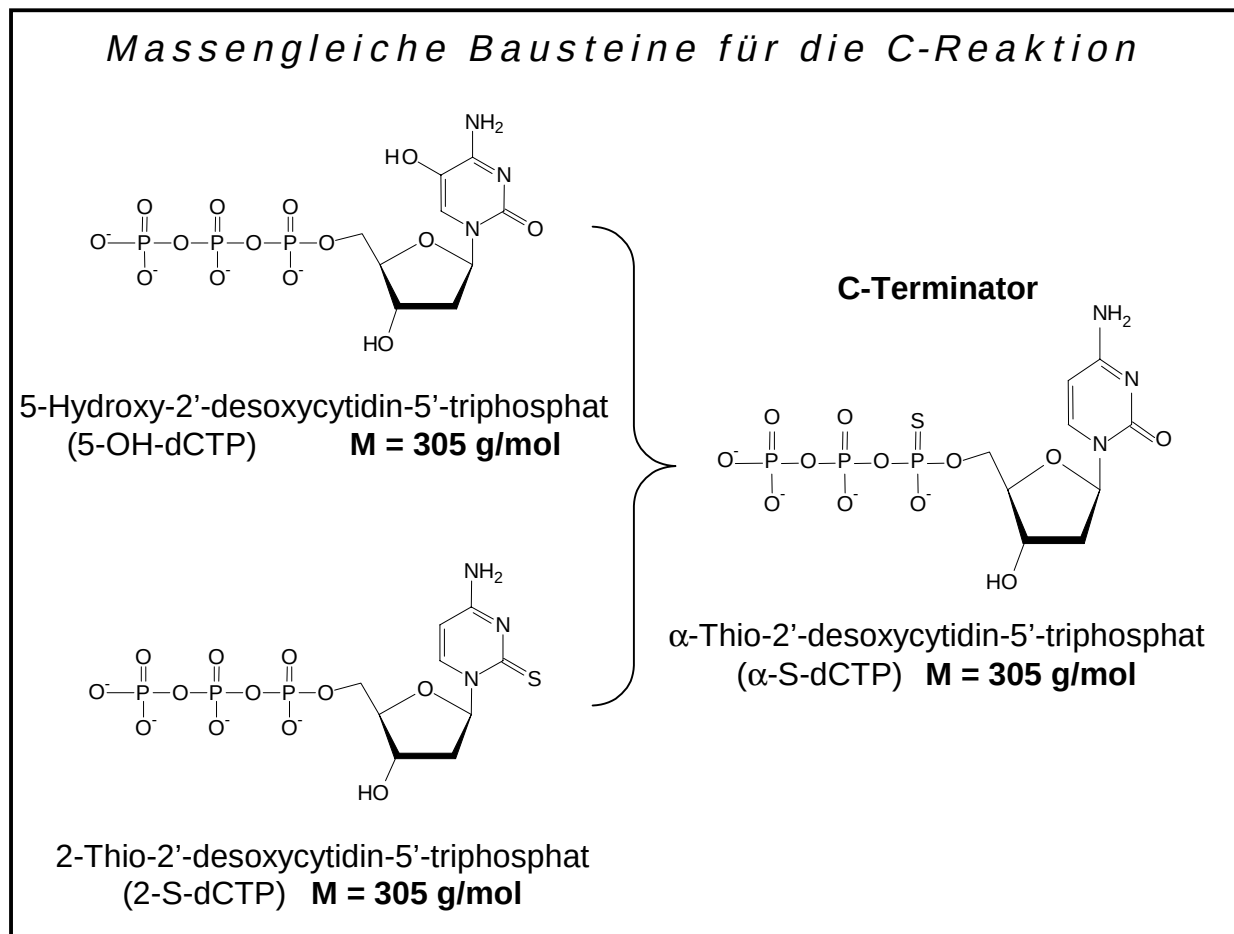


Abbildung 4-5: Struktur massengleicher Cytidintriphosphat-Analoga für den Einsatz in der reversen Sanger Sequenzierung (C-Reaktion).

4.3 Chemische Synthese eines massenmodifizierten Triphosphates

4.3.1 Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat nach Shirokova^[117] und Yoshikawa^[135]

Ausgehend von Thymidin **1** sollte zunächst in einer Variante der Mitsunobu-Reaktion^[130,131] die Konversion der 5'-OH-Gruppe zu 5'-Acetylthio-5'-desoxythymidin **2** erfolgen^[132]. Triphenylphosphin und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) wurden zunächst unter Eiskühlung in abs. THF zum entsprechenden quartären Phosphonium-Salz umgesetzt und durch Thioessigsäure protoniert. Durch Umsetzung mit dem Nucleosid **1** entsteht ein Alkoxyphosphonat, das durch das Thioacetat angegriffen wird und zu 5'-Acetylthio-5'-desoxythymidin **2** und Triphenylphosphinoxid reagiert. Nach Aufarbeitung und säulen-chromatographischer Reinigung konnte 5'-Acetylthio-5'-desoxythymidin **2** in 35 %iger Ausbeute gewonnen werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H- und ¹³C-NMR und Massenspektrometrie.

Die weitere Synthesestrategie sah die Umsetzung von 5'-Acetylthio-5'-desoxythymidin **2** zu 5'-Thio-5'-desoxythymidin **3** durch Behandlung mit Ammoniak in wässriger methanolischer Lösung vor. Das erhaltene Thiol **3** ist instabil und wird unter basischen Bedingungen schnell zum korrespondierenden Disulfid oxidiert. Um die Dimerisierung zu verhindern, wurde die ammoniakalische Lösung wie bei Shirokova *et al.*^[117,133] beschrieben, mit Mercaptoethanol versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulen-chromatographisch aufgereinigt, wobei dem Laufmittel einige Tropfen 2-Mercaptoethanol zugegeben wurde. Die Fraktion, die das aufgereinigte Produkt **3** enthielt, wurde mit Mercaptoethanol/Wasser behandelt und das Lösungsmittel nach 2 Stunden Rühren *in vacuo* abdestilliert. 5'-Thio-5'-desoxythymidin **3** konnte in 40 %iger Ausbeute erhalten werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie.

Die Phosphorylierung von 5'-Thio-5'-desoxythymidin **3** nach Shirokova mit Phosphorotriimidazolid, das durch Umsetzung von Triphenylphosphin mit Imidazol und Triethylamin in Acetonitril hergestellt wurde, gelang nicht. Statt dessen konnte das 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat **5** erfolgreich nach Yoshikawa durch Umsetzung mit POCl₃ und Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat-Lösung gewonnen werden^[134-137]. Hierzu

wurde Verbindung **3** zunächst durch Zugabe von insgesamt 3 eq. POCl_3 bei 0 °C in Acetonitril in Gegenwart von pulverisiertem Molekularsieb^[137] in 5'-Desoxythymidin-5'-dichlorophosphothioat **4** umgesetzt. Das entstandene Dichlorophosphothioat **4** wurde *in situ* durch Zugabe von 0.5 M Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat-Lösung in N,N-Dimethylformamid in das α -Mono-chloro-5'-thiotriphosphat überführt und anschließend zu 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat **5** hydrolysiert. Das folgende Schema verdeutlicht den Reaktionsweg:

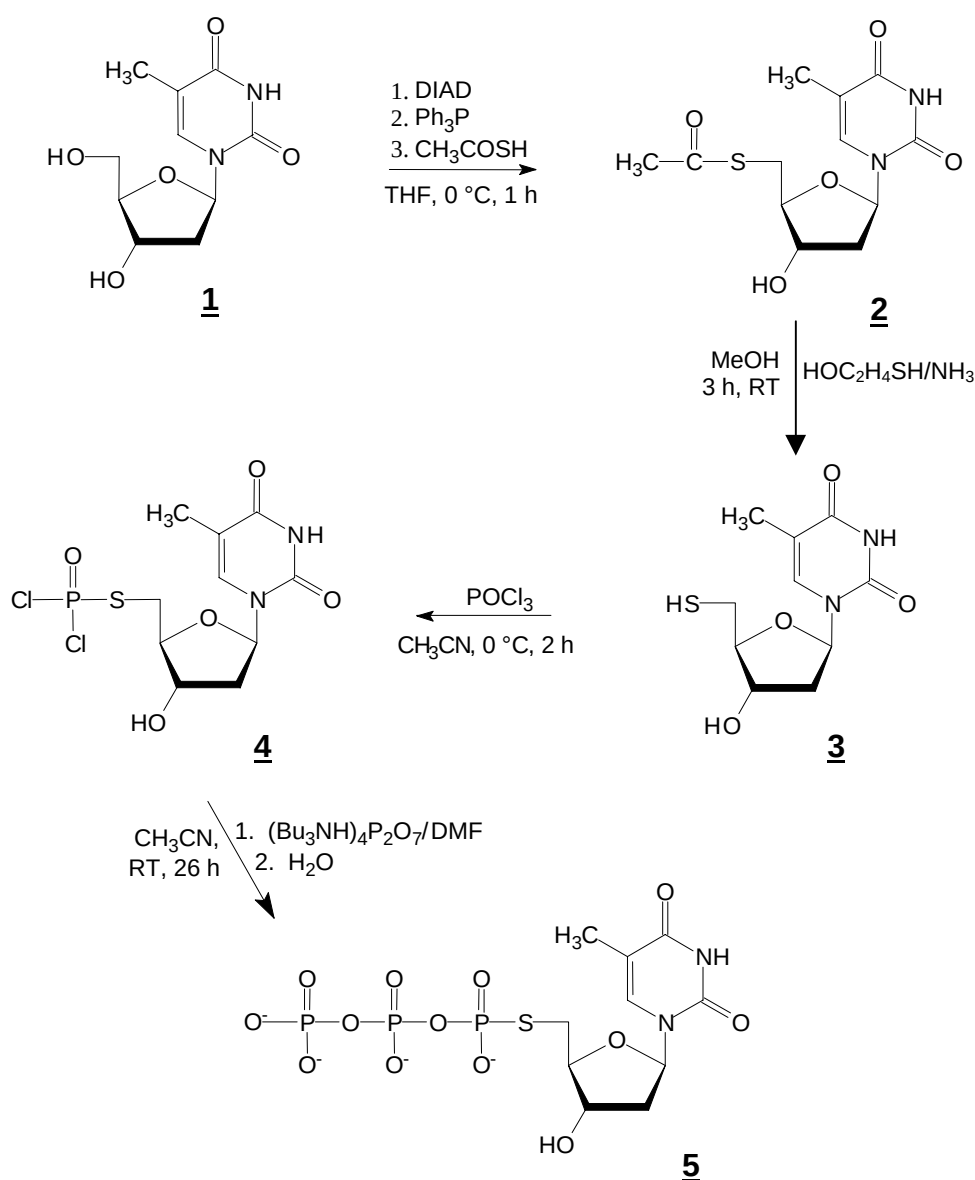


Abbildung 4-6: Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat

Nach Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sephacel, Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (TEAB), linearer Gradient 0.025-0.6 M) konnte das massenmodifizierte Thymidintriphosphat **5** in sehr geringer Ausbeute von 4.8 % isoliert werden. Die in der Literatur angegebene Ausbeute war jedoch mit 3.4 % ebenso gering. Die Charakterisierung erfolgte dünnschichtchromatographisch mit unmodifiziertem dTMP und dTTP als Vergleichssubstanzen, mittels UV-Detektion (260 nm), sowie mittels ^{31}P -NMR. Darüber hinaus sollte eine weitere Charakterisierung in einer Primer Extension Reaktionen mit anschließender MALDI-TOF MS Analyse des Elongationsproduktes erfolgen (vgl. Kap. 5.1).

4.3.2 Versuch zur Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat nach Eckstein^[138]

Wegen der geringen Ausbeute an Triphosphat aus der Synthese nach Shirokova sollte auf einem alternativen Syntheseweg die Modifizierung von 2'-Desoxythymidin zu 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat **5** erfolgen. Das folgende Schema zeigt den Syntheseweg nach Eckstein^[138], der bereits am Ribonucleosid Adenosin erfolgreich durchgeführt wurde (vgl. Abbildung 4-7). Diese Synthesestrategie sieht eine Umsetzung des 5'-tosylierten Ribonucleosids **6** mit dem Tri-n-butylammonium-Salz der Thiophosphorsäure zum Monophosphat **7** vor.

Die selektive Tosylierung von Thymidin **1** an C5' gelang durch Umsetzung von **1** mit 1.2 eq p-Toloylsulfonylchlorid (Tosylchlorid) in abs. Pyridin bei 0 °C. 5'-Tosylthymidin **6** konnte nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel in 48 %iger Ausbeute gewonnen werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels NMR-Spektroskopie.

Die weitere Synthesestrategie sah eine Umsetzung von **6** mit dem Tri-n-butylammoniumsalz der Thiophosphorsäure in DMF bei Raumtemperatur zum Monophosphat **7** vor. Eine dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufs zeigte jedoch neben dem Edukt als hauptsächlichem Bestandteil mehrere Produkte an. Durch die dennoch durchgeführte Ionenaustauschchromatographie zur Trennung der Produkte konnte kein Monophosphat **7** isoliert werden.

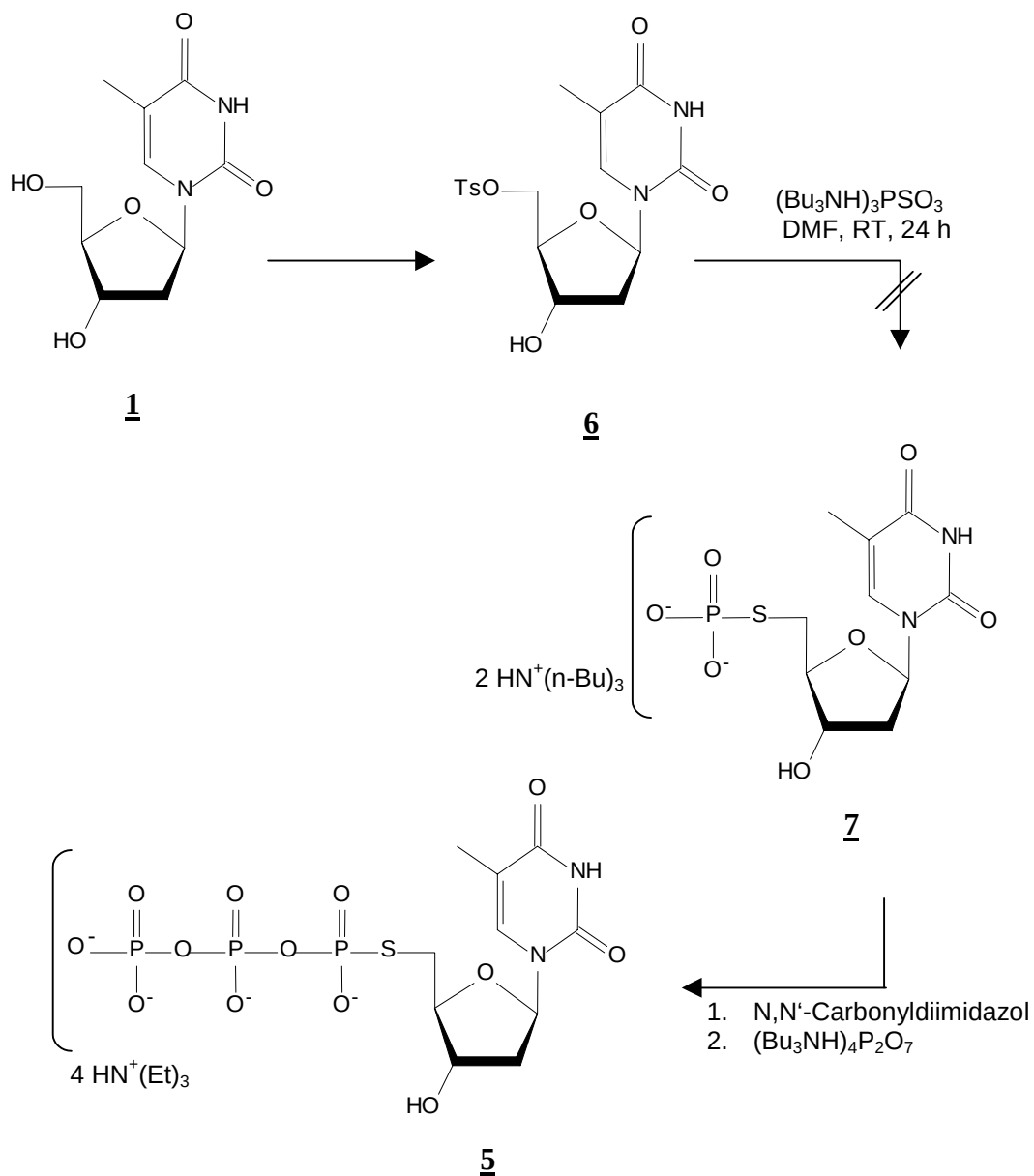


Abbildung 4-7: Synthesestrategie von 5'-thiomodifizierten Nucleosidtriphosphaten nach Eckstein.

Die Synthese nach Eckstein sieht die Umsetzung des ungeschützten Nucleosids vor. Möglicherweise wirken sich jedoch weitere reaktive Gruppen, wie etwa die ungeschützte OH-Gruppe an C3', störend in der Reaktion aus, so dass eine geordnete Triphosphatsynthese ohne aufwendige Schutzgruppeneinführung in diesem Fall nicht möglich war. Diese Ansätze wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da das gewünschte Nucleotid nach Shirokova und Yoshikawa synthetisiert werden konnte.

5 Suche nach geeigneten Polymerasen

Eine Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz massenmodifizierter Nucleosidtriphosphate in der reversen Sanger Sequenzierung ist die Ermittlung mindestens einer Polymerase, die neben den α -S-Terminatoren auch die jeweils analoge Massenmodifikation (2-S-dTTP, 5'-S-dTTP, 5-OH-dCTP oder 2-S-dCTP) als Substrat akzeptiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf DNA-Polymerasen auf ihre Fähigkeit zum Einbau modifizierter Nucleotid-analoga während der Polymerisierungsreaktion untersucht: Neben den bereits für die Generierung der phosphothioat-markierten PCR-Produkte verwendeten DNA-Polymerasen *Pfu*(exo-), *AmpliTaq Gold* und *HotStar Taq* wurde auch die *Taq* DNA-Polymerase, sowie die in der Sanger Sequenzierung bewährte *ThermoSequenase* untersucht.

5.1 Primer Extension Assay

Untersuchungen zur Inkorporation modifizierter Nucleosidtriphosphate durch verschiedene DNA-Polymerasen wurden bereits häufig durchgeführt und sind in der Literatur wohl dokumentiert^[139-142]. Ein einfaches Testsystem für DNA-Polymerasen ist der Primer Extension Assay^[143], bei dem ein an ein DNA-Template hybridisierter biotinylierter Primer enzymatisch verlängert wird. Dem Reaktionsansatz wird hierbei als Substrat für das jeweils zu testende Enzym eines der vier massenmodifizierten Nucleotide zugefügt. Die Massendifferenz zwischen dem verwendeten Primer und dem Terminationsprodukt erlaubt eine massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte mittels MALDI-TOF MS. In dieser Arbeit wurden von Frau Dipl. Chem. C. Matthies zwei 30-mere (Temp2 und Temp4) als Template zur Verfügung gestellt, deren Sequenzen auf die Untersuchung von dCTP- bzw. dTTP-Analoga abgestimmt waren. Als Primer wurde ein biotinyliertes 17-mer mit einer Masse von 5635 Dalton verwendet, das bei korrekter enzymatischer Umsetzung ein um eine Base verlängertes Terminationsprodukt mit einer Masse von 5940 Dalton (C-Reaktion), bzw. 5955 Dalton (T-Reaktion) liefern sollte:

C-Reaktion

Temp2: 3'-CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAG ACA TGC GTT-5'
 Primer: Biotin-GTA AAA CGA CGG CCA GT **M = 5635 Da**
 Terminationsprodukt: Biotin-GTA AAA CGA CGG CCA GT **C** **M = 5940 Da**

T-Reaktion

Temp4: 3'-CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAA CCA TGC GTT-5'
 Primer: Biotin-GTA AAA CGA CGG CCA GT **M = 5635 Da**
 Terminationsprodukt Biotin-GTA AAA CGA CGG CCA GT **T** **M = 5955 Da**

Die Aufreinigung der Terminationsprodukte für eine anschließende MALDI-TOF Analyse erfolgte über das Biotin-Streptavidin-Festphasensystem:

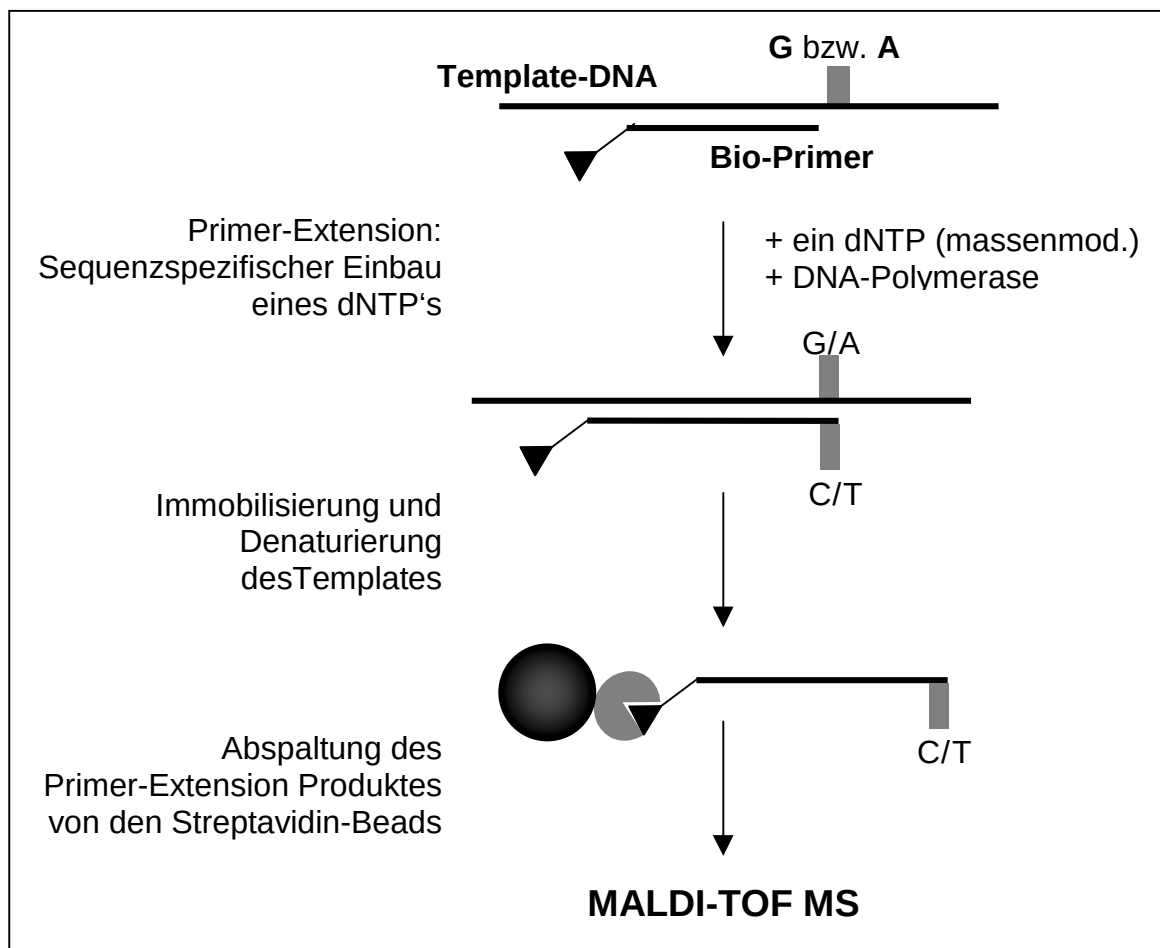


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte bei der enzymatischen Verlängerung eines biotinylierten Primers (Primer Extension Assay) mit anschließender Festphasenaufreinigung.

Um möglichst vergleichbare Reaktionsbedingungen zu erzeugen, wurden die Primer Extension Reaktionen für die verschiedenen Enzyme parallel in den einzelnen *wells* einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Reaktionsmischung, bestehend aus dem jeweiligen DNA-Template für die C- bzw. T-Reaktion (1 pmol), dem biotinylierten Primer (10 pmol) und einem Nucleosidtriphosphat (50 µmol), wurde in die Mikrotiterplatte pipettiert. Neben den Ansätzen für die vier massenmodifizierten dNTPs wurde zu Kontrollzwecken auch jeweils ein Reaktionsansatz mit dem analogen natürlichen dNTP und dem α -S-dNTP (Terminator) präpariert. Als Negativkontrolle fungierte ein Ansatz ohne Template. Die Reaktionslösungen wurden mit dem jeweils zu untersuchenden Enzym (2.5 Units) versetzt, das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug dabei 20 µl. Das Temperaturprogramm wurde über 25 Zyklen mit Reaktionszeiten von je einer Minute bei 95 °C, 49 °C und 72 °C durchgeführt. Dabei musste beachtet werden, dass für die Enzyme *HotStar Taq* und *AmpliTaq Gold* eine einmalige Aktivierungszeit von 15 Minuten bei 95 °C vor dem eigentlichen Temperaturprogramm erforderlich ist. Diese Enzyme wurden vom Hersteller für eine einfachere Handhabung mit einem Antikörper versehen, der das Enzym inaktiviert. Erst durch längeres Erhitzen auf 95 °C wird der Antikörper denaturiert und das Enzym so aktiviert.

Nach dem Durchlaufen der Temperaturzyklen wurde die Mikrotiterplatte auf 25 °C temperiert und die Reaktionsansätze zur Aufreinigung mit je 20 µl Straptavidin-Beads-Lösung versetzt. Die Immobilisierung der Reaktionsprodukte an die Festphase erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Streptavidin-Beads nach dreimaligem Waschen mit einer 10 mM Tris-HCl-Lösung zum Denaturieren des DNA-Templates mit 25 µl einer zweimolaren Ammoniaklösung versetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für fünf Minuten wurde der Überstand entfernt und die Denaturierung einmal wiederholt. Es folgte erneutes Waschen der Reaktionsansätze mit Tris-HCl-Lösung. Die Abspaltung der biotinylierten Reaktionsprodukte von der festen Phase erfolgte durch einmalige Behandlung der Beads mit 10 µl einer zweimolaren Ammoniaklösung bei erhöhter Temperatur. Nach 10-minütiger Inkubation bei 65 °C wurden die Streptavidin-Beads von der Reaktionslösung separiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in eine neue Mikrotiterplatte überführt, die zum Abdampfen des Ammoniaks ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Die Vermessung der Proben wurde auf einem Silizium-Chip mit 96 vorgefertigten Matrix-Spots durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte automatisch mittels eines Nanoplotters, der pro Ansatz 6 nl Analytlösung auf die

Matrix-Spots überträgt. Um möglichst repräsentative Spektren zu erhalten, wurden jeweils zwei Spots pro Reaktionsansatz aufgebracht und massenspektrometrisch untersucht. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über das Gesamtergebnis des Primer Extension Assays:

	<i>Pfu</i> (exo-)- Polymerase	<i>Thermo</i> - <i>Sequenase</i>	<i>Taq</i> - Polymerase	<i>HotStar Taq</i> - Polymerase	<i>AmpliTaq Gold</i> - Polymerase
T - R e a k t i o n					
dTTP	++	++	+	+	+
α -S-dTTP	++	++	+	+	+
5'-S-dTTP	-	-	-	-	-
2-S-dTTP	++	+	+	+	+
C - R e a k t i o n					
dCTP	++	++	+	++	++
α -S-dCTP	++	++	+	+	+
2-S-dCTP	+	+	(+)	(+)	-
5-OH-dCTP	+	+	+	+	+

Tabelle 5-A: Ergebnisse des Primer Extension Assays. Dabei bedeutet:

- + Vollständige Verlängerung des Primers. Nur ein Terminationsprodukt wurde erhalten.
- ++ Unspezifische Verlängerung des Primers durch Einbau mehrerer dNTPs. Mehrere Terminationsprodukte sind möglich.
- (+) Unvollständige Verlängerung des Primers, neben dem Terminationsprodukt wird auch der Primer detektiert.
- Keine Verlängerung des Primers durch das modifizierte Triphosphat.

Wie aus Tabelle 5-A ersichtlich ist, konnten die bereits in der konventionellen reversen Sanger Sequenzierung bewährte *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase, sowie die *ThermoSequenase* alle Terminatoren (α -S-dNTPs) sowie die drei basenmodifizierten dNTPs (2-S-dTTP, 2-S-dCTP u. 5-OH-dCTP) als Substrat akzeptieren. Hier wurde in jedem Fall der Primer quantitativ durch das jeweilige Nucleotid verlängert. Teilweise kam es zur unspezifischen Verlängerung des Terminationsproduktes. Einige Spektren zeigen daher Signale bei höheren Massen, die jedoch auf den Einbau ein oder mehrerer zusätzlicher Nucleotide zurückgeführt werden können (vgl. z.B. Abb. 5-2, Spektrum I). Aufgrund des hohen Substratüberschusses und der hohen Zykluszahl wird es dem Enzym ermöglicht, den DNA-Strang zu verlängern, auch wenn die Sequenz des entstehenden Stranges nicht mehr komplementär zum Template

ist. Die Polymerasen *Taq* und *HotStarTaq* akzeptierten 2-S-dCTP mit verminderter Effektivität: Hier konnte der Primer zumindest teilweise verlängert werden, neben dem korrekten Terminationsprodukt wurde im MALDI-TOF Spektrum jedoch immer auch das Signal des nicht umgesetzten Primers detektiert (vgl. Abb. 5-3, Spektrum IV). Die DNA-Polymerase *AmpliTaq Gold* interagiert dagegen mit dieser Verbindung überhaupt nicht, im MALDI-TOF Spektrum wurde stets nur der unverlängerte Primer detektiert (Abb. 5-3, II). Die Abbildungen 5-2 und 5-3 zeigen beispielhaft einige MALDI-TOF Spektren der Primer Extension Reaktion:

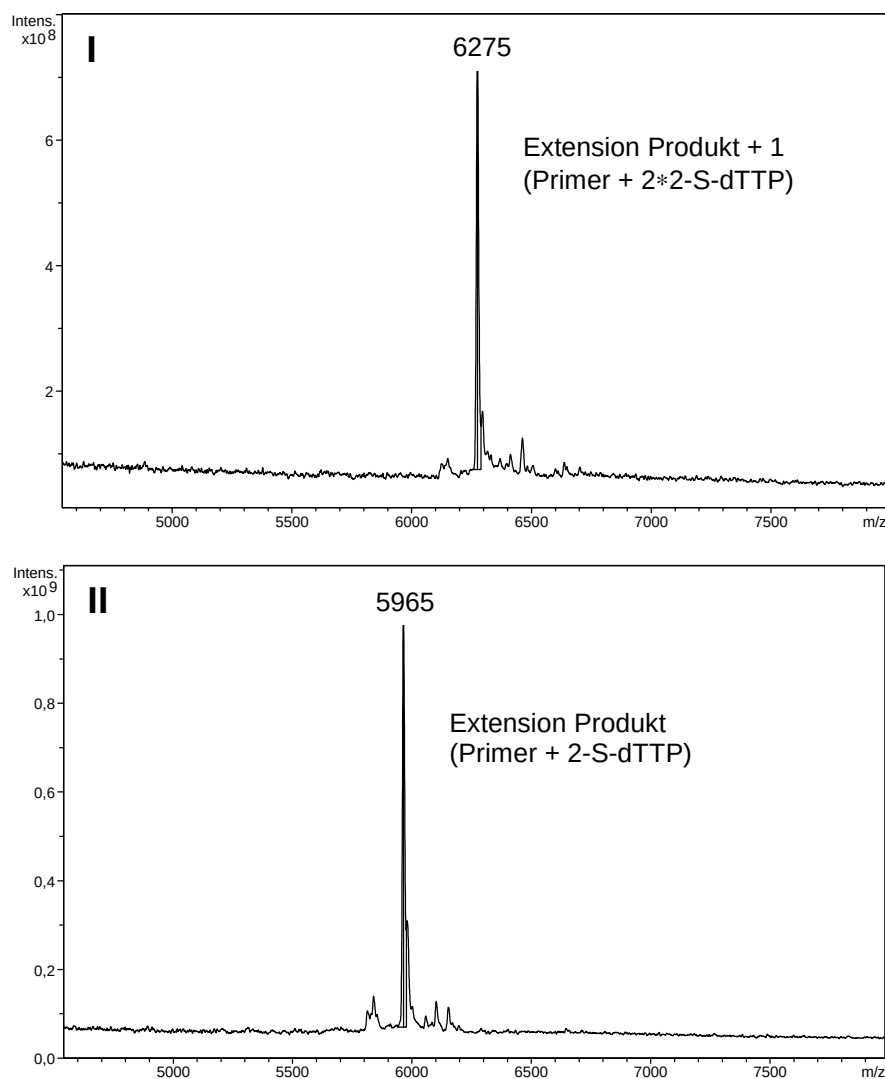


Abbildung 5-2: MALDI-TOF Massenspektren der Primer Extension Reaktion für die T-Reaktion.
 Spektrum I: Substrat: 2-S-dTTP, Enzym: *Pfu*(exo-) Polymerase → **Mehrfachverlängerung**
 Spektrum II: Substrat: 2-S-dTTP, Enzym: *AmpliTaq Gold* → **quantitative Umsetzung**
 Das Signal des Primers wurde bei 5635 m/z, das des Terminationsproduktes bei 5955 m/z erwartet.

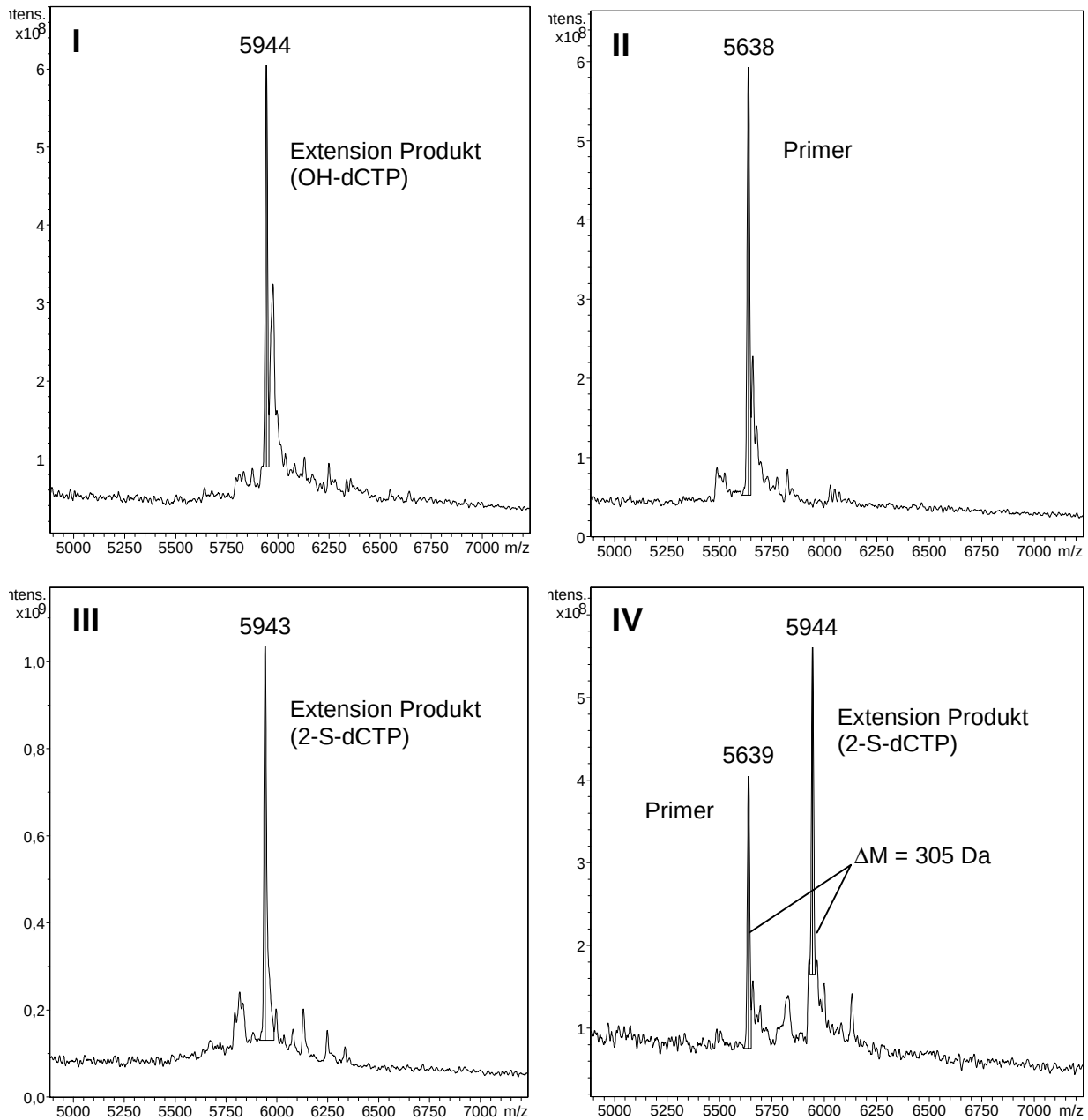


Abbildung 5-3: MALDI-TOF Massenspektren der Primer Extension Reaktion für die C-Reaktion.

Spektrum I: Substrat: 5-OH-dCTP, Enzym: *AmpliTaQ Gold* → **quantitative Verlängerung**

Spektrum II: Substrat: 2-S-dCTP, Enzym: *AmpliTaQ Gold* → **keine Verlängerung**

Spektrum III: Substrat: 2-S-dCTP, Enzym: *Pfu(exo-)* → **quantitative Verlängerung**

Spektrum IV: Substrat: 2-S-dCTP, Enzym: *HotStar Taq* → **unvollständige Verlängerung**

Aus der Massendifferenz von Primer und Extension Produkt lässt sich die Masse des modifizierten Nucleosids bestimmen (Spektrum IV: $M_{2-S-dCTP} = 304 \text{ Da}$).

Ein Vergleich der Substrateigenschaften der untersuchten basenmodifizierten Nucleotide zeigt, dass 2-S-dCTP ein tendenziell schlechteres Substrat für die untersuchten DNA-Polymerasen ist als 5-OH-dCTP und 2-S-dTTP, die von allen getesteten Enzymen mit hoher Effektivität in den DNA-Strang inkorporiert wurden. Dieses Ergebnis überrascht nicht, betrachtet man die spezifische Basenpaarung innerhalb der DNA genauer:

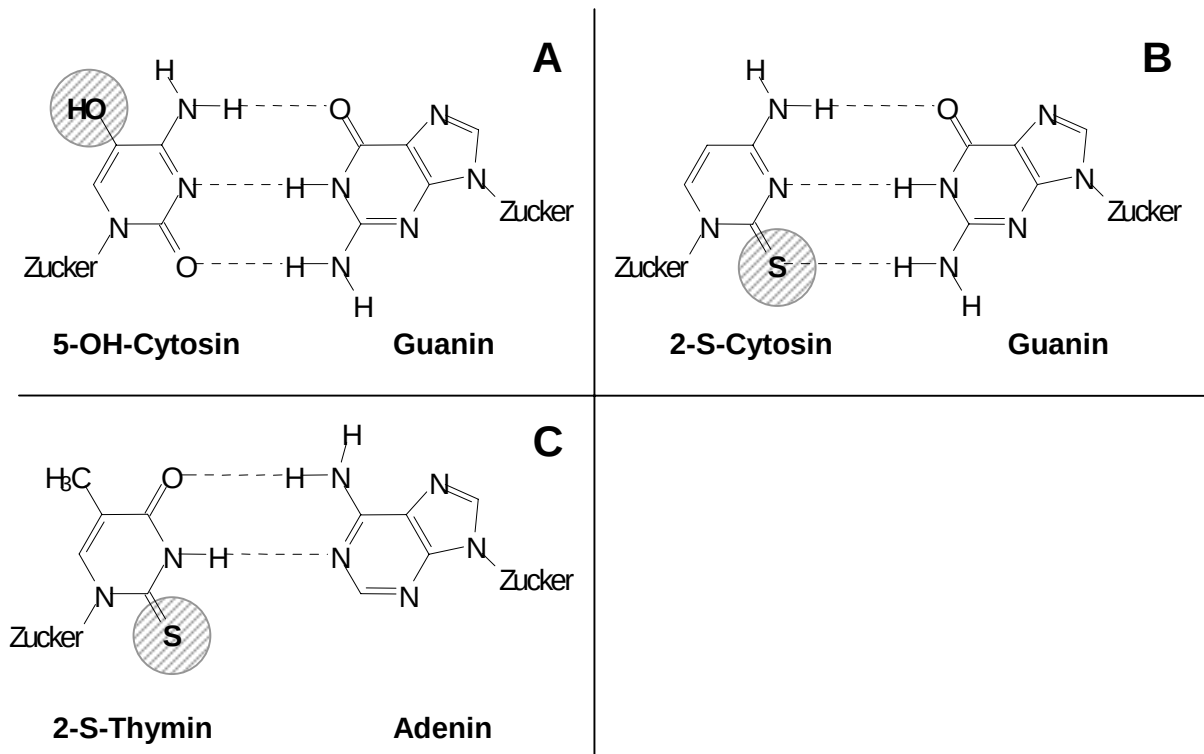


Abbildung 5-4: Spezifische Basenpaarung innerhalb der DNA durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken.

Die Katalyse der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase hängt stark von der Wasserstoffbrückenbindungs-Komplementarität zu der Base auf dem Matrizenstrang ab (vgl. Kap. 4.1). Während der Schwefel in 2-S-dCTP direkt an der spezifische Basenpaarung durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt ist (Abb. 5-4 B), liegt die zusätzliche Hydroxyl-Gruppe in 5-OH-dCTP auf der diesem Zentrum abgewandten Seite (Abb. 5-4 A). Auch der Schwefel in 2-S-dTTP greift nicht in den Prozess der Wasserstoffbrückenbildung ein (Abb. 5-4 C). Sowohl 5-OH-dCTP als auch 2-S-dTTP gewährleisten damit die Wasserstoffbrückenbindungs-Komplementarität. Daneben hat auch die Struktur-Komplementarität einen Einfluss auf die Sequenz-Selektivität der Basenpaarung. Durch die Einführung

einer zusätzlichen – räumlich jedoch wenig anspruchsvollen – OH-Gruppe an Position C-5 im Cytosin, oder dem Austausch von Sauerstoff durch ein voluminöses Schwefelatom an Position C-2 im Thymin wird diese scheinbar nicht beeinflusst.

Im Unterschied zu den basenmodifizierten dNTPs wurde das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte zuckermodifizierte Thymidinanalogon 5'-S-dTTP (vgl. Kap. 4.3.1) von keiner der fünf getesteten DNA-Polymerasen als Substrat akzeptiert. Der Primer konnte nicht durch das thio-modifizierte Nucleosidtriphosphat verlängert werden. Der Grund hierfür könnte in der veränderten Molekülgeometrie liegen. Im natürlichen Nucleosidtriphosphat erfüllt der Sauerstoff an C5' die Funktion einer "bindenden Einheit" zwischen dem Triphosphat-Rest und der Nucleosid-Komponente. Sein Austausch durch eine Einheit mit veränderten chemischen Eigenschaften kann daher einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Konformation, als auch die elektronischen Eigenschaften der modifizierten Nucleosidanaloga haben. Insbesondere die direkt an der Reaktion zur Bildung der Phosphodiester-Bindung beteiligte α -Phosphat-Gruppe ist hiervon betroffen. Der Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel an dieser Position bewirkt eine Veränderung des Bindungswinkels der von dieser Position ausgehenden Bindungen ($O = 105^\circ$, $S \sim 92^\circ$). Dieser jedoch bestimmt die Positionen der Triphosphat-Gruppe und des Zuckers im Molekül und ist damit für die Strukturkomplementarität bei der Substrat-erkennung entscheidend. Auch die Größe des Schwefelatoms sowie seine geringere Elektronegativität könnten hier eine Rolle spielen.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen deuteten bereits darauf hin, dass eine Modifizierung an Position C-5' einen starken Einfluss auf die Substraterkennung vieler Polymerasen hat^[110-114,117]. Viele der untersuchten Polymerasen konnten Modifikationen dieses Typs überhaupt nicht als Substrat akzeptieren, und selbst bei positiv getesteten DNA-Polymerasen, wie z.B. der von Shirokova untersuchten *DNA-Polymerase I* aus *E.coli*, wurden die Inkorporationsraten extrem herabgesetzt. Trotzdem sollten weitere Versuche an Polymerasen folgen. Bei der Vielzahl heute erhältlicher DNA-Polymerasen mit veränderten Substrateigenschaften besteht durchaus eine Wahrscheinlichkeit, dass eines dieser Enzyme die 5'-Thionucleotidanaloga als Substrat akzeptieren kann. Beispielsweise wird zurzeit in unserer Arbeitsgruppe an einer modifizierten *Taq* DNA-Polymerase gearbeitet, die insbesondere solche modifizierten Nucleosidtriphosphate als Substrat akzeptieren soll^[144].

5.2 Polymerasekettenreaktion

Die vollständige Amplifizierung eines doppelsträngigen PCR-Produktes stellt höhere Anforderungen an die Polymerase als eine einfache Primer Extension Reaktion, bei der dem Enzym lediglich ein Nucleotidanalogen als Substrat angeboten wird: Die Polymerase muss dazu befähigt sein neben drei natürlichen dNTPs mindestens ein modifiziertes Nucleosidtriphosphat als Substrat zu akzeptieren. Dabei muss die selektive Basenpaarung auch bei Durchlaufen von wenigstens 25 Reaktionszyklen korrekt erfolgen, um die Generierung falscher Sequenzierprodukte zu vermeiden. Außerdem werden während der PCR beide DNA-Stränge durch den Einbau der Nucleotidanaloga modifiziert, die in den Folgezyklen wiederum als Template fungieren und korrekt abgelesen werden müssen. Insgesamt muss die Ausbeute an PCR-Produkt hoch genug sein, um auch nach anschließender Sequenzierung mit Exonuclease III noch genügend Substanz für eine MALDI-TOF Analyse zu liefern.

Die Ergebnisse des Primer Extension Assays belegten, dass von den fünf untersuchten Enzymen die *AmpliTaQ Gold* DNA-Polymerase am schlechtesten für die reverse Sanger Sequenzierung geeignet ist, da sie sowohl 5'-S-dTTP als auch 2-S-dCTP nicht als Substrat akzeptierte. Die DNA-Polymerasen *Taq* und *HotStar Taq* zeigten für das Cytidinanalogon 2-S-dCTP eine verringerte Inkorporationsrate, der verwendete Primer konnte auch bei 25 Reaktionszyklen nicht vollständig verlängert werden. Da mit 5-OH-dCTP ein zweites „schweres“ Cytidinanalogon, sowie mit 2-S-dTTP ein Thymidinanalogon für den Massenausgleich zur Verfügung standen, können diese Enzyme als prinzipiell geeignete Kandidaten für weiterführende Versuche an Polymerisierungsreaktionen angesehen werden. Eine Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen ist für beide Enzyme erforderlich. Dagegen konnten die DNA-Polymerasen *Pfu(exo-)* und *ThermoSequenase* alle verwendeten Nucleotidanaloga als Substrat akzeptieren. Beide Enzyme eigneten sich gleichermaßen für weitere Untersuchungen an Polymerisierungsreaktionen.

In den vorangehenden Kapiteln wurde bereits der erfolgreiche Einsatz der *Pfu(exo-)* DNA-Polymerase in Polymerisierungsreaktionen mit α -S-Terminatoren demonstriert (vgl. Kap. 3.1.4). Da zum einen bei Verwendung dieses Enzyms bereits ein optimiertes PCR-System zur Verfügung stand, aber auch aus wirtschaftlichen Überlegungen – die *ThermoSequenase* ist

ein sehr teures Enzym, während die *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase als Standardenzym für PCR-Reaktionen kostengünstiger bezogen werden kann – wurde die *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase als am besten geeignetes Enzym für die im Folgenden diskutierte Amplifizierung von CFTR-PCR-Produkten mit den verschiedenen massenmodifizierten Nucleotiden ermittelt. Daneben wurden jedoch auch die *Taq* DNA-Polymerase, sowie die *HotStar Taq* DNA-Polymerase auf ihre Eignung getestet.

5.2.1 PCR mit massenmodifizierten Nucleotiden

In Anlehnung an die in Kapitel 3.1.4 beschriebene Amplifizierung des synthetischen Templates T87, wurde die PCR für die C- und T-Reaktion zunächst nur mit den basenmodifizierten Nucleotiden durchgeführt, ohne zusätzlich die entsprechenden, für eine Sequenzierung essentiellen, α -S-Terminatoren zu inkorporieren. Im PCR-Reaktionsansatz wurde hierfür jeweils das natürliche Nucleotid (dCTP oder dTTP) zu unterschiedlichen Anteilen durch sein „schweres“ Analogon (2-S-dCTP bzw. 5-OH-dCTP oder 2-S-dTTP) ersetzt. Die Konzentration der modifizierten Nucleotide im PCR-Ansatz wurde dabei von 25 % bis auf 100 % (vollständiger Ersatz des natürlichen dNTP's durch sein massenmodifiziertes Analogon) gesteigert. Die Reaktionsparameter für den PCR-Ansatz (Temperaturprogramm, Zykluszahl und Enzymkonzentrationen) konnten ohne weitere Optimierung von der reversen Sanger Sequenzierung am CFTR-System übernommen werden. Die PCR-Produkte wurden sowohl gelelektrophoretisch, als auch nach Aufreinigung über das Streptavidin-Biotin-Festphasensystem mittels MALDI-TOF MS untersucht.

Ein Vergleich der Bandenintensitäten der PCR-Produkte ergab, dass bei hohen Konzentrationen von 2-S-dCTP kein PCR-Produkt mehr generiert wird (vgl. Abb. 5-5, Bahn 1); das thio-modifizierte Analogon wird von der DNA-Polymerase *Pfu*(exo-) nicht mehr als Substrat akzeptiert. Dagegen konnte selbst bei vollständigem Ersatz des natürlichen Nucleosids dCTP durch sein zweites, „schweres“ Analogon 5-OH-dCTP noch ausreichend PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 5-5, Bahn 5). Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Primer Extension Reaktion, aus der 2-S-dCTP als generell schlechteres Substrat für DNA-Polymerasen hervorgegangen ist, als sein massengleiches Analogon 5-OH-dCTP. Die folgende Abbildung zeigt die Aufnahme eines 12 %igen Polyacrylamidgels von modifizierten

PCR-Produkten, die basenmodifizierte Cydintriphosphat-Analoga in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten:

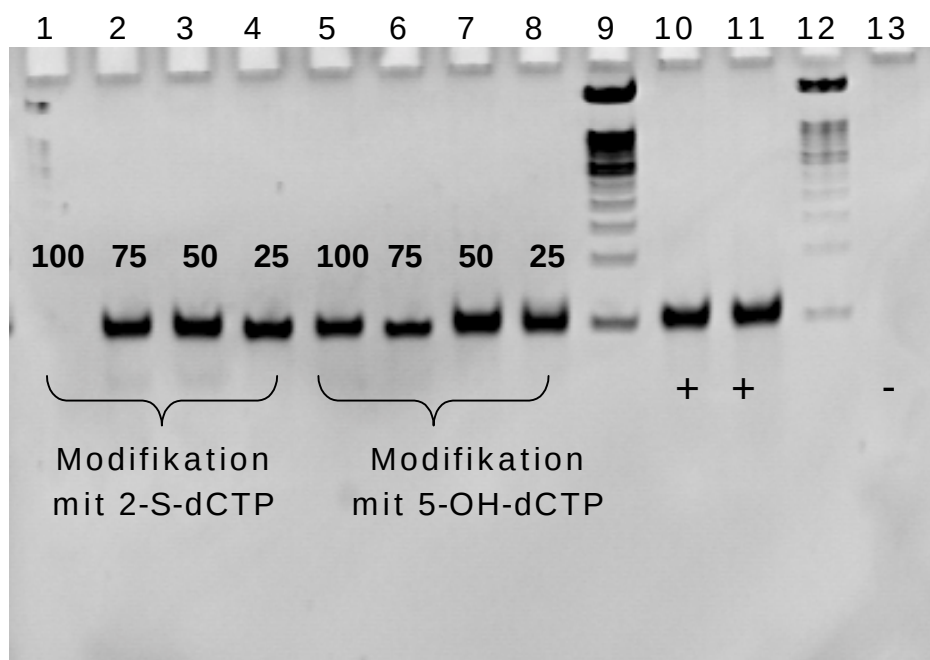


Abbildung 5-5: Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit massenmodifizierten PCR-Produkten für die C-Reaktion. Jeweils $\frac{1}{10}$ des PCR-Ansatzes (5 μ l) wurden aufgetragen. Bahn 1 bis Bahn 4 zeigen das mit 2-S-dCTP modifizierte 48-mer, Bahn 5 bis Bahn 8 zeigen die Banden des mit 5-OH-dCTP modifizierten 48-mers. Die Bahnen 9 und 12 enthalten den Längenstandard (pBR 322, *AluI* geschnitten) in unterschiedlicher Konzentration (1 + 3 μ l). In Bahn 10 und 11 wurde jeweils ein unmodifiziertes PCR-Produkt (48-mer) aufgetragen (Positivkontrolle (+)). Bahn 13 zeigt als Negativkontrolle (-) einen PCR-Ansatz, der ohne Template T87 durchgeführt wurde. Die modifizierten Nucleotide wurden in folgenden Konzentrationsverhältnissen in der Reaktion eingesetzt:

2-S-dCTP/dCTP [%]		5-OH-dCTP/dCTP [%]	
Bahn 1	100/0	Bahn 5	100/0
Bahn 2	75/25	Bahn 6	75/25
Bahn 3	50/50	Bahn 7	50/50
Bahn 4	25/75	Bahn 8	25/75

Auch das basenmodifizierte T-Analogon 2-S-dTTP wurde neben dem natürlichen dTTP als Substrat in der PCR mit *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase eingesetzt (vgl. Abbildung 5-6). Die gelelektrophoretische Untersuchung der PCR-Produkte, die das schwere Nucleotid in unterschiedlichen Konzentrationen enthält, zeigt, dass das Enzym auch bei einem vollständigen

Ersatz des natürlichen dTTP durch sein schweres Analogon PCR-Produkt in hoher Ausbeute liefert. Vergleicht man die Intensitäten der einzelnen PCR-Banden miteinander, stellt man nur eine leichte Abnahme der Bandenintensitäten bei höherer 2-S-dTTP-Konzentration fest.

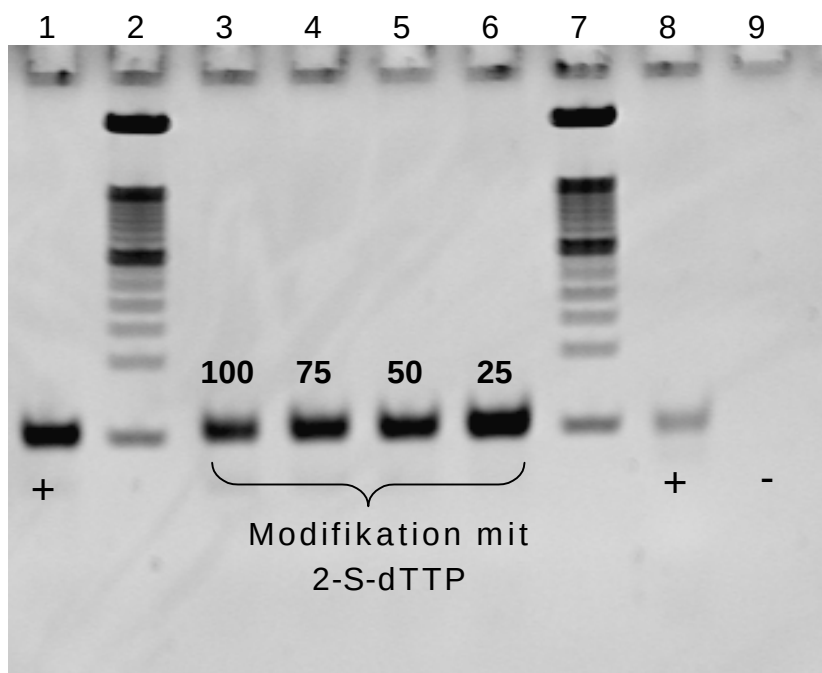


Abbildung 5-6: Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit massenmodifizierten PCR-Produkten für die T-Reaktion. Jeweils $\frac{1}{10}$ eines PCR-Ansatzes (5 μ l) wurde aufgetragen. Bahn 3 bis Bahn 6 zeigen die Banden des mit 2-S-dTTP modifizierten 48-mers. Die Bahnen 2 und 7 enthalten den Längensstandard (pBR 322, *AluI* geschnitten, je 2 μ l). In Bahn 1 und 8 wurde als Positivkontrolle (+) jeweils ein unmodifiziertes PCR-Produkt in unterschiedlicher Konzentration aufgetragen. Bahn 9 zeigt als Negativkontrolle (-) einen PCR-Reaktionsansatz, der kein Template T87 enthielt. Die modifizierten Nucleotide wurden in folgenden Konzentrationsverhältnissen in der Reaktion eingesetzt:

2-S-dTTP/dTTP [%]		2-S-dTTP/dTTP [%]	
Bahn 3	100/0	Bahn 5	50/50
Bahn 4	75/25	Bahn 6	25/75

Sowohl die *Taq* DNA-Polymerase, als auch die *HotStar Taq* DNA-Polymerase erwiesen sich dagegen für einen Einsatz in der Polymerasekettenreaktion als ungeeignet. Mit diesen Enzymen konnte das PCR-Produkt, unabhängig von Art und Menge des verwendeten basenmodifizierten Nucleotidanalogs (5-OH-dCTP, 2-S-dCTP oder 2-S-dTTP), nur in sehr geringer Ausbeute erzeugt werden. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft die Aufnahme eines 12 %igen Polyacrylamidgels von modifizierten PCR-Produkten nach Amplifizierung mit *Taq* DNA-Polymerase. Die schwache Intensität der Banden zeigt, dass nur eine geringe Menge an 2-S-dCTP- oder 2-S-dTTP-modifizierten PCR-Produkten gewonnen werden konnte. Als Vergleich wurden hier zwei mit *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase amplifizierte, ebenfalls mit dem „schweren“ Analogon 2-S-dTTP massenmodifizierte PCR-Produkte aufgetragen, deren Banden deutlich intensiver im Gel erscheinen.

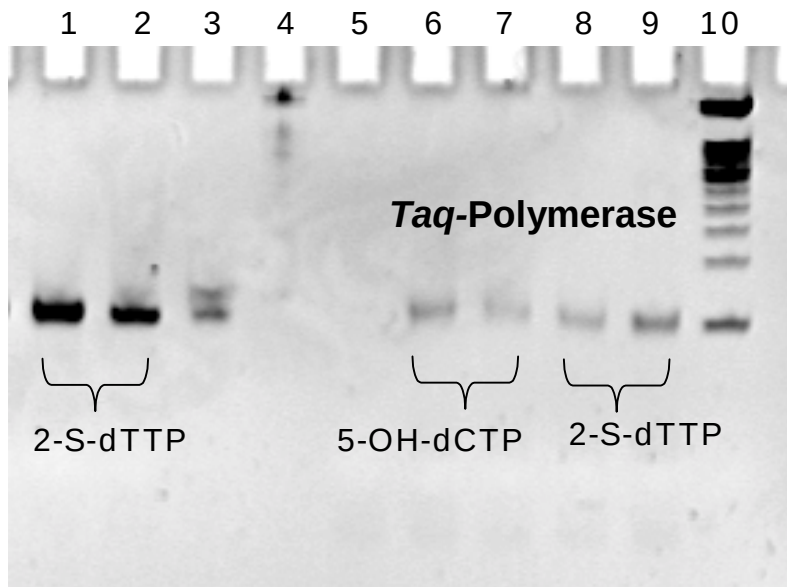


Abbildung 5-7: 12 %iges Polyacrylamidgel mit massenmodifizierten PCR-Produkten. Die Bahnen 6 bis 9 enthalten massenmodifizierte PCR-Produkte (je 50 % 5-OH-dCTP oder 2-S-dTTP), die mit *Taq* DNA-Polymerase generiert wurden. Die Bahnen 1 und 2 zeigen im Vergleich hierzu die wesentlich intensiveren Banden der mit *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase erzeugten Amplifikate, die ebenfalls zu 50 % 2-S-dTTP enthalten. Jeweils 5 µl wurden auf das Gel aufgetragen. Die Bahnen 4 und 10 enthalten den Längenstandard (pBR 322, *AluI* geschnitten (1 µl bzw. 3 µl) in unterschiedlicher Konzentration. Bahn 5 enthält die Negativkontrolle, Bahn 3 eine Positivkontrolle, die aufgrund eines Pipettierfehlers nur schwach zu erkennen ist.

5.2.2 Kombiniertes Einsatz von massenmodifizierten dNTPs und α -Thio-Terminatoren in der PCR

Als Template für die reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich müssen PCR-Produkte amplifiziert werden, in denen jeweils ein natürliches dNTP (dCTP oder dTTP) vollständig durch seine beiden „schweren“ Analoga (ein basenmodifiziertes Nucleosid und den entsprechenden α -S-Terminator) ersetzt wird: Analog zu Kapitel 5.2.1 wurden die jeweiligen modifizierten Nucleosidtriphosphate für die T- bzw. C-Reaktion in unterschiedlichen Konzentrationen in der PCR eingesetzt und die PCR-Produkte anschließend gelelektrophoretisch analysiert (vgl. Abb. 5-8 und 5-9).

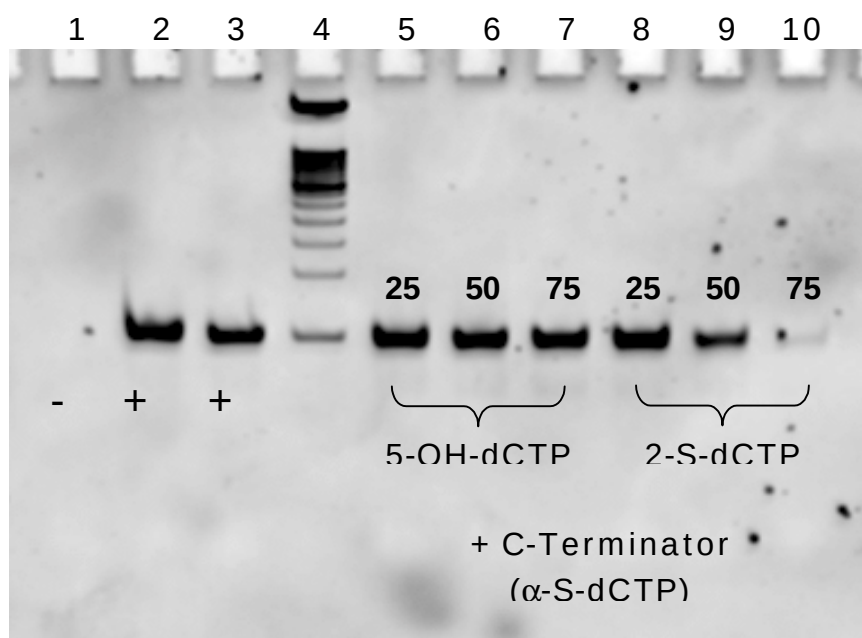


Abbildung 5-8: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von PCR-Produkten für die reverse Sanger Sequenzierung (C-Reaktion): Das natürliche dCTP wurde vollständig durch seine „schweren“ Analoga α -S-dCTP (Terminator) und 2-S-dCTP bzw. 5-OH-dCTP (Massenausgleich) ersetzt. Bahn 1 zeigt die Negativkontrolle (-) (PCR-Ansatz ohne Template), die Bahnen 2 und 3 zeigen Positivkontrollen (+) mit jeweils 100 % dCTP (Bahn 2) bzw. 100 % α -S-Terminator (Bahn 3). Aufgetragen wurde jeweils $\frac{1}{10}$ eines PCR-Ansatzes. Bahn 4 enthält den Standard pBR 322, *AluI* geschnitten (2 μ l). Die folgende Tabelle zeigt die Konzentrationsverhältnisse der jeweiligen Modifikationen im Reaktionsansatz:

5-OH-dCTP / C-Terminator [%]		2-S-dCTP / C-Terminator [%]	
Bahn 5	25 / 75	Bahn 8	25 / 75
Bahn 6	50 / 50	Bahn 9	50 / 50
Bahn 7	75 / 25	Bahn 10	75 / 25

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen wurden hier erneut bestätigt: Während 5-OH-dCTP auch bei hoher Konzentration im PCR-Ansatz hohe Produktausbeuten lieferte (Abb. 5-8, Bahn 5 bis 7), nahmen die Intensitäten der PCR-Banden mit steigendem Anteil an 2-S-dCTP deutlich ab (Bahn 8 bis 10). Bei einem Anteil von 75 % des massenmodifizierten dNTP's zu 25 % C-Terminator konnte praktisch kein PCR-Produkt mehr generiert werden. Die Amplifizierungsreaktion kann hier mit maximal 50 % der Massenmodifikation durchgeführt werden.

Erwartungsgemäß konnte die Konzentration des T-Analogons 2-S-dTTP ebenfalls auf bis zu 75 % in PCR-Ansatz erhöht werden, ohne einen Ausbeuteverlust an Produkt hinnehmen zu müssen (vgl. Abbildung 5-9, Bahn 2 bis 4).

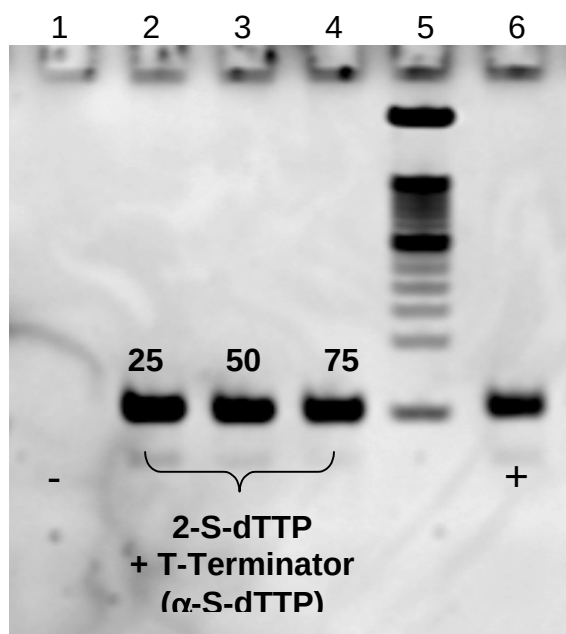


Abbildung 5-9: Polyacrylamid-Gelelektrophorese massenmodifizierter PCR-Produkte für die reverse Sanger Sequenzierung (T-Reaktion): Die Bahnen 2 bis 4 enthalten PCR-Produkte, in denen das natürliche dTTP vollständig durch seine beiden schwereren Analoga 2-S-dTTP bzw. α -S-dTTP (Terminator) ersetzt wurde. Bahn 1 zeigt die Negativkontrolle (-) (PCR-Ansatz ohne Template), Bahn 6 eine Positivkontrolle (+) (unmodifiziertes PCR-Produkt), aufgetragen wurde jeweils $\frac{1}{10}$ eines PCR-Ansatzes. Bahn 5 enthält den Standard pBR322, *Alu I* geschnitten, 2 μ l. Die Konzentrationen der Nucleotid-Analoga im PCR-Ansatz war wie folgt:

2-S-dTTP/T-Terminator [%]		2-S-dTTP/T-Terminator [%]	
Bahn 2	25/75	Bahn 4	75/25
Bahn 3	50/50		

5.2.3 Analyse massenmodifizierter PCR-Produkte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Neben der gelelektrophoretischen Untersuchung wurden die modifizierten PCR-Produkte aus den Kapiteln 5.2.1 und 5.2.2 auch massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden die 48-mere, wie zuvor beschrieben, über ihre Biotin-Markierung an die Streptavidin-Beads gebunden und durch mehrfaches Waschen mit Tris-HCl-Lösung an der Festphase aufgereinigt. Nach Denaturierung des DNA-Duplex und anschließender Abspaltung des biotinylierten Stranges von den Streptavidin-Beads wurden die beiden Einzelstränge getrennt voneinander auf einem MALDI-TOF Massenspektrometer vermessen.

Die Untersuchung der modifizierten PCR-Produkte aus Kapitel 5.2.1 zeigt noch einmal den Effekt der Signalverbreiterung bei gleichzeitiger Inkorporierung eines natürlichen dNTPs und seines „schweren“ Analogons in den DNA-Strang. Insbesondere bei der T-Reaktion wirkt sich die Massenheterogenität sichtbar auf die Signalauflösung aus, da in das Amplifikat bis zu 11 (nicht-biotinylierter Strang) bzw. 14 (biotinylierter Strang) Nucleotidanaloga inkorporiert werden können. Somit können bis zu 11 bzw. 14 PCR-Produkte unterschiedlicher Massen generiert werden, deren einzelne Signale im Massenspektrum nicht mehr aufgelöst werden können. Abbildung 5-10 auf Seite 87 zeigt die gegenüber dem unmodifizierten PCR-Produkt verbreiterten Molekülsignale, wenn das natürliche dTTP zu 25 bzw. 50 % durch 2-S-dTTP ersetzt wird (Spektrum II und III). Bei vollständigem Ersatz von dTTP durch sein „schweres“ Analogon wird dagegen erwartungsgemäß wieder ein scharfes Signal detektiert (Spektrum IV). Gut zu erkennen ist zudem die Verschiebung der Signale zu höheren Massen mit steigendem Anteil an „schwerem“ 2-S-dTTP.

Bei der massenspektrometrischen Analyse C-modifizierter PCR-Produkte konnte diese Signalverbreiterung nicht beobachtet werden, da das 48-mer nur 3 (nicht-biotinylierter Strang) bzw. 4 (biotinylierter Strang) Positionen trägt, an denen prinzipiell ein „schweres“ Cytidinanalogon inkorporiert werden kann.

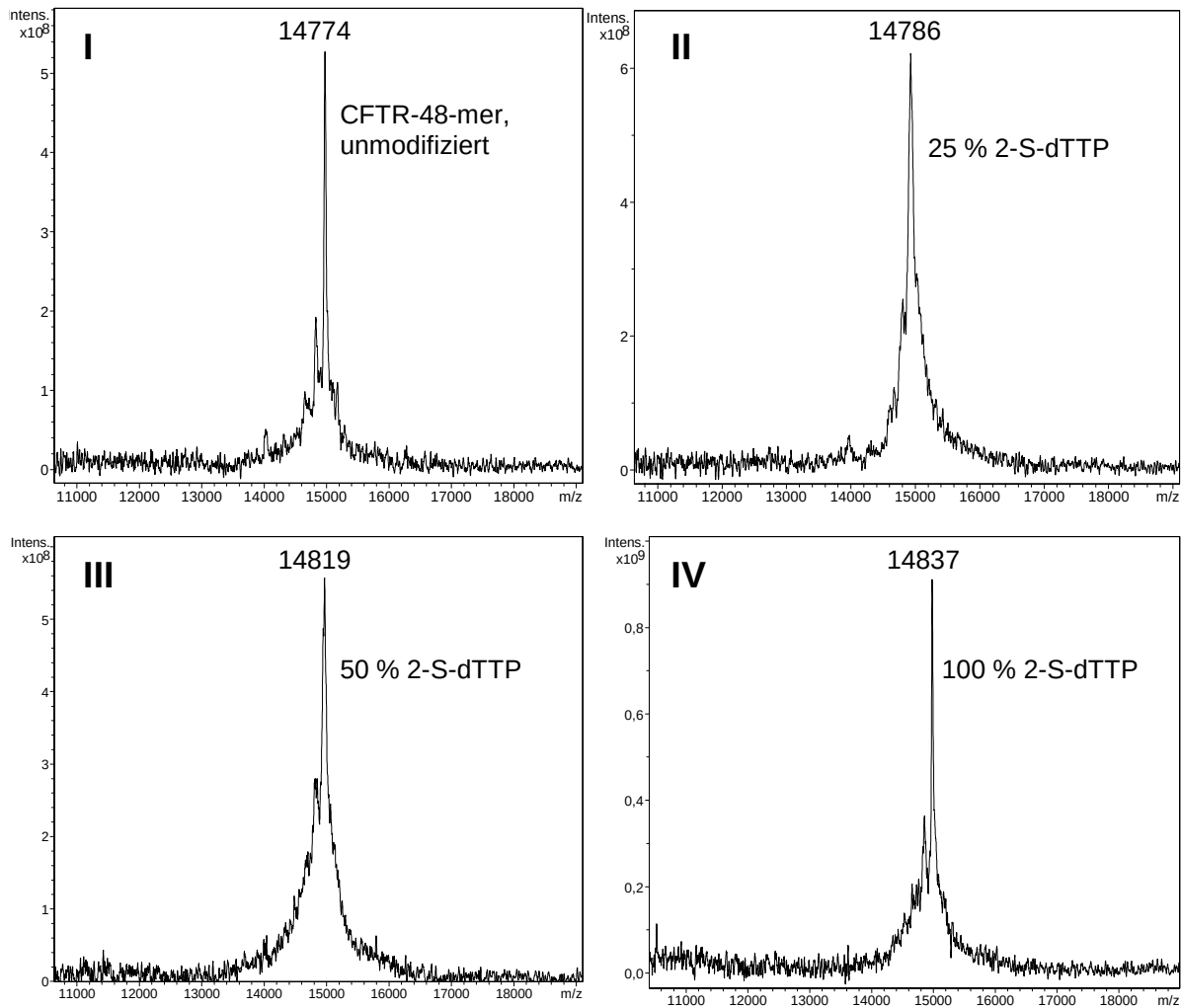


Abbildung 5-10: MALDI-TOF Massenspektren des nicht-biotinylierten 48-mers. Die Ausschnittsspektren zeigen eine Verbreiterung des Signals bei Inkorporierung des massenmodifizierten 2-S-dTTP neben dem natürlichen dTTP (Spektrum II und III). Spektrum I zeigt das unmodifizierte PCR-Produkt, in Spektrum IV wurde das natürliche dTTP zu 100 % durch 2-S-dTTP ersetzt. Deutlich erkennbar ist in Spektrum II und III die Peakverbreiterung bedingt durch die Massenheterogenität.

Die Inkorporierung des Cytidinanalogons 5-OH-dCTP verlief auch bei hohen Konzentrationen im Reaktionsansatz problemlos und lieferte in jedem Fall das erwartete Molekülsignal.

Die Untersuchung 2-S-dCTP-modifizierter PCR-Produkte mittels MALDI-TOF MS bestätigte das durch gelelektrophoretische Untersuchung der PCR-Produkte gewonnene Ergebnis der schlechten Akzeptanz dieser Modifikation durch die Polymerase. Lediglich bei einem Anteil von 25 % 2-S-dCTP (neben 75 % dCTP) im Reaktionsansatz wurde das erwartete *full length*-PCR-Produkt generiert (vgl. Abb. 5-11, Spektrum I, S. 88). Dagegen wurden bei Ersatz des natürlichen Triphosphats durch 50 oder 75 % des „schweren“ Analogons in der PCR zwei

Amplifikate unterschiedlicher Massen erhalten (Abb. 5-11, Spektrum II und III). Hier zeigt sich die wesentlich höhere Genauigkeit der MALDI-TOF MS gegenüber herkömmlichen, gelelektrophoretischen Analyseverfahren: Mittels Gelelektrophorese konnten die beiden Amplifikate nicht identifiziert werden, da die Massendifferenz von ca. 900 Dalton scheinbar zu gering ist, um die Produkte während des Gellaufs zu trennen; es wurde daher nur eine Bande detektiert.

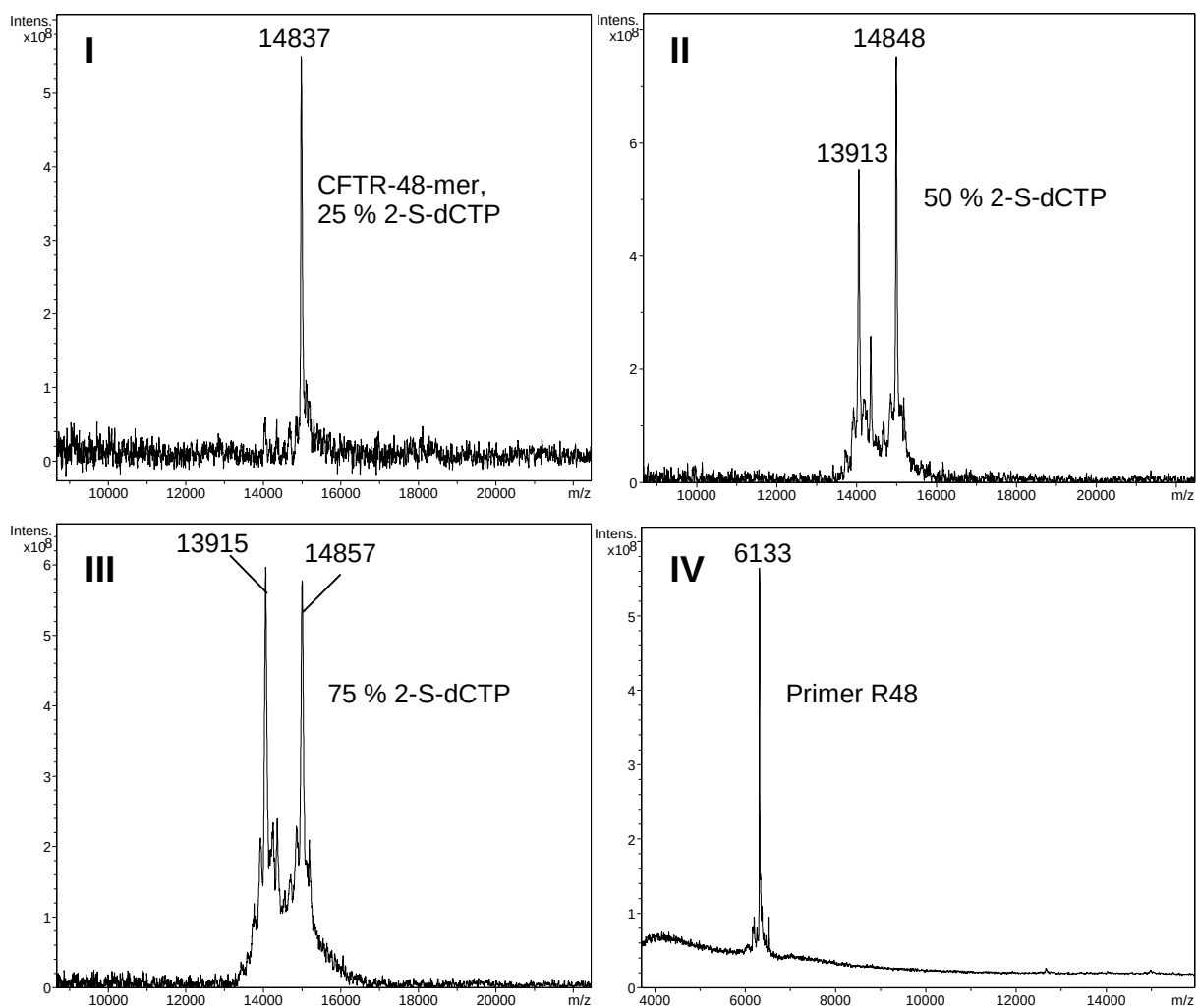


Abbildung 5-11: MALDI-TOF Massenspektren 2-S-dCTP-haltiger PCR-Produkte (denaturierter Strang). Die Amplifizierung des gewünschten PCR-Produktes führt nur bei einem Anteil von 25 % 2-S-dCTP (neben 75 % des natürlichen dCTP's) im Reaktionsansatz zum korrekten PCR-Produkt (Spektrum I). Bei Anteilen von 50 oder 75 % 2-S-dCTP werden zwei Amplifikate erhalten (II+III). Ein vollständiger Austausch des natürlichen dCTP's durch sein schweres Analogon setzt die Inkorporationsrate so weit herab, dass kein PCR-Produkt mehr generiert werden kann. Das Spektrum zeigt nur den nicht umgesetzten Primer (IV).

Die Massendifferenz von 935 bzw. 941 Dalton zwischen den beiden Amplifikaten zeigt, dass neben dem erwarteten 48-mer ein um drei Basen verkürztes Oligonucleotid (45-mer) generiert wurde. Die Sequenz des 48-mers endet im Fall des hier dargestellten nicht-biotinylierten Stranges auf ...CCAG. Es kann also davon ausgegangen werden, dass neben dem 48-mer das auch das auf C terminierte 45-mer amplifiziert wurde. Das darauffolgende, ebenfalls auf C terminierte 46-mer wird von der Polymerase nicht mehr synthetisiert, die Polymerisierungsreaktion bricht hier ab. Offenbar ist das Enzym nicht in der Lage, zwei aufeinanderfolgende Cytidinanaloge (2-S-dCTP) in den DNA-Strang einzubauen. Das „schwere“ Analogon 2-S-dCTP scheint die Inkorporationsrate des Enzyms extrem herabzusetzen. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung verhalten sich auch die Signalintensitäten, die einen Anhaltspunkt für die quantitative Ausbeute der Amplifikate geben können: Während bei einem Anteil von 50 % 2-S-dCTP das kurze Amplifikat (45-mer) eine etwas geringere Signalintensität aufweist als das 48-mer, und damit noch als Nebenprodukt angesehen werden kann, unterscheiden sich die Intensitäten der Signale bei einer Konzentration von 75 % 2-S-dCTP im Reaktionsansatz bereits nicht mehr. Bei vollständigem Ersatz des natürlichen dCTP's durch 2-S-dCTP wird kein PCR-Produkt mehr amplifiziert, die Polymerase wird durch das Cytidinanalogon 2-S-dCTP blockiert. Im Spektrum wurde lediglich nicht umgesetzter Primer detektiert (Abb. 5-11, IV).

Die schlechtere Akzeptanz von 2-S-dCTP durch die Polymerase muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass diese Modifikation für einen Einsatz in der reversen Sanger Sequenzierung ungeeignet ist. Entscheidend ist das Verhältnis [2-S-dCTP/C-Terminator]. Eine geringe Konzentration an 2-S-dCTP bedingt eine hohe Konzentration des Terminators im Reaktionsansatz. Eine Sequenzierung kann jedoch auch bei einer Konzentration von 75 % des Terminators (α -S-dCTP) erfolgreich verlaufen, insbesondere wenn wie bei der vorliegenden Sequenz nur eine geringe Zahl an Terminationsprodukten erwartet wird. Eine hohe Konzentration des Terminators im PCR-Produkt bedingt zudem eine hohe Gesamtausbeute an Terminationsfragmenten (vgl. Kap. 1.4.3, Abb. 1-5), die sich positiv auf die Auflösung des MALDI-TOF Spektrums auswirkt. Jedoch ist die Sequenzierung von GC-reichen Sequenzen oder von Sequenzen mit mehreren aufeinander folgenden C's mit 2-S-dCTP zum Ausgleich der Massenheterogenität vermutlich nicht möglich. Das in dieser Arbeit verwendete, GC-arme PCR-System kann jedoch voraussichtlich als Template in der Sequenzierung verwendet werden.

6 Reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich

Eine erfolgreiche reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich setzt voraus, dass der enzymatische Abbaumechanismus der zur Generierung der Sequenzleitern verwendeten Exonuclease nicht durch die in den DNA-Strang inkorporierten massen-modifizierten dNTPs gestört wird. Die zuvor amplifizierten PCR-Produkte, in denen je ein natürliches Nucleosid vollständig durch einen basenspezifischen Terminator sowie ein entsprechendes Analogon zum Massenausgleich ersetzt war, wurden nun einem enzymatischen Abbau mit Exonuclease III unterzogen. Die enzymatische Reaktion konnte hierbei entweder als Festphasensequenzierung an den Streptavidin-Beads, oder in Lösung mit anschließender Aufreinigung über die Festphase durchgeführt werden (vergl. hierzu Kapitel 3.1.3, Abb. 3-4).

6.1 Festphasensequenzierung mit Exonuclease III

6.1.1 Die C-Reaktion mit 5-OH-dCTP oder 2-S-dCTP zum Massenausgleich

Wegen der wenigen, aus der Sequenz des 48-mers hervorgehenden, C-terminierten Fragmente ist eine Sequenzbestimmung der Base C einfacher und weniger empfindlich als die Generierung einer T-Leiter, bei der bis zu 14 basenspezifisch terminierte Fragmente zur vollständigen Sequenzierung detektiert werden müssen.

Für die zunächst untersuchte C-Reaktion wurden modifizierte PCR-Produkte verwendet, die neben dem C-Terminator (α -S-dCTP) zu 25, 50 oder 75 % ein massenmodifiziertes Analogon (5-OH-dCTP oder 2-S-dCTP) enthielten. Analog zu der unter Kapitel 3.2.3 beschriebenen reversen Sanger Sequenzierung an der Festphase wurden die PCR-Produkte zunächst an die Streptavidin-Beads immobilisiert und für die anschließende Sequenzierung in *Taq*-Reaktionspuffer umgepuffert. Für den enzymatischen Abbau wurden die Festphasenpartikel mit 20 U Exonuclease III versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Aufreinigung an der Festphase wurden die nicht-biotinylierten Abbauprodukte mit zweimolarer Ammoniaklösung denaturiert und der Streptavidin-Biotin-Komplex danach durch

Behandlung mit 100 mM Ammoniaklösung gespalten. Die Fragmentpopulationen wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Die reverse Sanger Sequenzierung mit 5-OH-dCTP zum Massenausgleich konnte erfolgreich am CFTR-PCR-System demonstriert werden. Dabei wurden – unabhängig vom verwendeten Konzentrationsverhältnis [C-Terminator/5-OH-dCTP] – durch enzymatischen Abbau alle erwarteten C-terminierten Fragmente erzeugt. Das massenmodifizierte Nucleotid 5-OH-dCTP verhält sich in der Sequenzierreaktion also wie sein natürliches Analogon: Die zusätzliche OH-Gruppe in der Base hat keinen Einfluss auf den Spaltmechanismus der Exonuclease III.

Für eine gleichzeitige Sequenzierung beider DNA-Stränge erwies sich – analog zur reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich – ein Konzentrationsverhältnis von 50:50 des basenmodifizierten Analogons 5-OH-dCTP zum C-Terminator (α -S-dCTP) im PCR-Reaktionsansatz als günstig (vgl. Kapitel 3.1.5). Eine höhere Konzentration des Terminators im Template [5-OH-dCTP/ α -S-Terminator = 25:75] führte erwartungsgemäß zu hohen Signalintensitäten im Bereich hoher Massen: Da viele Positionen in der Sequenz durch einen Terminator besetzt sind, bricht die enzymatische Reaktion bereits frühzeitig ab; es entstehen überproportional viele lange DNA-Fragmente (vgl. Abb. 6-1, Spektrum I). Eine geringe Terminatorkonzentration [5-OH-dCTP/C-Terminator = 75:25] führte dagegen bei der Sequenzbestimmung des nichtbiotinylierten Stranges insgesamt zu niedrigen Signalintensitäten (Abb. 6-1, Spektrum II).

Bei der Untersuchung des biotinylierten Stranges wurde bei geringer Terminatorkonzentration (25 %) eine für die massenspektrometrische Analyse ungünstige Reduzierung der Signalintensitäten bei hohen Analytmassen beobachtet (Abb. 6-2, Spektrum II, S. 94). Eine Erklärung hierfür könnte in der schlechteren Gesamtausbeute an C-terminierten Fragmenten (76 %) liegen, die durch die geringe Konzentration von α -S-dCTP im PCR-Produkt bedingt wird (vgl. Kap. 1.4.3, Abb. 1-5). Die Detektion von längeren Oligonucleotiden, die nur in geringer Konzentration vorliegen, kann – besonders bei den biotinylierten Fragmenten – durch hohe Konzentrationen an Nebenprodukten wie Primern oder Streptavidin, erheblich gestört werden. Die Abbildungen 6-1 und 6-2 auf den folgenden Seiten zeigen die Spektren der C-Reaktion bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen [5-OH-dCTP/ α -S-dCTP] im PCR-Produkt.

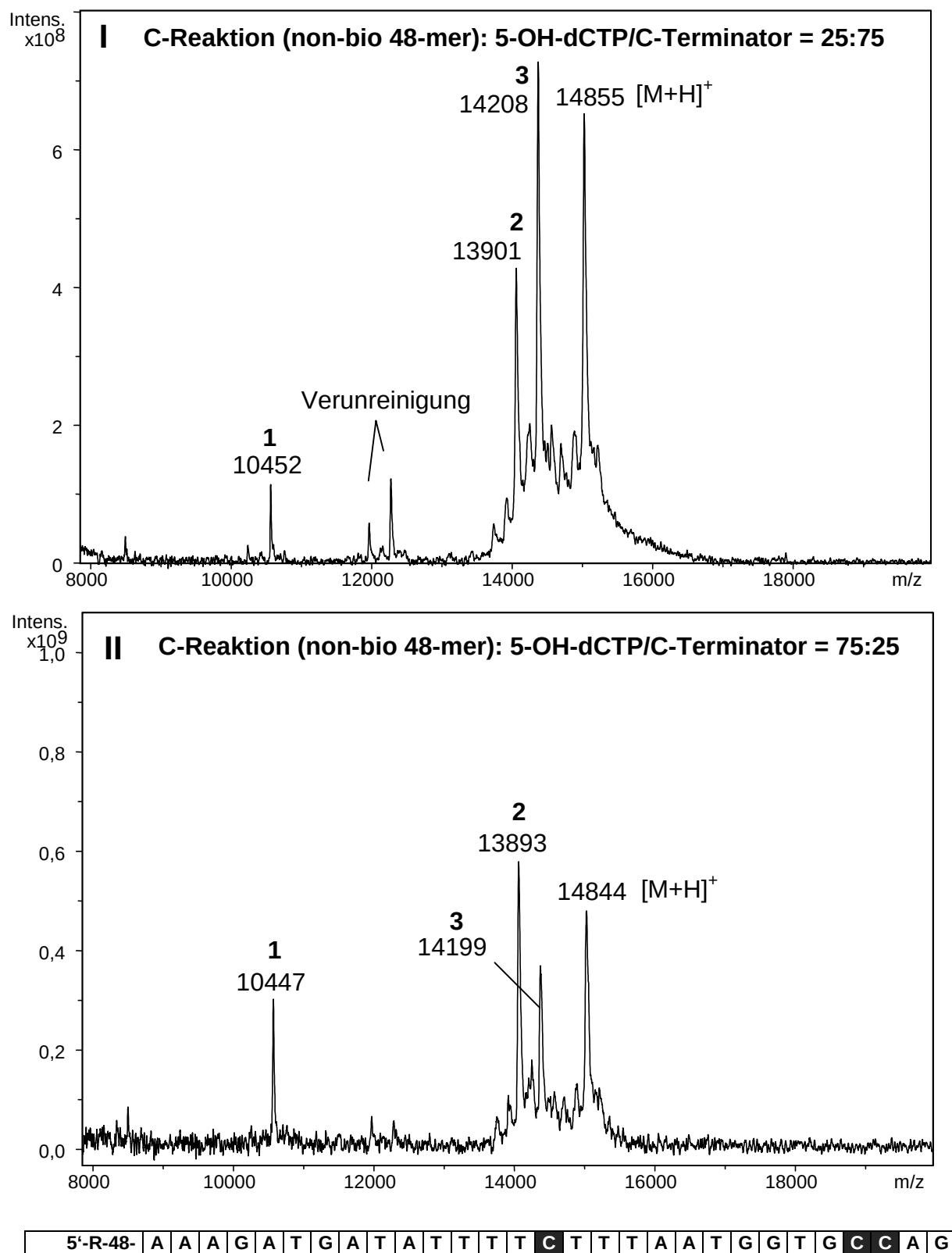
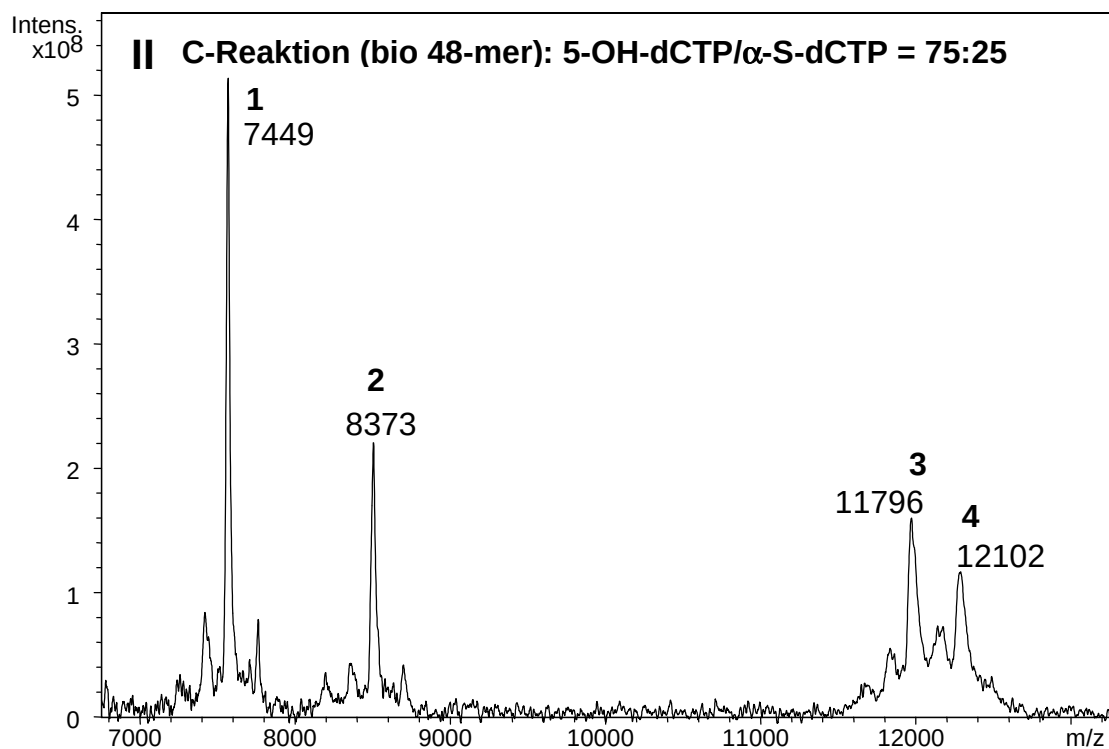
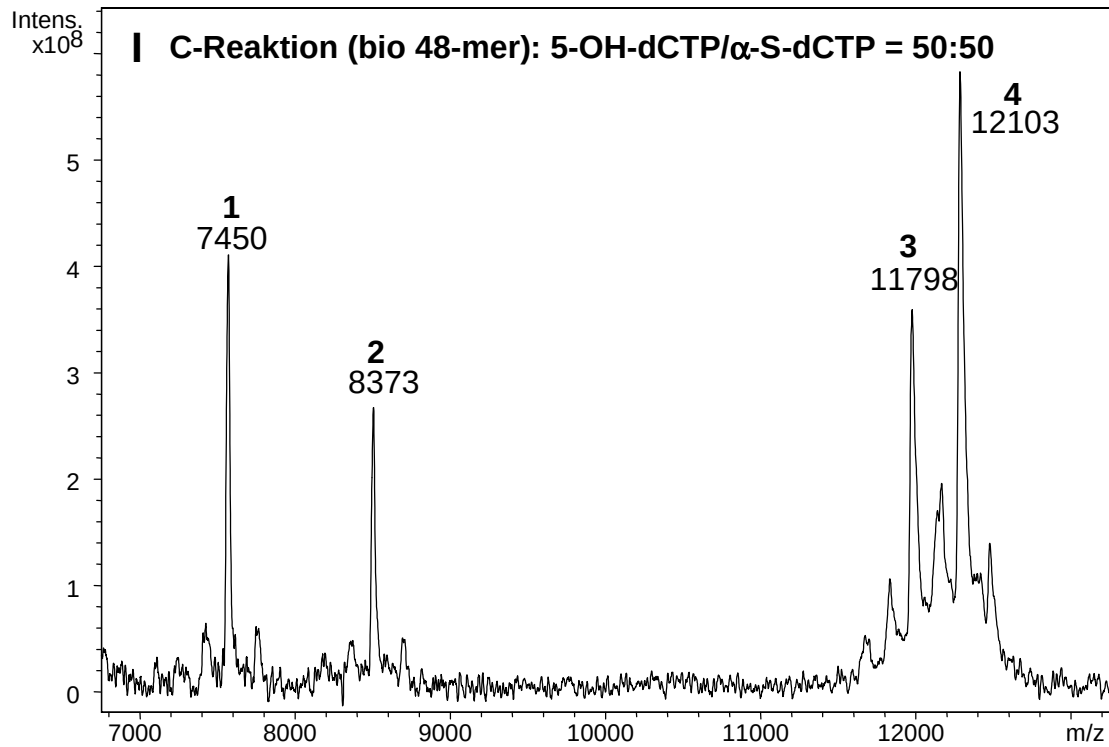


Abbildung 6-1: MALDI-TOF Spektrum der C-Reaktion (nicht-biotinylierter Strang) mit 5-OH-dCTP zum Massenausgleich. Spektrum I: Abbau eines PCR-Produktes mit 25 % 5-OH-dCTP (+75 % C-Terminator). Spektrum II: Das Template enthielt 75 % 5-OH-dCTP. Eine hohe Konzentration des Terminators führt zu hohen Signalintensitäten im Massenbereich ab 14000 Da (I). Bei einer geringen Terminatorkonzentration sind die Signalintensitäten insgesamt niedrig (II). Zum Vergleich mit der reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich siehe Tab. 3-C und Abb. 3-12, S. 45 u. 46.



5'-bio-F48- T A T C A T C T T T G G T G T T T C C T A T G A T G A A T

Abbildung 6-2: Fragmentleiter der C-Reaktion (biotinylierter Strang) mit 5-OH-dCTP zum Massenausgleich. Spektrum I: Abbau eines Templates mit 50 % 5-OH-dCTP (+50 % C-Terminator), Spektrum II: Template mit 75 % 5-OH-dCTP (+25 % α -S-dCTP). Während die Signalintensitäten bei gleichen Anteilen Terminator/5-OH-dCTP ausgeglichen sind (I), kommt es bei geringer Terminatorkonzentration zu einer Reduzierung der Intensitäten in hohen Massenbereichen. Zum Vergleich mit der reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich siehe Tab. 3-C und Abb. 3-12, S. 45 u. 46.

Auffallend war, dass bei allen Spektren der nicht-biotinylierten Sequenzleiter noch starke Signale des *full length*-PCR-Produktes $[M+H]^+$ detektiert wurden, während das biotinylierte 48-mer vollständig vom Enzym abgebaut wurde. Dieser Effekt konnte in deutlich schwächerer Ausprägung bereits bei der reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich beobachtet werden (vgl. Kap. 3.1.5). Die Vermutung lag nahe, dass die enzymatische Reaktion am denaturierten Strang durch die Nähe zur Festphase sterisch behindert und somit verlangsamt wird:

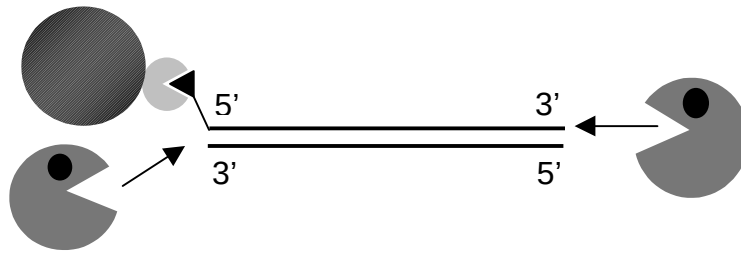
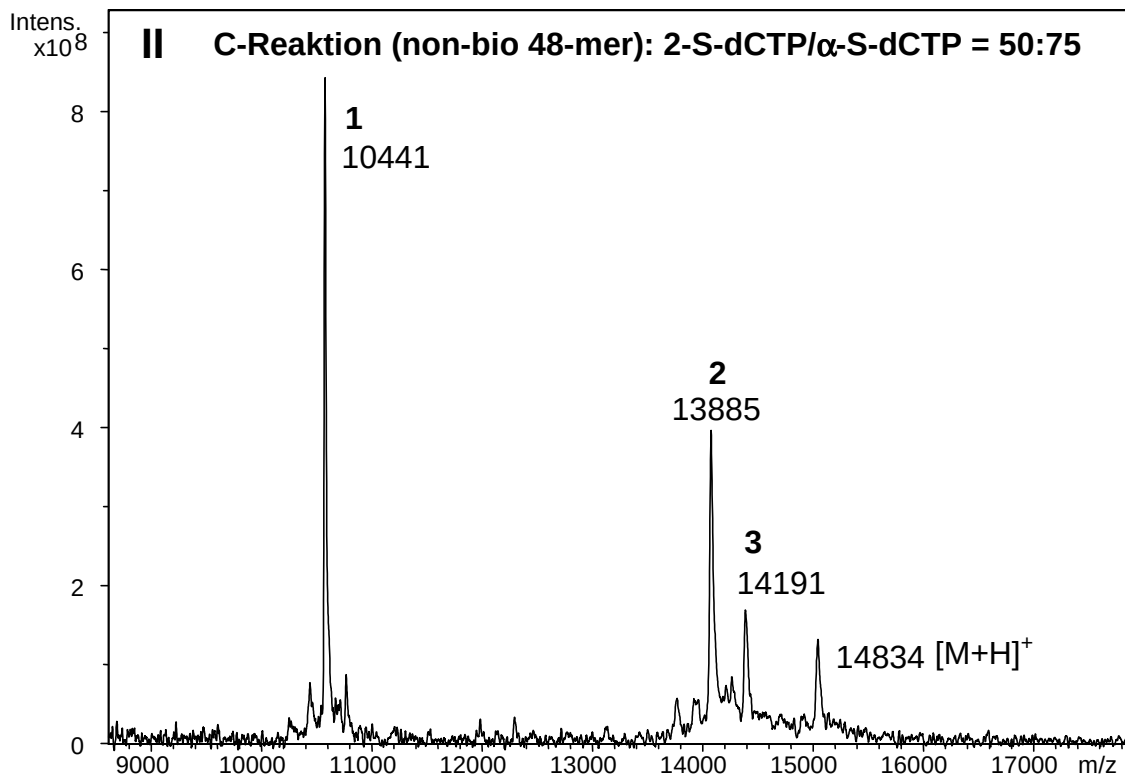
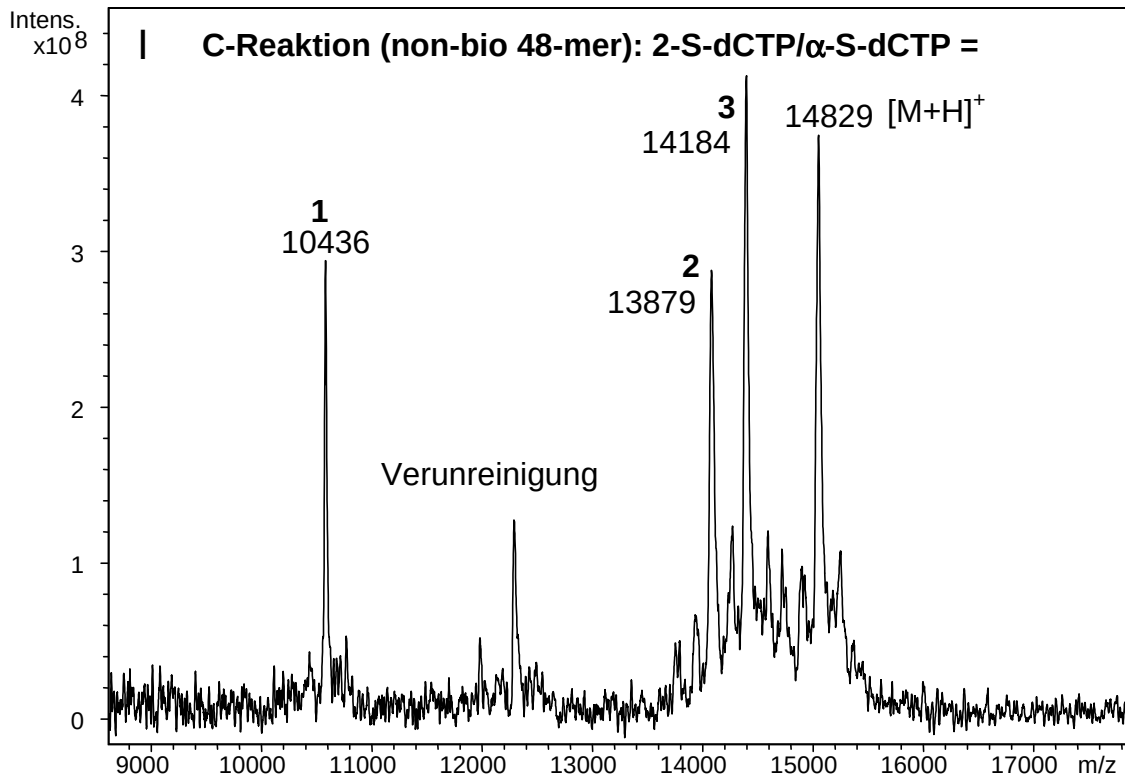


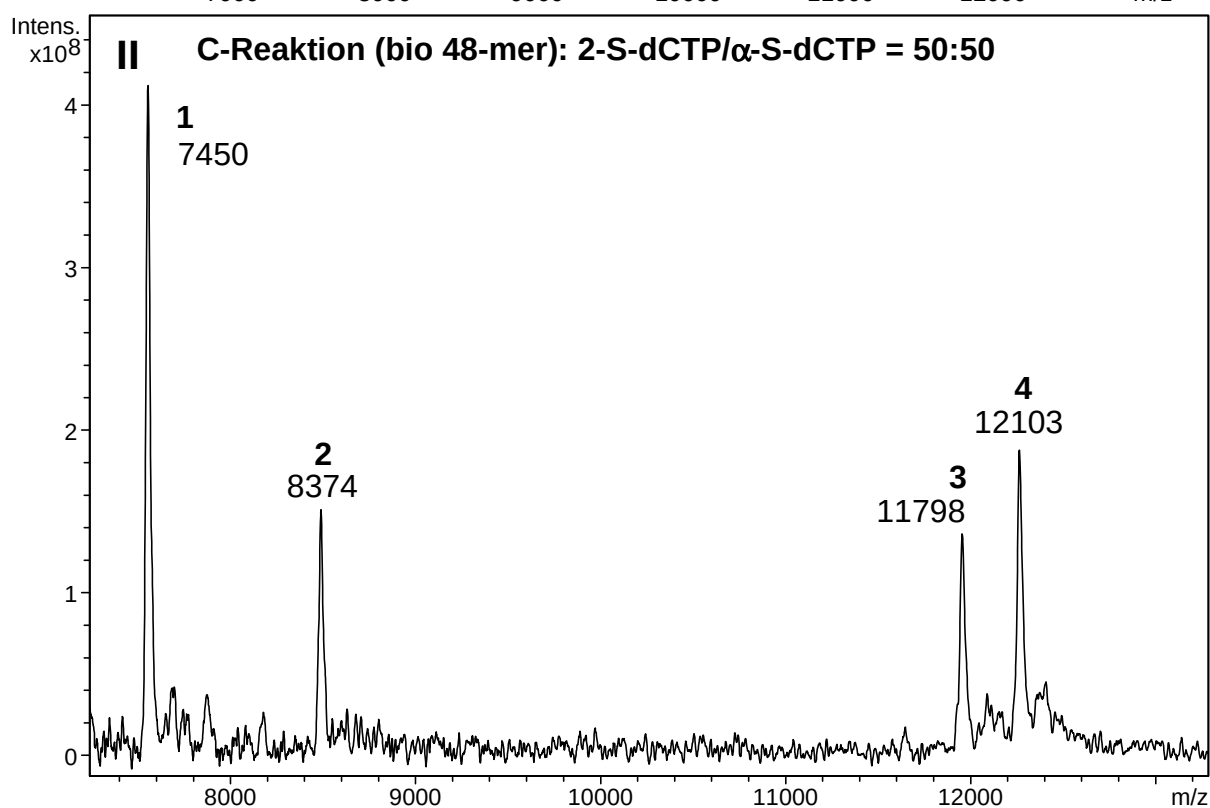
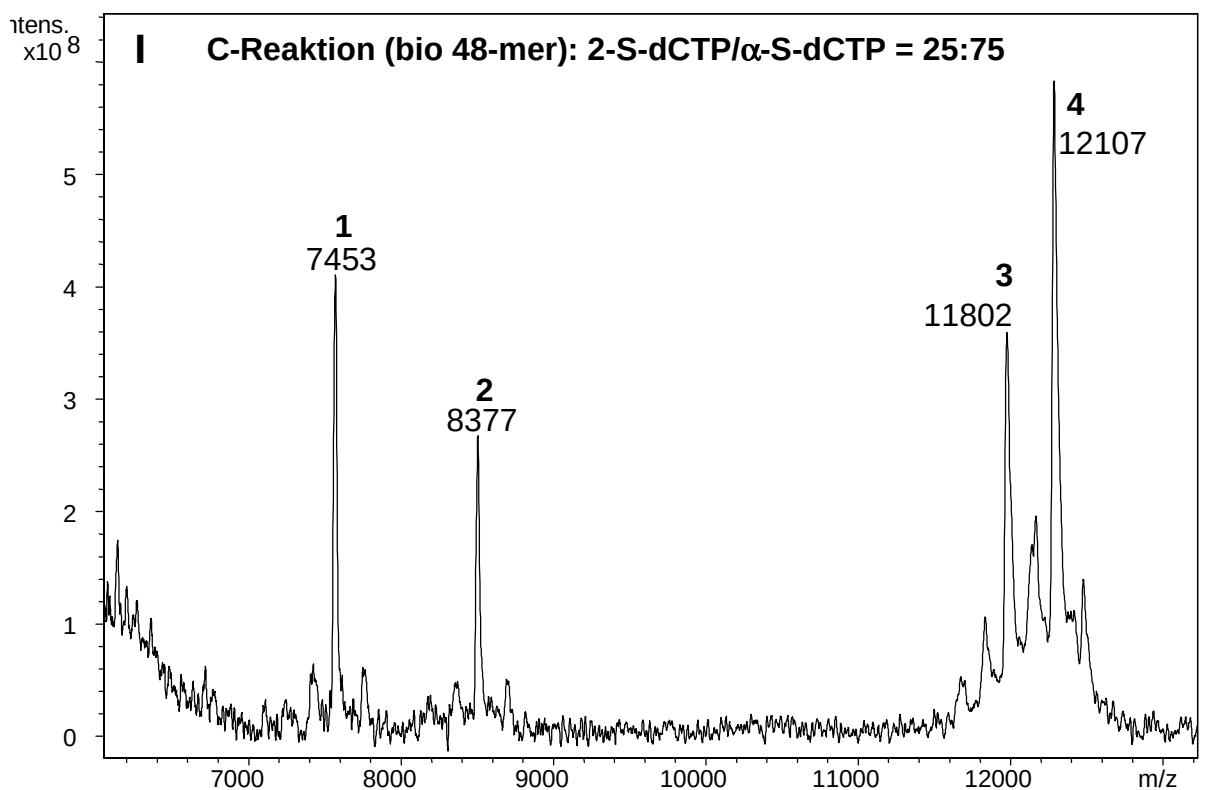
Abbildung 6-3: Spaltmechanismus der doppelstrangspezifischen Exonuclease III. Der enzymatische Abbau erfolgt immer in 3'→5'-Richtung.

Auch das zweite untersuchte Cytidinanalogon 2-S-dCTP konnte erfolgreich in der reversen Sanger Sequenzierung zum Ausgleich der Massenheterogenität eingesetzt werden. Aufgrund der schlechteren Akzeptanz dieses Analogons durch die DNA-Polymerase, konnten PCR-Ansätze mit einem hohen Anteil an 2-S-dCTP (75 % + 25 % Terminator) nicht für eine Sequenzierung verwendet werden, da das *full length*-Produkt (48-mer) hier nur in geringer Ausbeute erhalten wurde. Als Hauptprodukt wurde ein um drei Basen verkürztes Amplifikat generiert. Durch exonucleolytischen Abbau dieser Amplifikate konnten nur Signale von sehr geringer Intensität erzeugt werden, die sich nicht zur Sequenzbestimmung eigneten. PCR-Produkte mit einem geringeren Anteil an 2-S-dCTP (25 oder 50 %) konnten dagegen zur korrekten Sequenzbestimmung beider DNA-Stränge herangezogen werden (vgl. Abb. 6-4 und 6-5, S. 96/97). Analog zur Sequenzierung mit 5-OH-dCTP war die enzymatische Reaktion am biotinylierten Strang weiter fortgeschritten als am nicht-biotinylierten, bei dessen massenspektrometrischer Analyse stets das $[M+H]^+$ -Signal des nicht vollständig abgebauten 48-mers detektiert wurde (Abb. 6-4). Sollte dieser Effekt auf eine sterische Behinderung der Exonuclease durch die Festphase zurückzuführen sein, müsste dies theoretisch durch eine Reaktionsführung in Lösung oder den Einbau eines Spacers zwischen Biotinmarkierung und DNA ausgeglichen werden können. Aufreinigung und Trennung der DNA-Stränge könnten im Anschluss über das Festphasensystem durchgeführt werden (vgl. Kap. 3.1.3, Abb. 3-4).



5'-R-48- A A A G A T G A T A T T T T C T T T A A T G G T G C C A G

Abbildung 6-4: MALDI-TOF Spektrum der C-Reaktion (nicht-biotinylierten Strang) mit 2-S-dCTP zum Massenausgleich: Wegen der schlechten Inkorporation von 2-S-dCTP durch die Polymerase sind PCR-Produkte mit einem geringen Anteil des Analogons (25 %) und einer hohen Terminatorkonzentration günstig (Spektrum I). Eine steigende 2-S-dCTP-Konzentration senkt die Gesamtausbeute an PCR-Produkt und führt zu einer ungünstigen Fragmentverteilung (Spektrum II).



5'-bio-F48- T A T C A T C T T T G G T G T T T C C T A T G A T G A A T

Abbildung 6-5: Biotinylierte Fragmente der C-Reaktion mit 2-S-dCTP zum Massenausgleich. Spektrum I: 25 % 2-S-dCTP/75 % C-Terminator, Spektrum II: 50 % 2-S-dCTP/50 % C-Terminator.

Insgesamt konnten beide Cytidinaloga 5-OH-dCTP und 2-S-dCTP für eine erfolgreiche Sequenzierung mit Exonuclease III eingesetzt werden. Geeignet waren dabei PCR-Produkte mit einem Anteil von 25 oder 50 % der „schweren“ Nucleosidanaloga im Reaktionsansatz. Eine Gegenüberstellung der detektierten Massen einiger Sequenzierreaktionen mit den berechneten befindet sich im Anhang, Kapitel 11.1.2, S. 157 u. 158.

6.1.2 Die T-Reaktion mit 2-S-dTTP zum Massenausgleich

Analog zu Kapitel 5.1.1 wurden für die Sequenzierung mit 2-S-dTTP PCR-Produkte mit 25, 50 und 75 %igem Anteil an 2-S-dTTP untersucht. Durch enzymatischen Abbau von PCR-Produkten mit hohem Anteil des „schweren“ Analogons (2-S-dTTP/T-Terminator = 75:25) konnten die basenspezifisch terminierten Fragmente nicht in ausreichender Konzentration erzeugt werden. Hier lag die Gesamtausbeute der Terminationsprodukte durch die geringe Terminatorkonzentration vermutlich zu niedrig, so dass die geringen Signalintensitäten der einzelnen Fragmente und das schlechte Signal/Rauschverhältnis eine Sequenzierung verhinderten. Die Spektren zeigten lediglich einige Signale im niedrigen Massenbereich, die dem Primer, bzw. dem Primer-Abbau durch die Exonuclease zugeschrieben werden konnten.

Sequenzleitern wurden dagegen durch Exonuclease III-Abbau von PCR-Produkten erzeugt, die neben dem Terminator zu 25 oder 50 % das „schwere“ Analogon 2-S-dTTP zum Massenausgleich enthielten. Die Signalintensitäten waren jedoch für beide DNA-Stränge gering; zudem wurde für den nicht-biotinylierten Strang erneut viel *full length*-PCR-Produkt im Spektrum detektiert. Daher wurde in einer Zeitkinetik der Einfluss der Reaktionszeit des enzymatischen Abbaus auf die Intensität der detektierten Signale überprüft. Die Reaktionszeit wurde hierfür zwischen 5 und 70 Minuten variiert. Für den nicht-biotinylierten Strang wurde eine Verbesserung der Signalintensität bei längeren Reaktionszeiten erwartet, während für den biotinylierten Strang eher kurze Reaktionszeiten vorteilhaft sein sollten. Zusätzlich wurde bei einer Standardreaktionszeit von 30 Minuten die Enzymkonzentration halbiert, um die Reaktion zu verlangsamen.

Tabelle 6-A gibt eine Übersicht über den Einfluss von Reaktionszeit und Enzymkonzentration auf die Exonuclease III-Reaktion. Demnach erwiesen sich längere Reaktionszeiten (50 bis 70 min) erwartungsgemäß für die Generierung der nicht-biotinylierten Sequenzleiter als

vorteilhaft. Das Signal des nicht-umgesetzten PCR-Produktes $[M+H]^+$ wird mit zunehmender Reaktionszeit geringer, während die Konzentration der T-terminierten Fragmente und damit auch die Intensität ihrer Signale im Spektrum steigt (vgl. Abb. 6-6).

Entgegen den Vermutungen führten lange Reaktionszeiten bei der Untersuchung des biotinylierten Stranges nicht zu schlechteren MALDI-TOF Spektren. Zwar sinkt die Signalintensität bei langen Reaktionszeiten, dafür wurden jedoch keine Fehlabbrüche detektiert, während bei 10-minütiger Enzymreaktion deutliche Fehlabbrüche auftraten, die zur Bestimmung einer falschen Sequenz führen. (vgl. Abb. 6-7). Längere Reaktionszeiten von 50 bis 70 Minuten erwiesen sich daher für die Sequenzierung mit 2-S-dTTP zum Massenausgleich als günstig.

Exonuclease III [U]	Reaktionszeit [min]	nicht-biotinylierte Sequenzleiter	biotinylierte Sequenzleiter
20	5	• Sehr geringe Signalintensitäten • Falsche Signale (Fehlabbrüche) • Nicht-umgesetztes PCR-Produkt ($[M+H]^+$-Signal) → Abbau zu kurz	• Zu geringe Signalintensitäten → Keine Sequenzierung möglich
20	10	• Signale 1+2 fehlen. • Nicht-umgesetztes PCR-Produkt ($[M+H]^+$-Signal) → Abbau zu kurz	• Gute Signalintensitäten • Mehrere Fehlabbrüche → Vollständige Sequenz
10	30	• Praktisch nur PCR-Produkt wurde detektiert → Keine Sequenzierung möglich	→ Kein auswertbares Spektrum
20	30	• Signale 1+2 fehlen • Nicht-umgesetztes PCR-Produkt ($[M+H]^+$-Signal) → Abbau zu kurz	• Geringe Signalintensitäten, → Vollständige Sequenz
20	50	• Nur wenig $[M+H]^+$ wurde detektiert → Vollständige Sequenz	• Signalintensitäten im vorderen Massenbereich etwas höher → Vollständige Sequenz
20	70	→ Vollständige Sequenz	• Geringe Signalintensität → Vollständige Sequenz

Tabelle 6-A: Einfluss von Reaktionszeit und Enzymkonzentration auf die reverse Sanger Sequenzierung mit 2-S-dTTP zum Massenausgleich.

6 Reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich

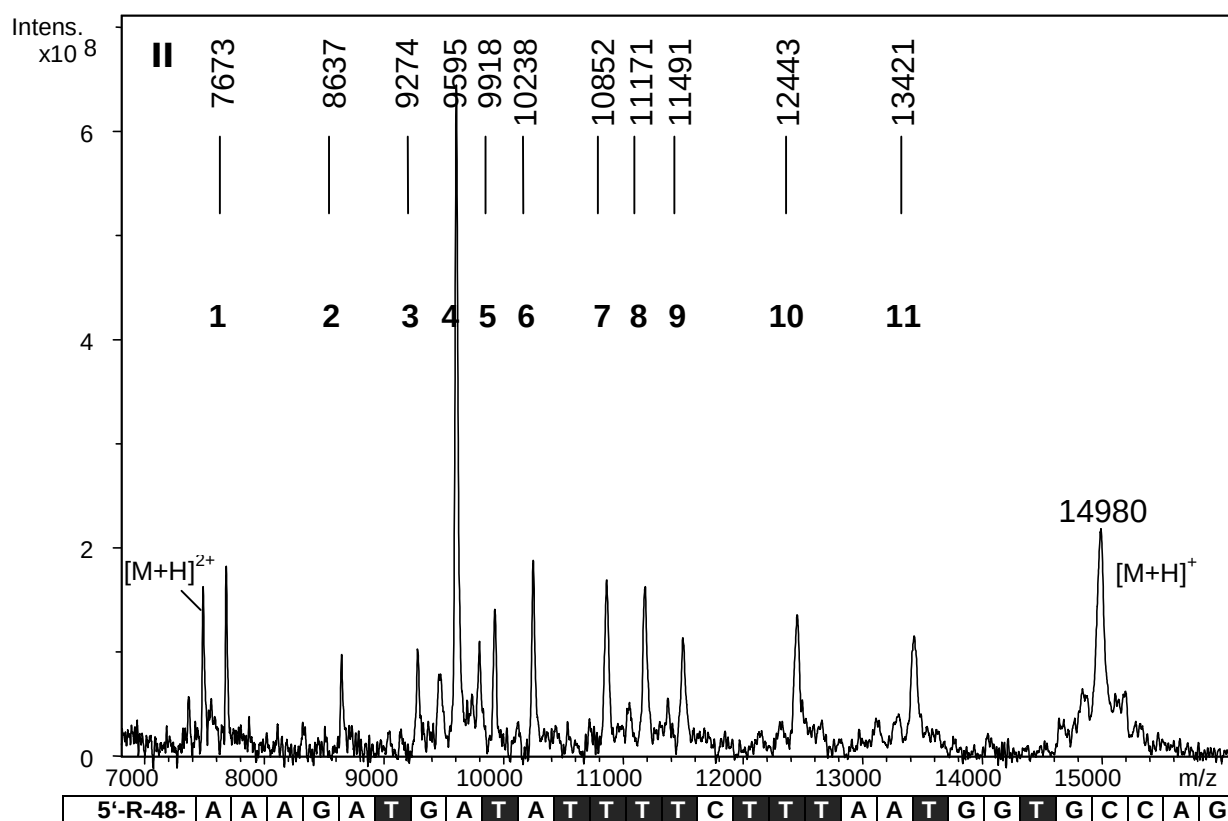
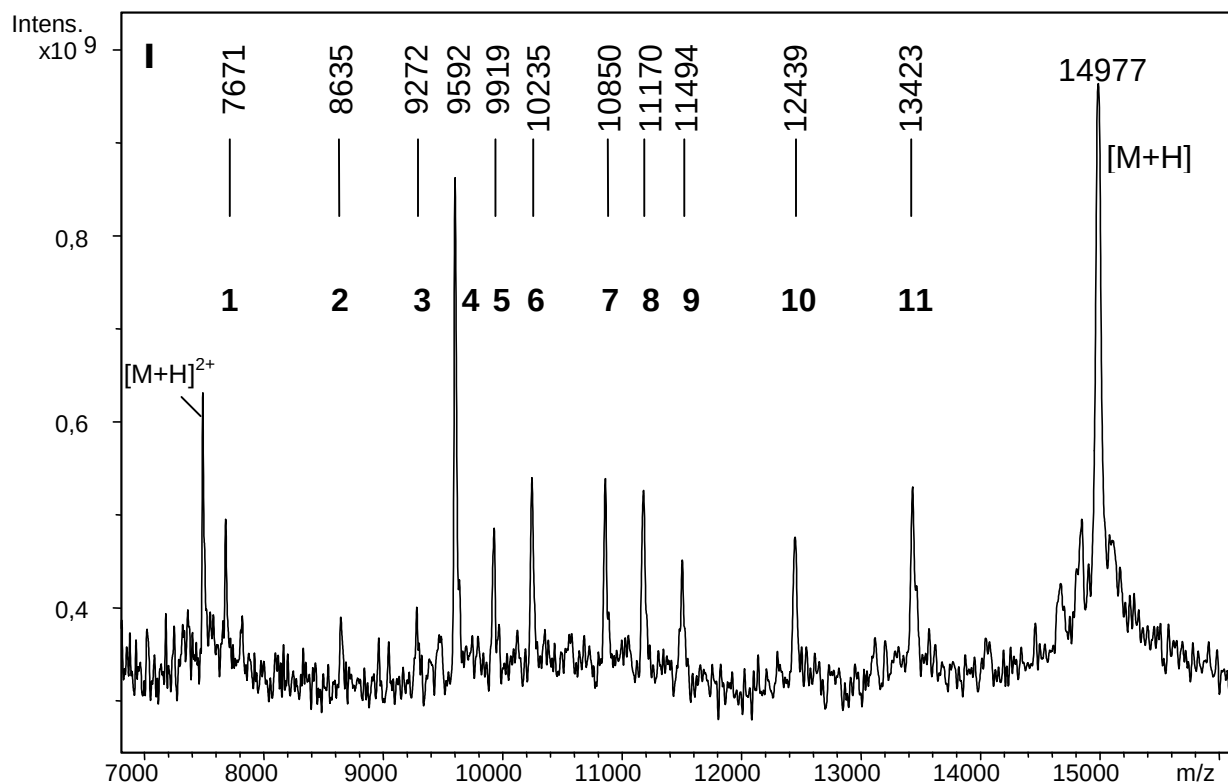
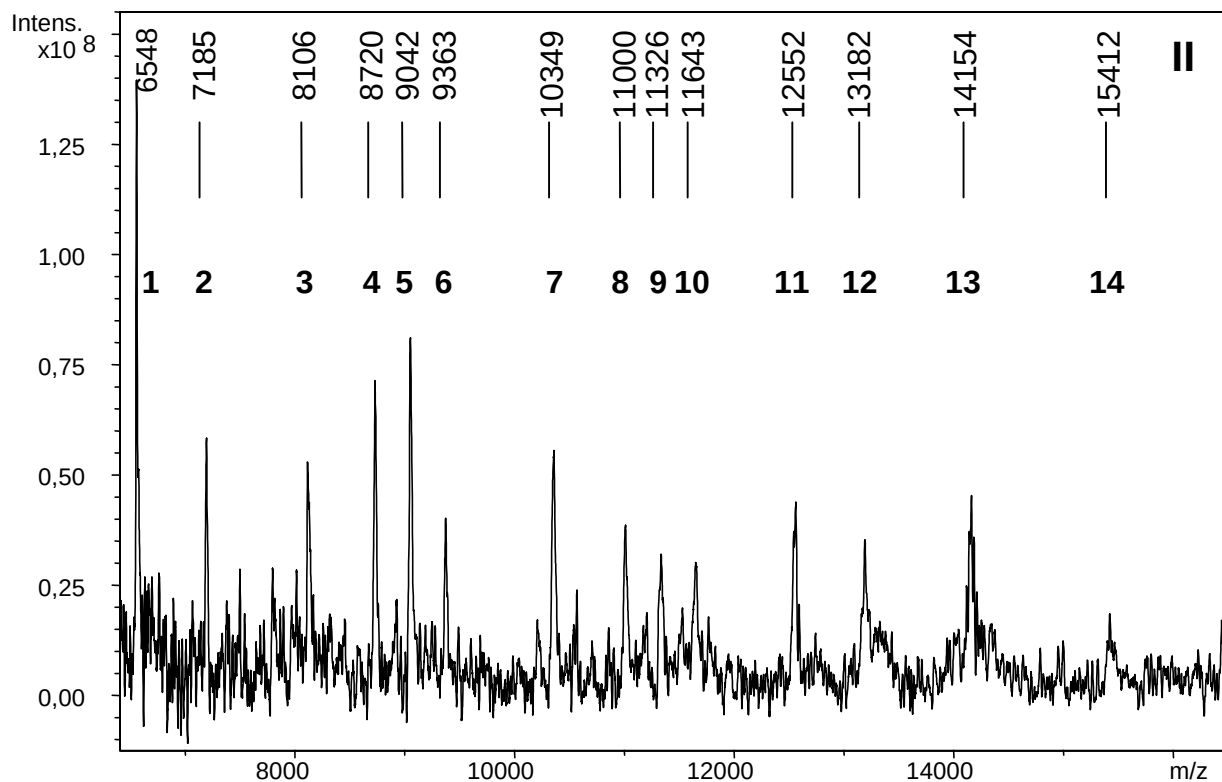
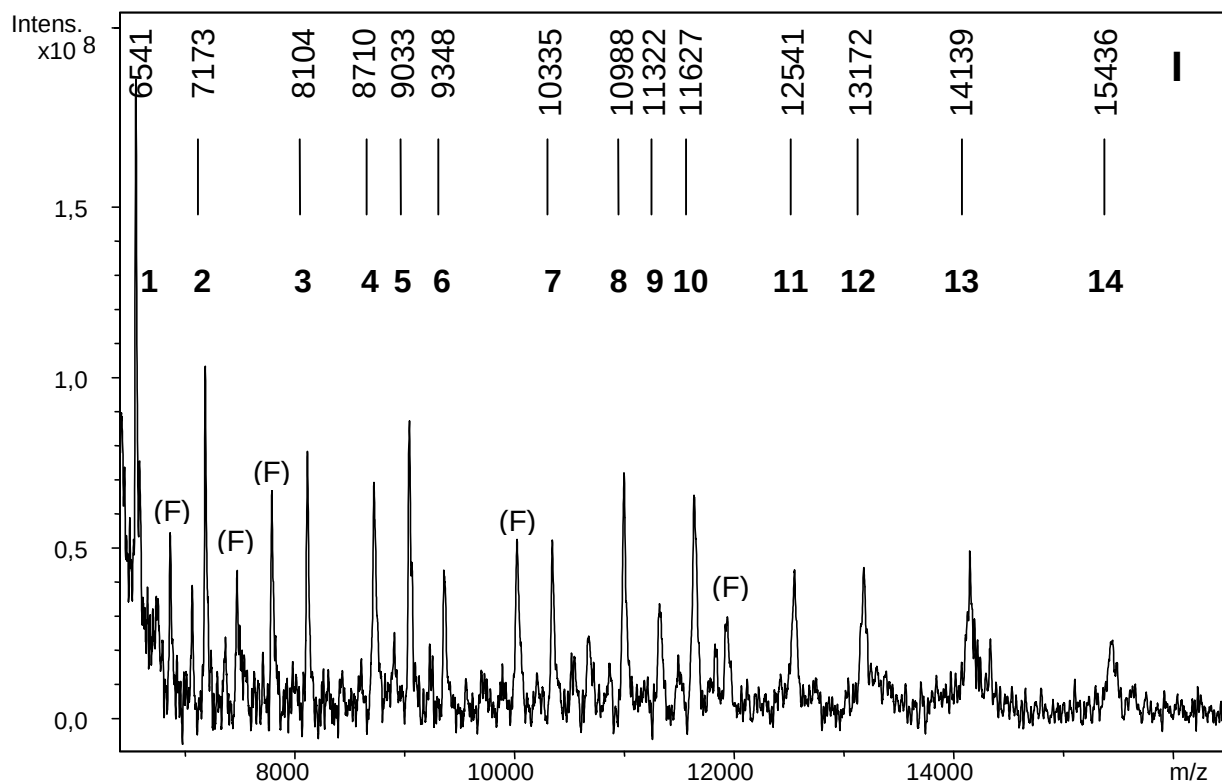


Abbildung 6-6: MALDI-TOF Spektren der T-Reaktion (nicht-biotinylierter Strang) mit 2-S-dTTP zum Massenausgleich. Verwendet wurden PCR-Produkte mit je 50 % 2-S-dTTP bzw. T-Terminator. Spektrum I wurde nach 50 Minuten, Spektrum II nach 70 Minuten Inkubation mit Exonuclease III aufgenommen. Deutlich zu erkennen ist die sinkende Intensität des Molekülsignals $[M+H]^+$ bei längerer Reaktionszeit. Die Intensitäten der Fragmentsignale steigen dagegen mit zunehmender Abbauzeit an.



5'-bio-F48- T A T C A T C T T T G G T G T T T C C T A T G A T G A A T

Abbildung 6-7: MALDI-TOF Spektren der T-Reaktion des biotinylierten Stranges. Verwendet wurden PCR-Produkte mit 50 % 2-S-dTTP bzw. T-Terminator. Spektrum I wurde nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten, Spektrum II nach 70 Minuten aufgenommen. Bei kurzen Reaktionszeiten wurden häufig Signale aus Falschabbrüchen (F) detektiert, während bei langen Inkubationszeiten mit Exonuclease III praktisch keine falschen Signale mehr auftraten.

Durch den Einsatz des „schweren“ Thymidinanalogs 2-S-dTTP in der reversen Sanger Sequenzierung konnte die Massengenauigkeit, d.h. die Übereinstimmung der Massen der detektierten Fragmente mit den berechneten, gegenüber der reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich verbessert werden (vgl. Kap. 3.1.5). In der folgenden Tabelle sind die Massen der Fragmentensignale den erwarteten Massen gegenübergestellt. Eine vollständige Übersicht aller berechneten Massen findet sich in Kapitel 11.1.2, S. 157/158 im Anhang. Die Signalintensitäten waren jedoch insgesamt im Vergleich zur konventionellen reversen Sanger Sequenzierung geringer.

Fragment-Nr.	M _{berechnet} [m/z]	M _{gemessen} (ΔM) [m/z]	Fragment-Nr.	M _{berechnet} [m/z]	M _{gemessen} (ΔM) [m/z]
<i>nicht-biotinylierter Strang</i>			<i>biotinylierter Strang</i>		
1 (25-mer)	7 667	7 671 (+4)	1 (20-mer)	6 539	6 548 (+9)
2 (28-mer)	8 629	8 635 (+6)	2 (22-mer)	7 172	7 185 (+13)
3 (30-mer)	9 263	9 272 (+9)	3 (25-mer)	8 095	8 106 (+11)
4 (31-mer)	9 583	9 592 (+9)	4 (27-mer)	8 704	8 720 (+16)
5 (32-mer)	9 903	9 919 (+16)	5 (28-mer)	9 024	9 042 (+18)
6 (33-mer)	10 223	10 235 (+12)	6 (29-mer)	9 344	9 363 (+19)
7 (35-mer)	10 833	10 850 (+17)	7 (32-mer)	10 323	10 349 (+26)
8 (36-mer)	11 153	11 170 (+19)	8 (34-mer)	10 972	11 000 (+28)
9 (37-mer)	11 473	11 494 (+21)	9 (35-mer)	11 293	11 326 (+33)
10 (40-mer)	12 420	12 439 (+19)	10 (36-mer)	11 613	11 643 (+30)
11 (43-mer)	13 398	13 423 (+25)	11 (39-mer)	12 511	12 552 (+41)
[M+H] ⁺	14 948	14 978 (+30)	12 (41-mer)	13 145	13 182 (+27)
			13 (44-mer)	14 107	14 154 (+47)
			14 (48-mer)	15 383	15 412 (+29)
			[M+H] ⁺		

Tabelle 6-B: Vergleich der mittels MALDI-TOF MS detektierten Fragmentmassen mit den berechneten. Für die nicht-biotinylierten Fragmente wurden die Massen aus Spektrum I, Abb. 6-6 zugrunde gelegt. Die biotinylierten Fragmentmassen stammen aus Spektrum II, Abb. 6-7. Die berechneten Werte berücksichtigen die um 16 Da schwerere Masse der Thymidinanaloga (2-S-dTTP, α-S-dTTP) in der Sequenz.

6.2 Sequenzierung mit Exonuclease III in Lösung

Der enzymatische Abbau massenmodifizierter PCR-Produkte mit Exonuclease III zur Erzeugung einer Sequenzleiter muss in dem für das Enzym geeigneten *Taq*-Reaktionspuffer durchgeführt werden. Da die Amplifizierungsreaktion jedoch mit *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase im entsprechenden *Pfu*-Reaktionspuffer durchgeführt wird, mussten die PCR-Produkte aufkonzentriert und anschließend in *Taq*-Reaktionspuffer aufgenommen werden. Hierzu standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Die Template-DNA konnte entweder durch Zugabe von Ethanol gefällt (vgl. Kap. 10.2.2.3), oder über Mikrofiltrationsmembranen (vgl. Kap. 10.2.2.4) aufgereinigt werden.

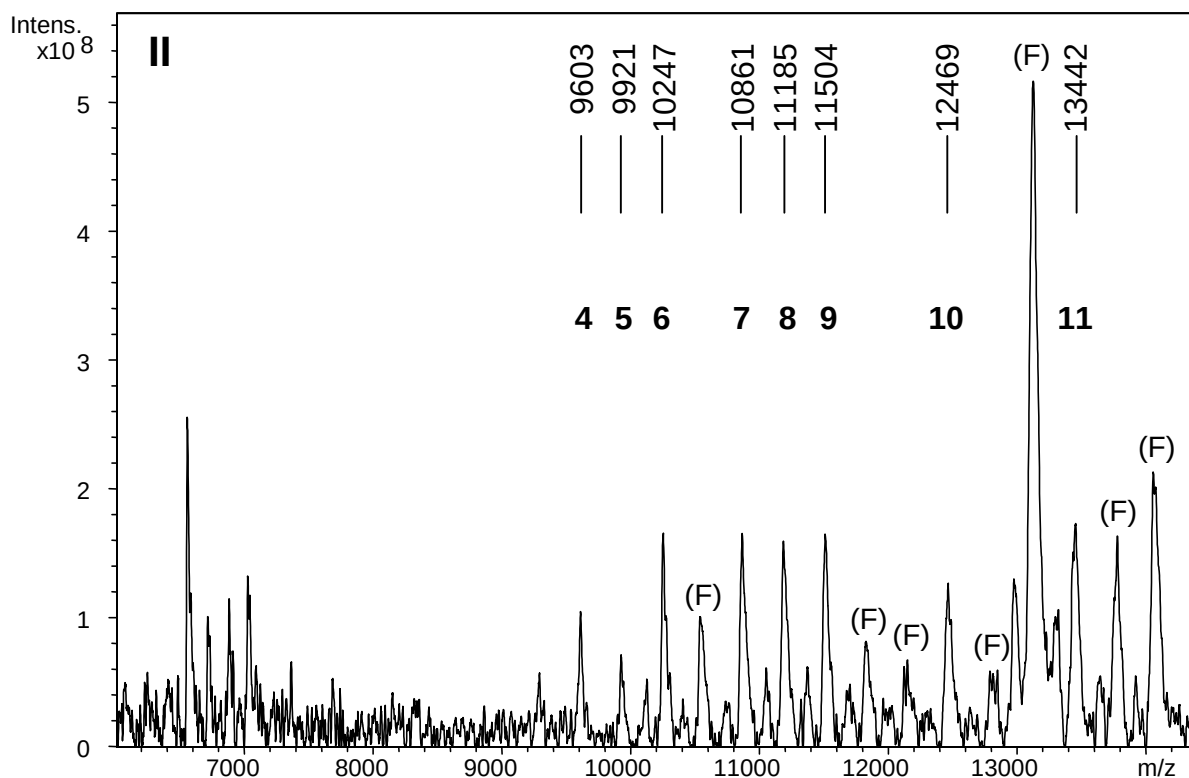
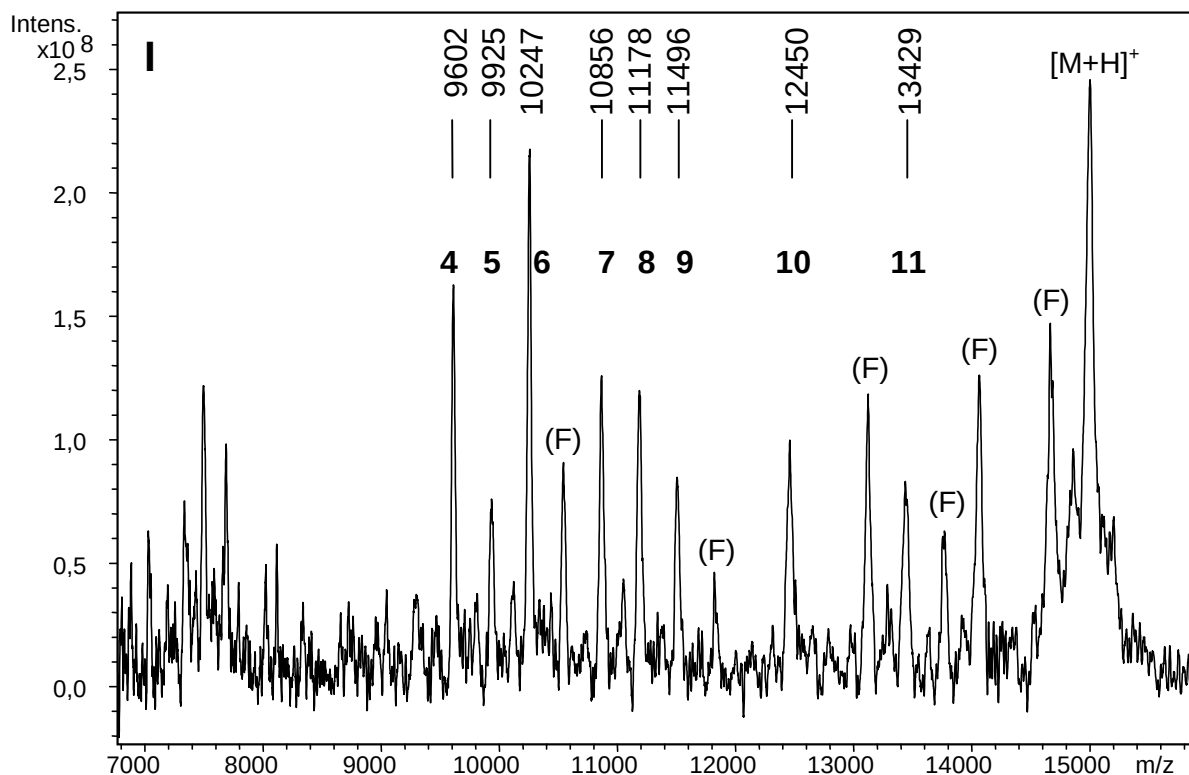
Mikrofiltrationsmembranen halten nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie größere Moleküle ab einem definierten Molekulargewicht auf der Membran zurück. PCR-Produkte können so von niedermolekularen Verunreinigungen wie überschüssigem Primer, Nucleotiden und im Reaktionspuffer enthaltenen Detergenzien befreit werden. In dieser Arbeit wurden Membranen mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10 000 g/mol verwendet. Die Aufreinigung eines enzymatischen Reaktionsansatzes mittels Ultrafiltration ist schnell und einfach in der Handhabung; nachteilig wirkt sich allerdings der im Vergleich zur Ethanolpräzipitation höhere Substanzverlust aus, der beim Abzentrifugieren der DNA von der Membran entsteht. Zudem wird bei einem Ausschlussgewicht von 10 000 g/mol auch die DNA-Polymerase auf der Membran zurückgehalten, die sich in der anschließenden Sequenzierungsreaktion mit Exonuclease III störend auswirken kann.

Der enzymatische Abbau mit Exonuclease III wurde bei Reaktionszeiten von 10 bis 50 Minuten durchgeführt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 5 Mikrolitern einer 0.5 molaren EDTA-Lösung. Um ganz sicher zu gehen, dass keine enzymatische Aktivität mehr vorhanden war, wurden die Proben zusätzlich für 10 Minuten bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Im Anschluss wurden die Fragmente an die Streptavidin-Beads immobilisiert und zur MALDI-TOF Probenvorbereitung, wie zuvor beschrieben, mit verdünnter Ammoniaklösung behandelt.

Aus Abbildung 6-8 auf Seite 105 wird deutlich, dass eine Reaktionsführung in Lösung in keiner Weise mit der Festphasensequenzierung konkurrieren konnte. Zwar wurden bei der

MALDI-TOF Analyse der Spaltprodukte Signale in einem begrenzten Massenbereich detektiert, die sich den gewünschten Fragmenten zuordnen ließen, eine vollständige Sequenz konnte jedoch nicht erzeugt werden. Neben den erwarteten Fragmentensignalen wurden zudem zahlreiche Signale mit hoher Intensität detektiert, die aus Falschabbrüchen während der Enzym-reaktion resultierten. Aus den Massendifferenzen ΔM der detektierten Signale konnten die jeweiligen Basen der Sequenz zugeordnet werden. Offenbar wurde der Spaltmechanismus der Exonuclease III bei einer Reaktionsführung in Lösung erheblich gestört, so dass das Enzym an beinahe jeder beliebigen Stelle in der Sequenz die DNA-Spaltung abbrechen und somit Fragmente jeder möglichen Länge erzeugen konnte. Dabei spielte die Probenvorbereitung vor der Exonuclease III-Reaktion – Aufkonzentrierung der DNA durch Ethanolpräzipitation oder Ultrafiltration – nur eine untergeordnete Rolle. Tendenziell konnten Spektren nach einer Ethanolfällung der DNA mit einer etwas besseren Signalauflösung aufgenommen werden.

Durch beide Methoden zur Aufkonzentrierung der DNA scheinen störende Substanzen in die Reaktionslösung eingebracht zu werden, die sich negativ auf den Enzymmechanismus auswirken. Dagegen steht mit der Sequenzierung am immobilisierten PCR-Produkt eine Methode zur Verfügung, die eine sehr effektive Aufreinigung der DNA sowohl vor der Enzymreaktion, als auch zur MALDI-TOF Probenkonditionierung ermöglicht.



5'-R-48- A A A G A T G A T A T T T T C T T T A A T G G T G C C A G

Abbildung 6-8: MALDI-TOF Massenspektren nach Exonuclease III-Reaktion in Lösung. Gezeigt werden Spektren der T-Reaktion (nicht-biotinylierter Strang) mit 50 % 2-S-dTTP und 50 % T-Terminator im PCR-Reaktionsansatz. Spektrum I zeigt die Spaltprodukte nach Ethanolpräzipitation des 48-mers, Spektrum II wurde nach Aufkonzentrierung des Templates über Ultrafiltrationsmembrane aufgenommen. Die Reaktionszeit betrug in beiden Fällen 30 Minuten.

7 Diskussion

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie ist heute eine anerkannte Methode zur Bestimmung der Molekulargewichte hochmolekularer Biomoleküle wie Nucleinsäuren und Proteine. Insbesondere in der Nucleinsäureanalytik sind inzwischen viele Anwendungsbereiche bekannt. Allerdings stößt die MALDI-Technik bei der Analytik größerer Moleküle immer noch schnell an ihre Grenzen. Kationenheterogenität und die Tendenz zur Fragmentierung dieser Verbindungsklasse nehmen mit steigender Länge der zu analysierenden Oligonucleotide zu und führen zu einer Peakverbreiterung und einem Abfall der Signalintensitäten im Spektrum. Der zugängliche Massenbereich für die routinemäßige Analytik von Oligonucleotiden ist daher bis heute auf etwa 50 nt beschränkt. Insbesondere bei der *de novo*-DNA-Sequenzierung können massenspektrometrische Sequenzieretechniken heute noch nicht mit den konventionellen, auf Gelelektrophorese basierenden Methoden konkurrieren.

Bei vielen diagnostischen Problemstellungen treten jedoch die Vorteile der MALDI-TOF MS, wie Schnelligkeit, Genauigkeit und Flexibilität im Hinblick auf das jeweilige analytische Problem, sowie das hohe Automatisierungspotenzial dieser Methode in den Vordergrund. Enzymatische Verfahren wie der Primer-Oligo-Base-Extension Assay (PROBE™) werden heute in Kombination mit der MALDI-TOF MS zur DNA-Analytik genutzt^[80,145,146]. Auch bei der Untersuchung von Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNP) oder Short-Tandem-Repeats (STR) ist die massenspektrometrische Analyse zur Lokalisierung und Identifizierung spezifischer Gene heute nicht mehr wegzudenken^[147-149]. Hier kann durch eine Kombination mit der DNA-Chip-Technologie ein extrem hoher Probendurchsatz erzielt werden^[82,150].

Auch in der diagnostischen *de novo*-Sequenzierung bietet sich die Massenspektrometrie als schnelle Alternative zur zeit- und durchsatzlimitierenden gelelektrophoretischen Auftrennung der komplexen Reaktionsgemische an. In diesem Bereich ist die Bestimmung kurzer Sequenzen von maximal 50 nt ausreichend; statistische Überlegungen zeigen, dass bereits eine Sequenz von nur 17 Basen im menschlichen Genom einzigartig ist. Obwohl bereits demonstriert wurde, dass das klassische Sanger-Verfahren an eine MALDI-MS Analyse der Fragmentgemische angepasst werden kann, ist selbst die Bestimmung kurzer Sequenzen wegen der niedrigen Empfindlichkeit gegenüber der geringen Zahl an langen Spaltfragmenten

problematisch. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein neues Konzept zur DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS, basierend auf der reversen Sanger-Methode, entwickelt werden, das die Generierung langer Fragmente bevorzugt und somit zu einer erhöhten Auflösung und Detektionseffizienz führt.

Anhand eines PCR-Modellsystems konnte im Verlauf dieser Arbeit demonstriert werden, dass durch die günstige Fragmentverteilung bei der reversen Sanger Sequenzierung auch die Signale der längeren Reaktionsprodukte mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden können. Alle erwarteten Molekülsignale der vier basenspezifisch terminierten Fragmentpopulationen konnten massenspektrometrisch mit hoher Detektionseffizienz bestimmt und zur Bestimmung der Sequenz des untersuchten doppelsträngigen 48-mers herangezogen werden. Durch die bevorzugte Erzeugung langer Spaltprodukte kann der sinkenden Nachweisgrenze bei zunehmender Masse der Analytmoleküle in der MALDI-TOF Analyse entgegengewirkt werden. Im Gegensatz dazu wurde bei vergleichenden Untersuchungen von Fragmentgemischen aus einer konventionellen Sanger Sequenzierung eine starke Reduktion der Signalintensitäten mit zunehmender Fragmentmasse beobachtet, so dass der Lesebereich bei dieser Methode stark limitiert ist, da viele Signale nicht mehr aufgelöst werden können.

Bei der Untersuchung der A-, G- und C-Reaktion wurde auch bei der reversen Sanger Sequenzierung in höheren Massenbereichen ein Abfall der Signalintensitäten im Spektrum beobachtet, der sich auf die Fragmentierung durch Basenverlust zurückführen lässt. Allerdings war der Effekt verglichen mit Spektren aus Sanger Sequenzierungen weniger ausgeprägt und führte nicht zu einem Informationsverlust. Die Depurinierung bei Adenosin und Guanin wird unter MALDI-TOF Bedingungen vermutlich durch die Protonierung der Base eingeleitet und führt dann zu einem Bruch der säurelabilen N-glykosidischen Bindung^[151,152]. Untersuchungen an Cytosin zeigen, dass auch diese Base unter MALDI-TOF Bedingungen instabil ist, während es sich bei der säurekatalysierten Hydrolyse – im Gegensatz zu A und G – als säurestabil erwies. Das Modell der säurekatalysierten Hydrolyse kann daher nicht ohne Einschränkung auf die in der Gasphase stattfindenden Prozesse unter massenspektrometrischen Bedingungen übertragen werden.

Es gibt bereits Ansätze, die Fragmentierung der DNA unter MALDI MS Bedingungen zu unterbinden. Neben der Optimierung der Geräte oder der Suche nach neuen, schonenden Matrices, spielen insbesondere chemische Modifikationen der Nucleoside selbst eine Rolle. So zeigen sich beispielsweise N⁷-Deazapurinderivate oder 2'-Fluoronucleosidanaloga unter MALDI Bedingungen stabiler^[92,153]. Daneben wurde kürzlich auch bei einem N⁹-Deazanucleosid eine höhere Stabilität festgestellt^[70]. Ein Einsatz dieser Modifikationen in der reversen Sanger Sequenzierung ist jedoch wegen der speziellen Anforderungen dieser Methode schwierig. Auch RNA zeigt gegenüber DNA eine deutlich geringere Tendenz zur Fragmentierung, wodurch der zugängliche Massenbereich erhöht werden kann. Die Spektren zeigen besser aufgelöste Signale, verglichen mit Signalen von Oligodesoxynucleotiden gleicher Länge. Es gibt daher bereits Bestrebungen, das Konzept der reversen Sanger Sequenzierung auf RNA-Ebene zu übertragen, um die höhere Stabilität der RNA unter UV-MALDI Bedingungen auszunutzen^[97].

Ein wesentlicher Vorteil des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Konzepts zur Sequenzierung doppelsträngiger PCR-Produkte liegt in der Möglichkeit, eine vollständige Sequenzbestimmung innerhalb von nur zwei basenspezifischen Reaktionen zu erzielen. Anders als bei der klassischen Sanger-Methode können Sequenzinformationen über beide DNA-Stränge des PCR-Produktes gewonnen werden. Durch die Kenntnis der Sequenz eines Stranges kann man auf die Komplementärsequenz des Gegenstranges schließen und umgekehrt. Eine Bestimmung der Gesamtsequenz ist daher innerhalb von zwei Reaktionen durch die Generierung der Sequenzleitern zweier nicht-komplementärer Basen (z.B. C und T) möglich. Voraussetzung hierfür ist ein flexibles System zur Aufarbeitung der doppelsträngigen Reaktionsprodukte nach Sequenzierung mit Exonuclease III. Das in dieser Arbeit verwendete Streptavidin-Biotin-System zur Aufreinigung biotinylierter Reaktionsprodukte zeigte alle Vorteile festphasengebundener Reaktionen wie gute Reproduzierbarkeit, hohe Spezifität und großes Automatisierungspotenzial. Entscheidend für die Wahl dieses Systems war jedoch die Variabilität der Reaktionsbedingungen zur Freisetzung der festphasengebundenen Moleküle: Unter milden Bedingungen konnte die immobilisierte DNA denaturiert werden, ohne hierbei den Streptavidin-Biotin-Komplex zu destabilisieren. Etwas stringenter Bedingungen führten dagegen zur Dissoziation der Streptavidin-Biotin-Bindung und setzten die biotinylierten Oligonucleotide frei. Auf diese Weise konnten die Fragmentpopulationen beider DNA-Stränge getrennt voneinander analysiert werden.

Auch für die Qualität der erhaltenen Massenspektren spielt die Probenkonditionierung eine erhebliche Rolle. Durch die Verwendung von verdünntem Ammoniak bei der Aufreinigung der immobilisierten Reaktionsprodukte wurden ausschließlich die für die massenspektrometrische Analyse erwünschten Ammoniumionen in die Probe eingebracht. Ein zusätzliches Entsalzen der Probe war nicht mehr notwendig. Das Festphasen-System zeigte jedoch auch Schwächen. So erwies sich das Streptavidin selbst unter milden Bedingungen zur Freisetzung der immobilisierten DNA als nicht vollständig stabil. Immer wieder wurden bei ca. 12 900 Dalton Signale des Proteins beobachtet, die bei Sequenzierungsreaktionen Signale der Spaltfragmente überlagerten und somit eine genaue Sequenzbestimmung in diesem Massenbereich verhinderten. Zudem muss wohl davon ausgegangen werden, dass es auf diesem Wege auch zu Ausbeuteverlusten kommt. Hier werden Fortschritte durch den Übergang zur Chip-Technologie erwartet: Derivatisiertes Silizium als Trägermaterial weist eine sehr gleichmäßige Oberfläche auf und bietet nicht zuletzt im Proben-Handling ganz erhebliche Vorteile.

Eine große Bedeutung hat auch die Art und Weise der Probenauftragung auf das Target des Massenspektrometers. Hydrophobe Oberflächen scheinen das Kristallisationsverhalten des Analyt-Matrix-Gemisches positiv zu beeinflussen. So wurde ein positiver Effekt bei der Verwendung von Tesafilm, Parafilm oder Teflon zur Beschichtung des Probentellers beschrieben^[154,155]. Im Verlauf der Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Probenteller mit glattpolierter Edelstahloberfläche zu einem besseren Kristallisationsverhalten der Proben führen als die Targets der neueren Generation mit aufgerauter Oberfläche. Die manuelle Probenauftragung wird jedoch sicherlich in nächster Zeit vollständig durch die automatisierte Mikropräparation mit Silizium-Chips als Träger verdrängt werden. Durch die Auftragung der Proben mit Hilfe von piezoelektrischen Pipetten^[82] im Nanolitermaßstab kann die Heterogenität der Analytkristalle vermindert und die Suche nach „sweet spots“ vereinfacht werden. Im Zuge der Miniaturisierung kann durch den Einsatz der Nanotechnologie eine weitere Verringerung des Probenvolumens bis in den Pikoliterbereich erwirkt werden^[156]. Die Probenspots sind dann so klein, dass sie durch einen einzigen Laserschuss vollständig verdampft werden.

Auch die Wahl des Lösungsmittels sowie die Kontrolle des Wassergehalts der Lösungsmittel wird in der Literatur diskutiert^[157,158]. Nicht zuletzt hat die zur Kokristallisation mit der Analytlösung verwendete Matrix einen entscheidenden Einfluss auf die Spektrenqualität. Bislang gilt die 3-Hydroxypicolinsäure bei der Analyse von DNA als die Matrix der Wahl. Jedoch wurden alle bisher als Matrix vorgeschlagenen Substanzen rein empirisch gefunden. Eine systematische Untersuchung des Kristallisationsvorganges könnte daher sicherlich die Suche nach noch besser geeigneten Matrices erleichtern.

Inwieweit sich durch das Konzept der reversen Sanger Sequenzierung eine Erweiterung des Lesebereichs über die untersuchten 50 nt erzielen lässt, bleibt offen. Erste Untersuchungen an einem längeren einzelsträngigen Template wurden durchgeführt. Hier wäre jedoch erhebliche Optimierungsarbeit schon bei der Generierung des modifizierten Templates mittels einer Primerverlängerungs-Reaktion zu leisten gewesen, so dass dieses Konzept zugunsten der überlegenen Doppelstrangsequenzierung nicht weiter verfolgt wurde. Zukünftige Untersuchungen sollten jedoch zur Klärung dieser Frage durch die Verwendung längerer Templates in der Sequenzierreaktion erfolgen.

Bedingt durch die bei der reversen Sanger-Methode auftretende Massenheterogenität bei Fragmenten gleicher Länge, verursacht durch den statistischen Einbau der um 16 Dalton schwereren Terminatoren, kommt es bei der Detektion der Spaltprodukte mit zunehmender Molekülmasse zu einer Signalverbreiterung und einer Verschiebung der detektierten Massen zu höheren Werten. Die Abweichungen von den berechneten Werten können bis zu 80 Dalton betragen. Durch die Verwendung weiterer, massenmodifizierter Nucleosidanaloga in der reversen Sanger Sequenzierung sollte dieser Effekt vermindert werden. Neben dem basenspezifischen Terminator sollte ein massengleiches Nucleosidanalogon den Anteil des natürlichen Nucleosids im Reaktionsansatz ersetzen und so für den Ausgleich der Massenheterogenität sorgen. Verschiedene Modifikationen der beiden nicht-komplementären Basen C und T wurden daher im Verlauf dieser Arbeit untersucht. Um für einen Einsatz in der reversen Sanger Sequenzierung in Frage zu kommen, müssen sich diese Modifikationen wie ihre natürlichen Analoga verhalten. Sie dürfen während der Sequenzierung mit Exonuclease III – anders als die basenspezifischen Terminatoren – nicht zu einem Abbruch der enzymatischen Spaltung führen und müssen auch von den Polymerasen bei der

Generierung des als Template in der Sequenzierung verwendeten PCR-Produktes als Substrat akzeptiert werden.

Verschiedene Polymerasen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, massenmodifizierte Nucleosidtriphosphate in einen wachsenden DNA-Strang einzubauen. Hierfür stand als einfaches Testsystem zunächst ein Primer Extension Assay zur Verfügung. Es zeigte sich, dass Nucleotide mit einer Modifikation an der Base deutlich besser von den Polymerasen akzeptiert werden, als das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte zuckermodifizierte Thymidinanalogon 5'-S-dTTP, das von keinem der fünf untersuchten Enzyme in den DNA-Strang inkorporiert wurde. Der Austausch des Sauerstoffs an Position C-5' der Ribose durch das wesentlich größere und elektropositivere Schwefelatom bewirkt eine Veränderung des Bindungswinkels der von dieser Position ausgehenden Bindungen, so dass die für die Substraterkennung entscheidende Struktur-Komplementarität nicht mehr gewährleistet ist. Auch die veränderten chemischen Eigenschaften wirken sich vermutlich negativ auf den Enzymmechanismus aus. Es bleibt zu untersuchen, ob unter der Vielzahl heute erhältlicher DNA-Polymerasen mit veränderten Substrateigenschaften ein geeignetes Enzym für den Einsatz dieser Modifikation ermittelt werden kann. Kombinatorische Ansätze zur gerichteten Evolution^[159] könnten helfen, vorhandene Enzyme in ihrer Substratspezifität für die Verwendung modifizierter Nucleosidtriphosphate zu optimieren. In zukünftigen Experimenten könnten außerdem weitere zuckermodifizierte Nucleosidanaloge, wie etwa die 4'-Thio-2'-desoxynucleotide^[122,123], auf ihre Eignung für einen Einsatz in der Sequenzierung mit Exonuclease III untersucht werden.

Eine Modifizierung der Nucleotide an der Base ist für die Substraterkennung durch Polymerasen weniger problematisch. Insbesondere wenn die eingeführten Atome oder Molekülgruppen nicht an der Ausbildung der Wasserstoffbrücken zum Matrizenstrang beteiligt sind, wie bei 5-OH-dCTP und 2-S-dTTP, werden die Nucleosidanaloge von den Enzymen mit hoher Effektivität in den DNA-Strang eingebaut. Sowohl Struktur- als auch Wasserstoffbrückenbindungs-Komplementarität sind hier gewährleistet. Doch auch 2-S-dCTP wurde von den meisten der untersuchten Polymerasen zumindest mit verminderter Effektivität als Substrat akzeptiert, obwohl der Schwefel an Position 2 direkt in den Prozess der Wasserstoffbrückenausbildung eingreift.

Mit Hilfe des Primer Extension Assays wurden zwei Enzyme – die *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase sowie die in Sanger Sequenzierungen häufig verwendete *ThermoSequenase* – als besonders geeignet ermittelt, da sie mit allen basenmodifizierten Analoga den jeweiligen Primer quantitativ umsetzen konnten. Damit standen für die anspruchsvollere Polymerasekettenreaktion zwei Enzyme zur Verfügung, von denen die wesentlich kostengünstigere *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase für weitere Versuche ausgewählt wurde.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die basenmodifizierten Nucleosidanaloga in unterschiedlichen Konzentrationen in der Polymerasekettenreaktion mit *Pfu*(exo-) Polymerase eingesetzt werden können. Auch ein vollständiger Ersatz des natürlichen Nucleosidtriphosphates durch seine beiden „schweren“ Analoga – den Terminator und ein entsprechendes basenmodifiziertes Triphosphat – in unterschiedlichen Konzentrations-verhältnissen lieferte in den meisten Fällen PCR-Produkte in hoher Ausbeute, die sich als Template in der Sequenzierung mit Exonuclease III verwenden ließen. Wegen der verminderten Effektivität, mit der die Inkorporierung von 2-S-dCTP durch die Polymerase erfolgt, kann diese Modifikation nur in geringerer Konzentration in der PCR verwendet werden. Eine hohe Konzentration führt, insbesondere bei gleichzeitigem Einbau des Terminators, zu einer Inhibierung des Enzyms; es entstehen unerwünschte Nebenprodukte. Bei vollständigem Ersatz des natürlichen dCTP's durch 2-S-dCTP konnte kein PCR-Produkt mehr generiert werden. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass der Einsatz dieser Modifikation trotz verminderter Inkorporationsrate in der reversen Sanger Sequenzierung möglich ist, wenn ein hoher Anteil des Terminators neben einer geringen Konzentration an 2-S-dCTP im Reaktionsansatz gewählt wird.

Für die reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich eignen sich PCR-Produkte, in denen ein natürliches Nucleosid vollständig durch einen Terminator und sein entsprechendes basenmodifiziertes Analogon ersetzt ist. Die Sequenzen aus der enzymatischen Spaltung dieser in zweifacher Weise modifizierten PCR-Produkte konnten zur vollständigen Sequenzbestimmung des 48-mers herangezogen werden. Dabei zeigte sich, dass die enzymatische Spaltung des immobilisierten Templates am nicht-biotinylierten Strang etwas verlangsamt abläuft, so dass stets nicht umgesetztes *full length*-PCR-Produkt im MALDI-TOF Spektrum detektiert wurde. Dieser Effekt wurde in abgeschwächter Form bereits bei Spektren aus der reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich beobachtet. In einer Zeitkinetik

erwiesen sich längere Reaktionszeiten von bis zu 70 Minuten für die Exonuclease III-Reaktion als günstig.

Inwieweit die Verlangsamung der enzymatischen Spaltung des nicht-biotinylierten Stranges durch eine sterische Behinderung des Enzyms durch die Festphase bedingt wird, sollte durch eine Reaktionsführung in homogener Phase geklärt werden. Vor der Exonuclease III-Reaktion ist eine Aufreinigung des doppelsträngigen Templates erforderlich, die mittels Ethanolpräzipitation oder Mikrofiltration angestrebt wurde. Diese Methoden führen jedoch zu erheblichen Substanzverlusten im Vorfeld der eigentlichen Sequenzierung. Zudem scheinen unerwünschte Substanzen in der Lösung zu verbleiben, bzw. werden erneut in die Reaktionslösung eingebracht und wirken sich negativ auf die Enzymreaktion aus. Es konnten daher nur unvollständige Sequenzen über einen begrenzten Massenbereich gewonnen werden. Auch die vielen detektierten Falschabbrüche sprechen für eine Störung des Enzymmechanismus. Ein Vergleich der hier verwendeten herkömmlichen Methoden mit dem Streptavidin-Biotin-System demonstrierte erneut die Vorteile einer festphasengestützten Aufreinigung, erwies sich jedoch zur Klärung des verzögerten Reaktionsverlaufs am nicht-biotinylierten Strang als unzureichend. Die Einführung längerer Linkermoleküle (Spacer) zwischen Biotin und DNA könnte hier zur Aufklärung des Reaktionsverlaufs beitragen.

Insgesamt konnte im Verlauf dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass die Verwendung zusätzlicher massenmodifizierter Nucleosidanaloga in der reversen Sanger Sequenzierung geeignet ist, den Effekt der Massenheterogenität auszugleichen. Die Detektionseffizienz war gegenüber der konventionellen reversen Sanger Sequenzierung etwas verringert, die Signaltbreite konnte durch diese Methode jedoch erwartungsgemäß reduziert werden. Abweichungen der detektierten Molekülmassen gegenüber den berechneten sind bei diesem Verfahren wohl hauptsächlich durch eine geringe Nachweiseffizienz aufgrund einer geringeren Ausbeute an Reaktionsprodukten zurückführen. Die Spektren der T-Reaktion zeigen jedoch im Vergleich mit der reversen Sanger Sequenzierung ohne Massenausgleich eine bessere Übereinstimmung der detektierten und berechneten Molekülmassen. Mit den basenmodifizierten Nucleosidanaloga 2-S-dTTP und 5-OH-dCTP, und in eingeschränkter Form auch 2-S-dCTP, steht ein nicht-komplementäres System zur vollständigen Sequenzierung doppelsträngiger PCR-Produkte zur Verfügung.

8 Zusammenfassung

Die reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS konnte an einem 48 bp langen PCR-Produkt demonstriert werden. Durch enzymatischen Abbau des phosphothioat-markierten Amplifikats mit Exonuclease III konnten basenspezifisch terminierte Sequenzleitern für die A-, C-, G- und T-Reaktion erzeugt und massenspektrometrisch detektiert werden. Im Vergleich zur konventionellen Sanger Methode ist bei der reversen Sanger Sequenzierung die Generierung langer Spaltfragmente bevorzugt. Es konnte gezeigt werden, dass die günstige Fragmentverteilung bei einer massenspektrometrischen Analyse der Analytmoleküle zu einer erhöhten Auflösung sowie einer Verbesserung der Signalintensitäten im MALDI-TOF Spektrum führt. Sequenzierreaktion und anschließende Aufreinigung der Reaktionsprodukte wurden an einem Streptavidin-Biotin-Festphasensystem durchgeführt. Die Präparation der Analytmoleküle für eine anschließende massenspektrometrische Analyse konnte hier weiter optimiert werden.

In einem zweiten Ansatz sollte zur Erweiterung des zugänglichen Massenbereiches in einer Primer Extension Reaktion ein phosphothioat-markiertes, einzelsträngiges 62-mer generiert und einem Exonuclease III-Abbau unterzogen werden. Die Primerverlängerung am immobilisierten Template verlief nur in geringer Ausbeute, so dass eine eindeutige Charakterisierung des Elongationsproduktes sowie der Sequenzierprodukte ohne umfangreiche Optimierung der Reaktionsbedingungen nicht möglich war.

Um dem Effekt der Signalverbreiterung durch Massenheterogenität – bedingt durch die variable Zahl inkorporierter Terminatoren bei Analytmolekülen gleicher Länge – bei der MALDI-TOF Analyse entgegenzuwirken, sollte je ein natürliches dNTP im Reaktionsansatz vollständig durch seinen α -S-Terminator sowie ein weiteres Analogon ersetzt werden, dessen Molekulargewicht dem seines α -S-Terminators entspricht, das jedoch gleichzeitig einer exonucleolytischen Spaltung zugänglich ist und somit nicht zum Kettenabbruch führt. Drei bereits im Handel erhältliche, basenmodifizierte Desoxynucleosidtriphosphate – 5-OH-dCTP, 2-S-dCTP und 2-S-dTTP – sowie ein im Rahmen dieser Arbeit synthetisiertes, zuckermodifiziertes Thymidinanalogon (5'-S-dTTP, **4**), hergestellt aus 5'-Acetylthiothymidin **2** nach einer Methode von Shirokova^[117], wurden in Hinblick auf ihre Substrateigenschaften untersucht.

Fünf DNA-Polymerasen – *Pfu*(exo-), *Taq*, *HotStar Taq* und *AmpliTaq Gold*, sowie die *ThermoSequenase* – wurden auf ihre Inkorporationsfähigkeit in Bezug auf massenmodifizierte Desoxynucleosidtriphosphate untersucht. Als einfaches biochemisches Testsystem stand hierfür ein Primer Extension Assay zur Verfügung. Es zeigte sich, dass die basenmodifizierten Nucleosidtriphosphate 2-S-dTTP und 5-OH-dCTP von allen untersuchten Enzymen als Substrat akzeptiert wurden. 2-S-dCTP wurde dagegen von den DNA-Polymerasen *Taq* und *HotStar Taq* nur mit verminderter Effektivität, von der *AmpliTaq Gold* überhaupt nicht in den DNA-Strang inkorporiert. Das zuckermodifizierte Thymidinanalogon 5'-S-dTTP wurde von keiner der untersuchten DNA-Polymerasen als Substrat akzeptiert.

In weiteren Versuchen wurden die drei basenmodifizierten Nucleosidtriphosphate 2-S-dCTP, 5-OH-dCTP und 2-S-dTTP in der anspruchsvolleren Polymerasekettenreaktion eingesetzt. PCR-Produkte wurden amplifiziert, die je ein massenmodifiziertes Nucleosidtriphosphat und sein natürliches Analogon in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Dabei konnte die *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase als am besten geeignetes Enzym für die Generierung massenmodifizierter PCR-Produkte ermittelt werden.

Für die reverse Sanger Sequenzierung mit Massenausgleich wurden PCR-Produkte amplifiziert, in denen das natürliche dNTP vollständig durch seine beiden schweren Analoga – den α -S-Terminator und sein basenmodifiziertes Analogon – ersetzt wurde. Durch enzymatischen Abbau mit Exonuclease III konnten Fragmentpopulationen erzeugt werden, an denen die Sequenz des PCR-Produktes abgelesen werden konnte. Die durch die Massenheterogenität bedingte Signalverbreiterung konnte durch diese Methode unterdrückt werden. Wurde der enzymatische Abbau dagegen in Lösung durchgeführt, konnten trotz Aufreinigung der Reaktionsprodukte am Streptavidin-Biotin-Festphasensystem keine korrekt terminierten Fragmentgemische erzeugt werden. Die Vorteile der Festphasensequenzierung und MALDI-TOF Probenkonditionierung konnten so demonstriert werden.

Insgesamt konnte ein neues Konzept zur DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS, basierend auf der reversen Sanger Methode, erfolgreich eingeführt werden. Dabei wurden durch eine Reaktionsführung am immobilisierten Template und anschließende Aufreinigung der Sequenzierprodukte an der festen Phase optimale Reaktionsbedingungen für eine massen-

spektrometrische Analyse geschaffen. Durch die Einführung zusätzlicher, massenmodifizierter Nucleosidtriphosphate konnte die Signalauflösung noch weiter verbessert werden.

9 Summary

Reverse Sanger sequencing via MALDI-TOF MS was accomplished using a thiophosphate-containing 48 bp-PCR product as template in the exonuclease digestion. Basespecific terminated sequence ladders were generated through enzymatic digestion of the thiophosphate-containing amplificate using Exonuclease III. Mass spectrometric data were obtained for the A-, G-, C- and T-reaction, respectively. Compared to the classical Sanger approach, reverse Sanger sequencing favors the production of longer cleavage products, thus, increasing resolution and signal intensity. Sequencing reaction and purification of the analyte were carried out taking advantage of a streptavidin-biotin solid-phase bead system. MALDI MS sample preparation could be further optimized during this procedure.

In an attempt to increase the accessible mass range, a single stranded thiophosphate-containing 62-mer was tried to generate during a primer extension reaction, followed by enzymatic cleavage with Exonuclease III. The elongation product was obtained in low yield, when the extension reaction was carried out with immobilized templates, thus, making the characterization of elongation and cleavage products impossible without thorough optimization of the reaction conditions.

The obstacle of mass heterogeneity – caused by variable numbers of incorporated thiophosphate-containing nucleotides within oligonucleotides of a defined length – can be solved by the exchange of the natural nucleotide for a modification which is isobaric to the α -S-terminator and is available for exonuclease cleavage. Substrate properties of three commercially available basemodified deoxynucleoside triphosphates (5-OH-dCTP, 2-S-dCTP and 2-S-dTTP, respectively) as well as the ribomodified nucleotide 5'-thio-5'-deoxythymidine 5'-triphosphate **4** (5'-S-dTTP), prepared by a published procedure^[117] from 5'-acetylthio-thymidine **2** were investigated.

The properties of five DNA polymerases – *Pfu*(exo-), *Taq*, *HotStar Taq* and *AmpliTaq Gold*, as well as *ThermoSequenase* – were investigated with regard to their ability to incorporate modified triphosphates, taking advantage of a primer extension array. It was shown that the basemodified triphosphates 2-S-dTTP and 5-OH-dTTP were substrate to all examined

polymerases. While 2-S-dCTP was incorporated in the growing DNA chain with weaker effectivity when the process was catalized by *Taq* and *HotStar Taq* DNA polymerase, respectively, *AmpliTaq Gold* DNA polymerase did not interact with this modification. 5'-S-dTTP was found to be no substrate at all to any of the investigated enzymes.

The basemodified nucleoside triphosphates 2-S-dCTP, 5-OH-dCTP and 2-S-dTTP were used in the more demanding polymerase chain reaction. *Pfu(exo-)* DNA polymerase was successfully employed, generating PCR products containing the modified nucleotide and its natural analogon in variable concentrations.

Furthermore, PCR products were amplified, in which the natural nucleotide was fully substituted by its heavier analogues (the α -S terminator and a basemodified nucleotide, respectively) and were used as templates in reverse Sanger sequencing reactions. Enzymatic cleavage with Exonuclease III lead to the production of specifically terminated sequence ladders. Compared to the classical reverse Sanger approach, peakbroadening due to mass heterogeneity could be suppressed. When the enzymatic reaction was carried out in solution, no specifically terminated sequence ladders could be obtained, although purification and sample preparation procedures were performed by making use of the streptavidin-biotin beads-system, thus demonstrating the advantages of solid phase sequencing and purification techniques.

It was shown in this thesis that the reverse Sanger sequencing approach is applicable to DNA sequence analysis via MALDI-TOF MS. Enzymatic cleavage on immobilized templates and subsequent purification on the solid support provided optimized conditions prior to mass spectrometric analysis. Additional introduction of massmodified nucleoside triphosphates lead to increased resolution in the MALDI-TOF spectra.

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeine Hinweise

Chemische Umsetzungen erfolgten grundsätzlich unter Feuchtigkeitsausschluss und wurden, sofern nötig, in geschlossenen Apparaturen mit Hg-Überdruckventilen unter Argon durchgeführt.

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das Einengen der Reaktionsprodukte erfolgte bei Temperaturen $\leq 40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10.1.1 Geräte und Methoden

Geldokumentation

Zur Aufnahme von Gelen oder zur Schnelldokumentation von Dünnschichtchromatogrammen standen die DocuGel 1000 Station der MWG Biotech AG, Ebersberg sowie der Alpha Imager 1220 (mit Multimage Light Cabinet) der Firma Biozym zur Verfügung.

Gelelektrophoresen

Elektrophoresen von Polyacrylamid- und Agarosegelen wurden mit Gelkammern der Firma Keutz (Gießen) durchgeführt.

MALDI-TOF Massenspektren

wurden mit einem Vision 2000 Reflektor TOF Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT GmbH, sowie an einem Biflex III und einem Reflex III der Firma Bruker Daltonik GmbH aufgenommen. Die Geräte verwenden einen Stickstofflaser. Die Spektren wurden i.d.R. im „positive ions reflector mode“ bei einer Laserwellenlänge von 337 nm mit ca. 20 kV Beschleunigungsspannung und mit einer um 500 ns verzögerten Ionenextraktion aufgenommen. Der Laserstrahl besitzt eine Energie von 1×10^6 bis $3 \times 10^6\text{ W/cm}^2$.

Die Massenkalisierung erfolgte bei allen Vision-Spektren extern auf einen 50-mer Oligodesoxynucleotidstandard. Für die Messungen an den Biflex und Reflex Geräten wurde ein externer Calibrant (5 Oligonucleotide im Massenbereich zwischen 5 000 und 10 000 Da)

der Firma Sequenom, San Diego verwendet. Zur Erhöhung der Signalintensität zeigt jedes Spektrum eine Aufsummierung von mehreren Einzelschüssen.

Als Matrix diene eine Lösung von 0.7 mol/l 3-Hydroxypikolinsäure und 0.07 mol/l Ammoniumcitrat in Acetonitril/Wasser (1:1, v/v).

Magnetic Particle Collector

Zur Separation der magnetischen Streptavidin-Beads wurden MPC der Firma Dynal, Hamburg verwendet.

Mikrotiterplatten

Der Primer Extension Assay wurde in 96-wells Mikrotiterplatten der Firma ABgene durchgeführt.

Nanoplotter

In der Mikropräparation wurden die DNA-Proben mit einem Nanoliter-Pipetting System SpectroJetTM Nanoplotter der Firma GeSIM mbH (Großerkmannsdorf) auf die Chipoberfläche gebracht.

NMR-Spektroskopie

¹H-NMR-Spektren (500 MHz) und ¹³C-NMR-Spektren (126 MHz) wurden mit einem Spektrometer Typ DRX 500, ¹H-NMR-Spektren (400 MHz) und ¹³C-NMR-Spektren (101 MHz) mit einem Spektrometer Typ AMX 400 aufgenommen. Die Spektren wurden nach der ersten Ordnung ausgewertet, wo erforderlich, mit Hilfe von zusätzlichen ¹H, ¹H bzw. ¹H, ¹³C-COSY-Experimenten. Als interner Standard dient entweder 0.5 % Tetramethylsilan oder das Signal des nichtdeutერიerten Anteils des verwendeten Lösungsmittels.

pH-Meter

pH-Messungen erfolgten mit dem pH 537 der WTW GmbH, Weilheim mit der pH-Elektrode InLab 410 von Mettler-Toledo, Gießen.

Schüttler

Das Schütteln von Reaktionsgefäßen zum Abdampfen von Ammoniak oder während des Bindens von DNA an die Festphasenbeads erfolgte auf einem Schüttler der Firma GLF Modell 3005.

Silizium-Chips

Silizium-Chips „SpectroCHIP-96 Elements“, beladen mit 96 Matrix-Spots für MALDI-TOF Messungen, wurden von der Firma Sequenom, San Diego, zur Verfügung gestellt.

Thermocycler

PCR wurden mit einem Omni-Gene Hybaid-Cycler (Fa. MWG, Ebersberg) und einem Cycler Modell 5330plus (Fa. Eppendorf, Hamburg) in Reaktionsvolumina zwischen 20 und 50 µl durchgeführt. Für die PCR in 96-wells Mikrotiterplatten stand ein Thermocycler der Fa. MJ Research, DNA Engine Tetrad, mit 4 Blöcken zur Verfügung.

Ultrafiltrationsmembranen

Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen wurden Ultrafiltrationsmembrane der Firma Amicon mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 10 000 Da verwendet.

UV- und VIS-Spektrometrie

Vermessungen von Triphosphatlösungen zur Erstellung von Elutionsprofilen erfolgte bei 260 nm mit einem GeneQuant-Photometer (Fa. Pharmacia) in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. UV/VIS-Spektren wurden mit einem Biochrom LBK 4060 UV/VIS-Photometer (Fa. Pharmacia) ebenfalls in Quarzglasküvetten mit 1 cm Schichtdicke aufgenommen.

10.1.2 Chemikalien

Absolutierte Lösungsmittel

Methanol wurde über Mg destilliert und über Molekularsieb 0.3 nm aufbewahrt. THF, Pyridin, Acetonitril und DMF wurden von den Firmen Aldrich und Fluka mit einem

Restwassergehalt von 10 ppm in kleinen, mit Septum verschlossenen Gebinden, über Molsieb gelagert, bezogen.

Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolie (Kieselgel 60, F₂₄₅, Fa. Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte 1.) visuell unter UV-Licht, 2.) nach Abdampfen flüchtiger Komponenten (z.B. Pyridin) mit einem Fön nochmals unter UV-Licht zur Unterscheidung flüchtiger und nichtflüchtiger UV-aktiver Verbindungen, 3.) nach Besprühen mit einem geeigneten Sprühreagenz und anschließender thermischer Behandlung mit einem Heißluftfön:

Sprühreagenz A: 4 ml p-Anisaldehyd, 2 ml konz. H₂SO₄ u. 0.5 ml Eisessig in 80 ml EtOH.

Detektion von nucleosidischen und zuckerhaltigen Komponenten
(Blaufärbung)

Sprühreagenz B: 10 %ige ethanolische H₂SO₄-Lösung.

Detektion zuckerhaltiger Komponenten (Verkohlung).

Säulenchromatographie

Präparative, chromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 (Korngröße 0.040 – 0.036 mm, Merck). Flash-Chromatographie wurde mit 0.05 – 0.5 bar N₂-Überdruck durchgeführt.

Ionenaustauschchromatographie

Die präparative Aufreinigung des modifizierten Triphosphates erfolgte chromatographisch auf DEAE-Sephacel mit Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (TEAB-Puffer) als Elutionsmittel. Die verwendete Anlage bestand aus einem einfachen, aus zwei verbundenen Kammern bestehenden Gradientenmischer, einer Schlauchpumpe, einer Säule sowie einem Fraktionssammler.

Darstellung des Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffers (TEAB-Puffer)

Zur Herstellung des TEAB-Puffers (1 mol/l Stammlösung) wurde eine einmolare, wässrige Triethylaminlösung unter Rühren mit Trockeneis versetzt, bis ein pH-Wert zwischen 7.9 und 8.2 erreicht war. Der Puffer wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Beschickung der Säule

120 g Diethylaminoethyl-Sephacel (DEAE-Sephacel) wurden in 1.8 l einer 0.5 molaren HCl-Lösung eingerührt und 1.5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung filtriert und mit Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats bei etwa 4 lag. Der Ionenaustauscher wurde dann in 1.8 Liter einer 0.5 M Natronlauge aufgenommen und erneut 1.5 Stunden inkubiert. Zur erneuten Filtration wurde Reinstwasser (18 Ω) verwendet und solange gewaschen, bis das Eluat neutral war. Der so konditionierte Ionenaustauscher wurde in 400 ml des 0.7 M TEAB-Puffers aufgenommen und bei 4 °C in die Säule eingefüllt.

Alle Aufreinigungen mittels Ionenaustauschchromatographie wurden in einem Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Vor jedem Lauf wurde die Säule mit 0.025 M TEAB-Puffer equilibriert. Das zu trennende Rohprodukt aus der Triphosphatsynthese wurde in einem Volumen von ca. 100 – 120 ml des 0.025 M TEAB-Puffers über einen Zeitraum von ca. 3 Stunden aufgetragen. Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit einem linearen Gradienten (0.025 – 0.6 M TEAB) mit einem Gesamtvolumen von 800 – 1 500 ml bei einer Flussrate von ca. 0.5 ml/min durchgeführt. Anschließend wurde die Säule regeneriert (Spülen mit 0.6 M Puffer und erneute Einstellung mit 0.025 M TEAB-Puffer). Bei längerer Lagerung wurde die Säule unter 0.1 M TEAB-Puffer unter Zusatz von 0.02 % Natriumazid aufbewahrt.

10.2 Biochemische Reaktionen

10.2.1 Materialien

10.2.1.1 Enzyme und DNA

*AmpliTaQ Gold*TM DNA-Polymerase, 5 U/ μ l, Perkin Elmer

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 0.5 % Tween® 20, 50 % Glycerin

Pfu(exo-) DNA-Polymerase, 2.5U/ μ l, Stratagene

Lagerungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Tween® 20 (v/v), 0.1% NP-40 (v/v), 50% Glycerin

10x Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.75, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM, MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA

HotStar Taq™ DNA-Polymerase, 5 U/μl, Quiagen GmbH

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 0.5 % NP40 (v/v), 0.5 % Tween® 20 (v/v), 50 % Glycerin

10x Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.7, (NH₄)₂SO₄, KCl, 15 mM MgCl₂

Taq DNA-Polymerase, 5 U/μl, Boehringer Mannheim

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 0.5 % NP40 (v/v), 0.5 % Tween® 20 (v/v), 50 % Glycerin

10x Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl

ThermoSequenase™ DNA-Polymerase, 32 U/μl, Amersham

Verdünnungspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Mercaptoethanol, 0.5 % Tween® 20 (v/v), 0.5 % NP40 (v/v)

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Tween® 20 (v/v), 0.5 % NP40 (v/v), 50 % Glycerin

10x Reaktionspuffer: 260 mM Tris-HCl, pH 9.5, 65 mM MgCl₂

Exonuclease III, 100 U/μl, Boehringer Mannheim

Längenstandards und genomische DNA

- pBR 322 DNA *AluI* geschnitten (250 ng/μl), MBI Fermentas, Vilnius

- 50 bp Standard, Gibco BRL, 1 μg/μl, 16 Fragmente zw. 50 und 800 bp + 2 652 bp-Bande

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA

- Genomische DNA (188 ng/μl), Sequenom GmbH, Hamburg

10.2.1.2 Pufferlösungen und Chemikalien

Acrylamid-Lösung, Roth, Karlsruhe:

Rotiphorese Gel 40, 38 % Acrylamidlösung + 2 % Bisacrylamid als Quervernetzer

APS: 10 %ige wässrige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (Polymerisationsinitiator)

Dynabeads Bindungs- und Waschpuffer, B/W (2x):

10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl

Dynabeads™ Streptavidin M-280, Dynal

2.8 µm Durchmesser, 4-8 m²/g Oberfläche, magnetische Massenssuszeptibilität 10⁻⁴ m³/kg,
10 mg/ml in PBS, pH 7.4, 0.1 % BSA, 0.02 % NaN₃

Elektrophoresepuffer, TAE (10x):

0.4 M Tris-HCl, pH 7.8, 0.05 M NaOAc, 0.01 M EDTA

Elektrophoresepuffer, TBE (10x):

10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 850 mM H₃BO₃, 10 mM EDTA

Ethidiumbromid-Färbelösung: 0.5 µg/ml EtBr in H₂O

Matrix-Lösung:

0.7 mM 3-Hydroxypicolinsäure, 70 mM Ammoniumcitrat, 50 % Acetonitril/H₂O

TEMED: N,N,N',N'-Tetraethylendiamin (Polymerisationsbeschleuniger)

Nucleotide:

ddCTP, Lithiumsalzlösung (10 mM), Boehringer Mannheim

ddTTP, Lithiumsalzlösung (10 mM), Boehringer Mannheim

α-S-dNTP-Set, Lithiumsalzlösung (100 mM), Boehringer Mannheim

dNTP-Set, Lithiumsalzlösung (100 mM), Boehringer Mannheim

5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-OH-dCTP (10 mM), TriLink BioTechnologies,
San Diego, USA

2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 2-S-dCTP (10 mM), TriLink BioTechnologies,
San Diego, USA

2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat, 2-S-dTTP (100 mM), TriLink BioTechnologies,
San Diego, USA

10.2.1.3 Primer und Oligonucleotide

Das CFTR-System verwendet in der PCR ein synthetisches Template, dessen Sequenz komplementär zum Exon 10 des CFTR-Gens ist. Die beiden synthetischen Primer generieren ein doppelsträngiges 48-mer.

CFTR-T87 (Synthetisches 87-mer), Pharmacia Biotech,

5'- TCTTC TAGTT CGCAT GCTTT GATGA CGCTT CTGTA TCTAT ATTCA
TCATA GGAAA CACCA AAGAT GATAT TTTCT TTAAT GGTGC CA -3'

Der grau unterlegte Bereich zeigt die Sequenz des amplifizierten 48-mers.

CFEx10 Bio-F48 auch Bio-F48 (biotinyliertes 19-mer),

5'-bio- CTGGC ACCAT TAAAG AAAA -3' Masse: 6 218.8 Da, Schmelztemp: 52 °C*

CFEx10 R48 auch R48 (19-mer):

5'- ATTCA TCATA GGAAA CACC -3' Masse: 5 764.8 Da, Schmelztemp: 52 °C*

Für das β -Actin-System wurden von Herrn Dr. van den Boom folgende Primer und Templates zur Verfügung gestellt:

β -Actin 160-mer

5'- ACCCA CACTG TGCCC ATCTA CGAGG GGTAT GCCCT CCCCC
ATGCC ATCCT GCGTC TGGAC CT GGC TGGCC GGGAC CTGAC
TGACT ACCTC ATGAA GATCC TCACC GAGCG CGGCT ACAGC
TTCAC CACCA CGGCC GAGCG GGAAA TCGTG CGTGA CATT -3'

Der grau unterlegte Bereich zeigt den Bereich des mit dem Sequenzierprimer amplifizierten 62-mers (Komplementärsequenz).

Bio-hACT2 (biotinyliertes 20-mer, *forward* Primer),

5'-bio- ACCCA CACTG TGCCC ATCTA -3' Masse: 6 388.4 Da, Schmelztemp: 62 °C*

hACTRD (20-mer, *reverse* Primer),

5'- TAATG TCACG CACGA TTTCC -3' Masse: 6 052 Da, Schmelztemp: 58 °C*

hACTVC (17-mer, Sequenzierprimer),

5'- AGGTC CAGAC GCAGG AT -3' Masse: 5 244 Da, Schmelztemp: 58 °C*

Für den Primer Extension Assay wurden von Frau Dipl. Chem. C. Matthies, Universität Hamburg, folgende Templates und Primer zur Verfügung gestellt:

Bio-USP (Universaler Sequenzier Primer, biotinyliertes 17-mer), Pharmacia Biotech

5'- GTAAA ACGAC GGCCA GT -3' Masse: 5 635.9 Da, Schmelztemp: 52 °C*

Temp2 (30-mer)

3'-CAA AA TTTTG CTGCC GGTC A GACAT GCGTT-5'

Temp4 (30-mer)

3'-CAA AA TTTTG CTGCC GGTC ACCAT GCGTT-5'

Der grau unterlegte Bereiche zeigt die Bindungsstelle des Universalen Sequenzier Primers.

* Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte nach der Formel:

$$T_m = 4x (\text{Anzahl GC-Paare}) + 2x (\text{Anzahl AT-Paare})$$

10.2.2 Allgemeine Methoden

10.2.2.1 Gelelektrophorese

Alle PCR-Produkte wurden generell gelelektrophoretisch überprüft. Hierbei standen je nach Länge der jeweiligen Produkte die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), sowie die Überprüfung auf Agarosegelen zur Verfügung. Kürzere PCR-Produkte wurden wegen der besseren Trennkapazität eher auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die Präparation der Gellösung und das Gießen der Gele erfolgte wie bei Maniatis^[160] beschrieben.

Zum Einfüllen der Proben und zur Kennzeichnung der Laufweite wurde den Proben etwa $\frac{1}{3}$ Volumen Blaumarker zugegeben. In der Regel wurden 10 % eines enzymatischen Ansatzes (z.B. PCR-Produkt) aufgetragen. Als interner Standard dienten 1.2 bis 2 μ l eines Oligonucleotidstandards, hergestellt durch *AluI*-Restriktionsverdau von pBR322 DNA oder ein 50 bp Standard mit 16 Fragmenten zwischen 50 und 800 bp-Länge sowie einer 2652 bp-Bande.

Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch Anfärben mit Ethidiumbromid und anschließender Aufnahme der Gele mit einer CCD-Videokamera unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder durch Silberfärbung. Die Gele sind in dieser Arbeit aus Gründen der Abbildungsqualität invertiert wiedergegeben. Eine anderweitige Modifikation der Gelbilder fand jedoch nicht statt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden standardmäßig 12 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 200 V für ca. 30 Minuten, anschließend wurden die Gele zur Detektion der DNA für etwa 15 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert.

Gellösung natives DNA Polyacrylamidgel (12 %)

3 ml	40%ige Acrylamid-Stammlösg. (Rotiphorese Gel 40)
6 ml	ddH ₂ O
1.0 ml	TAE-Puffer (10x)
50 µl	1 %ige APS-Lösung
10 µl	TEMED
10.06 ml	Gellösung

Laufpuffer:	1x Elektrophoresepuffer, TAE
Längenstandard:	pBR 322 DNA <i>AluI</i> geschnitten, 2 µl (100 ng)
	50 bp Standard, 1.2 µl (1 µg/µl)
Blaumarker:	50 % Glycerin
	50 mM EDTA
	0.005 % Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung:	200 µl 10 %ige Ethidiumbromidlösung (w/v) auf ca. 200 ml Laufpuffer (1x).

Silberfärbung von DNA-PAGE-Gelen:

Für die Untersuchung von Abbauprodukten aus Sequenzierungsreaktionen auf Polyacrylamidgelen erwies sich die Ethidiumbromidfärbung als ungeeignet. Eine einfache Alternative war die Silberfärbung:

Fixierlösung:	10 % Ethanol, 0.5 % Essigsäure
Färbelösung:	0.1 % Silbernitrat
Entwicklerlösung:	3 g NaOH auf 200 ml H ₂ O, anschließend versetzt mit 20 mg NaBH ₄ und 0.8 ml 37 %ige Formaldehydlösung
Stopppbad:	0.75 % Natriumcarbonat in Wasser

Das Gel wurde zunächst 10 Minuten in die Fixierlösung getaucht, optional kann danach der Puffer gewechselt und das Gel zeitlich unbegrenzt darin aufbewahrt werden. Zum Färben wurde das Gel anschließend 10 Minuten im Färbepuffer inkubiert und danach zweimal mit Wasser kurz gewaschen. Die Entwicklung des Gels in der Entwicklerlösung erfolgte dann solange, bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten, ca. 20 Minuten. Zum Stoppen des Entwicklungsvorganges wurde fünf bis zehn Minuten im Stopppbad inkubiert. Nach kurzem Wässern wurde das Gel dokumentiert und zur besseren Aufbewahrung in Folie eingeschweißt.

Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1.5 %ige Agarosegele verwendet. Der Gellösung wurden jeweils 2 µl einer Ethidiumbromidlösung zugegeben, so dass eine anschließende Inkubation im Ethidiumbromid-Bad entfiel und das Gel direkt auf der Geldokumentationsstation aufgenommen werden konnte. Der Gellauf erfolgte bei 135 V für 45 Minuten.

Gellösung Agarosegel (1.5 %)

1.2 g Agarose
80 ml TBE-Puffer

Laufpuffer:	0.5x Elektrophoresepuffer, TBE
Längenstandard:	50 bp Standard, 5 µl
Blaumarker:	Bromphenolblau/ 0.5 M EDTA/ 10x TBE

10.2.2.2 Das Streptavidin-Biotin-System zur Aufreinigung biotinylierter DNA

Zur Aufreinigung biotinylierter DNA wurden Streptavidin Festphasenbeads der Firma Dynal (Dynabeads) eingesetzt. Da die Bindungskapazität der Dynabeads von Art und Länge der zu immobilisierenden DNA abhängt, variierte die Menge der eingesetzten Dynabeads in den Sequenzierreaktionen. Die Bindungskapazität für einzelsträngige DNA liegt bei etwa 200 pmol/mg Dynabeads. Für doppelsträngige DNA sinkt die Kapazität, hier werden im Bereich bis zu 300 bp nur etwa 40 pmol DNA an ein Milligramm Dynabeads gebunden. Bei der Immobilisierung von PCR- bzw. Primer Extension Produkten richtete sich die Menge an Beads nach der in der Reaktion eingesetzten Menge an biotinyliertem Primer. Die Dynabeads werden in einer Konzentration von 10 mg/ml geliefert. Im Folgenden werden die Standard-Prozeduren für das Arbeiten mit den Streptavidin Dynabeads beschrieben:

Immobilisierung biotinylierter DNA an die Dynabeads

Vor jedem Gebrauch müssen die Streptavidin Dynabeads gewaschen werden, da ihr Konservierungspuffer mit Natriumazid versetzt ist. Natriumazid hat einen erheblichen, störenden Einfluss auf nachfolgende enzymatische Reaktionen und muss daher sorgfältig entfernt werden.

- 1.) Vor der Entnahme werden die Dynabeads gut resuspendiert, um eine homogene Suspension zu erhalten. Ein Aliquot wird der Stammlösung entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt.
- 2.) Das Reaktionsgefäß wird in einen MPC (Magnetic Particle Collector) gestellt und 30 sek inkubiert, wobei die Dynabeads von der Lösung separiert werden.
- 3.) Der Überstand wird abpipettiert, während das Eppendorfgefäß im MPC verbleibt.
- 4.) Die Dynabeads werden im gleichen Volumen mit 1x B/W-Puffer versetzt und resuspendiert, dazu wird das Reaktionsgefäß aus dem MPC genommen.
- 5.) Es folgen erneut 30 sek Inkubation im MPC und anschließende Entfernung des Überstands.
- 6.) Dieser Waschvorgang wird einmal wiederholt.
- 7.) Nach dem Waschen werden die Dynabeads in B/W-Puffer aufgenommen, hierbei kann das Reaktionsvolumen verringert werden.
- 8.) Die biotinylierte DNA wird zu den resuspendierten Beads in das Eppendorfgefäß pipettiert. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Endkonzentration des Reaktionsansatzes immer 1x B/W entspricht. Da die Zugabe der DNA zumeist mit einer größeren

Volumenzunahme verbunden ist, sollten die Beads nach dem Waschen in 2x B/W-Puffer aufgenommen werden.

- 9.) Zur Immobilisierung wird die Probe für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.
- 10.) Nach der Immobilisierungsreaktion wird das Eppendorfgefäß in einen MPC gestellt, um die Dynabeads von der Lösung zu separieren.
- 11.) Der Überstand, der Verunreinigungen und Enzyme enthält, wird entfernt.
- 12.) Die Dynabeads werden einmal mit 10 mM Tris-HCl Lösung (pH 8) nach der oben beschriebenen Prozedur gewaschen.

Bei eventueller Lagerung sollten die Beads in 1x B/W-Puffer resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt werden.

Denaturierung immobilisierter DNA

Zur Denaturierung doppelsträngiger DNA wurden die Dynabeads mit wässriger Ammoniaklösung in unterschiedlicher Konzentration versetzt. Neben der Ammoniakkonzentration wurden auch das -volumen sowie die Denaturierungstemperatur und die Inkubationszeit variiert. Der Überstand, der den nicht-biotinylierten DNA-Strang enthält, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Lösen der Streptavidin-Biotin Bindung

Um den biotinylierten Strang von den Streptavidin-Dynabeads zu lösen, wurde wie auch zur Denaturierung wässrige Ammoniaklösung unterschiedlicher Konzentration verwendet. Auch die Volumina wurden variiert. Im Unterschied zur Denaturierung erfolgte die Abspaltung von der Festphase jedoch immer bei erhöhter Temperatur:

- 1.) Die Dynabeads werden in wässriger Ammoniaklösung resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß mit Sicherheitsverschluß gebracht.
- 2.) Die Probe wird 10 min bei 65 °C inkubiert.
- 3.) Die Beads werden am MPC separiert
- 4.) Der Überstand mit der freigesetzten biotinylierten DNA wird nach kurzem Abkühlen in ein neues Gefäß überführt.
- 5.) Eventuell wird die Abspaltung einmal wiederholt.

Zum Abdampfen des Ammoniaks und Aufkonzentrierung der Proben für eine anschließende MALDI-TOF MS Analyse wurden die Probengefäße bei geöffnetem Deckel ca. 30 min bei Raumtemperatur auf einen „Schüttler“ gestellt. Bei einem Probenvolumen von mehr als 10 µl wurde zur Konzentrierung der DNA mit Ethanol gefällt (s. Kapitel 10.2.2.3).

Proben, die nicht sofort mittels MALDI-TOF MS untersucht werden konnten, wurden bei –20 °C gelagert.

10.2.2.3 Ethanolpräzipitation

Zur Aufkonzentrierung der DNA wurde die Lösung mit 2 µl Glykogen oder *seeDNA* als Fällungshilfe versetzt und gut gemischt (Vortex). Nach Zugabe des 2.5- bis 3.5-fachen Volumens an Ethanol (96 %) wurde 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation abgetrennt (14 000 rpm, 15 min).

Zum Waschen des Pellets wurde mit ¼ des Ausgangsvolumens an 70 %igem eisgekühltem Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert (14 000 rpm, 5 min).

Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet luftgetrocknet und für die anschließende Analyse mittels MALDI-TOF MS in 1 µl ddH₂O aufgenommen.

10.2.2.4 Ultrafiltration

Einige PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von überschüssigem Primer, Nucleotiden, Enzymen und im Reaktionspuffer enthaltenen Detergenzien über Ultrafiltrationsmembranen aufgereinigt. Verwendet wurden Einweg-Mikrofiltrationsaufsätze der Firma Amicon mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10 000 Da („microcon 10“).

Der spezielle Ultrafiltrationsaufsatz wurde in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß eingesetzt. Die Proben, eventuell nach Poolen mehrerer PCR-Produkte, wurden auf die Microspin-Membran aufgetragen, und ca. 60 min bei 13 000 g (11 000 rpm) zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und es wurde noch zweimal mit je 100 µl Wasser gewaschen. Der Ultrafiltrationsaufsatz wurde danach umgedreht und in einem frischen Eppendorfgefäß positioniert. Um eine vollständige Überführung der DNA in das Auffanggefäß zu gewährleisten, wurden 40 µl Wasser auf die Rückseite der Membran gegeben und 5 min bei 3 000 g zentrifugiert. Das Volumen der überführten Probe (zwischen 30 und 45 µl) wurde

ermittelt, gegebenenfalls mit Wasser auf 45 µl aufgefüllt und für die anschließende enzymatische Reaktion mit Exonuclease III mit 5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer versetzt.

10.2.2.5 MALDI-TOF MS Probenvorbereitung

500 nl Matrix-Lösung (70 mg 3-HPA, 10 mg Ammoniumcitrat in 700 µl ACN/H₂O [1:1 (v/v)]) wurden auf den MALDI-TOF Probenträger pipettiert und durch kurze Inkubation bei RT auskristallisiert. 500 nl der Probe wurden zupipettiert und erneut auf dem Probenteller auskristallisiert. Nach dem Trocknen wurde der Probenteller in die Vakuumschleuse des Massenspektrometers eingeführt.

Probenpräparation mit dem Nanoplotter

Für die automatisierte Probenvorbereitung stand ein 96er Silizium-Chip der Firma Sequenom zur Verfügung, der bereits mit 96 Matrix-Spots beladen war.

Mittels eines Nanoplotters mit 4 Piezopipetten konnten Proben direkt aus einer 96-wells Mikrotiterplatte auf den Chip gespottet werden, dabei wurden jeweils etwa 15 nl auf den Chip übertragen.

Nach Beladung des Chips wurde dieser in die Vakuumschleuse des MALDI-Geräts eingeschleust. Die Vermessung der Chips kann automatisch erfolgen, wobei die Spektren eine Aufsummierung von mehreren Einzelschüssen zeigen. Kann nicht sofort ein ausreichendes Spektrum aufgenommen werden, wechselt der Laser 7 mal die Position, bevor er automatisch zum nächsten Spot geht. Bei schlechter Spektrenqualität wurde jedoch eine Nachmessung einzelner Spots von Hand durchgeführt.

10.2.3 PCR

10.2.3.1 PCR am CFTR-System

a) Unmodifizierte PCR-Produkte

In der konventionellen Sanger Sequenzierung, bei der Optimierung von PCR-Bedingungen sowie als Vergleichsprobe in der reversen Sanger Sequenzierung (Vollverdau) wurden unmodifizierte PCR-Produkte eingesetzt. Als Template wurde ein synthetisches 87-mer (CFTR-T87) verwendet. Zur späteren Aufreinigung der PCR-Produkte über das Streptavidin-

Biotin-System wurde in allen PCRs generell der *forward*-Primer biotinyliert eingesetzt (Bio-F-48). Um zu verhindern, dass sich nicht umgesetzter, biotinylierter Primer an die Streptavidin-Beads anlagern kann, wurde grundsätzlich eine asymmetrische PCR mit dem 2- bis 4-fachen Volumen an reversem Primer durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden in ein Eppendorfgefäß mit Sicherheitsverschluss pipettiert:

	2-fach R48	4-fach R48
ddH ₂ O	x µl	x µl
10x Reaktionspuffer	5 µl	5 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl	2 µl
Template T87 (57 fmol/µl)	1 µl	1 µl
Bio-Primer Bio-F48	1 µl	1 µl
Reverser Primer R48	4 µl	2 µl
Enzym	y µl	y µl
Reaktionsvolumen	50 µl	50 µl

Tabelle 10-A: Pipettierschema unmodifizierte, asymmetrische PCR

Primermengen

Die Primer wurden in den Konzentrationen 35, 20 und 10 pmol/µl eingesetzt.

Polymerasen

Neben der *Pfu*(exo-) Polymerase [(2.5 U/µl), 1 µl] wurden auch die Polymerasen *HotStar Taq* [(5 U/µl), 0.2 µl] und *AmpliTaq Gold* [(5U/µl), 0.5 µl] verwendet.

Temperaturprogramm

Einmaliges Denaturieren:	95 °C, 3 min			
Denaturieren:	25 Zyklen { <table> <tr> <td>95 °C, 1 min</td> </tr> <tr> <td>50 °C, 53 °C, 56 °C, 1 min</td> </tr> <tr> <td>72 °C, 1 min</td> </tr> </table>	95 °C, 1 min	50 °C, 53 °C, 56 °C, 1 min	72 °C, 1 min
95 °C, 1 min				
50 °C, 53 °C, 56 °C, 1 min				
72 °C, 1 min				
Primer-Annealing:				
Extension:	72 °C, 1 min			
Kühlen:	4 °C, hold			

Für die PCR mit *HotStar Taq* und *AmpliTaq Gold* muss darauf geachtet werden, dass zur Aktivierung des Enzyms eine einmalige Denaturierungszeit von 15 min bei 95 °C eingehalten wird.

b) α -Thio-modifizierte PCR-Produkte für die reverse Sanger Sequenzierung

Auch für die reverse Sanger Sequenzierung mit α -Thio-Terminatoren wurde eine asymmetrische PCR mit dem 2-fachen Volumen des reversen Primers R48 durchgeführt.

Für den statistischen Einbau der α -Thio-Terminatoren während der Reaktion wurde je ein natürliches dNTP zu 50 % durch sein α -Thio-Analogon ersetzt; die anderen drei dNTPs wurden unverändert zugegeben. Die folgende Tabelle zeigt beispielhaft das Pipettierschema für die A-Reaktion; die C-, G- und T-Reaktion erfolgen entsprechend:

	A-Reaktion
ddH ₂ O	x μ l
10x Reaktionspuffer	5 μ l
dATP (5 mM)	1 μ l
dCTP (5 mM)	2 μ l
dGTP (5 mM)	2 μ l
dTTP (5 mM)	2 μ l
α -S-dATP (5 mM)	1 μ l
Template T87 (57 fmol/ μ l)	1 μ l
Bio-Primer Bio-F48	1 μ l
Reverser Primer R48	2 μ l
Enzym	y μ l
Reaktionsvolumen	50 μ l

Tabelle 10-B: Pipettierschema für die PCR mit α -Thio-Terminatoren

Primermengen wie unter a)

Polymerasen wie unter a)

Temperaturprogramm wie unter a), Annealingtemperatur = 50 °C

c) PCR mit basenmodifizierten Nucleosidtriphosphaten

Die basenmodifizierten Nucleosidtriphosphate 5-OH-dCTP, 2-S-dCTP und 2-S-dTTP wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in der PCR eingesetzt. Hierfür wurde das jeweils analoge, natürliche dNTP zu 25 bis 100 % durch das entsprechende basenmodifizierte Triphosphat ersetzt:

	C-modifiziertes PCR-Produkt				T-modifiziertes PCR-Produkt			
	25 %	50 %	75 %	100 %	25 %	50 %	75 %	100 %
ddH ₂ O	x µl	x µl	x µl	x µl	x µl	x µl	x µl	x µl
10x Reaktionspuffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dATP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dGTP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dCTP (5 mM)	1.5 µl	1 µl	0.5 µl	-	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dTTP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1.5 µl	1 µl	0.5 µl	-
5-OH-dCTP bzw. 2-S-dCTP (5 mM)	0.5 µl	1 µl	1.5 µl	2 µl	-	-	-	-
2-S-dTTP (5 mM)	-	-	-	-	0.5 µl	1 µl	1.5 µl	2 µl
Template T87 (57 fmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Bio-F48 (20 pmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
R48 (20 pmol/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Enzym	y µl	y µl	y µl	y µl	y µl	y µl	y µl	y µl
Reaktionsvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 10-C: Pipettierschema für die PCR mit basenmodifizierten TriphosphatenPrimermengen

Es wurden grundsätzlich asymmetrische PCRs (2-fach R48) durchgeführt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 20 pmol/µl eingesetzt.

Polymerasen

Neben der *Pfu*(exo-) DNA-Polymerase [(2.5 U/µl), 1 µl] wurde auch die *HotStar Taq* DNA-Polymerase [(5 U/µl), 0.4 µl] getestet.

Temperaturprogramm wie unter a)

d) PCR mit α -Thio-Terminatoren und basenmodifizierten dNTPs

Für die reverse Sanger Sequenzierung mit basenmodifizierten dNTPs zum Massenausgleich wurden PCR-Produkte generiert, in denen je ein natürliches dNTP vollständig durch seine beiden modifizierten Analoga ersetzt wurde (z.B. Ersatz von dCTP durch 5-OH-dCTP und α -S-dCTP). Hierbei wurde das Verhältnis von α -S-dNTP zu basenmodifiziertem dNTP variiert.

	PCR			PCR		
	mit C-Terminator			mit T-Terminator		
	25 %	50 %	75 %	25 %	50 %	75 %
ddH ₂ O	x µl	x µl	x µl	x µl	x µl	x µl
10x Reaktionspuffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dATP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dGTP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dCTP (5 mM)	-	-	-	2 µl	2 µl	2 µl
dTTP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	-	-	-
5-OH-dCTP bzw. 2-S-dCTP (5 mM)	1.5 µl	1 µl	0.5 µl	-	-	-
2-S-dTTP (5 mM)	-	-	-	1.5 µl	1 µl	0.5 µl
Terminator: α-S-dCTP (5 mM)	0.5 µl	1 µl	1.5 µl	-	-	-
Terminator: α-S-dTTP (5 mM)	-	-	-	0.5 µl	1 µl	1.5 µl
Template T87 (57 fmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Bio-F48 (20 pmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
R48 (20 pmol/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Enzym	y µl	y µl	y µl	y µl	y µl	y µl
Reaktionsvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 10-D: Pipettierschema für die PCR mit basenmodifizierten Triphosphaten und α-Thio-Terminatoren

e) PCR mit genomischer DNA

Für die PCR mit genomischer DNA als Template stand genomische DNA verschiedener gesunder Individuen zur Verfügung.

In den PCR-Ansätzen wie unter a) und b) beschrieben wurde das synthetische Template CFTR-T87 durch genomische DNA (188 ng/µl, 0.5 µl) ersetzt.

Die Reaktionsbedingungen wurden durch Variation der Annealing-Temperatur, der Dauer von Annealing und Extension sowie der Anzahl der Reaktionszyklen optimiert. Von den getesteten Polymerasen (wie unter a) und b)) wurden die besten Ergebnisse mit *Pfu(exo-)* DNA-Polymerase sowie *HotStar Taq* DNA-Polymerase erzielt.

Temperaturprogramme:	I	II
Einmaliges Denaturieren:	95 °C, 15 min	94 °C, 15 min
Denaturieren:	95 °C, 45 sek	94 °C, 20 sek
Annealing:	52 °C, 45 sek	45, 50, 53 u. 56 °C, 20 sek
Extension:	72 °C, 45 sek	72 °C, 30 sek
	72 °C, 3 min	72 °C, 3 min
Kühlen:	4 °C, hold	4 °C, hold

Temperaturprogramm I wurde mit je 25, 30, 35, 40 und 45 Reaktionszyklen, Temperaturprogramm II mit je 35, 40 und 45 Reaktionszyklen durchgeführt.

10.2.3.2 PCR am β -Actin-System

Für die asymmetrische PCR am β -Actin-System wurden folgende Substanzen in ein Eppendorfgefäß mit Sicherheitsverschluss pipettiert:

ddH ₂ O	31 μ l
10x exo(-) <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	5 μ l
dNTP-Mix (5 mM)	5 μ l
Template hACTR (10^7 K/ μ l)	5 μ l
Bio-Primer Bio-hACT 2 (20 pmol/ μ l)	1 μ l
Reverser Primer (20 pmol/ μ l)	2 μ l
exo(-) <i>Pfu</i> -Polymerase (2.5 U/ μ l)	1 μ l
Reaktionsvolumen	50 μ l

Tabelle 10-F: Pipettierschema für die Amplifizierung des 160-mers

Temperaturprogramm

Einmaliges Denaturieren:	95 °C, 3 min	
Denaturieren:	95 °C, 1 min	} 25 Zyklen
Primer-Annealing:	50 °C, 1 min	
Extension:	70 °C, 1 min	
Kühlen:	4 °C, hold	

10.2.4 Primer Extension Reaktionen

10.2.4.1 Primer Extension Reaktion am β -Actin-Template

Die in Kap. 10.2.3.2 generierten PCR-Produkte wurden analog zur Sequenzierung am CFTR-System für eine Sequenzierung mit Exonuclease III präpariert:

Immobilisierung der PCR-Produkte an die Festphasenbeads

Die PCR-Ansätze werden an je 20 μ l Dynabeads gebunden. Die Immobilisierung erfolgt dabei wie unter Kap. 10.2.2.2 beschrieben.

Denaturieren des DNA-Duplex

- 1.) Dynabeads am MPC separieren und Überstand abpipettieren
- 2.) Immobilisiertes PCR-Produkt einmal mit 50 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 waschen
- 3.) 5 μ l NH_4OH (25 %) zugeben
- 4.) Inkubation bei 40 °C, 4-5 min
- 5.) Dreimal mit 50 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 waschen

Primer Extension Reaktion mit α -Thio-Nucleotiden

Die Primer Extension Reaktion mit dem Sequenzierprimer hACTVC generiert ein DNA-Duplex (62-mer) mit einem 3'-Überhang. Ein Exonuclease III-Abbau ist somit nur noch am nicht-biotinylierten, α -thio-modifizierten DNA-Strang möglich.

Der folgende Reaktionsmix – hier für die T-Reaktion ($\text{dTTP}/\alpha\text{-S-dTTP} = 50:50$) – wurde zu dem zuvor denaturierten und an die Festphasenbeads gebundenen β -Actin-PCR-Produkt pipettiert:

10x Reaktionspuffer (exo(-) <i>Pfu</i> -Polymerase)	2 μ l
dATP (5 mM)	2 μ l
dCTP (5 mM)	2 μ l
dGTP (5 mM)	2 μ l
dTTP (5 mM)	1 μ l
α -S-dTTP (5 mM)	1 μ l
Primer hACTVC (20 pmol/ μ l)	1 μ l
Exo(-) <i>Pfu</i> -Polymerase (2.5 U/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	8 μ l
Reaktionsvolumen	20 μ l

Tabelle 10-G: Pipettierschema für die Generierung des modifizierten 62-mers

Temperaturprogramm

Denaturieren:	80 °C, 1 min
Primer-Annealing:	55 °C, 3 min
Extension:	72 °C, 4 min

Nach dem Temperaturprogramm wurde der Reaktionsansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei der modifizierte DNA-Strang vollständig an den biotinylierten Strang hybridisiert.

10.2.4.2 Primer Extension Assay

Für den Primer Extension Assay zur Untersuchung verschiedener modifizierter Nucleosidtriphosphate sowie einiger DNA-Polymerasen wurden folgende Substanzen in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

bio-USP (10 pmol) / Template (1 pmol) - Mix	1 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
dNTP (5 mM) modifiziert oder unmodifiziert	1 µl
BSA (1 ng/ml)	1 µl
Enzymlösung (2.5 U)	x µl
ddH ₂ O	y µl
Reaktionsvolumen	20 µl

Tabelle 10-H: Pipettierschema für den Primer Extension Assay

Der Assay wurde in einer 96-wells Mikrotiterplatte durchgeführt.

Da die untersuchten Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen geliefert werden, wurden sie vor der Zugabe zum Reaktionsansatz in geeigneter Weise in ihrem jeweiligen Verdünnungspuffer auf 2.5 bzw. 5 U/µl verdünnt.

Folgende Polymerasen wurden untersucht:

- *exo (-) Pfu* Polymerase (2.5 U/ μ l)
- *Taq* Polymerase (5 U/ μ l)
- AmpliTaq Gold (5 U/ μ l)
- HotStar Taq (5/ μ l)
- ThermoSequenase (2.5 U/ μ l)

Die Wahl des Templates richtete sich nach dem zu untersuchenden Nucleosidtriphosphat, für alle Modifikationen von C wurde das Template **Temp2**, für alle Modifikationen von T Template **Temp4** verwendet.

Folgende modifizierte Nucleosidtriphosphate wurden eingesetzt:

- C-Modifikationen:
- α -S-dCTP, Boehringer Mannheim
 - 5-OH-dCTP, TriLink BioTechnologies
 - 2-S-dCTP, TriLink BioTechnologies
- T-Modifikationen:
- α -S-dTTP, Boehringer Mannheim
 - 2-S-dTTP, TriLink BioTechnologies
 - 5'-S-dTTP aus der Synthese unter Kap. 4.3

Zur Kontrolle wurden außerdem die natürlichen Nucleosidtriphosphate dCTP und dTTP (Boehringer Mannheim) untersucht.

Temperaturprogramm

Einmaliges Denaturieren:	95 °C, 5 min	
Denaturieren:	95 °C, 1 min	} 25 Zyklen
Primer-Annealing:	49 °C, 1 min	
Extension:	72 °C, 1 min	
Kühlen:	4 °C, hold	

Die Aufreinigung der Reaktionsansätze erfolgte über das Streptavidin-Biotin-System:

Immobilisierung an Streptavidin-Beads

Pro Reaktionsansatz wurden 10 µl Dynabeads-Suspension eingesetzt:

- 1.) 10 µl Streptavidin-Beads mit 10 µl 1x B/W-Puffer waschen
- 2.) Beads in je 20 µl 2x B/W-Puffer resuspendieren
- 3.) Beads zum Reaktionsansatz (20 µl) hinzufügen
- 4.) Inkubation bei Raumtemperatur, 30 min

Denaturieren des Templates

- 1.) Beads am MPC separieren und Überstand entfernen
- 2.) Mit 50 µl 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 8.0) waschen
- 3.) 25 µl 2 M NH₄OH zugeben
- 4.) 5 min bei 37 °C inkubieren
- 5.) Denaturierung einmal wiederholen
- 6.) Beads dreimal mit je 50 µl 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 8.0) waschen

Abspalten des biotinylierten Stranges von den Festphasenbeads

- 1.) Beads am MPC separieren und Überstand entfernen
- 2.) 10 µl 2 M NH₄OH zugeben
- 3.) 10 min bei 65 °C inkubieren
- 4.) Beads am MPC separieren und Überstand in ein neues Tube überführen
- 5.) Zum Abdampfen des Ammoniaks das Reaktionsgefäß 30 min mit geöffnetem Deckel bei Raumtemperatur schütteln.

Die MALDI-TOF MS Probenpräparation erfolgte wie in Kap. 10.2.2.5 beschrieben.

10.2.5 Reverse Sanger Sequenzierung am CFTR-System

10.2.5.1 Exonuclease III-Reaktion an den Festphasenbeads

Die in Kap. 10.2.3.1 beschriebenen modifizierten PCR-Produkte wurden wie folgt einer enzymatischen Spaltung mit Exonuclease III unterzogen:

Immobilisierung der PCR-Produkte an die Festphase (Beads)

Je nach in der PCR eingesetzten Primermenge wurden 35 pmol Bio-F48 an 30 µl Dynabeads bzw. 20 pmol Bio-F48 an 15 µl Beads gebunden:

- 1.) 30 µl Streptavidin-Beads in ein Eppendorfgefäß pipettieren und zweimal mit 30 µl 1x B/W-Puffer waschen
- 2.) Beads in 2x B/W-Puffer aufnehmen ($V_{2x\ B/W} : V_{\text{PCR-Produkt}} = 1:1$) und zum PCR-Produkt pipettieren
- 3.) Inkubation bei Raumtemperatur, 15 - 30 min
- 4.) MPC anwenden und Überstand entfernen

Exonuclease III-Reaktion

Als Reaktionspuffer für die Exonuclease III-Reaktion wurde der PCR-Reaktionspuffer der Taq DNA-Polymerase verwendet. Auch das Enzym wurde in der Sequenzierreaktion 1:10 verdünnt in 1x Taq-Puffer eingesetzt.

- 1.) Immobilisiertes PCR-Produkt einmal mit 50 µl 1x Taq-Reaktionspuffer waschen
- 2.) In 48 µl 1x Taq-Reaktionspuffer resuspendieren

Die Sequenzierung wurde bei Raumtemperatur mit 2 µl Exonuclease III (10U/µl) und folgenden Inkubationszeiten durchgeführt:

Inkubationszeiten: 10, 20, 30, 40 und 50 min

Probenaufarbeitung

- 1.) Dynabeads am MPC sammeln und Überstand verwerfen
- 2.) Dreimal mit 50 µl 10 mM Tris-HCl Lösung (pH 8.0) oder Ammoniumcitratlösung waschen
- 3.) Denaturieren des nicht-biotinylierten Stranges:

Die Denaturierung wurde mit wässriger Ammoniaklösung unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

- A: 50 µl $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{konz.}}$; Inkubation bei RT für 2 min, Denaturierung einmal wiederholen
- B: 50 µl NH_4OH (25 %); Inkubation bei RT für 2 min, einmal wiederholen
- C: 5 µl NH_4OH (25 %); Inkubation bei 40 °C, 4-5 min
- D: 5 µl NH_4OH (25 %); Inkubation bei RT, 4-5 min
- E: 5 µl NH_4OH (2 M); Inkubation bei 40 °C, 4-5 min

Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

4.) Abspalten des biotinylierten Stranges von der Festphase:

Auch die Spaltung der Streptavidin-Biotin Bindung erfolgte mit wässriger Ammoniaklösung unterschiedlicher Konzentration und Volumina jedoch stets bei erhöhter Temperatur:

A: 50 µl $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{konz}}$; Inkubation bei 60 °C, 8 min, einmal wiederholen

B: 50 µl NH_4OH (25 %); Inkubation bei 65 °C, 8 min, einmal wiederholen

C: 10 µl NH_4OH (25 %); Inkubation bei 65 °C, 6-8 min

D: 10 µl NH_4OH (2 M); Inkubation bei 65 °C, 8-10 min

E: 5 µl NH_4OH (100 mM); Inkubation bei 40 °C, 4-5 min

Je nach Probenvolumen konnten die Proben entweder nach Abdampfen des Ammoniaks direkt mittels MALDI-TOF MS vermessen werden oder es wurde zur Aufkonzentrierung der DNA eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Zur Kontrolle wurden auch unmodifizierte PCR-Produkte in der reversen Sanger Sequenzierung verwendet. Diese wurden durch Behandlung mit Exonuclease III vollständig abgebaut (Vollverdau-Kontrolle) und anschließend ebenfalls massenspektrometrisch untersucht.

10.2.5.2 Untersuchung von PCR-Produkten mittels MALDI-TOF MS

Einige PCR-Produkte wurden zu Kontrollzwecken nicht nur gelelektrophoretisch, sondern auch massenspektrometrisch analysiert. Die Präparation der Proben erfolgte hierbei soweit wie möglich nach dem oben beschriebenen Protokoll zur reversen Sanger Sequenzierung an den Festphasenbeads.

Die PCR-Produkte wurden nach Immobilisierung an die Festphasenbeads einmal mit 1x *Taq*-Reaktionspuffer sowie dreimal mit je 50 µl 10 mM Tris-HCl Lösung (pH 8.0) gewaschen. Es folgte die Denaturierung des nicht-biotinylierten DNA-Stranges sowie das Lösen der Streptavidin-Biotin-Bindung, eventuell gefolgt von einer Ethanol-fällung zur Aufkonzentrierung der DNA.

10.2.5.3 Exonuclease III-Reaktion an PCR-Produkten in Lösung

Zur Sequenzierung modifizierter PCR-Produkte aus Kap. 10.2.3.2 in Lösung wurden die PCR-Reaktionsansätze entweder direkt mit Exonuclease III versetzt oder mittels Ultrafiltration (Kap. 10.2.2.4) oder Ethanolpräzipitation (Kap. 10.2.2.3) aufkonzentriert, in 1x Taq-Reaktionspuffer aufgenommen und anschließend mit dem Enzym inkubiert. Exonuclease III wurde 1:10 in 1x Taq-Reaktionspuffer verdünnt (10 U/μl) eingesetzt.

Die Sequenzierung wurde bei Raumtemperatur mit folgenden Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt:

<u>Enzymkonzentration:</u>	10 und 20 U
<u>Inkubationszeiten:</u>	5, 10, 20, 30, 50 und 70 min

Der Abbruch der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe von 5 μl 0.5 M EDTA-Lösung (pH = 7.6, NaOH) und anschließendem Einfrieren des Reaktionsansatzes auf -70 °C für mindestens 10 min

Die Aufreinigung wurde wie in Kap. 10.2.2.3 beschrieben über das Streptavidin-Biotin Festphasensystem durchgeführt. Die Abbauprodukte wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

10.2.6 Konventionelle Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS

Für die konventionelle Sanger Sequenzierung wurde als Template in der Sequenzierreaktion der biotinylierte Strang des mittels PCR amplifizierten, unmodifizierten 48-mers (Kap. 10.2.3.2) verwendet. Die Aufreinigung der Abbauprodukte konnte daher an den Festphasenbeads erfolgen. Für eine anschließende Analyse der Abbauprodukte mittels MALDI-TOF MS kann nur der nicht-biotinylierte Strang verwendet werden.

Denaturierung des DNA-Duplex

- 1.) Dynabeads am MPC sammeln und Überstand verwerfen
- 2.) Zugabe von 25 μl NH₄OH (2 M), Inkubation bei 37 °C, 5 min
- 3.) Überstand verwerfen
- 4.) Denaturierung einmal wiederholen
- 5.) Dreimal mit 50 μl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 waschen

Sanger Sequenzierreaktion

Für die Sanger Sequenzierung wurden folgende Substanzen zu dem zuvor denaturierten und an die Festphasenbeads gebundenen ss-48-mer pipettiert:

ddH ₂ O	12.9 µl
10x ThermoSequenase-Sequenzierpuffer	2.0 µl
Nucleotid-Mix: dATP } dGTP } 2 mM dCTP } dTTP }	2.5 µl
ddNTP (500 µM)	1.0 µl
Sequenzier-Primer R48 (15 pmol)	0.6 µl
ThermoSequenase (2.5 U/µl)	1.0 µl
Reaktionsvolumen	20 µl

Tabelle 10-F: Pipettierschema für die konventionelle Sanger Sequenzierung

Temperaturprogramm

Denaturieren:	80 °C, 1 min
Primer-Annealing:	48 °C, 3 min
Extension:	72 °C, 4 min

Probenaufarbeitung

- 1.) PCR-Produkt einmal mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 waschen
- 2.) Zweimal mit 50 µl 10 mM Tris-HCl Lösung (pH 8.0) waschen
- 3.) 5 µl NH₄OH-Lösung (2 M) zugeben
- 4.) 5 min bei 40 °C inkubieren
- 5.) Beads am MPC separieren und Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- 6.) Zum Abdampfen des Ammoniaks Reaktionsgefäße mit geöffnetem Deckel ca. 15 min bei RT schütteln
- 7.) MALDI-TOF Analyse bzw. Lagerung bei –20 °C

10.3 Chemische Synthesen

10.3.1 Synthese von 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat nach Shirokova und Yoshikawa

10.3.1.1 5'-Acetylthio-5'-desoxythymidin 2

5.1 g (19.4 mmol) Triphenylphosphin (PPh₃) in 230 ml abs. THF wurden auf 0 °C gekühlt und mit 3.9 ml (20 mmol) Diethylazodicarboxylat (DIAD) versetzt. 1.5 ml (21.1 mmol) Thioessigsäure gelöst in ca. 25 ml abs. THF wurden im Argongegenstrom zugetropft und die Lösung wenige Minuten bei 0 °C gerührt. Es folgte die Zugabe von 4.1 g (16.9 mmol) Thymidin 1. Nach ca. einstündigem Rühren bei 0 °C wurde das Eis/Kältebad entfernt und das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde das Reaktionsgemisch *in vacuo* eingengt und in ca. 50 ml Ethylacetat aufgenommen. Das Gemisch wurde zum Auskristallisieren des während der Reaktion entstandenen Triphenylphosphinoxids sowie nicht umgesetzten Thymidins über Nacht im Kühlschrank gelagert. Die Verunreinigungen wurden über einen Faltenfilter abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert.

12 g Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an 400 g Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 97:3 bis 90:10).

Ausbeute: 1.5 g (6 mmol), 36 % d. Th. (Lit. 40 %)

R_F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1): 0.3 (Sprühreagenz A)

M = 300.3 g/mol; (C₁₂H₁₆N₂O₅S)

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 300 [M+H]⁺ (12)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.81 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃COS), 2.05 (ddd, 1H, H-2'), 2.21 (ddd, 1H, H-2'), 2.51 (m, DMSO), 3.11 (m, 2H, H-5'), 3.22 (m, 2H, H-5'), 3.93 (m, 1H, H-4'), 4.21 (m, 1H, H-3'), 5.42 (m, 1H, OH), 6.13 (dd, 1H, H-1'), 7.43 (s, 1H, H-6) ppm

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.97 (CH₃), 31.37 (COCH₃), 31.94 (C-5'), 38.86 (C-2'), 73.40 (C-3'), 84.73 (C-4'), 85.36 (C-1'), 110.68 (C-5), 132.39 (C-6), 151.30 (C-2), 164.52 (C-4), 195.68 (COCH₃) ppm

10.3.1.2 5'-Thio-5'-desoxythymidin 3

170 mg (0.57 mmol) 2 wurden in 5 ml abs. Methanol gelöst. Die Lösung wurde mit 0.5 ml wässriger Ammoniaklösung (25 %) und 50 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt an 30 g Kieselgel 60 säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1 unter Zugabe einiger Tropfen 2-Mercaptoethanol). Die das Produkt 3 enthaltenden Fraktionen wurden sofort mit 40 ml 2-Mercaptoethanol/Wasser behandelt und nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur evaporiert. Der Rotationsverdampfer wurde mit Stickstoff belüftet.

Ausbeute: 59 mg (0.23 mmol), 40 % d. Th. (Lit. 77 %)

R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1): 0.45 (Sprühreagenz A)

M = 258.3 g/mol; (C₁₀H₁₄N₂O₄S)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.82 (d, 3H, CH₃), 2.07 (ddd, 1H, H-2'), 2.22 (ddd, 1H, H-2'), 2.48 (m, 1H, H-5'), 2.52 (m, DMSO), 2.75 (dd, 1H, H-5'), 3.79 (ddd, 1H, H-4'), 4.22 (ddd, 1H, H-3'), 5.35 (m, 1H, OH), 6.19 (dd, 1H, H-1'), 7.51 (s, 1H, H-6) ppm

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.48 (CH₃), 26.63 (C-5'), 38.48 (C-2'), 72.18 (C-3'), 84.06 (C-4'), 87.39 (C-1'), 110.13 (C-5), 136.40 (C-6), 150.83 (C-2), 164.03 (C-4) ppm

10.3.1.3 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat [5'-S-dTTP] 5

a) Darstellung von 0.5 M Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat in N,N'-Dimethylformamid

Zu einer Lösung aus 0.89 g (0.5 mmol) Pyrophosphorsäure in 70 ml Diethylether und 10 ml Acetonitril wurden 4.74 ml (20 mmol) Tri-n-butylamin gegeben. Anschließend wurden die Lösungsmittel abdestilliert; das nicht umgesetzte Tri-n-butylamin wurde abpipettiert und der Rückstand mit DMF auf ein Volumen von 10 ml verdünnt.

b) Triphosphatsynthese nach Shirokova^[117]

200 mg (3 mmol) Imidazol und 417 µl Triethylamin gelöst in 5 ml Acetonitril wurden bei 0 °C tropfenweise mit 93 µl (1 mmol) Phosphorylchlorid versetzt.

Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat abfiltriert. Die zurückbehaltene Lösung von Phosphortriimidazolid wurde zu 59 mg (0.23 mmol) 5'-Thio-5'-desoxythymidin **3** gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 4 °C über Nacht gerührt. Eine Kontrolle der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1; H₂O/NH₃/2-Propanol 1:1:3) zeigte keine Umsetzung zum gewünschten Monophosphat **4**. Auch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit und anschließende erneute Zugabe von 1 mmol Phosphortriimidazolid konnten die Edukte nicht zur Reaktion gebracht werden.

c) Triphosphatsynthese nach Yoshikawa^[135]

180 mg Molsieb (3 Å, gemörsert) und 180 mg (1.56 mmol) Pyridiniumhydrochlorid wurden in 4 ml Acetonitril suspendiert und zum zuvor frisch mit 2-Mercaptoethanol coevaporierten 5'-Thio-5'-desoxythymidin **2** (59 mg, 0.23 mmol) gegeben. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension auf 0 °C gekühlt und weitere 20 min gerührt.

Zur Umsetzung zum Monophosphat wurden 40 µl (0.44 mmol) Phosphorylchlorid in der Kälte zugegeben und die Reaktionsmischung ca. 30 min gerührt. Eine Kontrolle des Reaktionsverlaufs mittels DC zeigte keine Umsetzung zum Monophosphat.

Es wurden weitere 40 µl (0.44 mmol) Phosphorylchlorid zugegeben. Nach weiterem Rühren über 30 min zeigte die DC-Kontrolle des Reaktionsverlaufs eine deutliche Umsetzung des Thiols zum Monophosphat (Laufmittel 1: Dichlormethan/Methanol 9:1, Laufmittel 2: H₂O/NH₃/2-Propanol 1:1:3)

Die Umsetzung zum Triphosphat **5** erfolgte durch Zugabe von 5 ml 0.5 M Bis(tributylammonium)pyrophosphat-Lösung (DC-Kontrolle: Laufmittel H₂O/NH₃/2-Propanol 1:1:3).

Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephacel (linearer Gradient Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer, 0.025 – 0.6 M, pH 7.8, Gesamtelutionsvolumen = 1000 ml). Das Triphosphat wurde bei einer Pufferkonzentration von 0.3 M eluiert.

Ausbeute: 9 mg (0.035 mmol), 4.8 % d. Th. (Lit. 3.4 %)

R_F -Wert (Monophosphat): Dichlormethan/Methanol 9:1 = 0
 $H_2O/NH_3/2$ -Propanol 1:1:3 = 0.53 (Referenz dTMP = 0.55)
 R_F -Wert (Triphosphat): $H_2O/NH_3/2$ -Propanol 1:1:3 = 0.10 (Referenz dTTP = 0.12)

$M = 498.24 \text{ g/mol}$; ($C_{10}H_{17}N_2O_{13}P_{13}S$)

UV (Wasser) $\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}$

^{31}P -NMR (200 MHz, D_2O): $\delta = -5.1$ (1P, P_α), -10.14 (1P, P_γ), -21.05 (1P, P_β) ppm.

10.3.2 Versuche zur Synthese von 5'-Thio-5'-desoxyadenosin-5'-S-triphosphat nach Eckstein^[138]

10.3.3.1 5'-Tosyl-5'-desoxythymidin **6**^[161]

3 g (12.5 mmol) Thymidin **1** gelöst in 25 ml abs. Pyridin wurden auf 0 °C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 2.85 g (15 mmol, 1.2 eq) p-Tolylsulfonylchlorid (Tosylchlorid), gelöst in 25 ml abs. Pyridin versetzt. Die Reaktionslösung wurde noch 12 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe eines kleinen Stücks Eis wurde die Lösung auf 125 ml Eiswasser gegossen, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie mit Wasser extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt an 100 g Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1)

Ausbeute: 2.4 g (6 mmol), 48 % d. Th. (Lit. 63 %)

R_F -Wert (Chloroform/Methanol 9:1): 0.3 (Sprühreagenz A)

$M = 364.3 \text{ g/mol}$; ($C_{17}H_{20}N_2O_5S$)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.72$ (s, 3H, CH_{3Base}), 2.43 (s, 3H, CH_{3Tosyl}), 2.53 (m 2H, H-2'), 2.94 (m, 2H, H-5'), 4.25 (m, 1H, H-4'), 4.82 (m, 1H, H-3'), 5.71 (m, 1H, OH), 6.42 (dd, 1H, H-1'), 7.32 (d, 2H, H_{ar}), 7.76 (d, 2H, H_{ar}), 8.0 (s, 1H, H-6) ppm.

10.3.3.2 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-monophosphat 7

Zur Darstellung der Thiophosphorsäure als Trinatriumsalz wurden 10 g (250 mmol) Natriumhydroxid in 100 ml Wasser gelöst und mit 4.4 ml Thiophosphorylchlorid (7.194 mg, 0.042 mmol) versetzt. Die wässrige Lösung wurde für 15 Minuten unter Rückfluß bei 115 °C gerührt. Das entstandene Natriumsalz der Thiophosphorsäure, sowie Natriumchlorid wurden durch Kühlung im Eisbad auskristallisiert, gefiltert und in wenig warmen Wasser (30-35 ml, 40 °C) gelöst. Die abgekühlte Salzlösung wurde mit Methanol (90 ml) versetzt, wobei das Natriumthiophosphat nach einiger Zeit wieder auskristallisiert, während das NaCl in Lösung bleibt. Das Trinatriummonothiophosphat wurde aus abs. Methanol mehrfach umkristallisiert und anschließend getrocknet. Die vereinigten Kristalle des Natriumthiophosphats wurden mit abs. Methanol (80 ml) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und für 1 Stunde bei 100 °C getrocknet.

Um das Tri-n-butylammoniumsalz der Thiophosphorsäure zu erhalten, wurde eine Lösung des Trinatriummonothiophosphats (400 mg, 2.2 mmol) in 10 ml Methanol/Wasser 1:1 über eine Ionenaustauschersäule (Merck I Ionenaustauscher, Pyridinium-Form) gegeben, mit Methanol/Wasser 1:1 (300 ml) nachgespült und das Lösungsmittel *in vacuo* abdestilliert. Der Rückstand (Pyridiniumsalz der Thiophosphorsäure) wurde in 5 ml Methanol gelöst und in der Wärme mit Tri-n-butylamin (2.0 mmol) versetzt, die Reaktionsmischung noch 5 min gerührt und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Produkt wurde durch mehrfaches Destillieren mit abs. Pyridin getrocknet und direkt für die anschließende Umsetzung mit 5'-Tosyl-5'-desoxythymidin 6 eingesetzt.

Zur Synthese des Monophosphats 7 wurden 290 mg (0.8 mmol) 5'-Tosyl-5'-desoxythymidin 6 in 1.5 ml abs. DMF gelöst. Unter Rühren wurden 800 mg (1.19 mmol) Tri-n-butylammonium-thiophosphat gelöst in 1 ml abs. DMF hinzuge tropft und die Lösung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Eine dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufs (H₂O/NH₃/2-Propanol 1:1:3) zeigte neben dem Edukt als Hauptbestandteil noch die Entstehung mehrerer Reaktionsprodukte in sehr geringer Ausbeute an. Durch eine Aufreinigung des Rohproduktes mittels Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephacel (linearer Gradient Triethyl-ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, 0.025 – 0.6 M, pH 7.8, Gesamtelutionsvolumen = 1000 ml) konnte jedoch kein Monophosphat isoliert werden.

11 Anhang

11.1 Massentabellen

11.1.1 Reverse Sanger Sequenzierung mit α -Thio-dNTPs (Terminatoren)

A) Fragmentmassen der Sequenzleitern des biotinylierten Stranges

Fragment	Sequenz (5'→3')	unmodifiz. Fragmente (berechnet)	A-Reaktion gemessen	C-Reaktion gemessen	G-Reaktion gemessen	T-Reaktion gemessen
5'-bio-F48 (19-mer)		6218.8				
20-mer	T	6523.0	-	-	-	6528
21-mer	A	6836.2	6851	-	-	-
22-mer	T	7140.4	-	-	-	7154
23-mer	C	7429.6	-	7434	-	-
24-mer	A	7742.8	7757	-	-	-
25-mer	T	8047.0	-	-	-	8058
26-mer	C	8336.2	-	8340	-	-
27-mer	T	8640.4	-	-	-	8657
28-mer	T	8944.6	-	-	-	8957
29-mer	T	9248.8	-	-	-	9271
30-mer	G	9578.0	-	-	9581	-
31-mer	G	9907.2	-	-	9908	-
32-mer	T	10211.4	-	-	-	10236
33-mer	G	10540.6	-	-	10541	-
34-mer	T	10844.8	-	-	-	10864
35-mer	T	11149.0	-	-	-	11170
36-mer	T	11453.2	-	-	-	11487
37-mer	C	11742.4	-	11760	-	-
38-mer	C	12031.6	-	12055	-	-
39-mer	T	12335.8	-	-	-	12372
40-mer	A	12649.0	12669	-	-	-
41-mer	T	12953.2	-	-	-	12948
42-mer	G	13282.4	-	-	13289	-
43-mer	A	13595.6	13621	-	-	-
44-mer	T	13899.8	-	-	-	13941
45-mer	G	14229.0	-	-	14240	-
46-mer	A	14542.2	14573	-	-	-
47-mer	A	14855.4	14892	-	-	-
48-mer [M+H] ⁺	T	15159.6	-	-	-	15211

B) Fragmentmassen der Sequenzleitern des nicht-biotinylierten Stranges

Fragment	Sequenz (5'→ 3')	unmodifiz. Fragmente (berechnet)	A-Reaktion gemessen	C-Reaktion gemessen	G-Reaktion gemessen	T-Reaktion gemessen
R48 (19-mer)		5764.8				
20-mer	A	6078.0	6088	-	-	-
21-mer	A	6391.2	6401	-	-	-
22-mer	A	6704.4	6715	-	-	-
23-mer	G	7033.6	-	-	7046	-
24-mer	A	7346.8	7366	-	-	-
25-mer	T	7651.0	-	-	-	7666
26-mer	G	7980.2	-	-	7992	-
27-mer	A	8293.4	8311	-	-	-
28-mer	T	8597.6	-	-	-	8616
29-mer	A	8910.8	8935	-	-	-
30-mer	T	9215.0	-	-	-	9240
31-mer	T	9519.2	-	-	-	9548
32-mer	T	9823.4	-	-	-	9856
33-mer	T	10127.6	-	-	-	10166
34-mer	C	10416.8	-	10437	-	-
35-mer	T	10721.0	-	-	-	10761
36-mer	T	11025.2	-	-	-	11071
37-mer	T	11329.4	-	-	-	11381
38-mer	A	11642.6	11668	-	-	-
39-mer	A	11955.8	11987	-	-	-
40-mer	T	12260.0	-	-	-	12314
41-mer	G	12589.2	-	-	12619	-
42-mer	G	12918.4	-	-	12945	-
43-mer	T	13222.6	-	-	-	13282
44-mer	G	13551.8	-	-	13589	-
45-mer	C	13841.0	-	13878	-	-
46-mer	C	14130.2	-	14179	-	-
47-mer	A	14443.4	14481	-	-	-
48-mer	G	14772.6	14798	14801	14801	14821
[M+H] ⁺						

11.1.2 Reverse Sanger Sequenzierung mit α -Thio-dNTPs (Terminatoren) und modifizierten dNTPs zum Massenausgleich

A) Fragmentmassen der Sequenzleitern des biotinylierten Stranges

Fragment	Sequenz (5' → 3')	C-Reaktion berechnet	C-Reaktion gemessen (50 % 5-OH-dCTP)	T-Reaktion berechnet	T-Reaktion gemessen (50 % 2-S-dTTP)
5'-bio-F48 (19-mer)		6218.8		6218.8	
20-mer	T	6523.0	-	6539.0	6548
21-mer	A	6836.2	-	6852.2	-
22-mer	T	7140.4	-	7172.4	7185
23-mer	C	7445.6	7450	7461.6	-
24-mer	A	7758.8	-	7774.8	-
25-mer	T	8063.0	-	8095.0	8106
26-mer	C	8368.2	8373	8384.2	-
27-mer	T	8672.4	-	8704.4	8720
28-mer	T	8976.6	-	9024.6	9042
29-mer	T	9280.8	-	9344.8	9363
30-mer	G	9610.0	-	9674.0	-
31-mer	G	9939.2	-	10003.2	-
32-mer	T	10243.4	-	10323.4	10349
33-mer	G	10576.6	-	10652.6	-
34-mer	T	10876.8	-	10972.8	11000
35-mer	T	11181.0	-	11293.0	11326
36-mer	T	11485.2	-	11613.2	11643
37-mer	C	11790.4	11798	11902.4	-
38-mer	C	12095.6	12102	12191.6	-
39-mer	T	12399.8	-	12511.8	12552
40-mer	A	12713.0	-	12825.0	-
41-mer	T	13017.2	-	13145.2	13182
42-mer	G	13346.4	-	13474.4	-
43-mer	A	13659.6	-	13787.6	-
44-mer	T	13963.8	-	14107.8	14154
45-mer	G	14293.0	-	14437.0	-
46-mer	A	14606.2	-	14750.2	-
47-mer	A	14919.4	-	15063.4	-
48-mer [M ⁺]	T	15223.6	-	15383.6	15412

B) Fragmentmassen der Sequenzleitern des nicht-biotinylierten Stranges

Fragment	Sequenz (5'→3')	C-Reaktion berechnet	C-Reaktion gemessen (50 % 2-S-dCTP)	T-Reaktion berechnet	T-Reaktion gemessen (50 % 2-S-dTTP)
R48 (19-mer)		5764.8		5764.8	
20-mer	A	6078.0	-	6078.0	-
21-mer	A	6391.2	-	6391.2	-
22-mer	A	6704.4	-	6704.4	-
23-mer	G	7033.6	-	7033.6	-
24-mer	A	7346.8	-	7346.8	-
25-mer	T	7651.0	-	7667.0	7673
26-mer	G	7980.2	-	7996.2	-
27-mer	A	8293.4	-	8309.4	-
28-mer	T	8597.6	-	8629.6	8637
29-mer	A	8910.8	-	8942.8	-
30-mer	T	9215.0	-	9263.0	9274
31-mer	T	9519.2	-	9583.2	9595
32-mer	T	9823.4	-	9903.4	9918
33-mer	T	10127.6	-	10223.6	10238
34-mer	C	10432.8	10436	10512.8	-
35-mer	T	10737.0	-	10833.0	10852
36-mer	T	11041.2	-	11153.2	11171
37-mer	T	11345.4	-	11473.4	11491
38-mer	A	11658.6	-	11786.6	-
39-mer	A	11971.8	-	12099.8	-
40-mer	T	12276.0	-	12420.0	12443
41-mer	G	12605.2	-	12749.2	-
42-mer	G	12934.4	-	13078.4	-
43-mer	T	13238.6	-	13398.6	13421
44-mer	G	13567.8	-	13727.8	-
45-mer	C	13873.0	13881	14017.0	-
46-mer	C	14178.2	14187	14306.2	-
47-mer	A	14491.4	-	14619.4	-
48-mer [M ⁺]	G	14820.6	14829	14948.6	14980

11.1.2 Massen aller verwendeten DNA-Bausteine:

	Adenin	Cytosin	Guanin	Thymin
Nucleobase	135.0	111.0	151.0	126.0
Nucleotid	313.2	289.2	329.2	304.2
α-Thio-Nucleotid	329.2	305.2	345.2	320.2
massenmodifiziertes Nucleotid	—	305.2	—	320.2

11.2 Gefahrstoffanhang

11.2.1 Liste der verwendeten Gefahrstoffe

Stoffbezeichnung	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	22-23/24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
2-Propanol	F	11	7-16
3-Hydroxypicolinsäure	-	36/37/38	26-37/39
Aceton	F	11	9-17-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acrylamid	T	45-46-24/25-48/23/24/25	53-45
Ammoniaklösung, 32 %	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36-37
Essigsäure (100 %)	C	10-35	23.2-26-45
Ethidiumbromid	T ⁺	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Ethylacetat	F	11	16-23.2-29-33
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Methanol	F, T	11-23/25	7-16-24-45
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	F, Xn	11-20/22-37/38-41	16-26-39
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumhydroxid	C	35	7/8-26
Natriumsulfat			
n-Hexan	Xn, F, N	11-38-48/20-51/53-62-65	9-16-29-33-36/37-61-62
Petrolether 60-70°	F	11	9-16-29-33
Phosphorylchlorid	C	34-37	7/8-26-45
p-Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26-37
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Tetrahydrofuran	Xi, F	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	F, Xn	11	16-25-29-33
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Triton X-100	Xn	22-41	24-26-39

11.2.2 Entsorgungshinweise

Organische halogenfreie bzw. halogenhaltige Lösungsmittel wurden ebenso wie schwermetallhaltige Lösungen und Feststoffe in gesonderte Sammelbehälter gegeben. Saure bzw. alkalische Lösungen wurden neutralisiert und entsprechend der Lösungsmittelart entsorgt.

Ethidiumbromidhaltige Abfallstoffe wurden gesondert gesammelt.

12 Literaturverzeichnis

- [1] International Human Genome Sequencing Consortium
Nature, **409** (2001) 860-921
Initial sequencing and analysis of the human genome
- [2] J. C. Venter et al.
Science **291** (2001) 1304-1351
The sequence of the human genome
- [3] I. Dunham, N. Shimizu, B. A. Roe, S. Chisoe et al.
Nature, **402** (1999) 489.
The DNA sequence of human chromosome 22
- [4] V.A. McKusick
Genomics **5** (1989) 385-387
HUGO news. The Human Genom Organization: history, purposes and membership
- [5] C.R. Cantor
Science **248** (1990) 49-51
Orchestrating the Human Genome Projekt
- [6] Robert Shapiro
Der Bauplan des Menschen: Das Genom-Projekt
Scherz-Verlag, Bern, München 1992.
- [7] E. Marshall
Science, **290** (2000) 2042-2043
Storm erupts over terms for publishing Celera's sequence
- [8] Im Internet unter: <http://gdbwww.gdb.org>
- [9] D.N. Cooper, M. Krawczak
Human Genome Mutations
BIOS Scientific Publishers 1993
- [10] L. Stryer
Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1990) 169-176
- [11] A.E. Amery
Duchenne Muscular Dystrophie
Oxford University Press, Oxford, England 1988
- [12] B.S. Kerem, J.M. Rommens, J.A. Buchanan et al.
Science **245** (1989) 1073-1080
Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis

- [13] B.S. Wilford, N. Fost
J. Am. Med. Assoc. **263** (1990) 2777-2783
The cystic fibrosis gene: Medical and social implications for heterozygote detection
- [14] K. Ishikawa, G. Tsujimoto
Nippon Yakurigaku Zasshi **118/3** (2001) 170-176
New Strategies on medical research after completion of genome sequencing
- [15] W.C.O Cookson
74th Annual Meeting of Japanese Pharmacological Society
Asthma and atopic dermatitis: models for genetic and genomic investigations of complex genetic diseases.
- [16] M. Gannon
Trends Genet. **17/10** (2001) 23-28
Molecular genetic analysis of diabetes in mice
- [17] P.H. St. George-Hyskop et al.
Nature **347** (1990) 194-197
Genetic linkage studies suggest that Alzheimer`s disease is not a single homogeneous disorder
- [18] William Cookson
Die Jagd nach den Genen
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1996
- [19] Huub Schellekens u. a.
Ingenieure des Lebens: DNA-Moleküle und Gentechniker
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1994.
- [20] F.S. Collins, A.Patrinou, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland and L. Walters
Science **282** (1998) 682
New Goals for the U.S. Human Genome Projekt: 1998-2003
- [21] P. Lowrie, S. Wells
Genetic Fingerprints
New Scientist, Science Supplement (1991) 1.
- [22] J.S. Thompson, M.W. Thompson
Genetics in Medicine
W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA 1991
- [23] J.G. Ballantyne, J.A.Sensabaugh, A. Witkowski
DNA Technology and Forensic Science
Banbury Report **32** (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- [24] R. Mestel
New Scientist (1993) 6
Murder Trial Features Tree`s Genetic Fingerprint
- [25] D. Pringle
New Scientist (1994) 51
Who`s the DNA Fingerprinting Pointing at?

- [26] C.Y. Ou et al.
Science **239** (1988) 295-297
DNA amplification for the direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells
- [27] A. Bisson-Noel et al.
The Lancet, ii (1989) 1069-1071
Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of myobacterial DNA in clinical samples
- [28] T.J. Priestman
Cancer Chemotherapy
Springer Verlag, Berlin 1989
- [29] Michael Stratton
Nature **409** (2001) 850
Cancer and genomics
- [30] J.H. Jett et al.
J. Biomol. Struct. and Dynamics (1989) 301-309
High-Speed DNA sequencing: an approach based upon fluorescent detection of single molecules
- [31] G.L. Trainor
Anal. Chem. **62** (1990) 418
DNA Sequencing, Automation, and the Human Genome
- [32] H. Köster, S. Beck, J.M. Coull, T. Dunne, B. Gildea, C. Kissinger and T. O`Keeffe
Nucleic Acids Res., Symposium Ser. **24** (1991) 318-322
Oligonucleotide synthesis and multiplex DNA sequencing using chemiluminescent detection
- [33] R. Frank, H. Köster
Nucleic Acids Res. **6/6** (1979) 2069-2087
DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamid-gels
- [34] S. Beck, T. O`Keeffe, J.M. Coull, T and H. Köster
Nucleic Acids Res. **17** (1989) 5115-5123
Chemilumineszent detection of DNA: application for DNA sequencing and hybridisation
- [35] R. Drmanac, S. Drmanac, Z. Strezoska, T. Paunesku, I. Labat, M. Zeremski et al.
Science **260** (1993) 1649-1652
DNA Sequence Determination by Hybridisation: A Strategy for Efficient Large-Scale Sequencing
- [36] N.E. Broude, T. Sano, C.L. Smith and C.R. Cantor
Proc. Acad. Natl. Sci. USA **91** (1994) 3072-3076
Enhanced DNA sequencing by hybridisation
- [37] M.J. O`Donnell-Maloney, D.P. Little
Genetic Analysis **13** (1996) 151-157
Microfabrication and array technologies for DNA sequencing and diagnostics
- [38] K. Biemann, J.A. McCloskey
J. Am. Chem. Soc. **84** (1962) 2005-2007
Application of mass spectrometry to structure problems. VI. Nucleosides.

- [39] J.A. McCloskey, P.F. Crain
Methods Enzymol. **193** (1990) 771-781
Constituents of nucleic acids: overview and strategy
- [40] P.F. Crain
Mass Spectrom. Rev. **9** (1990) 505-554
Mass spectrometric techniques in nucleic acids research
- [41] J.A. McCloskey, P.F. Crain
Int. J. Mass Spectrom., Ion Proc. **118/119** (1992) 593-615
Progress in mass spectrometry of nucleic acid constituents: analysis of xenobiotic modifications and measurements at high mass.
- [42] H. Feld, A. Leute, R. Zurmühlen, A. Benninghoven
Anal. Chem. **63** (1991) 903
Comparative and Complementary Plasma Desorption Mass Spectrometry/Secondary Ion Mass Spectrometry: Investigations of Polymer Materials
- [43] H.D. Beckey
Int. J. Mass Spectrom., Ion Phys. **2** (1969) 500
Chemical Reactions under the influence of extremely high electrical fields
- [44] R.P. Lattimer, H.R. Schulten
Int. J. Mass Spectrom., Ion Phys. **67** (1985) 227
- [45] R.P. Lattimer
Int. J. Mass Spectrom., Ion Phys. **55** (1983) 221
- [46] L. Grotjahn, R. Frank, H. Blöcker
Nucleic Acids Res. **10** (1982) 4671-4678
Ultrafast sequencing of oligodeoxyribonucleotides by FAB-mass spectrometry
- [47] L. Grotjahn, H. Blöcker, R. Frank
Biomed. Mass Spectrom. **12** (1985) 514-524
Mass spectroscopic sequence analysis of oligonucleotides
- [48] T. Matsuo, T. Sakurai, H. Matsuda, M. Matsugi, M. Ikehara, T. Kobayashi, Y. Kammei, E. Kubota
Proceedings of the 34th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, ASMS, Cincinnati, Ohio (1986)
Characterisation of oligoribonucleotides up to 24 mer (M/z 13726) by sector type mass spectrometer
- [49] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse
Science **246** (1989) 64-71
Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules
- [50] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp
Anal. Chem. **57** (1985) 2935-2939
Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry
- [51] M. Karas, F. Hillenkamp
Anal. Chem. **60** (1988) 2299-2301
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons

- [52] P.F. Crain
Electrospray ionization mass spectrometry of nucleic acids and their constituents
Electrospray Ionization Mass Spectrometry, R.B. Cole ed., John Wiley & Sons, 421-457 (1997)
- [53] P.F. Crain
Characterization of oligonucleotides by electrospray mass spectrometry
Mass Spectrometry of biological Materials, edited by B.S. Larsen, C.N. McEwen, 389-404 (1998).
- [54] E. Nordhoff
Trends Anal. Chem. **15** (1996) 240-250
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry as a new method for the characterization of nucleic acids
- [55] E. Nordhoff, F. Kirpekar, P. Roepstorff
Mass Spectrom. Rev. **15** (1996) 67-138
Mass Spectrometry of Nucleic acids
- [56] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp
Anal. Chim. Acta **241** (1991) 175-185
Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry
- [57] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida
Rapid Commun. Mass Spectrom. **2** (1988) 151-153
- [58] M. Karas, U. Giessmann
Labor 2000 (1992) 71-83
- [59] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp
Org. Mass Spectrom. **27** (1992) 472-479
Role of photoionization and photochemistry in ionization process of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- [60] R. Knochenmuss, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi
Rapid Commun. Mass Spectrom. **10** (1996) 871-877
The matrix suppression effect and ionization mechanism in matrix-assisted laser desorption/ionization
- [61] M. Karas, M. Gluckmann, J. Schafer
J. Am. Soc. Mass Spectrom. **35** (2000) 1-12
Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors
- [62] R.J. Cotter
Anal. Chem. **64** (1992) 1027
Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules
- [63] W.C. Wiley, I.H. McLaren
Rev. Sci. Instrum. **26** (1955) 1150
Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution

- [64] U. Pieleles, W. Zürcher, M. Schär, H.W. Moser
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 3191
 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides
- [65] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp
 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry
Int. J. Mass Spectrom., Ion Proc. **111** (1991) 89.
- [66] K. Tang, N.I. Taranenko, S. Allman, C.H. Chen, L.Y. Chang, K. Jakobson
Rapid Commun. Mass Spectrom. **8** (1994) 673-677
 Picolinic acid as a matrix for laser mass spectrometry of nucleic acids and proteins
- [67] K.J. Wu, A. Steding, C.H. Becker
Rapid Commun. Mass Spectrom. **7** (1993) 142-146
 matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix
- [68] E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristiansen, P. Roepstorff
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 3347-3357
 Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- [69] C.W. Siegert, A. Jacob, H. Köster
Anal. Biochem **243** (1996) 55-65
 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Polymerase Chain Reaction Products Containing 7-Deazapurine Moieties
- [70] Silke Atrott,
 Dissertation 2001, Universität Hamburg
 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin: Ein optimierter Baustein für die MALDI-TOF Massenspektrometrie und biochemische DNA-Analytik
- [71] J. Gross, K. Strupat
Trends Anal. Chem. **17** (1998) 470-484
 Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) applied to biological macromolecules
- [72] E.J. Takach, W.M. Hines et al.
J. Protein Chem. **16/5** (1997) 363-369
 Accurate mass measurements using MALDI-TOF with delayed extraction
- [73] K. Tang, S.L. Allmann, C.H. Chen
Rapid Commun. Mass Spectrom. **6** (1992) 365-368
 Mass spectrometry of laser-desorbed oligonucleotides
- [74] K. Tang, N.I. Taranenko, S.L. Allmann, L.Y. Chang, C.H. Chen
Rapid Commun. Mass Spectrom. **8** (1994) 727-730
 Detection of 500-nucleotide DNA by laser desorption mass spectrometry

- [75] K.J. Wu, T.A. Shaler, C.H. Becker
Anal. Chem. **66** (1994) 1637-1645
Time-of-flight mass spectrometry of underivatized single-stranded DNA-oligomers by matrix-assisted laser desorption
- [76] C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, A. Jacob, J. Kirchhübel, A. Lüchow, D. v. d. Boom, R. Laufs, H. Köster
Genet. Anal. **13** (1996) 67-71
Detection of hepatitis B virus DNA in serum samples via nested PCR and MALDI-TOF mass Spectrometry
- [77] C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, D. v. d. Boom, A. Jacob, S. Polywka, R. Laufs, H. Köster
Genet. Anal. **14** (1998) 97-102
Application of nested PCR and mass spectrometry for DNA-based virus detection: HBV-DNA detected in the majority of isolated anti-BHc positive sera
- [78] C. Jurinke, D. v. d. Boom, A. Jacob, K. Tang, R. Wörl, H. Köster
Anal. Biochem. **237** (1996) 174
Analysis of Ligase Chain Reaction Products via Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight-Mass Spectrometry
- [79] L.A. Haff, I.P. Smirnov
Genome Res. **7** (1997) 378-388
Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry
- [80] A. Braun, D.P. Little, H. Köster
Clin. Chem. **43** (1997) 1151-1158
Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extension and mass spectrometry
- [81] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson
Proc. Natl. Acad. Sci. **74** (1977) 560-564
DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors
- [82] D.P. Little, T.J. Cornish, M.J. O'Donnel, A. Brown, R.J. Cotter, H. Köster
Anal. Chem. **69** (1997) 4540-4546
MALDI on a chip: analysis of arrays of low-femtomole to subfemtomole quantities of synthetic and DNA diagnostic products dispensed by a piezoelectric pipet
- [83] D.P. Little, A. Brown, M.J. O'Donnel, H. Köster
Nature Med. **3** (1997) 1413-1416
Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis
- [84] D.P. Little, G.S. Higgins, H. Köster
BioTechniques **23** (1997) 710
Competitive oligonucleotide single-base extension combined with mass spectrometric detection for mutation screening
- [85] F. Sanger
Annu. Rev. Biochem. **57** (1988) 1-28
sequences, sequences and sequences

- [86] M.A. Innis et al.
Proc. Natl. Acad. Sci. **85** (1988) 9436-9440
DNA Sequencing with *Thermus Aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA
- [87] B. Spengler
J. Mass. Spectrom. **32** (1997) 1019-1063
Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules
- [88] E. Nordhoff, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, F. Kirpekar et al.
J. Mass. Spectrom. **30** (1995) 99-112
Direct mass spectrometric sequencing of low-picomole amounts of oligodeoxynucleotides with up to 21 bases by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- [89] C. Jurinke, D. v. d. Boom, V. Collazo, A. Lüchow, A. Jacob, H. Köster
Anal. Chem. **69** (1997) 904-910
Recovery of Nucleic Acids from Immobilized Biotin-Streptavidin Complexes Using Ammonium Hydroxide and Applications in MALDI-TOF Mass Spectrometry
- [90] H. Köster, D. v. d. Boom, A. Braun, A. Jacob, C. Jurinke, D.P. Little, K. Tang
Nucleosides & Nucleotides **16** (1997) 563
- [91] Verena Collazo
Diplomarbeit 1996, Universität Hamburg
Untersuchungen zum Einsatz von Endonucleasen in der DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie
- [92] Carsten Siegert
Dissertation 1999, Universität Hamburg
Chemische und enzymatische Synthese modifizierter Nukleinsäuren für die Analytik mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie
- [93] M.C. Fitzgerald, L. Zhu, L.M. Smith
Rapid Commun. Mass Spectrom. **7** (1993) 895-897
The analysis of mock DNA sequencing reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- [94] K. Tang, D.J. Fu, S. Kötter, R.J. Cotter, H. Köster
Nucleic Acids Res. **23** (1995) 3126-3131
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized DNA-Duplex probes
- [95] S. Labeit, H. Lehrach, R.S. Goody
DNA **5** (1986) 173-177
A new Method of DNA sequencing using deoxynucleoside α -thiotriphosphates
- [96] D. B. Ohlsen, G. Wunderlich, A. Uy, F. Eckstein
Methods in Enzymology: Recombinant DNA **21**, 79-92
Academic Press, New York (1993).
- [97] Julia Groß
Dissertation 2000, Universität Münster
Analysis of Nucleic Acids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Fragmentation Mechanisms and Development of Ribonucleic Acid Sequencing

- [98] F. Eckstein
Ann. Rev. Biochem. **54** (1985) 367-402
Nucleoside Phosphorothioates
- [99] D. v. d. Boom
Diplomarbeit 1995, Universität Hamburg
Untersuchungen zur Anwendung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf die
DNA-Sequenzanalyse
- [100] C. Le Marechal, M. P. Audrezet et al.
Hum. Genet. **108** (2001) 290-298
Complete and rapid sequencing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)
gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for
genetic counselling
- [101] X. Tang, L. M. Smith
Anal. Chem., **64** (1992) 2672-2677
Solid-Phase Method for the Purification of DNA Sequencing Reactions
- [102] C. Jurinke, D. van den Boom, H. Köster
Rapid Commun. Mass Spectrom., **12** (1998) 50
- [103] C. Cocuzza et al.
United States Patent 1992, Ser. No. 05/484, 701
- [104] C. Jurinke, D. van den Boom, H. Köster
US Patent Application 1996, Ser. No. 08/649, 876
A Method for Dissociating Biotin Complexes
- [105] Fa. Perseptive Biosystems
Seminar: *Molekulare Lebensmittelanalytik*, Hamburg, 1999
- [106] E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas,
F. Hillenkamp, P. F. Crain
Rapid Commun. Mass. Spectrom., **6** (1992) 771-776
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in
the ultraviolet and infrared.
- [107] Z. G. Chidgeavadze et al.
Nucleic Acids Res., **12** (1984) 1671
2'-3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalysed
by DNA polymerases
- [108] Z. G. Chidgeavadze et al.
FEBS Letters, **183** (1985) 275
3'-Fluoro-2',3'-dideoxyribonucleoside 5'-triphosphates: terminators of DNA synthesis
- [109] M. Metzger, R. Raghavachari, S. Richards, S. E. Jacutin, A. Civitello, K. Burgess,
R. A. Gibbs
Nucleic Acids Res., **22** (1994) 4259

- [110] R. L. Letsinger, J. S. Wilkes, L. B. Dumas
Biochemistry, **15** (1976) 2810-2816
Incorporation of 5'-Amino-5'-deoxythymidine 5'-Phosphate in Polynucleotides by Use of DNA Polymerase I and a ϕ X174 DNA Template
- [111] G. A. Freeman, J. L. Rideout, W. H. Miller, J. E. Reardon
J. Med. Chem., **35** (1992) 3192-3196
3'-Azido-3',5'-dideoxythymidine-5'-methyl phosphonic acid Diphosphate: Synthesis and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibition
- [112] K. H. Scheit, A. J. Stütz
Carbohydrate Nucleoside Nucleotide, **1** (1974) 485-490
- [113] A. J. Stütz, K. H. Scheit
Eur. J. Biochem., **50** (1975) 343-349
Properties of ATP and UTP analogues with P-S-C-5' bonds.
- [114] D. H. Rammner, L. Yengoyan, A. V. Paul, P. C. Bax
Biochemistry, **6** (1967) 1828-1837
Nucleoside Phosphonic Acids. II. The Synthesis of 5'-Deoxythymidine 5'-Phosphonic Acid and its Pyrophosphate Derivatives
- [115] D. M. Coe, S. M. Roberts, R. Storer
J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, **9** (1992) 2659-2704
- [116] T. Y. Kileso, N. B. Tarusova, E. D. Atrazheva, M. K. Kukanova, S. V. Shulenin, A. F. Bobkov et al.
Bioorg. Khim., **16** (1990) 530-536
- [117] E. A. Shirokova, A. V. Shipitsyn, E. V. Kuznetsova, L. S. Viktorova, A. A. Kraevskii
Russ. J. Biorg. Chem., **19**(12), (1993) 736-741
5'-S-Nucleoside Triphosphates. Synthesis and Substrate Properties in Tests with DNA Polymerases
- [118] E. J. Reist, D. E. Gueffroy, L. Goodman
J. Am. Chem. Soc., **86** (1964) 5658-5663
Synthesis of 4-thio-D- and L-ribofuranose and the corresponding adenine nucleosides.
- [119] E. J. Reist, L. V. Fisher, L. Goodman
J. Org. Chem., **33** (1968) 189-192
Thio Sugars. Synthesis of the Adenine Nucleosides of 4-thio-D-xylose and 4-thio-D-arabinose.
- [120] M. Bobek, R. L. Whistler, A. Bloch
J. Med. Chem., **18** (1970) 411-413
Preparation and activity of the 4'-thio derivatives of some 6-substituted purine nucleosides.
- [121] J. A. Secrist, R. M. Riggs, K. N. Tiwari, J. Montgomery
J. Med. Chem., **35** (1992) 533-538
Synthesis and anti-HIV activity of 4'-thio-2',3'-dideoxynucleosides.
- [122] M. Bobek, A. Bloch, R. Parthasarathy, R. L. Whistler
J. Med. Chem., **18** (1975) 784-787
Synthesis and biological activity of 5-fluoro-4'-thiouridine and some related nucleosides.

- [123] L. A. Alexandrova, D. G. Semizarov, A. A. Krayevsky, R. T. Walker
Antiviral Chemistry & Chemotherapy, **7** (1996) 237-242
4'-Thio-5-ethyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (TEDUTP): synthesis and substrate properties in DNA-synthesizing systems.
- [124] S. Moran, R. X.-F. Ren, E. T. Kool
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94** (1997) 10506-10511
A thymidine triphosphate shape analogue lacking watson-crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity
- [125] J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. C. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco Jr.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85** (1988) 6252-6556
Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity
- [126] J. Petruska, M. F. Goodman
J. Biol. Chem., **270** (1995) 746-750
Enthalpy-entropy compensation in DNA melting thermodynamics
- [127] S. Shigeta, S. Mori, T. Kira, K. Takahashi et al.
Antivir. Chem. Chemother., **10** (1999) 195-209
Anti-herpesvirus activities and cytotoxicities of 2-thiopyrimidine nucleoside analogues in vitro
- [128] A. A. Purmal, Y. W. Kow, S. S. Wallace
Nucleic Acids Res., **22** (1994) 72-78
Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro
- [129] B. G. Huang, Y. Z. Hui
Chinese Science Bull., **38** (1992) 1177-1180
The Chemical Synthesis of 4'-Thio-2'-deoxythymidine-5'-triphosphate and its Effects on DNA synthesis
- [130] O. Mitsunobu
Synthesis, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1981, 1-21
The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products
- [131] O. Mitsunobu, J. Kimura, Y. Fujisawa
Bull. Chem. Soc. Jpn., **45** (1972) 245
- [132] R. P. Volante
Tetrahedr. Lett., **22** (1981) 33, 3119-3122
A New, Highly Efficient Method for the Conversion of Alcohols to Thioesters and Thiols
- [133] E. A. Shirokova
Bioorganicheskaya Khimiya, **19** (1993) 1226-1233
- [134] Susanne Jahneke, Diplomarbeit, Universität Hamburg 1992
- [135] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi
Tetrahedron Lett., **50** (1967) 5065-5068
A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides

- [136] D. E. Hoard, D. G. Ott
J. Am. Chem. Soc., **87** (1965) 1785-1788
Conversion of Mono- and Oligodeoxyribonucleotides to 5'-Triphosphates
- [137] V. Kohli, H. Blöcker, H. Köster
Tetrahedron Lett., **21** (1980) 501-502
Phosphorylation of Nucleosides Using Molecular Sieves as Acid Scavengers
- [138] B. K. Patel, F. Eckstein
Tetrahedron Lett., **38** (1997) 1021-1024
5'-Deoxy-5'-thioribonucleosid-5'-triphosphates
- [139] M.J. Lutz, H.A. Held, M. Hottiger, U. Hübscher, S.A. Benner
Nucleic Acids Res., **24** (1996) 1308-1313
Differential Discrimination of DNA Polymerases for Variants of the Non-Standard Nucleobase Pair Between Xanthosine and 2,4-Diaminopyridine, Two Compounds of an Expanded genetic Alphabet
- [140] M.J. Lutz, J. Horlacher, S.A. Benner
Bioorg. & Med. Chem. Let., **8** (1998) 1149-1152
Recognition of a Non-Standard Base Pair by Thermostable DNA-Polymerase
- [141] F. Marciacq, S. Sauvaigo, J.-P. Issartel, J.-F. Mourett, D. Molko
Tetrahedron Let., **40** (1999) 4673-4676
- [142] F. Hill, D. Loakes, C.L. Smith, D.M. Williams, D.M. Brown
Nucleosides & Nucleotides **18** (1999) 573-574
Synthesis and Polymerase Incorporation Properties of a Tricyclic Pyrrolopyrimidine Related to N⁶-Hydroxy-2'-desoxyadenosine
- [143] S. Lutz, P. Burgstaller, S.A. Benner
Nucleic Acids Res., **27** (1999) 2792-2798
An In Vitro Screening Technique for DNA-Polymerases that Can Incorporate Modified Nucleotides. Pseudothymidine as a Substrate for Thermostable Polymerases
- [144] Claudia Matthies
Dissertation in Vorbereitung, Universität Hamburg
- [145] D.P. Little, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, H. Köster
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **35** (1997) 545-548
Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry
- [146] D.P. Little, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, A. Frilling, Y. Li, R. Mc Iver, H. Köster
J. Mol. Med., **75** (1997) 745-750
Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using mass spectrometry
- [147] T.J. Griffin, J.G. Hall, J.R. Prudent, L.M. Smith
Proc. Acad. Natl. Sci. USA, **96** (11) (1999) 6301-6306
Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

- [148] P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. Haff
Nature Biotech., **16** (13) (1998) 1347-1351
High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry
- [149] N.I. Taranenko, N.T. Potter, S.L. Allman, V.V. Glovlev, C.H. Chen
Genet. Anal., **15** (1) (1999) 25-31
Detection of trinucleotide expansion in neurodegenerative disease by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
- [150] M.S. Bray, E. Boerwinkle, P.A. Doris
Human Mutat., **17**(4) (2001) 296-304
High throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: Practice, problems and promise.
- [151] A.J. Zoltewitz, D.F. Clark, T.W. Sharpless, G. Grahe
J. Am. Chem. Soc., **92**(6) (1970) 1741-1750
Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides
- [152] J.L. York
J. Org. Chem., **46** (1981) 2171-2173
Effect of the structure of the glycon on the acid-catalyzed hydrolysis of adenine nucleosides
- [153] T. Ono, M. Scalf, L.M. Smith
Rapid Commun. Mass Spectrom., **9** (1995) 4581-4588
2'-Fluoro modified nucleic acids: polymerase-directed synthesis, properties and stability to analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- [154] K.C. Hung, H. Rashidzadeh, Y. Wang, B. Guo
Anal. Chem., **70** (14) (1998) 3088-3093
Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA
- [155] K.C. Hung, H. Ding, B. Guo
Anal. Chem., **71** (2) (1999) 518-521
Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA
- [156] P. Onnerfjord, J. Nilsson, L. Wallman, T. Laurell, G. Marko-Varga
Anal. Chem., **70** (22) (1998) 4755-4760
Picoliter sample Preparation in MALDI-TOF MS using a micromachined silicon flow-through dispenser
- [157] I.D. Figueroa, O. Torres, D.H. Russell
Anal. Chem., **70** (1998) 4527-4533
Effects of the water content in the sample preparation for MALDI on the mass spectra
- [158] T. Yalcin, Y. Dai, L. Li
J. Am. Soc. Mass. Spectrom., **9**(12) (1998) 1303-1310
Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: Solvent effect in sample preparation
- [159] U.T. Bornscheuer
Angew. Chem., **110** (1998) 3285-3288
Gerichtete Evolution von Enzymen

- [160] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, 2. Aufl. 1989, Kap. 6.39ff
- [161] E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman
J. Chem. Soc., **29** (1964) 554-559
The synthesis of some 5'-Thiopentofuranosylpyrimidines

Danksagungen

Herrn *Professor Dr. H. Köster* danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, seine motivierende Unterstützung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitgliedern unseres stetig „schrumpfenden“ Arbeitskreises möchte ich für die Jahre danken, die ich mit Ihnen in einer angenehmen Atmosphäre verbringen durfte.

Insbesondere gilt mein Dank Frau *Dr. Ute Haker* für ihre Freundschaft und ihren Tatendrang, der besonders zu Zeiten des Arbeitsquadrats wegen anstehender Räumarbeiten gefordert war. Frau *Dr. Silke Atrott* danke ich für ihre Solidarität in den einsamen Zeiten des Arbeitsdreiecks. Frau *Dipl. Chem. Claudia Matthies* sorgte dafür, dass es auch in Zeiten der Arbeitslinie nicht langweilig wurde. Ich wünsche ihr, dass die Phase als verbliebener Arbeitspunkt nun nicht mehr lange andauern wird! Herrn *Dr. Joachim Roesecke* danke ich für Gespräche über NMR, die Übernahme des Kaffeedienstes und die Unterbrechung der Einsamkeit im 4. Stock, links. Allen hier nicht erwähnten „Ehemaligen“ sei vor allem für die freundliche Überlassung der Altlasten gedankt.

Den Mitarbeitern der Firma Sequenom danke ich für die freundliche Aufnahme. Mein Dank gilt hier vor allem Herrn *Dr. Andreas Ruppert* für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und seine generelle Unterstützung und Herrn *Dr. Dirk van den Boom* für MALDI-Messungen in früheren Zeiten. Frau *Beata Szalay*, Frau *Julia Clemens* sowie Frau *Gabi Sperling* ertrugen klaglos die ständigen Fragen Wo ist ...? und Wie geht ...?, versorgten mich mit allem Notwendigem und sorgten vor allem für eine stets gute Stimmung.

Herrn *Dipl. Chem. Torsten Kähler* danke ich für seine Mitarbeit als „SP“, seine Freundschaft und vor allem für seinen unerschöpflichen Sprüchevorrat, ohne den das Leben langweiliger wäre. Bei Frau *Dr. Carola Schulzke* möchte ich mich ebenfalls für ihre Freundschaft bedanken.

Ganz sicher nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und meine „Gehirnkapazität“ und vor allem meinem Mann *Dr. Cesar Collazo* für sein Durchhaltevermögen, seine strapazierte Geduld, seine Unterstützung und natürlich dafür, dass er sein Leben mit mir teilt!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Verena Collazo, geb. Stresing
Geburtsdatum: 04. Mai 1970
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

Aug. 1976 – Juni 1980 Grundschole Wiesenhof in Wilhelmshaven
Aug. 1980 – Juni 1982 Orientierungsstufe Altengroden in Wilhelmshaven
Aug. 1982 – Juni 1989 Humboldt-Gymnasium in Wilhelmshaven
Mai 1989 Erlangung der „Allgemeinen Hochschulreife“ (Abitur)

Hochschulstudium

Okt. 1989 Immatrikulation an der Universität Hamburg für den Studiengang „Diplom-Chemie“
Aug. 1992 Diplomvorprüfung
Jan. 1993 – Dez. 1993 Aufenthalt als „Monbusho“-Stipendiat an der Universität von Tokyo in Japan, dabei eine Veröffentlichung in der Zeitschrift „Heteroatom Chemistry“
Jan. 1996 Diplomhauptprüfung
Feb. 1996 – Okt. 1996 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. H. Köster, dabei eine Veröffentlichung in der Zeitschrift „Analytical Chemistry“

Promotionsstudium

Januar 1997 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. H. Köster

Promotionsstellen

Nov. 1996 – März 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Praktikum „Organische Chemie für Biochemiker“
April 2000 – Dez. 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des vom BMBF geförderten Projektes „Entwicklungen zum Einsatz der MALDI-TOF MS in der genomischen Analyse und Diagnostik“

Hiermit erkläre ich, Verena Collazo, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Andere Promotionsversuche als die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel „Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie“ habe ich bisher nicht unternommen.

Hamburg, November 2001

Verena Collazo