

## 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  $\alpha$ -S-Terminator sowie ein weiteres Analogon ersetzt werden, dessen Molekulargewicht dem seines  $\alpha$ -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<sup>[117]</sup>, 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  $\alpha$ -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.