

IV Zusammenfassung

Massenspektrometrie ist eine anerkannte Methode zur Bestimmung der Molmasse von organischen Verbindungen. Mit neuen schonenden Ionisierungsmethoden (soft-ionization) wie z.B. der Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) gelingt die Massenbestimmung von labilen, hochmolekularen Biomolekülen. Diese universell einsetzbare Technik stößt allerdings bei der Analytik von Desoxyribonukleinsäuren noch immer schnell an ihre Grenzen. Durch die Verwendung organischer Säuren sowie durch intramolekularen Protonentransfer kommt es während des MALDI-Vorgangs zu einer Spaltung der säurelabilen Bindungen, insbesondere der Purinnukleotide. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit den Auswirkungen der chemischen Modifikation eines Oligonukleotides auf seine Stabilität unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS. Hierzu wurden die sich ergänzenden Konzepte der festphasengebunden chemischen und der enzymatischen Synthese modifizierter Nukleinsäuren verfolgt.

Da 7-Deazapurindesoxynukleosidtriphosphate im Handel erhältlich waren, wurde zunächst mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) versucht, den enzymatischen Zugang zu höhermolekularen Nukleinsäuren zu ermöglichen. Es konnten tatsächlich für eine Reihe von DNA-Polymerasen geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, um modifizierte doppelsträngige DNA mit mehr als 600 Basenpaaren darzustellen. Durch die Verwendung ³²P-markierter Primer wurde die Effizienz des Einbaus der modifizierten Nukleosidtriphosphate bei verschiedenen Primer-Template-Systemen und durch unterschiedliche Enzyme untersucht. Diese durch den Einbau modifizierter Purintriphosphate dargestellten Nukleinsäuren zeigten unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie bereits eine deutlich Steigerung der Nachweisempfindlichkeit und deutlich reduzierte Fragmentierung. Es gelang, die Signale der beiden Einzelstränge einer modifizierten 99-mer DNA aufzulösen und ihre Massen mit einer Genauigkeit von 0.1 % zuzuordnen. Für eine 103-mer Nukleinsäure wurde bei einer gegenüber dem unmodifizierteren PCR-Produkt verdreifachten Auflösung eine Massenauflösung von 0.01% erzielt.

Die Purinnukleoside der in der PCR verwendeten unmodifizierten Primer stellten weiter eine Quelle der Fragmentierung dar. Um diesen Nachteil zu überwinden, der sich v.a. bei kürzeren PCR-Produkten auswirkt, wurde zunächst der Ansatz der Einfügung einer chemischen Sollbruchstelle zwischen Primer und Verlängerungsprodukt durch den Einsatz von Primern, die ein basenlabiles Ribonukleotid enthielten, verfolgt.

Durch Einwirkung von NaOH gelang die Abspaltung des Primers aus dem PCR-Produkt und somit der Zugang zu vollständig purinmodifizierten DNA-Fragmenten.

Um modifizierte Nukleinsäuren beliebiger Sequenz und auch purinmodifizierte PCR-Primer synthetisieren zu können, beschäftigte sich der folgende Teil der Arbeit mit der chemischen Nukleosidsynthese. Als modifizierte Bausteine für die chemische Festphasensynthese wurden in konvergenter Totalsynthese die 7-deazapurinmodifizierten Amidite 4-(Benzoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)-(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin und 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl}pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on dargestellt. Hierbei wurden verschiedene in der Literatur vorgeschlagene Wege zur Darstellung von Desoxynukleosiden aus einem modifizierten Aglykon und unterschiedlichen Glykosyldonoren bezüglich ihrer Reaktionsausbeuten und der Stereoselektivität der Knüpfung der N-glykosidischen Bindung miteinander verglichen und weiter optimiert. Mit Hilfe der modifizierten Amidite wurden verschiedene homo- und heteropolymere Nukleinsäuren bis zu einer Länge von 100 Basenpaaren dargestellt. Derart modifizierte Oligonukleotide erwiesen sich als Primer in Kombination mit entsprechend modifizierten Nukleosidtriphosphaten zu etablierten enzymatischen Reaktionen als kompatibel und für die massenspektrometrische PCR-Analytik und DNA-Sequenzierung einsetzbar.

Die 7-Deaza-Modifikation führte zu deutlichen Vorteilen bei der massenspektrometrischen DNA-Analytik, indem Signalintensität, Auflösungsvermögen und Reproduzierbarkeit der aufgenommenen Spektren erheblich gesteigert wurden. So war es erstmals möglich, DNA-Einzelstränge mit einer Länge von bis zu 315 Basenpaaren und Multimere von Einzelsträngen bis zu einer Länge von 660 Basenpaaren zu detektieren. Die Kombination von Nukleobasen- und Zuckermofifikation bewirkte, daß synthetische Oligodesoxynukleotide, die sowohl 7-Deazapurinbasen als auch 2'-Fluorocytidin enthielten, unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie überhaupt nicht mehr fragmentierten. Die kombinierte Anwendung dieser unterschiedlichen Methoden der chemischen Modifikation von DNA kann in Zukunft zu einer weiteren Steigerung der Bedeutung der Massenspektrometrie in der DNA-Analytik führen.

V Summary

Mass spectrometry is a well established method to determine the molecular weights of organic compounds. Soft ionization procedures like Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) made labile biopolymers of high molecular weights for the first time accessible to mass spectrometric investigation. Unfortunately, the applicability of this highly versatile method is still limited, when measuring oligodeoxynucleic acids. Both the need to use organic acids as matrices as well as intramolecular proton transfer mechanisms that occur during the MALDI process result in a cleavage of the acid-labile N-glycosylic bonds, especially of those in purine nucleotides. Therefore, the effects of chemical modification of nucleic acids to their behaviour under the conditions of MALDI-TOF-MS were investigated. Different concepts were followed, employing solid phase and enzymatic synthesis of modified nucleic acids.

As N⁷-deazapurine modified nucleoside triphosphates were commercially available, it was first tried out to make use of the polymerase chain reaction (PCR) to get access to larger nucleic acids. Indeed, in this study conditions could be found for a series of different DNA-polymerases to synthesize modified double stranded nucleic acids up to 600 base pairs in length. ³²Phosphorous labelled primers were used to investigate the effectiveness of the incorporation of such modified purine nucleoside triphosphates when using different enzymes and primer-template-systems. Nucleic acids that were synthesized by the incorporation of N⁷-deazapurine modified nucleoside-triphosphates already showed increased signal sensitivity and drastically reduced fragmentation during the MALDI process. Due to the increased mass resolution it was possible to resolve the signals of the two single-strands of a double-stranded 99-mer nucleic acid and to assign their masses with an accuracy of 0.1 %. A 103-mer nucleic acid showed a threefold increase in mass resolution compared to the unmodified one. Its mass could be assigned with an accuracy of 0.01 %.

Since unmodified primers were employed during PCR, such nucleic acids still contained unmodified purinnucleotides that could provide for fragmentation during MALDI-MS. Especially for the investigation of short PCR products that consist to a high percentage of nucleotides originating from the primer sequences this disadvantage had to be overcome. One method was the introduction of a chemical cleavage site into the sequence in between primer and extension product. By the use of sodium hydroxide the primer sequences could be cleaved off the extension product resulting into a fully 7-deaza purine modified DNA fragment.

V. Summary

To get access to purine modified primers and to modified nucleic acids of any desired sequence another part of this work was on the chemical synthesis of nucleosides. As building blocks for the solid-phase synthesis of nucleic acids the 7-deazapurine modified amidites 4-(benzoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-deoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)-(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-*erythro*-pentofuranosyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine and 2-(2-methylpropanoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-deoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-*erythro*-pentofuranosyl}pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-one were synthesized. Different literature methods to synthesize deoxynucleosides from a modified aglycone and different glycosyl donors were compared and further optimized with respect to their overall yield and the stereocontrol of the formation of the N-glycosylic bond. The modified amidites were used to synthesize homo- and heteropolymeric nucleic acids with a length of up to 100 base pairs. In combination with modified nucleoside triphosphates such modified nucleic acids proved to be compatible with established enzymatic DNA chemistry and could therefore be employed in mass spectrometric PCR analysis and DNA sequencing.

The 7-deaza modification technology facilitated great advantages in mass spectrometric DNA analysis by drastically increasing signal intensity, signal resolution and reproducibility of spectra acquired from such modified nucleic acids. For the first time single stranded nucleic acids of up to 315 base pairs in length and multimers of such with a length of up to 660 base pairs could be detected on a UV-MALDI-TOF mass spectrometer. A combination of base and sugar backbone modification was employed to chemically synthesize a nucleic acid that contained 7-deaza modified purine nucleotides and 2'-fluoro modified cytidine. This nucleic acid showed to be completely stable under the conditions of MALDI-TOF MS. The combination of different strategies of DNA modification might therefore be a way to further increase the importance of mass spectrometry to DNA analysis in the near future.