

**Carsten Siegert**

Chemische und enzymatische Synthese  
modifizierter Nukleinsäuren für die Analytik  
mit Hilfe der MALDI-TOF  
Massenspektrometrie

**Doktorarbeit / Dissertation**

# BEI GRIN MACHT SICH IHR WISSEN BEZAHLT



- Wir veröffentlichen Ihre Hausarbeit, Bachelor- und Masterarbeit
- Ihr eigenes eBook und Buch - weltweit in allen wichtigen Shops
- Verdienen Sie an jedem Verkauf

Jetzt bei [www.GRIN.com](http://www.GRIN.com) hochladen  
und kostenlos publizieren



### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

### **Impressum:**

Copyright © 1999 GRIN Verlag  
ISBN: 9783638277549

### **Dieses Buch bei GRIN:**

<https://www.grin.com/document/25015>

**Carsten Siegert**

**Chemische und enzymatische Synthese modifizierter  
Nukleinsäuren für die Analytik mit Hilfe der MALDI-TOF  
Massenspektrometrie**

## **GRIN - Your knowledge has value**

Der GRIN Verlag publiziert seit 1998 wissenschaftliche Arbeiten von Studenten, Hochschullehrern und anderen Akademikern als eBook und gedrucktes Buch. Die Verlagswebsite [www.grin.com](http://www.grin.com) ist die ideale Plattform zur Veröffentlichung von Hausarbeiten, Abschlussarbeiten, wissenschaftlichen Aufsätzen, Dissertationen und Fachbüchern.

### **Besuchen Sie uns im Internet:**

<http://www.grin.com/>

<http://www.facebook.com/grincom>

[http://www.twitter.com/grin\\_com](http://www.twitter.com/grin_com)

**Chemische und enzymatische Synthese modifizierter  
Nukleinsäuren für die Analytik mit Hilfe der MALDI-TOF  
Massenspektrometrie**

**DISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Carsten Siegert**

aus Hamburg

Hamburg 1999

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

2. November 1999

Die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von November 1995 bis Januar 1999 unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Köster am Institut für organische Chemie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg und soweit nötig bei der Firma Sequenom - Gesellschaft für industrielle Genomanalytik mbH, Hamburg, durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Hubert Köster danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine inspirierenden Visionen.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Klima der Zusammenarbeit.



„Damit das Mögliche entsteht, muß immer wieder das Unmögliche versucht werden.“

*Hermann Hesse*

# Inhalt

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	III
<b>I</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1	Wachsende Bedeutung der DNA-Analytik .....	1
2	Nachteile klassischer Methoden der DNA-Analytik .....	3
3	MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Analyse von Biomolekülen .....	4
4	Massenspektrometrie von Nukleinsäuren .....	7
<b>II</b>	<b>Problemstellung</b> .....	9
<b>III</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	11
1	Einführung .....	11
2	Das Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinsystem .....	13
	2.1 Biologische Bedeutung .....	13
	2.2 Nomenklatur .....	14
3	Synthese von 7-Deaza-2'-desoxyguanosin und 7-Deaza-2'-desoxyadenosin ....	15
	3.1 Darstellung der Aglykone .....	15
	3.2 Synthese geeigneter Akzeptoren für Glykosidierungsreaktionen .....	17
	3.3 Synthese von Glykosyldonoren .....	19
	3.4 Glykosidierungsreaktionen .....	23
	3.5 Abspaltung der Schutzgruppen aus den Glykosidierungsprodukten .....	31
4	Chemische Festphasensynthese von Oligodesoxynukleotiden .....	33
	4.1 Die Phosphoamiditmethode .....	33
	4.2 Darstellung von Monomeren für die DNA-Synthese .....	36
	4.3 Benzoyl- und Isobutyryl-Gruppe als exozyklische Aminoschutzgruppen .	38
	4.4 4- <i>tert</i> -Butylphenoxyessigsäure als Schutzgruppe für exozyklische Aminogruppen .....	42
	4.5 Phosphoamiditsynthese .....	47
	4.6 Festphasengebundene Synthese modifizierter Nukleinsäuren .....	49
5	Enzymatische Darstellung modifizierter Nukleinsäuren .....	55
	5.1 Die Polymerasekettenreaktion .....	55
	5.2 Wahl von Primer-Template-Systemen für die PCR .....	56
	5.3 Wahl einer geeigneten DNA-Polymerase für die PCR .....	57
	5.4 Erfolgreicher Einbau der modifizierten Triphosphate .....	58

5.5	Effektivität des Einbaus von 7-Deazanukleosidtriphosphaten . . . . .	58
6	Analytik doppelsträngiger DNA mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie	63
6.1	Analyse der 103-mer PCR-Produkte aus M13mp18 . . . . .	65
6.2	Analyse der 99-mer PCR-Produkte aus pHis6Bap . . . . .	68
6.3	Restriktionsverdau der 99-mer PCR-Produkte . . . . .	74
6.4	Ribomodifizierte Primer zur Darstellung 7-deaza-modifizierter Nukleinsäuren . . . . .	75
7	Massenspektrometrie einzelsträngiger DNA . . . . .	77
7.1	Analytik synthetischer Homopolymere von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin .	77
7.2	Das Streptavidin-Biotin-System . . . . .	78
7.3	Asymmetrische PCR mit biotinmodifizierten Primern . . . . .	80
7.4	Darstellung und Massenspektrometrie komplett c <sup>7</sup> -modifizierter Nukleinsäuren . . . . .	83
8	DNA-Sequenzanalyse . . . . .	87
8.1	Vermessung einer modifizierten synthetischen DNA-Leiter . . . . .	87
8.2	DNA-Sequenzierung mit Hilfe einer Endonuklease . . . . .	90
9	Modifikation des Zuckers zur Stabilisierung der DNA . . . . .	95
9.1	Enzymatische Reaktionen mit 2'-Fluoro-2'-desoxynukleosidtriphosphaten	95
9.2	2'-Fluorocytidin in einem synthetischen Oligonukleotid . . . . .	96
9.3	Kombination von Basen- und Zuckermodifikation . . . . .	97
10	Konzept eines massenspektrometrischen Polymerase-Inkorporations-Assays . .	100
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>103</b>
<b>V</b>	<b>Summary</b> . . . . .	<b>105</b>
<b>VI</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b> . . . . .	<b>107</b>
<b>VII</b>	<b>Experimenteller Teil</b> . . . . .	<b>113</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .	<b>175</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3-HPA	3-Hydroxypikolinsäure
A	Adenosin, 2'-Desoxyadenosin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B/W	<i>Binding and Wash</i>
Bio	Biotinyl-
Bn	Benzyl-
bp	Basenpaar(e)
Bz	Benzoyl-
C	Cytidin, 2'-Desoxycytidin
Ci	Curie
CPG	<i>Controlled Pore Glas</i>
$\delta$	chemische Verschiebung (NMR)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DCA	<i>Dichloroacetic Acid</i> (Dichloressigsäure)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMT	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl- (Dimethoxytrityl-)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient (UV/VIS)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EtBr	Ethidiumbromid (5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid)
EtOH	Ethanol
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
fwhm	<i>full width at half maximum</i>
G	Guanosin, 2'-Desoxyguanosin
HMDS	Hexamethyldisilazan
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
ib	Isobutyryl-, 2-Methylpropanoyl-
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
M	Molmasse
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i>
MeOH	Methanol
MPC	<i>Magnetic Particle Collector</i> <sup>TM</sup>

MS	Massenspektrometrie
N <sub>d</sub> TP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NMWG	Nominale Molekulargewichtsausschlußgrenze
OD	Optische Dichte, Extinktion bei einer Schichtdicke von 1 cm
OPC	<i>Oligonucleotide Purification Cartridge</i> <sup>TM</sup>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotidkinase
RF	replikative Form
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RP	reverser Sequenzierprimer
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
T	Thymidin, 2'-Desoxythymidin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBPA	4- <i>tert</i> -Butyl-phenoxyacetyl-
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> (Trifluoressigsäure)
Tfl	<i>Thermococcus litoralis</i>
TMS	Tetramethylsilan
Tol	Toluoyl-, (4-Methylbenzoyl-)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UITma	aus <i>Thermotoga maritima</i> isolierte DNA-Polymerase
USP	universeller Sequenzierprimer
v/v	Volumen zu Volumen
Vent	aus <i>Tfl</i> isolierte und in <i>E.coli</i> klonierte und exprimierte DNA-Polymerase
VIS	<i>visible</i> (Bereich des sichtbaren Lichtes)

## **I Einleitung**

### **1 Wachsende Bedeutung der DNA-Analytik**

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist eine der wichtigsten Substanzen überhaupt: Da die genetische Information aller lebender Organismen in ihrer Struktur kodiert wird, ist sie *das* Molekül des Lebens<sup>1,2</sup>. Beim Menschen besteht das komplette Genom aus etwa 300,000 Genen auf insgesamt 24 Chromosomen<sup>3</sup>. Jedes Gen kodiert dabei ein bestimmtes Protein, das nach seiner Expression via Transkription und Translation eine bestimmte biochemische Aufgabe in der lebenden Zelle ausübt. Mutationen, d. h. Veränderungen der DNA Sequenz, können in klinisch manifesten Krankheitsbildern resultieren, indem sie zur Expression von Proteinen führen, die eine veränderte biochemische Aktivität zeigen, oder in einigen Fällen diese sogar komplett verlieren. Man unterscheidet verschiedene Arten von Mutationen; diese umfassen Nukleotiddeletion, -insertion oder -austausch (d.h. Punktmutation).

Mehr als 3,000 genetisch bedingte Krankheiten sind inzwischen bekannt<sup>4</sup>, darunter z.B. Alzheimer<sup>5</sup>, Mukoviszidose (zystische Fibrose<sup>6,7,8</sup>), sowie bestimmte Arten der Hämophilie oder der Muskeldystrophie<sup>9</sup>. Neben vererbaren Krankheiten, die auf die Mutation bestimmter Gene zurückzuführen sind, können auch bestimmte Geburtsfehler auf chromosomalen Abnormalitäten beruhen wie z.B. die recht verbreitete Trisomie 21 (eines von 700 Lebendgeborenen betroffen) oder das auf einer Aneuploidie der Geschlechtschromosomen beruhende Klinefelter-Syndrom (XXY, einer von 590 lebendgeborenen Männern). Darüber hinaus gibt es zunehmend Hinweise, daß das Vorhandensein bestimmter DNA-Sequenzen ein Individuum für eine Reihe von Krankheiten besonders prädisponieren kann. So zum Beispiel für Diabetes, Arteriosklerose, Obesitas, eine Reihe von Autoimmunkrankheiten und auch verschiedene Krebsarten wie z.B. Brust-, Gebärmutter- und Lungenkrebs.

Die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist die Basis, um die Ursachen solcher Krankheiten, die auf genetischen Defekten beruhen, zu verstehen. Dieser enormen Herausforderung für die Naturwissenschaft stellen sich zahlreiche Forschungsgruppen auf der ganzen Welt, die ihre Bemühungen im Rahmen des sogenannten humanen Genom-Forschungsprogramms (Humane Genome Project, HUGO<sup>10,11,12</sup>) institutionalisiert haben. Die Teilnehmer haben sich zum Ziel gesetzt, das komplette menschliche Genom bis zum Jahre 2003 zu sequenzieren. Auch wenn der erfolgreiche Abschluß des humanen Genomprojektes oder ähnlich gelagerter Projekte in Landwirtschaft und Tierzucht einen großen Erfolg für die Wissenschaft darstellen wird, so ist aber allein durch das Vorliegen der Sequenz des menschlichen Genoms noch keinerlei Aussage über deren Bedeutung möglich.

Es wird sich daher eine zweite Phase des vergleichenden Sequenzierens und der Katalogisierung der genetischen Varianz zwischen den verschiedenen Individuen anschließen müssen<sup>13</sup>. Das hiermit verbundene immens hohe Probenaufkommen erfordert Verfahren, die eine schnelle und kostengünstige DNA-Analytik ermöglichen. Für diese zweite Phase rechnet man mit einem Zeitbedarf von ca. 40 Jahren bei weiterer Anwendung etablierter Verfahren.

Nimmt man an, daß lediglich ein Promille aller Nukleotide heterozygot ist, bedeutet dies, daß die Nukleotidsequenz zweier verglichener Gene bei unterschiedlichen Individuen niemals identisch sein wird, ohne das es sich hierbei um eine Mutation im eigentlichen Sinne handelte<sup>14</sup>. In den meisten Fällen wird sich daher ein Phänotyp nicht einfach aufgrund einer einzigen spezifischen Veränderung der Nukleotidsequenz zuordnen lassen. Ein Phänotyp wird viel häufiger auf einer ganzen Reihe von unterschiedlichen Veränderungen in einem oder mehreren Genen beruhen. Zu entwickelnde Methoden der DNA-diagnostischen Zuordnung von Krankheitsbildern werden also in solchen Fällen darauf angewiesen sein, das gesamte Gen, oder sogar mehrere Kombinationen von Genen, auf Mutationen hin zu untersuchen<sup>15</sup>. Diese Anforderungen können kaum mit konventionellen auf Gelchromatographie oder Hybridisierung basierenden Sequenzierverfahren in einer angemessenen Zeit und mit der notwendigen Präzision bewältigt werden.

Statistische Überlegungen zeigen, das bereits relativ kurze Nukleinsäuresequenzen verwendet werden können, um normale und defekte Gene in höheren Organismen eindeutig zu identifizieren. Viren und andere infektiöse Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze, Hefen und Protisten) enthalten Nukleinsäuresequenzen, die sich von denen des Trägerorganismus unterscheiden lassen. Daher lassen sich infizierte Organismen allein auf Grundlage dieser spezifischen DNA Sequenzen entdecken und identifizieren<sup>16,17</sup>. DNA Sequenzen können sogar als individueller Fingerabdruck dienen, um verschiedene Individuen derselben Spezies zu unterscheiden<sup>18</sup>. Eine Methode, die z.B. zur Aufklärung von Sexualdelikten in Form des DNA-Fingerprinting seit einiger Zeit in die moderne Forensik Einzug genommen hat<sup>19,20</sup>. Durch diese vielfältigen Anwendungen ergibt sich zusätzlich ein großer Bedarf für schnelle, zuverlässige und preiswerte Verfahren zur DNA-Analytik mit möglichst hohem Probendurchsatz.

## 2 Nachteile klassischer Methoden der DNA-Analytik

Voraussetzung für die stetig zunehmende Rolle, die Methoden zur DNA-Analyse<sup>21</sup> in Grundlagenforschung und klinischer Diagnostik spielen, war die Entwicklung effizienter Techniken zur spezifischen Vervielfältigung von DNA. Eine der wichtigsten Entwicklungen auf diesem Gebiet stellt die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dar. Diese 1985 von Mullis und Saiki vorgestellte Methode<sup>22,23</sup> erlaubt die selektive Vervielfältigung des in der jeweiligen Fragestellung interessanten Analytmoleküles, eines spezifischen DNA-Fragmentes (auch als Template oder Matrize bezeichnet), aus einer heterogenen Population von DNA-Sequenzen. In der Theorie kann man ausgehend von einem einzigen DNA-Molekül in kurzer Zeit ohne großen Aufwand Kopien in jeder gewünschten Menge anfertigen. Insbesondere die Entdeckung thermostabiler DNA Polymerasen (z.B. aus *Thermus aquaticus*) hat erheblich zur Verbesserung des Prozesses beigetragen<sup>24</sup>. Die zunehmende Bedeutung der Pathogendetektion auf Nukleinsäure-Basis wird durch aktuelle Änderungen im Verordnungswesen zur Blutproduktsicherheit unterstrichen. So müssen seit dem 01.04.1999 alle in Deutschland in den Verkehr gebrachten Blutprodukte mittels geeigneter Nukleinsäure Amplifikationstechniken, also z.B. der PCR, auf die Nachweisbarkeit des Genoms von Hepatitis C überprüft werden<sup>25</sup>.

Ungeachtet der geschilderten Fortschritte und der Bedeutung der DNA Diagnostik ist ihr Einsatz im Routinebetrieb klinischer Laboratorien im Vergleich zu immunologischen Methoden noch immer eingeschränkt. Hauptursache hierfür sind die bisher nur schwer zu automatisierenden und arbeitsintensiven Verfahren<sup>26</sup>. Zum Nachweis von DNA gibt es eine Reihe von Methoden. So können Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe der Gelelektrophorese durch Vergleich der Mobilität eines amplifizierten Nukleinsäure-Fragmentes mit einem bekannten Standard oder durch Hybridisierung<sup>27,28</sup> mit einer zu der zu identifizierenden komplementären Nukleinsäuresequenz identifiziert werden.

Die Identifizierung ist jedoch bei diesen Methoden stets nur indirekt und erfordert die Anwesenheit einer wie auch immer gearteten Reporterfunktionalität, die mit hoher Nachweisempfindlichkeit detektiert werden kann. Solche Funktionalitäten sind z.B. Radioaktivität, wobei insbesondere die Isotope <sup>32</sup>P und <sup>35</sup>S zum Einsatz kommen, Fluoreszenz<sup>29</sup> oder Chemilumineszenz<sup>30</sup>. Radioaktives Markieren ist mit Gefahren für Mensch und Umwelt verbunden, und die Intensität des erzeugten Signals nimmt im Laufe der Zeit, in Abhängigkeit von der Halbwertszeit des zur Markierung verwendeten Isotopes, ab. Andere Arten der Markierung (z.B. Fluoreszenz) haben den Nachteil geringerer Empfindlichkeit und abnehmender Signalstärke, wenn Laser hoher Intensität zur Anregung verwendet werden.



Darüber hinaus sind die Vorgänge von Labelling, Elektrophorese und anschließender Detektion zeitaufwendig, mühsam und vor allem fehlerbehaftet. Insbesondere die Elektrophorese ist äußerst anfällig für Fehler, da Größe bzw. Molekulargewicht einer Nukleinsäure nicht direkt mit der Mobilität korrelieren, welche hier aber als Messgröße verwendet wird. Man kennt eine Vielzahl sequenzspezifischer Effekte, Sekundärstrukturen und anderer Interaktionen mit der Gelmatrix, die Artefakte hervorrufen<sup>31,32</sup>.

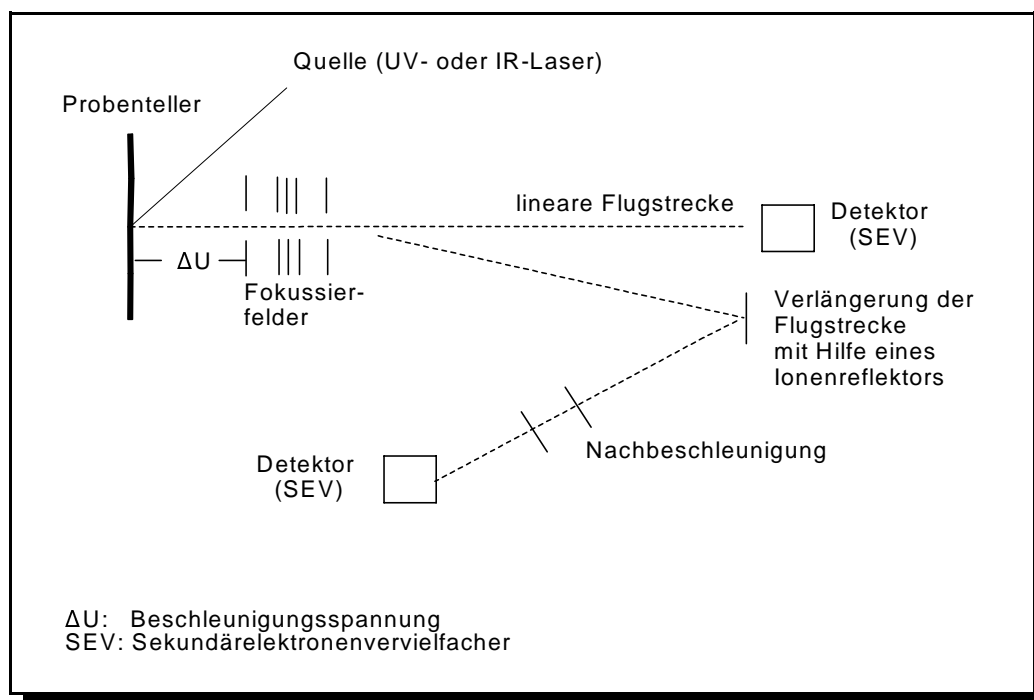
### 3 MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Analyse von Biomolekülen

Die Massenspektrometrie stellt ein Verfahren dar, um distinkte Moleküle zu „wägen“. Sie zählt daher wohl unbestritten zu den heute leistungsfähigsten Methoden der instrumentellen Analytik in der organischen Chemie und hat sich zum Nachweis und bei der Identifizierung unterschiedlichster Substanzen bis in den extremen Spurenbereich als Methode der Wahl etabliert. Es ist nicht verwunderlich, daß mit zunehmender Bedeutung der Biochemie und Biotechnologie in den letzten Jahren immer wieder versucht wurde, den Einsatzbereich massenspektrometrischer Verfahren durch neue Ionisierungstechniken auf biochemisch relevante Substanzklassen zu erweitern, an denen die klassische Elektronenstoßionisation (EI) oder auch die chemische Ionisation (CI) scheitern. Bei diesen und verwandten Verfahren erfolgt die Ionisation bei reduziertem Druck in der Gasphase. Die Voraussetzung dafür ist, daß sich die Probe unzersetzt verdampfen läßt, was aber bei den meisten polaren, thermisch labilen und sehr großen Biomolekülen mit ihrem fast nicht existenten Dampfdruck nur äußerst selten gegeben ist.

Seit den 70er<sup>33,34</sup> Jahren werden Laser in der organischen Massenspektrometrie eingesetzt. Die Laserdesorption (LD) gelang allerdings zunächst nur bei relativ kleinen Molekülen und hatte daher wenig praktische Bedeutung. Überwunden wurde dies durch die fast zeitgleiche Einführung des matrixunterstützten Laserdesorptionsverfahrens (MALD) durch Hillenkamp und Karas<sup>35,36,37</sup> bzw. Tanaka<sup>38</sup> im Jahre 1988. Da sowohl die Laserdesorption seit den 70er Jahren als auch die TOF-Technologie sogar schon seit den 50er Jahren bekannt waren, ist die enorme Zeitverzögerung kaum begreiflich, bis eine Kombination der beiden Methoden endlich Einzug in die moderne Massenspektrometrie gefunden hat.

Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe mit einem 100- bis 1000 fachen Überschuß einer sogenannten Matrix verdünnt, auf einem Probeneller kokristallisiert und im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Typische Matrixsubstanzen sind kleinere aromatische Säuren, wie etwa Nikotinsäure, Sinapinsäure oder Dihydroxybenzoesäure (DHB<sup>39</sup>),

die mit ihren  $\pi$ -Elektronensystemen Licht im Wellenlängenbereich des jeweils verwendeten Lasers absorbieren können<sup>40</sup>. Bei den zur Anwendung kommenden Lasern handelt es sich häufig um Impulsfestkörperlaser (Nd-YAG-Laser im Wellenlängenbereich von 355 bzw. 266 nm) oder um Stickstoff-Gaslaser (mit einer Wellenlänge von 337 nm), wie in allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometern. Die Einkopplung der für die Desorption notwendigen Energie erfolgt über die resonante elektronische Anregung der Matrixmoleküle.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der wichtigsten Elemente eines MALDI-TOF Massenspektrometers

Die zunächst von den Matrixmolekülen aufgenommene elektronische Anregungsenergie wird in extrem kurzen Zeiten in das Gitter des Festkörpers relaxiert und bewirkt dort eine starke Störung und Aufweitung. Was folgt, ist ein Phasenübergang weit außerhalb des thermischen Gleichgewichtes, der wohl am ehesten als explosive Auflösung eines Mikrobereiches des Probenfestkörpers zu beschreiben ist<sup>41</sup>, wobei neben den Matrix- auch die Probenmoleküle unzersetzt freigesetzt werden. Erst jetzt erfolgt durch Protonentransfer mit photoionisierten, d.h. radikalischen Matrixmolekülen die Bildung von elektrisch geladenen Probenmolekülen. In einem elektrostatischen Feld werden nun je nach Polarität positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt. Bei den in Kombination mit der matrixunterstützten Laserdesorption eingesetzten Massenanalysatoren handelt es sich in der Regel um Flugzeitmassenspektrometer (TOF = time of flight), bei denen die Massen-

bestimmung über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht, erfolgt. Eine deutliche Verbesserung der Massenauflösung erhält man dabei durch Verwendung eines Ionenreflektors<sup>42,43</sup> zur Verlängerung der Flugstrecke (vgl. Abbildung 1 zum schematischen Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers)<sup>44</sup>.

Mit Hilfe der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI), als einer „weichen“ Desorptions- und Ionisationsmethode, in Verbindung mit einem Flugzeitmassenspektrometer gelang der Massenspektrometrie endlich der Durchbruch auch in der biochemischen Analytik. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie entwickelt sich seitdem zunehmend zu einer Alternative zu den in der Biochemie/Molekularbiologie etablierten Methoden der Molekulargewichtsbestimmung. Diese Methode bringt im Vergleich zur Molekulargewichtsbestimmung über Gelfiltration, Gelelektrophorese oder Dichtegradientenultrazentrifugation eine Reihe entscheidender Vorteile mit sich:

- Kürzere Analysendauer bei minimaler Probenvorbereitung
- Minimaler Probenbedarf (Attomol für Proteine)
- Hohe Massengenauigkeit und -auflösung
- Reproduzierbarkeit
- Die Verwendbarkeit auch für Probengemische
- Einfach zu interpretierende Massenspektren, da wenig Fragmentierung beobachtet wird
- Separation und Detektion in einem Arbeitsgang

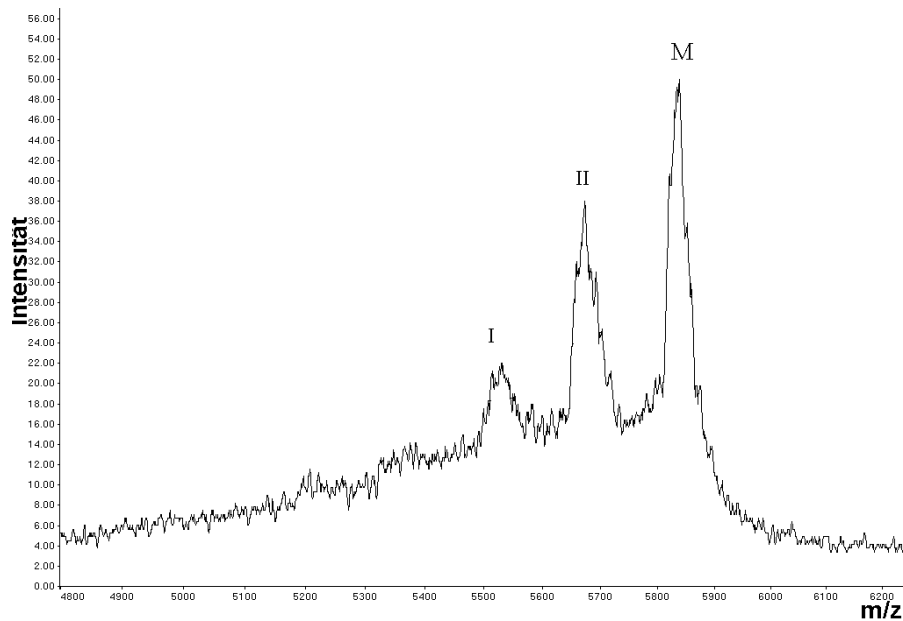
Insbesondere in Bereichen mit hohem Probenaufkommen bietet die MALDI-TOF MS im Vergleich zu gelelektrophoretischen Verfahren einen enormen Vorteil durch das hohe Automatisierungspotential des Verfahrens. MALDI hat sich in kürzester Zeit zu einem wirkungsvollen Werkzeug in der biologischen Massenspektrometrie entwickelt<sup>45</sup>. Insbesondere bei der Charakterisierung von Proteinen und Peptiden hat MALDI bedingt durch den hohen verfügbaren Massenbereich seine Stärken bewiesen, es wurden Proteine mit Molmassen über 200,000 g/mol detektiert<sup>46</sup>. Ursprünglich vor allem zur Protein- und Peptidanalytik entwickelt, haben zahlreiche Modifikationen der Technik den erfolgreichen Transfer auch auf eine Vielzahl anderer organischer Biopolymere<sup>47,48</sup> wie Oligosaccharide/Kohlenhydrate, Ganglioside und Oligonukleotide, ebenso wie auf synthetische organische Polymere mit Molekulargewichten von bis zu 1.5 Millionen g/mol ermöglicht<sup>49,50</sup>.

#### 4 Massenspektrometrie von Nukleinsäuren

Die Analyse von Nukleinsäuren ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden, da es sich hierbei um äußerst polare Biopolymere handelt, die nur sehr schwer zu verdampfen sind. Daher waren Verfahren, die auf einer Desorption mittels Fast Atom Bombardement (FAB) oder Plasma Desorption (PD) beruhten, auf die Detektion synthetischer Oligonukleotide sehr geringer Masse beschränkt<sup>51,52</sup>. Auch der MALDI-Prozeß erwies sich bei dieser Substanzklasse als nicht trivial und zudem äußerst abhängig von der verwendeten Matrix. Ein Matrixgemisch aus 3-Hydroxypikolinsäure (3-HPA<sup>53</sup>) und Pikolinsäure<sup>54</sup> erlaubte es erstmals, auch längere DNA-Stränge zu detektieren<sup>55</sup>; wobei trotz hoher Analytmenge und großem Aufwand bei der Probenvorbereitung nur eine sehr geringe Auflösung und Signalintensität erzielt werden konnte. Erste Ergebnisse mit kleineren Oligodesoxynukleotiden haben zur Erforschung der Einsatzmöglichkeiten der Massenspektrometrie für DNA-Screening und -Sequenzierung ermutigt<sup>56</sup>.

Es ist bekannt, daß DNA in Lösung nur eine begrenzte chemische Stabilität besitzt, wobei die N-glykosidische Bindung zwischen einer Purinbase und der Zuckereinheit die höchste Hydrolyseempfindlichkeit aufweist. So findet man spontane Depurinierung mit nachfolgender Hydrolyse der Phosphodiesterbindung an den so entstandenen apurinischen Stellen unter physiologischen Bedingungen in Lösung erstaunlich häufig. Ein ähnliches Phänomen beobachtet man auch bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie von Oligodesoxyribonukleotidfragmenten als einen entscheidenden Beitrag zur Verschlechterung der detektierten Signale. Insbesondere bei Oligodesoxynukleotiden mit hohem Desoxyguanosinanteil wurde das Auftreten von Signalen niedrigerer Massen, die durch Depurinierung verursacht wurden, beobachtet<sup>57</sup>. Als illustratives Beispiel zeigt Abbildung 2 das Massenspektrum eines 19-mer PCR-Primers. Neben dem Signal des Molekülions von  $(M+H)^+ = 5822$  u ist eine Serie von Fragmentierungssignalen zu sehen.

Um die bei der DNA-Sequenzierung nach den Verfahren von Maxam/Gilbert<sup>58</sup> oder Sanger<sup>59,60,61</sup> eingesetzte zeitaufwendige Gelelektrophorese zur Analyse der Produkte der Sequenzierreaktion durch die bedeutend schnellere, empfindlichere und aussagekräftigere Methode der Molmassenbestimmung mit Hilfe der Massenspektrometrie ersetzen zu können, müssen u.a. noch wesentliche Vorgänge bei der Desorption und Ionisation von DNA besser verstanden werden. Insbesondere im Bereich höherer Massen (Moleküle mit 200-300 Nukleotiden) liegen sowohl Massenauflösung als auch Nachweisgrenze um mindestens eine Größenordnung unter den Werten, die man für das Sequenzieren benötigt<sup>62,63</sup>.



**Abbildung 2:** Massenspektrum eines 19-mer Oligonukleotids, das als Primer in der Polymerasekettenreaktion verwendet wird. Das Signal bei  $M = 5822$  u steht für das einfach protonierte  $(M+H)^+$  Molekülion. Begleitet wird das Signal von den Tochterionen I und II, welche aus Depurinierung hervorgegangene Fragmentationen darstellen  $[(M-A+H)^+]$  und  $[(M-A-G+H)^+]$ .

Möchte man die Massenauflösung nachhaltig verbessern, gibt es unterschiedliche Ansätze. Enormen Einfluß auf die erzielten Ergebnisse hat die Wahl der verwendeten Matrix, mit der die Analytlösung kokristallisiert wird<sup>64,65,66</sup>. Ein wichtiger Ansatzpunkt ist sicherlich die Optimierung des MALDI-Prozesses selbst durch die Entwicklung neuer Geräte. Sehr große Fortschritte konnten z.B. mit der Technik der verzögerten Fokussierung (delayed ion extraction, DE) erzielt werden<sup>67,68</sup>. Allerdings bietet diese Methode nur im Bereich geringerer Massen bis ca. 10,000 g/mol entscheidende Vorteile.

Neben der Optimierung dieser äußeren Parametern, bietet sich aber auch die Stabilisierung des zu untersuchenden Moleküls durch chemische Modifikation an. Diese Strategie bietet den entscheidenden Vorteil, daß so auch auf bereits vorhandenen Massenspektrometern bessere Meßergebnisse erhalten werden können. Mit diesem Aspekt soll sich nun die hier vorliegende Arbeit beschäftigen: