

Triplex-basierte „molecular beacons“ als modulare Sonden zur DNA-Detektion**

Tom N. Grossmann, Lars Röglin und Oliver Seitz*

Die spezifische Detektion von Nukleinsäuresequenzen spielt in den Lebenswissenschaften eine zentrale Rolle, und betrachtet man den raschen Anstieg der verfügbaren Sequenzdaten, ist davon auszugehen, dass die DNA- und RNA-Diagnostik in den nächsten Jahren sogar noch an Bedeutung gewinnt. Die nützlichsten diagnostischen Methoden verwenden Sonden, die quantitative Messungen in homogener Lösung ermöglichen. Dabei ist es von Vorteil, dass die Notwendigkeit der Abtrennung gebundener von ungebundenen Sonden entfällt.^[1] Eine häufig verwendete Sondenklasse sind die „molecular beacons“ (MBs),^[2] die an einem Strangende einen Fluorophor und am anderen einen Fluoreszenzlöcher enthalten. In Abwesenheit der komplementären Zielsequenz liegen MBs in einer Stamm-Schleife-Struktur vor (Abbildung 1 A), in der die Fluoreszenz gelöscht wird. Durch Bin-

dung des komplementären Targets wird die Haarnadelstruktur aufgebrochen, die Chromophore werden separiert, und die Fluoreszenzintensität steigt an. MBs wurden in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) für den sequenzspezifischen Nachweis des Amplicons genutzt sowie in der Visualisierung pathogener RNA in lebenden Zellen.^[2]

Es ist eine nützliche Eigenschaft, dass konformativ gespannte Sonden – wie MBs – ihre Zielsequenzen mit größerer Spezifität erkennen als lineare Sonden.^[3] Diese Eigenschaft ist bei der Analyse von Einzelbasenmutationen von besonderer Bedeutung. Die erhöhte Sequenzspezifität, die bei strukturierten Sonden beobachtet wird, eröffnet die Möglichkeit, die Selektivität der Sonden-Target-Hybridisierung durch Variation der konformativen Spannung zu modulieren. Im Fall der MBs kann dies durch Variation der Stammlänge und -sequenz erreicht werden. Jedoch erfordert diese Art der Modulation die Synthese einer Reihe verschiedener MBs. Bisher sind nur wenige Ansätze zur Modifikation des ursprünglichen, auf Watson-Crick-Basenpaarung basierenden Stammbereichs bekannt. So wurden die Verwendung von Homo-DNA-^[4a] LNA-^[4b] und G-Quadruplex-basierten Systemen^[4c] sowie „stammlose“ Peptidnukleinsäure(PNA)-MBs beschrieben.^[4d-f] Die Abhängigkeit der G-Quadruplex-Stabilität von bestimmten Kationen wurde bereits dazu genutzt, die konformative Spannung des entsprechenden „beacons“ zu modulieren,^[4c] jedoch ist die Kationenkonzentration bei Anwendungen wie der qPCR oder bei Messungen in vivo ein nur schwer variierbarer Parameter.

Hier zeigen wir, dass Triplex-basierte „molecular beacons“ (tMBs, Abbildung 1 B) unter Verwendung einer einzigen, doppelt markierten DNA-Sonde (triplex-forming molecular beacon, tfMB) in Kombination mit mehreren stammbildenden Oligonukleotiden (stem-forming oligonucleotides, sFOs) eine präzise Modulation der konformativen Spannung ermöglichen. Dieser Aufbau benötigt nur eine doppelt markierte Sonde, da Selektivität und Empfindlichkeit der DNA-Detektion über die Wahl des sFO justiert werden können. Darüber hinaus ermöglicht der modulare Aufbau^[5] den Einbau weiterer Funktionalitäten, die sehr einfach über das sFO eingeführt werden können. Ein Beispiel für dieses erweiterte Konzept sind „superquenched“^[6] tMBs, die durch Anbindung zusätzlicher Fluoreszenzlöcher an das sFO erhalten wurden.

Der tMB ist so gestaltet, dass der Stammbereich durch eine Poly(a)-2poly(T)-Struktur gebildet wird (Abbildung 1 C).^[7] Das stammbildende Poly(a)-Segment (sFO) besteht aus PNA, einem DNA-Analogon mit einem ungeladenen N-(2-Aminoethyl)glycin-Rückgrat. PNA ist in der Lage, mit komplementärer DNA stabilere Duplexe und Triplexse zu bilden, als vergleichbare DNA.^[8] Das sFO wurde so gewählt,

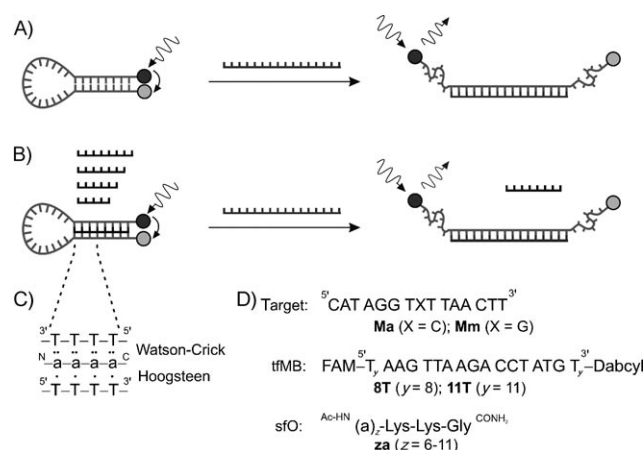


Abbildung 1. Vergleich von „molecular beacons“ (MB, A) und Triplex-basierten „molecular beacons“ (tMB, B) zur Detektion komplementärer DNA-Oligonukleotide. C) Poly(a)-2poly(T)-Struktur zur Bildung der Stammregion. D) Sequenzen der verwendeten DNA (Target, tfMB) und PNA (sFO).

[*] Dipl.-Chem. T. N. Grossmann,^[1] Dipl.-Chem. L. Röglin,^[1] Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

[†] Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Dieses Projekt wurde von der Schering AG finanziell unterstützt. T.N.G. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

dass es an die beiden Poly(T)-Armsegmente des triplexbildenden MBs (tfMB) über Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaare bindet.

Wir entschieden uns, zwei tfMB-Systeme (**8T** und **11T**, Abbildung 1D) zu untersuchen. Beide tfMBs bestehen aus einer zentralen DNA-Sequenz, die zur verwendeten Zielsequenz (**Ma**) vollständig komplementär ist. Die Erkennungssequenz wird von Poly(T)-Regionen flankiert. Diese sind an den Enden mit 6-FAM und Dabcyl als Fluorophor bzw. Fluoreszenzlöcher markiert. Die sfO-Länge variierte zwischen sechs und elf Adenin-Einheiten. In vorausgehenden UV-Denaturierungsexperimenten untersuchten wir die Stabilität der Duplexe aus tfMB und Target (tfMB-Target) in Abwesenheit der sfOs sowie die Stabilität der Triplexen (tfMB-sfO) in Abwesenheit des Targets. Tabelle 1 zeigt die

Tabelle 1: Schmelztemperaturen (in °C) von Komplexen der unmarkierten tfMBs mit perfekt komplementärem Target (**Ma**), dem einzelbasenfehlgepaarten Target (**Mm**) sowie den unterschiedlichen sfOs.^[a]

	tfMB-Target		tfMB-sfO					
	Ma	Mm	6a	7a	8a	9a	10a	11a
8T-nl	47	36	38	44	49	–	–	–
11T-nl	48	37	44	48	53	57	59	60

[a] Bedingungen: 1 μM Oligonukleotide im Puffer: 10 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, pH 9.

Schmelztemperaturen (T_m) der unmarkierten tfMBs (**8T-nl** und **11T-nl**) im Komplex mit Target oder sfOs. Wie erwartet zeigt der einzelbasenfehlgepaarte Duplex (tfMB-**Mm**) eine deutlich geringere Stabilität ($\Delta T_m = 11^\circ\text{C}$) als der perfekt komplementäre Duplex (tfMB-**Ma**). Die Schmelztemperaturen der tfMB-sfO-Triplexe stiegen wie erwartet mit der Länge des sfO an. Dies sollte eine präzise Modulation der konformativen Spannung des tMB ermöglichen.

Um die Fähigkeit jedes Triplex-basierten „molecular beacon“ (tfMB-sfO) zur Unterscheidung zwischen perfekt komplementärem und einzelbasenfehlgepaartem Target vergleichen zu können, führten wir Denaturierungsexperimente durch, bei denen die FAM-Fluoreszenz in Abwesenheit sowie in Gegenwart jeweils eines der beiden Targets (**Ma** oder **Mm**) detektiert wurde. Die Denaturierungskurven waren reversibel, und es wurde keine Hysterese beobachtet. Zum Ausgleich kleiner Pipettierfehler und der intrinsischen Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz wurden normalisierte Match/Mismatch-Selektivitäten berechnet (siehe die Hintergrundinformationen). Abbildung 2A zeigt die höchste normalisierte Match/Mismatch-Selektivität, die für den jeweiligen Komplex ermittelt wurde. Hierbei war zu erkennen, dass die Selektivität mit ansteigender Triplex-Stabilität zunahm. So wurden mit **11T**, das über einen längeren Stamm verfügt, höhere Selektivitäten erzielt als mit **8T**. Längere sfOs führten ebenfalls zu erhöhten Selektivitäten. Im Fall von **11T** wurde bei einer sfO-Länge von neun Adenin-Nukleobasen ein Plateau erreicht, ab dem die Selektivität nicht weiter zunahm. Die jeweils höchsten Selektivitäten von **11T** mit **9a** (16.4), **10a** (13.4) und **11a** (17.2) wurden bei Temperaturen zwischen 42°C und 43°C beobachtet. Zusätzlich führten wir mit dem

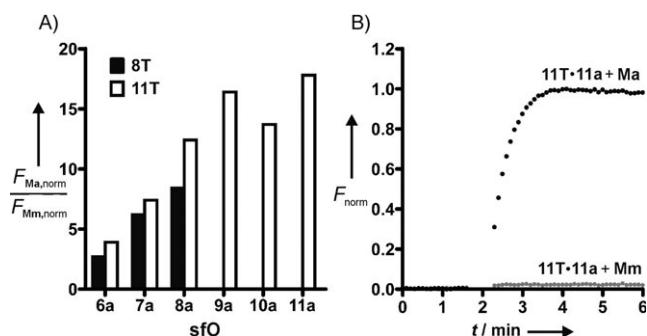


Abbildung 2: A) Aus den Denaturierungsexperimenten berechnete maximale, normalisierte Selektivität (siehe die Hintergrundinformationen) mit der die aus unterschiedlichen tfMBs und sfOs aufgebauten mTBs Matched- von Mismatched-Ziel-DNA unterscheiden können. B) Kinetikexperiment mit Detektion bei $\lambda_{\text{ex}} = 492\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$ bei 43°C. Zugabe von **Ma** oder **Mm** nach 2 min. Bedingungen: 0.2 μM **11T**, 0.3 μM **11a**, 0.4 μM Target (**Ma** oder **Mm**); Puffer: 10 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, pH 9.

selektivsten tMB (**11T-11a**) kinetische Experimente bei 43°C durch. Abbildung 2B zeigt den zeitlichen Verlauf der normalisierten FAM-Fluoreszenz vor und nach der Zugabe von zwei Äquivalenten Target-DNA. Während im Falle des fehlgepaarten Targets (**Mm**) nahezu kein Signalanstieg auftrat, konnte mit dem perfekt komplementären Target (**Ma**) ein deutlicher Anstieg beobachtet werden.

In weiteren Studien ermittelten wir die Abhängigkeit des Fluoreszenzanstiegs, der bei Zugabe des perfekt komplementären Targets erzielt wird, von der Länge des sfO. Aus den Daten der oben beschriebenen Denaturierungsexperimente berechneten wir den Fluoreszenzanstieg bei 20°C (Abbildung 3A). Bei steigender Rückstellkraft, erzielt durch Verlängerung des Triplexbereichs von **7a** zu **11a**, beobachteten wir eine geringere Tendenz zur Öffnung des tMB, wie durch eine geringere Fluoreszenzintensivierung angezeigt wurde. Ein Maximum des Fluoreszenzanstiegs wurde mit sfO **7a** erreicht, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass das kürzere sfO **6a** nicht mehr in der Lage ist, den tMB quantitativ zu schließen. Die Triplex-„beacons“ mit dem

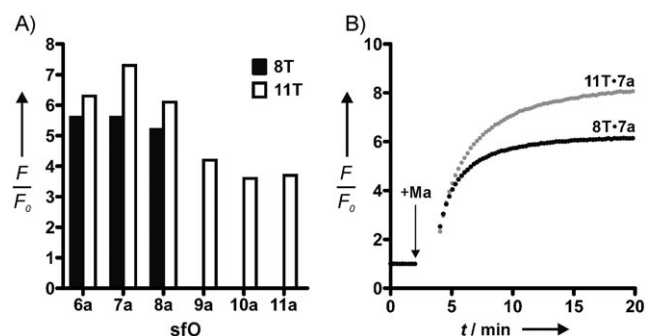


Abbildung 3: A) Aus den Denaturierungsexperimenten berechneter Fluoreszenzanstieg (siehe die Hintergrundinformationen) bei Bindung der tMBs an Ziel-DNA bei 20°C. B) Kinetikexperiment mit Detektion bei $\lambda_{\text{ex}} = 492\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$ bei 20°C. Bedingungen: 0.2 μM tfMB (**8T** oder **11T**), 0.25 μM **7a**, 0.6 μM **Ma**; Puffer: 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, pH 9.0.

längeren Stammbereich (**11T**-sfO) lieferten größere Fluoreszenzanstiege als die kürzeren „beacons“ in (**8T**-sfO). Dies ist mit einer effizienteren Fluoreszenzlöschung in den **11T**-sfO-tMBs zu erklären. Abbildung 3B zeigt Echtzeitmessungen bei Zugabe von drei Äquivalenten **Ma** zu **8T**-**7a** und **11T**-**7a**. Unter diesen Bedingungen erzielten wir einen sechs- bzw. achtfachen Fluoreszenzanstieg. Bemerkenswerterweise konnte selbst beim stabilsten tMB (**11T**-**11a**) ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Dies ist überraschend, wenn man die hohe Stabilität des Triplex-Stammbereichs ($T_m = 60^\circ\text{C}$, Tabelle 1) und die vergleichsweise geringe Stabilität des **11T**-Target-Komplexes ($T_m = 48^\circ\text{C}$) vergleicht. Wir vermuten, dass die Hybridisierung des Targets zunächst die Hoogsteen-Wechselwirkungen aufbricht. Die Affinität des langen sfO **11a** zum Watson-Crick-Strang von **11T** könnte ausreichen, um sowohl Target **Ma** als auch sfO **11a** im Komplex mit **11T** zu halten.^[9] Im Unterschied dazu sollte das kürzere sfO **7a** eine größere Tendenz zur vollständigen Dissoziation aufweisen.

Der modulare Aufbau der tMBs ermöglicht eine sehr einfache Einführung zusätzlicher Funktionalitäten. Als Beispiel konstruierten wir durch Anbindung zusätzlicher Dabcyl-Fluoreszenzlöcher an sfO **7a** (**7a*** und **7a****, Abbildung 4 A)

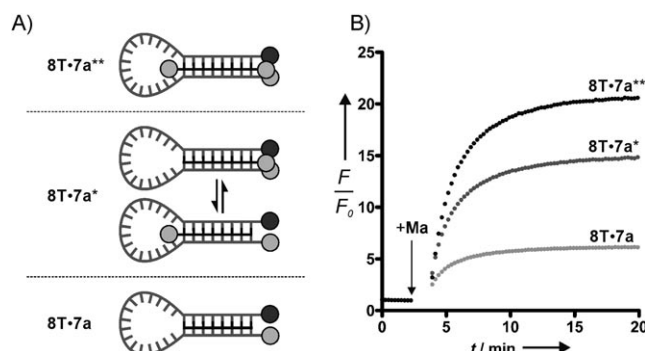


Abbildung 4. A) Konzept der „superquenched“ tMBs (Sequenzen: **7a**** $\text{Ac-HN-Lys(Dabcyl)-a-Lys(Dabcyl)-Lys}_2\text{-Gly}^{\text{CONH}_2}$, **7a*** $\text{Ac-HN-Lys(Dabcyl)-a-Lys}_2\text{-Gly}_2^{\text{CONH}_2}$). B) Kinetikexperiment detektiert bei $\lambda_{\text{ex}} = 492\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$ bei 20°C . Bedingungen: $0.2\text{ }\mu\text{M}$ **11T**, $0.25\text{ }\mu\text{M}$ sfO (**7a**, **7a*** oder **7a****) und $0.6\text{ }\mu\text{M}$ **Ma**; Puffer: 10 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , pH 9.

„superquenched“^[6] tMBs. Das Ziel war es, die Fluoreszenzintensivierung bei Zugabe des Targets durch Absenkung der Fluoreszenzintensität des geschlossenen tMBs zu erhöhen. Tatsächlich führte die Verwendung der Dabcyl-sfOs **7a*** und **7a**** zu einem drastischen Anstieg der Löscheffizienz von 77.6% (**8T**-**7a**) auf 98.3% (**8T**-**7a****) bzw. von 86.0% (**11T**-**7a**) auf 96.9% (**11T**-**7a****). Kinetische Messungen am „Beacon“-System **8T** mit den Dabcyl-markierten sfOs offenbarten den deutlich erhöhten Fluoreszenzanstieg nach Hybridisierung an **Ma** (**7a**: 6.2-fach, **7a***: 14.9-fach, **7a****: 20.8-fach).

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass Triplex-basierte „molecular beacons“ in der Lage sind, die Anwesenheit eines DNA-Targets in homogener Lösung durch Anstieg der Fluoreszenz anzuzeigen. Die Zugabe des Targets erzeugt

einen bis zu achtfachen Fluoreszenzanstieg bei der Verwendung unmarkierter sfOs und einen bis zu 21-fachen Anstieg bei der Verwendung Dabcyl-markierter sfOs. Die Verwendung verbesserter Fluorophor/Fluoreszenzlöcher-Paare sollte zu noch größeren Signalanstiegen führen.^[10] Die erzielte Match/Mismatch-Selektivität des Fluoreszenzanstiegs ist vergleichbar mit derjenigen konventioneller MBs. Das zentrale Merkmal der tMBs ist die Möglichkeit, die Selektivität und die Empfindlichkeit eines gegebenen doppelt markierten Oligonukleotids durch Auswahl des geeigneten triplexbildenden Oligonukleotids justieren zu können. Diese Eigenschaft sollte in Optimierungsstudien, beispielsweise in der qPCR, von Vorteil sein. Demgegenüber bedarf die Optimierung herkömmlicher Detektionssonden einer erneuten Synthese.^[11] Der modulare Aufbau aus zwei Oligonukleotiden (tfMB und sfO) ermöglicht darüber hinaus den sehr einfachen Einbau weiterer Funktionalitäten, z.B. weiterer Fluorophore oder Immobilisierungsanker, ohne die Komplexität (und die Kosten) der „Beacon“-Synthese zu erhöhen. Wir zeigten als Beispiel die Anbindung zusätzlicher Fluoreszenzlöcher, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensivierung führte. Die Konjugation mit chemisch oder biologisch aktiven Einheiten, die bei Freisetzung des sfO ein Signal auslösen, könnte die Vielseitigkeit der tMBs als eine neuartige Klasse leicht modulierbarer DNA-Detektionssonden weiter erhöhen.

Eingegangen am 22. Januar 2007

Online veröffentlicht am 30. Mai 2007

Stichwörter: Bioanalytik · DNA-Erkennung · Fluoreszenzsonden · FRET (resonanter Fluoreszenzenergietransfer) · Molecular beacons

- [1] a) C. A. Foy, H. C. Parkes, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 990–1000; b) R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487–5502.
- [2] a) S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308; b) ausgewählter Übersichtsartikel: W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547–553.
- [3] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6171–6176.
- [4] a) C. Crey-Desbiolles, D. Ahn, C. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e77; b) L. Wang, C. J. Yang, C. D. Medley, S. A. Benner, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15664–15665; c) A. Bourdoncle, A. Estevez Torres, C. Gosse, L. Lacroix, P. Vekhoff, T. Le Saux, L. Jullien, J.-L. Mergny, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11094–11105; d) O. Seitz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3389–3392; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249–3252; e) H. Kuhn, V. V. Demidov, B. D. Gildea, J. M. Fiandaca, J. C. Coull, M. D. Frank-Kamenetskii, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 265–270; f) H. Kuhn, V. V. Demidov, J. C. Coull, J. M. Fiandaca, B. D. Gildea, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097–1103.
- [5] I. Trkljca, S. M. Biner, S. M. Langenegger, R. Häner, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 25–27.
- [6] C. J. Yang, H. Lin, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12772–12774.
- [7] M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65–95.

- [8] a) P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500; b) ausgewählter Übersichtsartikel: P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 16–20.
- [9] R. A. J. Darby, M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, N. Brown, C. Barton, T. Brown, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 39e.
- [10] S. A. E. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 122e.
- [11] a) D. J. French, C. L. Archard, T. Brown, D. G. McDowell, *Mol. Cell. Probes* **2001**, 15, 363–374; b) N. Svanvik, A. Stahlberg, U. Sehlstedt, R. Sjoback, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, 287, 179–182; c) O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938–2939; d) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69–77.
-