

Rolling-Circle-Amplifikation: Anwendungen in der Nanotechnologie und in der Biendetektion mit funktionellen Nucleinsäuren**

Weian Zhao, M. Monsur Ali, Michael A. Brook* und Yingfu Li*

Aptamere · Biosensoren · Funktionelle Nucleinsäuren · Nanoanordnungen · Rolling-Circle-Amplifikation

Die Rolling-Circle-Amplifikation (RCA) ist ein isothermer enzymatischer Prozess, der durch bestimmte DNA-Polymerasen vermittelt wird. Bei der RCA werden lange einzelsträngige (ss) DNA-Moleküle mithilfe eines einzelnen DNA-Primers an einer kurzen ringförmigen ssDNA-Matrize synthetisiert. Die RCA hat sich als eine Standardamplifikationsmethode für die ultraempfindliche DNA-Detektion in der Genomik und Diagnostik bewährt. Neuerdings ist es gelungen, die RCA als Verfahren für die Erzeugung von DNA-Matrizen im großen Maßstab nutzbar zu machen. Die so erzeugten Matrizen können zur Herstellung von periodischen Nanoanordnungen eingesetzt werden. Darüber hinaus wurden verschiedene RCA-Strategien entwickelt, um repetitive Sequenzen von DNA-Aptameren und DNAzymen herzustellen, die als Detektionsplattformen für kleine Moleküle und Proteine fungieren. Diese neuen Verfahren machen die RCA zu einer höchst vielseitigen Methode für die Vervielfältigung von DNA, die breite Anwendungsmöglichkeiten in der Genomik, Proteomik, Diagnostik, Biosensorik, Wirkstoffentwicklung und Nanotechnologie finden wird.

1. Einleitung

Mitte der 90er Jahre wurde entdeckt, dass bestimmte DNA-Polymerasen die Fähigkeit haben, einen kurzen DNA-Strang (Primer), der an eine kleine ringförmige ssDNA-Matrize gebunden ist, kontinuierlich zu verlängern.^[1a–g] Der Prozess ist heute als Rolling-Circle-Amplifikation (RCA)

bekannt (Abbildung 1A).^[1h,i] Gewöhnlich können die ringförmigen DNA-Matrizen zwischen 13 und 240 Nucleotide (nts) enthalten. In einem typischen RCA-Prozess repliziert die DNA-Polymerase die ringförmige Matrize hunderte bis tausende Male, sodass als Endprodukte einer RCA-Reaktion extrem lange ssDNA-Moleküle mit repetitiven Sequenzeinheiten entstehen, die zur ringförmigen DNA-Matrize komplementär sind (Abbildung 1B). Die DNA-Produkte enthalten dann gewöhnlich hunderttausende Nucleotide und erreichen Längen zwischen hunderten von Nanometern bis einigen Mikrometern.

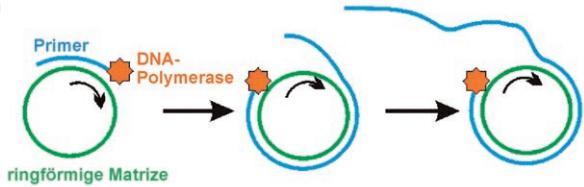
In der Folgezeit begann man rasch, die RCA als Methode zur DNA-Amplifikation und vor allem als Technik für die ultraempfindliche DNA-, RNA- und Proteindetektion in der diagnostischen Genomik und Proteomik nutzbar zu machen.^[2] Verbreitete Anwendung fand die RCA vor allem in der DNA-Analyse mithilfe so genannter Padlock-Sonden.^[2a–c,3] Die Methode verwendet eine lineare DNA-Sonde, deren beide Enden durch die spezifische Hybridisierung an eine DNA- oder RNA-Zielsequenz in unmittelbare Nähe gebracht werden. Die beiden Enden der DNA-Sonde werden durch eine DNA-Ligase verbunden, und der entstehende DNA-Ring fungiert als Matrize für eine RCA-Reaktion mit einer geeigneten DNA-Polymerase (z.B. Phi29-DNA-Polymerase)^[4] und dNTPs (dATP, dCTP, dTTP und dGTP). Das

[*] W. Zhao, Prof. Dr. M. A. Brook, Prof. Dr. Y. Li
Department of Chemistry, McMaster University
1280 Main Street West, Hamilton, ON, L8P 4M1 (Kanada)
Fax: (+1) 905-522-9033
E-Mail: mabrook@mcmaster.ca
liying@mcmaster.ca

Dr. M. M. Ali, Prof. Dr. Y. Li
Department of Biochemistry and Biomedical Sciences
McMaster University
1200 Main Street West, Hamilton, ON, L8N 3Z5 (Kanada)

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

A)



B)

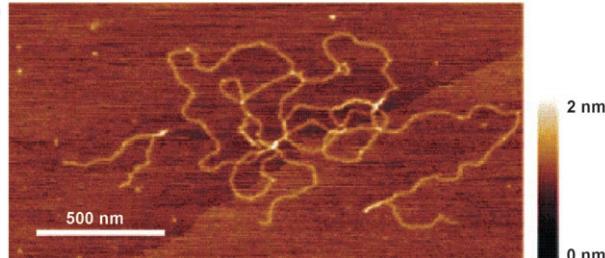
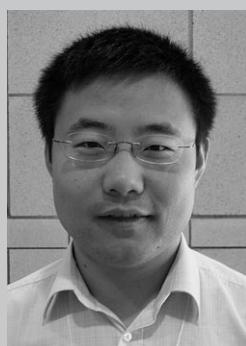


Abbildung 1. A) Prinzip des RCA-Prozesses. Ein kurzer DNA-Primer (blaue Kurve) hybridisiert zunächst mit einer ringförmigen ssDNA-Matrize (grüner Ring). Eine DNA-Polymerase (orangefarbener Stern) fügt dann fortwährend Nukleotide an den Primer an und kopiert dabei die ringförmige Matrize. Da die Bildung kleiner ringförmiger DNA-Doppelstrände geometrischen Beschränkungen unterliegt, wird angenommen, dass sich die ssDNA während der Polymerasereplikation spontan und selbsttätig von der ringförmigen DNA-Matrize abwickelt (anstatt von der Polymerase verdrängt zu werden).^[1, g, 2b, f] Die Länge der neu synthetisierten Ketten ist hauptsächlich durch die endliche Prozessivität der Polymerase begrenzt: Hoch prozessive DNA-Polymerasen (z. B. Phi29-DNA-Polymerase) bleiben länger an die ringförmige DNA-Matrize gebunden (und produzieren deshalb längere RCA-Produkte) als geringer prozessive Polymerasen.^[2f] B) Ein typisches Rasterkraftmikroskopie-(AFM)-Bild zeigt, dass die durch RCA produzierten ssDNA-Moleküle Längen zwischen einigen hundert Nanometern bis mehrere Mikrometer erreichen können. Die Skalierung entspricht 500 nm. Wiedergabe nach Lit. [10] mit Genehmigung.



Weian Zhao erwarb seinen M.Sc.-Grad in Chemie 2003 am Key Laboratory of Colloid and Interface Chemistry an der Shandong University (China) mit einer Arbeit über Polymerkomposite. 2004 begann er seine Promotion am Department of Chemistry an der McMaster University (Kanada) bei Dr. Yingfu Li und Dr. Michael A. Brook. Sein Forschungsinteresse gilt nucleinsäurestrukturierten Nanopartikelanordnungen und Biosensoren.



M. Monsur Ali promovierte 2003 an der pharmazeutischen Fakultät der Kyushu University (Japan) bei Prof. Shigeki Sasaki mit einer Arbeit über bioorganische und synthetische Chemie von Nucleinsäuren. In derselben Arbeitsgruppe war er anschließend Postdoc (CREST, JST-Stipendium) bis 2005. Danach wechselte er in die Arbeitsgruppe von Dr. Yingfu Li an die McMaster University, wo er zurzeit über Nucleinsäure-Biosensoren mit DNA-Aptameren und Desoxyribozymen forscht.

RCA-Produkt kann nach Hybridisierung mit komplementären DNA-Oligonucleotiden, die mit einem Fluorophor markiert sind, im Konfokalmikroskop sichtbar gemacht werden.^[5] Außerdem besteht die Möglichkeit, den RCA-Prozess mit Hilfe molekularer Leuchtfeuer (Beacons),^[6] molekularer Reißverschlüsse^[7] oder fluorogener Farbstoffe^[8] in Echtzeit zu verfolgen. Die RCA wurde auch zur Signalverstärkung in Mikroarray-Immunassays für Proteomikanwendungen verwendet.^[2e, 9] Nach Kupplung des RCA-Primers an den Detektionsantikörper führt die Antigen-Antikörper-Bindung zur Immobilisierung des Primers auf der Mikroarrayoberfläche. Der Primer wird anschließend genutzt, um eine RCA-Reaktion zu starten, die ein langes ssDNA-Molekül ergibt, das durch Hybridisierung mit einer fluoreszierenden DNA-Sonde direkt sichtbar gemacht werden kann.

Die RCA zeichnet sich durch mehrere attraktive Eigenarten aus: 1) Ein Vorteil gegenüber der Polymerasenkettenreaktion (PCR) – der am häufigsten verwendeten Methode zur DNA-Amplifikation – ist das isotherme Verhalten der Phi29-DNA-Polymerase (die die DNA-Polymerisation bei einer konstanten Temperatur (30°C oder sogar Raumtemperatur) katalysiert), sodass man keine thermisch stabile DNA-Polymerase benötigt, ebensowenig wie eine komplizierte Instrumentierung. 2) RCA-basierte Assays bieten sowohl hohe Empfindlichkeiten als auch hohe Spezifitäten. Als Methode zur Signalverstärkung (entweder durch lineare Verstärkung oder durch exponentielles Wachstum)^[3b, 11] (zur Erläuterung des exponentiellen Wachstums siehe die Hintergrundinformationen) ergibt die RCA typische Verstärkungsfaktoren von ca. 1000 (lineare Verstärkung) bis 10000. Zudem ist die Zählung einzelner Moleküle möglich, da das Signal (tausende von Fluorophoren) auf einem einzelnen Molekül



Michael Brook promovierte 1984 in organischer Chemie an der McGill University (Kanada). Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der ETH Zürich bei Prof. Dieter Seebach wurde er 1985 Assistant Professor und 1997 ordentlicher Professor an der McMaster University. Seine Forschungsinteressen liegen im Bereich der Biomaterialien, insbesondere der Siliconkomposite. Zurzeit ist er Direktor des Centre for Advanced Ophthalmic Materials an der McMaster University.



Yingfu Li studierte Chemie an der Anhui University in China (BSc 1983) und erwarb seinen MSc-Abschluss in organischer Synthese an der China Agriculture University (1986). Er promovierte 1997 in Biochemie an der Simon Fraser University in Kanada bei Prof. Dipankar Sen. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Yale University bei Ronald Breaker wurde er 1999 Assistant Professor am Department of Biochemistry and Biomedical Sciences an der McMaster University. Zurzeit ist er Associate Professor und hält einen Canada Research Chair. Seine Forschungsinteressen gelten katalytischer DNA, Aptameren, Biosensoren, nichtcodierenden RNAs und der Nanotechnologie.

(oder als einzelner Fleck auf dem festen Substrat) lokalisiert ist.^[3b, 12] Die hohe Spezifität röhrt daher, dass eine RCA-Reaktion nur nach der spezifischen Hybridisierung zwischen einem Primer und der passenden ringförmigen DNA-Matrize gestartet werden kann. Im Fall der Padlock-Sonden^[3] ist außerdem eine spezifische ligasevermittelte Reaktion erforderlich, um die ringförmige Matrize zu erzeugen. Dies macht RCA-basierte Assays zu hoch spezifischen und außerordentlich nützlichen Verfahren für die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs).^[2a-c, 3, 13] 3) Die RCA kann leicht für eine Vielzahl von Detektionssystemen adaptiert werden (z. B. für Mikroarrays) und ist für die parallele und die Hochdurchsatzanalyse geeignet.^[2c, 3b, 9a-d] Tatsächlich sind in den letzten zehn Jahren ausführliche Studien zur Anwendung der RCA als Amplifikationsmethode insbesondere für die Nukleinsäurediagnostik unternommen worden, und man hat große Erfolge erzielt. Mehrere ausgezeichnete Übersichten wurden veröffentlicht, die einen allgemeinen Überblick über die Grundlagen der RCA, Padlock-Sonden und RCA-basierte Proteinmikroarrays geben.^[2]

Einige spannende neue Entwicklungen wurden in jüngerer Zeit bei Anwendungen der RCA in der Nanotechnologie und in Bioassays mit funktionellen Nukleinsäuren erzielt. Aus Sicht der Materialwissenschaft sind die repetitiven DNA-Sequenzen innerhalb der RCA-Produkte äußerst nützlich und ermöglichen es, solche Moleküle als Matrizen für den Aufbau von periodischen Nanoanordnungen zu verwenden.^[10, 14, 15] Noch wichtiger ist die Tatsache, dass man die Eigenschaften der Matrize fein abstimmen kann, einfach indem man die Länge und Sequenzinformation der für eine gegebene RCA-Reaktion verwendeten, ringförmigen Matrize vorgibt. Wegen ihrer relativ großen Abmessungen können RCA-Produkte zur Verbrückung von Nanoanordnungen und zur Herstellung von mikro- oder gar makroskaligen Materialien dienen.^[16] Darüber hinaus ist die RCA geeignet, um strukturelle DNA-Motive wie Nanokreuzungen (Nanojunctions)^[17] und DNAzyme^[18, 19] zu amplifizieren. In Kombination mit funktionellen Nukleinsäuren (z. B. DNA-Aptameren und DNAzymen)^[20] kann die Anwendung von RCA-basierten Assays von der Nukleinsäuredetektion hin zur sensorischen Erkennung diverser Zielanalyte (wie Proteine^[8, 21] und kleine Metabolite^[22]) ausgeweitet werden. Schließlich kann die Anwendung der RCA zur Herstellung enzymatischer DNA-Produkte zu weiteren Verbesserungen der Detektionsempfindlichkeit führen.^[18, 19] In diesem Kurzaufsatzz befassen wir uns in erster Linie mit der Anwendung der RCA zur Herstellung von Nanoanordnungen, zur Synthese von wohldefinierten Nanostrukturen und in der Biosensorik mit funktionellen Nukleinsäuren.

2. RCA in der Nanotechnologie

2.1. Matrizen für periodische Anordnungen

In einer RCA-Reaktion fügt eine DNA-Polymerase fortwährend Nukleotide an den Primer an und erzeugt so eine neue DNA-Kette, indem es die gleiche ringförmige DNA-Matrize Runde für Runde kopiert. Dieser Prozess führt zur

Bildung von langen ssDNA-Produkten, die Tandemwiederholungen von DNA-Sequenzen enthalten. Ihre repetitive Struktur macht die RCA-Produkte zu exzellenten Matrizen für den Aufbau von eindimensionalen periodischen Nanoanordnungen (Abbildung 2 A).

Die Forschungsgruppen um Mao und Simmel haben die Anwendung von RCA-Produkten als Matrizen für die Anordnung von mit komplementären DNA-Oligonukleotiden modifizierten Gold-Nanopartikeln (AuNPs) beschrieben (Abbildung 2 B).^[10, 14] Wir haben kürzlich untersucht, ob RCA-Reaktionen direkt an Nanopartikeloberflächen ausgeführt werden können, und wir fanden, dass eine solche Reaktion ein dreidimensionales Gerüst zugänglich macht, an das Nanospezies, die mit einem komplementären Oligonukleotid

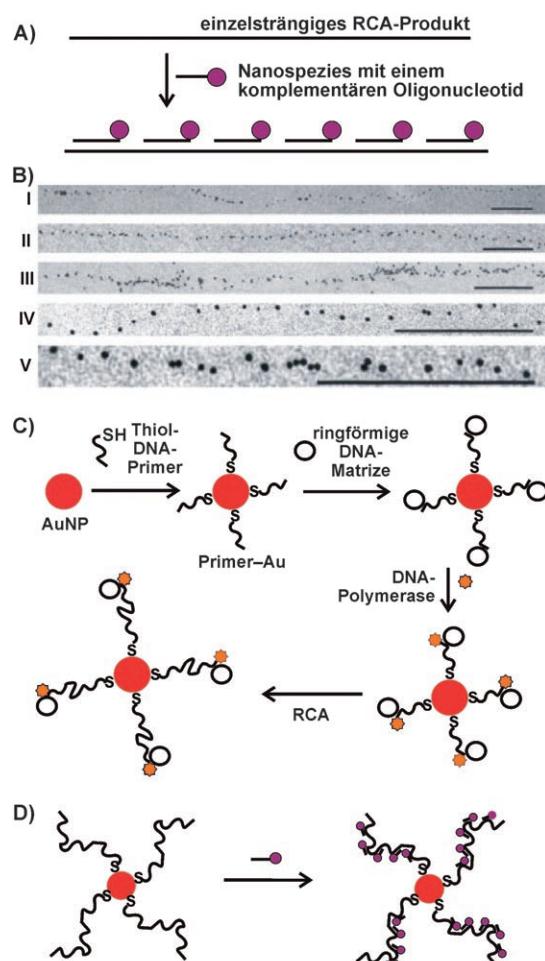


Abbildung 2. A) Bildung einer 1D-Nanoanordnung an ssDNA-Matrizen, die durch RCA-Reaktion hergestellt wurden. B) Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bilder von 1D-Anordnungen von Gold-Nanopartikeln (AuNPs), die an einem RCA-Produkt gebildet wurden. IV und V sind vergrößerte Ausschnitte der Anordnungen in I und II. Die Skalierungen entsprechen 200 nm. Wiedergabe nach Lit. [14] mit Genehmigung. C) Die Herstellung einer DNA-AuNP-Struktur durch RCA-Reaktion an einem AuNP-Kern.^[15] Thiolmodifizierte DNA-Primer, die an den AuNPs angebracht wurden, werden durch DNA-Polymerase mithilfe einer ringförmigen DNA-Matrize verlängert. D) Eine Struktur bestehend aus multiplen RCA-Produkten an einem AuNP kann als Gerüst für größere periodische Nanoanordnungen dienen. Wiedergabe nach Lit. [15].

versehen sind, periodisch angebracht werden können (Abbildung 2 C,D).^[15] Willner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass RCA-Produkte als Matrize für die Bildung von komplexen Proteinnanostrukturen dienen können. In dieser Studie (Abbildung 3) enthielt die ringförmige DNA-Matrize, die

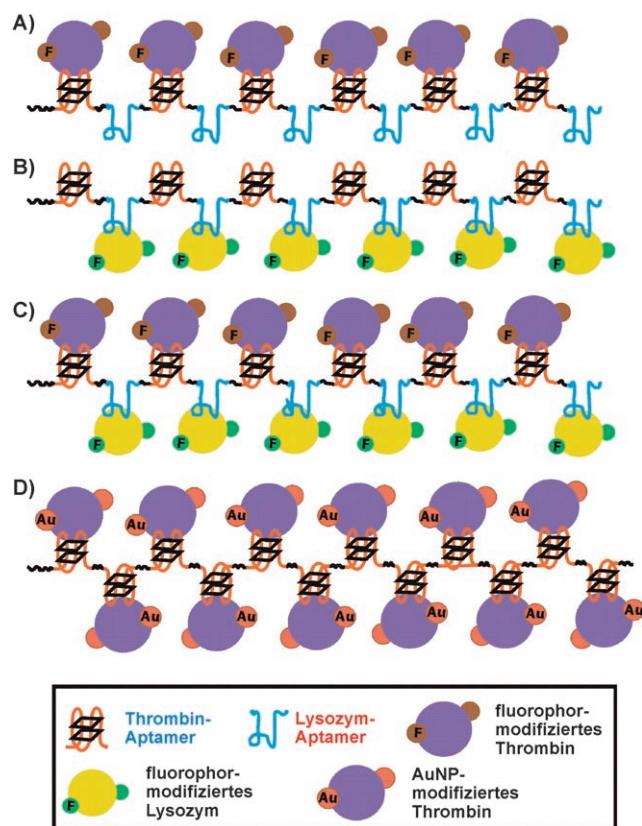


Abbildung 3. Protein- und AuNP-Nanostrukturen, die durch Verwendung von RCA-Produkten als Matrizen hergestellt wurden. Die RCA-Produkte in (A–C) sind ssDNA-Moleküle mit repetitiven Aptamersequenzen für die Thrombin- und Lysozym-Erkennung. Das RCA-Produkt in (D) trägt ausschließlich Thrombin-bindende Aptamersequenzen. Die Strukturen in (A–C) sind mithilfe von RCA-Matrizen hergestellte Anordnungen von fluorophor-modifiziertem Thrombin, fluorophor-modifiziertem Lysozym bzw. beiden. Die Struktur in (D) ist eine mithilfe einer RCA-Matrize hergestellte AuNP-modifizierte Thrombinüberstruktur. Wiedergabe nach Lit. [23].

für die RCA-Reaktion eingesetzt wurde, die Antisense-Sequenz für zwei unterschiedliche Aptamere (zur Erkennung von Thrombin bzw. Lysozym).^[23] Die Autoren zeigten, dass die langen RCA-Produkte zur Anordnung von Thrombin und/oder Lysozym durch Aptamer-Protein-Bindung genutzt werden können. Die Komplexität der Anordnungen konnte durch Einführung von AuNPs (durch chemische Konjugation) weiter erhöht werden.^[23]

Die Verwendung von RCA-Produkten als Matrizen zum Aufbau von Nanoanordnungen hat mehrere Vorteile: 1) Da die Wiederholungseinheiten in einem RCA-Produkt die gleiche Länge haben wie die ringförmige Matrize, kann man den Abstand zwischen angefügten Nanospezies leicht vorgeben, indem man die Länge der ringförmigen Matrize einstellt (wenngleich es praktische Einschränkungen bezüglich der

verfügbareren Größen gibt; siehe Lit. [1a]). 2) Die Sequenz der Wiederholungseinheiten in einem RCA-Produkt ist in der ringförmigen Matrize codiert (bzw. zu dieser komplementär). Dadurch hat man relativ freie Hand beim Entwurf von Nanostrukturen. 3) Wegen der relativ großen Abmessungen der RCA-Produkte kann die Bildung der Nanoanordnungen über größere Längenskalen (Mikro- oder Makroskala) erfolgen. Dies könnte zum Aufbau von mikro- oder makroskopischen Bauelementen genutzt werden.^[16] Ein großes Problem ist jedoch, dass zwischen den RCA-Produktmolekülen eine unspezifische Vernetzung auftreten kann, wenn die angefügten Nanospezies mehrere Oligonukleotide enthalten.^[10,14] Eine Lösung hierfür ist die Verwendung von monofunktionalisierten DNA-Nanospezies.^[24] Ein weiterer, offensichtlicher Nachteil bei der Anwendung der RCA zur Herstellung von Matrizen für Nanoanordnungen liegt darin, dass keine variablen Bindungsstellen für die Immobilisierung von Nanospezies erzeugt werden können, da die RCA nur Concatemere mit identischen Sequenzeinheiten erzeugt (wenngleich Willner und Mitarbeiter die gleichzeitige Anordnung von zwei Arten von Nanospezies beschrieben haben).^[23] Eine Lösung für dieses Problem könnte ein Gerüst bestehend aus einer Reihe von RCA-Produkten mit unterschiedlichen Sequenzen sein.

2.2. Synthese von Nanostrukturen

Der RCA-Prozess kann auch zur Herstellung interessanter DNA-Nanostrukturen verwendet werden. Wichtig ist dabei, dass man die Sequenz des Produkts durch Codierung der komplementären Sequenz in der ringförmigen Matrize genau festlegen kann. Erste Beispiele hierfür stammen von Kool und Mitarbeitern, die die Anwendung der RCA zur Herstellung von künstlichen humanen Telomeren mithilfe einer ringförmigen Matrize mit komplementärer Hexamersequenz beschrieben.^[25] Diese synthetischen Telomere sind von großer Bedeutung für die Untersuchung von In-vivo-Systemen.^[25]

Wegen der hohen Prozessivität der Phi29-DNA-Polymerase und ihrer Fähigkeit, doppelsträngige (ds) DNA zu verdrängen,^[4] ist eine RCA auch dann effektiv, wenn die ringförmige Matrize topologischen Randbedingungen unterliegt (d. h. eine Sekundärstruktur aufweist).^[26] Dadurch ist man in der Lage, DNA-Produkte mit diversen Sekundärstrukturen zu erzeugen (wie Doppelstränge, Haarnadeln und Kreuzungsmotive), die wichtige Bestandteile von funktionellen Nucleinsäuren und in der DNA-Nanotechnologie sind.^[27] Yan und Mitarbeitern gelang es kürzlich, mithilfe einer RCA-Methode eine DNA-Vierwegekreuzung zu amplifizieren. Damit steht eine neuartige Strategie zur Herstellung großer Mengen verzweigter DNA-Kreuzungen zur Verfügung (Abbildung 4).^[17a] Eine wichtige Methode, die in dieser Studie angewendet wurde, ist der enzymatische Verdau der RCA-Produkte mithilfe von Restriktionsenzymen (z. B. PstI), der monomere DNA-Nanokreuzungen ergibt.^[17a] Wir haben außerdem gefunden, dass man durch sorgfältiges Abstimmen der Reaktionsbedingungen (z. B. der Reaktionszeit) für den enzymatischen Verdau die Länge der Spaltprodukte festlegen kann (d. h. Monomere, Dimere, Trimere usw.).^[12a,15] Diese

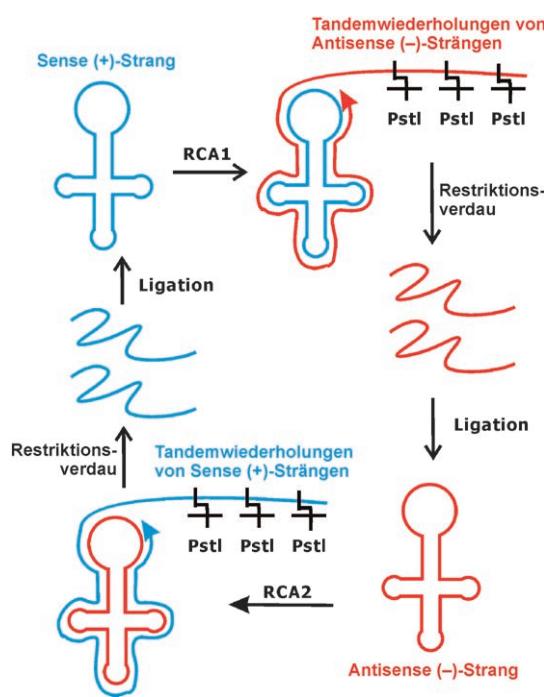


Abbildung 4. Amplifizierung einer DNA-Vierwegekreuzung durch RCA.^[17] Eine linierte DNA-Vierwegekreuzung (blau; bezeichnet als Sense(+)-Strang) dient als Matrize für eine RCA-Reaktion. Das RCA-Produkt, das komplementär zur ringförmigen Matrize ist (bezeichnet als Antisense(-)-Strang) wird durch ein Restriktionsenzym (PstI) in monomere Wiederholungseinheiten (rot) gespalten. Es folgt eine weitere RCA-Reaktion an der linierten ringförmigen Antisense(-)-Matrize mit anschließendem Verdau mit dem gleichen Restriktionsenzym, wobei eine große Zahl von Sense-Strängen erzeugt wird. Wiedergabe nach Lit. [17a].

können dann abgetrennt und durch Gelelektrophorese isoliert werden. Yan und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass auch komplexere, mehrfach überkreuzte DNA-Nanostrukturen durch RCA amplifiziert werden können. Diese Studie zeigte einen Weg auf, um virale DNA in Zellen zu klonieren.^[17b] Die Synthese von DNAzymen mit hoch konservierten Sekundärstrukturen wurde ebenfalls vorgestellt (siehe Abschnitt 3).^[18,19]

Diese ersten Erfolge deuten stark darauf hin, dass sich die RCA-Technik als eine leistungsfähige Methode zur Herstellung von DNA-Strängen mit gewünschter Länge, Sequenz und Struktur etablieren könnte. So erzeugte DNA-Moleküle, die mit anderen Methoden nur schwer zugänglich sind, könnten dann durch gut verfügbare, leistungsfähige enzymatische Reaktionen wie enzymatischen Verdau und Ligierung weiter umgesetzt werden, je nach ihrer spezifischen Verwendung in der Nano- und Biotechnologie.^[27]

3. RCA in Bioassays mit funktionellen Nucleinsäuren

Die Anwendung der RCA als eine Methode zur Signalverstärkung wurde mit großem Erfolg in der Nucleinsäurediagnostik vorgeführt.^[3] In einem repräsentativen Beispiel wurden ringförmige DNA-Matrizen – bezeichnet als Padlock-

Sonden – mit der betreffenden Nucleinsäuresequenz (oft als Primer bezeichnet) hybridisiert, und dieses Einzelbindungsereignis wurde anschließend mehrere tausend Male durch den RCA-Prozess amplifiziert.^[3] Diese Art von Assay wurde erfolgreich zur Genotypisierung von DNA-Sequenzen und zur SNP-Analyse angewendet. Vor kurzem wurden auch Sandwich-Immunassays zur Detektion von Proteinen und anderen Antigenen auf der Grundlage von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen entwickelt.^[2c,9] In einem typischen Chip-basierten Sandwich-Immunassay wird ein Ziel-Analyt durch einen spezifischen Antikörper, der an einen Chip konjugiert ist, gebunden. Ein zweiter Antikörper bindet dann an den konjugierten Analyten. Anschließend wird ein dritter, universeller Antikörper, an den der RCA-Primer angebracht ist, an den zweiten Antikörper konjugiert, der dann der RCA-Amplifizierung unterzogen wird.^[2c] Seit der ersten Beschreibung im Jahr 2000^[9c] wurden RCA-amplifizierte Antikörperchips in zunehmendem Maße zur Mehrkanal-Proteinprofilierung in der Krankheitsdiagnostik und im Wirkstoff-Screening eingesetzt. Die Verwendung dieser Assays dürfte jedoch durch die inhärenten Nachteile von Antikörpern eingeschränkt sein (schwierige Herstellung, relativ geringe Stabilität usw.).^[2c,9] Zudem sind zusätzliche Konjugationsschritte nötig, um den RCA-Primer am Antikörper anzubringen.^[9]

Neueste Studien haben gezeigt, dass durch Anwendung der RCA in Kombination mit funktionellen Nucleinsäuren^[20] (Aptameren und Aptazymen) eine deutlich größere Bandbreite von Zielstrukturen als in gewöhnlichen RCA-basierten Assays detektiert werden kann. DNA- oder RNA-Aptamere,^[28] die Nucleinsäureäquivalente von Antikörpern, spielen eine besondere Rolle in der Biodetektion, Wirkstoffentwicklung und Nanotechnologie.^[20,27d] Aptamere, die durch einfache, aber leistungsfähige In-vitro-Selektion erhalten werden können, sind Nucleinsäuresequenzen, die spezifisch an ihre Zielstruktur binden.^[28] Die Entwicklung von Strategien der In-vitro-Selektion hat dazu geführt, dass man Aptamere rasch als eine vielversprechende Klasse von Molekülen erkannt hat, die in der Diagnostik eine ähnlich wichtige Rolle spielen könnten wie die Antikörper.^[20] Tatsächlich haben Aptamere in bestimmten Fällen Vorteile gegenüber Antikörpern:^[20c] 1) Aptamere werden durch In-vitro-Selektion erzeugt, sodass, anders als bei der Herstellung von Antikörpern, keine Tierzellen benötigt werden. Darüber hinaus lassen sich die Bedingungen einer In-vitro-Selektion leicht steuern, sodass Aptamere mit gewünschten Eigenschaften erhalten werden können. 2) Einmal identifiziert, können Aptamere durch relativ einfache chemische Methoden mit ausgezeichnete Genauigkeit und Reproduzierbarkeit synthetisiert werden. Während der chemischen Synthese ist es außerdem leicht, Modifikationen, z.B. Fluorophore, in die Aptamerstränge einzuführen. 3) Aptamere sind stabiler gegen Denaturierung (z.B. durch hohe Temperaturen). Diese Eigenschaften machen Aptamere zu vielversprechenden Spezies für diagnostische Assays, für die bisher hauptsächlich Antikörper eingesetzt wurden.

Die Kombination von Aptamer-Bindung und DNA-Amplifikation wurde erstmals in umgebungsabhängigen Assays zur Proteindetektion genutzt. Landegren und Mitarbeiter entwickelten PDGF-Sensorassays (PDGF = Blutplättchen-

Wachstumsfaktor), bei denen die simultane Bindung von PDGF durch zwei Aptamere die Ligation dieser beiden Aptamere vermittelte und die ligierten DNA-Moleküle anschließend durch PCR amplifiziert wurden.^[29] In weiteren Arbeiten über solche Ligationssysteme wurde RCA als Ersatz von PCR genutzt.^[30]

Basierend auf der Isolierung zweier thrombinbindender DNA-Aptamere, die die Eigenschaft haben, Thrombin an unterschiedlichen Orten zu erkennen, entwickelten King und Mitarbeiter folgende Strategie für die Thrombin-Detektion: Zunächst wurde eines der Aptamere in die ringförmige Form überführt, das andere jedoch in der linearen Form belassen. Hierbei wurden die Sequenzen beider Aptamere in der Weise modifiziert, dass mindestens sechs Nucleotide am Ende der linearen Aptamerkette einen kurzen (und deshalb extrem schwachen) Doppelstrang mit dem ringförmigen Aptamer bilden können. In Abwesenheit von Thrombin wurde kein Doppelstrang gebildet, da die Wechselwirkungen in diesem Fall zu schwach sind. Sobald dagegen Thrombin vorgelegt wird, binden beide Aptamere dasselbe Thrombinmolekül, wodurch der DNA-Doppelstrang gebildet und somit der RCA-Prozess gestartet wird (das lineare Aptamer fungierte als der Primer, das ringförmige Aptamer als die Matrize; siehe Abbildung 5 A).^[8] Der RCA-Prozess wurde mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit verfolgt. In einer weiteren Studie entwarfen Ellington und Mitarbeiter ein RCA-basiertes Sensorsystem für die PDGF-Detektion mithilfe eines DNA-Aptamers, das einen analytinduzierten Konformationswechsel eingehen kann,^[31] der die beiden Enden des DNA-Aptamers in unmittelbare Nähe bringt und so für eine Ligationsreaktion vorbereitet (Abbildung 5 B).^[21] Der ligierte DNA-Ring kann als Matrize für die nachfolgende

RCA-Reaktion dienen. Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte auch eine Anwendung der RCA zur Detektion einer niedermolekularen Verbindung, ATP.^[22] Die funktionelle Nucleinsäure, die in dieser Studie eingesetzt wurde, war ein Aptazym, dessen katalytische Aktivität durch ATP moduliert wird. Wie in Abbildung 6 gezeigt wird, agiert das Aptazym in Gegenwart von ATP wie eine DNA-Ligase und erzeugt die ringförmige Matrize für die nachfolgende RCA-Reaktion.

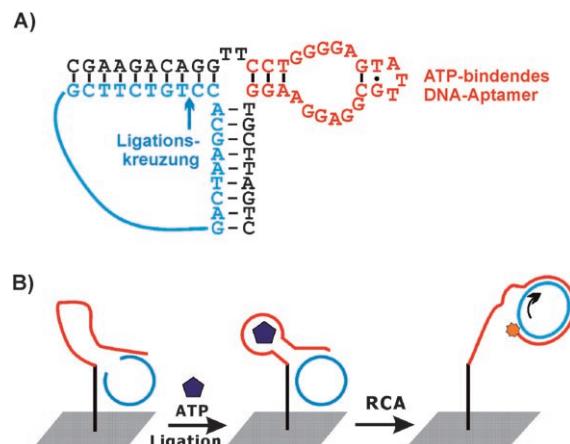


Abbildung 6. A) Sequenzentwurf eines Aptazys, das auf die Bindung von ATP hin eine DNA-Ligation katalysiert. Schwarz: DNA-Ligase, rot: ATP-bindende Aptamerdomäne, blau: Padlock-Sonde. B) Prinzip der Aptazym-vermittelten RCA-Reaktion in einem Mikroarray-Format. Zuerst wird das Aptazym an einen Glasträger gebunden (durch Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung). Das Aptazym wird durch ATP aktiviert und ligt die Padlock-Sonde, die sodann die RCA-Reaktion bewirken kann. Das RCA-Produkt kann mithilfe von Fluoreszenzsonden sichtbar gemacht werden. Wiedergabe nach Lit. [22].

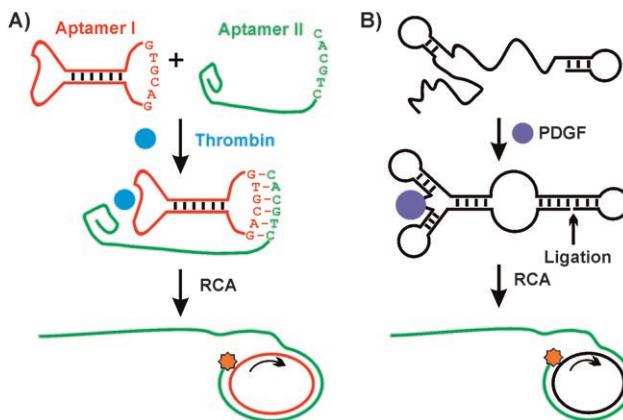


Abbildung 5. A) Umgebungsabhängiger Assay für die Thrombin-Detektion mit Aptameren als Erkennungselementen und RCA als Amplifikationsmethode (nach Lit. [8]). Die gleichzeitige Bindung eines Thrombinmoleküls durch ein lineares Aptamer (das zugleich als der RCA-Primer dient) und ein ringförmiges Aptamer (das als RCA-Matrize dient) ermöglicht eine RCA-Reaktion. B) Der Entwurf eines Assay für die PDGF-Detektion mithilfe eines strukturschaltenden Aptamers und RCA (nach Lit. [21a]). Die Bindung von PDGF an das Aptamer verursacht eine Konformationsänderung im Aptamer, die zur Bildung einer Ligationsstelle führt. Nach Ligation durch eine DNA-Ligase dient das zirkulare Aptamer als ringförmige Matrize für die RCA. In beiden Assays löst eine einzelne Protein-Aptamer-Bindung die RCA-Reaktion aus, die das Signal tausendfach verstärkt.

Die Assays können homogen in Lösung oder heterogen auf Mikroarrayträgern ausgeführt werden.^[22] Der RCA-Prozess lässt sich mithilfe molekularer Beacons oder Fluoreszenzsonden in Echtzeit verfolgen.^[8, 21, 22] Die Kombination von funktionellen Nucleinsäuren mit dem RCA-Prozess bietet mehrere Vorteile: 1) Gegenüber den konventionellen RCA-basierten Assays, die in erster Linie zur Detektion von Nucleinsäuren genutzt werden, ermöglicht die Verwendung von Aptameren den Entwurf RCA-basierter Assays, die eine viel breitere Spanne von Analyten erfassen können (Proteine, Metabolite, niedermolekulare Verbindungen, Metallionen und sogar lebende Zellen). Im Prinzip ist es möglich, durch In-vitro-Selektion ein Aptamer für jede spezifische Zielstruktur zu erhalten.^[28] 2) Durch Verwendung eines Aptamers können einige der bei Antikörper-basierten RCA-Immunoassays erforderlichen Schritte eingespart werden (z.B. die chemische Konjugation des RCA-Primers mit dem Antikörper). 3) Wie schon erwähnt, sind DNA-Aptamere stabiler und in der Synthese kostengünstiger als Antikörper.^[20c, 32] Darüber hinaus können funktionelle Gruppen (Fluorophore, Biotin, Thiolgruppen usw.) einfach und in genauen Positionen in Aptamersequenzen eingefügt werden, sodass es relativ leicht ist, RCA-basierte Assays auf Basis funktioneller Nucleinsäuren an unterschiedlichste Detektionssysteme anzupassen.^[20c, 32]

Noch wichtiger ist vielleicht, dass mit diesen Assays hohe Empfindlichkeiten erreicht werden können, da ein einzelnes biomolekulares Erkennungsergebnis durch den RCA-Prozess tausendfach verstärkt wird. Jüngste Studien der Arbeitsgruppen um Willner und Mao haben gezeigt, dass die Empfindlichkeit weiter gesteigert werden kann, wenn DNAzyme (DNA-Sequenzen, die chemische Reaktionen katalysieren können)^[33] als RCA-Produkte resultieren (Abbildung 7).^[18,19]

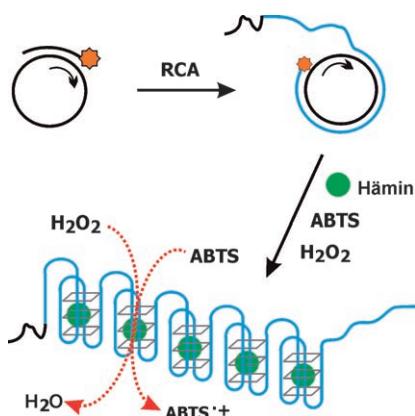


Abbildung 7. RCA-Prozess zur Erzeugung zahlreicher Kopien von DNAzymen, die die Funktion von Peroxidase nachahmen und die Oxidation von ABTS katalysieren. Das Signal wird zweimal verstärkt – zuerst durch RCA, dann durch das DNAzym –, sodass eine ultraempfindliche Detektion resultiert. Wiedergabe nach Lit. [18].

In diesen Experimenten erzeugte der RCA-Prozess tausende von DNAzymen, die auf die Bindung von Hämin hin die Funktion der Peroxidase nachahmen. Das DNAzym katalysiert die Oxidation von 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) zu ABTS⁺ (oder von ABTS²⁻ zu ABTS) durch H₂O₂; die Reaktion kann durch Messung der optischen Absorption verfolgt werden.^[34] Da die enzymatische Reaktion mehrere Turnover ausführt (jedes DNAzym kann mehrere Produkte erzeugen), wird das Signal auf zwei Ebenen verstärkt, sodass eine sehr viel höhere Empfindlichkeit resultiert. Die erfolgreiche Anwendung dieses Assays zur DNA-Detektion wurde kürzlich beschrieben.^[18,19]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Jüngste Fortschritt bei der Rolling-Circle-Amplifikation haben ergeben, dass die RCA-Methode ein überaus wirksames Vervielfältigungsverfahren zur Herstellung von funktionellen Nanostrukturen und von Matrizen für nanoskopische Anordnungen ist und ein großes Potenzial für den Aufbau von Nanofunktionseinheiten aufweist. Der Anordnungsprozess beruht auf spezifischen DNA-Hybridisierungen (oder der Aptamer-Analyt-Erkennung),^[35] was die genaue Positionierung der Nanospezies sicherstellt. Ihre repetitive Struktur macht die RCA-Produkte zu perfekten Matrizen für periodische Nanoanordnungen. Von Bedeutung ist, dass die RCA-Produkte leicht mit gewünschter Sequenz erzeugt werden können, indem man die Gegensequenz in die ring-

formige Matrize eincodiert. Der Abstand zwischen angeordneten Nanospezies lässt sich über die Länge der ringförmigen Matrize ebenfalls leicht steuern. Die großen Abmessungen (oder hohen Molekulargewichte) der RCA-Produkte bieten eine weitere attraktive Eigenschaft: Sie können als Brückenelemente dienen, um die Nanospezies zu größeren Strukturen zu verknüpfen, oder auch als Bestandteile hierarchischer Anordnungen auf mikro- oder makroskopischer Ebene fungieren. Dies ist außerordentlich nützlich für den Aufbau von Mikro- oder Makrofunktionseinheiten.

Darüber hinaus kann das RCA-Produkt selbst zu wohldefinierten Nanostrukturen falten. Mithilfe von über 200 kurzen Oligonucleotid-„Stapelsträngen“ gelang es Rothemund, lange ssDNA-Moleküle (7 kb) in diverse Nanostrukturen mit präzise festgelegten Formen und Mustern zu falten.^[36] Es ist denkbar, dass lange RCA-Produkte mit sorgfältig entworfenen Sequenzen auf ähnliche Weise falten können, eventuell sogar ohne Unterstützung durch Stapelstränge. Diese Annahme gründet darauf, dass diese DNA-Moleküle Tandemwiederholungen enthalten und dass die Sequenz, die für die Bildung wohldefinierter Formen und Muster durch spezifische intra- oder intermolekulare DNA-Hybridisierung benötigt wird, durch Eincodieren der Sequenzinformation in die ringförmige Matrize erzeugt werden kann. Somit ist es gut möglich, dass die RCA-Technik noch viele Anwendungen auf dem Gebiet der DNA-Nanotechnologie finden wird.^[27b–e]

Der RCA-Prozess kann auch eine Vielzahl funktioneller Nanostrukturen zugänglich machen, z.B. Nanokreuzungen, Aptamere und DNAzyme, die in der Nanotechnologie und Biosensorik von Nutzen sein können. Durch Verwendung von funktionellen Nucleinsäuren wie Aptameren und Aptazymen in RCA-basierten Assays kann die Bandbreite an detektierbaren Analyten stark ausgedehnt werden. Zudem sind solche Verfahren noch wesentlich empfindlicher als gewöhnliche RCA-basierte Assays. Da es möglich ist, praktisch jedes gewünschte Aptamer durch In-vitro-Selektion zu erhalten, könnten RCA-basierte Assays mit Aptameren als Erkennungselementen zur Detektion von fast jedem denkbaren Analyten (Nucleinsäuren, Proteine, Metabolite, Metallionen und sogar lebende Zellen) verwendet werden. Darüber hinaus spielen einige der mit Antikörpern verbundenen Nachteile bei Aptameren keine Rolle, sodass Aptamer-basierte Sandwich-Assays, die RCA als Amplifikationsmethode verwenden, ein großes Potenzial für zukünftige Immunassays haben.

Trotz aller Fortschritte befinden sich die Studien zur RCA und ihre Anwendungen in der Nanotechnologie und Biodektion noch in den Anfängen, insbesondere was die Kombination mit funktionellen Nucleinsäuren betrifft. So sind vielzählige natürliche und synthetische DNA-Aptamere und -Enzyme für einen breiten Bereich von Anwendungen verfügbar,^[20,27d,37] bislang sind aber nur einige wenige DNA-Aptamere und DNA-Enzyme in RCA-basierten Assays eingesetzt worden. Darüber hinaus wurde zwar prinzipiell nachgewiesen, dass RCA-basierte Assays mit funktionellen Nucleinsäuren in der Diagnostik angewendet werden können, eine weite Verbreitung, insbesondere in einer kommerzialisierten Form, steht aber noch aus. Hieraus ergeben sich

enorme Perspektiven für die Erforschung von funktionellen Nucleinsäuren für Anwendungen in RCA-basierten Diagnosesystemen, insbesondere in Bereichen, in denen Aptamere Vorteile gegenüber Antikörpern bieten. Wir glauben daher, dass die Verwendung funktioneller Nucleinsäuren dazu beitragen wird, die RCA als eine leistungsfähige Methode in vielfältigen Anwendungsgebieten wie der Biosensorik, Diagnostik, Wirkstoffentwicklung und Nanotechnologie zu etablieren.

Diese Arbeit wurde vom Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Sentinel: The Canadian Network for the Development and Use of Bioactive Paper und den Canadian Institutes for Health Research (CIHR) gefördert. Y.L. hält einen Canada Research Chair.

Eingegangen am 29. Dezember 2007

Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] a) Die im RCA-Prozess eingesetzte ringförmige DNA-Matrize kann enzymatisch oder chemisch durch intramolekulare Ligation von Phosphat- und Hydroxy-Endgruppen synthetisiert werden. In der enzymatischen Synthese (siehe Lit. [15] für ein typisches Syntheseprotokoll) werden die beiden reaktiven Enden einer linearen DNA-Vorstufe durch ein Enzym (z.B. T4-DNA-Ligase) verknüpft. Die enzymatische Synthese ist effizient (Ausbeute > 90 %) für relativ große DNA-Substrate, kann aber für kleine ringförmige DNA (< 30 nt und insbesondere < 10 nt) ungeeignet sein. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der ungenügenden Absättigung der Enzymbindungsstellen und/oder in der sterischen Spannung, die beim Ringschluss kurzer Oligonucleotide auftritt (siehe Lit. [1b-d]). Dies kann in manchen Fällen ein Hindernis für die Anwendung der RCA-Methode sein, da die enzymatische Synthese die am häufigsten benutzte Strategie zur Herstellung ringförmiger DNA-Matrizen in RCA-basierten Diagnoseassays ist. Man beachte aber, dass die chemische Zyklierung von DNA-Oligonucleotiden ebenfalls genutzt werden kann, um sowohl kleine (< 14 nt; siehe Lit. [1e,f]) als auch große ringförmige DNA-Matrizen (> 15 nt; siehe Lit. [1b]) herzustellen. Beispielsweise wurde die chemische Ligation zur Synthese eines ringförmigen DNA-Moleküls mit 13 nt eingesetzt, das das bislang kleinste in einem RCA-Prozess noch wirksame ringförmige DNA-Molekül ist (siehe Lit. [1g]); b) E. Rubin, S. Rumney IV, S. Wang, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3547–3553; c) G. Kaufmann, T. Klein, U. Z. Littauer, *FEBS Lett.* **1974**, *46*, 271–275; d) T. J. Snopek, A. Sugino, K. L. Agarwal, N. R. Cozzarelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *68*, 417–424; e) E. de Vroom, H. J. G. Broxterman, L. A. J. M. Sliedregt, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4607–4620; f) M. L. Capobianco, A. Carcuro, L. Tondelli, A. Garbesi, G. M. Bonora, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 2661–2669; g) M. Frieden, E. Pedroso, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3870–3874; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3654–3657; h) A. Fire, S. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4641–4645; i) D. Liu, S. L. Daubendiek, M. A. Zillman, K. Ryan, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1587–1594.
- [2] Neuere Übersichtsartikel: a) M. Nilsson, F. Dahl, C. Larsson, M. Gullberg, J. Stenberg, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 83–88; b) M. Nilsson, *Histochem. Cell Biol.* **2006**, *126*, 159–164; c) D. Zhang, J. Wu, F. Ye, T. Feng, I. Lee, B. Yin, *Clin. Chim. Acta* **2006**, *363*, 61–70; d) X. Qian, R. V. Lloyd, *Diagn. Mol. Pathol.* **2003**, *12*, 1–13; e) S. F. Kingsmore, D. D. Patel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 74–81; f) V. V. Demidov, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2002**, *2*, 89–95; g) S. C. Andras, J. B. Power, E. C. Cocking, M. R. Davey, *Mol. Biotechnol.* **2001**, *19*, 29–44; h) B. Schweitzer, S. Kingsmore, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 21–27; i) M. M. Shi, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 164–172; j) N. O. Fischer, T. M. Tarasow, J. B.-H. Tok, *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 121–128.
- [3] a) M. Nilsson, J. Banér, M. Mendel-Hartvig, F. Dahl, D. O. Antson, M. Gullberg, U. Landegren, *Hum. Mutat.* **2002**, *19*, 410–415; b) P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 225–232; c) D. Y. Zhang, M. Brandwein, T. C. Hsuih, H. Li, *Gene* **1998**, *211*, 277–285; d) X. Qi, S. Bakht, K. M. Devos, M. D. Gale, A. Osbourn, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 116e; e) A. T. Christian, M. S. Pattee, C. M. Attix, B. E. Reed, K. J. Sorensen, J. D. Tucker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14238–14243; f) C. Larsson, J. Koch, A. Nygren, G. Janssen, A. K. Raap, U. Landegren, M. Nilsson, *Nat. Methods* **2004**, *1*, 227–232; g) J. Banér, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5073–5078; h) J. Pickering, A. Bamford, V. Godbole, J. Briggs, G. Scozzafava, P. Roe, C. Wheeler, F. Ghouze, S. Cuss, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 60e; i) I. Smolina, C. Lee, M. Frank-Kamenetskii, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2324–2328; j) I. V. Smolina, H. Kuhn, C. Lee, M. D. Frank-Kamenetskii, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 84–93; k) J. S. Lohmann, M. Stougaard, J. Koch, *BMC Mol. Biol.* **2007**, *8*, 103–110.
- [4] a) L. Blanco, A. Bernad, J. M. Lázaro, G. Martín, C. Garmendia, M. Salas, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8935–8940; b) J. A. Esteban, M. Salas, L. Blanco, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2719–2726.
- [5] G. A. Blab, T. Schmidt, M. Nilsson, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 495–498.
- [6] a) M. Nilsson, M. Gullberg, F. Dahl, K. Szuhan, A. K. Raap, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 66e; b) I. V. Smolina, V. V. Demidov, C. R. Cantor, N. E. Broude, *Anal. Biochem.* **2004**, *335*, 326–329.
- [7] J. Yi, W. Zhang, D. Y. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e81.
- [8] D. A. Di Giusto, W. A. Wlassoff, J. J. Gooding, B. A. Messerle, G. C. King, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e64.
- [9] a) B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, V. T. Tchernev, J. Christiansen, M. Velleca, S. F. Kingsmore, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 359–365; b) W. Shao, Z. Zhou, I. Laroche, H. Lu, Q. Zong, D. D. Patel, S. Kingsmore, S. P. Piccoli, *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *5*, 299–307; c) B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10113–10119; d) H. Zhou, K. Bouwman, M. Schotanus, C. Verweij, J. A. Marrero, D. Dillon, J. Costa, P. Lizardi, B. B. Haab, *Genome Biol.* **2004**, *5*, R28; e) Y. Y. Huang, H. Y. Hsu, C. J. Huang, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 980–985.
- [10] S. Beyer, P. Nickels, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 719–722.
- [11] a) F. Dahl, J. Banér, M. Gullberg, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, M. Nilsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4548–4553; b) D. Y. Zhang, W. Zhang, X. Li, Y. Konomi, *Gene* **2001**, *274*, 209–216; c) F. B. Dean, J. R. Nelson, T. L. Giesler, R. S. Lasken, *Genome Res.* **2001**, *11*, 1095–1099.
- [12] a) M. M. Ali, S. Su, C. D. M. Filipe, R. Pelton, Y. Li, *Chem. Commun.* **2007**, *43*, 4459–4461; b) H. Y. Hsu, Y. Y. Huang, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 123–126.
- [13] a) X. B. Zhong, P. M. Lizardi, X. H. Huang, P. L. Bray-Ward, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3940–3945; b) Y. Chen, M. R. Shortreed, M. Olivier, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2400–2405; c) B. Nie, M. R. Shortreed, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6594–6600; d) Y. Chen, M. R. Shortreed, D. Peelen, M. Lu, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3016–3017; e) H. Kuhn, Y. Hu, M. D. Frank-Kamenetskii, V. V. Demidov, *Biochemistry* **2003**, *42*, 4985–4992; f) J. Li, W. Zhong, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9030–9038.

- [14] Z. Deng, Y. Tian, S. H. Lee, A. E. Ribbe, C. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3648–3651; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3582–3585.
- [15] W. Zhao, Y. Gao, S. A. Kandadai, M. A. Brook, Y. Li, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2469–2473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2409–2413.
- [16] W. Zhao, Y. Gao, M. A. Brook, Y. Li, *Chem. Commun.* **2006**, 3582–3584.
- [17] a) C. Lin, M. Xie, J. J. Chen, Y. Liu, H. Yan, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7699–7701; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7537–7539; b) C. Lin, X. Wang, Y. Liu, N. C. Seeman, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14475–14481.
- [18] Z. Cheglakov, Y. Weizmann, B. Basnar, I. Willner, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 223–225.
- [19] Y. Tian, Y. He, C. Mao, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1862–1864.
- [20] a) N. K. Navani, Y. Li, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 272–281; b) J. J. Gooding, G. C. King, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 4876–4880; c) S. D. Jayasena, *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628–1650.
- [21] a) L. Yang, C. W. Fung, E. J. Cho, A. D. Ellington, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3320–3329; b) L. Zhou, L.-J. Ou, X. Chu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7492–7500.
- [22] E. J. Cho, L. Yang, M. Levy, A. D. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2022–2023.
- [23] Z. Cheglakov, Y. Weizmann, A. B. Braunschweig, O. I. Wilner, I. Willner, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 132–136; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 126–130.
- [24] a) D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 32–35; b) X. Xu, N. L. Rosi, Y. Wang, F. Huo, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9286–9287.
- [25] a) U. M. Lindstrom, R. A. Chandrasekaran, L. Orbai, S. A. Helquist, G. P. Miller, E. Oroudjev, H. G. Hansma, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15953–15958; b) J. S. Hartig, S. Fernandez-Lopez, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1458–1462.
- [26] H. Kuhn, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 574–580.
- [27] a) G. M. Blackburn, M. J. Gait in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford, **1990**; b) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431; c) N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1151–1159; d) Y. Lu, J. Liu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 580–588; e) F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284–299; f) F. C. Simmel, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 817–830.
- [28] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510; b) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822; c) W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 487–517.
- [29] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsson, A. Ostman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 473–477.
- [30] a) O. Söderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L. G. Larsson, U. Landegren, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 995–1000; b) J. Jarvius, J. Melin, J. Goransson, J. Stenberg, S. Fredriksson, C. Gonzalez-Rey, S. Bertilsson, M. Nilsson, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 725–727.
- [31] a) R. Nutiu, Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771–4778; b) X. Fang, A. Sen, M. Vicens, W. Tan, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 829–834.
- [32] S. Klussmann, *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [33] a) J. C. Achenbach, W. Chiuman, R. P. Cruz, Y. Li, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *5*, 321–336; b) Y. Li, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 315–323.
- [34] a) Y. Xiao, V. Pavlov, T. Niazov, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7430–7431; b) T. Niazov, V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683–1687.
- [35] a) C. Lin, E. Katilius, Y. Liu, J. Zhang, H. Yan, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5422–5427; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5296–5301; b) Y. Liu, C. Lin, H. Li, H. Yan, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4407–4412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4333–4338.
- [36] P. W. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [37] a) E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166–6235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042–6108; b) N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547–1562.