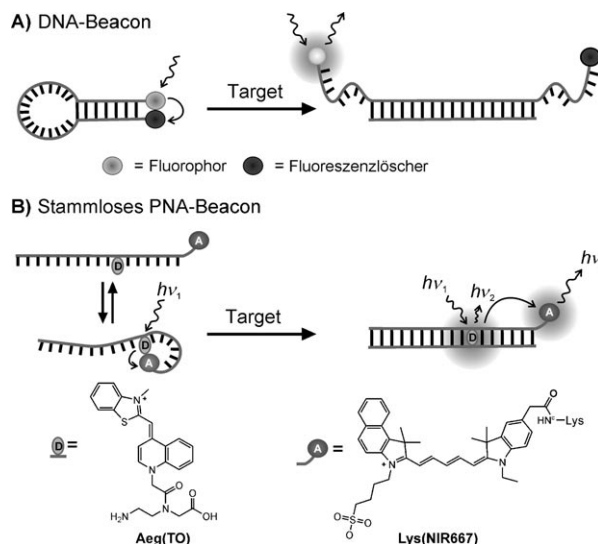


# Stammlose PNA-Beacons für die empfindliche DNA- und RNA-Detektion mit geringem Hintergrundrauschen\*\*

Elke Socher, Lucas Bethge, Andrea Knoll, Nadine Jungnick, Andreas Herrmann und Oliver Seitz\*

In einer Vielzahl von Bioassays werden Fluoreszenzsonden zum Nachweis von spezifischen Nucleinsäuren benötigt. Hierzu zählen Tests zur DNA-Quantifizierung, zur SNP-Typisierung (SNP = Einzelnucleotidpolymorphismus) und zur Analyse von mRNA in lebenden Zellen.<sup>[1]</sup> In den meisten Sonden wird die abstandsabhängige Wechselwirkung zwischen zwei Chromophoren ausgenutzt. Sensitive fluoreszierende Hybridisierungssonden zeigen einen großen hybridisierungsinduzierten Anstieg der Fluoreszenzemission mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) in der Größenordnung von  $10^2$ .<sup>[2]</sup> Selektive Sonden ermöglichen einzelbasenspezifische Fluoreszenzsignale. Eine empfindliche und zugleich spezifische Detektion von DNA und RNA konnte durch die Verwendung von Molecular Beacons (MBs) erzielt werden (Schema 1 A).<sup>[3]</sup> Diese haarnadelförmigen Sonden sind so konstruiert, dass zwei miteinander wechselwirkende Farbstoffe in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden können. Das SRV ist hoch, da in Abwesenheit der Zielsequenz die Fluoreszenz durch resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET), durch Stoßlöschung und/oder Bildung eines Grundzustandskomplexes oder über Excimerbildung effizient gelöscht wird. MBs binden die Ziel-DNA mit hoher Sequenzspezifität, dies allerdings nur innerhalb eines bestimmten Temperaturfensters, das von der unterschiedlichen thermischen Stabilität der passenden und nicht-passenden Sonden-Target-Komplexe abhängt.<sup>[4]</sup> Folglich ist es unter Bedingungen, bei denen der passende und der nicht-passende Sonden-Target-Komplex koexistieren, nicht möglich, komplementäre von nicht perfekt komplementären Zielsequenzen zu unterscheiden.

Als größte Einschränkung des MB-Designs gilt, dass Eigenschaften, die einen Anstieg der Empfindlichkeit fördern, von Nachteil für die erzielbare Sequenzspezifität sind, und umgekehrt. So können hohe Fluoreszenzanstiege nur erzielt werden, wenn sich die Stammregion bereitwillig öffnet. Für eine hohe Spezifität wird hingegen eine stabile Stammstruktur



**Schema 1.** Vergleich von A) DNA-Beacons mit B) stammlosen FIT-PNA-Beacons zur Detektion von komplementären Nucleinsäuren. In stammlosen FIT-PNA-Beacons dient ein Interkalatorfarbstoff wie Thiazolorange (TO) als Basensurrogat, das die Interkalation in einen perfekt komplementären Doppelstrang durch FRET zu einem Farbstoff wie NIR667, der im nahen Infrarotbereich emittiert, signalisiert.

gefordert, die einer Öffnung durch Hybridisierung an die nicht perfekt komplementäre Zielsequenz standhält. Wir schlagen ein alternatives Sondendesign vor. Dieser Ansatz behält auf der einen Seite den in MBs genutzten Signalmechanismus bei, indem zwei Chromophore die Änderung der Sondenkonformation anzeigen, allerdings ohne die Notwendigkeit, eine stabile Haarnadelstruktur zu bilden.<sup>[5]</sup> Auf der anderen Seite werden „intelligente“ Markierungen eingeführt, die nur dann fluoreszieren und einen FRET zu einem Nahinfrarot-Farbstoff initiieren, wenn der Donor in perfekt komplementärer Basenpaarung eingebettet ist. Es wird gezeigt, dass die Kombination von zwei Prozessen, die Detektion konformativer Änderungen durch einen Wechsel des Energietransfermechanismus und die Erkennung geänderter Stapelwechselwirkungen an einem Interkalatorfarbstoff, eine 108-fache Fluoreszenzintensivierung bei Hybridisierung ermöglichen. Von Interesse ist dabei, dass die stammlosen Sonden komplementäre von einzelbasenfehlpaarenden Zielsequenzen nahezu bei jeder Temperatur unterscheiden können. Es wird demonstriert, dass sowohl DNA als auch RNA homogen detektiert werden können.

Das Sondendesign ist in Schema 1 B veranschaulicht. Ein Interkalatorfarbstoff, wie Thiazolorange, wird als Basensurrogat in eine Peptidnucleinsäure (PNA)-Sonde eingeführt und

[\*] E. Socher, L. Bethge, Dr. A. Knoll, 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

N. Jungnick, Prof. Dr. A. Herrmann  
Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin  
Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)

[\*\*] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Bayer-Schering AG für die finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200803549> zu finden.

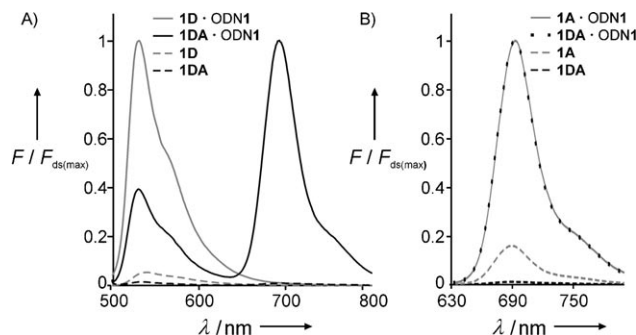
als Donor für den FRET verwendet. Ein terminal angebundener Nahinfrarot-Farbstoff (NIR), wie NIR667, dient als Akzeptorfarbstoff. Es wurde erwartet, dass die Anregung des Donors in der einzelsträngigen Sonde eine vernachlässigbare Emission des Akzeptorfarbstoffs induziert, da 1) der angeregte Zustand des Donors durch die Drehbewegung um die zentrale Methinbrücke im entstapelten Thiazolorange rasch entvölkert wird,<sup>[6]</sup> 2) die NIR667(Akzeptor)-Emission durch Stöße mit den Nucleobasen gelöscht wird und 3) die Neigung von ungeladenen, hydrophoben PNA-Molekülen, eine kompakte Struktur in Wasser anzunehmen, die Bildung intramolekularer Farbstoffdimere oder kurzlebiger Stoßkomplexe erleichtert.<sup>[5c,d]</sup> Für den Doppelstrang wurde erwartet, dass die Akzeptoremission durch Anregung des Donors ausgelöst werden kann, denn 4) der Donor wird eingeschaltet als Folge der Stapelung von Thiazolorange mit den gebildeten Basenpaaren und der damit einhergehenden Einschränkung von Rotationsfreiheitsgraden,<sup>[5b,f,7]</sup> 5) der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist gering genug ( $< 30 \text{ \AA}$ ), um FRET zu ermöglichen, und 6) die Rigidität des gebildeten Doppelstrangs erschwert das Löschen durch Donor-Akzeptor- oder Akzeptor-Nucleobasen-Kontakt. Darüber hinaus sollte das bekannte Ansprechverhalten des Thiazolorange-Farbstoffs auf Störungen der lokalen Doppelstrangstruktur auch im Energietransferprozess erhalten bleiben. In einer einzelbasenfehlgepaarten Umgebung zeigt die „TO-Base“ nur schwache Fluoreszenzemission, da genügend Platz für die Drehbewegungen vorhanden ist.<sup>[6]</sup> Es sollte daher gelingen, einzelbasenfehlgepaarte Sequenzen unabhängig von der thermischen Beständigkeit des Sonden-Target-Komplexes zu unterscheiden.

Das SONDENSYSTEM teilt eine Besonderheit mit den kürzlich veröffentlichten FIT-Sonden (FIT = erzwungene (forced) Interkalation), nämlich die Verwendung eines interkalierenden Cyaninfarbstoffs als künstliche Nucleobase.<sup>[5f]</sup> Jedoch erwarteten wir, dass das Zusammenspiel des Interkalators mit einem sorgfältig ausgewählten Farbstoff die Empfindlichkeit wesentlich erhöhen wird. Zunächst untersuchten wir die Modellsequenzen **1**, **2** und **3** (Abbildung 1) als Beispiel für Donor-markierte Sonden (**1D**, **2D**, **3D**), die auf Hybridisierung mit unterschiedlich hohen Fluoreszenzanstiegen reagieren. Die Fluoreszenzspektren, gemessen vor und nach Hybridisierung mit komplementärer und einzelbasenfehlgepaarter DNA, belegten, dass die Einführung des NIR-Akzeptorfarbstoffs in die Donor-Akzeptor-markierten

<b>PNA:</b>	<b>DNA:</b>
<b>1</b> , X-gccgta-Y-atagccg-Gly <sup>CONH<sub>2</sub></sup>	ODN1M, 5'-CGGCTATTMACGGC-3'
<b>2</b> , X-gccgtc-Y-ttagccg-Gly <sup>CONH<sub>2</sub></sup>	ODN2, 5'-CGGCTAATGACGGC-3'
<b>3</b> , X-gccgta-Y-ctagccg-Gly <sup>CONH<sub>2</sub></sup>	ODN3, 5'-CGGCTAGTTACGGC-3'
<b>1-3D</b> , X = Ac, Y = Aeg(TO);	ODN1, M = T, ODN1G, M = G;
<b>1-3DA</b> , X = Lys(NIR), Y = Aeg(TO);	ODN1A, M = A; ODN1C, M = C
<b>1-3A</b> , X = Lys(NIR), Y = a	
<b>MB:</b>	
MB1, 5'-Cy5-GCACAGGCCGATGCCGATAATGCCGATGCCGTGT-GC-FAM-3'	
ODN4M, 5'-ATCGGCATTMATCGGCATCG-3'	
ODN4, M = T, ODN4G, M = G; ODN4A, M = A; ODN4C, M = C	

**Abbildung 1.** In dieser Untersuchung verwendete Testsequenzen.

Sonden **1DA**, **2DA** und **3DA** das Ansprechverhalten um eine Größenordnung erhöht. So vermittelt beispielsweise der TO-Farbstoff in Sonde **1D** eine hohe Nachweisempfindlichkeit, die durch einen hohen hybridisierungsinduzierten Fluoreszenzanstieg von  $F_{ss}/F_{ds} = 24$  gekennzeichnet ist (Abbildung 2A).<sup>[6a]</sup> Die Donor-Akzeptor-markierte Sonde **1DA**



**Abbildung 2.** Normalisierte Fluoreszenzspektren von **1D**, **1DA** und **1A** vor und nach der Zugabe von ODN1 (ODN = Oligodesoxyribonucleotid) bei der Anregung von A) TO ( $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ ) und B) NIR-667 ( $\lambda_{ex} = 620 \text{ nm}$ ). Bedingungen:  $1 \mu\text{M}$  Sonde und Target in  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0 bei  $25^\circ\text{C}$ .  $F(F_{ds(max)})$ , Fluoreszenzintensität (beim Emissionsmaximum des Doppelstrangs).

erweist sich wegen des sehr geringen Fluoreszenzhintergrunds als noch sensitiver. Die Quantenausbeute der Einzelstrangemission von TO in **1DA** wurde von  $\phi_{ss} = 0.0239$  auf  $\phi_{ss} = 0.0004$  um 98 % herabgesenkt (Tabelle 1). Der gleichzeitige Abfall der Quantenausbeute der NIR667-Emission in **1DA** ( $\phi_{ss} = 0.005$  gegenüber  $\phi_{ss} = 0.03$  der Akzeptor-markierten Sonden **1A**) deutet auf einen kontaktbasierten Mechanismus der Fluoreszenzlöschung hin. Eine Bestätigung lieferten UV/Vis-Spektren, die eine Rotverschiebung des Hauptabsorptionspeaks von TO und NIR667 in **1DA** aufzeigen (siehe Abbildung S15 in den Hintergrundinformationen). Solche Änderungen der Form von Absorptionsspektren deuten auf Grundzustandswechselwirkungen hin, die zum Löschen der TO- und NIR667-Emission beitragen.<sup>[8]</sup> Die Schmelzanalyse zeigte nur eine geringfügige Änderung der Schmelztemperatur ( $T_m(\text{1DA} \cdot \text{ODN1}) = 75^\circ\text{C}$ ,  $T_m(\text{1D} \cdot \text{ODN1}) = 73^\circ\text{C}$ ) an, was darauf hindeutet, dass die Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung in **1DA** zu schwach ist, um die Bindungsaffinität der PNA-Sonde wesentlich zu beeinflussen. In der hybridisierten Form fluoreszieren sowohl TO als auch NIR667, was durch einen 32-fachen bzw. 23-fachen Anstieg der Emissionsquantenausbeuten  $\phi_{ds}$  gekennzeichnet ist. Dies stützt die Vorstellung, dass ein kontaktbasierter Löschmechanismus in der ausgebildeten Doppelhelix nicht länger wirken kann. Als Folge von FRET geht die Bildung des Sonden-Target-Komplexes mit einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von  $530 \text{ nm}$  zu  $691 \text{ nm}$  einher. Am bemerkenswertesten war, dass die Hybridisierung von **1DA** mit ODN1 eine 108-fache Steigerung der NIR667-Emission bewirkte, wenn bei der TO-Absorptionswellenlänge angeregt wurde.

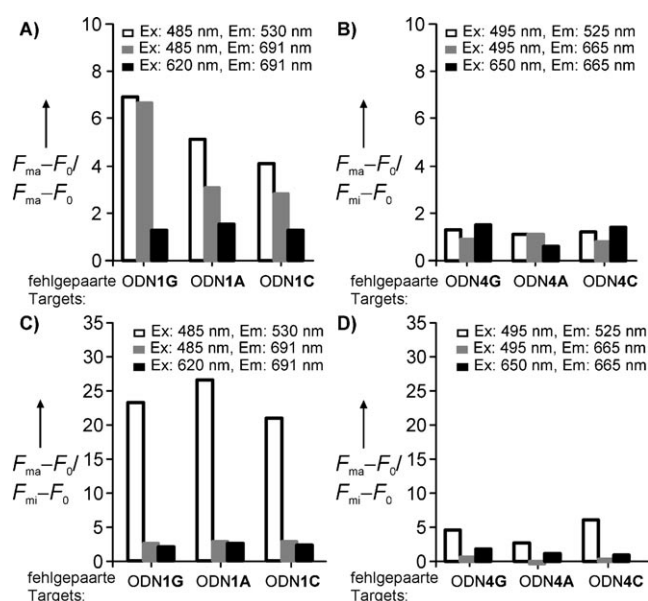
**Tabelle 1:** Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzanstieg von Donor-markierten Sonden **D**, Donor-Akzeptor-markierten Sonden **DA** und Akzeptor-markierten Sonden **A**.<sup>[a]</sup>

PNA: <b>X</b> -gccgt <b>k</b> - <b>Y</b> -ltagccg-Gly <sup>CONH<sub>2</sub></sup> DNA: <sup>3'</sup> CGGC <b>AM</b> -T- <b>NAT</b> CGGC <sup>5'</sup>											
		<b>D</b> Y = Aeg(TO); X = Ac $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$		<b>DA</b> Y = Aeg(TO); X = Lys(NIR667) $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$						<b>A</b> Y = a; X = Lys(NIR667) $\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$	
Seq.	k-M, l-N	$\Phi_{\alpha}$	$F_{\text{ds}}^{[\text{b}]} / F_{\text{ss}}^{[\text{b}]}$	$\Phi_{\alpha(\text{Q})}$	$F_{\text{ds}}^{[\text{b}]} / F_{\text{ss}}^{[\text{b}]}$	$\Phi_{\text{Q}(\alpha)}$	$F_{\text{ds}}^{[\text{c}]} / F_{\text{ss}}^{[\text{c}]}$	$\Phi_{\text{Q}(\text{FRET})}$	$F_{\text{ds}}^{[\text{c}]} / F_{\text{ss}}^{[\text{c}]}$	$\Phi_{\text{Q}}$	$F_{\text{ds}}^{[\text{c}]} / F_{\text{ss}}^{[\text{c}]}$
1	a-T, a-T	ss: 0.0239 ds: 0.3057	24	ss: 0.0004 ds: 0.0126	28	ss: 0.0050 ds: 0.1138	89	ss: 0.0012 ds: 0.0539	108	ss: 0.0307 ds: 0.2399	4.6
2	c-G, t-A	ss: 0.2004 ds: 0.3011	1.2	ss: 0.0043 ds: 0.0123	7	ss: 0.0126 ds: 0.1318	15	ss: 0.0026 ds: 0.0864	13	ss: 0.0473 ds: 0.2115	3.4
3	a-T, c-G	ss: 0.0255 ds: 0.2524	5	ss: 0.0009 ds: 0.0133	12	ss: 0.0064 ds: 0.0184	36	ss: 0.0022 ds: 0.0875	39	ss: 0.0112 ds: 0.0789	1.9

[a] Messbedingungen siehe Abbildung 2. [b]  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ . [c]  $\lambda_{\text{em}} = 691 \text{ nm}$ . Der Messfehler der Quantenausbeute wird auf 10% geschätzt.

Die Sonden **2DA** und **3DA** stellen weitere Beispiele dar, in denen die Einführung von NIR667 als Akzeptor für einen Energietransfer von TO das Signal-Rausch-Verhältnis um eine Größenordnung erhöht. So reduziert die Anwesenheit des NIR667-Farbstoffs in **2DA** den Fluoreszenzhintergrund im Einzelstrang von **2D** um 98% (Tabelle 1, siehe auch Abbildung S12). Mit der TO/NIR667-markierten Sonde **3DA** konnte bei Hybridisierung ein 39-facher Anstieg des FRET-Signals gemessen werden, wohingegen die ausschließlich mit dem Donor markierte Sonde **3D** eine nur mäßige 5-fache Fluoreszenzintensivierung ( $F/F_0 = 5$ ) lieferte (siehe Abbildung S13).

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung von Sonden, die hohe Empfindlichkeit bei der Nucleinsäuredektion mit hoher Spezifität, sogar unter nicht-stringenten Bedingungen, kombinieren. Sonde **1DA** wurde entsprechend mit komplementären ODN1- und einzelbasenfehlpaarenden Targets ODN1G hybridisiert. Das Auslesen der TO-Emission oder der FRET-induzierten NIR667-Emission bei 25 °C ergab für die komplementäre DNA ein 7-fach höheres Signal als bei Zugabe von einzelbasenfehlpaarendem ODN1G (Abbildung 3A). Andere Einzelbasenfehlpaarungen in ODN1A und ODN1C können ebenfalls unterschieden werden, obwohl komplementäre und einzelbasenfehlpaarende Sonden-Target-Komplexe bei dieser niedrigen Temperatur nebeneinander vorliegen. Mit Sonde **2DA** wurden unter nicht-stringenten Bedingungen sogar höhere Sequenzselektivitäten erzielt, während **3DA** geringere (Faktor 2) Selektivitäten zeigte (Tabelle S1). Die höchste Spezifität wird erhalten, wenn die Selektivität des TO-Farbstoffs und die Selektivität der Sonden-Target-Erkennung kombiniert werden. Bei 65 °C und in Gegenwart von komplementärem Target ODN1 zeigt die Sonde **1DA** ein 25-fach höheres TO-Signal als in Gegenwart des einzelbasenfehlpaarenden Targets ODN1G (Abbildung 3C). Die NIR667-Fluoreszenz des einzelbasenfehlpaarenden Doppelstrangs war fast genauso hoch wie die des perfekt komplementären Doppelstrangs **1DA**·ODN1 (Abbildung 3A). Folglich erhält man durch direkte Anregung des terminal gebundenen NIR667-Farbstoffs ein Emissionssignal, dass zwar die Hybridisierung, jedoch



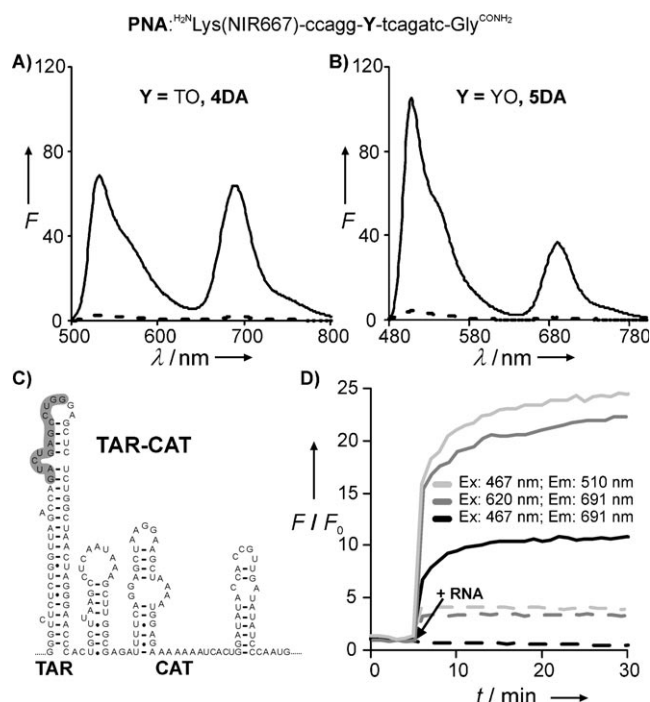
**Abbildung 3.** Spezifität des Fluoreszenzsignals von Sonde **1DA** (A, C) und von MB1 (B, D), dargestellt als das Verhältnis  $(F_{\text{ma}} - F_0)/(F_{\text{mi}} - F_0)$  ( $F_0$  = Einzelstrangfluoreszenz) der um das Hintergrundsignal korrigierten Fluoreszenz des komplementären ( $F_{\text{ma}}$ ) und des einzelbasenfehlpaarenden ( $F_{\text{mi}}$ ) Sonden-Target-Doppelstrangs. A), B) 25 °C und C), D) 65 °C. Bedingungen: A), C) siehe Abbildung 2 und B), D) 1  $\mu\text{M}$  Sonde und Target in 10 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.2; Tris =  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ .

nicht die durch Einzelbasenfehlpaarungen verursachten Störungen in der Doppelstrangstruktur anzeigt.

Es ist aufschlussreich, die stammlosen PNA-Beacons wie **1DA** hinsichtlich der Spezifität der Fluoreszenzsignalgebung mit DNA-MBs (siehe Schema 1) zu vergleichen, die die gleiche Targetsequenz binden. Als Fluorophore wurden FAM und Cy5 gewählt, da die Emission in ähnlichen spektralen Bereichen erscheint wie die von TO und NIR667. Wir prüften drei MB-Strukturen (Abbildung S18). Für höchste Sequenzspezifität bei 65 °C waren eine Verlängerung der Sondense-

quenz und eine relativ lange (8 bp) Stammregion (unterstrichen) in MB1 erforderlich (Abbildung 1). Wie erwartet, zeigte MB1 eine geringe FAM-Emission, die durch die Zugabe von komplementärem Target intensiviert wurde (Abbildung S21). Einzelbasenfehlpaarende Targets ließen sich unter Bedingungen, bei denen sowohl perfekt komplementäre als auch fehlgepaarte Sonden-Target-Doppelstränge vorlagen, nur unzureichend unterscheiden (Abbildung 3B). Dieses Verhalten wurde erwartet, da die Spezifität des Fluoreszenzsignals von MBs auf der Selektivität der Sonden-Target-Erkennung beruht. Demgegenüber liefern stammlöse PNA-Beacons wie **1DA** wegen der Umgebungssensitivität des fluoreszierenden TO-Basensurrogats sogar unter nicht-stringenten Bedingungen ein einzelbasenspezifisches Fluoreszenzsignal (Abbildung 3A). Die Spezifität von MB1 wird bei erhöhter Temperatur (60–70 °C) im Bereich von  $T_m$  des gebildeten Sonden-Target-Komplexes offenkundig (Abbildung 3D). Der untersuchte Spezifitätsfaktor  $(F_{ma} - F_0)/(F_m - F_0)$  ist unabhängig vom dynamischen Signalebereich und sollte folglich nicht von der Wahl der Fluorophore beeinflusst werden.

Im Weiteren untersuchten wir das Potenzial der stammlösen PNA-Beacons in der Detektion von RNA. Die doppelt markierte Sonde **4DA** wurde gegen ein Segment der TAR-RNA, das die Reproduktion des humanen Immundefizienzvirus (HIV) reguliert, gerichtet.<sup>[9]</sup> Die Hybridisierung von **4DA** mit komplementärer RNA resultierte in einem starken 25- und 32-fachen Anstieg der TO- bzw. NIR667-Emission (Abbildung 4A). Anhand des Einbaus von Oxazolgelb (YO) in **5DA** wurde evaluiert, ob andere Farbstoffe der Thiazolorange-Familie als umgebungssensitiver Donor eingesetzt werden können.<sup>[10]</sup> Auch die Fluoreszenz von **5DA** wurde im Einzelstrang effizient gelöscht (Abbildung 4B). Sowohl die YO- und als auch die NIR-Emission reagierten auf die Hybridisierung mit RNA mit 30 bzw. 38-fachen Fluoreszenzanstiegen. In einer Modelluntersuchung verwendeten wir die Sonde **5DA**, um eine 650 nt lange, in vitro transkribierte RNA-Sequenz zu detektieren (Abbildung 4C), die die TAR-Schleife des HIV-Genoms mit einer TAR-CAT-Fusion aufspannt.<sup>[11]</sup> Wir nahmen an, dass **5DA** in der Lage ist, unter Öffnung der TAR-Schleife in dem hervorgehobenen Bereich an die TAR-CAT-RNA zu binden. In der Tat war die Hybridisierung von **5DA** mit TAR-CAT bei Anregung des YO (467 nm) von einem 24- bzw. 11-fachen Anstieg der YO- und NIR667-Emission begleitet (Abbildung 4D). Der Fluoreszenzanstieg war bereits bei 25 °C ein schneller Prozess, der durch das Potenzial von PNA, in basengepaarte Regionen eindringen zu können, wahrscheinlich befördert wurde.<sup>[12]</sup> Die Zugabe von Kontroll-RNA führte zu einem 5-fachen Fluoreszenzanstieg der YO-Emission, hatte jedoch keine Auswirkung auf das FRET-Signal, da die NIR667-Emission nahezu unverändert blieb. Die Anregung bei der NIR667-Absorption (620 nm) führt zu einem 22-fachen Fluoreszenzanstieg durch Hybridisierung mit der TAR-CAT RNA, allerdings auch zu einer 4-fachen Intensivierung bei Zugabe von Kontroll-RNA. Demnach zeigt das FRET-Signal nach Hintergrundkorrektur die stärkste Fluoreszenzantwort. Vermutlich ist für FRET die Bildung einer vollständigen Doppelstrangstruktur erforderlich, sodass weder die Donor- noch



**Abbildung 4.** Emissionsspektrum von A) TO enthaltender Sonde **4DA** und B) YO enthaltender Sonde **5DA** vor (gestrichelte Linie) und nach Zugabe (durchgezogene Linie) von komplementärer synthetischer RNA. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde und 2  $\mu$ M RNA-Target in Puffer (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12.5 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol, pH 6.8, 25 °C,  $\lambda_{ex}$  = 485 nm für TO und  $\lambda_{ex}$  = 467 nm für YO). C) Vorgeschlagene Sekundärstruktur eines Ausschnitts des in vitro transkribierten T7-TAR-CAT-Plasmids und der Zielsequenz (grau schraffiert). D) Kinetikexperiment zur Fluoreszenzemission von **5DA** vor und nach Zugabe (6 min) der TAR-CAT-RNA (durchgezogene Linie) bzw. einer Negativkontrolle (gesamte RNA der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*) (gestrichelte Linie). Bedingungen: 30 nM **5DA** in Puffer (siehe Bedingungen für (A) und (B)) und nach Zugabe von 300 nM RNA.

die Akzeptorfluoreszenz durch Farbstoff-Farbstoff- oder Farbstoff-Nucleobasen-Kontakt gelöscht werden kann.

Wir haben gezeigt, dass stammlöse PNA-Beacons zu den empfindlichsten bisher beschriebenen Hybridisierungssonden gehören, wie anhand eines durch Hybridisierung induzierten Fluoreszenzanstiegs um das bis zu 10<sup>2</sup>-Fache belegt wurde. Eine besondere Fähigkeit der stammlösen PNA-Beacons, über die DNA-MBs nicht verfügen, besteht darin, den hochempfindlichen DNA-Nachweis mit der einzelbasenspezifischen Detektion kombinieren zu können. Hierbei kann zwischen komplementären und einzelbasenfehlpaarenden Zielsequenzen sogar dann unterschieden werden, wenn bei geringen Temperaturen komplementäre und fehlgepaarte Sonden-Target-Doppelstränge koexistieren. Die doppelt markierten Sonden bieten drei Auslesemodi zur Erkennung von Ziel-DNA und -RNA an, in denen entweder A) die YO- oder TO-Anregung und -Emission (ex: 467 oder 485 nm, em: 510 oder 530 nm), B) die NIR667-Anregung und -Emission (ex: 620 nm, em: 691 nm) oder C) FRET durch die Anregung von YO oder TO und der Emission von NIR667 (ex: 467 oder 485 nm, em: 691 nm) verwendet werden. Bei den Modi B und C ergab die Hybridisierung sehr hohe Fluoreszenzanstiege. Modus A bietet die höchste Sequenzspezifität, sogar unter

nicht-stringenten Bedingungen. Beachtenswert ist, dass der Abstand zwischen den beiden sich beeinflussenden Farbstoffen in stammlosen PNA-Beacons kleiner ist als in MBs. Dies ermöglicht ein FRET-Signal (Modus C), das, wie hier erstmalig beschrieben wird, bei Hybridisierung bis zu  $10^2$ -fache, einzelbasenspezifische Fluoreszenzanstiege erlaubt.<sup>[13]</sup> Weiterhin bot Modus C in Hybridisierungsexperimenten mit gefaltetem RNA-Target in komplexen Puffersystemen die höchste Empfindlichkeit über nichtspezifischen Hintergrund. Die sehr hohe Targetspezifität und der sehr große apparente Stokes-Shift ( $> 200$  nm) legen nahe, die FRET-Signalisierung vorzuziehen, wenn Nucleinsäuretargets in biogenen Matrices detektiert werden sollen. Das direkte Auslesen der TO-Emission (Modus A) sollte in der Analyse von Einzelbasenmutationen bevorzugt werden, da dieser Modus es gestattet, Fehlpaarungen mit hoher Selektivität (bis 25-fach) zu unterscheiden. Der Vergleich mit unseren vorausgegangenen einzelmarkierten FIT-PNAs lässt auf eine erweiterte Anwendbarkeit in verschiedenen Sequenzkontexten schließen. Der Verzicht auf ein Stammsegment sollte helfen, Kreuzhybridisierungen mit anderen als den Targetsequenzen vermeiden zu können.<sup>[14]</sup> Zusammenfassend folgern wir, dass die beobachtete Verschiebung der Emissionswellenlänge vom Interkalatorfarbstoff zum Nahinfrarot-Farbstoff, die hohe Empfindlichkeit und die hohe Spezifität unter nicht-stringenten Bedingung sich als nützlich erweisen könnten, um Hintergrundsignale, die bei der Analyse von Einzelbasenmutationen und in der Lokalisierung von RNA in lebenden Zellen stören, zu minimieren.

Eingegangen am 21. Juli 2008

Online veröffentlicht am 23. Oktober 2008

**Stichwörter:** Einzelnucleotidpolymorphismen · FRET · Hybridisierung · Molecular Beacons · RNA

- [1] a) M. M. Shi, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 164–172; b) T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192–1199; c) N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547–1562; d) I. M. Mackay, K. E. Arden, A. Nitsche, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1292–1305; e) D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhl-anga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13308–13313; f) K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1623–1633; g) A. P. Silverman, E. T. Kool, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 225–230.
- [2] a) C. J. Yang, H. Lin, W. Tan, *J. Am. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365–370; b) D. J. Maxwell, J. R. Taylor, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9606–9612.
- [3] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [4] a) G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6171–6176; b) T. N. Grossmann, L. Röglin, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5315–5318; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5223–5225.
- [5] Früher beschriebene stammlose MBs: a) E. Ortiz, G. Estrada, P. M. Lizardi, *Mol. Cell. Probes* **1998**, *12*, 219–226; b) O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3674–3677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3466–3469; c) O. Seitz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3389–3392; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249–3252; d) H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097–1103; e) E. Privat, T. Melvin, U. Asseline, P. Vigny, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 532–541; f) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69–77; g) N. Svanvik, G. Westman, D. Y. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26–35; h) E. Ergen, M. Weber, J. Jacob, A. Herrmann, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3707–3713.
- [6] a) D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 300–310; b) V. Karunakaran, J. L. Pérez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernstring, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954–2962.
- [7] a) O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938–2939; b) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674–2675; c) E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 318–330.
- [8] a) M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950–6956; b) M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466–3471.
- [9] B. Berkhout, *Adv. Pharmacol.* **2000**, *48*, 29–73.
- [10] L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 114–125.
- [11] D. Dorin, M. C. Bonnet, S. Bannwarth, A. Gatignol, E. F. Meurs, C. Vaquero, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4440–4448.
- [12] a) J. C. Hanvey, N. J. Pepper, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, C. F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Bruckenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, *258*, 1481–1485; b) P. Wittung, P. Nielsen, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7049–7054.
- [13] F. Menacher, M. Ruber, S. Berndt, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263–4266.
- [14] a) C. Crey-Desbiolles, D. Ahn, C. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e77; b) Y. Kim, C. J. Yang, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7279–7287.