

Molekulartechnische DNA-Modifizierung: Molecular Beacons

Kemin Wang,* Zhiwen Tang, Chaoyong James Yang, Youngmi Kim, Xiaohong Fang, Wei Li, Yanrong Wu, Colin D. Medley, Zehui Cao, Jun Li, Patrick Colon, Hui Lin und Weihong Tan*

Aptamere · DNA · Genomik · Haarnadelstrukturen ·
Molecular Beacons

Molecular Beacons (MBs) sind spezifisch entworfene DNA-Haarnadelstrukturen, die als Fluoreszenzsonden für verschiedenste Zwecke eingesetzt werden. Die Anwendungen reichen von genetischem Screening über die Herstellung von Biochips und den Nachweis von Einzelnucleotidpolymorphismen bis hin zum mRNA-Monitoring in lebenden Zellen und der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ermöglicht wird dieses breite Anwendungsspektrum durch die besondere Art, mit der MBs mit DNA-, RNA- und Proteinmolekülen wechselwirken. Durch die Haarnadelstruktur der MBs wird eine enge Nachbarschaft zwischen einem Fluoreszenzdonor und einem -akzeptor hergestellt, wodurch es zu einem resonanten Energietransfer kommt. Die Hybridisierung der Schleifenregion mit der Zielsequenz bewirkt eine Konformationsänderung der Sonden, die den Donor und Akzeptor auseinanderbewegt und die Fluoreszenz wieder herstellt. Die aktuelle Forschung zielt auf die Verbesserung der Sonden, die intrazelluläre Quantifizierung von Genen und die Anwendung in Studien von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

1. Einleitung

Nucleinsäuren, vor allem DNA-Basen, sind ideale Systeme für die Entwicklung von molekularen Sonden für Anwendungen in der Biochemie und Biomedizin. Die Vorteile von Nucleinsäuren liegen in ihrer einfachen Synthese, der Möglichkeit, verschiedenste Modifizierungen vorzunehmen, und in ihrer hohen Selektivität und Affinität. Spezifisch modifizierte

DNA-Moleküle können effizient Nucleinsäuren und andere Zielmoleküle wie Proteine und niedermolekulare Substanzen erkennen. In diesem Kurzaufsatz fassen wir die aktuellen Fortschritte bei der Entwicklung von DNA-Sonden für eine Reihe von Anwendungen zusammen und betrachten vornehmlich Sonden, die als Molecular Beacons (MBs) konzipiert sind. MBs werden unter anderem beim genetischen Screening, zur Entwicklung von Biosensoren, zur Herstellung von Biochips, zum Nachweis von Einzelmolekülpolymorphismen (SNPs) und beim mRNA-Monitoring in lebenden Zellen eingesetzt. Ermöglicht wird dieses breite Anwendungsspektrum durch die Art und Weise, in der diese Sonden auf DNA-, RNA- und Proteinmoleküle ansprechen. So erlaubt die besondere Haarnadelstruktur und der Aufbau als Fluorophor-Quencher-Paar z. B. den Echtzeitnachweis von Nucleinsäuren mit außergewöhnlicher Empfindlichkeit und Selektivität. Dennoch bleibt die Verwendung von MBs mit vielen Herausforderungen verbunden, so z.B. bei der intrazellulären Bestimmung der Genexpression. Wir werden daher nicht nur den Entwurf und die Anwendungen von MBs in der Bio-

[*] Prof. K. Wang, Dr. Z. Tang, Dr. Y. Kim, Y. Wu, Dr. C. D. Medley, Dr. Z. Cao, P. Colon, H. Lin, Prof. W. Tan
Department of Chemistry and Department of Physiology and Functional Genomics, Center for Research at the Bio/Nano Interface, UF Genetics Institute and Shands Cancer Center, University of Florida, Gainesville, FL 32611-7200 (USA)
Fax: (+1) 352-846-2410
E-Mail: tan@chem.ufl.edu
Prof. K. Wang, W. Li, Dr. J. Li, Prof. W. Tan
Biomedical Engineering Center, State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082 (P.R. China)
Prof. X. Fang
Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences
2 Zhongguancun Beiyijie, Beijing 100190 (P.R. China)
Dr. C. J. Yang
Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005 (P.R. China)

analytik und Biomedizin besprechen, sondern auch Ansätze untersuchen, mit denen bestehende Probleme beim Einsatz dieser Sonden gelöst werden sollen.

Die Entdeckung der Doppelstrangstruktur der DNA im Jahr 1953^[1] gab klaren Aufschluss über die entscheidende Rolle von Nucleinsäuren bei allen Lebensvorgängen.^[2] Die Paarung von Nucleinsäuren als einer der stärksten und spezifischsten biomolekularen Erkennungsvorgänge ist die Grundlage fast aller molekularer Sonden für Nucleinsäuren. Viele Arten von Nucleinsäuresonden wurden entworfen, und seit den frühen 60er Jahren in der Biologie, Medizin und Chemie eingesetzt, wobei jeweils die neuesten Erkenntnisse der Molekularbiologie und Fortschritte der Synthesechemie von Nucleinsäuren einfließen.^[3–5] Heute werden Nucleinsäuresonden, vor allem solche auf DNA-Basis, verbreitet eingesetzt, um die biologischen Prozesse der Nucleinsäurereplikation, -rekombination, -translation und -expression zu erforschen. Im Zeitalter der Proteomik gibt es einen ständigen Bedarf an hochempfindlichen und selektiven DNA-Sonden für quantitative und Echtzeituntersuchungen an genomischen und proteomischen Informationsträgern. Zahlreiche molekular-technische Strategien wurden in den letzten Jahren zur Entwicklung von DNA-Sonden genutzt, um diesen Bedarf zu decken.

Ein herausragendes Beispiel für solche neu entwickelten DNA-Sonden sind die Molecular Beacons, die erstmals 1996 von Tyagi und Kramer beschrieben wurden.^[6] Der gezielte Entwurf von MBs erscheint einfach, ist in Wirklichkeit aber ziemlich kompliziert. Grundsätzlich bestehen die DNA-Sequenzen der MBs aus einer 15 bis 30 Basen langen Erkennungsregion für die Zielstruktur, die durch zwei kurze komplementäre Stammsequenzen flankiert ist. Dadurch wird die gesamte Sequenz in Abwesenheit der Zielstruktur in eine Haarnadelkonformation gezwungen. Dies bringt den Fluoreszenzlöcher (Quencher) und den Fluorophor, die an den entgegengesetzten Enden des MB angekuppelt sind, in unmittelbare Nähe zueinander, wodurch die Fluoreszenz effektiv unterdrückt wird. Die zu erkennende DNA oder RNA hybridisiert dann mit der Schleife des MB, und die stärkere intermolekulare Hybridisierung öffnet die schwächere Stammhelix. Dadurch werden Fluorophor und Quencher räumlich getrennt, und die Fluoreszenz wird wiederhergestellt (Abbildung 1).^[6–8] Die thermodynamische Stabilität der Haarnadelstruktur, die sehr effiziente Umwandlung des Signals und die Möglichkeit, verschiedenste Fluorophore zu verwenden, machen MBs zu einer außergewöhnlichen DNA-

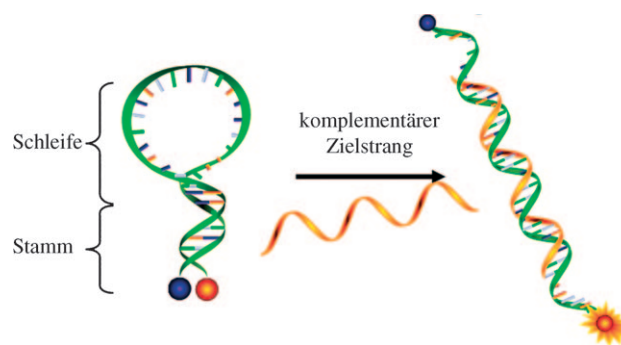


Abbildung 1. Funktionsprinzip eines Molecular Beacon: Das MB nimmt eine Haarnadelkonformation ein und hält damit Fluorophor (orange) und Fluoreszenzlöcher (blau) in enger Nachbarschaft. Dadurch wird die Fluoreszenzemission des Fluorophors (in Abwesenheit der Zielstruktur) stark unterdrückt. Der Zielstrang hybridisiert dann mit der Schleife des MB und öffnet die Stammhelix. Durch die räumliche Trennung vom Fluoreszenzlöcher wird die Fluoreszenz des Fluorophors wiederhergestellt.

Sonde mit hoher Empfindlichkeit, Selektivität und der Fähigkeit zur Echtzeitdetektion. MBs werden in vielen Anwendungsbereichen eingesetzt,^[6,9–25] z. B. beim DNA- und RNA-Nachweis,^[6,9–11] beim Monitoring lebender Systeme,^[12–15] zur Untersuchung enzymatischer Vorgänge,^[16–18,27] beim Entwurf von Biosensoren,^[19,20] zur Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen^[21–23] und zur Herstellung von Biochips.^[19,24,25] Dieser Kurzaufsatz konzentriert sich auf die Grundzüge einer gezielten MB-Entwicklung sowie auf aktuelle Anwendungen von MBs in der Bioanalytik und bei der Aufzeichnung intrazellulärer Abläufe. Weiterhin diskutieren wir die noch bestehenden Probleme auf dem Gebiet und entsprechende Lösungsansätze, die in jüngster Zeit formuliert wurden.

2. Grundlagen und Entwurf von Molecular Beacons

Trotz vielzähliger Berichte über die Optimierung der Sondenstruktur, über spezielle Basenmodifikationen und über alternative Verfahren zur Fluoreszenzerzeugung bleibt das Aufbauprinzip von MBs auf zwei Schlüsselkomponenten beschränkt, die die Eigenschaften und die Funktion bestimmen: eine Haarnadelstruktur (Stamm und Schleife) und ein resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET).^[6,8] Wir wollen deshalb kurz betrachten, wie Aspekte der Signalübertra-



Kemin Wang ist seit 1992 Professor für Biomedizintechnik und Chemie an der Hunan University in China. Er promovierte 1987 an der Hunan University und war anschließend Postdoc bei Prof. Wilhelm Simon an der ETH Zürich (1989–1991). Seine Forschungen gelten der bioanalytischen Chemie im Nanometerbereich und auf Einzelmolekülebene für Anwendungen in der Nanobiotechnologie, nanobiomedizinischen Funktionseinheiten und der chemischen und biologischen Sensortechnik.



Weihong Tan, ist V. T. und Louis Jackson-Professor für Chemie an der University of Florida. Er studierte Chemie an der Hunan Normal University und der Chinesischen Akademie der Wissenschaften und promovierte 1993 in physikalischer Chemie an der University of Michigan. Seine Forschungsinteressen gelten der chemischen Biologie und Bioanalytik, der Nanotechnologie und der Herstellung von Aptameren zur Aufklärung der biologischen Prozesse bei der Entstehung von Krankheiten.

gung, Thermodynamik, Kinetik und Selektivität in den Entwurf von MBs einfließen. Die in diesem Aufsatz besprochenen MB-Arten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Klassen und Eigenschaften von Molecular Beacons.

MB-Klasse ^[a]	Eigenschaften
2-OMe-modifizierte MBs	resistent gegen Nucleaseverdau; hohe Affinität zur Zielstruktur; kein Substrat für RNase H; nicht resistent gegen einzelstrangbindende Proteine (SSBs).
PNA-MBs	resistent gegen Nucleaseverdau; hohe Affinität zur Zielstruktur; schlecht löslich in wässrigem Medium.
LNA-MBs	resistent gegen Nucleaseverdau; höhere Affinität zur Zielstruktur als die meisten anderen MBs; ausgezeichnete Strukturstabilität; kein Substrat für RNase H; niedriger Fluoreszenzhintergrund in lebenden Zellen; je nach Aufbau resistent gegen SSBs.
QD-markierte MBs	helles Signal bei Hybridisierung; Anregung vieler QDs bei einer einzelnen Wellenlänge für Parallelanalysen.
CP-gekoppelte MBs	helles Signal bei Hybridisierung; kann mit einem einzelnen Fluoreszenzlöcher gelöscht werden.
Gold-NP-MBs	sehr effiziente Fluoreszenzlöschung; sehr gute Selektivität.
SQ-MBs	sehr hohe Signalverstärkung (320fach in einer Anordnung mit drei Fluoreszenzlöchern); einfache Reinigung.

[a] PNA = Peptidnucleinsäure; LNA = fixierte („locked“) Nucleinsäure; QD = Quantenpunkt; CP = konjugiertes Polymer; NP = Nanopartikel; SQ = Superquencher.

2.1. Energieübertragung und Entwurf von DNA-Sonden

Viele Nucleinsäuresonden, z. B. Sonden mit benachbarten Sequenzen^[28–39] und TaqMan-Sonden,^[40,41] nutzen den FRET als Signalübertragungsmechanismus. Die Gegenwart der Zielsequenz wird hierbei auf verschiedene Weisen angezeigt. Sonden mit benachbarten Sequenzen bestehen z. B. aus zwei Oligonucleotiden, die mit der Ziel-DNA oder -RNA in benachbarten Positionen hybridisieren. TaqMan-Sonden, die komplementär zur Zielsequenz sind und zwei fluoreszierende Marker tragen, zeigen die DNA- oder RNA-Zielsequenz durch die Abnahme des FRET-Signals an, verursacht durch den Verdau der Sonde durch die 3',5'-Exonucleaseaktivität der Polymerase.^[40,41] Wegen des unkomplizierten experimentellen Umgangs und der einfachen molekularen Wechselwirkungen für die Signalerzeugung hat sich FRET als effizienter Signalübertragungsmechanismus für viele Untersuchungen biomolekularer Wechselwirkungen erwiesen.

Bei MBs wird an einem Ende ein fluoreszierender Rest (Donor) kovalent angekuppelt, am anderen Ende ein Fluoreszenzlöcher (Akzeptor). Wenn die beiden Enden über die Stammhelix in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht werden, wird die meiste absorbierte Energie als Wärme abgegeben, und nur ein kleiner Anteil der Energie wird

als Licht abgestrahlt (das Phänomen wird bisweilen als statische Fluoreszenzlöschung bezeichnet). In Gegenwart des Zielmoleküls bildet die Schleifenregion des MB eine Hybridhelix, die länger und stabiler ist als die Stammhelix. Dies zwingt dem MB eine Konformationsänderung auf, durch die die Stammhelix aufgetrennt wird. Da sich der Fluoreszenzlöcher nun nicht mehr in der Nähe des Fluorophors befindet, wird die Fluoreszenz wiederhergestellt und signalisiert damit die Bindung des MB an sein Zielmolekül.

Die MBs nutzen unterschiedliche Mechanismen der Signaltransduktion. Im Wesentlichen unterscheidet man zwei Kategorien: dynamische und statische Fluoreszenzlöschung. Zur ersten Kategorie gehören der Förster-Transfer (RET oder FRET) und der Dexter-Transfer (Kollisionslöschung oder Elektronentransferlöschung). Bei einer dynamischen Fluoreszenzlöschung wird kein Photon abgestrahlt, vielmehr ist die Löschung das Resultat weitreichender Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor. Die Geschwindigkeit der Energieübertragung hängt von der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem des Akzeptors ab sowie von der Quantenausbeute des Donors und der relativen Orientierung und dem Abstand von Donor und Akzeptor. Der Abstand, bei dem der RET 50 % beträgt, wird als Förster-Abstand bezeichnet und liegt typischerweise im Bereich von 20–70 Å. Der zweite Fall der statischen Fluoreszenzlöschung erfordert die Bildung von Komplexen im Grundzustand. Der genaue Mechanismus hängt von der Stammsequenz und den verwendeten Chromophoren und Linkern ab.

Die Funktion der meisten MBs beruht auf einer statischen oder Kontaktfluoreszenzlöschung (dies ist auch der ursprüngliche Signalgebungsmechanismus von MBs gewesen).^[11] Der Begriff Kontaktfluoreszenzlöschung beschreibt, dass ein Fluoreszenzdonor sich in unmittelbarer Nähe zu einem nichtfluoreszierenden Akzeptor befindet. Unter diesen Bedingungen wird der überwiegende Teil der übertragenen Energie nicht als Licht, sondern strahlungslos emittiert.^[26,42] In der Entwicklung von MBs hat man sich dieses Verhalten zu Nutze gemacht, indem man nichtfluoreszierende Fluoreszenzlöcher verwendet, um den Wirkungsgrad der Fluoreszenzlöschung zu verbessern und das Hintergrundrauschen zu reduzieren, was insgesamt eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit ergibt. Häufig eingesetzte nichtfluoreszierende Fluoreszenzlöcher sind Dabcyl (4-(Dimethylaminoazo)benzol-4-carbonsäure) und die „Black-Hole“-Fluoreszenzlöcher

BHQ1 und BHQ2. Der typische Wirkungsgrad dieser Verbindungen bei statischer Fluoreszenzlöschung liegt zwischen 85 und 97%. Sie können mit vielen gebräuchlichen Fluorophoren kombiniert werden,^[26,42] z.B. wird Dabcyl oft mit Fluorophoren im nahen Infrarot gekoppelt, obgleich sein Absorptionsmaximum bei etwa 475 nm liegt.

2.2. Thermodynamische Aspekte

Die Hybridisierung von MBs mit ihren Zielsequenzen kann im Wesentlichen mit der Thermodynamik des Gesamtsystems erklärt werden. Zur Erklärung diente ursprünglich ein einfaches „Alles-oder-Nichts“-Modell, das als Näherung nur den Anfangs- und den Endzustand der Reaktion berücksichtigt. Dieses Modell wurde durch Experimente gestützt, die ergaben, dass die Schmelztemperatur einer fehlerfrei passenden Helix aus dem MB und der Zielsequenz 42 °C beträgt, während Helices mit einzelnen Fehlpaarungen Schmelztemperaturen zwischen 28 und 31 °C aufwiesen. Das Modell sagte korrekt voraus, dass die Position einer Fehlpaarung in der Ziel-DNA vernachlässigbar ist.^[12,49,50]

Ein Vergleich zwischen der Thermodynamik von MBs und linearen DNA- oder RNA-Sonden verdeutlicht die Beziehung zwischen Schmelztemperatur und Selektivität und erklärt auch, weshalb MBs selektiver sind als lineare Sonden. Erstens können lineare DNA- oder RNA-Sonden in zwei Zuständen oder Phasen vorliegen, nämlich frei oder an eine Zielsequenz gebunden. MBs können hingegen drei Zustände oder Phasen einnehmen: hybridisiert mit einer Zielsequenz, frei in der Haarnadelkonformation oder frei als Zufallsknäuel.^[48] Das Selektionsvermögen einer Sonde wird von der Differenz zwischen den Phasenübergangstemperaturen der perfekten Target-Sonden-Helix und der Target-Sonden-Helix mit Fehlpaarungen bestimmt. Genaue thermodynamische Messungen haben ergeben, dass die freie Energie der MBs in der Haarnadelkonformation niedriger ist als die des Zufallsknäuels.^[9,10,12,47–49] Dies weist darauf hin, dass der Temperaturunterschied den Phasenübergang von der Doppelstrang- zur Haarnadelkonformation verursacht, bevor sich das Zufallsknäuel bildet, in dem die Hybridisierung am wahrscheinlichsten ist. Dies erklärt auch, weshalb eine längere oder stabilere Stammsequenz selektivere MBs ergeben sollte: Der Grund ist, dass die Differenz in der Phasenübergangstemperatur zwischen der perfekten komplementären Helix und den Doppelsträngen mit Fehlpaarungen steigt.^[48,49] Entscheidend ist also das dreiphasige thermodynamische Verhalten der MBs (im Unterschied zum zweiphasigen Verhalten der linearen Sonden), das die Differenz der Übergangstemperaturen zwischen perfekter Helix und Doppelsträngen mit Fehlpaarungen vergrößert und damit die höhere Selektivität verursacht.

MB-Sonden können an Oberflächen oder Grenzflächen angebracht und so zur Entwicklung von Biosensoren genutzt werden.^[19,25,51,52] Ihre hohe Empfindlichkeit und ausgezeichnete Selektivität machen MBs zu hervorragenden Biosensorsonden auf Genchips und Mikroarrays,^[24] ebenso wie für optische Nahfeld- und Mikrofasersensoren.^[20] Um die Spezifität von oberflächenimmobilisierten MBs aufzuklären, wur-

de mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) die Hybridisierung zwischen MBs und ihrer komplementären Ziel-DNA (cDNA) auf Einzelmolekülebene untersucht,^[46] indem die zum Bindungsbruch erforderliche Kraft gemessen wurde. Die Kraftdifferenz zwischen einem „perfekten“ MB-cDNA-Hybrid und einem MB-DNA-Hybrid mit einer Fehlpaarung betrug 0.50 ± 0.11 nN und war damit deutlich größer als die entsprechende Differenz bei Verwendung einer linearen DNA-Sonde (0.21 ± 0.08 nN). Diese Ergebnisse belegen, dass die immobilisierten MBs für den Nachweis einzelner Fehlpaarungen viel spezifischere Sonden sind als lineare DNA-Sonden.

2.3. Selektivität kontra Kinetik

Die ausgezeichnete Selektivität von MBs ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber linearen DNA- und RNA-Sonden. Die Ursache der Selektivität liegt letztlich in der Haarnadelstruktur der MBs begründet. Die Selektivität von MBs kann leicht durch eine Optimierung ihrer Sequenzen verbessert werden.^[49,53] Thermodynamischen Überlegungen zufolge sollte eine längere oder stärkere Stammsequenz die Selektivität erhöhen, weil die Differenzen zwischen den Phasenübergangstemperaturen zwischen der perfekten Helix und Doppelsträngen mit Fehlpaarungen, wie oben erläutert, größer werden.^[48,49,59] Das einfachste Verfahren zur Verbesserung der Selektivität sollte also in der Verlängerung der Stammregion oder der Erhöhung des G,C-Gehalts bestehen. Unglücklicherweise erhöht eine stärkere Stammregion zwar die Stabilität der Haarnadelkonformation, vermindert aber gleichzeitig die Hybridisierungsgeschwindigkeit. So beträgt die kinetische Bildungskonstante einer Helix bei einer 17–19 Basen langen linearen DNA-Sonde etwa $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, während die Bildungskonstante bei MBs drastisch von $5000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $40\text{--}300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sinkt, wenn die Stammhelix von vier auf sechs Basenpaare verlängert wird.^[49] Bei kürzeren Stammsequenzen erhält man andererseits einen höheren Fluoreszenzhintergrund, was die Nachweisempfindlichkeit vermindert. Daher muss man einen Kompromiss zwischen der höheren Selektivität der längeren Stammsequenzen und der schnelleren Hybridisierung der kürzeren Stammsequenzen finden. Meistens ist der Stamm 5 bis 7 Basenpaare lang, und die Schleife umfasst 15 bis 25 Basen.

Eine andere Strategie besteht darin, eine längere Stammsequenz zu verwenden, die gleichzeitig Teil der Bindesequenz für die Zielverbindung ist. Dies ermöglicht höhere Hybridisierungsgeschwindigkeiten, ohne auf die Spezifität der längeren Stammsequenzen verzichten zu müssen.^[50]

Selektivität und Hybridisierungsgeschwindigkeit werden außerdem entscheidend von der Temperatur beeinflusst. Höhere Temperaturen begünstigen bei freien MBs das Zufallsknäuel gegenüber der Haarnadelkonformation, wodurch die Fluoreszenz teilweise wiederhergestellt wird. Folglich erfordern Anwendungen mit Temperaturen über 25 °C (In-vivo-Bildgebung oder Echtzeit-PCR-Verfahren) stabilere Stammregionen, um MBs mit niedrigem Fluoreszenzhintergrund zu erhalten.^[6,13] Bei Temperaturen über 50 °C beginnt die Haarnadelstruktur zu einem Zufallsknäuel zu schmelzen, das

einen so hohen Hintergrund verursacht, dass das MB nutzlos wird.^[48,49] Dies lässt sich vermeiden, indem man die MBs aus fixierten Nucleinsäuren (LNAs, locked nucleic acids) herstellt. Diese tragen eine bicyclische Furanoseeinheit, die in einer RNA-ähnlichen Zuckerkonformation fixiert ist (Abbildung 2).^[54,55] Die LNA-DNA-Hybridisierung ist stärker als

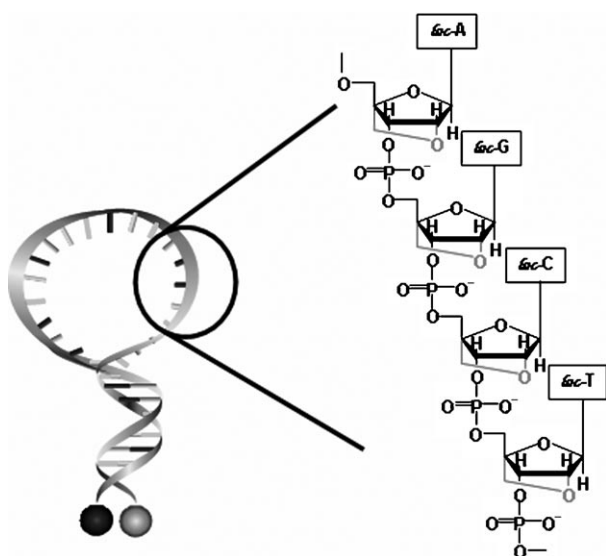


Abbildung 2. Aufbau einer LNA-MB: Das Zuckerrückgrat der LNA bildet eine starre C3'-Konformation über eine 2'-O,4'-C-Methylenbrücke.

die DNA-DNA-Hybridisierung,^[56–58] sodass die LNA-MBs selektiver sind als die DNA-MBs. Messungen der Schmelztemperatur deuten darauf hin, dass die LNA-MBs sogar bei 95 °C noch in einer Haarnadelkonformation verbleiben; DNAs und RNAs wären bei dieser Temperatur längst denaturiert. Der Nachweis, dass die LNA-MBs bei 95 °C mit Ziel-DNA hybridisieren, konnte erbracht werden.^[54] LNA-MBs sind daher vielversprechende Sonden für spezielle biologische Anwendungen, für die normale DNA-MBs nicht geeignet sind. Neben den LNA-MBs gibt es noch andere temperaturstabile Spezies, die zum Aufbau der Stammregion in Frage kommen und die bei neuen Entwürfen mit in Betracht gezogen werden sollten.^[143–145]

3. Bioanalytische Anwendungen von Molecular Beacons

Die oben beschriebenen Eigenschaften machen MBs zu attraktiven Systemen für zahlreiche bioanalytische Anwendungen in der Biomedizin, Biotechnologie und Chemie.^[8,53,60] Als Zielmoleküle kommen nach DNA- und RNA-Molekülen inzwischen auch andere Biomoleküle wie Proteine und Enzyme in Frage. In den nächsten Abschnitten werden wir die wichtigsten Anwendungen kurz vorstellen.

3.1. Echtzeit-PCR- und andere Gendetektions-Assays

MBs werden am häufigsten in Echtzeit-PCR-Assays (PCR = Polymerasekettenreaktion) und anderen Assays

zum Gen-Nachweis verwendet.^[53,60] Um die DNA-Amplifikation der Zielsequenz während der PCR zu verfolgen, kann die PCR-Lösung mit speziell entwickelten MBs versetzt werden, die mit dem PCR-Produkt (in Hin- oder Rückrichtung) hybridisieren. Mit zunehmender Zahl der Reaktionszyklen wird immer mehr amplifizierte Ziel-DNA produziert, die im Annealing-Schritt mit dem MB hybridisiert. Dadurch nimmt die Fluoreszenz des MB zu, wodurch der Fortschritt der PCR in Echtzeit gemessen werden kann. Im Vergleich zu den TaqMan-Sonden lässt sich so eine höhere Empfindlichkeit und bessere Spezifität für den Nachweis der amplifizierten Sequenz erzielen,^[6,10] und durch den besonderen Mechanismus der Signalerzeugung ist außerdem eine parallele Detektion bei höherem Durchsatz und verbesserter Präzision des Assays möglich.^[9,10]

Auch bei anderen Verfahren zur DNA- oder RNA-Amplifikation, wie der Rolling-Circle-Amplifikation (RCA) und der nucleinsäuresequenzbasierten Amplifikation (NASBA), sind MBs als effektive Reportermoleküle geeignet.^[61–63] Beim Nachweis von RCA-Produkten werden MBs aus 2'-O-Me-RNA eingesetzt, um den Abbau durch die 3'-Exonucleaseaktivität der Polymerasen zu vermeiden. Wegen der stabilen Hybridisierung der 2'-O-Me-RNA-Basenpaare genügt eine Stammregion mit vier Basenpaaren.^[62] Das NASBA-Verfahren ist eine effiziente, robuste und empfindliche RNA-Amplifizierungsmethode, allerdings mit dem Nachteil, dass der Nachweis des Produkts im Anschluss an die Reaktion arbeitsintensiv und zeitaufwändig ist. Mit der Einführung von MBs, die komplementär zum Antisense-RNA-Amplikon sind, können NASBA-Produkte in Echtzeit quantitativ nachgewiesen werden.^[62,63]

3.2. Nachweis von Triplex-DNA

MBs sind ideal geeignet, um DNA- und RNA-Wechselwirkungen zu verfolgen.^[8,48] Beispielsweise wurden MBs genutzt, um die Bildungskinetik von Triplex-DNA zu untersuchen.^[64] Es ist bekannt, dass die Bildung von Triplex-DNAs das Promotorzentrum krankheitsrelevanter Gene hemmt. Die Echtzeitanalyse dieser Vorgänge sollte daher die Entwicklung gentherapeutischer Strategien erleichtern. Als Anwendungsbeispiel wurden die Schmelzprofile intramolekularer und intermolekularer DNA-Duplexe, -Triplexe und -Quadruplexe mit DNA-Sonden untersucht, die den Signalübertragungsmechanismus der fluoreszierenden Sonden nachahmen.^[65] Außerdem wurden MBs verwendet, um die Paarung von DNAs über „klebrige“ Enden zu verfolgen (Abbildung 3).^[130] Diese Studien gaben Einblick in die Assoziation der DNA und die heterogene Paarung an den DNA-Enden und halfen beim Entwurf von MBs.

3.3. SNP- und genetisches Screening

Einzelnucleotidpolymorphismen (SNPs) machen etwa 90 % der genetischen Abweichungen beim Menschen aus und werden daher als aussagekräftige genetische Marker und wertvolle Indikatoren in der biomedizinischen Forschung

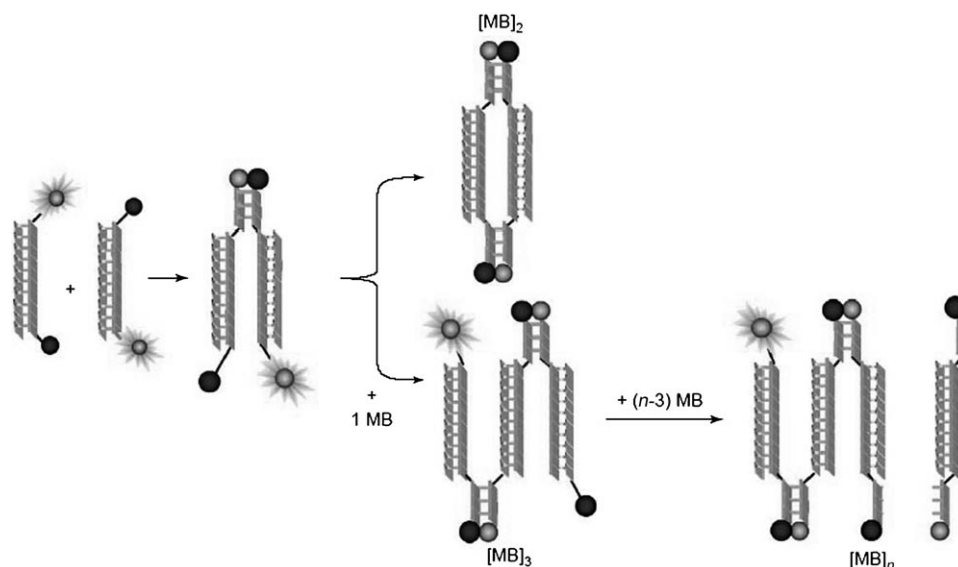


Abbildung 3. Paarung zwischen MBs über überhängende („klebrige“) Enden: Zwei komplementäre überhängende Enden von zwei MB-Hybriden können sich paaren und eine kurze Doppelhelix bilden, sodass die beiden Hybride an einem Ende assoziiert werden. Diese beiden MB-Hybride können eine geschlossene Struktur $[MB]_2$ bilden, indem sie sich mit den beiden anderen überhängenden Enden paaren, oder sie polymerisieren zu einer größeren Struktur $[MB]_n$ ($n > 3$), indem sie sich mit mehreren Hybriden paaren. Durch die Paarung der überhängenden Enden werden Fluorophor und Fluoreszenzlöcher wieder zusammengeführt, und die Fluoreszenz wird unterdrückt.

angesehen.^[66–70] Der inhärente Signalgebungsmechanismus (durch Energieübertragung) und die hohe Selektivität machen MBs zu geeigneten Systemen für den einfachen, schnellen und empfindlichen SNP-Nachweis.^[10,71–73] MBs können SNPs während der PCR in homogener Lösung registrieren, indem MBs mit Sequenzen eingesetzt werden, die zum Wildtyp bzw. den entsprechenden Allelen komplementär sind. Die Schleifenregion des MB wird so gewählt, dass sie eine Schmelztemperatur etwas oberhalb der Annealing-Temperatur der PCR hat, während die Stammregion so gewählt wird, dass sie 7–10 °C oberhalb der Annealing-Temperatur der PCR dissoziiert. Die allelische Base liegt meist in der Mitte der MB-Schleifenregion, wodurch die Empfindlichkeit der SNP-Differenzierung verbessert wird. Für ein optimales Signal werden die PCR-Primer im Allgemeinen so gewählt, dass ein PCR-Produkt entsteht, das kürzer als 250 Basenpaare ist; die Nachweisregion sollte etwa 20–30 Basen von einem Primerende entfernt liegen.^[71] Verglichen mit anderen FRET-Methoden zum SNP-Nachweis, die ebenfalls mit homogener Hybridisierung operieren (z. B. TaqMan-Assays), können MBs verlässlichere Genotypisierungsdaten liefern und eignen sich außerdem zur Paralleldetektion. Damit lassen sich SNPs im Hochdurchsatz identifizieren, was für Anwendungen wie etwa den Aufbau einer DNA-Verbrecherkartei interessant ist.^[74]

3.4. Monitoring von Proteinen und kleinen Molekülen

MBs sind empfindliche Sonden, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder Enzymen mit DNA zu erfassen.^[7,8] Die Fähigkeit von MBs zur Proteinerkennung wurde erstmals an einem einzelstrangbindenden Protein (SSB) aus *E. coli* gezeigt. Bindungsstöchiometrie und Bindungskonstanten

wurden gemessen, indem man die Fluoreszenzzunahme der MBs verfolgte, die durch die SSB-induzierten Konformationsänderungen verursacht wurde (Abbildung 4a).^[22]

Wechselwirkungen zwischen Enzymen und DNA, z. B. der Verdau von ssDNAs durch Nucleasen, können ebenfalls mithilfe von MBs untersucht werden (Abbildung 4b).^[16] Hierbei destabilisiert die Spaltung der Schleifenregion den Doppelstrang des Stamms und stellt die Fluoreszenz wieder her. Die Spaltungsvorgänge wurden mit drei Nucleasen (S1-Nuclease, DNase I, Mungbohennuclease) verfolgt und un-

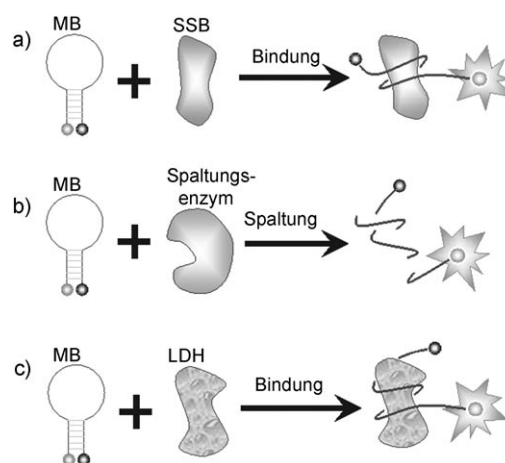


Abbildung 4. Anwendung von MBs in enzymatischen Untersuchungen. a) Echtzeitmessung einer SSB-DNA-Bindung: Das MB bindet an das SSB-Protein, wodurch seine Struktur aufgebrochen und die Fluoreszenz wiederhergestellt wird. b) Nachweis des enzymatischen DNA-Verdaus: Das Enzym spaltet das MB und zerstört die Haarnadelstruktur, wodurch die Fluoreszenz wiederhergestellt wird. c) Bestimmung der LDH-DNA-Wechselwirkung: Das Enzym LDH bindet ein MB und stört dessen Struktur, wodurch die Fluoreszenz ansteigt.

tersucht. In ähnlicher Weise wurde die Wechselwirkung zwischen Lactatdehydrogenase (LDH) und ssDNAs mithilfe von MBs analysiert (Abbildung 4c).^[21] Für verschiedene LDH-Isoenzyme wurden unterschiedliche Affinitäten zu ssDNA bestimmt, z. B. zeigte der Komplex LDH-5/MB eine 1:1-Stöchiometrie und eine Bindungskonstante von $1.9 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$.

Mit zunehmender Entwicklung der MB-Techniken wurden immer ausgefeiltere MB-Assays für spezifische DNA-Protein-Prozesse entworfen, z. B. für die DNA-Ligation und -Phosphorylierung (die an der Duplikation, Rekombination und Reparatur der DNA beteiligt sind).^[17,18,75,76] Zur Untersuchung der DNA-Ligation wurden MBs eingesetzt, die zwei ssDNA-Sequenzen überbrücken und eine Lücke fixieren (Abbildung 5a). Die beiden ssDNAs sind komplementär zu

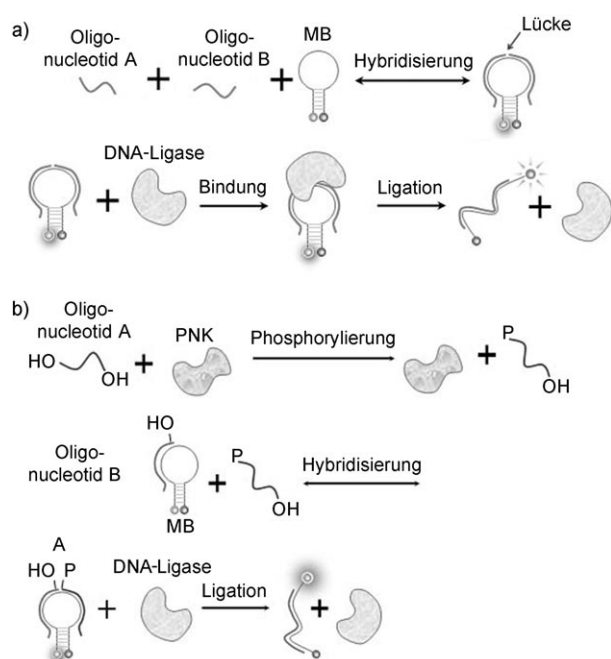


Abbildung 5. Anwendung von MBs zur Untersuchung von Phosphorylierungen und Ligationen. a) Echtzeit-Monitoring einer Nucleinsäure-Ligation: Zwei Oligonucleotide A und B, die zu je einer Hälfte der MB-Schleife komplementär sind, hybridisieren mit dem MB und fixieren die Lücke im Strang, wobei sie die Basenpaarungen in der Stammregion nur geringfügig öffnen. Die DNA-Ligase bindet an die Lücke und katalysiert die Ligation der beiden kurzen Oligonucleotide zu einem Strang. Das Ligrationsprodukt hybridisiert dann mit dem MB, wodurch die Stammregion gespalten und die Fluoreszenz wiederhergestellt wird. b) Untersuchung der Nucleinsäure-Phosphorylierung. Das Oligonucleotid A wird zunächst an der 5'-Hydroxygruppe durch die Polynucleotidkinase phosphoryliert. Die Lücke, die zurückbleibt, wenn Oligonucleotid B und das phosphorylierte Oligonucleotid A mit dem MB hybridisieren, kann durch die DNA-Ligase geschlossen werden. Dadurch wird die Stammregion des MB geöffnet und die Fluoreszenz wiederhergestellt.

zwei aufeinanderfolgenden Abschnitten der MB-Schleife. Die Schmelztemperatur der beiden kurzen Sequenzen ist viel niedriger als die des MB, sodass die Haarnadelstruktur des MB erhalten bleibt. Wenn die DNA-Ligase hinzugefügt wird, schließt sie die Lücke, sodass letztlich die Schleifenregion des

MB als Matrize zur Bildung einer längeren DNA-Sequenz dient, die zur gesamten Schleifenregion komplementär ist. Dies führt wiederum dazu, dass die Basenpaare in der Stammregion getrennt werden und die Fluoreszenz wiederhergestellt wird (Abbildung 5a). Mit dieser Methode lässt sich der Vorgang der DNA-Ligation in Echtzeit verfolgen.^[17,75,76]

Eine Reihe von Ligationen mit verschiedenen DNA-Ligasen wurde auf diese Weise untersucht. Beispiele sind die T4-DNA-Ligase und die DNA-Ligase aus *E. coli*, von denen letztere mit weit höherer Genauigkeit operiert. Für beide Ligasen wurde gefunden, dass eine T-G-Fehlpaarung am 5'-Ende die höchste Fehlerrate bei der Ligation verursacht. Darüber hinaus konnte auch der Einfluss von Metallionen, kleinen Biomolekülen und Wirkstoffen auf die Aktivität der DNA-Ligase detailliert untersucht werden. Dieser Assay könnte zur Identifizierung und Entwicklung von Wirkstoffen gegen eine bestimmte Ligase nützlich sein.^[76] Da der genaue Mechanismus der Ligrationsreaktion jedoch noch nicht bekannt ist, sollten die Ergebnisse der MB-Studien mit Vorsicht interpretiert werden.

Nach einer ähnlichen Strategie wurden auch DNA-Phosphorylierungen – ein wichtiger DNA-Reparaturmechanismus – mithilfe von MBs untersucht (Abbildung 5b).^[17] In diesem Fall wird das DNA-Fragment am 5'-Ende der Lücke so modifiziert, dass es einen Dephosphorylierungsschaden nachahmt (d. h., eine der Hydroxygruppen am 5'-Ende der DNA ist nicht phosphoryliert). Die Lücke, die sich am 5'-Ende der DNA befindet, kann daher erst von der DNA-Ligase geschlossen werden, wenn die „beschädigte“ DNA durch die Polynucleotidkinase (PNK) phosphoryliert wurde. Anschließend werden die beiden DNA-Fragmente zu der längeren Oligonucleotidsequenz ligiert, die zur Schleifenregion des MB komplementär ist.

In jüngster Zeit wurde auch versucht, MBs zur Untersuchung von Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen einzusetzen.^[76,133] Zum Beispiel wurde ein neuartiger Assay zur Aufzeichnung kleiner Moleküle wie Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) und ATP entwickelt. Für den NAD-Test wurden MBs zusammen mit DNA-Ligase aus *E. coli* verwendet. Die Schleifenregion wurde so entworfen, dass sie zwei kurze Oligonucleotide überbrücken kann. Unter diesen Bedingungen katalysiert die DNA-Ligase aus *E. coli* die Verknüpfung der beiden kurzen Oligonucleotide nur in Gegenwart von NAD. Durch die Verknüpfung wird die Sonde geöffnet und das Fluoreszenzsignal wiederhergestellt. Die Methode ist schneller, selektiver und etwa zehnmal empfindlicher als übliche NAD-Assays und kann auch zur Analyse von NAD in biologischen Proben wie Zelllysaten verwendet werden.

3.5. Biosensoren und Biochips

Es gibt inzwischen zahlreiche Anwendungen von oberflächenimmobilisierten MBs als Biosensoren.^[19,20,24,25,51,77–83] Zwei wichtige Punkte sind hierbei zu beachten: 1) Die Immobilisierung der MBs auf der Oberfläche muss effizient sein und zu stabilen Sensorarchitekturen führen. 2) Die MBs

müssen für den Einsatz an der Flüssig-fest-Grenzfläche optimiert werden. Analog zu den bekannten Immobilisierungsstrategien für DNA- oder RNA-Sonden werden zur Immobilisierung von MBs vor allem drei Arten von Wechselwirkungen genutzt: die Biotin-Avidin-Wechselwirkung, die Thiol-Gold-Bindung und Amidbindungen. Entsprechend den verschiedenen Immobilisierungsstrategien werden auch unterschiedliche Trägermaterialien wie Glas,^[19,24] Gold,^[51,84] Polyacrylamid^[85] oder Agarose^[54] eingesetzt. Alle drei Strategien ermöglichen eine hocheffiziente und stabile Immobilisierung, die Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit und Ansprechgeschwindigkeit von MB-Biochips und MB-Biosensoren ist.

Die Immobilisierung von MBs auf einer Oberfläche resultiert oft in einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz. Mehrere Ansätze wurden entwickelt, um diesen Effekt zu minimieren. Eine Möglichkeit ist, einen Abstandhalter zwischen MB und Oberfläche zu bringen, wodurch das MB von der Oberfläche ferngehalten wird und mögliche Wechselwirkungen zwischen MB und Oberfläche minimiert werden.^[20,86] In einem Fall wurde ein Poly(T)-Linker an einem Ende des MB als Abstandhalter verwendet,^[24] allerdings lässt sich die Empfindlichkeit auf diese Weise nur geringfügig verbessern. Ein anderer Ansatz bestand darin, die MBs an die Oberfläche eines funktionalisierten hydrophilen Gelfilms wie Agarose oder Polyacrylamid zu binden und so in einer homogenen lokalen Umgebung zu immobilisieren.^[25,85] Das MB-Agarose-System zeigte einen niedrigeren Hintergrund, höhere Empfindlichkeiten und bessere Selektivitäten als MBs auf Glasträgern. Die Immobilisierung von MBs auf einer Goldoberfläche ist eine andere Möglichkeit, den Hintergrund zu verringern. Die Ursache ist der stark fluoreszenzlöschende Effekt der Goldoberfläche auf Fluorophore in unmittelbarer Umgebung.^[51,84] Nach der Hybridisierung mit der Ziel-DNA konnte ein Anstieg der MB-Fluoreszenz um das Hundertfache gemessen werden.

Als Ersatz für die Fluoreszenzanalyse wurden inzwischen auch neuartige Strategien der Signalerzeugung entwickelt, darunter enzymatische Verfahren und elektrochemische Elektronenübertragung.^[87,88,131,138] Bei diesen Nachweisverfahren wird die signalgebende Gruppe – ein Enzym oder eine elektrochemische Verbindung – an das freie Ende eines MB gekuppelt. Das Signal wird durch die Konformationsänderung des MB als Folge der Hybridisierung mit der Ziel-Nucleinsäure ausgelöst.

MB-funktionalisierte Trägerkügelchen wurden zur parallelen Analytdetektion eingesetzt.^[80,86] Die MB-beladenen Kügelchen wurden hierbei statistisch auf eine Anordnung von Vertiefungen verteilt, die auf eine optische Faser mit einem Durchmesser von 500 µm geätzt waren.^[80] Die Anordnung kann im Hochdurchsatz betrieben werden und ermöglicht eine schnelle Ansprechzeit, wodurch z. B. die parallele Analyse genetischer Mutationen gelang. In Kombination mit der Durchflusszytometrie wurden MB-funktionalisierte Kügelchen zum parallelen Nachweis nichtmarkierter Nucleinsäuren genutzt.^[86] Die Signale der MB-funktionalisierten Kügelchen wurden mithilfe einer Größen- und Farbcodierung differenziert. Man erwartet, dass die Verwendung MB-funktionalisierter Trägerkügelchen schnelle, einfache und genaue Ana-

lysen und Genotypisierungen für die klinische Diagnostik und Therapie ermöglicht.

Eine andere Klasse leistungsfähiger Biosensoren beruht auf ultrakleinen optischen Fasersonden, die sich durch extreme Empfindlichkeit auszeichnen und zudem eine räumliche Auflösung ermöglichen.^[89,90] Mithilfe immobilisierter MBs wurden Biosensoren aus submikrometerdicken Fasern hergestellt, um DNA und RNA in kleinvolumigen Proben mit ungewöhnlicher Empfindlichkeit und Selektivität nachzuweisen. Die wiederverwendbaren Fasersonden könnten zum Nachweis spezifischer DNA- oder RNA-Sequenzen in lebenden Zellen eingesetzt werden.

4. Intrazelluläre Echtzeitanalysen mit Molecular Beacons

Ein entscheidender Vorteil von MB-Verfahren ist, dass Analyte ohne die vorherige Abtrennung ungebundener Sondenmoleküle detektiert werden können, sodass die Möglichkeit intrazellulärer Messungen besteht. Zum Beispiel können Synthese, Transport und Verteilung von mRNAs in lebenden Zellen mit guter räumlicher und zeitlicher Auflösung verfolgt und wichtige Informationen für die funktionale Genomik erhalten werden.^[12,14,55] Eine Reihe von Sonden für den intrazellulären mRNA-Nachweis ist in den letzten Jahren entwickelt worden, z. B. lineare binäre FRET-Sonden,^[91] der Nucleinsäurefarbstoff SYTO 14,^[92] mit GFP fusionierte RNA-Bindeproteine,^[93–96] fluoreszenzgelöschte Autoligationssonden^[97,98] und MBs.^[12,14,19] Trotz dieser Erfolge befindet sich das Gebiet aber noch in den Anfängen, und es gibt derzeit keine universelle Methode, um intrazelluläre Ereignisse mit allen erforderlichen Parametern zu erfassen.

4.1. MBs zum mRNA-Nachweis in lebenden Zellen

MBs sind dank ihres einzigartigen Signalmechanismus für Genexpressionsstudien in lebenden Zellen prädestiniert: 1) Der Nachweis der Ziel-RNA erfolgt in Echtzeit, ohne dass gebundene und freie Sondenmoleküle vorher getrennt werden müssten. Dies ist für Messungen in lebenden Zellen eine entscheidende Voraussetzung, denn es ist unmöglich, die MB-mRNA-Hybride vom Überschuss nicht gebundener MBs zu trennen ohne die Zellen zu zerstören. 2) Die hohe Empfindlichkeit der MBs (mit Nachweisgrenzen im nM-Bereich und darunter) ist entscheidend, um auch mRNA-Moleküle mit sehr niedriger Kopienzahl in einer einzigen Zelle nachweisen zu können. 3) MBs zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Selektivität aus und können zwischen Sequenzen differenzieren, die sich nur in einer Base unterscheiden.

Beim Entwurf von MBs für Anwendungen im intrazellulären mRNA-Monitoring müssen vor allem zwei Punkte beachtet werden: Die MBs müssen so entworfen sein, dass sie die Ziel-mRNA in der Zelle finden, und es muss eine Methode entwickelt werden, um die Sonden möglichst effizient in die Zellen zu transportieren.

Ein generell schwieriger Aspekt beim Entwurf einer MB-Sonde ist die Auswahl der passenden Zielsequenz innerhalb

der mRNA. Das Problem liegt zum einen in der komplexen Sekundärstruktur der langen mRNA-Sequenzen und zum anderen darin, dass die MBs freien Zugang zu ihren komplementären Sequenzen haben müssen. Die Suche nach einer geeigneten Zielsequenz beginnt daher gewöhnlich mit der Vorhersage möglicher mRNA-Sekundärstrukturen. Die Zielregion wird in einem Bereich gesucht, der mit hoher Wahrscheinlichkeit einzelsträngig bleibt. So soll gesichert werden, dass die native mRNA-Struktur möglichst wenig mit der MB-Hybridisierung in Konflikt gerät. Für die ausgewählten Regionen werden Oligonucleotide hoher Affinität und verschiedener Länge, die komplementär zu den Zielsequenzen sind, als Sequenzen für die Schleifenregionen der MBs ausgewählt. Um falsche Hybridisierungen (mit anderen als den gewünschten mRNAs) möglichst zu vermeiden, ist eine BLAST-Analyse (basic local alignment search tool) ein notwendiger Schritt.^[100]

Der zweite Punkt betrifft den Transport der Sonden in die Zellen. Die häufigsten Verfahren zum Einschleusen von DNA in lebende Zellen sind Mikroinjektion,^[14,101] Elektroporation,^[102] reversible Permeabilisierung^[15] und peptidvermittelte Membranpassage.^[103] Die Mikroinjektion hat mehrere Vorteile: Sie ermöglicht den DNA-Transport in eine einzelne Zelle, die SONDENSPEZIES kann in gut reproduzierbaren Mengen eingeschleust werden, und das Ansprechverhalten der Sonde lässt sich sofort messen. Nachteile der Mikroinjektionstechnik sind die relativ aufwändige Instrumentierung und der geringe Durchsatz. Weitaus höhere Durchsätze sind mit Elektroporation und reversibler Permeabilisierung möglich. Beide Methoden erzeugen Poren in der Zellmembran, durch die die Sonden durch passive Diffusion in die Zellen gelangen.^[15,102] Im Gegenzug können intrazelluläre Moleküle aber auch aus der Zelle diffundieren, und die Menge an SONDENSPEZIES, die in einzelne Zellen gelangen, schwankt. Eine weitere Methode – die peptidvermittelte Membranpassage –, schleust Sonden durch die Membran, ohne die Integrität der Zelle zu stören.^[103] Dazu muss das Peptid allerdings an die Sonde gekuppelt werden, was die Kosten und Komplexität der SONDENSYNTHE erhöht. Außerdem erfordert der Aufnahmeprozess eine gewisse Inkubationszeit, was die Methode zur Analyse schneller Hybridisierungen ungeeignet macht.

4.2. Genexpressionsstudien in lebenden Zellen

Der zunehmende Einsatz von MBs für die intrazelluläre Analyse führte auch zur Entwicklung von MB-Methoden zur Visualisierung von Lokalisation, Verteilung und Transport der mRNAs in lebenden Zellen. Die ersten In-vivo-Studien mit MBs galten lediglich dem Nachweis der Hybridisierung an die Zielsequenz, während Lokalisation und Verteilung noch keine Beachtung fanden.^[13,104] Im Jahr 2003 berichteten Tyagi et al., dass MBs auch geeignet sind, um die Verteilung und den Transport von mRNA zu visualisieren.^[12] In dieser Studie wurde ein MB mit Spezifität für die Oskar-mRNA in Oozyten von *Drosophila melanogaster* untersucht. Um die Hintergrundfluoreszenz der MBs auszuschalten, wurde eine Strategie mit zwei MBs entwickelt, die mit benachbarten

Regionen der mRNA hybridisieren. Wenn beide MBs unmittelbar nebeneinander hybridisieren, wird das FRET-Signal sichtbar und zeigt die Gegenwart der Zielsequenz an. Auf diese Weise ließ sich nicht nur die Verteilung der mRNA sichtbar machen, sondern auch die Wanderung der mRNA durch die Zelle und sogar in benachbarte Zellen der Oozyte verfolgen. Um das Verhalten eines Virus zu untersuchen, wurde die virale mRNA mithilfe von MBs in der Wirtszelle sichtbar gemacht. Die Lokalisation der mRNA wurde bestimmt und die Diffusion der mRNA mit FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) gemessen. In weiteren Visualisierungsstudien untersuchten Bao et al. die Colokalisation von mRNA und intrazellulären Organellen in menschlichen Haut-Fibroblasten.^[15] In dieser Studie wurden MBs in Kombination mit einer Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien genutzt. Die Fluoreszenz der MBs und die des Farbstoffs konnten spektral aufgelöst und voneinander unterschieden werden, was den Nachweis ermöglichte, dass die mRNAs von Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und von K-ras spezifisch innerhalb der Mitochondrien lokalisiert sind.

Gewöhnlich beobachtet man, dass MBs nach dem Einschleusen in eine lebende Zelle schnell in den Zellkern wandern und dann geöffnet werden. Dies verursacht einen hohen Fluoreszenzhintergrund im intrazellulären Kompartiment und besonders in der Gegend des Zellkerns, wodurch Untersuchungen der mRNA im Zytoplasma stark beeinträchtigt werden. Um dieses Problem zu lösen, wurde in vitro translatierte tRNA an einem Ende mit dem verlängerten Arm eines MB hybridisiert.^[99] Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die tRNA-gekuppelten MBs eine längere Verweilzeit im Zytoplasma hatten und nicht im Zellkern angereichert wurden. In dieser Form waren sie für ein intrazelluläres mRNA-Monitoring geeignet. Eine ähnliche Strategie, bei der MBs an Makromoleküle oder Nanopartikel gekuppelt werden, kann ebenfalls dabei helfen, die MBs vom Zellkern fernzuhalten.^[139,140]

Weitere wichtige Untersuchungen galten der Expressionshöhe von mRNAs in lebenden Zellen. Zwei MB-Methoden wurden verwendet, um die relativen Expressionshöhen von K-ras und überlebender mRNA in menschlichen Haut-Fibroblasten zu bestimmen.^[15] Mithilfe von MBs und einer Referenzsonde als internem Standard für eine ratiometrische Analyse untersuchten wir kürzlich die stochastischen Schwankungen der mRNA-Expression der Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) in menschlichen Brustkrebszellen.^[105] In dieser Arbeit wurde die MnSOD-Expression dreier Zellgruppen analysiert und untereinander sowie mit der Expression von β -Actin-mRNA verglichen. Um die vielen experimentellen und instrumentellen Unterschiede auszugleichen, wurden die Ergebnisse durch die ratiometrische Analyse normiert und damit direkt vergleichbar gemacht. Die Methode bietet eine neue Strategie für den quantitativen Nachweis von mRNA in lebenden Zellen.

Während Untersuchungen einzelner mRNA-Zielsequenzen in Zellen bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben wurden, ist die parallele Aufzeichnung verschiedener mRNAs in einer einzelnen lebenden Zelle eine experimentelle Herausforderung. Ein solches Experiment würde

einen direkten Vergleich der Expressionshöhen verwandter mRNAs in einer einzelnen Zelle ermöglichen, was für die Untersuchung mancher Krankheiten äußerst nützlich wäre. Es wurde bereits demonstriert, dass MBs mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert werden können, um unterschiedliche mRNA-Zielsequenzen anzuzeigen. In einer Studie wurden z.B. MBs für MnSOD- und β -Actin-mRNA (zusammen mit einem MB als Negativkontrolle) durch Mikroinjektion in Zellen eingebracht. Mit einem konfokalen Mikroskop mit mehreren Fluoreszenzmesskanälen wurden dann die relativen Expressionshöhen von MnSOD und β -Actin durch ratiometrische Analyse parallel bestimmt (Abbildung 6).^[14,105,146] Die ratiometrische Analyse ermöglicht bes-

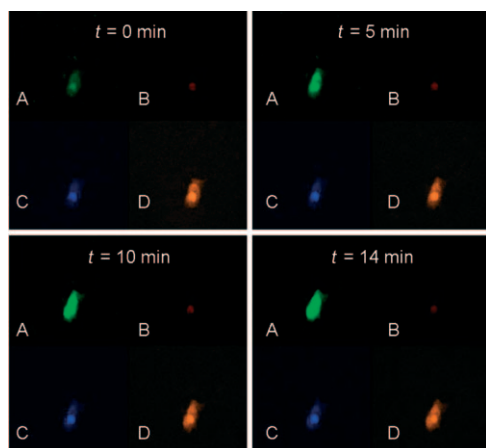


Abbildung 6. Simultane Aufzeichnung mehrerer mRNAs in einer lebenden Zelle. Gezeigt ist eine Zeitreihe von Fluoreszenzbildern der MBs in einer einzelnen MDA-MB-231-Zelle. A: MB für β -Actin (grün); B: Kontrollaufnahme (MB-Farbe rot); C: MB auf MnSOD (blau); D: Referenzsonde Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) (RuBpy) (orange).

ser reproduzierbare Messungen als die direkten Intensitätsmessungen. Die Fluoreszenz der MnSOD-spezifischen MBs in den Zellen war nach vier Stunden Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS), einem typischen Endotoxin, das die MnSOD-Expression stimuliert, deutlich erhöht. In Kontrollzellen ohne LPS-Behandlung blieb die Fluoreszenz der MnSOD-MBs dagegen niedrig. Diese Untersuchung belegt, dass MBs effektiv zur intrazellulären Aufzeichnung von Analyten geeignet sind und zur Erforschung von Krankheiten genutzt werden könnten, bei denen ein Vergleich der Expressionshöhen unterschiedlicher mRBA-Spezies wichtig ist.

4.3. Genomik von Nervenzellen

Wegen der extremen Komplexität und Diversität des Nervensystems bleibt die Funktionsweise des Gehirns auch nach vielen Jahren intensiver Forschung rätselhaft.^[106] Ein Beispiel ist die Familie der Riechrezeptoren (olfactory receptors, ORs), die eine der größten Genfamilien in Säugern ist und beim Menschen etwa 900, bei Mäusen etwa 1500 Gene umfasst.^[107] Unter den annähernd 1000 Möglichkeiten, die im Genom codiert sind, wählt jede olfaktorische sensorische Nervenzelle genau einen Riechrezeptor und transkribiert ihn

von genau einem Allel, um damit den korrekten olfaktorischen Verarbeitungsweg zwischen Nase und Gehirn aufzubauen. Unser Wissen über die Gehirnfunktion ist derzeit noch begrenzt, vor allem weil man bisher nicht in der Lage war, die vielen Zelltypen zu identifizieren und zu klassifizieren.^[108] Fortschritte in der Genomik und Proteomik erlauben uns aber, die Entwicklung und Funktion der Nervenzellen und der neuronalen Schaltkreise auf molekularer Ebene zu untersuchen. Neuartige Methoden der funktionellen Genomik und Proteomik, z.B. CGH-Profilierung (Profilierung durch vergleichende genomische Hybridisierung), werden zunehmend eingesetzt, um Einblicke in das neuronale Netzwerk zu gewinnen.^[109]

Einblicke in die Funktion von Nervenzellen können durch Echtzeit-Bestimmungen der Expressionshöhe maßgeblicher Gene in lebenden Zellen gewonnen werden. Mit der gleichen MB-Methode, die wir zur Untersuchung von Brustkrebszellen verwendeten, haben wir versucht, mRNAs in lebenden Nervenzellen nachzuweisen (Abbildung 7).^[14,105] Leider er-

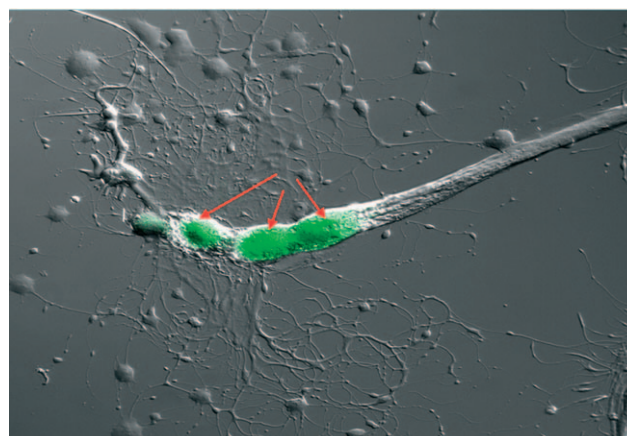


Abbildung 7. Lebende Nervenzelle, in die MBs mit Poly(U)-Sequenzen injiziert wurde. Die grüne Fluoreszenz entsteht durch die Öffnung der MBs im Verlauf neuronaler Vorgänge.

zeugten die MBs bereits kurz nach der Mikroinjektion in die Nervenzellen ein starkes Fluoreszenzsignal, was bedeutet, dass das neuronale Zytoplasma deutlich anders zusammengesetzt ist als das Zytoplasma der früher untersuchten Tumorzellen. Die hohe Hintergrundfluoreszenz könnte auch durch Nucleaseverdau oder Proteinbindung verursacht werden (zwei häufig auftretende Probleme beim Einsatz von MBs in lebenden Systemen). Um die Stabilität der MBs in Nervenzellen zu erhöhen, haben wir neuartige Sequenzen aus fixierten Nucleinsäurebasen synthetisiert.^[54,55] Nach ersten Ergebnissen sind die LNA-MBs im Zytoplasma der Zelle durch die starre Struktur der LNA-Basen sehr viel stabiler als konventionelle MBs (siehe Tabelle 1 in Abschnitt 2.1).

4.4. Optimierung von DNA-Sonden durch molekulartechnische Methoden

Eine Reihe von Optimierungen sind erforderlich, bevor MBs zur Aufzeichnung der mRNA-Expression in lebenden

Zellen genutzt werden können. Besonderes Augenmerk gilt der Empfindlichkeit der Sonden sowie der Vermeidung von unspezifischen Proteinbindungen und Nucleaseverdau.

4.4.1. Steigerung der Empfindlichkeit von DNA-Sonden

MB-Sonden mit hoher Empfindlichkeit zu erzeugen, ist eine schwierige und komplexe Aufgabe. Für Zielsequenzen mit sehr niedriger Kopienzahl in einer einzelnen Zelle ist die Empfindlichkeit konventioneller MBs oft unzureichend, weshalb sich die meisten Anwendungen bisher auf den Nachweis häufiger oder stimulierter Genprodukte beschränken.^[12,14,99] Grundsätzlich kann man die Empfindlichkeit von MBs steigern, indem man entweder die Fluoreszenzintensität des Fluorophors erhöht oder die Fluoreszenzlöschung effizienter macht. Der zweite Lösungsansatz wird dadurch eingeschränkt, dass es immer ein gewisses Hintergrundsignal aus dem Zellinnern und der Umgebung gibt, ganz gleich wie vollständig die Fluoreszenz des Donors unterdrückt werden kann. Die meisten Strategien verfolgen daher den ersten Lösungsansatz, also die Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Wie erwähnt liegt der typische Wirkungsgrad der statischen oder Kontaktfluoreszenzlöschung bei 85–97%.^[26,42] Theoretisch ließe sich mit höheren Wirkungsgraden ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis und damit eine größere Empfindlichkeit und ein größerer dynamischer Bereich für den Nachweis der Zielsequenzen erreichen.

Kürzlich wurde eine als Superquenching bezeichnete Strategie entwickelt, bei der molekulare Assoziate bestehend aus mehreren Fluoreszenzlöschern eingesetzt werden.^[43] Auf diese Weise lassen sich wesentlich bessere Wirkungsgrade erzielen; z.B. erhöhte sich der Wirkungsgrad von 92.9 auf 99.7%, wenn ein Konjugat von drei Dabcyl-Molekülen statt nur eines Moleküls verwendet wurde (mit einem FAM als Fluorophor). Das Signal-Rausch-Verhältnis stieg außerdem deutlich von 14 auf 320, sodass die Möglichkeit zur Spurenanalyse von Zielsequenzen besteht (Abbildung 8). Des Weiteren erhöht sich die Schmelztemperatur des MB um 5°C durch die verstärkte hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Fluorophor und den Fluoreszenzlöchern. Damit lassen sich einzelne Fehlpaarungen möglicherweise besser erkennen. Der Wirkungsgrad des Superquenchings kann allerdings nicht voll zum Tragen kommen, bevor nicht der zelluläre Hintergrund mithilfe anderer Strategien minimiert wird, z.B. durch zeitaufgelöste Messungen oder Wellenlängenverschiebungen.^[124]

4.4.2. Steigerung der Empfindlichkeit von MBs durch konjugierte Polymere

Eine andere Strategie, die Empfindlichkeit von MBs zu steigern, ist der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Poly(phenylenethynyl) (PPE)^[44] ist ein wasserlöslicher Polyelektrolyt mit hoher Quantenausbeute.^[45] Eine einzelne PPE-Kette kann ein viel intensiveres Fluoreszenzsignal erzeugen als ein einzelner Fluorophor in konventionellen MBs. Mit einem neu entwickelten Syntheseverfahren, bei dem die Polymerisation direkt an den Oligonucleotiden abläuft, lässt sich PPE an Oligonucleotide kuppeln, die an eine Glasoberfläche

mit kontrollierter Porengröße gebunden sind. Es zeigte sich, dass PPE weder mit der Haarnadelstruktur des MB interferiert noch dessen Hybridisierungsgeschwindigkeit beeinflusst. Zur Charakterisierung des PPE-Systems verglichen wir die erzeugte Helligkeit mit der Fluoreszenzintensität gebräuchlicher Fluorophore bei den jeweils optimalen Anregungs- und Extinktionswellenlängen. Die Konzentrationen der Fluorophore wurden konstant bei 10 nM gehalten. Die Messungen ergaben eindeutig, dass PPE eine viel größere Helligkeit als herkömmliche organische Farbstoffe wie Cy3, TMR, FAM oder Alexa Fluor 488 (ALX488) zeigt (Abbildung 9). Unter unseren experimentellen Bedingungen (Abbildung 9) strahlt PPE etwa zwanzigmal heller als z.B. Cy3 und mehr als sechsmal heller als Alexa Fluor 488. Zudem beträgt die Fluoreszenzintensität einer einzelnen PPE-Kette etwa 75% der eines Quantenpunkts, seine Helligkeit ist also mit der eines Nanopartikels vergleichbar.

Darüber hinaus ließ sich für Dabcyl als Fluoreszenzlöcher ein hoher Wirkungsgrad in Kombination mit PPE nachweisen. In einem Experiment wurde überprüft, ob ein Superquenching von PPE durch Dabcyl möglich ist. Wie in Abbildung 10 dargestellt, lassen sich 2 μM (Konzentration der repetitiven Einheiten) PPE durch steigende Konzentrationen Dabcyl sehr wirkungsvoll löschen. Die Stern-Volmer-Konstante bei niedrigeren Konzentrationen des Fluoreszenzlöschers ($< 0.4 \mu\text{M}$) betrug etwa $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Bei höheren Konzentrationen des Fluoreszenzlöschers ergibt sich in der Stern-Volmer-Darstellung eine starke Krümmung nach oben, wodurch eine viel höhere Konstante von etwa $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ resultiert. Ein nach oben gekrümmter Verlauf ist typisch für konjugierte Polyelektrolyte mit gegensätzlich geladenen Fluoreszenzlöchern. Diese Erscheinung ist bekannt, und der Mechanismus wurde bereits diskutiert. In unserem Experiment erzeugte das mit PPE konjugierte MB ein starkes Fluoreszenzsignal bei der Bindung der Zielsequenz, was für bioanalytische Anwendungen vielversprechend ist.

Die hier vorgestellten, neuartigen Strategien zur Verstärkung der Fluoreszenzlöschung und Steigerung der Signalintensitäten ermöglichen den Nachweis von Zielsequenzen mit niedriger Konzentration in lebenden Zellen. Die Strategien können auch leicht auf andere Arten von DNA- oder RNA-Sonden übertragen werden, um Tests mit hoher Empfindlichkeit vorzunehmen.

4.4.3. Erhöhung der Stabilität von MBs mit abgewandelten DNA-Basen.

Ein allgemeines Problem bei der Anwendung von MBs ist die MB-Spaltung durch Nucleaseverdau, mit dem sich Zellen gegen eindringende heterologe Gene schützen. Im Zellinnern werden MBs typischerweise in 45 min abgebaut, was sich in einem starken Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen gibt.^[14,55] Mit dem Ziel, die zytoplasmatische Stabilität von MBs zu verbessern, wurden modifizierte DNA-Basen in MBs eingebaut, darunter 2'-O-Methylderivate,^[110–112] Phosphorothioat-derivate^[113,114] und Peptidnucleinsäure(PNA)-Basen.^[115,116,141] Die 2'-O-Methyl-modifizierten MBs zeigen gute Nucleaseresistenz gegen intrazelluläre Spaltung und werden von RNase H nicht erkannt.^[12] Sie verursachen jedoch eine starke

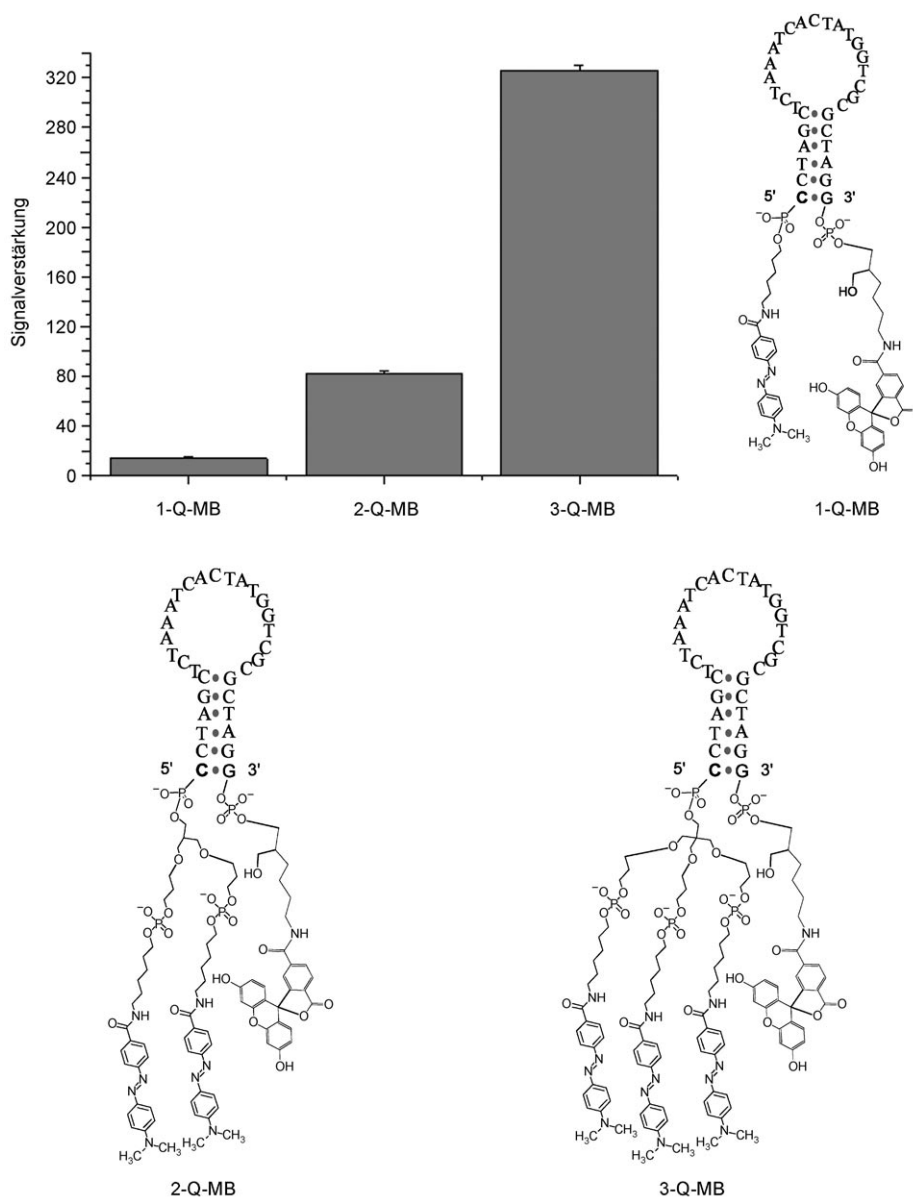


Abbildung 8. Superquencher-MBs: Signal-Rausch-Verhältnis von MBs mit einem (1-Q-MB), zwei (2-Q-MB) oder drei Fluoreszenzlöschern (3-Q-MB). Die MBs haben die gleiche Sequenz und sind mit Fluorescein als Fluorophor am 3'-Ende markiert. An das 5'-Ende der Oligonucleotide sind ein, zwei oder drei DABCYL-Moleküle gekuppelt. Das drei Fluoreszenzlöcher enthaltende MB erzeugte eine 320fache Signalverstärkung bei Hybridisierung, verglichen mit einer 14fachen Verstärkung beim einfachen MB.

Hintergrundfluoreszenz in lebenden Zellen, möglicherweise verursacht durch unspezifische Proteinbindung.^[21,22,138] PNA-MBs sind nucleaseresistent und haben eine gute Affinität zu DNA- und RNA-Zielsequenzen, sind wegen ihrer schlechten Löslichkeit und gelegentlicher Aggregation aber nicht breit einsetzbar.

Die bereits erwähnten LNA-MBs sind ebenfalls nucleaseresistent und gehen zudem kaum unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen wie SSB ein, was sie zu hervorragenden Kandidaten für intrazelluläre Untersuchungen machen könnte. Um die Vorteile der LNA-MBs in Anwendungen wie der Analyse komplexer Proben und intrazellulärer Messungen ausnutzen zu können, synthetisierten Yang et al. eine Serie von chimären DNA/LNA-MBs und unter-

suchten den Einfluss des DNA/LNA-Verhältnisses in MBs auf das thermodynamische Verhalten, die Hybridisierungskinetik, die Proteinbindungsaffinität und die Enzymresistenz.^[132] Die LNA-Basen in der Stammregion des MB hatten einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der Haarnadelkonformation. Die Hybridisierungsgeschwindigkeit der LNA-MBs nahm mit sinkendem DNA/LNA-Verhältnis merklich zu. Außerdem war wichtig, dass auch die Stammregion der LNA-MB an die Zielsequenz hybridisierte („Shared-Stem“-Form), da so die Paarung überhängender Enden verhindert wird. Nur MB-Sequenzen mit abwechselnd aufeinanderfolgenden DNA- und LNA-Basen oder ausschließlich LNA-Basen erwiesen sich als resistent gegen unspezifische Proteinbindung und Verdau durch DNase I. Es

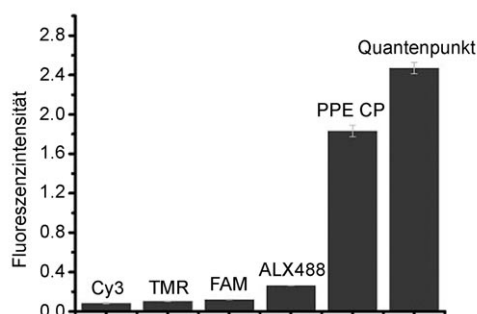
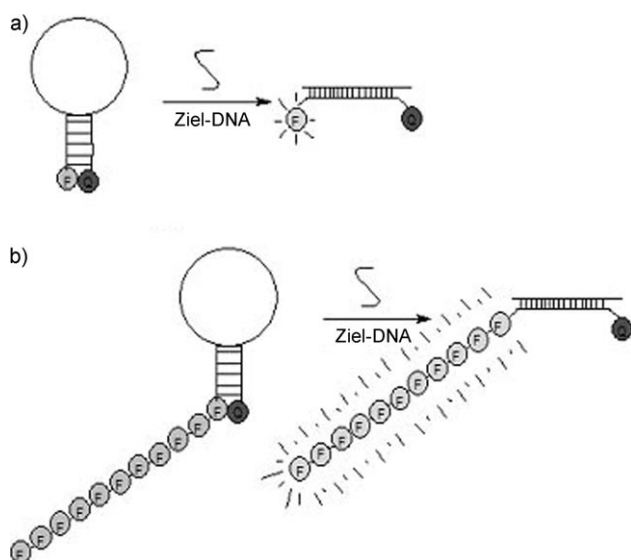


Abbildung 9. PPE-MBs. Oben: Funktionsweise eines konventionellen MB (a) und eines mit einem konjugierten Polymer markierten MB (b). Das konventionelle MB verwendet nur einen einzelnen Fluorophor, um das Bindungsereignis zu signalisieren, während die polymermarkierten MBs eine Kette von Fluorophoren verwenden. Unten: Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedener Fluorophore. Die Anregungs-/Emissionswellenlängen von Cy3, TMR, FAM, ALX488, PPE und Quantenpunkten sind (in nm): 543/560, 557/581, 488/514, 488/515, 440/520 bzw. 400/520. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt jeweils 10 nM.

wurde gezeigt, dass eine Basenfolge von weniger als drei DNA-Basen zwischen den LNA-Basen die RNase H blockieren kann.

Insgesamt also verfügt die optimierte MB-Sonde für intrazelluläre Anwendungen über eine Shared-Stem-Konfiguration mit einer vier Basen langen Stammregion und alternierende DNA- und LNA-Basen. Eine so entworfene Sonde zeigt vernünftige Hybridisierungsgeschwindigkeiten, verringerte Proteinbindung und Resistenz gegen Nucleaseverdau. Diese Studie hat weitreichende Auswirkungen auf die Entwicklung von molekularen LNA-Sonden für intrazelluläre Messungen, Krankheitserkennung und die biologische Grundlagenforschung. Durch weitere Modifizierungen wurden LNA-MBs erhalten, die für Langzeitmessungen in Echtzeit (von wenigen Stunden bis zu Tagen) im Zellinnern mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität geeignet sind.^[142] Die gemischten DNA/LNA-MBs zeichneten sich durch eine

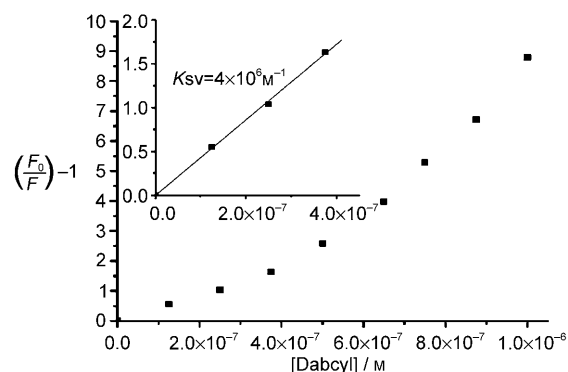


Abbildung 10. Stern-Volmer-Diagramm der Fluoreszenzlösung von PPE durch DabcyI in 40 mM Glycin-HCl-Puffer (pH 2.3). Der Puffer dient dazu, DabcyI als Gegenion zum Polymer PPE zu protonieren.

extrem hohe Biostabilität aus und wurden z. B. an MDA-MB-231-Tumorzellen getestet, um die mRNA-Expressionshöhen in Echtzeit über 5 bis 24 h zu bestimmen. Nach 24 h in lebenden Zellen waren die MBs noch immer funktional, sodass die Messung der intrazellulären Genexpression über ausgedehnte Zeiträume möglich ist.

Um das Problem der Ausbreitung der Stammregion in Haarnadelsonden anzugehen, haben wir vor kurzem ein modifiziertes MB synthetisiert, das nichtnatürliche enantiomere DNA (L-DNA) in der Stammregion enthält und natürliche D-DNA in der Schleife.^[134] Da L-DNA eine spiegelbildliche Form der natürlich vorkommenden D-DNA ist, haben beide Doppelstränge die gleichen physikalischen Eigenschaften bezüglich der Löslichkeit und Stabilität. Außer einer linksdrehenden Doppelhelix kann L-DNA keine stabilen Doppelstränge mit D-DNA bilden. Durch den Einbau von L-DNA in die Stammregion eines MB wird die intra- und intermolekulare Ausbreitung der Stammregion unterdrückt, die Schmelztemperatur der Haarnadelsonde wird angehoben und die Selektivität gegenüber der Zielsequenz wird verbessert. Insgesamt verleiht dies dem MB eine höhere Stabilität in biologischer Umgebung. Wir glauben, dass die Verwendung von L-DNA eine nützliche Strategie für den Entwurf von funktionellen Nucleinsäuresonden ist.

5. Ausblick

Seit der Einführung der Molecular Beacons im Jahr 1996^[6] wurden viele Versuche unternommen, ihren Aufbau zu verbessern und neue Anwendungen zu finden. Heute existiert eine ganze Bandbreite solcher Sonden, die durch gezielte Optimierung der einzelnen Komponenten hohe Leistungsfähigkeiten erreicht haben. Zu den besonderen Vorzügen der MBs zählen der sehr effiziente Signalübertragungsmechanismus durch resonanten Energietransfer, die flexible Modifizierbarkeit und nicht zuletzt die relativ niedrigen Kosten, sodass sich ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten in der Biologie, Chemie, Biomedizin und Biotechnologie eröffnet hat. Derweil gehen die Bemühungen weiter, Herstellung und Design der MBs noch mehr zu verbessern. Im Fokus stehen vor allem die weitere Optimierung der Si-

gnalübertragung, die Verwendung modifizierter Basen und die Suche nach neuen Anwendungen in der biochemischen und biomedizinischen Forschung.

Ein wichtiger Ansatz zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit der MBs ist die Entwicklung effizienterer Signalübertragungswege. Neben dem ursprünglich genutzten Signalübertragungsmechanismus der Kontaktfluoreszenzlöschung wurde inzwischen eine Fülle neuer Strategien entwickelt und getestet, darunter FRET,^[11] Wellenlängenverschiebung,^[9] Fluoreszenzlöschung an Metalloberflächen,^[51,84,118] enzymatische Verstärkung^[87,119,120] und elektrochemische Signalübertragung.^[88] Neben den gebräuchlichen Fluorophoren und Fluoreszenzlöschern wurden auch neue chemische Spezies interessant, z.B. Gold-Nanopartikel,^[118] Superquencher,^[43] Pyrenderivate,^[121,135] konjugierte Polymere,^[44] Goldoberflächen^[51,84] und Ferrocenmoleküle.^[88]

Ein weiterer Vorteil von MBs besteht darin, dass die Strukturen relativ leicht chemisch modifiziert werden können, was sehr flexible Synthesen ermöglicht. So wurden diverse Basenmodifikationen entwickelt, z.B. 2'-O-Methyl-^[110–112] und Phosphorothioatderivate,^[113,114] PNAs,^[115,116] LNAs^[54,55] und L-DNAs^[134] (siehe Tabelle 1). Mit diesen Modifikationen erhalten die MBs zusätzliche Eigenschaften wie Nucleaseresistenz, bessere Hybridisierungsaffinität und minimierte unspezifische Proteinbindung. MBs können auch an Nanoröhren gekuppelt werden.^[147]

Die ursprünglichen Einsatzfelder der MBs (als PCR-Reportergruppen und in der Allelanalyse) sind in den letzten Jahren enorm erweitert worden. In Kombination mit anderen Systemen und Techniken werden MBs inzwischen in Anwendungen wie Proteinassays,^[21,22] Enzymmessungen,^[16–18] mRNA-Monitoring in lebenden Zellen,^[12,14,99] Biosensoren^[19,20,80,82] und molekulares Computing^[119,122] eingesetzt. MB-Aptamere (MBAs)^[123–127] sind ein neuer Typ von Proteinsonden, die die Vorteile des MB-eigenen Signalübertragungsmechanismus mit der Spezifität der molekularen Erkennung von Aptameren verbinden.^[128,129,136,137] Sie ermöglichen sehr empfindliche und selektive Assays zum Nachweis von Proteinen und Zellen.

Die Autoren ihren Mitarbeitern, deren Arbeiten in diesen Kurzaufsatz eingeflossen sind. Die Arbeiten an MBs in unserer Arbeitsgruppe wurden durch Dr. Fred Kramer und Dr. Sanjay Tyagi inspiriert. Den NIH (NIGMS GM 66137 und NIH U54NS058185) und der NSF wird für langjährige Unterstützung gedankt. Diese Arbeit wird außerdem durch das NSFC-Projekt „Major International (Regional) Joint Research Program of Natural Science Foundation of China (20620120107) unterstützt.

Eingegangen am 24. Januar 2008,
veränderte Fassung am 26. April 2008
Online veröffentlicht am 9. Dezember 2008
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

[1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.

[2] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964.

[3] B. D. Hall, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, 47, 137.

- [4] E. T. Bolton, B. J. McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 48, 1390.
- [5] A. P. Nygaard, B. D. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, 12, 98.
- [6] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303.
- [7] X. H. Fang, J. W. J. Li, J. Perlette, W. H. Tan, K. M. Wang, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 747A.
- [8] W. H. Tan, K. M. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 547.
- [9] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1191.
- [10] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 49; <http://www.molecular-beacons.org/Introduction.html>.
- [11] P. Zhang, T. Beck, W. H. Tan, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 416; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 402.
- [12] D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 13308.
- [13] J. Perlette, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5544.
- [14] C. D. Medley, T. J. Drake, J. M. Tomasini, R. J. Rogers, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4713.
- [15] P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e57.
- [16] J. J. Li, R. Geyer, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, E52.
- [17] Z. W. Tang, K. M. Wang, W. H. Tan, C. B. Ma, J. Li, L. F. Liu, Q. P. Guo, X. X. Meng, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33.
- [18] Z. W. Tang, K. M. Wang, W. H. Tan, J. Li, L. F. Liu, Q. P. Guo, X. X. Meng, C. B. Ma, S. S. Huang, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31.
- [19] X. H. Fang, X. J. Liu, S. Schuster, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2921.
- [20] J. Li, W. Tan, K. Wang, D. Xiao, X. Yang, X. He, Z. Tang, *Anal. Sci.* **2001**, 17, 1149.
- [21] X. H. Fang, J. J. Li, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3280.
- [22] J. W. J. Li, X. H. Fang, S. M. Schuster, W. H. Tan, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1091; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1049.
- [23] W. H. Tan, X. H. Fang, J. Li, X. J. Liu, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1107.
- [24] G. Yao, W. H. Tan, *Anal. Biochem.* **2004**, 331, 216.
- [25] H. Wang, J. Li, H. Liu, Q. Liu, Q. Mei, Y. Wang, J. Zhu, N. He, Z. Lu, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, e61.
- [26] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4208.
- [27] J. B. Biggins, J. R. Prudent, D. J. Marshall, M. Ruppen, J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 13537.
- [28] R. A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, D. E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 8790.
- [29] R. G. H. Immink, T. W. J. Gadella, S. Ferrario, M. Busscher, G. C. Angenent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 2416.
- [30] D. S. Witherow, S. C. Tovey, Q. Wang, G. B. Willars, V. Z. Slepak, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 21307.
- [31] D. R. Larson, Y. M. Ma, V. M. Vogt, W. W. Webb, *J. Cell Biol.* **2003**, 162, 1233.
- [32] F. Stuhmeier, A. Hillisch, R. M. Clegg, S. Diekmann, *J. Mol. Biol.* **2000**, 302, 1081.
- [33] L. Zheng, K. P. Hoefflich, L. M. Elsby, M. Ghosh, S. G. Roberts, M. Ikura, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 792.
- [34] T. Heyduk, E. Heyduk, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 171.
- [35] C. Gohlke, A. I. Murchie, D. M. Lilley, R. M. Clegg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 11660.
- [36] Y. Okamura, S. Kondo, I. Sase, T. Suga, K. Mise, I. Furusawa, S. Kawakami, Y. Watanabe, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, E107.
- [37] K. O. Greulich, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 2458.
- [38] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819.
- [39] R. P. Haugland, J. Yguerabi, L. Stryer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 63, 23.
- [40] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7276.

- [41] K. J. Livak, S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, *PCR Methods Appl.* **1995**, 4, 357.
- [42] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer, Dordrecht, **1999**.
- [43] C. Y. J. Yang, H. Lin, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12772.
- [44] C. Y. J. Yang, M. Pinto, K. Schanze, W. H. Tan, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2628; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2572.
- [45] H. M. Huang, K. Wang, W. H. Tan, D. An, X. H. Yang, S. S. Huang, Q. Zhai, L. Zhou, Y. Jin, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5753; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5635.
- [46] Y. Jin, K. Wang, W. Tan, P. Wu, Q. Wang, H. Huang, S. Huang, Z. Tang, Q. Guo, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5721.
- [47] L. Tan, Y. Li, T. J. Drake, L. Moroz, K. M. Wang, J. Li, A. Munteanu, C. Y. J. Yang, K. Martinez, W. H. Tan, *Analyst* **2005**, 130, 1002.
- [48] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6171.
- [49] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 1319.
- [50] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4208.
- [51] H. Du, M. D. Disney, B. L. Miller, T. D. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4012.
- [52] G. Yao, X. Fang, H. Yokota, T. Yanagida, W. Tan, *Chemistry* **2003**, 9, 5686.
- [53] G. Goel, A. Kumar, A. K. Puniya, W. Chen, K. Singh, *J. Appl. Microbiol.* **2005**, 99, 435.
- [54] L. Wang, C. J. Yang, C. D. Medley, S. A. Benner, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15664.
- [55] C. Y. J. Yang, C. D. Medley, W. H. Tan, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2005**, 6, 445.
- [56] A. A. Koshkin, P. Nielsen, M. Meldgaard, V. K. Rajwanshi, S. K. Singh, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13252.
- [57] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, 54, 3607.
- [58] J. Wengel, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 301.
- [59] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3406.
- [60] S. A. E. Marras, S. Tyagi, F. R. Kramer, *Clin. Chim. Acta* **2006**, 363, 48.
- [61] G. Leone, H. van Schijndel, B. van Gemen, F. R. Kramer, C. D. Schoen, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 2150.
- [62] M. Nilsson, M. Gullberg, F. Dahl, K. Szuhai, A. K. Raap, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30.
- [63] W. Ayele, M. P. de Baar, J. Goudsmit, A. Kliphuis, T. Tilahun, W. Dorigo-Zetsma, D. Wolday, A. Abebe, Y. Mengistu, G. Pollakis, *J. Virol. Methods* **2005**, 130, 22.
- [64] T. Antony, T. Thomas, L. H. Sigal, A. Shirahata, T. J. Thomas, *Biochemistry* **2001**, 40, 9387.
- [65] 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.
- [66] P. Y. Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, 2, 235.
- [67] G. C. Johnson, J. A. Todd, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, 10, 330.
- [68] N. J. Risch, *Nature* **2000**, 405, 847.
- [69] I. G. Gut, *Hum. Mutat.* **2001**, 17, 475.
- [70] S. B. Gabriel, S. F. Schaffner, H. Nguyen, J. M. Moore, J. Roy, B. Blumenstiel, J. Higgins, M. DeFelice, A. Lochner, M. Faggart, S. N. Liu-Cordero, C. Rotimi, A. Adeyemo, R. Cooper, R. Ward, E. S. Lander, M. J. Daly, D. Altshuler, *Science* **2002**, 296, 2225.
- [71] M. M. Mhlanga, L. Malmberg, *Methods* **2001**, 25, 463.
- [72] A. S. Piatek, S. Tyagi, A. C. Pol, A. Telenti, L. P. Miller, F. R. Kramer, D. Alland, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 359.
- [73] L. G. Kostrikis, S. Tyagi, M. M. Mhlanga, D. D. Ho, F. R. Kramer, *Science* **1998**, 279, 1228.
- [74] B. Sobrino, M. Brion, A. Carracedo, *Forensic Sci. Int.* **2005**, 154, 181.
- [75] Z. W. Tang, K. M. Wang, W. H. Tan, J. Li, L. F. Liu, Q. P. Guo, X. X. Meng, S. S. Huang, D. Li, W. F. Luo, *Chin. Sci. Bull.* **2003**, 48, 1215.
- [76] L. F. Liu, Z. W. Tang, K. M. Wang, W. H. Tan, J. Li, Q. P. Guo, X. X. Meng, C. B. Ma, *Analyst* **2005**, 130, 350.
- [77] N. E. Broude, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 249.
- [78] H. J. Lou, W. H. Tan, *Instrum. Sci. Technol.* **2002**, 30, 465.
- [79] J. R. Epstein, A. P. K. Leung, K. H. Lee, D. R. Walt, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 541.
- [80] F. J. Steemers, J. A. Ferguson, D. R. Walt, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 91.
- [81] X. J. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, W. H. Tan, *Anal. Biochem.* **2000**, 283, 56.
- [82] X. J. Liu, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5054.
- [83] P. Kohli, C. C. Harrell, Z. H. Cao, R. Gasparac, W. H. Tan, C. R. Martin, *Science* **2004**, 305, 984.
- [84] H. Du, C. M. Strohsahl, J. Camera, B. L. Miller, T. D. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7932.
- [85] Y. J. Wang, H. Wang, L. Gao, H. P. Liu, Z. H. Lu, N. Y. He, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, 5, 653.
- [86] D. Horejsh, F. Martini, F. Poccia, G. Ippolito, A. Di Caro, M. R. Capobianchi, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33.
- [87] B. Bockisch, T. Grunwald, E. Spillner, R. Bredehorst, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, e101.
- [88] C. H. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9134.
- [89] R. Kopelman, W. H. Tan, *Science* **1993**, 262, 1382.
- [90] W. H. Tan, Z. Y. Shi, S. Smith, D. Birnbaum, R. Kopelman, *Science* **1992**, 258, 778.
- [91] A. Tsuji, H. Koshimoto, Y. Sato, M. Hirano, Y. Sei-Iida, S. Kondo, K. Ishibashi, *Biophys. J.* **2000**, 78, 3260.
- [92] R. B. Knowles, J. H. Sabry, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, G. J. Bassell, K. S. Kosik, *J. Neurosci.* **1996**, 16, 7812.
- [93] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, R. M. Long, *Mol. Cell* **1998**, 2, 437.
- [94] D. Fusco, N. Accornero, B. Lavoie, S. M. Shenoy, J. M. Blanchard, R. H. Singer, E. Bertrand, *Curr. Biol.* **2003**, 13, 161.
- [95] K. M. Forrest, E. R. Gavis, *Curr. Biol.* **2003**, 13, 1159.
- [96] D. McDonald, M. A. Vodicka, G. Lucero, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, M. Emerman, T. J. Hope, *J. Cell Biol.* **2002**, 159, 441.
- [97] Y. Z. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 148.
- [98] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9686.
- [99] M. M. Mhlanga, D. Y. Vargas, C. W. Fung, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 1902.
- [100] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, 215, 403.
- [101] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Methods* **2003**, 29, 51.
- [102] M. Golzio, M. P. Rols, J. Teissie, *Methods* **2004**, 33, 126.
- [103] N. Nitin, P. J. Santangelo, G. Kim, S. M. Nie, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32.
- [104] D. L. Sokol, X. L. Zhang, P. Z. Lu, A. M. Gewitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 11538.
- [105] T. J. Drake, C. D. Medley, A. Sen, R. J. Rogers, W. H. Tan, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2041.
- [106] P. W. Glimcher, A. Rustichini, *Science* **2004**, 306, 447.
- [107] B. M. Shykind, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, 14, 1903.
- [108] J. M. Young, B. J. Trask, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, 11, 1153.
- [109] A. E. Oostlander, G. A. Meijer, B. Ylstra, *Clin. Genet.* **2004**, 66, 488.
- [110] R. H. Kehlenbach, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31.
- [111] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 5168.

- [112] C. Molenaar, S. A. Marras, J. C. M. Slats, J. C. Truffert, M. Lemaitre, A. K. Raap, R. W. Dirks, H. J. Tanke, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e89.
- [113] R. Shah, W. S. El-Deiry, *Cancer Biol. Ther.* **2004**, *3*, 871.
- [114] V. Vijayanathan, T. Thomas, L. H. Sigal, T. J. Thomas, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 225.
- [115] K. Petersen, U. Vogel, E. Rockenbauer, K. V. Nielsen, S. Kolvraa, L. Bolund, B. Nexø, *Mol. Cell. Probes* **2004**, *18*, 117.
- [116] H. Kuhn, V. V. Demidov, B. D. Gildea, M. J. Fiandaca, J. C. Coull, M. D. Frank-Kamenetskii, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 265.
- [117] B. Vester, J. Wengel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13233.
- [118] B. Dubertret, M. Calame, A. J. Libchaber, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365.
- [119] M. N. Stojanovic, T. E. Mitchell, D. Stefanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3555.
- [120] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 411.
- [121] K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3271.
- [122] W. B. Liu, X. H. Shi, S. M. Zhang, X. R. Liu, J. Xu, *Biosystems* **2004**, *77*, 87.
- [123] J. W. J. Li, X. H. Fang, W. H. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 31.
- [124] C. J. Yang, S. Jockusch, M. Vicens, N. J. Turro, W. H. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17278.
- [125] X. H. Fang, Z. H. Cao, T. Beck, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5752.
- [126] M. C. Vicens, A. Sen, A. Vanderlaan, T. J. Drake, W. H. Tan, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 900.
- [127] Z. H. Cao, W. H. Tan, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4502.
- [128] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505.
- [129] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [130] J. Li, W. Tan, *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 251–254.
- [131] N. Graf, R. Kramer, *Chem. Commun.* **2006**, 4375.
- [132] C. J. Yang, L. Wang, Y. Wu, Y. Kim, C. D. Medley, H. Lin, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4030.
- [133] C. Ma, X. Yang, K. Wang, Z. Tang, W. Li, W. Tan, X. Lv, *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 131.
- [134] Y. Kim, C. J. Yang, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7279.
- [135] P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336.
- [136] D. Shangguan, Y. Li, Z. W. Tang, Z. H. C. Cao, H. W. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C. Y. J. Yang, W. H. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11838.
- [137] P. Mallikaratchy, Z. Tang, S. Kwame, L. Meng, D. Shangguan, W. Tan, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2230.
- [138] N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4117; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4013.
- [139] A. K. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e105.
- [140] S. Tyagi, O. Alsmadi, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 4153.
- [141] O. Seitz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3389; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249.
- [142] Y. Wu, C. J. Yang, L. L. Moroz, W. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3025.
- [143] C. Crey-Desbiolles, D. R. Ahn, C. J. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e77.
- [144] T. N. Grossmann, L. Röglin, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5223.
- [145] A. Bourdoncle, A. E. Torres, C. Gosse, L. Lacroix, P. Vekhoff, T. Le Saux, L. Jullien, J. L. Mergny, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11094.
- [146] C. D. Medley, H. Lin, H. Mullins, R. J. Rogers, W. H. Tan, *Analyst* **2007**, *132*, 885.
- [147] R. H. Yang, J. Y. Jin, Y. Chen, N. Shao, H. Z. Kang, Z. Y. Xiao, Z. W. Tang, Y. R. Wu, Z. Zhu, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8351.