

# Einzelmolekül-DNA-Biosensoren zur Detektion von Proteinen und Liganden\*\*

Konstantinos Lymeropoulos, Robert Crawford, Joseph P. Torella, Mike Heilemann, Ling Chin Hwang, Seamus J. Holden und Achillefs N. Kapanidis\*

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an spezifische DNA-Sequenzen binden und auf diese Weise die Genexpression kontrollieren.<sup>[1]</sup> Sie sind natürliche Biosensoren oder Schalter, die chemische und physikalische Signale (Temperaturänderungen, Lichtbestrahlung, Konzentration an chemischen Substanzen, Redoxeigenschaften) durch Bindung an ein Promotorelement oder die RNA-Polymerase für die Genexpression übersetzen. Da die Konzentration der Transkriptionsfaktoren fundamentalen biologischen Prozessen wie der DNA-Reparatur oder dem Zellzyklus unterliegt, kann eine Veränderung zu Krankheiten führen oder auf diese hinweisen. Mutationen des Transkriptionsfaktors p53 führen z. B. zu einem schnellen Wachstum von Krebszellen, und aufgrund eines allgemeinen Auftretens (Mutationen von p53 treten in 50 % aller menschlicher Tumoren auf) wird ein entsprechender Nachweis als Biomarker für Krebs eingesetzt.<sup>[2]</sup> Methoden, die Transkriptionsfaktoren mit hoher Empfindlichkeit detektieren, liefern somit einerseits grundlegende Informationen zur Genexpression und können andererseits diagnostisch eingesetzt werden.

Transkriptionsfaktoren werden häufig mit gelelektrophoretischen Assays oder Western-Blots detektiert. Diese Methoden sind zwar hilfreich für die Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen, sind aber mühsam, teuer, rein qualitativ und benötigen große Probenmengen. Immunologische Verfahren, wie ELISA (enzyme-linked immuno-

sorbent assay), sind empfindlicher und ermöglichen einen höheren Durchsatz, benötigen aber viele präparative Schritte sowie eine Signalverstärkung zur Detektion von Proteinen mit niedriger Konzentration. Eine ähnliche Verstärkung ist bei anderen Ligationsassays erforderlich,<sup>[3]</sup> sodass keine schnelle Diagnostik innerhalb weniger Minuten und keine Detektion in lebenden Zellen möglich ist.

Ein weiterer Assay zur Detektion von Transkriptionsfaktoren beruht auf resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET) zwischen zwei doppelsträngigen DNA-Fragmenten, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte komplementäre Einzelstrang-Überhänge enthalten (molecular beacons).<sup>[4–6]</sup> In Gegenwart des Transkriptionsfaktors werden beide DNA-Fragmente hybridisiert, und ein FRET wird beobachtet. Dieser Ansatz erfordert ebenfalls größere Probenmengen und kann keine Transkriptionsfaktoren in niedriger Konzentration erfassen. Ferner müssen beide Fluoreszenzfarbstoffe so nah zueinander positioniert werden, dass sie sich innerhalb des dynamischen FRET-Bereiches (1–10 nm) befinden, wodurch sie der Protein-DNA-Wechselwirkung räumlich sehr nahe kommen und diese sterisch beeinflussen können. Würden die Farbstoffe weit genug entfernt von der Bindungsstelle des Proteins an der DNA (üblicherweise 15 bis 30 Basenpaare lang) angebracht, könnte hingegen in den meisten Fällen kein FRET mehr detektiert werden.

In der hier vorgestellten Arbeit setzen wir die Anregung durch alternierende Laser (alternating-laser excitation, ALEX)<sup>[7,8]</sup> zur Detektion von Transkriptionsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen ein und erfassen dazu das Koinzidenzsignal der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente. Ähnlich zu den „molecular beacons“ nutzt dieser schnelle und verstärkungsfreie Ansatz die durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren hervorgerufene Hybridisierung der DNA – allerdings können pikomolare Konzentrationen detektiert und kleine Probenmengen eingesetzt werden. Wegen der Unabhängigkeit des FRET ist keine Optimierung der Fluorophorpositionen oder genaue Kenntnis der Bindungsgeometrie erforderlich, und darüber hinaus wird die Protein-DNA-Bindung nicht durch Farbstoffmoleküle gestört. Wir demonstrieren, dass die ALEX-Spektroskopie die – auch parallele – Detektion von Transkriptionsfaktoren und von niedermolekularen Verbindungen ermöglicht und sich selbst für komplexe biologische Proben eignet.

In unserem Assay (Abbildung 1 a,b) teilen wir die DNA-Bindungssequenz eines Transkriptionsfaktors in zwei Hälften (siehe auch Lit. [5]): die linke Halbseite (H1) und die rechte Halbseite (H2). Jede Halbseite enthält außer der halben Bindungssequenz auch kurze, komplementäre 3'-Überhänge. Die Halbseite H1 ist mit einem „grünen“ Fluorophor („G“)

[\*] Dr. K. Lymeropoulos,<sup>[+]</sup> R. Crawford,<sup>[+]</sup> J. P. Torella, Dr. M. Heilemann, Dr. L. C. Hwang, S. J. Holden, Dr. A. N. Kapanidis Biological Physics Research Group, Department of Physics, University of Oxford, Clarendon Laboratory Parks Road, Oxford, OX1 3PU (Großbritannien) E-Mail: a.kapanidis1@physics.ox.ac.uk

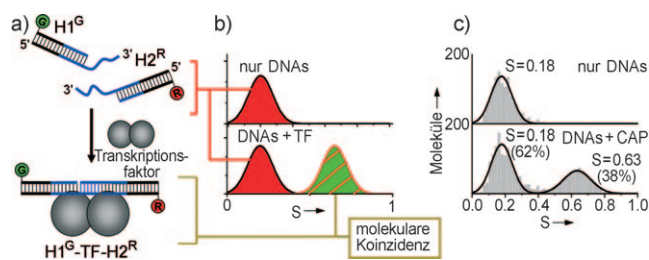
Dr. K. Lymeropoulos<sup>[+]</sup> Derzeitige Adresse: BioQuant und Cellnetworks Cluster, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 69120 Heidelberg (Deutschland)

Dr. M. Heilemann Derzeitige Adresse: Angewandte Laserphysik & Laserspektroskopie, Universität Bielefeld Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)

[\*] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken Dr. M. Brenowitz (Albert Einstein College of Medicine) und Dr. R. Ebright (HHMI/Rutgers U.) für Plasmide, Dr. S. Weiss (UCLA) für Software sowie L. Sattary und J. Ghadiali für Unterstützung. Diese Arbeit wurde finanziert vom UK Bionanotechnology IRC, der EU (MIRG-CT-2005-031079), EPSRC (EP/D058775) und dem Wellcome Trust (VS/06/OX/A4). M.H. wurde durch ein DAAD-Stipendium gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904597> zu finden.



**Abbildung 1.** Detektion von Transkriptionsfaktoren mit ALEX. a) In der Abwesenheit des Transkriptionsfaktors diffundieren beide DNA-Halbsseiten, von denen jede eine Hälfte der Bindungssequenz sowie einen komplementären 3'-Überhang enthält, unabhängig voneinander (oben); eine Hybridisierung findet nur kurzzeitig statt. Bindet ein Transkriptionsfaktor, diffundiert ein ganzer Komplex (H1<sup>G</sup>-TF-H2<sup>R</sup>, unten). b) Die schematische Darstellung eines Stöchiometrie (S)-Histogramms zeigt, dass der H1<sup>G</sup>-TF-H2<sup>R</sup>-Komplex als „grün-rote“ Spezies detektiert wird und von den nur „rot“ markierten Halbsseiten unterschieden wird. c) Detektion des Transkriptionsaktivators CAP. Oben: in Abwesenheit von CAP wird keine „Grün-Rot“-Koinzidenz (d.h. DNA-Koinzidenz) beobachtet. Unten: In Gegenwart von CAP bilden die CAP-spezifischen DNA-Halbsseiten mit dem Protein einen Komplex und werden als Population bei  $S \approx 0.63$  detektiert. (Graue Balken: Projektion der E\*-S-Daten auf die S-Achse, schwarze Linien: Gauß-Anpassungskurven; vollständige E\*-S-Histogramme für CAP finden sich in Abbildung S1 a,b der Hintergrundinformationen.)

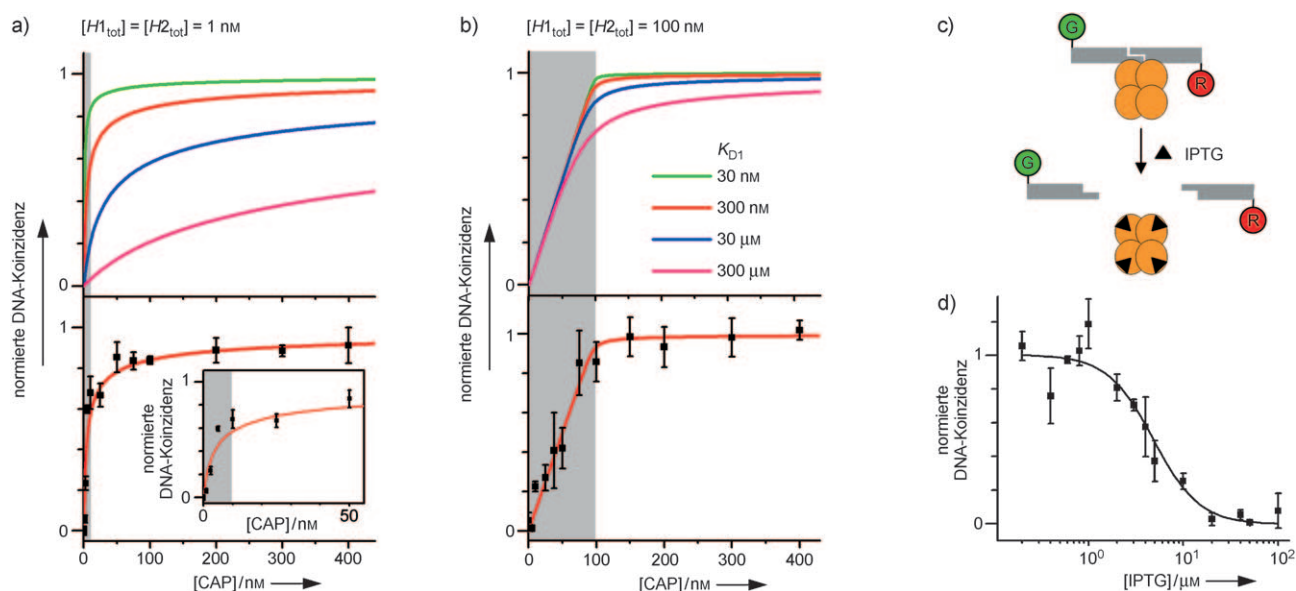
markiert (H1<sup>G</sup>), H2 mit einem spektral unterschiedlichen „roten“ Fluorophor („R“; H2<sup>R</sup>). In Abwesenheit des Transkriptionsfaktors und bei DNA-Konzentrationen von 10–100 pM diffundieren H1 und H2 unabhängig und assoziieren nur kurzzeitig. In Gegenwart eines Transkriptionsfaktors, der an die vollständig zusammengefügte DNA bindet, hybridisieren H1 und H2 und diffundieren gemeinsam in Form eines Komplexes (H1<sup>G</sup>-TF-H2<sup>R</sup>; Abbildung 1 a, unten).

Nach der Bindung eines Transkriptionsfaktors detektieren wir das gleichzeitig auftretende Fluoreszenzsignal mithilfe der ALEX-Spektroskopie.<sup>[7–9]</sup> Einzelne rote und grüne Fluorophore werden hierbei selektiv durch zwei alternierende Laser angeregt. Auf diese Weise ermöglicht die ALEX-Spektroskopie das Sortieren auf molekularer Ebene in zweidimensionalen Histogrammen nach sowohl der FRET-Effizienz  $E^*$  (die den Abstand der Fluorophore abbildet) und einer Stöchiometrie  $S$  (zur Ermittlung von  $E^*$  und  $S$  siehe die Hintergrundinformationen). So wird beispielsweise die Suche nach „rot“ markierten Molekülen (d.h. sowohl nach Molekülen, die nur mit einem roten Farbstoff markiert sind, als auch nach Molekülen, die mit einem roten und einem grünen Farbstoff markiert sind) im Falle unabhängig diffundierender Halbsseiten nur eine einzige Population im S-Histogramm aufzeigen (H2<sup>R</sup>; Abbildung 1 b, oben). Sind allerdings beide Halbsseiten an einen Transkriptionsfaktor gebunden, wird eine Population mit höherem  $S$ -Wert detektiert (Abbildung 1 b, unten). Im vorliegenden Assay nutzen wir nur die Sortierung nach  $S$ ; darüber hinaus könnte der Parameter  $E^*$  auch zusätzlich eingesetzt werden, um den Informationsgehalt zu erhöhen (siehe Lit. [7–9] sowie Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen für Beispiele mit E\*-S-Histogrammen).

Wir haben ALEX-Spektroskopie eingesetzt, um das Protein CAP (catabolite activator protein) zu detektieren (Abbildung 1 c), das die Transkription von Genen in Bakterien aktiviert, die zur Expression von Lactose abbauenden Proteinen führen. In Gegenwart von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) bindet CAP an eine 22-Basenpaar-Sequenz und weist eine Dissoziationskonstante von  $K_D \approx 20$  pM auf.<sup>[10]</sup> Nach Inkubation von 100 nM CAP-spezifischer Halbsseiten H1<sup>G</sup> und H2<sup>R</sup> mit einem Überschuss an CAP (200 nM) und anschließender Verdünnung auf ca. 10 pM (DNA) erscheinen zwei Populationen im S-Histogramm (Abbildung 1 c, unten), eine erste mit einer hohen Stöchiometrie ( $S \approx 0.63$ , H1<sup>G</sup>-CAP-H2<sup>R</sup>) und eine zweite mit einer niedrigen Stöchiometrie ( $S \approx 0.2$ , freies H2<sup>R</sup>). In einem Kontrollexperiment ohne CAP werden keine Moleküle mit höherer Stöchiometrie detektiert (Abbildung 1 c, oben). Wir haben ähnliche Ergebnisse für den lac-Repressor erhalten (lacR; Abbildung S1 c,d in den Hintergrundinformationen), der das lac-Operon ausschaltet und dazu an einer anderen Stelle als CAP bindet.<sup>[11,12]</sup> Mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Halbsseiten konnten wir ferner das CAP-Protein bis zu pikomolaren Konzentrationen erfassen (Abbildung S1 e in den Hintergrundinformationen).

Um quantitative Informationen zu erhalten, haben wir ein Modell entwickelt, das die Bindung von CAP mithilfe zweier gekoppelter Gleichgewichte beschreibt: eines für die Assoziation der beiden Halbsseiten und ein zweites für die Bindung von CAP an H1<sup>G</sup>-H2<sup>R</sup> (mit entsprechenden Dissoziationskonstanten  $K_{D1}$  und  $K_{D2}$ ; siehe Hintergrundinformationen). Wir bestimmten den Zusammenhang der Konzentration an CAP ( $[CAP]$ ) mit dem Anteil gebundener Halbsseiten  $F_B$  (bestimmt mit ALEX-Spektroskopie), mit  $K_{D1}$  und  $K_{D2}$  sowie der gesamten Konzentration  $H_{tot}$  jeder Halbsseite [Gl. (S7) in den Hintergrundinformationen]. Anhand dieses Modells war es möglich, einfache Ansätze zur Verbesserung der Empfindlichkeit und des dynamischen Bereiches unseres Assays zu entwickeln (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen): Liegt die Größenordnung von  $H_{tot}$  bei  $K_{D1}$ , ist die Hybridisierung der Halbsseiten effizient, und  $K_{D2}$  kontrolliert die Detektion von CAP; bei Transkriptionsfaktoren mit einem niedrigen  $K_{D2}$ -Wert ist der gebundene Anteil linear abhängig von der Konzentration von CAP und ermöglicht dessen Detektion im Bereich von 0 bis  $H_{tot}$  (Abbildung 2 b, oben). Anders ist die Situation bei  $H_{tot} \ll K_{D1}$ : Der Anteil der gebundenen Fraktion steigt hyperbolisch, sodass der dynamische Bereich verschoben und die Empfindlichkeit gesteigert wird (Abbildung 2 a). Auf diese Weise können die Empfindlichkeit und der dynamische Bereich durch Veränderung von  $H_{tot}$ ,  $K_{D1}$  und  $K_{D2}$  beeinflusst werden (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen):  $H_{tot}$  kann leicht durch die Konzentration der Halbsseiten beeinflusst werden,  $K_{D1}$  durch eine Modifikation der Länge der 3'-Überhänge<sup>[13,14]</sup> und  $K_{D2}$  durch leicht veränderte Bindungssequenzen.

Zur quantitativen Charakterisierung unseres Assays haben wir 1 und 100 nM DNA-Halbsseiten mit 0–400 nM CAP titriert, auf 10 pM verdünnt und das normierte Koinzidenzsignal  $F_B$  gemessen (Abbildung 2 a,b). Die Titration bei 1 nM wurde mit dem Modell verglichen (Abbildung 2 a, unten), wobei in Gleichung S7 (Hintergrundinformationen) die



**Abbildung 2.** Quantifizierung von Transkriptionsfaktoren und Liganden. a,b) Normierte DNA-Koinzidenz in Abhängigkeit von [CAP] bei a) 1 nM und b) 100 nM DNA-Halbseiten. Oben: Modellrechnung in Abhängigkeit von  $K_{D1}$ . Unten: Eine Modellfunktion wurde an die ALEX-Daten angepasst (rote Kurve). Der Einschub in (a) zeigt vergrößert den dynamischen Bereich des Assays. Grauer Bereich: dynamischer Bereich der Messung (Fehlerbalken aus Mittelwertsabweichungen). c) Detektion niedermolekularer Verbindungen, gezeigt für IPTG (Dreiecke). Bei niedriger IPTG-Konzentration und in Gegenwart von lacR wird DNA-Koinzidenz beobachtet (oben). Bei hoher Konzentration an IPTG dissoziiert lacR von der DNA, es werden weniger Koinzidenzen beobachtet (unten). d) Eine Titration von  $H1^G$ -lacR- $H2^R$  mit IPTG zeigt abnehmende DNA-Koinzidenz mit steigender IPTG-Konzentration. Bei einer Konzentration von ca. 5  $\mu$ M IPTG sind 50% der Proteine an DNA gebunden.

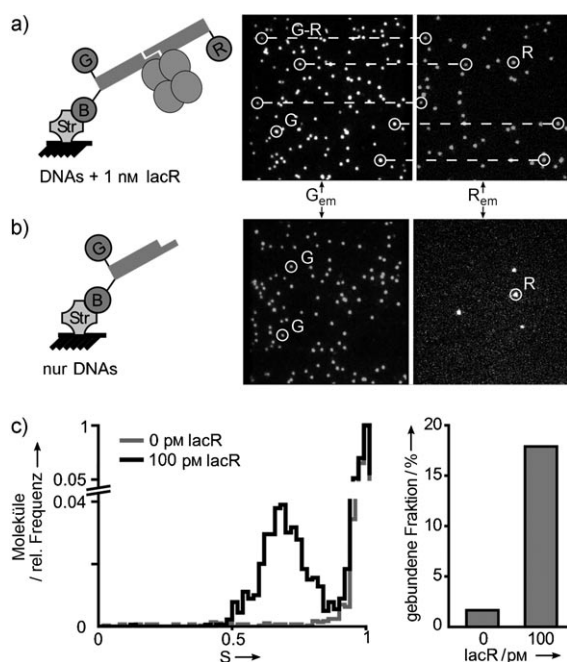
Werte  $H_{tot} = 1$  nM und  $K_{D1} = 300$  nM eingesetzt und  $K_{D2}$  angeglichen (bestimmt aus Ensemblemessungen; siehe Hintergrundinformationen) wurde; in guter Übereinstimmung mit Lit. [10] wurde  $K_{D2} \approx 10$  pM gefunden. Die Titration bei 100 nM DNA-Halbseiten (Abbildung 2b, unten) zeigte den erwarteten linearen Anstieg von  $F_B$  mit [CAP] bis zu einer Sättigungskonzentration von  $[CAP] \approx H_{tot}$ , wobei wir eine hervorragende Übereinstimmung zwischen unserem Experiment und dem Modell bei Werten von  $K_{D1} = 300$  nM und  $K_{D2} = 10$  pM feststellten (Abbildung 2b, unten; rote Linie).

Eine nützliche Erweiterung dieses Bioassays besteht in der Detektion niedermolekularer Verbindungen. Da Transkriptionsfaktoren als natürliche Sensoren für solche Moleküle agieren können (so z.B. Zucker, Nucleotide, Metallionen, Aminosäuren), haben wir die Eignung für deren Bestimmung überprüft. Als Modellbeispiel wählten wir Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG), ein Lactoseanalogon, das an lacR bindet, in diesem eine Konformationsänderung hervorruft und seine Bindung an DNA um einen Faktor von etwa 1000 schwächt.<sup>[15,16]</sup> Bei Zugabe von 0–100  $\mu$ M IPTG zu konstanten Konzentrationen an DNA-Halbseiten und lacR traten bei niedriger IPTG-Konzentration wie erwartet viele Koinzidenzen auf; wurde die Konzentration an IPTG erhöht, führte die geringere Bindungsstärke von lacR zu deutlich weniger Koinzidenzen (Abbildung 2d). Die genaue Betrachtung der durch IPTG verursachten Inhibition ergab eine charakteristische Konzentration von 5  $\mu$ M, die hervorragend mit dem in einem ähnlichen Puffer bestimmten Wert von 3  $\mu$ M übereinstimmt.<sup>[17]</sup>

Die Möglichkeit zur gleichzeitigen Detektion mehrerer Analyte (Multiplexing), die oft in Mikroarrays realisiert

wird,<sup>[18]</sup> erhöht die Bedeutung eines diagnostischen Assays. Für einen entsprechenden Test wollten wir parallel die Transkriptionsfaktoren lacR und CAP detektieren (Abbildung S3a,b in den Hintergrundinformationen), wobei die jeweiligen DNA-Halbseiten so konstruiert wurden, dass sie anhand des S-Wertes unterscheidbar sind (siehe Hintergrundinformationen). Ferner haben wir eine parallele Detektion mit 3-Farben-ALEX-Spektroskopie<sup>[19]</sup> durchgeführt, wobei die jeweiligen Halbseiten anhand unterschiedlicher  $E^*$ -Werte unterschieden wurden (Abbildung S3c,d in den Hintergrundinformationen). Unsere Befunde bieten somit eine Grundlage für die Entwicklung erweiterter Assays mit hoher Empfindlichkeit, z.B. durch den Einsatz von mehreren grünen und roten Fluorophoren zur Einstellung des S-Wertes.

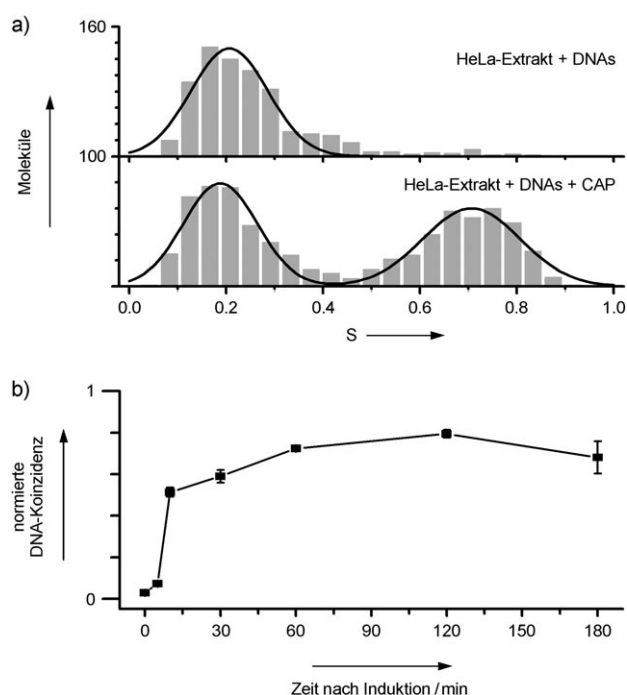
Während eine gleichzeitige Messung mehrerer Transkriptionsfaktoren in Lösung durch parallele Detektion möglich sein mag, gestatten Messungen auf Oberflächen ein wirkliches Hochdurchsatz-Screening von Hunderten von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen (z.B. in Mikroarrays<sup>[18]</sup>). Wir haben die Kompatibilität unserer Methode mit einer Oberflächenimmobilisierung getestet und dazu die biotinylierte Halbseite  $H1^G$  an eine Glasoberfläche geheftet, mit lacR und  $H2^R$  inkubiert und mit einer CCD-Kamera abgebildet (Abbildung 3a, links). In der Gegenwart von lacR erscheinen grüne und rote Farbstoffe kolokalisiert (Abbildung 3a, rechts), nicht hingegen in Abwesenheit von lacR (Abbildung 3b). Konzentrationen an lacR bis zu 100 pM konnten auf diese Weise detektiert werden (Abbildung 3c). Vergleichbare Ergebnisse wurden für CAP erhalten (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).



**Abbildung 3.** Parallele Detektion. a,b) Detektion von Transkriptionsfaktoren auf Oberflächen. a) Eine biotinylierte (B) Halbseite H1<sup>G</sup> wurde über Streptavidin (Str) an Glas geheftet und mit 1 nM lacR sowie 1 nM H2<sup>R</sup> inkubiert; nach einem Waschschrift wurde die Oberfläche abgebildet. In der Gegenwart von lacR sind beugungsbegrenzte „grüne“ Spots von grünen Farbstoffen und „rote“ Spots von roten Farbstoffen kolokalisiert. Einzelne „grüne“ Spots resultieren von einzelnen H1<sup>G</sup>-Halbseiten oder von H1<sup>G</sup>-lacR-H2<sup>R</sup>-Komplexen, in denen der rote Farbstoff gebleicht wurde; einzelne „rote“ Spots resultieren von H1<sup>G</sup>-lacR-H2<sup>R</sup>-Komplexen, in denen der grüne Farbstoff gebleicht wurde, und unspezifisch gebundenem H2<sup>R</sup>. b) In der Abwesenheit von lacR werden nur wenige „rote“ Spots detektiert (verursacht durch unspezifische Bindung von H2<sup>R</sup>). c) Detektion von Transkriptionsfaktoren mit hoher Empfindlichkeit auf einer Oberfläche. Links: relative Molekülhäufigkeit in Abhängigkeit von der Stöchiometrie in der Gegenwart und Abwesenheit von 100 pM lacR. Rechts: Die gebundene Fraktion (bestimmt aus der Zahl der kolokalisierten DNA-Halbseiten) wurde aus den S-Histogrammen mit  $S < 0.87$  (kolokalisierte DNA-Fragmente) und  $S > 0.87$  (einzelne „grüne“ Spots) errechnet.

Eine entscheidende Voraussetzung für die praktische Umsetzung der Genanalyse in der Diagnostik ist, dass die verwendeten Biosensoren in „biologischen Flüssigkeiten“ eingesetzt werden können, d. h. in Gegenwart von Nucleasen, Proteasen und anderen Molekülen, die die Detektion beeinflussen und das Ergebnis verfälschen können. Wir haben die Robustheit unseres Assays getestet, indem wir das CAP-Protein mit CAP-spezifischen DNA-Halbseiten im Zellkernextrakt von HeLa-Zellen 10 min inkubiert, auf 50 pM verdünnt und mit ALEX-Spektroskopie detektiert haben. In Abwesenheit von CAP (Abbildung 4a, oben) traten nur sehr wenige Koinzidenzsignale auf, während in der Gegenwart von CAP sehr viele detektiert werden konnten (Abbildung 4a, unten).

Darüber hinaus haben wir überprüft, ob wir Änderungen der Genexpression in *E. coli*-Lysaten verfolgen können. Dazu wurden *E. coli* eingesetzt, die ein Plasmid mit dem für CAP kodierenden Gen enthielten, und die Lysate vor der Induktion und zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach



**Abbildung 4.** Detektion von Transkriptionsfaktoren in biologischen Flüssigkeiten. a) Detektion von 10 nM CAP im Zellkernextrakt von HeLa-Zellen. In Abwesenheit von CAP (oben) werden nur wenige DNA-Koinzidenzen beobachtet, in Gegenwart von CAP (unten) hingegen sehr viele (Population bei  $S \approx 0.7$ ). b) Detektion der Genexpression im Lysat von Bakterienzellen. Die Expression von CAP wurde induziert und die Koinzidenz der DNA-Halbseiten über die Zeit gemessen (100 nM Halbseiten; eine normierte DNA-Koinzidenz von 0.8 entspricht ca. 80 nM aktivem CAP; Fehlerbalken wurden aus der Abweichung vom Mittelwert bestimmt).

analysiert. Mit ALEX-Spektroskopie beobachteten wir einen Anstieg der CAP-Konzentration ausgehend von einem niedrigen Wert vor der Induktion und eine Sättigung nach ca. 1 h (Abbildung 4b). Unter Berücksichtigung von Verdünnungseffekten, die durch die Herstellung des Lysates verursacht worden waren, bestimmten wir eine zum Sättigungszeitpunkt aktive Konzentration an CAP von ca. 300 pM (ca.  $3 \times 10^5$  aktive CAP-Moleküle pro Zelle oder 20–30 % der gesamten Proteinmenge<sup>[19]</sup>), die mit der Quantifizierung durch SDS-PAGE gut übereinstimmt (ca. 40 % der gesamten Proteinmenge).

Mit dem hier präsentierten Ansatz haben wir eine vielseitige Methode zur Detektion von Transkriptionsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen vorgestellt. Der Assay kann auf Oberflächen durchgeführt werden, sodass eine parallele Detektion auf Mikroarrays mit spezifisch organisierten Halbseiten denkbar ist. Der Assay ist ferner kompatibel mit wichtigen eukaryotischen Transkriptionsfaktoren mit mittlerer oder hoher Bindungsaffinität zu DNA, z. B. p53 ( $K_d \approx 1.6$  nM<sup>[20]</sup>), NF- $\kappa$ B ( $K_d \approx 8$  pM<sup>[21]</sup>) oder dem Östrogenrezeptor ( $K_d \approx 1.8$  nM<sup>[22]</sup>). Da einige Transkriptionsfaktoren innerhalb von 1–5 min von der DNA dissoziieren, ist eine TIRF-Konfiguration (TIRF = totale interne Reflexion) zu bevorzugen, da durch parallele Detektion von > 1000 Molekülen innerhalb weniger Sekunden eine genügende Menge an



Daten gesammelt werden kann, um sowohl die Konzentration als auch die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe zu bestimmen. Die Empfindlichkeit des Assays ermöglicht die Detektion von Transkriptionsfaktoren in Zellkernextrakten bis zu einer Konzentration von ca. 10 nM (dies entspricht ca. 10 000 Molekülen in einer „typischen“ Säugerzelle) und damit einer Größenordnung, die für die Detektion krankheitsrelevanter Transkriptionsfaktoren ausreicht (so treten in vielen Krebszelllinien 30 000–200 000 p53-Moleküle auf<sup>[23]</sup>).

Unser Assay ist dank seiner Robustheit in Zellextrakten darüber hinaus vielversprechend für die Detektion einzelner Transkriptionsfaktoren in lebenden Zellen. Einzelne Fluorophore sind in Bakterien detektiert worden;<sup>[24]</sup> bedenkt man einerseits, dass eine Konzentration von 1 nM etwa einem Molekül in einer *E.-coli*-Zelle entspricht, und andererseits, dass unser Assay Transkriptionsfaktoren bis zu pM-Konzentrationen detektieren kann, sollte eine Übertragung in lebende Zellen ohne Verstärkungsschritt möglich sein. Die dazu benötigten DNA-Halbseiten könnten durch Elektroporation in Bakterien eingeführt werden. Eine Vielfalt von Techniken ermöglicht die Transfektion von DNA in Säugerzellen (z. B. Elektroporation, der Einsatz von Reagentien wie Lipofektamin, liposomale Transfektion), und die Detektion der Biomarker in Zellpopulationen mit nur wenigen krankhaften Zellen ist denkbar. Eine Kombination dieses Assays mit einem kompakten und tragbaren Instrument könnte so eine schnelle Diagnostik vor Ort ermöglichen.

Eingegangen am 18. August 2009,  
veränderte Fassung am 3. November 2009  
Online veröffentlicht am 13. Januar 2010

**Stichwörter:** Biosensoren · Einzelmoleküluntersuchungen · Laserspektroskopie · Protein-DNA-Wechselwirkungen · Transkriptionsfaktoren

- [1] C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York, **1999**.
- [2] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, 408, 307.
- [3] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsdottir, A. Ostman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 473.
- [4] E. Heyduk, Y. Fei, T. Heyduk, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2003**, 6, 347.
- [5] E. Heyduk, E. Knoll, T. Heyduk, *Anal. Biochem.* **2003**, 316, 1.
- [6] T. Heyduk, E. Heyduk, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 171.
- [7] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 8936.
- [8] Y. Santos, L. C. Hwang, L. Le Reste, A. N. Kapanidis, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, 36, 738.
- [9] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay, R. H. Ebright, S. Weiss, *Biophys. J.* **2005**, 88, 2939.
- [10] R. H. Ebright, Y. W. Ebright, A. Gunasekera, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 10295.
- [11] M. Fried, D. M. Crothers, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 6505.
- [12] C. M. Falcon, K. S. Matthews, *Biochemistry* **2000**, 39, 11074.
- [13] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, L. A. Marky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 3746.
- [14] M. J. Lane, T. Paner, I. Kashin, B. D. Faldasz, B. Li, F. J. Gallo, A. S. Benight, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 611.
- [15] M. D. Barkley, A. D. Riggs, A. Jobe, S. Burgeois, *Biochemistry* **1975**, 14, 1700.
- [16] M. Lewis, *C. R. Biol.* **2005**, 328, 521.
- [17] A. D. Riggs, R. F. Newby, S. Bourgeois, *J. Mol. Biol.* **1970**, 51, 303.
- [18] E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 5.
- [19] S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 599.
- [20] N. M. Nichols, K. S. Matthews, *Biochemistry* **2001**, 40, 3847.
- [21] M. de Lumley, D. J. Hart, M. A. Cooper, S. Symeonides, J. M. Blackburn, *J. Mol. Biol.* **2004**, 339, 1059.
- [22] M. S. Ozers, J. J. Hill, K. Ervin, J. R. Wood, A. M. Nardulli, C. A. Royer, J. Gorski, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 30405.
- [23] L. Ma, J. Wagner, J. J. Rice, W. Hu, A. J. Levine, G. A. Stolovitzky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 14266.
- [24] J. Elf, G. W. Li, X. S. Xie, *Science* **2007**, 316, 1191.