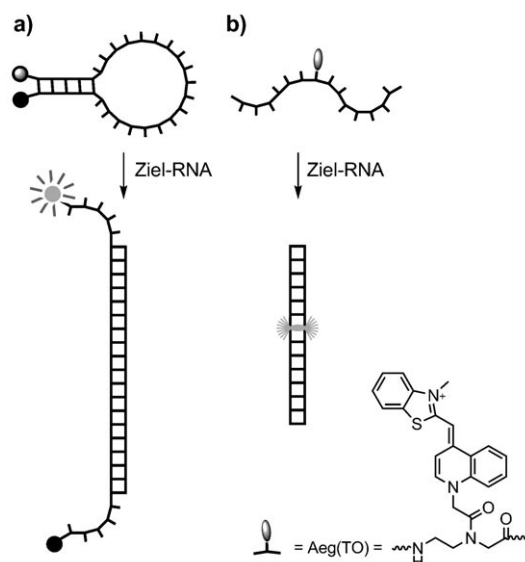


Fluoreszenzbildung der mRNA von Influenza-H1N1 in lebenden infizierten Zellen durch FIT-PNA mit einem einzigen Chromophor**

Susann Kummer, Andrea Knoll, Elke Socher, Lucas Bethge, Andreas Herrmann* und Oliver Seitz*

Bedingt durch das stetig wachsende Interesse an der RNA-Forschung wurde die Entwicklung von fluoreszierenden Oligonukleotid-Sonden mit großen Anstrengungen vorangetrieben. Ein Ziel ist es, die RNA-Expression in lebenden Zellen unter dem Mikroskop zu verfolgen.^[1] Bisher wurden vorzugsweise molekulare Beacons^[2] (MBs; Schema 1a) als Sonden zur Visualisierung von RNA verwendet.^[3] Diese haarnadelförmigen Sonden basieren auf der Interaktion zwischen zwei endständig angefügten Chromophoren, die bei der Bildung des Sonden-Zielsequenz-Komplexes voneinander räumlich getrennt werden. Unbeabsichtigt auftretende Bindungen mit Proteinen und/oder ein Nuklease-vermittelter Sondenabbau können allerdings ebenfalls den Abstand der Chromophore ändern.^[4]

Wir haben FIT-PNA-Sonden eingeführt (Schema 1b),^[5] in denen ein Thiazolorange(TO)-Interkalator als künstliche fluoreszierende Nukleobase dient. Diese Sonden reagieren auf Änderungen der lokalen Struktur in der Umgebung des Fluorophors, nicht jedoch auf globale Änderungen der Konformation, die der Entstehung des Fluoreszenzsignals bei den doppelt markierten MBs zugrunde liegen.^[6] Zur Erzielung einer starken Fluoreszenzsteigerung muss der TO-Farbstoff interkalieren. Dieser Mechanismus sollte gewährleisten, dass intensive Fluoreszenzsignale infolge unvermeidbarer Bindungen durch Proteine verhindert werden. Unter den vielen bereits beschriebenen TO-Sonden^[7] sind FIT-PNA-Sonden einzigartig. Ein einzelner Fluorophor genügt, um sowohl hohe Fluoreszenzanstiege bei spezifischer Hybridisierung zu liefern als auch für eine hohe Spezifität unter nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen zu sorgen (d.h. Bedingungen, bei denen die Sonde im Komplex mit komplementären und nicht-komplementären Sequenzen vorliegt). Als weitere positive Eigenschaften der PNA-Sonden sind die hohe Affinität zu komplementärer RNA und die verbesserte Biostabilität, die durch das Peptidnukleinsäure-Rückgrat vermittelt



Schema 1. Nachweis von Nukleinsäuren mit a) molekularen Beacons und b) FIT-PNA. MB-Sonden ändern nach der Bindung an die komplementäre Zielsequenz die Konformation. Bei den FIT-PNA-Sonden reagiert ein Interkalator wie Thiazolorange (TO) auf Änderungen der unmittelbaren Umgebung. Stapelwechselwirkungen verhindern eine Drehung um die TO-Methinbrücke, was einen Anstieg der Fluoreszenz zur Folge hat.

wird, zu nennen.^[8] In dieser Studie möchten wir die Vorteile der FIT-PNA-Sonden bei der visuellen Darstellung von mRNA eines Influenzavirusstammes, der dem gleichen Subtyp wie der hochpathogene Schweine-Virus (A/Mexico/1/2009, H1N1) angehört, aufzeigen.

Im Rahmen eines Forschungsprogramms mit Schwerpunkt auf der Charakterisierung des räumlichen und zeitlichen Musters des Viruszusammenbaus benötigten wir eine Methode, die es uns ermöglicht, mRNA zu visualisieren, welche für die Neuraminidase (NA) des Influenzavirus A/PR/8 kodiert. FIT-Sonden wie **1a** und **1b** wurden gegen ein Segment der NA-mRNA (nt 599–615, bezogen auf die Zugangsnummer NC_002018) gerichtet. Die Sequenz ist im Wesentlichen mit der NA-mRNA-Sequenz des A/Mexico/1/2009/Schwein (H1N1, nt 625–640) identisch (Abbildung 1). Die Zugänglichkeit des Zielsegments für Hybridisierungen, die durch die Sekundärstruktur der mRNA und Bindung von Proteinen erschwert werden kann, wurde bereits durch Zhang und Mitarbeiter demonstriert.^[9] Die rasche Synthese^[10] und Analyse von acht verschiedenen PNA-Oligomeren ergab die FIT-Sonde **1a** als das am besten geeignete System für unsere Untersuchung (siehe Hintergrundinformationen). **1a** lieferte

[*] Dr. A. Knoll, Dr. E. Socher, L. Bethge, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie, Humboldt-Universität Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

S. Kummer, Prof. Dr. A. Herrmann
Institut für Biologie, Humboldt-Universität Berlin
Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-8585
E-Mail: andreas.herrmann@rz.hu-berlin.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (A.H., O.S.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201005902> zu finden.

FIT-PNA-Sonden

- 1a**, H-Lys-cagtta-Aeg(TO)-tatgccgttg-Lys-NH₂
1b, H-Lys(PEG)-cagtta-Aeg(TO)-tatgccgttg-NH₂
1c, H-Lys(PEG)-cgttt-Aeg(TO)-taattcgttc-Lys-NH₂

Molekularer Beacon

- 2**, TMR-GCGACTTTCAGTTATTATGCCGTTGATTTGTCGC-Dabcyl

RNA-Zielsequenzen

- 3a**, 5'-CAACGGCAUAAUACUG-3', A/PR/8 (H1N1), nt 599-615
3b, 5'-AAAUAACACGGCAUAAUACUGAAA-3', A/PR/8 (H1N1), nt 594-618
3c, 5'-UCAAAGAAUAAUACAA-3', A/X-31 (H3N2, DQ87 4878, nt 16-32)

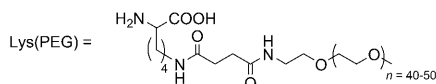


Abbildung 1. Hier verwendete Sonden und Zielsequenzen. Die Nukleotidangaben beziehen sich auf die Zugangsnummer NC_002018 (A/PR/8, H1N1), sofern keine Abweichungen angegeben sind.

nach Hybridisierung mit der komplementären RNA-Zielsequenz **3a** bei 37°C einen 11fachen Anstieg der TO-Emission (Abbildung 2a). Zudem untersuchten wir die Subtypspezifi-

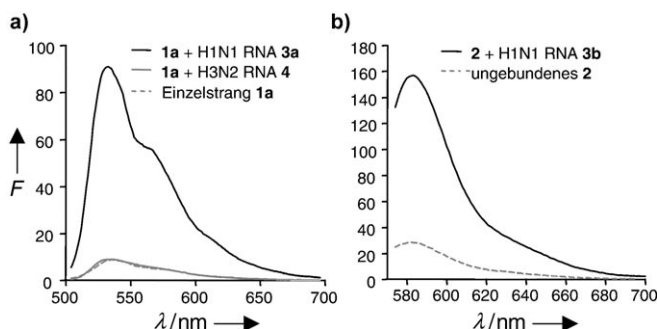


Abbildung 2. Fluoreszenzspektren a) der FIT-PNA-Sonde **1a** ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) und b) der MB-Sonde **2** ($\lambda_{\text{ex}} = 559 \text{ nm}$) vor und nach der Zugabe komplementärer H1N1-RNA oder nicht-komplementärer H3N2-RNA bei 37°C. Bedingungen: 1 μM Sonde und 10 μM Zielsequenz in 100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.0.

tät der Sonde **1a**. Die RNA **4** eines anderen Influenzastammes (NA-mRNA des A/X31, H3N2, nt 16-32) weist sieben komplementäre, aneinander liegende Basenpaare um die TO-Base auf. Dennoch blieb die Fluoreszenz von **1a** nach Zugabe von RNA **4** nahezu unverändert. Die TMR/DABCYL-markierte MB-Sonde **2** (Abbildung 1; TMR = Tetramethyl-6-carboxyrhodamin; DABCYL = 4-(4-dimethylaminophenyl)diazonylbenzoesäure) wurde bereits in einer früheren Studie^[9] verwendet. Diese Sonde zeigte nach Zugabe der komplementären RNA **3b** einen 6fachen Anstieg der TMR-Emission (Abbildung 2b).

Als nächstes verglichen wir FIT-PNA **1a** und den DNA-MB **2** in Bezug auf den Nachweis von RNA in Zelllysate. Die Zelllysate von MDCK-Zellen wurden mit der komplementären RNA-Zielsequenz **3b** oder Puffer versetzt und anschließend die Sonden zugegeben. Wurde die MB-Sonde für lediglich 60 min dem Zelllysate ausgesetzt, verringerte sich das Ansprechverhalten F/F_0 (F , F_0 = Fluoreszenzintensität der RNA enthaltenden Lysate bzw. der Kontrolllysate) um mehr

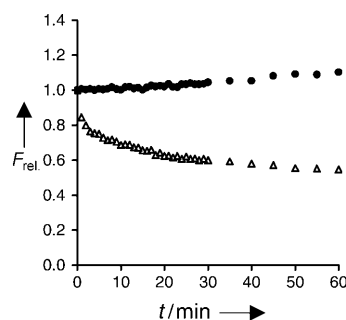


Abbildung 3. Relative Fluoreszenz ($F(t)/F_0(t=0)/F_0(t=0)$) der FIT-PNA-Sonde **1a** (●) und der MB-Sonde **2** (△) in Zelllysate nach der Zugabe der RNA **3a** bzw. **3b**. $F(t)$, $F_0(t)$ = Fluoreszenzintensität in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von RNA, gemessen bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ für die FIT-PNA-Sonde und $\lambda_{\text{ex}} = 559 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 593 \text{ nm}$ für die MB-Sonde. Bedingungen: 1 μM Sonde, 10 μM RNA in 100 μL Zelllysate, 37°C.

als 40% (Abbildung 3). Dieses Ergebnis könnte durch Nuklease-vermittelten Abbau und Proteinbindung hervorgerufen werden, da beide Mechanismen zu einem Anstieg von F_0 bei nicht vorhandener Zielsequenz führen (Abbildung S24). Demgegenüber blieb der hohe Fluoreszenzanstieg für die FIT-Sonde **1a** unabhängig von der Inkubationsdauer in Zelllysate beständig. Wir folgerten hieraus, dass die FIT-Sonde **1a** stabil in Lysaten und vermutlich gleichermaßen in lebenden Zellen ist. Ein zusätzliches Kontrollexperiment wurde durchgeführt, um zu beurteilen, ob die FIT-Sonden doppelsträngige DNA binden. Wir inkubierten die Sonde **1a** mit Thymus-Duplex-DNA in 100fachem Überschuss an Basenpaaren – eine Situation, die bei Lebendzellstudien der zytosolischen RNA nicht vorkommen sollte (Abbildung S25). Sogar unter diesen Bedingungen blieb die FIT-Sonde **1a** reaktionsfähig und zeigte immer noch einen starken Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe der RNA-Zielsequenz bei geringfügig erhöhter Hintergrundfluoreszenz. Unselektive Interkalation der abstandhalterfreien TO-PNA-Anbindung in DNA-Basenpaarungen werden vermutlich aus sterischen Gründen erschwert.

Zur Vorbereitung auf die Lebendzellstudien nutzten wir die quantitative Echtzeitpolymerasekettenreaktion (qPCR), um den Verlauf der viralen mRNA-Produktion während des Infektionszyklus von A/PR/8 in MDCK-Zellen zu untersuchen. Nach der Infektion^[9] wurde die gesamte RNA extrahiert, revers transkribiert und mit qPCR analysiert (Abbildung S26). Die quantitative Auswertung wurde durch die FIT-PNA **1a** ermöglicht, da diese Sonde sowohl bei 37°C als auch bei 60°C eine hohe durch die Bindung mit der Zielsequenz induzierte Fluoreszenzsteigerung aufwies – eine Anwendungsbreite, die durch konventionelle MBs nicht realisiert werden kann (Abbildung S23). Die Ergebnisse der qPCR ergaben, dass nach einer Infektionsdauer von 4–5 h das maximale Niveau von etwa 10^4 Kopien der NA-mRNA pro infizierter Zelle erreicht wird.

Der nächste Schritt bestand im Nachweis der viralen mRNA in lebenden Zellen. Um eine Segregation und nukleären Import^[11] zu vermeiden, wurde eine Oligoethylen-glycolkette an die FIT-Sonde **1a** angefügt, indem ein Suc-

cinylaminoethyl-*O*-methylpolyethylenglycol unter Verwendung eines *N*-Hydroxysuccinimidaktivester an die lysinmodifizierte PNA-Sonde in Lösung gekuppelt wurde (siehe Hintergrundinformationen). Die PEGylierung selbst hatte vernachlässigbare Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften (siehe Abbildungen S13, S20, S21). Die Sonde **1b** wurde wie bereits beschrieben^[9] mithilfe der Streptolysin-O (SLO)-vermittelten Permeabilisierung der Plasmamembran in lebende MDCK-Zellen eingebracht. Die intakte Morphologie der Zellen sowie das Ausbleiben der Propidiumiodid-Färbung belegten die Vitalität der mit SLO behandelten Zellen (Abbildung S30). Eine 250 nM Konzentration der Sonde **1b** war dabei ausreichend, um das Einbringen der Sonden und eine spezifische Markierung zu erzielen. Den Wiederverschluss der Plasmamembran vor Beginn der Mikroskopie gewährleistete eine 30-minütige Inkubation in frischem Medium. Zur Anregung des TO-Chromophors wurde ein 488-nm-Argonlaser benutzt und die Emission in einem Bereich von 510–540 nm aufgenommen. Konfokale Lasermikroskopie (CLSM) zeigte eine intensive Fluoreszenz von mit Influenza A/PR/8 infizierten Zellen (Abbildung 4a). Demgegenüber wiesen die nicht-infizierten Kontrollzellen eine unsignifikante Fluoreszenz auf (Abbildung 4b). Für die quantitative Analyse wurden Regionen im Zytosol verschiedener Zellen ausgewählt (Abbildung S28), von diesen die intrazelluläre Fluoreszenzintensität verschiedener Zellen bestimmt und die Hintergrundfluoreszenzintensität subtra-

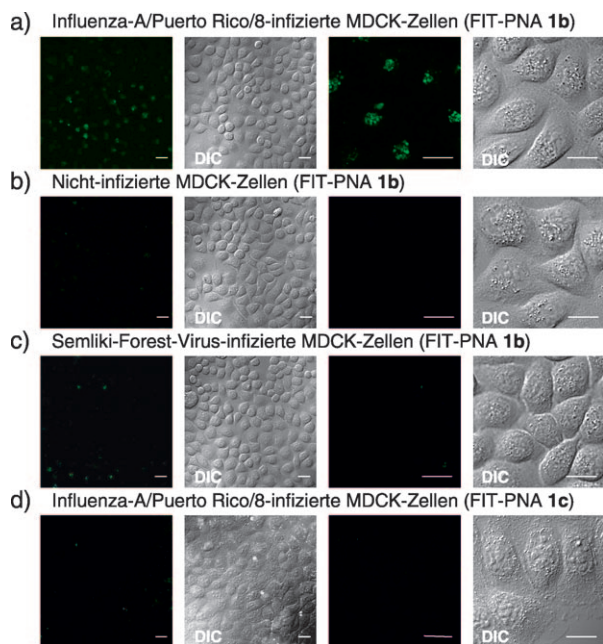


Abbildung 4. a–d) Konfokale Lasermikroskopie an lebenden MDCK-Zellen, die mit der für Influenza A/Puerto Rico/8 NA spezifischen FIT-PNA-Sonde **1b** (a–c) oder der für Vesicular-Stomatitis-Virus L spezifischen FIT-PNA-Sonde **1c** (d) 4.5 h nach der Infektion markiert wurden (Infektionsfaktor 100). Die FIT-PNA-Sonden wurden mit einem 488-nm-Argonlaser in lebenden MDCK-Zellen angeregt. Die Bilder wurden mit einem inversen konfokalen Mikroskop bei 37 °C aufgenommen. Die zwei rechten Spalten zeigen jeweils dreifach vergrößerte Aufnahmen der beiden linken Spalten. Maßstab: 10 µm; DIC = differenzieller Interferenzkontrast.

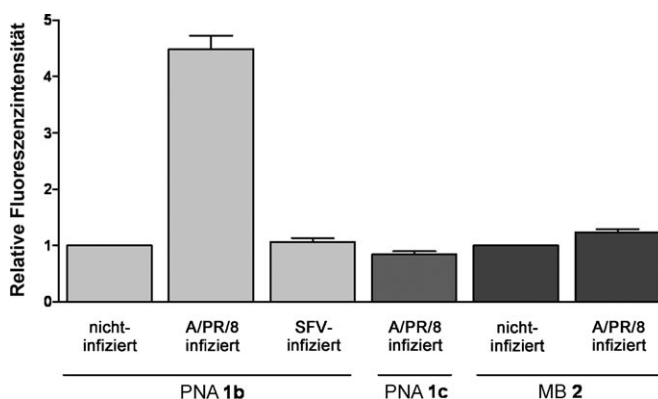


Abbildung 5. Relative Fluoreszenzintensität der für Influenza A/Puerto Rico/8 NA spezifischen FIT-PNA-Sonde **1b** in mit Influenza A/Puerto Rico/8 infizierten MDCK-Zellen, nicht-infizierten MDCK-Zellen (Kontrolle) und mit Semliki-Forest-Virus infizierten MDCK-Zellen, der für vesikulären Stomatitisvirus L spezifischen PNA-Sonde **1c** und der für Influenza A/Puerto Rico/8 NA spezifischen MB-Sonde **2** in mit Influenza A/Puerto Rico/8 infizierten und nicht infizierten MDCK-Zellen. Integrierte Fluoreszenzintensitätswerte aller Proben wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler des Mittelwertes. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente mit jeweils fünf Zellen pro Experiment ($n = 15$).

hiert. Die Bildanalyse ergab, dass mit Influenza H1N1 infizierte Zellen mit einer 4.5fach höheren Intensität fluoreszierten als nichtinfizierte Zellen (Abbildung 5). Wir führten zwei weitere Kontrollexperimente durch, um aufzuklären, ob Sonden wie **1b** in unspezifischer Weise auf erhöhte Transkriptionsniveaus an mRNA, die möglicherweise mit der Virusinfektion einhergehen, ansprechen. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit dem Semliki-Forest-Virus (SFV) infiziert (Abbildung 4c). SFV-infizierte Zellen zeigten eine geringe 1.1fache Steigerung der Fluoreszenz (Abbildung 4c und Abbildung 5). Zusätzlich wurde die FIT-Sonde **1c** in H1N1-infizierten MDCK-Zellen verwendet. Diese Sonde ist spezifisch für die mRNA des L-Proteins, einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (VSV, Zielsequenz: nt 9109-9124 bezogen auf die Zugangsnummer NC_001560, Abbildung 1) vom Vesicular-Stomatitis-Virus. Nach Hybridisierung mit VSV-RNA fluoreszierte **1c** mit erhöhter Intensität, allerdings sprach **1c** nicht auf die Zugabe von H1N1 RNA **3a** an (Abbildung S22). Die mikroskopischen Aufnahmen der lebenden Zellen ergaben keinen Unterschied der Fluoreszenzintensität verglichen mit nicht-infizierten Zellen. Beide Kontrollexperimente verdeutlichen, dass die hohe Fluoreszenzintensität der FIT-PNA-Sonden in A/PR/8-infizierten Zellen auf die virusspezifische NA-mRNA zurückgeführt werden kann.

Für einen Vergleich wurde die MB-Sonde **2** in Zellen eingeführt.^[9] Die Analyse der CLSM-Aufnahmen (Abbildung S27) ergab, dass die Influenza-infizierten Zellen lediglich eine 1.2fach erhöhte intrazelluläre Fluoreszenz gegenüber nicht-infizierten Zellen zeigten. Dieser Wert stimmt hinreichend mit der 1.8fach ($\pm 30\%$) erhöhten Intensität der MB-Sonde **2** überein, welche in einer früheren Untersuchung 4.5 h nach Infektion (verglichen mit 1.5 h nach Infektion) bestimmt wurde.^[9] Zwar wurden bei dieser Arbeit die Details

der durchgeführten Bildanalyse für infizierte und nicht-infizierte Zellen nicht angegeben, wir möchten jedoch darauf hinweisen, dass FIT-PNA **1b** in H1N1-infizierten Zellen bei signifikant reduzierten Fehlern eine 4.5fach ($\pm 6\%$) höhere Fluoreszenzintensität zeigte als in nicht-infizierten Zellen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deuten auf eine heterogene, nicht-zufällige intrazelluläre Verteilung der NA-mRNA hin. Obwohl weitere Studien nötig wären, um zu klären, ob die Lokalisation ebenso von mRNA widerspiegelt wird, die nicht im Komplex mit FIT-Sonden vorliegt, erscheint es plausibel, dass mRNA aus regulatorischen, entwicklungsrelevanten und ökonomischen Gründen in subzellulären Kompartimenten lokalisiert wird.^[12]

DNA-basierte MB-Sonden gehören zu den am häufigsten verwendeten Hybridisierungssonden für mikroskopische Aufnahmen in lebenden Zellen. Eine hohe Sequenzspezifität und hybridisierungsinduzierte Anstiege der Fluoreszenz wurden beschrieben.^[1b,2-4,11,13] Unsere Daten bieten, nach unserem Wissen, das erste Beispiel einer nicht-nukleotidischen Sonde für die mikroskopische Bildgebung von mRNA in lebenden Zellen. PNA-basierte FIT-Sonden wie **1** sind keinen Abbauprozessen durch Nukleasen oder Proteasen unterworfen. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis der FIT-PNA-Sonden war höher als dasjenige einer MB-Sonde, die in einer früheren Studie zu Lebendzell-RNA-Aufnahmen verwendet wurde. Unsere Arbeit stellt FIT-PNA-Sonden als reizvolle Methode zur Untersuchung der Genregulation in lebenden Zellen vor. Wir haben unsere Untersuchungen hier auf ein Mitglied der akuten Influenzavirusfamilie (H1N1) bezogen, die Methode kann aber unter Verwendung von FIT-PNA-Sonden auf jedes andere Virus angewendet werden. Künftige Experimente werden darauf fokussieren, die virale mRNA-Expression mit FIT-PNA-Sonden auf Einzelzellebene in einem absoluten Maßstab und in Echtzeit zu quantifizieren.

Eingegangen am 20. September 2010,
veränderte Fassung am 22. Oktober 2010
Online veröffentlicht am 21. Januar 2011

Stichwörter: Hybridisierungssonden · Konfokale Mikroskopie · Molekulare Beacons · RNA · Viren

- [1] a) P. J. Santangelo, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, 2, 11–19; b) G. Bao, W. J. Rhee, A. Tsourkas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, 11, 25–47; c) S. Paillason, M.

- Van De Corput, R. W. Dirks, H. J. Tanke, M. Robert-Nicoud, X. Ronot, *Exp. Cell Res.* **1997**, 231, 226–233; d) A. Tsuji, *Biophys. J.* **2000**, 78, 3260–3274; e) S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9686–9687; f) R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16021–16023; g) Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6492–6497; h) K. Furukawa, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1026–1036.
- [2] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303–308.
- [3] a) D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhlana, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 13308–13313; b) Z. Q. Cui, Z. P. Zhang, X. E. Zhang, J. K. Wen, Y. F. Zhou, W. H. Xie, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 3245–3252; c) P. Santangelo, N. Nitin, L. LaConte, A. Woolums, G. Bao, *J. Virol.* **2006**, 80, 682–688.
- [4] a) J. J. Li, X. Fang, S. M. Schuster, W. Tan, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1091–1094; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1049–1052; b) J. J. Li, R. Geyer, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, e52; c) A. K. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, e105.
- [5] a) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69–77; b) L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 114–125; c) E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Roglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, 375, 318–330.
- [6] a) D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 300–310; b) V. Karunakaran, J. L. Perez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2954–2962.
- [7] a) N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, 281, 26–35; b) U. Asseline, M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1949–1957; c) C. Holzhauser, S. Berndt, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239–1248; d) S. Berndt, M. Breunig, A. Göpferich, H. A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 997–999; e) F. Menacher, M. Rubner, S. Berndt, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4263–4266; f) S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, A. Okamoto, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6602–6606; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6480–6484.
- [8] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500.
- [9] W. Wang, Z. Q. Cui, H. Han, Z. P. Zhang, H. P. Wei, Y. F. Zhou, Z. Chen, X. E. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 4913–4928.
- [10] D. V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187–3195.
- [11] A. K. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, e69.
- [12] K. C. Martin, A. Ephrussi, *Cell* **2009**, 136, 719–730.
- [13] Y. Li, X. Zhou, D. Ye, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 373, 457–461.