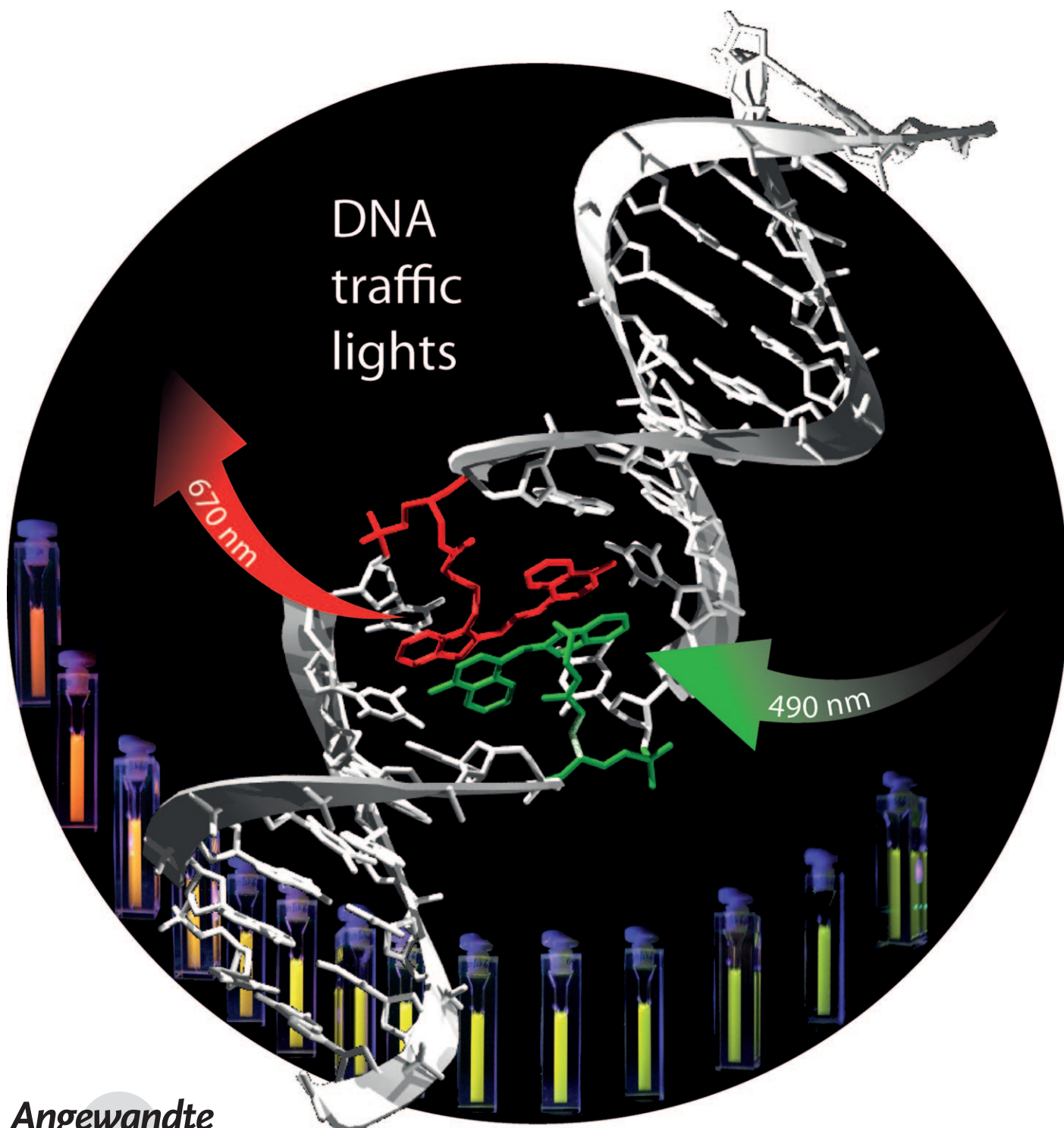


Deutliche Fluoreszenzfarbwechsel durch Markierung des Stamminneren von „Molecular Beacons“**

Carolin Holzhauser und Hans-Achim Wagenknecht*



Angewandte
Chemie

„Molecular Beacons“ (MBs) sind ein häufig gebrauchtes Werkzeug in der Fluoreszenz-Bioanalytik von Nucleinsäuren.^[1,2] Die derzeit größten Herausforderungen auf diesem Gebiet liegen in der Beobachtung der zellulären Aufnahme von DNA/RNA und der anschließenden Visualisierung der sequenzspezifischen Hybridisierung sowie in der verlässlichen Detektion von Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs) durch Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.^[2] Werden Hybridisierungsnachweise in vivo durchgeführt, birgt die Auswertung einzelner Fluoreszenzwellenlängen jedoch das Risiko eines falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisses, hervorgerufen durch die Autofluoreszenz intrazellulärer Bestandteile oder durch unspezifische Fluoreszenzlöschung. Deswegen ist die Entwicklung neuer und leistungsfähigerer MBs von entscheidender Bedeutung: Die wichtigsten Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet stellen beispielsweise löscherfreie MBs,^[3] stammlose PNA-MBs,^[4] MBs mit Wellenlängenverschiebung^[5,6] sowie MBs mit Excimer-Fluoreszenz dar.^[7–11] Vor kurzem berichteten wir darüber, dass zwei Thiazol-Orange-Farbstoffe als DNA-Basensurrogate über hydrophobe Wechselwirkungen ein Interstrang-Dimer bilden, was einen deutlichen Fluoreszenzfarbwechsel bei der DNA-Hybridisierung bewirkt.^[7] Hier stellen wir die Weiterentwicklung eines im Stamminneren markierten MB mit Wellenlängenverschiebung vor, der so aufgebaut ist, dass Thiazol-Orange (TO) und Thiazol-Rot (TR) ein Interstrang-Chromophorenpaar für den Energietransfer (ET) bilden.

Mithilfe der von uns bereits publizierten DNA-Bausteine^[12] wurden vier MBs hergestellt (**DNA1–DNA4**, Abbildung 1, Tabelle 1), die sich in ihrer Stammlänge von 11 bis 5 Basenpaaren unterscheiden (einschließlich der als künstliche Basen eingebauten Farbstoffe). Zusätzlich wurde **DNA5** synthetisiert, um die Auswirkung der Farbstofforientierung des diagonalen TO-TR-Chromophorenpaars zu untersuchen (5'–3' oder 3'–5'). In allen MBs wurde darauf geachtet, dass die Farbstoffe TO und TR im Stamm in identische DNA-Basenumgebungen eingebettet werden, um so die strukturelle Vergleichbarkeit für die Chromophor-Wechselwirkung zu gewährleisten. Dies beinhaltet zum einen ein A-T-Basenpaar an jeder Seite des Farbstoffpaares und zum anderen ein Thymin als „Gegenbase“ zu jedem Chromophor. Außer diesem festgelegten zentralen Strukturmotiv ist die übrige Stammsequenz der MBs frei wählbar.

Die Absorptionsspektren aller MBs (siehe die Hintergrundinformationen) zeigen deutlich die beiden kovalent angeknüpften Chromophore durch gut voneinander getrennte Absorptionsmaxima (510 nm für TO und 640 nm für

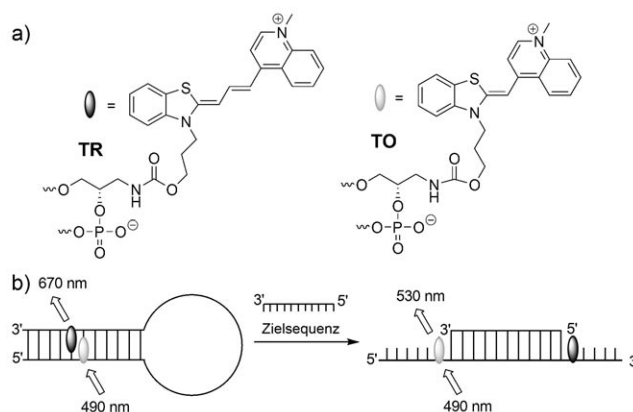


Abbildung 1. a) Struktur von Thiazol-Orange (TO) und Thiazol-Rot (TR) als DNA-Basensurrogate. b) Der hybridisierungsbedingte Fluoreszenzfarbwechsel eines MB, der mit TO und TR modifiziert ist, von Rot nach Grün.

Tabelle 1: Sequenzen der MBs **DNA1–DNA6**^[a] und ihrer Gegenstränge.

	3'→5' für MBs, 5'→3' für Gegenstränge
DNA1	<u>GTCATRTTGACCGTACGTCAGTTGACTGGTCATOTTGAC</u> ACTGGCATGCAGTCAACTGACCAG
DNA2	<u>GTCATRTTGACTGTACGTCAGTTGACTGGTCATOTTGAC</u> ACTGACATGCAGTCAACTGACCAG
DNA3	<u>TCATRTTGACTGTACGTCAGTTGACTGATCATOTTGA</u> ACTGACATGCAGTCAACTGACTAG
DNA4	<u>CATRTTTCGCTGTACGTCAGTTGACTGATCATOTTG</u> GCGACATGCAGTCAACTGACTAG
DNA5	<u>GTCATTOTGACCGTACGTCAGTTGACTGGTCAATRTGAC</u> CTGGCATGCAGTCAACTGACCAGT
DNA6 ^[b]	<u>X-GTCAATTGACCGTACGTCAGTTGACTGGTCAATTGAC-Y</u> ACTGGCATGCAGTCAACTGACCAG

[a] Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Stammsequenz der MBs. [b] **DNA6**: am Ende markiert mit X = Rhodamin (TAMRA, 5') und Y = Fluorescein (FAM, 3'); siehe die Hintergrundinformationen.

TR). Die funktionelle Charakterisierung der TO/TR-modifizierten MBs erfolgte hauptsächlich mithilfe stationärer Fluoreszenzspektroskopie, wobei die TO-selektive Anregung bei 490 nm verwendet wurde. Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen (T_m) der Haarnadeln mit denen der Duplexe verglichen, die sich in Gegenwart von 1.2 Äquiv. Gegenstrang bildeten. Hierbei zeigte sich, dass die Länge der eingesetzten Gegenstränge dann optimal ist, wenn diese nicht nur zum Schleifenbereich des MB, sondern auch zum „inneren“ Teil des Stammes komplementär sind. Dies wurde beispielhaft für **DNA2** gezeigt (siehe die Hintergrundinformationen). Mit Gegensträngen, die nur mit der Schleife des MB hybridisieren, werden beide Chromophore nur unvollständig getrennt, was zu unspezifischer Farbstoffaggregation über die klebrigen Enden führt.

Um die Ergebnisse der hier präsentierten TO/TR-modifizierten MBs sowohl untereinander als auch mit denen kommerziell erhältlicher MBs vergleichen zu können, wurde der Kontrastfaktor f berechnet.^[14,15] f steht für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I_{530}/I_{670} für Duplex- und Haarnadelform (Tabelle 2); I_{530} und I_{670} stellen die jeweils farb-

[*] Dipl.-Chem. C. Holzhauser, Prof. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
76131 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-6084-4825
E-Mail: wagenknecht@kit.edu
Homepage: <http://www.ioc.kit.edu/wagenknecht/>

[**] Für die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Wa 1386/9-4) und durch das KIT wird gedankt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101968> zu finden.

stofftypischen Emissionsintensitäten bei einer Wellenlänge **Tabelle 2:** Kontrastfaktor f und Schmelztemperaturen (T_m) für **DNA1–DNA6**.

	$f^{[a]}$	$T_m(\text{Duplex})^{[b]}$ [°C]	$T_m(\text{Haarnadel})^{[c]}$ [°C]	$\Delta T_m^{[d]}$ [°C]
DNA1	34.2 ± 0.5	79.9	69.3	10.6
DNA2	13.0 ± 0.5	77.3	66.4	11.0
DNA3	39.7 ± 2.4	76.8	63.9	12.9
DNA4	22.3 ± 0.9	78.6	58.5	20.1
DNA5	13.4 ± 2.0	79.1	68.4	10.7
DNA6	3.9 ± 0.4	78.4	72.8	5.6

[a] Kontrastfaktor $f = (I_{530}/I_{670})_{\text{Duplex}} / (I_{530}/I_{670})_{\text{Haarnadel}}$. [b] Schmelztemperatur T_m von **DNA1–DNA6** gemessen bei 260 nm hybridisiert mit 1.2 Äquiv. Gegenstrang. [c] Schmelztemperatur T_m von **DNA1–DNA6** bei 260 nm in der Haarnadelform. [d] $\Delta T_m = T_m(\text{Duplex}) - T_m(\text{Haarnadel})$.

von 530 nm für TO und 670 nm für TR dar. Zuerst wurde die Auswirkung der Farbstofforientierung von TO und TR zueinander anhand von **DNA1** und **DNA5** genauer untersucht (Abbildung 2, links). Während die T_m -Unterschiede zwischen Duplex und Haarnadel annähernd gleich groß sind (10.6 bzw.

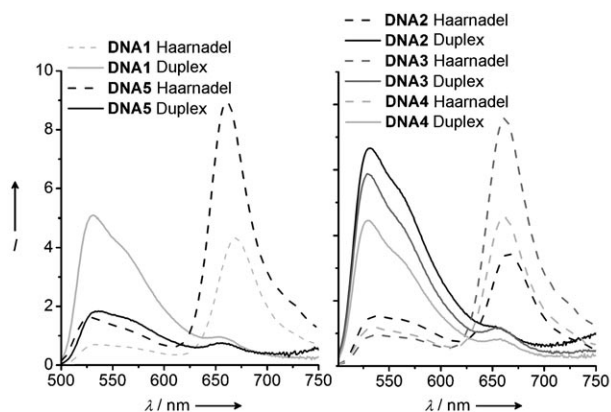


Abbildung 2. Fluoreszenzspektren von **DNA1** und **DNA5** (links) sowie **DNA2–DNA4** (rechts), jeweils als Duplex und Haarnadel. 2.5 μM in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, Anregungswellenlänge: 490 nm.

10.7 °C), zeigt sich bei den Fluoreszenzspektren ein deutlicher Unterschied: Die intensivere rote TR-Fluoreszenz von **DNA5** lässt auf eine höhere ET-Effizienz schließen, wohingegen der Anstieg der grünen TO-Fluoreszenz durch Öffnung der Haarnadel im Fall von **DNA1** erheblich größer ist.

Aus diesem Grund weist **DNA1** einen viel besseren Kontrast f (34.2) zwischen den beiden Farben Grün und Rot auf als **DNA5** (13.4). Im Moment können wir dieses Ergebnis allerdings nur unzureichend erklären. Unsere zuvor durchgeführten Studien an TO/TO- und TO/TR-Chromophorenpaaren in DNA machten deutlich, dass die verwendeten Farbstoffe excitonische Wechselwirkungen untereinander bilden können,^[7,12,13] was sich störend auf den ET von einem angeregten Monomer (TO) auf ein im Grundzustand befindliches Monomer (TR) auswirkt. Werden solche Dimere im Grundzustand als konformatives Subensemble angeregt, fällt die ET-Effizienz deutlich ab. In der Tat lassen Unter-

schiede in den Absorptionsspektren zwischen **DNA1** und **DNA5** auf mögliche excitonische Wechselwirkungen in der Haarnadel von **DNA5** schließen (siehe die Hintergrundinformationen). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Chromophor-Orientierung in **DNA1** für die Anwendung in einem TO/TR-modifizierten MB deutlich besser geeignet ist.

In einer zweiten Experimentreihe wurde die optimale Stammlänge der MBs ermittelt (Abbildung 2, rechts). Aufgrund der Stammverkürzung sinken die T_m -Werte von 69.3 °C für **DNA1** auf 58.5 °C für **DNA4**, wohingegen die T_m -Unterschiede zwischen Haarnadel und Duplex von 10.6 °C auf 20.1 °C ansteigen. Vergleicht man die f -Werte für **DNA1–DNA4**, so lassen sich zwei bemerkenswert hohe Werte herausstellen: 34.2 für **DNA1** und 39.7 für **DNA3**. Abschließend wurde noch das kinetische Verhalten der Haarnadelöffnung für **DNA1–DNA5** nach Zugabe von 0.5 Äquiv. des entsprechenden Gegenstranges untersucht. Zeitabhängige Messungen der f -Werte zeigen, dass – bei niedrigen mikromolaren DNA-Konzentrationen – ein plateauartiges Maximum innerhalb von 12 min für **DNA2–DNA5** und 30 min für **DNA1** erreicht wird.

Abbildung 3 a zeigt eine vollständige Titration von **DNA1** durch schrittweise Zugabe von 0.1 Äquiv. Gegenstrang. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurde eine Wartezeit von 60 min eingehalten, um eine vollständige Öffnung des MB zu gewährleisten, obwohl die oben besprochenen kinetischen Experimente eine deutlich kürzere Zeit ergeben hatten. Bemerkenswerterweise ändert sich die Emissionsfarbe des MB schrittweise von Rot (TR) nach Grün (TO), was daran liegt, dass beide Wellenlängen durch die große Differenz von 140 nm deutlich getrennt sind. Die vollständige Öffnung des MB erfordert die Zugabe von 1.6 Äquiv. Gegenstrang, was in dem vergleichsweise kleinen ΔT_m -Wert begründet liegt.

Da der Rückgang der roten TR-Emission gleichzeitig mit dem Anstieg der grünen TO-Emission stattfindet, kann diese Farbänderung gut mit dem bloßen Auge verfolgt werden, wenn die Küvette unter der UV-Lampe beleuchtet wird. Da die beschriebene Wellenlängenverschiebung ebenfalls in **DNA2**, **DNA3** und **DNA4** zu beobachten war (siehe die Hintergrundinformationen), gehen wir davon aus, dass das TO/TR-System in einer Vielzahl von MBs, die sich in Stammlänge und Schleifengröße unterscheiden, einsetzbar ist.

Abschließend wurde **DNA1** mit dem kommerziell erhältlichen MB **DNA6** verglichen, der eine so genannte Wellenlängenverschiebung aufweist. **DNA6** wurde endständig mit Fluorescein als ET-Donor (FAM, 5'-Ende) und Rhodamin als Akzeptor (TAMRA, 3'-Ende) markiert.^[5] Das Titrationsexperiment mit **DNA6** (Abbildung 3 b) zeigt prinzipiell ähnliche Spektren wie aus der Literatur bekannt und ergibt einen f -Wert von nur 3.9 (Abbildung 4). Dieser Wert steht für einen Kontrast zwischen Haarnadel und Duplex, der annähernd eine Größenordnung kleiner ist als mit **DNA1**. Dieses Ergebnis überrascht nicht, denn bei genauer Betrachtung des Fluoreszenzspektrums wird ersichtlich, dass die beiden Emissionswellenlängen in **DNA6** nur mäßig voneinander getrennt sind. Der Grund weshalb **DNA6** den maximalen f -

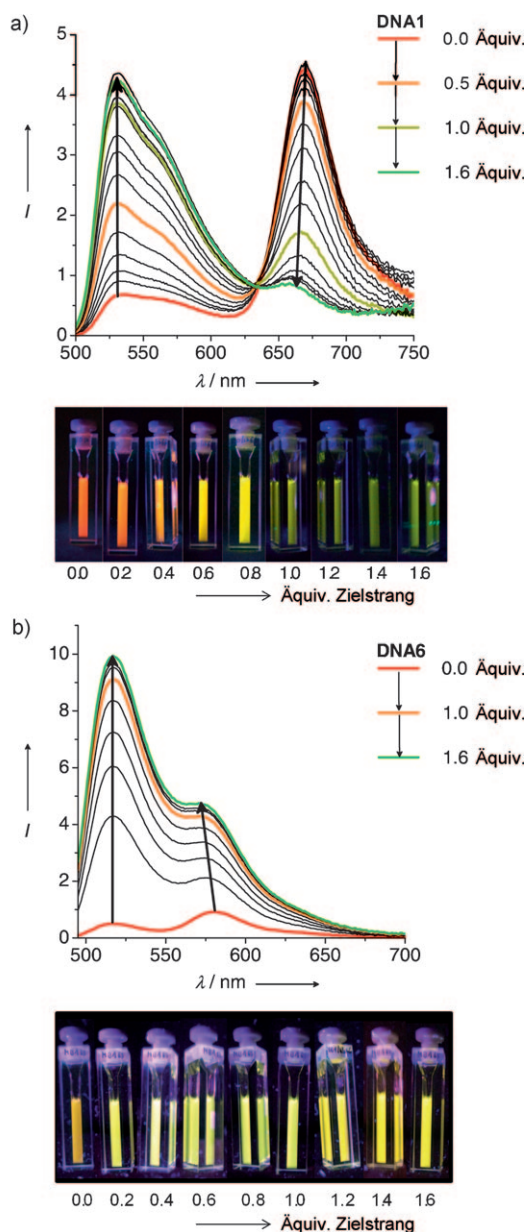


Abbildung 3. a) Fluoreszenzspektren der Titration von Haarnadel-DNA1 (2.5 μM) mit bis zu 1.6 Äquiv. Gegenstrang, 10 mM Natriumphosphat-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20°C, Anregung bei 490 nm. b) Fluoreszenzspektren der Titration von Haarnadel-DNA6 (2.5 μM) mit bis zu 1.6 Äquiv. Gegenstrang, 10 mM Natriumphosphat-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20°C, Anregung bei 488 nm.

Wert mit bereits 0.2 Äquiv. Gegenstrang erreicht, findet sich in der Tatsache, dass die TAMRA-Fluoreszenz eine deutlich geringere Intensität aufweist und zudem mit der Seitenbande der FAM-Emission überlappt. Obwohl sich der f -Wert als sehr nützlich erwiesen hat, um die Fluoreszenzänderung unterschiedlicher MBs miteinander zu vergleichen, wird in der Literatur nur spärlich darüber berichtet. Als eines der wenigen Beispiele sei hier ein mit Alexa und RedX markierter MB genannt, der einen f -Wert von 10.5 erreicht.^[15]

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Art und Weise, wie die Chromophore mit dem DNA-Rückgrat verknüpft

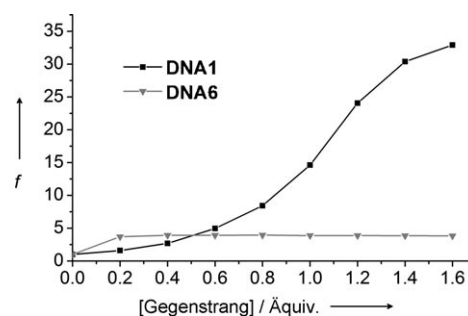


Abbildung 4. Kontrastfaktor f von DNA1 und DNA6, aufgetragen gegen die Menge des entsprechenden Gegenstrangs.

werden, entscheidend zum Unterschied zwischen DNA1 und DNA6 beiträgt.^[16] Im Fall von DNA6 sind beide Farbstoffe über lange, flexible Alkylketten mit dem jeweiligen Ende des MB verknüpft, wodurch ein ET nur sehr ineffizient durch zufälliges Aufeinanderprallen der Farbstoffmoleküle stattfinden kann. Dagegen zwingt in DNA1 die DNA-Architektur die beiden Farbstoffe TO und TR in räumliche Nähe zueinander, wodurch die ET-Effizienz durch statische Löschung erheblich gesteigert wird. Während einer Titration wird der entsprechende Gegenstrang schrittweise zugegeben, was nach und nach zu einer Öffnung der Haarnadel führt, wodurch gleichzeitig die architektonischen Kräfte der DNA-Doppelhelix um die Chromophore herum gelockert werden. Dies führt dazu, dass TO und TR voneinander getrennt werden, was sich durch eine kontinuierliche Farbänderung von Rot nach Grün verfolgen lässt.

Verglichen mit DNA6 und anderen kommerziell erhältlichen MBs weist der von uns gewählte Ansatz hauptsächlich zwei Vorteile auf: 1) Die Fluoreszenzauswertung wird durch die klar voneinander getrennten Wellenlängen sehr einfach (140 nm Verschiebung). 2) Bedingt durch die gut voneinander getrennten Emissionsbanden sowohl des Duplexes als auch der Haarnadel steigern die hohen f -Werte das Signal/Rausch-Verhältnis signifikant. Diese Eigenschaften machen die von uns entwickelten MBs zu sehr leistungsfähigen Werkzeugen für die Fluoreszenz-Bioanalytik mit einem breiten Anwendungsspektrum. Hier seien beispielsweise die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, die molekulare Diagnostik oder die Bildgebung von Zellen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie genannt. Darüber hinaus ist es wichtig hervorzuheben, dass wir hier ein neues Konzept vorstellen, das sehr vielversprechend für die Entwicklung bioanalytischer Werkzeuge ist. Werden zwei Chromophore als Basensurrogate in DNA durch die diagonale Interstrang-Orientierung in räumliche Nähe zueinander gezwungen, kann eine deutlich verbesserte ET-Effizienz erreicht werden.

Eingegangen am 20. März 2011
Online veröffentlicht am 29. Juni 2011

Stichwörter: DNA · Energietransfer · Molecular Beacons · Thiazol-Orange · Wellenlängenverschiebung

- [1] a) S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308; b) S. Tyagi, D. P. Bartu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49–53; c) W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547–553.
- [2] K. Wang, Z. Tang, J. Y. Chaoyong, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 870–885; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856–870.
- [3] a) G. T. Hwang, Y. J. Seo, H. B. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6528–6529; b) N. Venkatesan, Y. J. Seo, H. B. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 648–663.
- [4] a) E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 318–330; b) E. Socher, L. Berthge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9697–9701; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9555–9559; c) S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Berthge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1972–1975; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1931–1934.
- [5] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191–1196.
- [6] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526–528.
- [7] S. Berndt, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2454–2457; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418–2421.
- [8] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 300–310.
- [9] a) R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1249–1252; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227–1230; b) S. M. Biner, D. Kummer, V. L. Malinovskii, R. Häner, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, DOI: 10.1039/c0ob01132k.
- [10] a) Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5634–5638; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5502–5506; b) H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7178–7181; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044–7047.
- [11] a) A. A. Martí, S. Jockusch, N. Stevens, J. Ju, N. J. Turro, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 402–409; b) P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Martí, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336–342.
- [12] C. Holzhauser, S. Berndt, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239–1248.
- [13] S. Berndt, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 997–999.
- [14] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 416–419; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402–405.
- [15] S. Jockusch, A. A. Martí, N. J. Turro, Z. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 493–498.
- [16] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466–3471.