

# Konsekutive Signalverstärkung für die DNA-Detektion basierend auf einer De-novo-Fluorophorsynthese und Wirt-Gast-Chemie\*\*

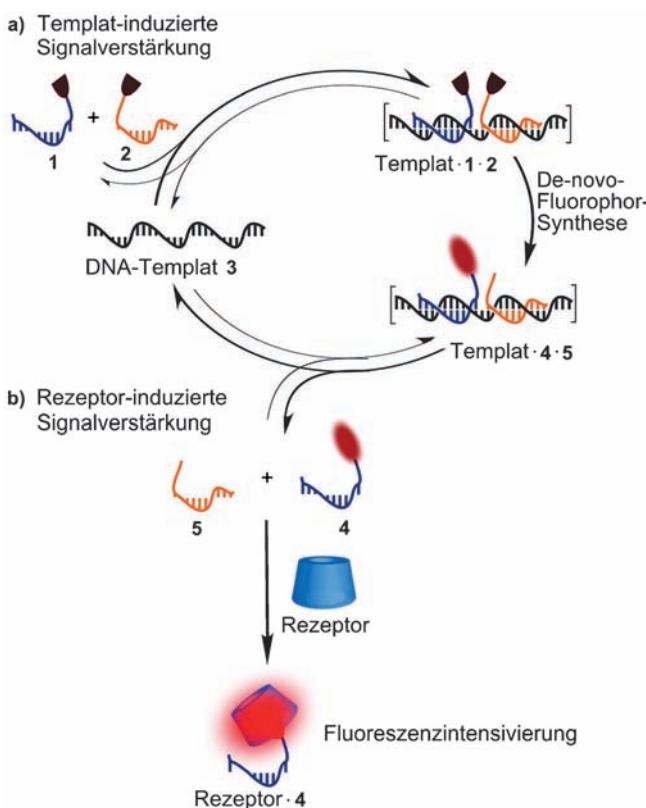
Xiao-Hua Chen, Alexander Roloff und Oliver Seitz\*

Durch Nukleinsäuretemplate gesteuerte chemische Reaktionen eröffnen den Material- und Lebenswissenschaften faszinierende Möglichkeiten. In kürzlich erschienenen Arbeiten wurde die Nukleinsäure-gesteuerte Chemie mit dem Ziel eingesetzt, replizierbare DNA-Nanoarchitekturen zu konstruieren, die Testung von Wirkstoffen zu erleichtern, DNA und RNA sogar in lebenden Zellen nachzuweisen und wirkstoffähnliche Moleküle freizusetzen.<sup>[1]</sup> Typischerweise werden bei diesen Umsetzungen stöchiometrische Mengen des DNA-Templats benötigt. Jedoch würden viele Anwendungen von einer katalytischen Wirksamkeit des Templat profitieren.<sup>[1a]</sup> Intensive Anstrengungen galten der Entwicklung templatkatalysierter Reaktionen, durch die geringste Mengen an DNA oder RNA nachgewiesen werden können.<sup>[2-4]</sup> Dabei bewirkt ein Templatmolekül (= Analyt) die Bildung mehrerer Signalmoleküle. Der katalytische Umsatz am Templat stellt somit einen Mechanismus zur Verstärkung des detektierten Signals dar. Unter den üblicherweise ausgelesenen Werten wird Fluoreszenz mit Abstand am häufigsten genutzt.<sup>[3,4]</sup> Methoden, bei denen die Gegenwart des Analyts einen Anstieg der Fluoreszenzintensität herbeiführt, gestatten Messungen in Echtzeit und bieten Ansätze, um RNA in lebenden Zellen bildgebend darzustellen und/oder DNA in einem PCR-freien Verfahren nachzuweisen.

Die vorangegangenen Arbeiten auf diesem Gebiet konzentrierten sich auf DNA-gesteuerte Reaktionen zwischen markierten Oligonukleotiden, welche gelöschte Fluorophore oder Photosensibilisatoren trugen.<sup>[3,4]</sup> Das Fluorophorsystem war dabei bereits vorhanden und die templatgesteuerte Reaktion diente einzig dem Zweck, die fluoreszenzlöschenden Gruppen voneinander zu entfernen. Detektionsverfahren, die auf gelöschten Fluorophoren beruhen, haben oft den Nachteil eines relativ hohen Hintergrundsignals, welches von unvollständiger Fluoreszenzlösung bzw. der potentiellen hydrolytischen Spaltung estergebundener Chromophore herrührt. Kürzlich wurde eine Aldol-artige Chemie genutzt, um Cyaninfarbstoffe über eine DNA-gesteuerte Verknüpfungsreaktion zu generieren.<sup>[5]</sup> Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal durch die Bildung eines Fluorophors erzeugt. Verknüpfungsreaktionen führen jedoch zu Produktinhibierung, was

den katalytischen Umsatz am Templat und somit die Signalverstärkung verhindert. DNA-gesteuerte Spaltungsreaktionen zeichnen sich dagegen durch eine verminderte Produktinhibierung aus. So wurden templatgesteuerte Versionen der Staudinger-Reaktion zur Freisetzung von Stickstoff aus Azidgelöschten Fluorophoren oder  $\alpha$ -Azidoether-verbrückten Lösichern genutzt.<sup>[4]</sup> Diese Reaktionen ermöglichen einen katalytischen Umsatz am Templat und hohe Fluoreszenzverstärkungen.

Hier stellen wir nun einen neuen Ansatz vor, bei dem eine Olefinierungsreaktion, die über einen Gruppentransfer verläuft (und nicht etwa über eine Verknüpfungs- oder Spaltungsreaktion), zur De-novo-Synthese eines Fluorophors führt (Schema 1a). In einem zweiten Schritt wird der neu gebildete Fluorophor durch ein Rezeptormolekül erkannt (Schema 1b). Die Verstärkung des ausgelesenen Signals wird dabei durch zwei konsekutive Verstärkungsmechanismen erreicht: a) eine Transferreaktion, die über katalytischen Umsatz am Templat verläuft, da jedes Produktmolekül über dieselbe Anzahl an basenpaarenden Nukleotiden verfügt wie die ein-



Schema 1. Konsekutive Signalverstärkung für die DNA-Detektion.

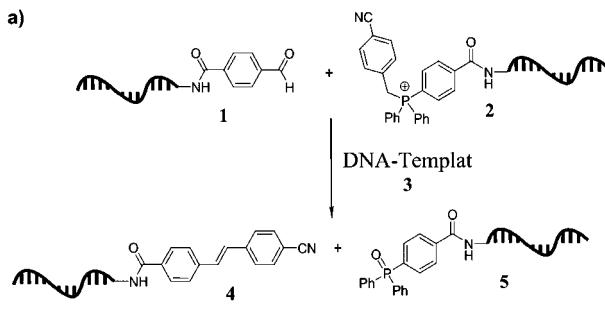
[\*] Dr. X.-H. Chen, Dipl.-Chem. A. Roloff, Prof. Dr. O. Seitz  
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin  
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)  
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

[\*\*] Wir danken der Alexander von Humboldt-Stiftung für die Gewährung eines Stipendiums für X.-H.C.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108845> zu finden.

zernen Sonden vor der Reaktion, und b) eine Fluoreszenzintensivierung, die herbeigeführt wird, indem der neu gebildete Fluorophor von einem Rezeptor gebunden wird und dadurch Reaktionspfade zur strahlunglosen Deaktivierung geschlossen werden. Es wird gezeigt, dass sich dieser konsekutive Ansatz durch einen geringen Hintergrund auszeichnet und eine mehr als 100-fache Fluoreszenzverstärkung liefert. Im Vergleich zu Reaktionen ohne Amplifizierung wird das gemessene Signal um mehr als das 300-fache verstärkt.

Für die DNA-kontrollierte Fluorophorsynthese erdachten wir ein Reaktionsformat, in dem eine Benzyliden-Einheit eines DNA-gebundenen Phosphoniumsalzes auf einen DNA-gebundenen Benzaldehyd übertragen wird.<sup>[6]</sup> Bei geeigneter



b) Sonden

- 1a,  $\text{OHC-C}_6\text{H}_4\text{-CONH-C}_6\text{H}_{12}\text{-OPO}_2\text{-5'}$ O-CCTACAGCGC-3'  
 1b,  $\text{OHC-C}_6\text{H}_4\text{-CONH-C}_6\text{H}_4\text{OCONH-C}_6\text{H}_{12}\text{-OPO}_2\text{-5'}$ O-CACACCTACAGCGCC-3'  
 2a, 5'-ACTCTCCCCAC-3' O-PO<sub>2</sub><sup>-</sup>-OC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-NHCO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-P<sup>+</sup>(Ph)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CN  
 2b, 5'-CAGGGCACTCTCCC-3' O-PO<sub>2</sub><sup>-</sup>-OC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-NHCO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-P<sup>+</sup>(Ph)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CN

Template

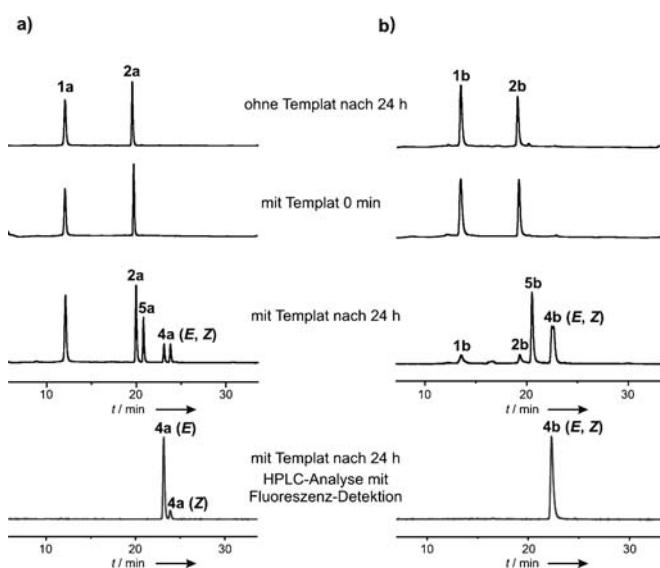
- 3a, 5'-GGCGCTGTAGGTGTGGGGAAAGAGT-3'  
 3b, 5'-GGCGCTGTAGGTGTGGGGAAAGAGTGCCTG-3' (Mutante)  
 3c, 5'-GGCGCTGGAGGTGTGGGGAAAGAGTGCC CTG-3' (Wildtyp)

**Schema 2.** a) DNA-gesteuerte Wittig-Reaktion. b) Sequenzen der DNA-Sonden und -Template.

Substituierung würde das entstehende Stilben fluoreszieren. Wir konzentrierten uns auf den in Schema 2 dargestellten Entwurf. Durch die Verwendung des Phosphoniumsalzes **2** kann die Bildung eines Ylids bei  $\text{pH} < 9$  erfolgen. Der Benzaldehyd **1** verwirklicht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Stabilität und Reaktivität und führt zur Bildung eines Stilbens, das im Puffer bei 380 nm fluoresziert. Im Zuge der templatgesteuerten Reaktion werden der DNA-Aldehyd und das DNA-Phosphonium-Konjugat am DNA-Templat in unmittelbarer Nähe zueinander angeordnet (Schema 1a). Der damit einhergehende Anstieg der effektiven Molarität beschleunigt die Wittig-Reaktion, die in Abwesenheit des Templat nur mit sehr geringer Geschwindigkeit abläuft. Unter den Bedingungen des dynamischen Strangtauschs (nahe der Schmelztemperatur,  $T_M$ ) wird ein katalytischer Umsatz am Templat erwartet, da die Sonden sowohl vor als auch nach erfolgter Reaktion eine ähnliche Affinität für das Templat aufweisen. Die Bildung des Stilbens leitet ein zweites molekulares Erkennungsereignis ein: die Wechselwirkung mit einem geeigneten Rezeptor. Basierend auf der Verfügbarkeit, der Wasserlöslichkeit und der Einfachheit der Handhabung wählten wir hierfür  $\alpha$ -Cyclodextrin. Die hy-

drophobe Kavität des  $\alpha$ -Cyclodextrins stellt eine enge Bindungstasche, welche die gebundene *trans*-Stilben-Einheit vor chemischen und photochemischen Umsetzungen schützt.<sup>[7]</sup> Dies resultiert in einer Intensivierung der Stilben-Emission und trägt als ein zweites Mittel zur Signalverstärkung bei.

Als Templat **3** wählten wir ein Segment, das die bekannte karzinogene G12V-Mutation des *Ras*-Gens umfasst. Zuerst wurde die DNA-gesteuerte Wittig-Reaktion zwischen den modifizierten Oligonukleotiden **1** und **2** über HPLC analysiert (Abbildung 1). Die Reaktion verlief in wässrigem Puffer bei pH 8.5 und 50 °C glatt (Abbildung 1a). Es entstanden drei neue HPLC-Signale, deren Ursprung durch MALDI-TOF/MS und Fluoreszenzanalyse aufgeklärt wurde. Das *trans*-Stilben **4a** (*E*) und *cis*-Stilben **4a** (*Z*) wurden annähernd im 1:1-Verhältnis zusammen mit dem Phosphinoxid **5a** gebildet.



**Abbildung 1.** HPLC-Analyse der Reaktion zwischen den Sonden **1** und **2** in Gegenwart und in Abwesenheit des Templat **3**. Bedingungen: a) 100 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM NaCl, pH 8.5, 50 °C, 5  $\mu\text{M}$  **1**, **2** und **3a** (1 Äquiv., wenn zugegeben); b) unter optimierten Bedingungen: 100 mM Natriumhydrogencarbonat, 1 M NaCl, pH 8.5, 60 °C, 500 nm **1b**, **2b** und **3b** (1 Äquiv., wenn zugegeben).

In Abwesenheit des Templat fand nahezu keine Reaktion statt.

Die Verwendung verschiedener Templat führte nur zu kleinen Unterschieden in den Reaktionsausbeuten, wenn zwischen den beiden Doppelstrangsegmenten des ternären Komplexes **Templat-1-2** null bis drei ungepaarte Templatbasen vorlagen (Hintergrundinformationen, Schema S1). Die DNA-gesteuerte Reaktion tolerierte eine Reihe von Reaktionsbedingungen (Tabellen S1–S3). Die Reaktion verlief bei erhöhter Temperatur schneller, sofern der  $T_M$  des Sonden-Templat-Komplexes nicht überschritten wurde. Deshalb verlängerten wir die Oligonukleotidsonden. Unter den optimierten Bedingungen (Abbildung 1b) lieferte die templatgesteuerte Reaktion der Sonden **1b** und **2b** ( $T_M = 65^\circ\text{C}$  und  $64^\circ\text{C}$  am Templat **3b**) das Stilben **4b** in 83 % Ausbeute nach 24 h. Der Hintergrund war gering; weniger als 0.8 % Produkt

wurden in Abwesenheit des Templat nach 24 h gebildet. Messungen nach kürzeren Reaktionszeiten ergaben fast 50% bzw. 26% Stilben **4b** nach nur 2 h bzw. 30 min (Tabelle S3). Erfreulicherweise stellten wir fest, dass die Reaktion den katalytischen Umsatz am Templat unterstützte (Tabelle 1 und Abbildung S1). Bei der Reaktion, in der 0.0002 Äquiv. des Templat vorlagen, ergab die HPLC-Analyse eine Wechsel-

**Tabelle 1:** Fluoreszenzintensitäten und Signalverstärkungen.

Eintrag	Templat (Äquiv.)	Umsatz- zahl	F.I. <sup>[a]</sup> ohne α-CD	F.I. <sup>[a]</sup> mit α-CD	Signal- verstärkung durch α-CD	Gesamte Signal- verstärkung <sup>[b]</sup>
1	0.1	4	10.1	306	30	120
2	0.01	13	3.8	70	18	234
3	0.001	28	1.2	9.6	8	224
4	0.0002	84	1.0	4.2	4	336
5	0	–	0.88	2.7	3	3

[a] F.I. = Fluoreszenzintensität aus Abbildung 2a und b bei 380 nm.

[b] Gesamte Signalverstärkung = Umsatzzahl × Signalverstärkung durch α-CD.

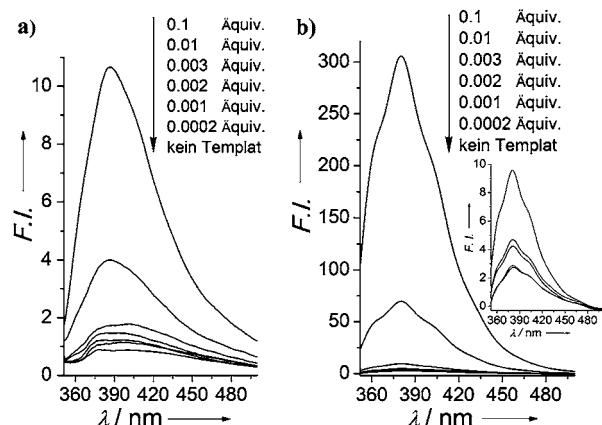
zahl von 84. Die 1.7% des gebildeten Stilbens überstiegen dabei den Hintergrund um das Dreifache.

In einem nächsten Schritt verfolgten wir die Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie. Das durch die templatgesteuerte Reaktion gebildete Stilben-DNA-Konjugat **4** zeigte ein breites Emissionsspektrum, dessen Intensitätsmaximum bei  $\lambda = 380$  nm lag (Abbildung 2a). Die Zugabe von 0.1 Äquiv. Templat führte zur Bildung des Stilbens und damit zu einem 12-fachen Anstieg des Fluoreszenzsignals bei 380 nm. Interessanterweise wurde auch in Gegenwart von nur 0.01 Äquiv. Templat eine gegenüber dem Hintergrund vierfach verstärkte Fluoreszenz beobachtet. Inspiriert durch das Analyt-Rezeptor-Modell für die Signalverstärkung<sup>[7,8]</sup> untersuchten wir den Einfluss des  $\alpha$ -Cyclodextrins (Abbildung

S2–S7). Dieses Wirtmolekül ist in der Lage, das neu gebildete Stilben einzuschließen. Hierdurch werden manche Reaktionspfade, die zu einer Entvölkerung des angeregten Zustands führen (wie z. B. Photoisomerisierung), geschlossen, was eine Intensivierung der Fluoreszenzintensität nach sich zieht.<sup>[7]</sup> So wurde durch die Zugabe von 100 mM  $\alpha$ -Cyclodextrin zu den in Gegenwart von 0.1 Äquiv. Templat gebildeten Reaktionsprodukten eine 30-fach verstärkte Fluoreszenz gegenüber Messungen ohne  $\alpha$ -Cyclodextrin erhalten (vgl. Abbildung 2b und 2a, Eintrag 1 in Tabelle 1).<sup>[9]</sup> Die Intensität war mehr als 100-fach höher als der Hintergrund (= Reaktion in Abwesenheit des Templat, Tabelle 1: vgl. Eintrag 1 mit Eintrag 5). Fand die Reaktion in Gegenwart von 0.01 Äquiv. Templat statt, ergab sich eine 26-fache Signalverstärkung (Tabelle 1: vgl. Eintrag 2 mit Eintrag 5). Im Vergleich dazu lieferten zuvor berichtete templatgesteuerte Staudinger-Reduktionen unter identischen Bedingungen  $\leq$  10-fache Fluoreszenzverstärkungen.<sup>[4e,f]</sup> Bemerkenswerterweise führte die Reaktion in Gegenwart von 0.001 Äquiv. Templat immer noch zu einer 3.5-fachen Verstärkung der Fluoreszenzintensität (Tabelle 1: vgl. Eintrag 3 mit Eintrag 5). Dies ist ein Maß an Empfindlichkeit, über das in templatgesteuerten Fluoreszenzaktivierungsverfahren noch nicht berichtet wurde.<sup>[10]</sup> Unter den gewählten Bedingungen wurde mit den eingesetzten Sonden die Nachweisgrenze bei 0.0002 Äquiv. (40 pm) Templat erreicht.

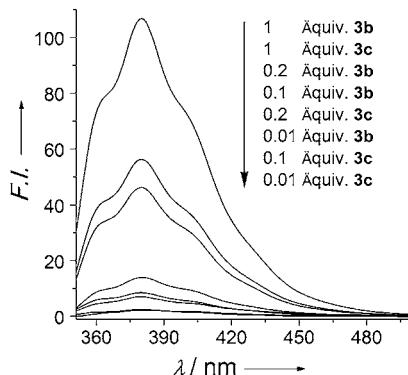
In Tabelle 1 sind die Gesamtverstärkungen aufgeführt, die aus der Kombination zweier verschiedener Verstärkungsmechanismen resultieren. Einerseits ermöglicht die katalytische Wirksamkeit des Templat die Erzeugung vieler Signalmoleküle (Stilbene) pro Templatmolekül. Zum Beispiel liefert die Transferreaktion in Gegenwart von 0.0002 Äquiv. (40 pm) Templat die 84-fache Menge (ca. 3.4 nm) an Signalmolekülen. Dieser Verstärkungsmechanismus wird bei hohen Templat/Sonden-Verhältnissen weniger ausschlaggebend, denn 0.1 Äquiv. (20 nm) Templat führen zu einer nur 4-fach größeren Menge (80 nm) des Stilbens. Andererseits ist die Verstärkung, die durch die Zugabe des  $\alpha$ -Cyclodextrins erreicht wird, bei hohen Templatmengen effektiver als bei niedrigen. So wurde nach Zugabe von  $\alpha$ -Cyclodextrin zu einer Reaktion an 0.1 Äquiv. (20 nm) Templat eine 30-fache Verstärkung der Stilben-Emission gemessen. Demgegenüber wurden für Reaktionen an 0.0002 Äquiv. Templat nur 4-fache Fluoreszenzansteige erhalten. Dies ist plausibel, da eine quantitative Einschließung des Stilbens bei abnehmenden Konzentrationen des Templat und damit des gebildeten Stilbens schwieriger wird. Diese Analyse ergibt zwei Schlussfolgerungen: Erstens haben die beiden Verstärkungsmechanismen gegensätzliche Richtungen, und die resultierende Signalverstärkung in Bezug auf das theoretische Signal ohne Verstärkung/Turnover liegt unabhängig vom verwendeten Sonden/Templat-Verhältnis im Bereich von  $10^2$ . Zweitens sollte die Verwendung von Rezeptoren, die höhere Affinitäten zum gebildeten Stilben haben als  $\alpha$ -Cyclodextrin ( $K_a < 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ),<sup>[11]</sup> noch größere Signalverstärkungen ermöglichen.<sup>[12]</sup>

Nachfolgend untersuchten wir die Sequenzspezifität und analysierten Reaktionen an perfekt komplementärer und einzelbasenfehlpaarer DNA, welche einen Sequenzaus-



**Abbildung 2.** Fluoreszenzspektren nach erfolgter templatgesteuerter Wittig-Reaktion zwischen den Sonden **1b** und **2b** in Gegenwart unterschiedlicher Mengen des Templat **3b** in a) Abwesenheit und b) Anwesenheit von 100 mM  $\alpha$ -Cyclodextrin (nach 30 min Inkubation bei 25 °C). F.I. = Fluoreszenzintensität. Bedingungen: 100 mM Natriumhydrogencarbonat, 1 M NaCl, pH 8.5, 200 nm **1b**, 500 nm **2b**, 60 °C für 24 h,  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  nm. Einstellung: vergrößerte Ansicht.

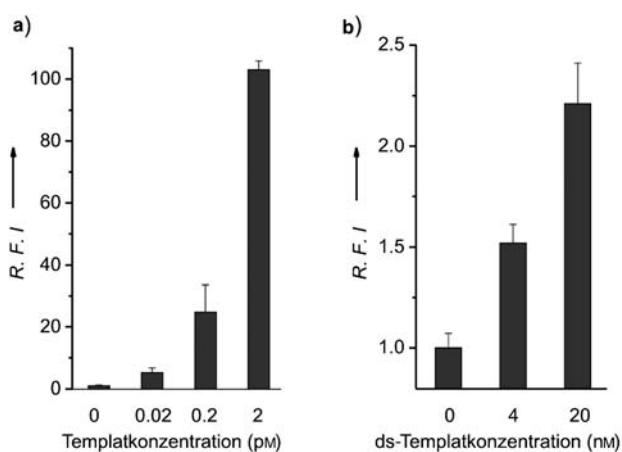
schnitt um die karzinogene G12V-Mutation des *Ras*-Gens umspannte. Es war die Absicht, die Mutante **3b**, nicht aber den Wildtyp **3c** zu detektieren. Aus diesem Grund sind die Substrate **1b/2b** perfekt komplementär zu **3b** und bilden eine Einzelbasenfehlpaarung mit **3c** aus. Die Reaktion erwies sich als sequenzspezifisch. In Gegenwart des perfekt komplementären Templat **3b** wurde ein stärkerer Fluoreszenzanstieg gemessen als in Anwesenheit des einzelbasenfehlpaarenden Templat **3c**. Erwartungsgemäß führten niedrigere Templatmengen zu einer höheren Sequenzspezifität (6-fach)



**Abbildung 3.** Sequenzspezifität der hintergrundbereinigten Fluoreszenz gemessen nach der templatgesteuerten Wittig-Reaktion von **1b** mit **2b** an perfekt komplementärem Templat **3b** oder einzelbasenfehlpaarendem Templat **3c** bei unterschiedlichen Templatmengen. *F.I.* = Fluoreszenzintensität. Bedingungen: 200 nm **1b**, 200 nm **2b**, 100 mM Natriumhydrogencarbonat, 1 M NaCl, pH 8.5, 65 °C (60 °C bei 0.01 Äquiv. Templat), 2 h Reaktionszeit, 30 min Inkubation mit 100 mM  $\alpha$ -Cyclodextrin bei 25 °C.

bei 0.01 Äquiv. Templat und 2-fach bei 1 Äquiv. Templat; Abbildung 3). Dies kann auf den hohen  $T_M$  der 15 nt langen Oligonukleotide und das kleine Temperaturfenster, in dem die Hybridisierung sequenzspezifisch erfolgt (**1b-3b** (perfekt komplementär),  $T_M = 65$  °C; **1b-3c** (einzelbasenfehlgepaart),  $T_M = 61$  °C, gemessen bei 1:1-Stöchiometrie und 0.5  $\mu$ M), zurückgeführt werden. Die Verringerung der Oligonukleotidkonzentrationen wird dieses Fenster zu niedrigeren Temperaturen hin verschieben.

Von mehreren templatgesteuerten fluorogenen Reaktionen wurde berichtet, dass diese auch in komplexen biologischen Umgebungen ablaufen. So wurden beträchtliche Anstrengungen für die Detektion von RNA in Zellen unternommen. Es ist unser langfristiges Ziel, eine chemische Methode für die DNA-Detektion in biologischen Proben zu entwickeln. Allerdings stellt die doppelsträngige Natur der DNA eine enorme Herausforderung für die templatgesteuerte Chemie dar. Wir wählten einen 81 Nukleotide langen DNA-Strang als Templat und nutzten die asymmetrische Polymerasekettenreaktion (PCR), um größtenteils doppelsträngige, aber auch eine kleine Menge einzelsträngiger DNA zu produzieren (Abbildung S10).<sup>[13]</sup> Nach nur 30 Zyklen wurde das PCR-Gemisch mithilfe der templatgesteuerten Wittig-Reaktion analysiert (Abbildung 4a). Die Reaktion verlief trotz der Anwesenheit von Nukleotiden, Oligonukleotiden und Enzymen problemlos. Eine Reaktionszeit von 3 h



**Abbildung 4.** Relative Fluoreszenzintensität (*R.F.I.*) bei 380 nm, bestimmt nach erfolgter Reaktion der Sonden **1b** und **2b** in Gegenwart von a) durch asymmetrische PCR hergestellten DNA-Templaten oder b) 81 bp Doppelstrang-DNA-Templat. Bedingungen: a) 1. 30 Zyklen (95 °C für 10 s; 58 °C für 30 s; 72 °C für 20 s) in Gegenwart unterschiedlicher Templatmengen, 800 nm Vorwärts-Primer, 100 nm Rückwärts-Primer, Taq-DNA-Polymerase (1 u); 2. PCR-Produkt verdünnt (1:3, v/v) mit Puffer (100 mM Natriumhydrogencarbonat, 1 M NaCl, pH 8.5), 200 nm **1b**, 500 nm **2b**, 60 °C, 3 h; 3. 100 mM  $\alpha$ -Cyclodextrin, 25 °C, 30 min. b) 200 nm **1b**, 200 nm **2b**, 400 nm Vorwärts-Primer und Rückwärts-Primer in Puffer, 81 bp Doppelstrang-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen, 3 h Thermozyklierung (95 °C für 10 s; 60 °C für 50 s).

reichte aus, um einen 100-fachen Fluoreszenzanstieg bei 2 pm Startmenge an Templat (gegenüber einer Kontrolle, die kein Templat enthielt) zu erzielen. Die meisten anderen sequenzspezifischen Methoden, die in der PCR-Analyse zum Einsatz kommen, liefern  $\leq 10$ -fache Fluoreszenzanstiege. Bemerkenswert ist der immer noch 5-fache Signalanstieg bei 20 fm Startmenge an Templat.

Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass die DNA-gesteuerte Wittig-Reaktion die Verwendung einer Vielzahl an Puffern toleriert. Auch bei erhöhten Temperaturen blieb der Hintergrund gering. Diese Eigenschaften ermöglichen Anwendungen, bei denen thermisches Denaturieren erforderlich ist, um den Zugang zum Zielsegment zu gewährleisten. Wir verwendeten den 81-meren DNA-Doppelstrang als Templat<sup>[13]</sup> und untersuchten, ob die templatgesteuerte Wittig-Reaktion unter den Bedingungen der Thermozyklierung abläuft. Wir gingen davon aus, dass die reaktiven DNA-Sonden **1b** und **2b** an einzelsträngige Templatsegmente binden würden, die im Zuge der Thermozyklierung zwischen 95 °C (Denaturierung) und 60 °C (Anlagerung → templatgesteuerte Wittig-Reaktion) temporär gebildeten würden. Um die Rückbildung des DNA-Templat-Doppelstrangs zu verlangsamen, wurde ein Überschuss an Oligonukleotidprimern zugegeben.<sup>[14]</sup> In der Tat lieferte die Reaktion, bei der die DNA-Sonden mit 20 nm (0.1 Äquiv.) dsDNA-Templat unter Anwendung der Thermozyklierung (95 °C für 10 s, 60 °C für 50 s) für 3 h inkubiert wurden, einen 2.2-fach höheren Fluoreszenzanstieg als die Reaktion in Abwesenheit des Templat (Abbildung 4b). Dagegen blieb die Reaktion ohne Thermozyklierung aus (Abbildung S11). Dies und eine Positivkontrolle, bei der Einzelstrangtemplat zusätzlich zugeführt

wurde, deutet darauf hin, dass der Templatstrang quantitativ hybridisiert vorlag. Wurden 4 nm (0.02 Äquiv.) dsDNA-Templat verwendet, konnte immer noch ein 50%iger Anstieg der Fluoreszenz registriert werden. Diese Resultate zeigen, dass die DNA-gesteuerte Wittig-Reaktion zu den wenigen fluorogenen chemischen Reaktionen gehört, die eine direkte Analyse von doppelsträngiger DNA gestatten.<sup>[15]</sup> Wir vermuten, dass diese Methode nicht auf eine Analyse purinreicher oder AT-reicher Zielsequenzen beschränkt ist, welche für Reaktionen erforderlich sind, die auf Triplexbildung beruhen.

Das von uns entwickelte konsekutive Signalverstärkungssystem für die DNA-Detektion, das auf dem Aufbau einer Doppelbindung mit anschließender molekularer Erkennung basiert, ist ein konzeptionell neuer Ansatz. Dieses System stellt nach unserem Kenntnisstand die erste DNA-kontrollierte Reaktion dar, bei der eine katalytische De-novo-Synthese eines Fluoreszenzfarbstoffs gelingt. An 0.1 Äquiv. Templat konnten 10<sup>2</sup>-fache Fluoreszenzverstärkungen erzielt werden, was die in fluorogenen Reaktionen üblicherweise erzielten Signalverstärkungen übersteigt.<sup>[16]</sup> Die templatgesteuerte Wittig-Reaktion verläuft mit geringer Hintergrundgeschwindigkeit und ermöglicht das Auslesen der Fluoreszenzsignale binnen Minuten. Ein weiterer Vorteil liegt in der Tolerierung von erhöhten Temperaturen. Wir haben gezeigt, dass dadurch Anwendungen, bei denen thermische Denaturierung zur Entfaltung der Ziel-DNA notwendig ist, erleichtert werden. Der von uns vorgestellte Reaktionsaufbau dürfte nur eine von vielen Möglichkeiten darstellen, eine Signalverstärkung in konsekutiven Reaktionen zu ermöglichen. Wittig- und Horner-Reaktionen können zum Aufbau vieler anderer Fluorophore genutzt werden. Außerdem könnte eine Vielzahl anderer Rezeptoren (z. B. Cucurbiturile, Calixarene, Antikörper) für die anschließende molekulare Erkennung herangezogen werden. Potentielle Anwendungen können auch auf andere Gebiete als die Nukleinsäuredetektion abzielen. So könnten templatgesteuerte Wittig-Reaktionen einen katalytischen Umsatz in der DNA- oder RNA-codierten Synthese von wirkstoffähnlichen Molekülen ermöglichen. In zukünftigen Arbeiten werden wir die Bandbreite des Ansatzes erweitern und andere Aldehyde, Phosphorylide und Rezeptoren untersuchen.

Eingegangen am 15. Dezember 2011

Online veröffentlicht am 22. März 2012

**Stichwörter:** DNA-Detektion · DNA-Templat-Katalyse · Fluoreszenz · Wirt-Gast-Wechselwirkung · Wittig-Reaktion

[1] Übersichtsartikel: a) T. N. Grossmann, A. Strohbach, O. Seitz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2185–2192; b) S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7336–7359; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180–7201; c) X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870; d) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 93–95; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 89–90; e) D. M. Kolpashchikov, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4709–4723; f) J. Scheuermann, D. Neri, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 931–937.

- [2] a) Z. C. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11159–11163; b) J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410–12411; c) I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7849–7856; d) H. Abe, Y. Kondo, H. Jinmei, N. Abe, K. Furukawa, A. Uchiyama, S. Tsuneda, K. Aikawa, I. Matsumoto, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 327–333; e) S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2098–2103; f) A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2880–2884; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2828–2832.
- [3] a) Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2501–2510; b) S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2096–2097; c) H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13980–13986; d) J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751–754; e) C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5495–5499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5369–5373; f) T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596–15597; g) C. Dose, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 65–77; h) T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7228–7231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7119–7122; i) A. Shibata, H. Abe, M. Ito, Y. Kondo, S. Shimizu, K. Aikawa, Y. Ito, *Chem. Commun.* **2009**, 6586–6588; j) D. J. Kleinbaum, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8154–8156; k) D. K. Prusty, A. Herrmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12197–12199; l) S. Dutta, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1243–1245.
- [4] a) J. F. Cai, X. X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324–16325; b) Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822; c) R. M. Franzini, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2981–2988; d) K. Furukawa, H. Abe, J. Wang, M. Uda, H. Koshino, S. Tsuneda, Y. Ito, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 671–677; e) Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492–6497; f) R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16021–16023; g) G. Katarzyna, K. Ioanna, T. Ulrich, N. Winssinger, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1969–1975.
- [5] a) Y. Huang, J. M. Coull, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3238–3239; b) K. Meguelliati, G. Koripelly, S. Ladame, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2798–2802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2738–2742.
- [6] a) Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1874–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1796–1800; b) Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1408–1413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1370–1375.
- [7] a) E. Arunkumar, C. C. Forbes, B. D. Smith, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4051–4059; b) G. L. Duveneck, E. V. Sitzmann, K. B. Eissenthal, N. J. Turro, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 7166–7170; c) C. A. Stanier, M. J. O'Connell, W. Clegg, H. L. Anderson, *Chem. Commun.* **2001**, 493–494; d) J. Terao, A. Tang, J. J. Michels, A. Krivokapic, H. L. Anderson, *Chem. Commun.* **2004**, 56–57.
- [8] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.
- [9] Höhere Signalanstiege wurden erhalten, wenn  $\alpha$ -Cyclodextrin nicht während, sondern erst nach erfolgter DNA-gesteuerter Reaktion zugegeben wurde.
- [10] Zum Vergleich müsste eine fluorogene Hybridisierungssonde eine 2500-fache Fluoreszenzverstärkung bei Bindung an äquimolare Mengen Templat erfahren, um die gleiche Signalverstärkung in Gegenwart von 0.001 Äquiv. Templat zu erreichen.
- [11] a) R. Breslow, N. Greenspoon, T. Guo, R. Zarzycki, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8296–8297; b) P. Suresh, K. Pitchumani, *J. Photochem. Photobiol. A* **2009**, *206*, 40–45.
- [12] Es wurde berichtet, dass Antikörper hohe Bindungsaffinitäten zu Stilbenen aufweisen können und zu Fluoreszenzverstärkung führen: a) A. Simeonov, M. Matsushita, E. A. Juban, E. H. Z. Thompson, T. Z. Hoffman, A. E. Beuscher, M. J. Taylor, P.

- Wirsching, W. Rettig, J. K. McCusker, R. C. Stevens, D. P. Millar, P. G. Schultz, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Science* **2000**, *290*, 307–313; b) F. Tian, E. W. Debler, D. P. Millar, A. A. Deniz, I. A. Wilson, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7927–7929; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7763–7765.
- [13] Eine detaillierte Beschreibung der PCR, der DNA-Sequenz des Templa ts und der Primer befindet sich in den Hintergrundinformationen.
- 
- [14] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9970–9981.
- [15] H. Li, R. M. Franzini, C. Bruner, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2132–2137.
- [16] Kürzlich wurde über eine 10<sup>2</sup>-fache Fluoreszenzverstärkung durch eine templatgesteuerte Staudinger-Reaktion in Gegenwart von 1 Äquiv. Templat berichtet. R. M. Franzini, E. T. Kool, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2168–2175.