

## Allosterische Signalumwandlung

DOI: 10.1002/ange.200504319

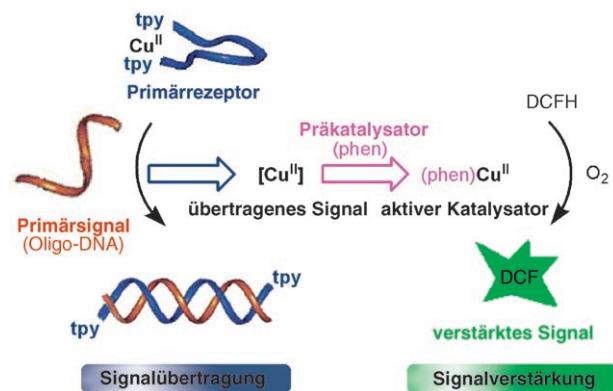
## Eine Metallionen freisetzende Sonde für den DNA-Nachweis durch katalytische Signalverstärkung\*\*

Nora Graf, Mareike Göritz und Roland Krämer\*

Chemische oder physikalische Signale werden in biologischen Systemen sehr effizient verstärkt und über Signalkaskaden, die verschiedene Signaltransduktions- und katalytische Amplifizierungsschritte einschließen, schnell in biochemische Antworten umgewandelt. Die Signalverstärkung durch Katalyse wird für die Entwicklung hoch empfindlicher Analysesysteme genutzt. Viele leistungsfähige Verfahren beruhen auf enzymatischer Verstärkung, z.B. der viel verwendete ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay). Die Entwicklung von Amplifizierungsstrategien, die biologischen Systemen nachempfunden sind, aber chemische Katalysatoren einsetzen, ist ein aufstrebendes Forschungsgebiet.<sup>[1]</sup> Beispielsweise wurde kürzlich ein Chloridsensor beschrieben, bei dem der Analyt als allosterischer Effektor<sup>[2]</sup> wirkt und einen synthetischen Katalysator aktiviert.<sup>[3]</sup> In einem von Anslyn und Mitarbeitern eingeführten Analyseverfahren<sup>[4]</sup> verdrängt das zu detektierende Metallion (Primärsignal) ein anderes Metallion aus einem Makrocyclus. Letzteres (das „umgewandelte“ Signal) assoziiert als Cofaktor mit einem Präkatalysator zum aktiven, signalverstärkenden metallorganischen Katalysator.

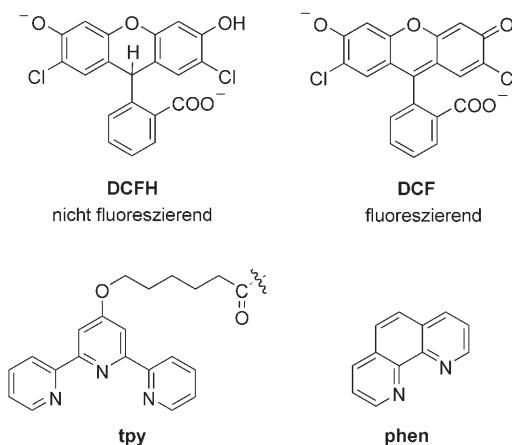
Unser Sensorkonzept beruht auf einer neuartigen allosterischen Umwandlung des Primärsignals (hier ein DNA-Oligonucleotid) in ein Metallionen-Signal (Schema 1). Dieses Ion aktiviert als Cofaktor einen chemischen Redoxkatalysator, der ein nicht fluoreszierendes Substrat in ein fluoreszierendes Produkt umsetzt. Das Verfahren wird dadurch flexibler, dass die Strukturen von Primärsignal und umgewandeltem Signal nicht ähnlich sein müssen. Aktuell besteht großes Interesse am PCR-unabhängigen Nachweis von Nucleinsäuresequenzen durch katalytische Signalverstärkung, wobei Enzym- und Ribozym-Methoden im Vordergrund stehen.<sup>[5]</sup>

Der Primärrezeptor in Schema 1 ist eine an beiden Enden mit 2,2',2"-Terpyridin (tpy) modifizierte 20mer DNA **1**



**Schema 1.** Detektion von DNA **3** (= Primärsignal) durch allosterische Signalumwandlung und katalytische Signalverstärkung durch Bildung des Fluoreszenzfarbstoffs DCF. Die Abkürzungen sind im Text definiert.

(Schema 2). Die Synthese von **1** und der 3'-Mono(tpy)-DNA **2** wurde an anderer Stelle beschrieben.<sup>[6]</sup>



- 1: 5'-tpy(d(ATCGTTACCAAGCATCGT)tpy
- 2: 5'-d(ATCGTTACCAAGCATCGT)tpy
- 3: 5'-d(TACGATGCTTGGTAACGAT)
- 4: 5'-d(TACGATGCTTGGTAATGAT)

**Schema 2.** Strukturen von DCFH, DCF, substituiertem tpy und phen sowie die Basensequenzen der Terpyridin-Oligonucleotid-Konjugate **1** und **2**, der komplementären DNA **3** und der DNA **4** mit Fehlpaarung.

Die Koordination von Kupfer(II) durch beide Terpyridin-Einheiten in **1**-Cu kann über UV-spektrophotometrische Titration, ein charakteristisches EPR-Signal ( $g_{\text{par}} = 2.23$ ,  $A_{\text{par}} = 156$  G) und die Destabilisierung eines Hybrids von **1** mit einem kurzen komplementären DNA-Strang nachgewiesen werden (siehe Hintergrundinformationen). Ein Überschuss an 1,10-Phenanthroline (phen), einem hoch affinen Kupfer(II)-Chelator (Komplexbildungskonstanten:  $\lg K = 9.2^{[7]}$  für (phen)Cu<sup>II</sup>,  $\lg K = 9.1$  für (tpy)Cu<sup>II</sup><sup>[8]</sup>), führt nicht zur Extraktion des Metallions aus **1**-Cu. Die Intensität der UV-Bande bei 320 nm für Kupfer(II)-komplexiertes tpy nimmt jedoch bei der Zugabe komplementärer 20merer DNA **3** zu

[\*] Dipl.-Chem. N. Graf, Dr. M. Göritz, Prof. Dr. R. Krämer  
Anorganisch-Chemisches Institut  
Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 270  
69120 Heidelberg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6221-54-8599  
E-mail: roland.kraemer@urz.uni-heidelberg.de

[\*\*] N. Graf und M. Göritz danken dem Land Baden-Württemberg für finanzielle Unterstützung (Landesgraduiertenstipendien). Beide Autoren haben gleichen Anteil an dieser Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

einer Lösung von **1-Cu**phen spontan ab (siehe Hintergrundinformationen), und nach einer Minute ist keine weitere Veränderung der Absorptionsbande zu beobachten. Offensichtlich macht die Bildung der starren **1:3**-Doppelhelix eine intramolekulare Bis-Chelatisierung unmöglich und destabilisiert dadurch die Wechselwirkung in **1-Cu**.

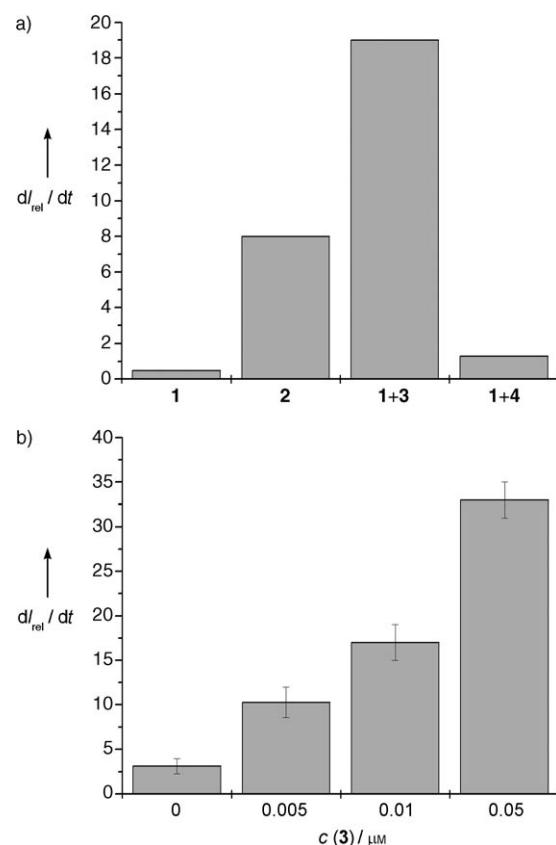
Das katalytische Modul des Nucleinsäure-Detektionsverfahrens besteht aus dem zweizähnigen Chelatliganden und Präkatalysator 1,10-Phenanthrolin (phen), seinem Cofaktor Kupfer(II), dem nicht fluoreszierenden Substrat 2',7'-Dichlordihydrofluorescein (DCFH), Luft als Oxidationsmittel und Cysteamin ( $H_2NCH_2CH_2SH$ ) als reduzierendem Cosubstrat. Ein plausibler Reaktionsweg für die Bildung des fluoreszierenden Produkts 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) sieht die durch (phen)Cu vermittelte Erzeugung von  $H_2O_2$  aus  $O_2$  mit Cysteamin vor, auf die eine durch (phen)Cu katalysierte  $H_2O_2$ -Oxidation von DCFH zu DCF folgt.<sup>[9]</sup> Obwohl bei dieser Reaktion wahrscheinlich auch OH-Radikale und andere reaktive Sauerstoffspezies entstehen,<sup>[10]</sup> konnte bei der HPLC-Analyse keine signifikante Spaltung der Oligo-DNA detektiert werden (siehe Hintergrundinformationen). Unserer Meinung nach wirkt DCFH als Antioxidans und schützt die DNA vor deren Abbau. DCFH wird als fluorige Sonde zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in lebenden Zellen verwendet.<sup>[11]</sup>

Die Entstehung des Produkts DCF wurde anhand des Anstiegs der relativen Fluoreszenzintensität bei 523 nm zeitlich verfolgt ( $dI_{rel}/dt$ ). Das Diagramm in Abbildung 1a verdeutlicht die Sequenzselektivität und das Diagramm in Abbildung 1b die Empfindlichkeit des Verfahrens. Die Konzentrationen der Reagentien wurden im Hinblick auf ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis optimiert.

Während die Oxidation von DCFH durch **1-Cu** in Gegenwart eines Überschusses an phen sehr langsam ist, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit nach Zugabe komplementärer DNA **3** sehr stark zu. Etwa zwei Drittel der Aktivität einer „DNA-freien“ phen/Cu<sup>II</sup>-Lösung wird beobachtet, was auf die Bildung des Katalysators (phen)Cu hindeutet.<sup>[12]</sup> Im Unterschied zu **1-Cu** weist eine **2/Cu/phen**-Mischung auch ohne komplementäre DNA eine erhebliche katalytische Aktivität auf (Abbildung 1a). Dies zeigt, dass das Kupferion aus dem Komplex mit Mono(tpy)-DNA **2** leicht verdrängt werden kann, und bestätigt die erhebliche Stabilisierung von **1-Cu** durch intramolekulare Bis-Chelatisierung. Das Verfahren ermöglicht die Erkennung einzelner Basenfehlpaarungen: Die Geschwindigkeit der DCF-Bildung in Gegenwart der DNA **4** (C/T-Austausch) liegt nur leicht über dem Hintergrund. Bei niedrigen Konzentrationen an **1-Cu** liegt die Nachweisgrenze für komplementäre DNA **3** bei 5 nm (250 fmol; Abbildung 1b).

Nach 12 Stunden Reaktionszeit kann die Fluoreszenz einer **1** und **3** enthaltenden Lösung (Abbildung 1a) mit bloßem Auge beobachtet werden (Abbildung 2). Bezogen auf Kupfer(II) und DNA **3** werden Umsatzzahlen von 20 bzw. 5 erreicht.

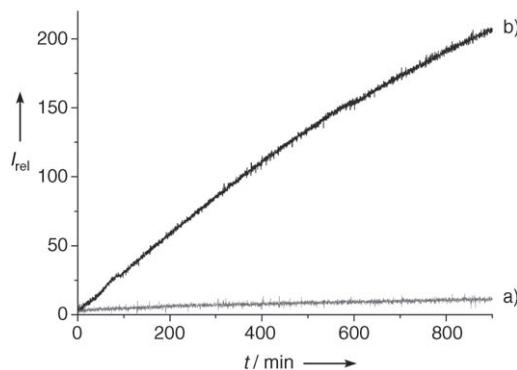
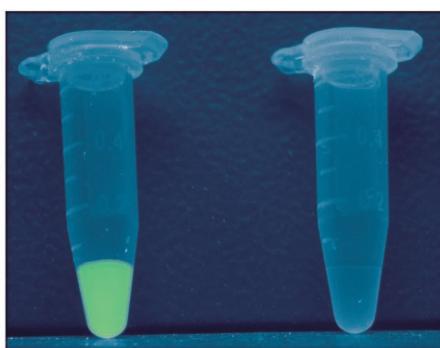
Der beschriebene Prototyp eines neuartigen DNA-Sensors erreicht nicht die niedrigen Nachweisgrenzen einiger bekannter Systeme,<sup>[5a–e]</sup> denn seine Empfindlichkeit ist durch die unkatalysierte Hintergrundoxidation des fluorogenen



**Abbildung 1.** Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung (0–10 min) gegen die Zeit ( $dI_{rel}/dt$ ,  $\lambda_{ex}=503$  nm,  $\lambda_{em}=523$  nm): 25 °C, pH 7 (10 mM MOPS-Puffer), DCFH (10  $\mu$ M), Cysteamin (100  $\mu$ M), NaCl (0.1 M) sowie 5  $\mu$ M phen, 0.5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> und 2  $\mu$ M der angegebenen DNA-Oligonucleotide (a), oder 0.2  $\mu$ M phen, 0.02  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 0.05  $\mu$ M **1** und DNA **3** in variabler Konzentration (b). MOPS = 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure.

Substrats DCFH eingeschränkt. Zudem ist die Signalverstärkung aufgrund der geringen Umsatzgeschwindigkeit ( $2\text{ h}^{-1}$ ) wenig effizient. Um Empfindlichkeit und Signalverstärkung zu erhöhen, muss das katalytische Modul optimiert werden. Eine leichte Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses von 3:1 auf 5:1 bei niedrigen DNA-Konzentrationen wurde durch Austausch des Präkatalysators phen gegen 5-Amino-1,10-phenanthrolin erzielt. Weiterhin untersuchen wir zurzeit alternative chemische und biologische Katalysesysteme, wie die Aktivierung von Apoenzymen durch Metallionen-Cofaktoren.

Wir haben ein chemisches Verfahren für den Nachweis von DNA in Lösung beschrieben, das eine allosterische Signalwandlung mit einem katalytischen Amplifizierungsschritt kombiniert. Das System erinnert an biologische Signalkaskaden wie die Hormonwirkung. Vereinfacht dargestellt, wird dabei das chemische Primärsignal Adrenalin durch einen Membranrezeptor allosterisch umgewandelt, woraufhin ein Rezeptor-assoziiertes G-Protein aktiviert und freigesetzt wird. Dieses bindet an die Adenylatcyclase und aktiviert sie für die katalytische Erzeugung von cAMP aus ATP. Biologische Signalkaskaden können als Vorbilder für künstliche



**Abbildung 2.** Oben: Reaktionslösung aus DNA **1** (rechts) und **1 + 3** (links) nach 12 Stunden unter UV-Licht betrachtet (Bedingungen siehe Abbildung 1a). Unten: Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität mit der Zeit: a) DNA **1**, b) DNA **1 + 3**.

modulare Detektionssysteme dienen, die chemische Signale schnell und effizient verstärken.

Eingegangen am 5. Dezember 2005,  
veränderte Fassung am 24. Februar 2006  
Online veröffentlicht am 9. Mai 2006

**Stichwörter:** Allosterie · DNA · Fluoreszenz · Kupfer · Signalverstärkung

- [1] L. Zhu, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1208–1215; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1190–1196.
- [2] Übersicht zu synthetischen allosterischen Rezeptoren und Katalysatoren: L. Kovbasyuk, R. Krämer, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3161–3187.
- [3] N. C. Gianneschi, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1644–1645.
- [4] Q. Wu, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14682–14683; siehe auch L. Zhu, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7267–7275.
- [5] Enzymatische Verfahren in heterogener Phase: a) F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770–772; b) F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3548–3552; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3398–3402; c) T. Niazov, V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683–1687; d) F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13918–13919; enzymatische Verfahren in homogener Phase: e) A. Saghatelyan, K. M. Guckian, D. A. Thayer, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 344–345; f) V. Pavlov, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J.*

*Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6522–6523; g) P. Simon, C. Dueymes, M. Fontecave, J.-L. Décout, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2824–2827; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2764–2767; Ribozym-Verfahren: h) M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 411–415; i) S. Sando, T. Sasaki, K. Kanatani, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15720–15721; j) J. S. Hartig, I. Gruene, S. H. Najafi-Shoushtari, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 722–723; k) S. Sando, A. Narita, K. Abe, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5300–5301; Katalyse an Nucleinsäure-Templaten: l) Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11159–11163; m) J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410–12411.

- [6] M. Göritz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18016–18017.
- [7] P. Mitchell, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1564–1570.
- [8] A. Odani, H. Masuda, K. Inukai, O. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6294–6300.
- [9] Kupfervermittelte  $H_2O_2$ -Bildung aus  $O_2$  und Cysteamin: T. Kamide, I. Kuniya, T. Segawa, H. Watanabe, *Chem. Lett.* **1992**, 887–890. Kupferkatalysierte Oxidation von DCFH zu DCF in Gegenwart von  $O_2$  und Reduktionsmitteln: D. E. Ryan, J. Holzbecher, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1971**, *1*, 159–160. Beide Reaktionen zeigen eine komplizierte Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Kupferkonzentration. Wir haben beobachtet, dass phen/Kupfer(II) ein viel effizienterer Katalysator für die DCFH-Oxidation ist als freie Kupfer(II)-Ionen.
- [10] D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12269–12272; B. C. Bales, T. Kodama, Y. N. Weledji, M. Pitié, B. Meunier, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5371–5379.
- [11] Siehe zum Beispiel: S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, D. A. Wessels, D. M. Flaherty, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 146–159.
- [12] Zur Vereinfachung bezeichnen wir die aktive Spezies mit (phen)Cu, obwohl zu erwarten ist, dass sowohl (phen)Cu als auch (phen)Cu entstehen und die Oxidation von DCFH katalysieren (siehe Hintergrundinformationen). Die katalytische Aktivität der in situ erzeugten Komplexe  $(tpy)_2Cu$  und  $(tpy)Cu$  ist vernachlässigbar. Eine  $tpy/phen/Cu^{II}$ -Lösung im Verhältnis 1:1:1 zeigte unter den in Abbildung 1a angegebenen Reaktionsbedingungen ohne DNA nur 10% der Aktivität einer phen-Cu-Lösung (1:1).