

- [1] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *113*, 4128–4158.
- [2] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2016.
- [3] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [4] M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1993**, *9*, 3408–3413.
- [5] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1655–1656.
- [6] T. H. Galow, A. K. Boal, V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 576–579.
- [7] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- [8] R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12674–12675.
- [9] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1925–1929; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1808–1812.
- [10] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 32–35.
- [11] W. Stöber, A. Fink, J. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
- [12] L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 4329–4335.
- [13] T. Ung, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Langmuir* **1998**, *14*, 3740–3748.
- [14] F. Caruso, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 11–22.
- [15] P. A. Buining, B. M. Humbel, A. P. Philipse, A. J. Verkleij, *Langmuir* **1997**, *13*, 3921–3926.
- [16] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861–8871.
- [17] S. L. Westcott, S. J. Oldenburg, T. R. Lee, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *300*, 651–655.
- [18] M. Weigele, S. L. DeBernard, J. P. Teng, W. Leimgruber, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5927–5928.
- [19] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, *Science* **1972**, *178*, 871–872.
- [20] K. Hofmann, G. Titus, J. A. Montibeller, F. M. Finn, *Biochemistry* **1982**, *21*, 978–984.
- [21] J. J. Leary, D. J. Brigati, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 4045–4049.
- [22] M. Li, K. K. W. Wong, S. Mann, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23–26.

Ein weiterer Schritt in Richtung Einzelmolekül-Sequenzierung: *Escherichia coli*-Exonuclease III degradiert DNA mit Fluoreszenzmarkierungen an jedem Basenpaar

Susanne Brakmann* und Sylvia Löbermann


Der internationale Wettlauf zur Sequenzierung des menschlichen Genoms sowie der Genome verschiedener Modellorganismen ermutigte Bestrebungen, eine „Sequen-

zierung einzelner Moleküle“ zu realisieren. Diese Idee nährt die Hoffnung, die Sequenzanalyse von Genomen deutlich zu beschleunigen, weil bis zu 50000 bp lange DNA-Fragmente „lesbar“ wären und dadurch die Sequenzinformation schneller zusammengesetzt werden könnte.^[1–5] Die verschiedenen Strategien zur Realisierung der Einzelmolekül-Sequenzierung basieren auf der Tatsache, dass einzelne fluoreszierende Moleküle innerhalb von Millisekunden^[6] identifiziert werden können, und sie kombinieren die sequentielle enzymatische Hydrolyse individueller DNA-Moleküle mit einer sich unmittelbar anschließenden Detektion der freigesetzten Monomere anhand ihrer Fluoreszenzcharakteristika wie Wellenlänge, Fluoreszenzlebensdauer oder einer Kombination beider Eigenschaften.^[5,7]

Zwei ungewöhnliche enzymatische Aktivitäten werden für diese Technik benötigt, erstens die vollständige und sequenz-treue Synthese von DNA-Kopien ausschließlich aus fluoreszenzmarkierten Analoga der vier Nucleobasen (A, G, C und T) sowie zweitens die exonucleolytische Hydrolyse der vollständig markierten DNA. Kürzlich haben wir bereits eine Lösung für das Problem der vollständigen enzymatischen Markierung präsentiert, die durch das Klenow-Fragment (KF) der *E. coli*-DNA-Polymerase I möglich ist: Wir haben dieses Enzym als die erste natürliche Polymerase identifiziert, die auch in alleiniger Gegenwart Rhodamin-markierter Desoxynucleosid-Triphosphate ihre volle Aktivität und Genauigkeit beibehält.^[8] Wir haben ferner gezeigt, dass der vollständige Austausch aller Pyrimidinbasen eines Strangs, d.h. die vollständige Markierung aller Basenpaare, durch ein fluoreszierendes Analogon mit KF in einer so genannten Primer-Verlängerungsreaktion erreicht werden kann.^[9]

Die Tatsache, dass eine natürliche DNA-Polymerase in Gegenwart sperriger, Rhodamin-markierter Substrate voll funktionsfähig ist und darüber hinaus auch das sterisch wie elektronisch anspruchsvolle DNA-Zwischenprodukt weiterverarbeiten kann, ermutigte uns, eine Reihe natürlicher Exonucleasen auf Aktivität gegenüber Substrat-DNA zu untersuchen, deren einer Strang ausschließlich fluoreszenzmarkierte Analoga der Pyrimidinbasen enthielt (fluoreszierende Nucleotide: Tetramethylrhodamin-dUTP und Rhodamine-Green-dCTP). In ersten Experimenten untersuchten wir deshalb die Substratazeptanz durch die Exonuclease des Bakteriophagen λ , Schlangengift-Phosphodiesterase sowie durch zwei DNA-Polymerasen mit bekannter 5'-3'-Exonucleaseaktivität, T7-DNA-Polymerase und KF, und verfolgten deren Reaktionen online in einem Fluorimeter (LS-50; Perkin-Elmer). Da hochgradig Rhodamin-markierte DNA in der Regel nicht mehr fluoresziert (bis auf solche Sequenzen, die homopolymere A:T(bzw. A:U)-Regionen enthalten), erwarteten wir einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität durch exonucleolytisch freigesetzte Nucleotide. Das Fluoreszenzverhalten der Reaktionssysteme änderte sich jedoch in keinem der untersuchten Fälle, eine hydrolytische Reaktion fand also nicht statt. Da hochgradig markierte DNA in wässrigen Lösungen eine starke Tendenz zur Bildung von Aggregaten aufweist, untersuchten wir auch die Zugabe verschiedener organischer Lösungsmittel wie Acetonitril oder DMSO (maximal 10 % v/v). Obwohl bekannt war, dass diese Lösungsmittel die Löslichkeit der markierten DNA deutlich

[*] Dr. S. Brakmann
Angewandte Molekulare Evolution
Institut für Zoologie
Universität Leipzig
Talstraße 33, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-36848
E-mail: sbrakma@rz.uni-leipzig.de
S. Löbermann
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Faßberg, 37077 Göttingen (Deutschland)

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

erhöhen,^[9] hatten sie keinen positiven Einfluss auf die Exonuclease-Reaktionen, vermutlich weil ihr denaturierender oder toxischer Einfluss auf das verwendete Enzym dominierte. Ein wichtiger Hinweis zur Lösung des Problems resultierte aus der Beobachtung, dass ein hohes Ausmaß an Fluoreszenzmarkierung die zumindest partielle Umwandlung der rechtshändigen B-DNA in eine linkshändige Z-DNA nach sich zieht.^[9] Bereits 1976 hatten Ogilvie und Hruska festgestellt, dass Z-DNA, die *syn*-orientierte Nucleoside enthält, von Schlangengift-Phosphodiesterase nicht als Substrat akzeptiert wird.^[10] Wir vermuteten daher, dass dieser Sachverhalt auch für die übrigen bis hierher von uns untersuchten Enzyme galt. In weiteren Experimenten verwendeten wir daher *E. coli*-Exonuclease III, weil dieses Enzym sich im Zusammenhang mit der Suche nach potenziellen Z-DNA-Regionen innerhalb genomischer DNA als nützlich erwiesen hatte.^[11] Tatsächlich beobachteten wir eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Exonuclease III zu einer wässrigen Lösung hochgradig fluoreszenzmarkierter DNA (ohne organische Colösungsmittel). In der Folge testeten wir eine Reihe verschiedener Additive wie Rinderserum-Albumin (BSA), Glycerin, Spermidin, Sarcosin, DMSO oder Triton-X-100, um die Reaktion zu optimieren; keiner dieser Zusätze vermochte jedoch, den Umsatz an Substrat-DNA zu steigern. Allerdings verbessert die Zugabe von maximal 25 % (v/v) 1,4-Dioxan den exonucleolytischen Abbau der markierten DNA drastisch, ohne sich dabei negativ auf die Aktivität des Enzyms auszuwirken.

Da der sequentielle Abbau vollständig Rhodamin-markierter DNA durch Exonuclease III der Schlüssel zu einer künftigen Einzelmolekül-Sequenzierung sein könnte, untersuchten wir die Aktivität dieses Enzyms im Detail. Zu diesem Zweck führten wir kinetische Gleichgewichtszustandsanalysen durch und variierten eine Reihe verschiedener, geschwindigkeitsbestimmender Faktoren wie Enzymkonzentration, Temperatur und Gegenwart des organischen Lösungsmittels. Zum Vergleich untersuchten wir eine Standardreaktion der Exonuclease mit natürlicher DNA gleicher Sequenz, die für die Detektion lediglich 5'-terminal mit Rhodamine-Green markiert war. Mit „quantitativer Fragmentlängenanalyse“ durch ein automatisiertes, fluoreszenzbasiertes Sequenziersystem (ABI 373A) konnten wir nicht nur die Fragmentlängen von Edukt und Produkt(en) relativ zu einem internen Standard, sondern auch deren Fluoreszenzintensitäten (relative Konzentrationen) bestimmen. Die Auswertung der Elektropherogramme lieferte uns einerseits einen Schätzwert für die makroskopischen Hydrolysegeschwindigkeiten in Nucleotiden pro Sekunde, und ermöglichte andererseits die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Reaktion zweiter Ordnung (siehe Hintergrundinformation).

Prozessivität: Der herausragendste Unterschied zwischen dem Abbau natürlicher DNA und vollständig farbstoffmarkierter DNA war bereits bei visueller Auswertung der Elektropherogramme zu erkennen. Wir stellten fest, dass der Abbau der Rhodamin-markierten DNA durch Exonuclease III in Dioxan-haltigen Lösungen zu allen Messzeitpunkten völlig ohne Intermediate erfolgt war (d. h. prozessiv; frühester Meßzeitpunkt = 0.3 min nach Zugabe des Enzyms). Im Falle natürlicher DNA sowie in Abwesenheit von 1,4-

Dioxan konnte dieses Ausmaß an Prozessivität selbst mit einem 280fachen molaren Enzymüberschuss nicht erzielt werden. Stattdessen beobachteten wir – in Übereinstimmung mit bereits früher publizierten Untersuchungen^[12] – das Auftreten zunehmend kürzerer Intermediate mit fortschreitender Reaktionszeit während gleichzeitig die zugehörigen Vorläufer verschwanden (distributiver Reaktionsmodus). Bei diesen Intermediaten handelte es sich stets um mehrere Spezies, die um eine vorherrschende Fragmentlänge herum gruppiert waren.

Die hohe Prozessivität der Exonuclease III in Gegenwart Rhodamin-markierter DNA ist vermutlich auf die – im Vergleich zur „natürlichen Reaktion“ – unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zurückzuführen: Die geringe Verfügbarkeit des DNA-Substrats in der wässrigen Phase macht die Zugabe des lösungsvermittelnden 1,4-Dioxan unumgänglich. Eine Assoziation zwischen Enzym und Substrat zum aktiven Komplex erfolgt deshalb möglicherweise innerhalb von „Lösungsmittelkäfigen“, in denen die Reaktion zum Produkt komplett abläuft, ehe Enzym und Substrat wieder dissoziieren.

Makroskopische Hydrolysegeschwindigkeit: In Gegenwart des organischen Colösungsmittels 1,4-Dioxan zeigte sich die Aktivität von Exonuclease III gegenüber fluoreszenzmarkierter DNA unabhängig von der Enzymkonzentration und der Temperatur. Da keine Intermediate vorhanden waren und die Elektropherogramme der zu verschiedenen Messzeitpunkten genommenen Proben lediglich im Verhältnis zwischen Edukt und Produkt differierten, wurde die Hydrolysegeschwindigkeit als maximal angenommen. Aufgrund dieser Annahme betrug die Abbaugeschwindigkeit 16.5 Nucleotide pro Sekunde (nts^{-1}). Intermediate des Abbaus von farbstoffmarkierter und von natürlicher DNA traten hingegen auf, wenn kein Dioxan zugesetzt worden war. In diesen Fällen erreichte die Hydrolysegeschwindigkeit $\approx 4 \text{ nts}^{-1}$ für natürliche DNA (dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten von $\approx 5 \text{ nts}^{-1}$ bei 37°C),^[12,13] und sank auf ungefähr 1 nts^{-1} mit farbstoffmarkierter DNA.

Deutlich sichtbar wurde der Umsatz von Substrat-DNA zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Produkt sowohl von der Enzymkonzentration als auch von der Temperatur beeinflusst. Diese Beobachtung reflektiert erstens, dass eine Erhöhung der Temperatur die Löslichkeit der Substrat-DNA verbessert und zweitens eine erhöhte Enzymkonzentration die Wahrscheinlichkeit für die Assoziation von Enzym und Substrat erhöht (Tabelle 1). Es sollte erwähnt werden, dass die Aktivität von Exonuclease III unter natürlichen Bedingungen stark von der Reaktionstemperatur abhängt (eine Verdopplung der Geschwindigkeit erfolgt alle 6°C zwischen 22 und 46°C).^[12]

Bezüglich unseres Ziels, die biochemischen Voraussetzungen für eine Sequenzierung einzelner DNA-Moleküle zu untersuchen, können wir nun den Schluss ziehen, die Grundlagen dafür geschaffen zu haben: Obwohl es höchstwahrscheinlich nötig sein wird, alle vier Basen eines DNA-Strangs mit einer Fluoreszenzmarkierung zu versehen und diesen Strang dann exonucleolytisch abzubauen, könnte es im Prinzip genügen, nur zwei Nucleotide zu markieren und das Experiment in allen möglichen Permutationen zu wieder-

Tabelle 1. Durch visuelle Auswertung der Elektropherogramme erhaltene Werte für die makroskopische Geschwindigkeit der Hydrolyse, \bar{v} , und die Prozessivität der Exonuclease III.^[a]

Nr.	DNA-Markierung	[E ₀] [U]	T [°C]	1,4-Dioxan	Umsatz [%]	t [min]	\bar{v} [nts ⁻¹]	Prozessivität
1	TMR, RG	5	37	+	26	0.3	16.5	+
2	TMR, RG	50	37	+	72	0.3	16.5	+
3	TMR, RG	250	37	+	67	0.3	16.5	+
4	TMR, RG	50	10	+	38	0.3	16.5	+
5	TMR, RG	50	20	+	68	0.3	16.5	+
6	TMR, RG	50	37	+	72	0.3	16.5	+
7	TMR, RG	25	20	+	56	0.3	16.5	+
8	TMR, RG	25	20	–	15	5.0	1.1	–
9	keine ^[b]	25	20	–	98	0.2	4.1	–

[a] TMR = Tetramethylrhodamin; RG = Rhodamine-Green. [b] 5'-Terminale RG-Markierung.

holen.^[7,14] Dieser „minimale“ oder Zweifarben-Ansatz könnte nun basierend auf unseren Ergebnissen verfolgt werden, da wir einerseits gezeigt haben, dass DNA bei vollständiger Substitution der Pyrimidin-Nucleotide durch ihre fluoreszierenden Analoga sequenzgetreu kopiert werden kann, und andererseits diese Heteroduplex-DNA als Substrat für den sequentiellen hydrolytischen Abbau durch *E.-coli*-Exonuclease III fungiert – sofern 1,4-Dioxan zugegeben wird. Dieses Lösungsmittel erhöht nicht nur die Löslichkeit der markierten DNA, sondern ändert auch das mikroskopische Verhalten des Enzyms vom distributiven zum hochgradig prozessiven Modus. Daher sind wir zuversichtlich, dass das Konzept der Einzelmolekül-Sequenzierung jetzt realisiert und reproduzierbar etabliert werden kann.

Experimentelles

Kinetische Gleichgewichtszustandsanalyse: 40 fmol dsDNA-Substrat mit einem vollständig durch Rhodamin-markierte Pyrimidin-Analoga modifizierten Strang (ca. 370 bp; Fragment der codierenden Sequenz der Reversen Transkriptase von HIV) wurden in 75 μ L Reaktionspuffer, bestehend aus 66 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.66 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol (DTT), 0.5 mgmL⁻¹ BSA und 25 % (v/v) 1,4-Dioxan, gelöst. Der exonucleolytische Abbau wurde durch Zugabe von 2 μ L Exonuclease III gestartet (jeweils Verdünnungen, die die in Tabelle 1 angegebenen Mengen an Enzym in Units enthielten; United States Biochemicals). Die Reaktion wurde bei 20 °C inkubiert. Proben (7 μ L) wurden unmittelbar vor Zugabe des Enzyms (0 min) sowie nach 0.2, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min genommen, die dann mit 1 μ L 0.5 M EDTA versetzt wurden, um die Reaktion zu beenden. Nach der sich anschließenden Lyophilisierung wurden die Proben in 4 μ L Ladepuffer (Formamid/25 mM EDTA = 5:1 (v/v) mit 50 mgmL⁻¹ Dextranblau) aufgenommen, mit 1 μ L internem Fragmentlängen-Standard ROX-1000 (Applied Biosystems) versetzt und in Sequenziergelen (6 % Polyacrylamid, 8.3 M Harnstoff) mithilfe des automatischen Systems ABI 373A analysiert. Fragmentlängen und relative Konzentrationen wurden mit der Software GeneScan 672 (ABI) bestimmt.

Eingegangen am 17. April 2002 [Z19105]

- [7] K. Dörre, S. Brakmann, M. Brinkmeier, K.-T. Han, K. Riebesel, P. Schwill, J. Stephan, T. Wetz, M. Lapczyn, M. Stuke, R. Bader, M. Hinz, H. Seliger, J. Holm, M. Eigen, R. Rigler, *Bioimaging* **1997**, 5, 139–152.
- [8] S. Brakmann, P. Nieckchen, *ChemBioChem* **2001**, 2, 773–777.
- [9] S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1473–1476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1427–1429.
- [10] K. K. Ogilvie, F. H. Hruska, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 68, 375–378.
- [11] J. D. Hoheisel, F. M. Pohl, *J. Mol. Biol.* **1987**, 193, 447–464.
- [12] J. D. Hoheisel, *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 238–246.
- [13] R. L. Affeck, J. N. Demas, P. M. Goodwin, J. H. Jett, R. A. Keller, J. C. Martin, J. A. Schecker, D. J. Semin, M. Wu in Human Genome Program Contractor-Grantee Workshop V, Human Genome Program, US Department of Energy, **1996**.
- [14] J. H. Jett, R. A. Keller, J. C. Martin, R. G. Posner, B. L. Marrone, M. L. Hammond, D. J. Simpson, Method for rapid base sequencing in DNA and RNA with two base labeling, USA 5405747, **1995**.

¹[HgGe₉]²⁻ – Ein durch Heteroatome kovalent verknüpftes Polymer mit Zintl-Ionen als Bausteinen**

Anke Nienhaus, Ralf Hauptmann und
Thomas F. Fässler*

Professor Gottfried Huttner zum 65. Geburtstag gewidmet

Homoatomare Elementpolyeder des Typs E_n^{x-} (E = Element der Gruppe 14) sind aussichtsreiche Kandidaten für den Aufbau komplexer Strukturen mit interessanten elektronischen Eigenschaften. Die E_n-Polyeder sind mit unterschiedlicher Elektronenzahl stabil und können daher als Elektronenreservoir dienen, was bei geeigneter Kupplung der Cluster zu ungewöhnlichen Eigenschaften führt. Besonders eindrucksvoll ist dies bei Alkalimetallfullerid-Phasen belegt,

- [1] D. C. Nguyen, R. A. Keller, J. H. Jett, J. C. Martin, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2158–2161.
- [2] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, M. E. Johnson, J. C. Martin, B. L. Marrone, J. A. Schecker, C. W. Wilkerson, R. A. Keller, *Ber. Bunsen-Ges.* **1993**, 97, 1535–1542.
- [3] M. Eigen, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5740–5747.
- [4] R. F. Service, *Science* **1999**, 283, 1669.
- [5] J. Stephan, K. Dörre, S. Brakmann, T. Winkler, T. Wetz, M. Lapczyn, M. Stuke, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Földes-Papp, R. Rigler, M. Eigen, *J. Biotechnol.* **2001**, 86, 255–267.
- [6] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **1993**, 22, 169–175.

[*] Prof. Dr. T. F. Fässler, A. Nienhaus, Dr. R. Hauptmann
Technische Universität Darmstadt
Eduard-Zintl-Institut
Petersenstraße 18–20, 64287 Darmstadt (Deutschland)
Fax: (+49) 6151-16-6029
E-mail: faessler@ac.chemie.tu-darmstadt.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP 1072) gefördert. Wir danken Herrn Dr. Cordier für die Unterstützung bei der Datensammlung für die Strukturanalyse und Herrn Dr. Eichel für die Aufnahme von ESR-Spektren.