

Autoren, die eine „Zuschrift“ veröffentlichen wollen, sollten vor der Abfassung ihres Manuskripts unbedingt die „Hinweise für Autoren“ lesen, die jeweils im Januarheft eines Jahrgangs nach dem Inhaltsverzeichnis gedruckt sind; auf Anforderung können sie auch von der Redaktion erhalten werden.

Dreidimensionale Abbildung der DNA-Superspiralisierung durch Rasterkraftmikroskopie **

Von Bruno Samori*, Carmelo Nigro, Valerio Armentano, Salvatore Cimieri, Giampaolo Zuccheri und Carla Quagliariello

Die Rasterkraftmikroskopie (Scanning Force Microscopy, SFM) findet immer häufiger in der Organischen^[1] und Biologischen Chemie^[2, 3] Verwendung. Die SFM ist eine Abbildungstechnik, die es ermöglicht, Moleküle in Wasser^[4] und in organischen Lösungsmitteln^[2, 5, 6] „sichtbar“ zu machen. Auch wenn sich diese Technik noch in der Entwicklung befindet, so gibt es doch keinen Zweifel über die große Bedeutung, die sie beim Studium von Struktur und Verhalten von Molekülen haben wird.

In nahezu allen Organismen ist der DNA-Doppelstrang rechtshändig spiralisiert, und man spricht von negativer Superspiralisierung (negative supercoiling)^[7]. Superspiralisierte und entspannte zirkuläre DNA-Moleküle werden heute routinemäßig mit der SFM abgebildet^[2, 4, 6]. Den SFM-Auf-

nahmen von superspiralisierten zirkulären DNA-Molekülen konnte bisher aber nur die planare Projektion der molekularen Gestalt entnommen werden^[2, 4, 5], wie sie auch die Elektronenmikroskopie (EM) liefert. Die Aufnahmen enthalten jedoch auch Informationen über die dritte Dimension der untersuchten DNA-Moleküle, auch wenn die bislang erreichte vertikale Auflösung nicht hoch genug war, den kompletten dreidimensionalen Verlauf der Ketten direkt darzustellen. Die Aufnahmen in Abbildung 1 zeigen jedoch, daß auch dies nun möglich ist.

Deutlich zu erkennen sind Zahl (zwei) und Rechtshändigkeit der Windungen der DNA-Molekülkette um die superhelicale Achse. Wir können somit die Superspiralisierung des Moleküls vollständig und direkt charakterisieren – wir „sehen“ sie gleichsam. Bis jetzt haben wir solche hohen Auflösungen nur bei Molekülen mit zwei oder drei Windungen erzielt^[8]. In den anderen Fällen kann eine stratigraphische Analyse durchgeführt werden^[6]. Mit deren Hilfe lassen sich aus den SFM-Aufnahmen oft die Informationen über die dritte Dimension gewinnen und die Chiralität der Superspiralisierung für die meisten der gut erkennbaren Schleifen bestimmen.

Die Darstellung des kompletten dreidimensionalen Achsenverlaufs des DNA-Doppelstrangs eröffnet nun mehrere interessante Möglichkeiten:

1. Lokale Veränderungen der Superspiralisierung, die viele wichtige biologische Vorgänge durch DNA-Transkription^[9, 10] oder -Polymorphismus^[11] erleichtern oder steuern, können nun in gezielten Experimenten direkt verfolgt werden. Superspiralisierung stabilisiert H-Tripelhelices sowie Kreuz- und linkshändige Z-DNA-Strukturen^[11]. Die Umwandlung von negativer zu positiver Superspiralisierung etwa ist charakteristisch für hoch transkribierte Gene^[10]. Die Veränderungen der Superspiralisierung hängen von lo-

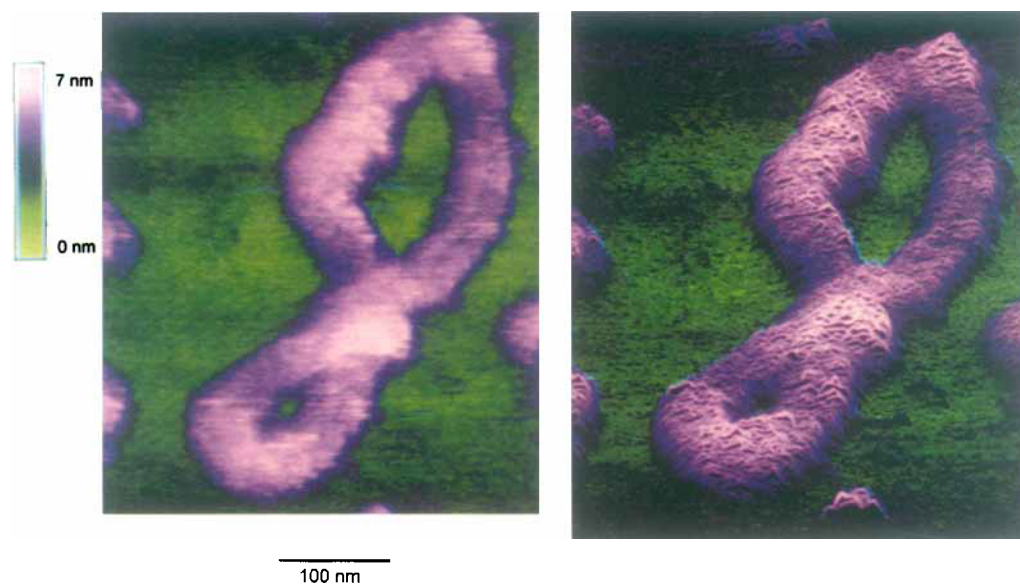


Abb. 1. SFM-Aufnahme eines superspiralisierten pBR322-DNA-Moleküls. Die dreidimensionale Struktur eines zirkulären DNA-Moleküls ist in der ungefilterten Aufsicht (links) gut zu erkennen. Die Höheninformation ergibt sich aus den Violettabstufungen (je heller, desto höher). In der Liendarstellung (rechts), die durch Plotten jeder Scanlinie auf eine x, y, z-Skala erhalten wird, ist der DNA-Doppelstrang noch deutlicher. Die beiden Windungen der DNA-Kette um die superhelicale Achse sowie die Rechtshändigkeit der Superspiralisierung können direkt abgelesen werden.

[*] Prof. B. Samori, Dr. C. Nigro, V. Armentano, S. Cimieri, G. Zuccheri
Dipartimento di Chimica, Università della Calabria
Arcavacata di Rende (CS) I-87030 (Italien)
Telefax: Int. + 984/492044

Prof. C. Quagliariello
Dipartimento di Biologia Cellulare, Università della Calabria (Italien)

[**] Diese Arbeit wurde vom CNR (Rom), Progetto Finalizzato Biotecnologie Biostrumentazione, der Regione Emilia Romagna und der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, Kalifornien) gefördert.

kalen Sequenzen, von den Positionen von Promotoren und von der Bewegung makromolekularer Komplexe an der DNA entlang ab^[9–12].

2. Die Anzahl der Windungen spiralisierter DNA-Moleküle (Windungszahl W)^[7, 13], der einzige umfassende und genaueste Parameter zur Beschreibung der Superspiralisierung sowie der hydrodynamischen Gestalt von DNA-Molekülen, kann jetzt experimentell bestimmt werden. Bisher

wird zur Beschreibung der Superspiralisierung am häufigsten das „Linking-Defizit“ ($\Delta L_k = L_k - L_{k0}$) verwendet. Die Differenz reduziert die dreidimensionale Spiralisierung der DNA-Stränge auf eine einzige Zahl, die mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese bestimmt werden kann. Die Verwindungszahl (linking number) L_k ist die Summe von vorzeichenbehafteten Indices, die die Überkreuzungen sowohl der beiden DNA-Stränge als auch der DNA-Achse kennzeichnen^[13]. Diese Knoten entstehen entweder als Windungen der DNA-Stränge um die DNA-Achse (Twistzahl T_w) oder als Windungen der Superhelix selbst (W). Die Bezugsgröße L_{k0} ist die Verwindungszahl des entspannten zirkulären DNA-Moleküls. Aus zwei Gründen eignet sich das Linking-Defizit nur schlecht zur Beschreibung der Superspiralisierung. Zum einen ist sie eine rein topologische Größe, die von der DNA-Geometrie unabhängig ist. Superspiralisierung ist jedoch ein geometrischer Vorgang. Zum anderen ist es formal möglich, für ein perfekt planares Molekül eine Differenz ΔL_k von ungleich Null zu erhalten^[13].

Im Gegensatz dazu ist W tatsächlich eine geometrische Eigenschaft der DNA-Achse. W ist direkt proportional zur Anzahl der Windungen des DNA-Moleküls um die superhelicale Achse und somit null für relaxierte DNA. Die Verwendung von W anstelle von ΔL_k war bisher jedoch dadurch eingeschränkt, daß W experimentell nicht zugänglich war. W wurde stattdessen unter der Annahme einer modellhaften, idealen Superspiralisierung indirekt aus den Geometriedaten von EM-Aufnahmen berechnet^[14]. Die Auflösung der SFM-Aufnahme in Abbildung 1 läßt nun jedoch die direkte Bestimmung von W als das Gauß-Integral über den kompletten dreidimensionalen Kettenverlauf zu^[13]. In solchen einfachen Fällen wie hier ist sogar die direkte Abschätzung von W aus den Aufnahmen möglich. Die Anzahl der planaren Schleifen im vorliegenden Fall, wo das Molekül auf Muskovit (Glimmer) liegt, ist null. Aufgrund der festen Verdrillung der Kette in der Mitte beträgt die Anzahl der negativen Kreuzungen^[7] in fast allen Projektionen zwei. Die Anzahl der Windungen der Superhelix für das Molekül in Abbildung 1 ist also sehr nahe -2 .

3. Die Aufteilung von ΔL_k zwischen Veränderungen der Superspiralisierung (W) und der in der Spiralisierung der beiden DNA-Stränge (T_w) kann nunmehr ebenfalls experimentell bestimmt werden. Die Messung von W in Plasmidproben mit bekanntem ΔL_k ergibt ΔT_w .

4. Die SFM sollte auch das Studium der räumlichen Architektur, der Windungen und Spiralisierungen anderer Polymere als DNA ermöglichen.

Zusammengefaßt betrachtet zeigen SFM-Aufnahmen wie die in Abbildung 1, daß es heute möglich ist, lokale Veränderungen der Superspiralisierung von einzelnen DNA-Molekülen direkt zu verfolgen und ihre Topologie vollständig zu charakterisieren.

Experimentelles

10 µL einer 10 µg/mL-Lösung von pBR322-Plasmid-DNA in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) wurden auf frisch gespaltenen Muskovit (Glimmer) gegeben. Nach 2 min wurde die überschüssige Lösung mit einem Filterpapier entfernt. Die Probe wurde anschließend sofort mit 15 µL Wasser gespült und dann mit Stickstoff 5 min getrocknet. Die SFM-Aufnahmen der Probe wurden unter 1-Propanol mit dem NANOSCOPE III AFM (Digital Instruments) aufgenommen. Als Spitzen wurden „Nanosonden“ aus Siliciumnitrid (Digital Instruments) verwendet. Die pBR322-Plasmid-DNA wurde aus transformierten DH5-E.-coli-Zellen erhalten. Die Plasmidreinigung erfolgte im großen Maßstab durch Thermolyse und zweifache Dichtegradientenzentrifugation mit Ethidiumbromid/CsCl bis zum Gleichgewicht [15]. Die Probe ergab bei Agarosegel-Elektrophorese drei Banden: die schnellste rührte von superspiralisierter DNA her, die zweite von unterbrochener und entspannter DNA und die langsamste von hochmolekularer DNA.

Eingegangen am 29. März 1993 [Z 5957]

- [1] J. Frommer, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1325–1357; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1298–1328.
- [2] H. G. Hansma, J. Vesenska, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, P. K. Hansma, *Science* **1992**, *256*, 1180–1184.
- [3] A. Engel, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 79–108.
- [4] H. G. Hansma, M. Bezanilla, F. Zenhausern, M. Adrian, R. L. Sinsheimer, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 505–512.
- [5] F. Zenhausern, M. Adrian, B. ten Heggeler-Bordier, R. Emch, M. Jobin, M. Taborelli, P. Descouts, *J. Struct. Biol.* **1992**, *108*, 69–73.
- [6] B. Samori, G. Siligardi, C. Quagliarillo, A. L. Weisenhorn, J. Vesenska, C. J. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3598–3601.
- [7] W. R. Bauer, F. H. C. Crick, J. H. White, *Sci. Am.* **1980**, *243*, 100–113.
- [8] Die dreidimensionale Auflösung über den ganzen Verlauf der sehr fest ineinander verwundenen Ketten schien mit den kommerziell erhältlichen Spitzen, die wir ausprobierten, kaum möglich. Das liegt wahrscheinlich an der gleichzeitigen Abnahme des Radius der Superhelix bei Zunahme der Superspiralisierung [14] und an Form und Profil der Spitze. Tatsächlich hängt die horizontale Auflösung in SFM-Aufnahmen vom Endradius der Spitzenkrümmung ab (M. J. Allen, N. V. Hud, M. Balooch, R. J. Tench, W. J. Siekhaus, R. Balhorn, *Ultramicroscopy* **1992**, *42–44*, 1095; J. Vesenska, M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delaine, C. Bustamante, *ibid.* **1992**, *42–44*, 1243), wogegen die vertikale Auflösung, also die Frage, wie gut Steilheit herauskommt, vom Öffnungswinkel der Spitze bestimmt wird (D. Keller, D. Deputy, A. Alduino, K. Luo, *Ultramicroscopy* **1992**, *42–44*, 1481). Das Profil einer Kettenkreuzung kann damit nur dann dreidimensional aufgelöst werden, wenn sein Öffnungswinkel größer als der der Spitze ist. Die ungewöhnlich breite und doppelstürige DNA-Kette in Abbildung 1 läßt darauf schließen, daß diese SFM-Aufnahme mit einer Sonde mit zwei sehr scharfen und eng zusammenliegenden Spitzen aufgenommen wurden. Unter diesen Bedingungen ist die vertikale Auflösung häufig ungewöhnlich hoch, was auch die Abbildung von geraden DNA-Stücken ermöglicht.
- [9] L. F. Liu, J. C. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7024–7027.
- [10] M. S. Lee, T. W. Garrard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9675–9679.
- [11] M. D. Frank-Kamenetskii in *DNA Topology and its Biological Effects* (Hrsg.: N. R. Cozzarelli, J. C. Wang), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1990**, S. 185–215.
- [12] H. Zhang, C. B. Jessee, L. F. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9078–9082.
- [13] N. R. Cozzarelli, T. C. Boles, J. H. White in *DNA Topology and its Biological Effects* (Hrsg.: N. R. Cozzarelli, J. C. Wang), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1990**, S. 139–184.
- [14] T. C. Boles, J. H. White, N. R. Cozzarelli, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 931–951.
- [15] E. F. Fritsch, J. Sambrook, T. Maniatis, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1989**, Bd. 1, S. 34–35 und 42–43.

Die Struktur eines eindimensional unendlichen doppelhelicalen Kupfer(I)-Komplexes **

Von Riccardo F. Carina, Gérald Bernardinelli und Alan F. Williams*

Professor Erwin Parthé zum 65. Geburtstag gewidmet

Die supramolekulare Chemie – die Chemie komplexer Strukturen, die durch Assoziation einfacher molekularer Bausteine entstehen – ist derzeit von großem Interesse^[1]. In der supramolekularen Komplexchemie bauen sich die Strukturen aus passend strukturierten Liganden und Metall-Ionen auf. Die Zusammensetzung supramolekularer Komplexe wird durch die Anordnung der Bindungsstellen in den Liganden und durch die Stereochemie des Metall-Ions kontrol-

[*] Dr. A. F. Williams, Dr. R. F. Carina
Département de Chimie Minérale Analytique et Appliquée
Université de Genève
30 quai Ernets Ansermet, CH-1211 Genève 4 (Schweiz)
Telefax: Int. + 22/329-6102

Dr. G. Bernardinelli
Laboratoire de Cristallographie aux Rayons-X
Université de Genève
CH-1211 Genève 4 (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Nr. 20.30129.90) unterstützt.