

„Einfangen“ und Abbilden molekularer Dynamik durch Kombination von Rasterkraftmikroskopie und topologischen Einschränkungen**

Bruno Samori*, Carmelo Nigro, Amalia Gordano, Innocenzo Muzzalupo und Carla Quagliariello

Rasterkraftmikroskopie (Scanning Force Microscopy, SFM) ermöglicht es, Moleküle abzubilden, die fest an flache Substrate wie Muskovit (Glimmer), Gold oder Glas adsorbiert sind^[1, 2]. SFM-Abbildungen enthalten Informationen über die Oberflächenhöhe der untersuchten Moleküle. Damit konnten die Chiralität von nativer superspiralierter DNA^[3, 4] und von F-Aktin^[5] direkt untersucht und identifiziert sowie die dreidimensionale Struktur von Chromatinfasern aufgeklärt werden^[6].

Die Forschung mit SFM verlagert sich nun von der Visualisierung statischer Strukturen hin zu Untersuchungen chemischer Prozesse, bei denen diese Technik angewendet werden soll, um die Dynamik und die Reaktionen von Molekülen zu erforschen, die locker an das Substrat gebunden sind^[2, 7, 8]. Lineare, locker an Muskovit adsorbierte DNA-Fragmente wurden kürzlich in wäßriger Pufferlösung abgebildet; ihre Dynamik wurde innerhalb des zeitlichen Auflösungsvermögens von SFM, das bei ca. 1 min pro Bild liegt, beobachtet^[7, 8]. Allerdings könnte bei dieser Art von Experiment, wie bereits angemerkt^[8], die Bewegung der abtastenden Proben spitze dann mit zur Molekülbewegung beitragen, wenn sehr locker gebundene Moleküle untersucht werden. Außerdem könnte der „Geist des Unbestimmtheitprinzips“ in diesem Experiment walten. Gemäß der klassischen Heisenbergschen Unschärferelation könnte die Wechselwirkung zwischen dem Meßinstrument und dem Untersuchungsobjekt im Vergleich mit der zu bestimmenden Größe nicht vernachlässigbar klein sein.

Wir entwarfen ein Experiment, in dem feine Vibrationsbewegungen, die im Anschluß an die vorübergehende und teilweise Ablösung von Muskovit-gebundenen DNA-Kettenfragmenten erfolgen, durch Kombination von Rasterkraftmikroskopie und topologischen Einschränkungen „eingefangen“ und nachgewiesen wurden. Statt die Moleküle kontinuierlich abzubilden und dabei zu versuchen, die gerade ablaufenden Diffusionsprozesse zu verfolgen, zeichneten wir diese Prozesse auf, indem wir

sie durch topologische Einschränkungen „eingefangen“ und jeweils kurz vor und nach ihrem Ablauf abbildeten.

Superspiralisierte pBR322-DNA-Plasmide wurden aus einer Pufferlösung, die 10 mM Mg²⁺-Ionen enthielt, welche Querbrücken zwischen Muskovit und den Phosphateinheiten der DNA induzieren, auf Muskovit aufgebracht^[9]. Die Probe wurde durch Überblasen von Stickstoff getrocknet, mit UV-Licht bestrahlt, um Einzelstrangbrüche zu erzeugen, und unterschiedlich lang in Wasser getaucht, bevor sie wiederum getrocknet und an Luft im „Tapping“-Modus abgebildet wurde. Abbildung 1 zeigt, daß die Moleküle mit wachsender Eintauchzeit allmählich eine offenere Gestalt annehmen.

In Kontrollexperimenten mit unbestrahlten Proben behalten die Moleküle ihre enge Superspiralisierung sogar nach 12 h Eintauchen. Wie die SFM-Aufnahmen in den Abbildungen 1 und 2

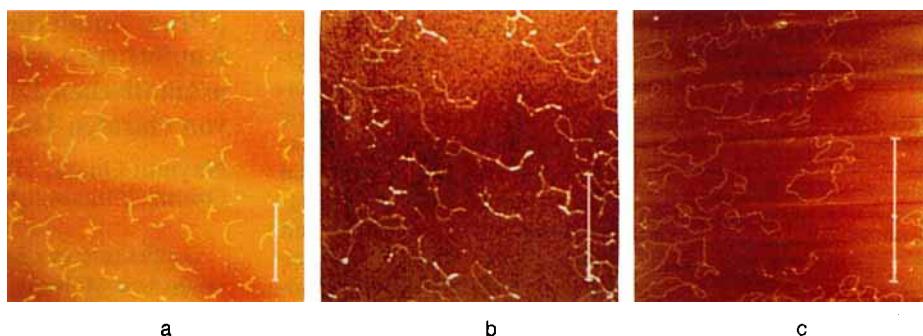


Abb. 1. a) SFM-Überblicksaufnahme: eng superspiralisierte circuläre DNA-Moleküle, verzweigt oder unverzweigt, die auf Muskovit (Glimmer) aufgebracht und getrocknet wurden. b), c) Wenn die Probe in Wasser getaucht wird, werden die Adsorptionskräfte allmählich schwächer. Die Bilder b) und c) wurden nach 60 min bzw. 12 h Eintauchen erhalten. Die Balken entsprechen 1 μm .

zeigen, erzeugt die Öffnung der Moleküle mit Einzelstrangbrüchen Strukturen mit offenen Schleifen, die lokal begrenzt und allmählich auf Kosten anderer Segmente, die noch immer sehr eng superspiralisiert sind, expandieren.

Die Ketten superspiralierter circulärer DNA-Moleküle stehen unter permanenter Torsionsspannung, weil ihnen im Vergleich zu linearen, gleich langen DNA-Molekülen Helixwindungen fehlen und weil sie wegen der ungebrochenen Schleifenbildung ihrer zwei Polynukleotidstränge topologisch eingeschränkt sind^[10]. Diese Einschränkung wird nur aufgehoben – und die Moleküle können sich nur dann zu offenen circulären Strukturen entspannen (Abb. 1c) – wenn wenigstens eine kovalente Bindung eines Strangs gespalten wird, so daß dieser an der Spaltstelle frei um den anderen Strang rotieren kann. Daher können in unserem Experiment die DNA-Moleküle, nachdem sie durch UV-Licht^[11] und das Ozon^[12] in der Bestrahlungskammer (siehe Experimentelles) gespalten worden sind, ihre Superspiralisierung nicht entspannen, solange sie getrocknet und auf Muskovit „fossilisiert“ bleiben (Abb. 1a). Nach dem Eintauchen der Proben in Wasser werden die Mg²⁺-Ionen, welche die DNA-Ketten auf dem Muskovit verankern, allmählich entfernt. Immer größere Kettensegmente lösen sich vom Muskovit ab und erreichen die erforderliche Mobilität, um ihre Superspi-

[*] Prof. B. Samori, Dr. C. Nigro, A. Gordano, Dr. I. Muzzalupo, C. Quagliariello

Dipartimento di Chimica, Università della Calabria
I-87030 Arcavacata di Rende (CS) (Italien)
Telefax: Int. +9 84/49 29 44

[**] Diese Arbeit wurde von CNR (Rom) Progetto Finalizzato Biotecnologie Bioinstrumentazione und von der Region Emilia Romagna gefördert. Wir danken C. Bustamante (Eugene, OR) und G. Zuccheri für hilfreiche Kommentare.

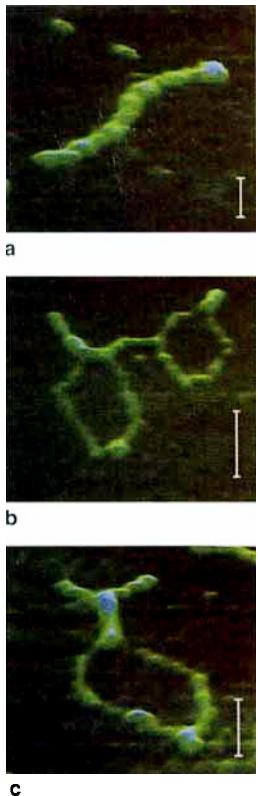


Abb. 2. Die transiente Ab- und Loslösung von Kettensegmenten eng superspiralierter DNA-Moleküle, die an Muskovit adsorbiert sind wie in (a), wird durch sich öffnende und vergrößernde Schleifen wie in (b) und (c) durch topologische Einschränkungen „eingefangen“ und sichtbar gemacht. Die Balken entsprechen 100 nm.

Experimentelles

20 µL einer HEPES-Pufferlösung, die 1 µg mL⁻¹ superspiralisiertes pBR322-DNA-Plasmid und 10 mM MgCl₂ enthielt, wurde auf eine Scheibe aus frisch gespaltenem, rubinrotem Muskovit (Glimmer) gegeben. Die überschüssige Lösung wurde mit Filterpapier abgelöscht, die Probe kurz mit einigen Tropfen Wasser gespült, in einem schwachen Stickstoffstrom getrocknet und 90 s in einer kleinen Kammer mit drei 15W-Hg/Xe-Lampen bestrahlt. Danach wurde sie mit der Oberseite nach oben unterschiedlich lang in ein Gefäß mit etwa 50 mL entionisiertem, doppelt destilliertem Wasser, das im Argonstrom von Luft befreit worden war, getaut. Die Proben wurden abgetupft, wiederum getrocknet und schließlich in einer trockenen Stickstoffatmosphäre mit einem Tapping-Mode-Rasterkraftmikroskop (Nanoscope III, Digital Instruments, Santa Barbara, CA) abgebildet. Die ursprüngliche DNA-Probe war, wie eine Elektrophorese-Untersuchung auf Agarose ergab, zu mindestens 95% superspiralisiert. Lineare Moleküle und solche mit einfachen Strangbrüchen wurden durch Behandlung der nativen *E. coli*-pBR322-DNA-Proben mit Exonuclease III [15] entfernt, um die Ablagerung bereits entspannter DNA-Moleküle auf dem Muskovit zu vermeiden.

Eingegangen am 7. August 1995 [Z 8291]

Stichworte: DNA · Rasterkraftmikroskopie · Topologie

- [1] C. Bustamante, D. Keller, G. Yang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 363–372.
- [2] C. Bustamante, D. A. Erie, D. Keller, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 750–760.
- [3] B. Samori, G. Siligardi, C. Quagliariello, A. L. Weisenhorn, J. Vesenka, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3598–3601.
- [4] B. Samori, C. Nigro, V. Armentano, S. Cimieri, G. Zuccheri, C. Quagliariello, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1482–1483; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1461–1463.
- [5] D. Keller, F. S. Franke, *Surf. Sci.* **1993**, *294*, 409–419.

ralisierungs-Torsionsspannung in der Nähe der zuvor durch UV-Bestrahlung induzierten Strangbrüche zu entspannen (Abb. 1b). Die Zahl der Strangbrüche beeinflusst daher die Empfindlichkeit dieses experimentellen Ansatzes^[1,3]. Wenn die Häufigkeit der Strangbrüche über die Kette verteilt groß ist, wird die Superspiralisierung jedes sich vom Substrat ablösenden Kettensegments entspannt. Sogar äußerst geringe und transiente^[14] Bewegungen einzelner adsorbierter Moleküle, die nur sehr schwer mit anderen physikalischen Methoden, selbst mit direkter SFM-Abbildung in Lösung, zu entdecken wären, können mit dieser Methode „eingefangen“ und nachgewiesen werden – ohne das Risiko, sie mit der Abtastspitze zu induzieren.

Chemische Topologie stellt permanente interne Marker für jede Art von molekularem Vorgang zur Verfügung, der mit Bindungsbrüchen und -neuknüpfungen einhergeht, unabhängig davon, wie kurzlebig die molekularen Strukturen sind und wie schnell und transient der Prozeß ist^[10]. SFM-Abbildung in Kombination mit topologischen Einschränkungen kann es ermöglichen, diese Prozesse „einzufangen“ und zu untersuchen, ohne in ihre Dynamik einzugreifen (Abb. 2).

- [6] S. H. Leuba, G. Yang, C. Robert, B. Samori, K. van Holde, J. Zlatanova, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11621–11625.
- [7] M. Guthold, M. Bezanilla, D. A. Erie, B. Jenkins, H. Hansma, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12927–12931.
- [8] M. Bezanilla, B. Drake, E. Nudler, M. Kashlev, P. K. Hansma, H. Hansma, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2454–2459.
- [9] M. Bezanilla, S. Manne, D. E. Laney, Y. L. Lyubchenko, H. G. Hansma, *Langmuir* **1995**, *11*, 655–659.
- [10] A. D. Bates, A. Maxwell, *DNA Topology*, Oxford University Press, New York, 1993.
- [11] M. Matzeu, *Physica Medica* **1991**, *VII*, 3–9; R. D. Ley, R. B. Webb, *Photochem. Photobiol.* **1974**, *20*, 395–398.
- [12] K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 7183–7194.
- [13] Es ist sehr wahrscheinlich, daß eine bessere Kontrolle über das Ausmaß der Einzelstrangbrüche in Zukunft durch die Anwendung von Spaltungsmethoden erreicht werden kann, die bereits zum Nachweis von DNA-Strukturen in Lösung verwendet werden sind (D. M. J. Lilley, *Methods Enzymol.* **1992**, *212*, 133–139). Ozon spaltet pBR322-Plasmide an spezifischen Stellen [12].
- [14] Diese Segmente werden vorübergehend von der Oberfläche abgelöst, da die Zahl der Moleküle im Blickfeld, nachdem sie bereits alle eine offene Gestalt angenommen haben, über Stunden hinweg nahezu konstant bleibt. Bei einer geringeren Anfangskonzentration von Mg²⁺ nimmt die Zahl der an Muskovit adsorbierten Moleküle ab, und ihre vollständige Ablösung wird nach kürzeren Eintauchzeiten erreicht.
- [15] S. G. Rogern, B. Weiss, *Methods Enzymol.* **1980**, *65*, 201–211.

„Programmierte“ Selbstorganisation von Kupfer(II)-L- und -D-Aarginin-Komplexen mit aromatischen Dicarboxylaten unter Bildung von chiralen Doppelhelices**

Nayumi Ohata, Hideki Masuda und Osamu Yamauchi*

Großes Interesse findet in den letzten Jahren die Selbstorganisation von Molekülen, die zu einzigartigen Eigenschaften und Funktionen führen kann^[1–4]. Selbstorganisation resultiert aus einer Kombination von nichtkovalenten Wechselwirkungen und wird oft durch die Koordination von Metall-Ionen gefördert. Die stereospezifische Bildung von Molekülaggregaten kann man durch Einführung von chiralen Bauelementen erreichen. Typische Beispiele sind die rechtsgängigen Spiralen der α -Helices von Proteinen^[5] und die rechtsgängige DNA-Doppelhelix^[6]. Wir berichten hier über die Bildung von kristallinem $[\text{Cu}(\text{L-Arg})_2](\text{L})$ ($\text{L} = m\text{-Phthalat}$ (pa), Pyridin-2,6-dicarboxylat (2,6-dipic)) und $[\text{Cu}(\text{D-Arg})_2](\text{L})$ ($\text{L} = \text{Pyridin}-3,5\text{-dicarboxylat}$ (3,5-dipic)) aus Kupfer(II), L- bzw. D-Aarginin (Arg) und einem aromatischen Dicarboxylat L. Dabei führt ein einzigartiges Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen abhängig davon, welches Arginin-Enantiomer eingesetzt wurde, zur Bildung einer rechts- bzw. einer linksgängigen Doppelhelix.

Metall-Ionen mit tetraedrischer Koordinationsgeometrie wie Cu¹, Ag¹ und Ni^{II}^[7–12] können Komplexe mit Doppel- oder Tripelhelixstruktur bilden. Eine solche Komplexbildung spielt auch bei der sequenzspezifischen Bindung von DNA durch „Zink-Finger“-Proteine eine Rolle, wie Kristallstrukturanaly-

[*] Prof. Dr. O. Yamauchi, N. Ohata
Department of Chemistry, Faculty of Science, Nagoya University
Chikusa-ku, Nagoya 464-01 (Japan)
Telefax: Int. + 52/789-2953
E-mail: b42215a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp

Dr. H. Masuda
Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Nagoya (Japan)

[**] Wir danken dem japanischen Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur für einen Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (Bioanorganische Chemie).