

Direkte mikroskopische Beobachtung des Zeitverlaufs von Einzelmolekül-DNA-Restriktionsreaktionen**

Bürk Schäfer, Helgard Gemeinhardt und Karl Otto Greulich*

Während sich in der Literatur zahlreiche Varianten bio-physikalischer Methoden zur Untersuchung einzelner DNA-Moleküle finden lassen, z. B. Kraftmessungen^[1-4] oder Laserdissektion,^[5] gibt es nur wenige Arbeiten zur direkten mikroskopischen Detektion von DNA-Einzelmolekülreaktionen. In den meisten Fällen wurde dabei ungefärbte DNA an Mikrokügelchen gebunden, die mit einer optischen oder magnetischen Pinzette gehalten wurden. Die Reaktion wurde dann indirekt über die Veränderung einer Distanz oder einer Kraft beobachtet. Die Veränderung der Lage eines Mikrokügelchens diente als Maß für den Reaktionsfortschritt.^[6-10] In diesem Sinne wurden viele Einzelmolekül-DNA-Reaktionen mehr oder weniger „blind“ durchgeführt. Eine Ausnahme ist die direkte mikroskopische Beobachtung von fluoreszenzmarkierter *E.-coli*-RNA-Polymerase entlang eines ungefärbten DNA-Moleküls.^[11] Eine besonders interessante Klasse von Reaktionen sind die der Restriktionsendonukleasen, da sie es erlauben, individuelle DNA-Moleküle zu charakterisieren und zu unterscheiden. Allein vom Typ II der Restriktionsendonukleasen sind inzwischen mehr als 3000 bekannt.^[12] Die direkte Beobachtung von Restriktionsreaktionen ist aber schwierig, da der Restriktionsschnitt ein „Alles-oder-nichts-Prozess“ ist, d. h.: Schnitt oder kein Schnitt des DNA-Moleküls an einer vorgegebenen Restriktionsstelle. Bis vor kurzem wurden Einzelmolekül-Restriktionsreaktionen durch „blinde“ Schneiden individueller fluoreszenzmarkierter DNA-Moleküle und anschließende Analyse der Restriktionsfragmente als Fluoreszenz-„Schauer“ gemessen.^[13]

In zwei früheren Arbeiten haben wir über das Schneiden eines einzelnen, an ein Mikrokügelchen gebundenen DNA-Moleküls mit der Restriktionsendonuklease Apa I mit einer einzelnen Schnittstelle im Zielmolekül^[14] und über die Restriktion durch Sma I und EcoR I mit drei bzw. fünf Schnittstellen^[15] berichtet. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf zeitlicher Auflösung und damit auf Information zur Kinetik von Einzelmolekül-Restriktionsreaktionen.

Abbildung 1 zeigt die Restriktion eines DNA-Einzelmoleküls mit dem Enzym EcoR I. Im Bildteil (g) ist das aus der 48502 Basenpaare langen Sequenz von Lambda-Phagen-DNA zu erwartende Restriktionsmuster gezeigt. Das DNA-Molekül wurde in dieser Reaktion durch hydrodynamischen Fluss von unten rechts nach oben links gestreckt. In dem hier gezeigten Beispiel ist das DNA-Molekül mit seinem längsten Restriktionsfragment (21226 Basenpaare) an das Mikrokügelchen gebunden. Konjugation mit dem kurzen Fragment

[*] Prof. Dr. K. O. Greulich, B. Schäfer, H. Gemeinhardt
Institut für Molekulare Biotechnologie
Postfach 100813, 07708 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-65-6410
E-mail: kog@imb-jena.de

[**] Wir danken Dr. Werner Wolf für hilfreiche Diskussionen und der Volkswagen-Stiftung für die Förderung von B.S. (Projekt-Nr. I/75099).

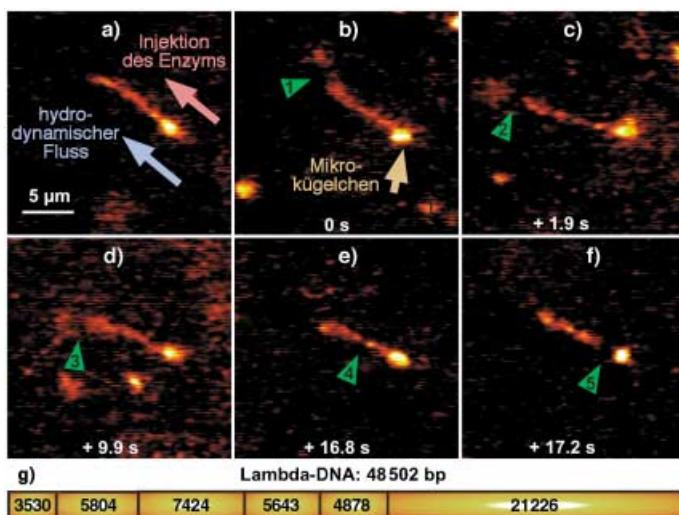


Abbildung 1. Beispiel für die vollständige enzymatische Restriktion eines einzelnen hydrodynamisch gestreckten Lambda-Phagen-DNA-Moleküls mit der Restriktionsendonuklease EcoR I (a–f). Alle fünf erwarteten Restriktionsstellen sind zu sehen. g) Erwartetes Schnittmuster (Restriktionskarte) von EcoR I auf Lambda-Phagen-DNA.

(3530 Basenpaare) ist auch möglich, aber dann werden meist nur ein oder zwei Schnitte gesehen, da in diesem Fall einige Schnittstellen in dem Teil des DNA-Moleküls liegen, der um das Mikrokügelchen gewickelt ist. Dieses Umwickeln erzeugt die Fluoreszenz der Mikrokügelchen, die in Abbildung 1 wiedergegeben ist.

Zu einem bestimmten Zeitpunkt, üblicherweise 5–20 Sekunden nach Injektion des Enzyms, tritt der erste Schnitt auf (Abbildung 1b). Dies wird dann als zeitlicher Nullpunkt definiert. Nachdem das Fragment vom Hauptmolekül abgeschnitten worden ist, kollabiert es schnell in eine globuläre Struktur (wie jedes DNA-Molekül, auf das keine Streckkraft einwirkt) und wird durch den Fluss forttransportiert. In Schritten von einigen Sekunden (siehe Abbildung 1 für genaue Zeiten) treten die anderen erwarteten Schnitte auf. Zwei Details sind wichtig: Der erste Schnitt tritt am dem Mikrokügelchen entfernten Ende des DNA-Moleküls auf, der zweite Schnitt liegt dann näher am Kügelchen usw.; offensichtlich schreitet die Reaktion also gegen den hydrodynamischen Fluss voran. Ferner sind die Schnitte aufeinander folgend, d.h., keine erwartete Schnittstelle wird ausgelassen. Diese Beobachtungen lassen sich am einfachsten erklären mit der Bindung eines einzelnen Enzymmoleküls an das freie Ende und anschließender Bewegung entlang des DNA-Moleküls in Richtung Mikrokügelchen. Dies wird weiter unten detaillierter diskutiert.

Eine ähnliche Beobachtung haben wir mit der Restriktionsendonuklease Sma I gemacht, die drei Schnittstellen im Lambda-Phagen-DNA-Molekül hat. Insgesamt wurden je zehn Moleküle mit Sma I und mit EcoR I untersucht, also insgesamt 80 Restriktionsereignisse. In etwas mehr als 50% der Fälle waren die Beobachtungen wie soeben beschrieben, in weiteren 30% der Fälle wurden Restriktionsstellen an einem Ende ausgelassen, aber alle anderen Schnitte blieben aufeinander folgend. Nur bei vier der 20 beobachteten Moleküle wurden größere Abweichungen von diesem generellen Muster beobachtet.

Diese weitgehende Übereinstimmung deutet unter anderem darauf hin, dass tatsächlich enzymatische Schnitte und nicht etwa mechanische DNA-Brüche gesehen wurden. Noch deutlicher äußert sich dies darin, dass das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der einzelnen Restriktionsfragmente zu der des Gesamt moleküls gut die erwarteten Restriktionsfragmentlängen widerspiegelt (siehe Lit. [15]).

Aus den Zeiten, zu denen die Schnitte beobachtet werden, kann der Zeitverlauf der Reaktion rekonstruiert werden. Abbildung 2a zeigt solche Zeitverläufe von sechs vollständigen Sma-I-Restriktionsreaktionen, Abbildung 2b diejenigen für fünf Reaktionen von EcoR I. Jede Messkurve wurde an einem einzelnen DNA-Molekül aufgenommen.

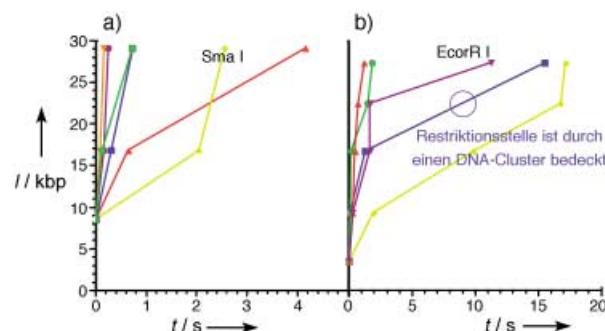


Abbildung 2. Zeitverlauf der Restriktion durch Sma I (a) und EcoR I (b) für elf verschiedene Moleküle. Jede Kurve stellt ein individuelles DNA-Molekül dar. Achtung: Die Zeitachsen für Sma I und EcoR I sind verschieden.

Diese Ergebnisse werden noch klarer, wenn die Reaktionen zwischen zwei nebeneinander liegenden Schnittstellen separat dargestellt werden, wie in Abbildung 3 geschehen. Für jedes der beiden Enzyme gibt es zwei Gruppen von

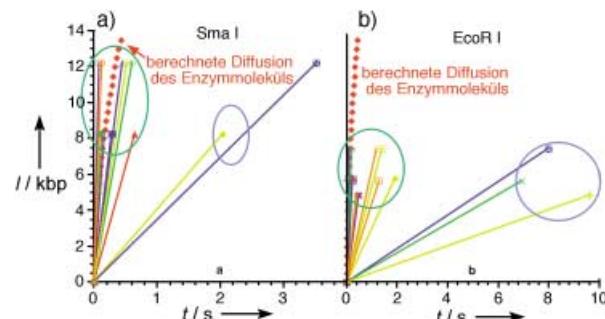


Abbildung 3. Restriktionsgeschwindigkeiten für Sma I (a) und EcoR I (b). Die Steigung jeder Geraden spiegelt die Restriktionsgeschwindigkeit zwischen zwei aufeinander folgenden Schnitten wider. Es können jeweils zwei Gruppen von Geschwindigkeiten ausgemacht werden, die durch Kreise und Ellipsen gekennzeichnet sind.

Daten. Da die Steigung der Geraden ein Maß für die Restriktionsgeschwindigkeit ist, hat offensichtlich jedes Enzym eine langsame und eine schnelle Restriktionsgeschwindigkeit, und diese ist bei Sma I generell höher als bei EcoR I. Die punktierten Linien stehen für freie Diffusion der Enzymmoleküle durch die Lösung. Alle Geschwindigkeiten sind langsamer als Diffusion, d.h., die Bewegung entlang des DNA-

Moleküls kann einerseits durchaus thermisch getrieben sein, wird aber andererseits abgebremst, als gäbe es Reibungsverluste.

Diffusion kann auch erklären, warum der Erkennungsprozess zwischen Enzym und DNA keine exakte Bindung an einer der fünf (EcoR I) oder drei (Sma I) Restriktionsstellen auf dem 48502 Basenpaare langen Lambda-Phagen-Molekül voraussetzen kann. Beide Enzyme haben Erkennungsstellen, die sechs Basenpaare lang sind. Statistisch gesehen würde es mehr als 1500 (EcoR I) oder 3000 (Sma I) Kontakte zwischen einem Enzymmolekül und der DNA erfordern, bis eine spezifische Bindungsstelle getroffen wird. Die Konzentration des mikroinjizierten Enzyms liegt bei ca. 6×10^4 Molekülen pro μL . Hieraus folgt die mittlere Frequenz an Kontakten als ca. 1 Kontakt pro Sekunde. Daher würden 1500 bzw. 3000 Kontakte eine halbe Stunde für EcoR I und für Sma I sogar eine Stunde benötigen, und einem Enzymmolekül ist es somit in der beobachteten Zeitspanne von Sekunden unmöglich, eine seiner Restriktionsstellen allein durch räumliche Diffusion zu finden.

Dies legt zusammen mit der Beobachtung, dass die meisten Schnitte aufeinander folgend sind, die Annahme nahe, dass das Enzymmolekül unspezifisch und zufällig an das DNA-Molekül bindet und dann seine Restriktionsstelle sucht und schneidet. Da in allen beobachteten Fällen, in denen die Reaktion nach einem Schnitt fortschreitet, dies in Vorwärtsrichtung, oft mit unveränderter Geschwindigkeit, geschieht, schlagen wir vor, dass das Enzym am zur Ankunftsseite gelegenen Ende schneidet. Dies ist sofort einsichtig für EcoR I, da dessen Erkennungsstelle 5'...G↓AATT...3' ist, wobei der Pfeil die eigentliche Schnittstelle anzeigt. Für Sma I ist allerdings die Erkennungsstelle hoch symmetrisch (Sma I: 5'...CCC↓GGG...3'), und daher ist eine derart einfache Erklärung nicht möglich. Hier müsste man eine unterschiedliche Affinität des Enzyms für G- und C-Sequenzen annehmen. Eine endgültige Antwort wird wohl erst möglich sein, wenn die Struktur von Sma I bekannt ist.

Die bisher gegebene Erklärung der Beobachtungen erscheint plausibel, doch muss noch eine andere Möglichkeit ausgeschlossen werden, nämlich, dass nicht ein einzelnes, sondern einige individuelle Enzymmoleküle an das DNA-Molekül binden und kooperieren. In diesem Fall müsste man allerdings einen verborgenen Mechanismus annehmen, der diese verschiedenen Moleküle so koordiniert, dass die Schnitte im oben beschriebenen Sinne aufeinander folgend sind. Solch ein Mechanismus ist wesentlich weniger wahrscheinlich als der Mechanismus, der hier postuliert wurde. Im Fall von EcoR I mit seinen fünf Erkennungsstellen ist diese Wahrscheinlichkeit verschwindend gering.

Die beobachteten Geschwindigkeiten für die Bewegung des Enzyms entlang eines DNA-Moleküls mögen hoch erscheinen, können aber durch geführte lineare Diffusion erklärt werden. Wir beobachteten 50 kbps^{-1} ($17 \mu\text{m s}^{-1}$) für Sma I und 30 kbps^{-1} ($10 \mu\text{m s}^{-1}$) für EcoR I. Andere Geschwindigkeiten sind bekannt für DNA-Polymerase I (10 bps^{-1}), T7-DNA-Polymerase (300 bps^{-1}) und das DNA-Polymerase-Holoenzym (1000 bps^{-1}). Ferner lässt sich die Geschwindigkeit für RecBCD, eine DNA-Helicase und Exonuclease, zu 1000 bps^{-1} abschätzen.^[16] All diese Reak-

tionsgeschwindigkeiten sind geringer als die von uns ermittelten. Polymerasen katalysieren eine Reaktion an jedem Basenpaar und können Energie aus jeder Bindung beziehen (ggf. nach Verbrauch von ATP). Dagegen kann die lineare Bewegung von Restriktionsendonucleasen entlang eines DNA-Moleküls nur gelegentlich Energie aus einer geöffneten Bindung beziehen, muss also aus thermischer Bewegung gespeist werden. Es war aber schon weiter oben besprochen worden, dass dies möglich ist und so ein thermisch getriebener Mechanismus auf Basis von Diffusion die Beobachtungen erklären kann.

Experimentelles

Biotinylierung und Färbung: Lambda-Phagen-DNA (48502 bp oder $16.5 \mu\text{m}$ in gestreckter Form, New England Biolabs, Schwalbach) wird biotinyliert mithilfe von Biotin-16-ddUTP (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Lambda-DNA-Moleküle in einer Konzentration von 2.5×10^8 Molekülen pro μL werden zusammen mit einem zehnfachen Überschuss an Biotin-16-ddUTP mit terminaler Transferase (Boehringer Mannheim) in Pufferlösung (in fünfmal höherer Konzentration als vom Lieferanten empfohlen; 1M Kaliumcacodylat, 125 mM Tris-HCl, 1.25 mg mL^{-1} Rinderserum-Albumin, pH 6.6, Boehringer Mannheim) und 1.5 mM CoCl₂ (Boehringer Mannheim) 20 min bei 37°C inkubiert. Die Transferase-Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (50 mM) gestoppt. Die biotinylierte DNA wird im Verhältnis 1:20 mit H₂O verdünnt und dann durch Mischen und Röhren mit dem fluoreszierenden Intercalatorfarbstoff SYBRGreen (Molecular Probes, Oregon, USA) gefärbt. SYBRGreen ist nicht der Idealfarbstoff in Bezug auf Stabilität, war aber neben DAPI der einzige Farbstoff, mit dem wir eine Reaktion beobachten konnten.^[14] Da der Lieferant die exakte Farbstoffkonzentration nicht mitteilt, wurde eine Verdünnung auf 0.08% empirisch als am besten für die Experimente geeignet bestimmt.

Konjugation der DNA an Mikrokügelchen: Im folgenden Schritt wird die DNA an Streptavidin-beladene Mikrokügelchen (Durchmesser $1 \mu\text{m}$, Polysciences, Eppelheim)^[15] gebunden. Die DNA-Suspension, die immer noch Restmaterial aus der Biotinylierungs- und Färbeprozess enthält, wird dann mit den Mikrokügelchen (10^7 Kügelchen pro μL in H₂O) im Verhältnis 5:1 gemischt und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach enthält die Suspension 3×10^5 DNA-Moleküle pro μL in H₂O. Unter diesen Bedingungen kann man erwarten, dass nur ein oder höchstens einige wenige DNA-Moleküle an ein Mikrokügelchen binden. Die geringe Ionenstärke (im Wesentlichen wurde für alle Verdünnungsschritte Wasser verwendet) erlaubt Streckung der DNA-Moleküle mit geringem Kraftaufwand. Für die abschließende Bindung einzelner DNA-Moleküle an die Mikrokügelchen werden die DNA-Moleküle mit Biotin an der 5'-Position endmarkiert und mit den Streptavidin-beladenen Mikrokügelchen gemischt. Wegen der starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin erfolgt die Bindung praktisch sofort. Zu Details siehe Lit. [15].

Handhabung von DNA-Molekülen mit der optischen Pinzette und durch hydrodynamischen Fluss: Für die Handhabung einzelner DNA-Moleküle werden $5 \mu\text{L}$ der Mikrokügelchen/DNA-Suspension auf ein Deckglas aufgetropft und im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Um Photobleichen zu reduzieren, wird ein „Antifade Kit“ (Appligene Oncor, Heidelberg) in einer Verdünnung von 2:5 eingesetzt. Im Hellfeld können die Mikrokügelchen gesehen werden, bei Umschalten auf Fluoreszenz wird die DNA sichtbar. Durch Umschalten zwischen beiden Betriebsarten kann das Mikrokügelchen identifiziert und mit der optischen Pinzette erfasst werden.^[17, 18] Das DNA-Molekül wird dann durch hydrodynamische Kräfte zwischen DNA-Molekül und vorbeifließendem Puffer gestreckt, die durch Bewegen des Objektträgers bei gleichzeitigem Festhalten des Mikrokügelchens erzeugt werden. Wenn die Bewegung des Objektträgers stoppt, kollabiert das DNA-Molekül in ein bis zwei Sekunden in eine globuläre Struktur.

Enzymreaktion: Die Restriktionsendonucleasen Sma I und EcoR I (New England Biolabs, Schwalbach) wurden in einer fünfmal höheren Konzentration des Puffers als vom Lieferanten empfohlen eingesetzt (Sma I: 250 mM Kaliumacetat, 100 mM Tris-Acetat, 50 mM Magnesiumacetat, 5 mM

DTT, pH 7.9; EcoR I: 250 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 0.125% Triton X-100, pH 7.5), um die erforderliche Ionenkonzentration für die Restriktionsreaktion nach Injektion des Enzyms zu erreichen. Dies erfordert Reinigung mit 0.22-µm-Zentrifugenfiltern (Ultrafree-MC, Millipore, Eschborn). Wenn höher konzentrierter Reaktionspuffer verwendet wird, tendieren die DNA-Moleküle wegen der hohen Ionenstärke sogar im hydrodynamischen Fluss zum Kollabieren. Ein Mikromanipulator mit Mikroinjektor (Eppendorf, Hamburg) wird verwendet, um das Enzym in die Mikrokügelchen/DNA-Suspension zu injizieren.

Die Injektionskapillare wird 10 µm vor dem gestreckten DNA-Molekül positioniert. Um die enzymatische Restriktion zu starten, werden bei Raumtemperatur 0.1–0.2 pL injiziert. Die Enzym/Puffer-Lösung wird dabei um einen Faktor 1:5 verdünnt, sodass der Puffer wieder seine empfohlene Konzentration erreicht.

Eingegangen am 25. Juni 2001,
veränderte Fassung am 15. Oktober 2001 [Z17349]

- [1] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, V. Croquette, *Science* **1996**, *271*, 1835–1837.
- [2] S. R. Quake, H. Babcock, S. Chu, *Nature* **1997**, *388*, 151–154.
- [3] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6185–6190.
- [4] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. M. Block, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1335–1346.
- [5] N. Endlich, C. Hoyer, A. Harim, S. Monajembashi, K. O. Greulich, *Exp. Tech. Phys.* **1995**, *41*, 303–311.
- [6] B. Maier, D. Bensimon, V. Croquette, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12002–12007.
- [7] A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, R. M. Simmons, *Science* **1999**, *283*, 1689–1695.
- [8] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, J. Gelles, *Science* **1999**, *270*, 1653–1657.
- [9] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. M. Block, *Science* **1998**, *282*, 902–907.
- [10] G. J. L. Wuite, S. B. Smith, M. Young, D. Keller, C. Bustamante, *Nature* **2000**, *404*, 103–106.
- [11] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, T. Yanagida, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 709–715.
- [12] A. Pingoud, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3705–3727.
- [13] A. V. Orden, R. A. Keller, W. P. Ambrose, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 37–41.
- [14] C. Hoyer, S. Monajembashi, K. O. Greulich, *J. Biotechnol.* **1996**, *52*, 65–73.
- [15] B. Schäfer, H. Gemeinhardt, V. Uhl, K. O. Greulich, *Single Mol.* **2000**, *1*, 33–40.
- [16] P. R. Bianco, L. R. Brewer, M. Corzett, R. Balhorn, Y. Yeh, S. C. Kowalczykowski, R. J. Baskin, *Nature* **2001**, *409*, 374–378.
- [17] A. Ashkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4853–4860.
- [18] K. O. Greulich, *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine: The Laser Microbeam and Optical Tweezers*, Birkhäuser, Basel, **1999**.

Extremely Long Dendronized Polymers: Synthesis, Quantification of Structure Perfection, Individualization, and SFM Manipulation**

Lijin Shu, A. Dieter Schlüter,* Christof Ecker, Nikolai Severin, and Jürgen P. Rabe*

The enormously successful top-down approach to nanostructured materials^[1] increasingly faces its limitations. For example, it is virtually impossible to both control and determine nanostructures on the atomic scale by cutting and etching. In recent years the alternative bottom-up approach to the nano world has made considerable progress from single atom manipulation^[2a] towards rather well defined, more complex structures,^[2b] although not enough to make it technologically important at this stage. Complex molecules with predictable shapes on the nanometer-scale were constructed, handled, and characterized and it was possible to individualize and manipulate them^[3] or to assemble even more complex functional arrays.^[4] The bottom-up approach is closely related to the scanning-probe microscopies which provide particularly important analysis, manipulation, and construction tools. Their consequent application and further methodical development have provided indispensable knowledge about both individualized and assembled properties of molecules, the behavior of molecules at interfaces,^[5] and thus laid the foundation for what may become competition for the top-down approach within the next 10 years or so. For resolution reasons, scanning force microscopy (SFM) is useful for larger objects (a few nm in diameter) than scanning tunneling microscopy (STM, a few Å). On the other hand, there are no structural limitations for SFM, whereas STM is restricted to sufficiently thin molecules on conducting substrates. Dendronized polymers have been developed over the last 10 years as nanoscaled molecular objects at the interface between the materials and bio sciences.^[5] Despite considerable effort in many laboratories to date it has not been possible to synthesize such polymers carrying fourth generation (G4) dendrons and having both high molar mass and a functionalized surface for chemical modifications. We here report the divergent synthesis of an extremely high molar mass, surface functionalized, G4 dendronized polystyrene (PS), its individualization and SFM visualization on graphite, and its manipulation with the SFM tip.

[*] Prof. Dr. A. D. Schlüter, Dr. L. Shu
Institut für Chemie
Freie Universität Berlin
Takustrasse 3, 14195 Berlin (Germany)
Fax: (+49) 30-838-53357
E-mail: adschlue@chemie.fu-berlin.de
Prof. Dr. J. P. Rabe, Dipl.-Phys. C. Ecker, Dr. N. Severin
Institut für Physik
Humboldt-Universität zu Berlin
Invalidenstrasse 110, 10115 Berlin (Germany)
Fax: (+49) 30-2093-7632
E-mail: rabe@physik.hu-berlin.de

[**] This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sfb 448, TPs 1 and 5) and the Fonds der Chemischen Industrie; SFM = scanning force microscopy.