

VU Research Portal

Cleaving, Condensing and Manipulating Single DNA Molecules

van den Broek, B.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van den Broek, B. (2007). *Cleaving, Condensing and Manipulating Single DNA Molecules*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Knippen, condenseren en manipuleren van afzonderlijke DNA-moleculen

In de Griekse oudheid geloofde men dat de wereld was opgebouwd uit vier elementen: aarde, lucht, water en vuur. Inmiddels weten we dat dit niet de elementaire bouwstenen van de natuur zijn. Het idee dat alles is opgebouwd uit een handvol bouwstenen is echter juist gebleken. De vier klassieke elementen zijn nu vervangen door een hele rits *elementaire deeltjes*. De elementaire deeltjes zijn de bouwstenen voor atomen. Groepen atomen vormen moleculen, die samen weer de eigenschappen van een stof of materiaal definiëren. De onderlinge wisselwerking van bouwstenen bepaalt dus steeds hoe een complexere structuur zich gedraagt.

Hoe zit het dan met levende materie? Hoe kan de enorme complexiteit die we zien verklaard worden aan de hand van een paar simpele elementen? Als we vanuit deze complexiteit een paar niveau's inzoomen blijkt dat ook het leven functioneert aan de hand van een handvol bouwstenen (en wetmatigheden). Elk levend organisme gebruikt DNA-moleculen als drager van *genetische informatie*. Deze DNA-moleculen zijn zeer lange ketens van aan elkaar geschakelde moleculen genaamd *nucleotiden* of *DNA-basen* (zie Figuur 1.1 op pagina 3). Alhoewel het DNA van elk organisme weer anders is – zelfs binnen soorten zijn er behoorlijke verschillen – zijn alle DNA-moleculen opgebouwd uit slechts vier verschillende nucleotiden. Deze vier vormen als het ware het meest basale alfabet van het leven: in groepjes van drie letters fungeren zij uiteindelijk als 'blauwdruk' voor de andere belangrijke groep biomoleculen: de *eiwitten* (Figuur 1.2 op pagina 4). Eiwitten zijn ketens van *aminozuren* en zijn de eigenlijke 'motoren' van het leven: zij zorgen voor transport van materialen, geven de cel stevigheid en zijn betrokken bij celdeling. Als enzymen reguleren ze alle benodigde chemische reacties in de cel en zorgen ze voor de omzetting van energie in

beweging. Een groot aantal eiwitten heeft als functie het DNA te onderhouden. Er moeten bijvoorbeeld stukken DNA gekopieerd of gerepareerd worden. Vaak herkennen deze eiwitten een bepaald stuk op het DNA. Ze 'lezen' het DNA af en gaan pas tot actie over als ze een stuk met de juiste herkenning volgorde van DNA-basen hebben gevonden.

Mijn promotieonderzoek heeft zich gericht op de vraag hoe dit soort *plaats-specifieke* eiwitten hun herkenning volgorde vinden en hoe ze er vervolgens mee werken. De eiwitten die ik voor dit doel bestudeerd heb zijn zogenaamde *restrictie-enzymen*. Door hun hoge specificiteit en precisie zijn deze eiwitten zeer goede modellen voor specifieke DNA-herkenning. Voordat ik mijn onderzoeksresultaten beschrijf geef ik hieronder eerst een korte uitleg over de biologische functie van restrictie-enzymen en waarom ze zo belangrijk zijn voor de moleculaire biologie.

Restrictie-enzymen

Net als planten en dieren staan ook de eencellige bacteriën constant bloot aan virussen. Deze *bacteriøfagen* infecteren hun slachtoffer door hun DNA in de bacteriële cel te injecteren. Als de bacterie niet ingrijpt, zullen er virale eiwitten geproduceerd worden die essentiële functies van de cel lamleggen. Vervolgens worden nieuwe virussen aan de lopende band geproduceerd totdat op een gegeven moment de cel uit elkaar barst en vele dochtervirussen op pad gaan om nieuwe bacteriën te besmetten.

Om dit te voorkomen, is het zaak dat de bacterie zo snel mogelijk het virale DNA onschadelijk maakt. Daarom heeft hij een set *restrictie-enzymen* aan boord. Deze eiwitten herkennen een specifieke, korte opeenvolging van DNA-basen en knippen het DNA daar doormidden. Het DNA van de bacterie zelf is op dit soort herkenning plekken beveiligd tegen de knipreactie doordat een ander enzym juist daar iets aan het DNA verandert. Het geniale van dit systeem is dus dat terwijl het genoom van de bacterie beschermd is tegen de acties van de eigen restrictie-enzymen, malafide DNA dat de cel binnentreedt snel aan stukken kan worden geknipt.

In de ontwikkeling van de moleculaire biologie hebben restrictie-enzymen een buitengewoon belangrijke rol gespeeld. De eigenschap om DNA op specifieke plaatsen met hoge precisie te knippen is cruciaal voor genetische modificatie technieken. Voor de ontdekking en het isoleren van de eerste restrictie-enzymen kregen de wetenschappers Arber, Nathans en Smith in 1978 de Nobelprijs. Tegenwoordig zijn restrictie-enzymen onmisbaar gereedschap voor al het DNA knip- en plakwerk in het biochemische lab. Ook worden ze ingezet bij forensisch DNA-onderzoek.

Ondanks dat er veel onderzoek is gedaan naar restrictie-enzymen zijn er nog veel vragen onbeantwoord. In dit proefschrift heb ik een aantal van deze kwesties proberen te beantwoorden:

- Hoe (snel) verloopt het herkenningproces en wat is de invloed van mechanische spanning in het DNA op dit proces (Hoofdstuk 2)?
- Hoe vindt een restrictie-enzym zijn herkenningplek op het DNA (Hoofdstuk 3)?
- Wat is het mechanisme van dubbel-bindende restrictie-enzymen (Hoofdstuk 5)?

Daarnaast beschrijf ik de resultaten van aanverwante projecten:

- Het realiseren van een nieuwe techniek om afzonderlijke aan DNA gebonden eiwitten te detecteren (Hoofdstuk 4).
- Wat is de dynamica van DNA condensatie door polyamine moleculen (Hoofdstuk 6)

Al het onderzoek is uitgevoerd met behulp van experimenten afzonderlijke DNA-moleculen en eiwitten. Door aan één enkel molecuul te meten kan men eigenschappen achterhalen die met traditionele (biochemische) technieken doorgaans niet of veel lastiger toegankelijk zijn. Een voorbeeld hiervan is hoe een eiwit omgaat met mechanische veranderingen/spanning in het DNA. Een ander voordeel van de *single-molecule* benadering is dat men, behalve over de populatie moleculen in z'n geheel, informatie verkrijgt over het gedrag van de individuele deelnemers en de spreiding hiervan.

Aangezien de biomoleculen in kwestie slechts een paar nanometer groot zijn (een miljardste meter, oftewel 0.000001 millimeter), kun je deze moleculen niet zomaar met het blote oog of zelfs onder de microscoop aan het werk zien. Ik heb daarom gebruik gemaakt van een techniek die het mogelijk maakt om individuele DNA-moleculen te vangen en heel precies te manipuleren.

Het optisch pincet

Het principe dat licht een – minuscule¹ – kracht kan uitoefenen op materie d.m.v. impulsoverdracht is al meer dan een eeuw bekend. Relatief nieuw is dat er ook kleine objecten mee gemanipuleerd kunnen worden. Het blijkt dat met een krachtige, sterk gefocusseerde laserbundel plastic of glazen bolletjes ter grootte van een micrometer (een duizendste millimeter) kunnen worden 'vastgepakt' (zie Figuur 1.5 op pagina 11). Doordat een grote hoeveelheid laserlicht door het bolletje wordt afgeketst, kan er een substantiële kracht op worden uitgeoefend.² Een belangrijke eigenschap van een optisch pincet is dat we door het licht weer op te vangen deze krachten

¹De stralingsdruk die de zon op het aardoppervlak uitoefent is bijvoorbeeld minder dan een miljoenste kg/m². Over de hele aarde genomen is dit echter een gewicht van 50000 ton. In zware sterren zorgt de stralingsdruk er zelfs voor dat deze niet onder hun eigen gewicht imploderen.

²Conceptueel is dit vergelijkbaar met het wegduwen van een mammoettanker m.b.v. een reusachtig pingpongballemkanon.

ook heel precies kunnen *meten*. De met deze techniek toegankelijke krachten liggen in hetzelfde bereik als de krachten die een rol spelen in biologische processen. We hebben het dan over krachten van *picoNewtons* (pN).³

Deze bolletjes, die in tegenstelling tot DNA en eiwitten wèl zichtbaar zijn onder de microscoop, zijn dus ideaal om te gebruiken als ‘handvatten’ voor de beïnvloeding van afzonderlijke DNA-moleculen. De te onderzoeken DNA-moleculen heb ik daartoe aan de uiteinden gelabeld met *biotine*, dat stevig bindt aan chemisch behandelde bolletjes. Dit stelt ons in staat om individuele DNA-moleculen te ‘vangen’ onder een microscoop. In onze experimentele opstelling worden twee onafhankelijk beweegbare optische pincetten geproduceerd, zodat beide uiteinden van het DNA vastgepakt kunnen worden.

Om de interactie van afzonderlijke DNA-moleculen met eiwitten te kunnen meten, moet je, behalve een methode om DNA-moleculen individueel te manipuleren, ook een manier hebben om ze te isoleren uit het reservoir. Voor dit doel hebben we een flowsysteem ontwikkeld, waarbij vanuit kleine containers verschillende oplossingen naast elkaar komen te stromen zonder te mengen (Figuren 1.8 en 1.9 op pagina’s 14 en 15). Door de flowkamer ten opzichte van het laserfocus te verplaatsen kunnen we snel en effectief wisselen tussen de verschillende oplossingen. In het eerste kanaal worden eerst twee bolletjes gevangen in de optische pincetten, in het tweede worden DNA-moleculen tussen de bolletjes gekoppeld, en in een derde kanaal bevinden zich de te bestuderen eiwitten.

Knippen door EcoRV en BamHI

Van de restrictie-enzymen is EcoRV (van de *E. coli* bacterie, die onder andere in onze darmen voorkomt) een van de meest bestudeerde. Het eiwit fungeert veelal als een modelsysteem van de eerdergenoemde specifieke DNA-herkenning. In dit proces, ook wel *induced fit* genoemd, ondergaan DNA en eiwit beide grote structurele veranderingen. Bij specifieke binding wordt het DNA lokaal 50 graden gebogen zodat de actieve plek (*active site*) van EcoRV dichtbij de te knippen locatie van het DNA wordt gebracht. Ondanks vele biochemische en structurele studies naar dit enzym, waren de snelheden waarmee dit gebeurt en de krachten die hierbij een rol spelen nog onbekend.

Om deze eigenschappen te bepalen heb ik onderzocht hoe de knipsnelheid van EcoRV afhangt van mechanische spanning in het DNA. De achterliggende gedachte hierbij is, dat als er aan het DNA molecuul getrokken wordt, het moeilijker wordt voor het enzym om het te buigen. Zodra het buigen van DNA het langzaamste proces

³Eén Newton is gelijk aan het gewicht van iets van ongeveer 100 gram. Ter vergelijking: een mug zittend op een tafel oefent een kracht uit van een miljoenste Newton. Een picoNewton, 10^{-12} Newton, is dus nog een miljoen keer kleiner!

in de hele knipreactie wordt, zouden we het moeten kunnen meten. De resultaten van deze experimenten staan beschreven in Hoofdstuk 2, en ik heb inderdaad een dergelijk effect gemeten. Voor krachten onder de 30 piconewton is er geen invloed op de gemiddelde knipsnelheid van EcoRV, wat aangeeft dat bij deze krachten een ander proces dan het buigen het langzaamst verloopt. Vanaf ongeveer 40 pN is er echter een scherpe daling in activiteit te zien (Figuur 2.8 op pagina 28). Bij een stuk DNA met één kniplocatie was dit effect veel sterker dan bij een langer stuk DNA met 21 van deze plaatsen. Deze metingen zijn herhaald met een ander restrictie-enzym, BamHI, dat het DNA juist niet buigt, maar in de natuurlijke configuratie laat. In dit geval werd geen afhankelijkheid van de kracht op het DNA gevonden.

Door alle resultaten aan een model te toetsen, waren we in staat om verschillende eigenschappen en reactiesnelheden van EcoRV en BamHI te bepalen. Met deze methode kon de buigingshoek van EcoRV tot op een paar graden nauwkeurig bepaald worden en is er een bovengrens gesteld aan de snelheid van het *induced-fit* proces. De verkregen data van BamHI geven aan dat zowel de initiële binding aan het DNA als het uiteindelijke knippen na de induced-fit reactie niet beïnvloed worden door de DNA spanning. De gevonden resultaten leggen een verbinding tussen bestaande biochemische en structurele informatie en zijn in principe toepasbaar op andere DNA-bindende eiwitten.

In de experimenten met EcoRV vonden we aanwijzingen dat het vinden van de kniplocatie op het DNA langzamer ging dan verwacht voor dit type eiwit. Dit zette ons ertoe aan de invloed te onderzoeken van de mate waarin het DNA molecuul samengepakt zit op de reactiesnelheid van EcoRV, beschreven in Hoofdstuk 3. In onze DNA-spanning experimenten was het DNA immers compleet uitgestrekt, terwijl het in de cel en in biochemische experimenten juist altijd in een dynamische klauw zit.

Waarom zou dit een verschil maken voor de snelheid waarmee de specifieke plaats gevonden wordt? Om deze vraag te beantwoorden is het belangrijk om te weten dat de restrictie-enzymen zoals hier onderzocht hun specifieke knipplaats localiseren via diffusie, d.w.z. er is geen actief zoekmechanisme: alle beweging wordt veroorzaakt door willekeurige fluctuaties (de zogenaamde *Brownse beweging*). In levende organismen zijn de specifieke bindingslocaties op het DNA veelal ingebed in lange DNA-moleculen met duizenden of miljoenen niet-specifieke DNA locaties. De kans is dan ook groot dat een door de cel bewegend eiwit eerst met zo'n niet-specifieke plaats in aanraking komt. Sommige eiwitten kunnen het DNA dan als rails gebruiken en zo het zoekproces naar de specifieke herkenningsplek tot wel honderd keer versnellen. Ook EcoRV heeft deze eigenschap, maar de afgelegde afstand langs het DNA voordat het DNA weer losgelaten wordt is te klein om een grote verbetering van de zoeksnelheid te bewerkstelligen. Er is echter nog een ander effect dat de zoeksnelheid kan vergroten. Lange DNA-moleculen in oplossing hebben net als in de cel grofweg de structuur

van een kluwen, waarin een eiwit tijdelijk ‘verstrikt’ kan raken. Het eiwit kan in zo’n geval ‘springen’ naar plekken op het DNA die vlakbij zijn in 3D ruimte, maar toch ver van elkaar liggen gemeten langs de DNA contour. Door dit proces, dat *jumping* genoemd wordt, bezoekt het eiwit gemiddeld vaker verschillende DNA locaties. De specifieke locatie zal dus eerder worden gevonden en het DNA eerder geknipt dan wanneer er geen jumping mogelijk is.

In Hoofdstuk 3 beschrijf ik een methode die wij hebben ontwikkeld om het effect van jumping te meten. De experimenten bestaan uit het meten van de knipsnelheid van EcoRV als functie van de uitgestrektheid van de kluwen DNA. Deze variabele wordt bepaald door de afstand tussen de twee bolletjes die het DNA vasthouden. Door deze afstand per experiment te variëren kunnen we dus selectief jumping aan of uit zetten (zie ook Figuur 3.1 op pagina 39). Dit bracht wel een extra meetprobleem met zich mee. De kniptijd meten bij DNA onder spanning was eenvoudig; de kracht op de bolletjes verdween op het moment van knippen. Zonder kracht op het DNA is dit niet te observeren. Daarom lieten we één van de optische pincetten elke seconde razendsnel heen en weer bewegen, zodat het DNA heel even gestrekt werd tot een meetbare kracht van een paar picoNewton. Het verdwijnen van dit terugkerende krachtsignaal betekende dat het DNA ergens in de voorliggende seconde geknipt was (Figuur 3.2 op pagina 41). Het belangrijkste resultaat van dit onderzoek was dat EcoRV het snelst zijn herkenningsplek op het DNA vindt als het DNA het meest compact is (Figuur 3.4, pagina 43). We denken dat in de bacteriële cel het effect van jumping veel belangrijker zal zijn, aangezien daar de lokale dichtheid van het DNA nog veel groter is dan in onze experimenten.

Manipuleren van twee DNA-moleculen

In de afgelopen decennia heeft de ontwikkeling van nieuwe technieken het mogelijk gemaakt om het gedrag van individuele biomoleculen te bestuderen. Vóór die tijd kon men alleen het gemiddelde gedrag van een verzameling moleculen meten. Sindsdien is het aantal van dit soort *single-molecule* experimenten exponentieel toegenomen en zijn vele nieuwe eigenschappen van biomoleculen aan het licht gekomen. Zo helpt het hebben van precieze controle over één enkel DNA molecuul bij het onderzoek naar de werking van veel DNA-bindende eiwitten en moleculaire motoren. Bij veel biologische processen hebben eiwitcomplexen echter interactie met twee stukken DNA tegelijk. Hierdoor zijn dit soort systemen met conventionele single-molecule technieken lastig te bestuderen.

In Hoofdstuk 4 beschrijven we een nieuwe techniek waarmee we twee DNA-moleculen tegelijk kunnen hanteren met in totaal vier optische pincetten. Hiermee ligt de weg open voor experimenten met eiwitten die simultaan binden aan twee stukken DNA. Voor het genereren van vier (of meer) optische traps wordt gebruik

gemaakt van een acousto-optic deflector (AOD). Net als in de experimenten beschreven in de Hoofdstukken 2 t/m 3 wordt de laserbundel in tweeën gesplitst. De AOD, waar één van deze bundels doorheen gaat, wordt door de computer zo aangestuurd dat de laserbundel pijlsnel heen en weer wordt geschakeld tussen drie verschillende posities. Dit gaat zo snel (20000 keer per seconde) dat het voor de drie vastgepakte bolletjes net lijkt of de laser steeds tegelijk op deze drie locaties aanwezig is. De posities van deze zogenaamde *time-shared* pincetten zijn m.b.v. een joystick onafhankelijk in twee richtingen te besturen in het microscoopsample. Door een lens te verschuiven is bovendien het vierde optisch pincet behalve in het optisch scherpe vlak van de microscoop ook in de diepte beweegbaar, zodat we de gevangen DNA-moleculen ook om elkaar heen kunnen wikkelen.

Om de mogelijkheden van het apparaat te demonstreren hebben we een nieuw type experiment uitgevoerd, waarbij twee DNA-moleculen onafhankelijk in drie dimensies worden gemanoeuvreed. Met de techniek kunnen specifiek gebonden eiwitten op het DNA worden gedetecteerd en kan de sterkte van de eiwit-DNA binding worden bepaald. Het experiment zit als volgt in elkaar. Nadat de twee DNA-moleculen zijn gevangen wordt één DNA molecuul om het andere heen gewonden. Vervolgens worden ze strakgetrokken zodat een gevlochten structuur ontstaat zoals weergegeven in Figuur 4.1 op pagina 55. De bolletjes die het eerste DNA vasthouden worden nu tegelijk bewogen zodat het 'knoopje' langs het tweede DNA schuift op een manier die lijkt op de wijze waarop zogenaamde motoreiwitten in de cel langs het DNA 'lopen'. Als er nu obstakels op het DNA aanwezig zijn, kan dit knoopje erachter blijven haken, waardoor er een extra kracht komt te staan op het DNA, die weer via een van de bolletjes gemeten kan worden.

Het eerste verkregen resultaat, dat *a priori* niet zonneklaar was, was dat zonder enige obstakels op het DNA de wrijving tussen de twee stukken DNA-moleculen die in het lusje strak langs elkaar bewegen verwaarloosbaar klein is (< 1 pN, Figuur 4.4 op pagina 58). Dit betekent dat er geen sterke (aantrekkende) interacties tussen twee stukken DNA zijn. Vervolgens hebben we het experiment herhaald in de aanwezigheid van EcoRI restrictie-enzymen, onder omstandigheden waarbij het eiwit wel aan het DNA bindt maar het niet knipt. In dit geval zagen we duidelijke pieken in de kracht, die precies overeen kwamen met de vooraf bekende locaties van de herkeningsplaatsen op het DNA (Figuur 4.6 op pagina 60). Dit betekent dus dat met deze nieuwe tasttechniek de binding van afzonderlijke eiwitten in oplossing kan worden gemeten. De kwestie die nu rijst is: blijven de eiwitten aan het DNA gebonden als het knoopje wat strakker wordt getrokken en dus meer kracht uitoefent, of worden ze er dan vanaf getrokken? Om deze vraag te beantwoorden hebben we het DNA eerst 'geladen' met eiwitten, en vervolgens het scanningexperiment uitgevoerd in een oplossing zonder eiwit. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Figuur 4.7 op pagina 62. Wat we zagen was dat, mits het DNA niet te strak aangetrokken was, de

eiwitten aan het DNA gebonden bleven. Als we harder trokken, zagen we bij opeenvolgende scans steeds minder eiwitten. De gemeten kracht per waargenomen eiwit was hier ook een stuk groter. Hieruit concluderen we dat bij een strakke knoop het eiwit van het DNA afgetrokken wordt, terwijl een lossere knoop op een gegeven moment langs het eiwit schiet zonder de binding te verstoren.

De nauwkeurigheid waarmee we individuele bindingslocaties kunnen meten is ongeveer 50 baseparen. Dit getal is op zichzelf niet wereldschokkend. Wel is het zo dat dit de eerste lokalisatietechniek is waarbij zowel het DNA als het eiwit intact blijven. Wellicht is het in de nabije toekomst mogelijk om met deze techniek dynamisch eiwitbinding te bestuderen.

DNA-lussen gevormd door dubbel-bindende restrictie-enzymen

Zoals eerder genoemd zijn er veel biologische processen waarbij meerdere DNA stukken betrokken zijn. Sinds een aantal jaar pas is bekend dat ook veel restrictie-enzymen interactie hebben met twee kopieën van hun herkenningsplaats. Als deze twee *sites* zich op één DNA molecuul bevinden kan er een lus (*loop*) in het DNA worden gemaakt. Dit is in 1991 voor het eerst direct aangetoond aan de hand van elektronmicroscopie-foto's [186]. Sindsdien is DNA-lusformatie door restrictie-enzymen bestudeerd met verschillende, veelal biochemische methoden. Bij deze werkwijzen is het bewijs voor het vormen van DNA-lussen echter altijd indirect of wordt er slechts een momentopname gemaakt. Hierdoor geven dit soort experimenten weinig inzicht in de onderliggende DNA-lus *kinetiek*. In Hoofdstuk 5 beschrijf ik zogenaamde *tethered particle motion* (TPM) experimenten aan de restrictie-enzymen NaeI en NarI, die ik heb uitgevoerd in het lab van prof. Francesco Pavone in Florence (Italië). De TPM techniek maakt het mogelijk om *real-time* de vorming van DNA-lussen door deze enzymen te volgen. DNA-moleculen worden vastgemaakt met het ene uiteinde aan een microscopisch klein plastic (polystyreen) bolletje, en met het andere uiteinde aan het oppervlak van een microscoopglasje, zoals weergegeven in Figuur 5.2b op pagina 74. Door de Brownse beweging zullen de bolletjes willekeurig heen en weer bewegen als een bal aan een touwtje. De gemiddelde uitwijking van deze beweging ten opzichte van het bevestigingspunt hangt af van de lengte van het DNA molecuul. Door simpelweg de positie van het bolletje in de tijd te meten met behulp van een microscoop en een videocamera kan men veranderingen in de lengte van het DNA dus direct bepalen.

Voor de experimenten heb ik twee verschillende DNA-moleculen gebruikt, die elk twee bindingsplaatsen hadden voor één van de twee restrictie-enzymen. Het DNA geschikt voor het ene enzym kon dus tevens gebruikt worden als controlemolecuul (geen sites) voor het andere enzym en vice versa. Met NaeI in de oplossing bleek het niveau van de Brownse beweging te schakelen tussen twee discrete waarden, die

bovendien onafhankelijk waren van de eiwitconcentratie (Figuur 5.3 op pagina 77). Een logische verklaring hiervoor is dat wanneer het eiwit een lus van karakteristieke grootte in het DNA introduceert, de effectieve lengte ervan met diezelfde omvang afneemt. De geregistreerde gemiddelde uitwijkingen waren inderdaad in goede overeenstemming met de verwachte waarden voor specifiek gelust en vrij DNA. Door te kijken naar de verdeling van lustijden hebben we de bindingstijd van het complex bepaald. We hebben ook geconstateerd dat het vormen van een lus volledig bepaald wordt door de snelheid waarmee de twee plekken op het DNA bij elkaar komen; het eiwit blijft steeds aan één van de sites gebonden, terwijl de andere herhaaldelijk loslaat en weer bindt. Deze constatering wordt ondersteund door de kristalstructuur van NaeI, waarin twee verschillende DNA-bindende domeinen zichtbaar zijn.

Bij het eiwit NarI kregen we heel andere resultaten: hier fluctueerde de gemiddelde uitwijking van het bolletje tussen veel meer dan twee waarden (Figuur 5.4 op pagina 78). Dit is een aanwijzing dat NarI naast eventueel specifieke lussen, ook niet-specifieke lussen maakt in het DNA. Dit vermoeden werd versterkt doordat bij steeds hogere NarI concentraties door vele niet-specifieke lussen het DNA effectief almaar korter werd.

De tot nu toe beschreven experimenten waren gedaan in een oplossing zonder metaal-ionen, zodat de enzymen het DNA niet konden knippen. Over het algemeen gebruiken restrictie-enzymen hier magnesium of mangaan voor. Het metaal-ion calcium daarentegen heeft de handige eigenschap dat het wel specifieke eiwitbinding stimuleert, maar knippen tegenhoudt. Door toevoeging van calcium-ionen werd de NaeI binding dan ook enorm versterkt. De gemiddelde bindingstijd nam toe van een tiental seconden tot een uur. Bij NarI verwachtten we eenzelfde soort resultaat. De data van NarI met calcium, weergegeven in Figuur 5.5 op pagina 81, laten zien dat er in dit geval wel degelijk specifieke binding plaatsvindt en dat de niet-specifieke lussen worden onderdrukt. Maar de levensduur van het specifieke NarI-DNA complex is erg kort, slechts een paar seconden. We denken dat deze korte levensduur de oorzaak is dat NarI slechts één DNA streng knipt voor het complex weer uiteenvalt.

De in dit proefschrift beschreven metingen zijn de eerste waarin DNA lussen door restrictie-enzymen in individuele DNA-moleculen direct en in real-time waargenomen worden. Vóór deze experimenten was de TPM techniek alleen toegepast op andere eiwitssystemen, zoals de gen-regulatoren Lac en Gal repressor. De nieuwe resultaten bieden dus de mogelijkheid DNA-lus mechanismen van eiwitten met heel verschillende structuur en functie te vergelijken.

Condenseren van individuele DNA-moleculen

In vrijwel alle levende organismen zit het genetisch materiaal dicht opeengepakt in de cel of celkern. Virussen spannen hierbij de kroon. In water heeft het viraal DNA

een volume dat 10000 keer zo groot is als het virus zelf! Omdat DNA ook nog sterk negatief elektrisch geladen is – en dus zichzelf afstoot – wordt het DNA onder enorme druk in de virushuls geperst. In de meeste bacteriofagen wordt de electrostatische afstoting enigszins gereduceerd door de aanwezigheid van *polyaminen*, kleine positief geladen moleculen die binden aan de buitenkant van het DNA. Een interessant verschijnsel is dat DNA los in een waterige oplossing in de aanwezigheid van lage concentraties polyaminen samenklontert tot een spoelvormig ‘condensaat’, waarvan de structuur verdacht veel lijkt op hoe het DNA in virussen zit opgerold. Figuur 1.4 op pagina 10 is een elektronenmicroscopiefoto van zo’n DNA condensaat.

Het laatste deel van dit proefschrift, Hoofdstuk 6, gaat over DNA condensatie van individuele DNA-moleculen door het polyamine *spermine*. Als eerste laten we m.b.v. fluorescentiemetingen zien dat DNA dat vastgehouden wordt tussen twee bolletjes in optische pincetten die langzaam naar elkaar toe bewegen samenpakt in een enkel condensaat, waarvan de fluorescentie-intensiteit ruwweg overeenkomt met de hoeveelheid DNA die erin zit (Figuur 6.1 op pagina 91). De resultaten tonen ook aan dat DNA van beide kanten van het condensaat met gelijke snelheid ingerold wordt, en dat de bolletjes geen directe invloed hebben op het condensatieproces. Vervolgens beschrijf ik een opvallende *hysterese*⁴ in het elastisch gedrag van DNA in de aanwezigheid van spermine. We vonden dat, als er eenmaal een begin van condensatie is, het proces heel snel verloopt en het DNA wordt strakgetrokken tot een kracht van 3-5 pN (Figuur 6.3 op pagina 94). Door het DNA met verschillende snelheden te relaxeren laten we zien dat de afnemende kracht de barrière voor condensatie verlaagt. In onze experimenten hebben we heel precieze controle over de afstand tussen de twee bolletjes, waardoor het mogelijk is de condensatie van DNA met hoge resolutie te bestuderen. Een opmerkelijke ontdekking die we hebben gedaan is dat condensatie en de-condensatie van DNA bij de eerder genoemde krachten in kleine discrete stappen van ongeveer 40 nanometer (nm) verloopt (Figuren 6.5 en 6.7 op pagina’s 97 en 100). De omtrek van gecondenseerde DNA-spoelen in oplossing is veelal 200 tot 300 nm. De door ons gedetecteerde stappen zijn dus een stuk kleiner. Toch denken we dat we hier te maken hebben met het (af)wikkelen van individuele DNA windingen. Door de aanwezige kracht op het DNA is de energetisch optimale grootte van een DNA-lus namelijk veel kleiner (30-40 nm) dan wanneer het DNA niet onder spanning staat. Hier is in eerdere optisch-pincet metingen aan DNA condensatie geen rekening mee gehouden. Tenslotte hebben we ontdekt dat voor een stabiel condensaat minimaal twee DNA windingen nodig zijn. Alle resultaten wijzen daarmee in de richting dat er inderdaad spoelvormige DNA condensaten worden gevormd op DNA onder mechanische spanning, iets wat met andere technieken nooit is aangetoond.

⁴Hysterese is het verschijnsel dat een gemeten grootte (in dit geval de kracht) niet alleen afhangt van de grootte van de variabele (hier de DNA-uitrekking), maar ook van de richting waarin deze verandert.

Conclusies

Dit proefschrift beschrijft een van de eerste single-molecule onderzoeken naar Type II restrictie-enzymen. De uitgevoerde experimenten hebben nieuwe kennis over deze eiwitten opgeleverd die met andere strategieën niet of nauwelijks te achterhalen zou zijn geweest. De algemene uitdaging van single-molecule experimenten om genoeg statistiek te vergaren geldt extra voor restrictie-enzymen, die immers bij elke reactie het DNA-construct kapotknippen. Dit probleem hebben wij aanzienlijk verkleind door de ontwikkeling van een goed werkend flowsysteem met meerdere kanalen, waarin DNA-constructen *on the fly* kunnen worden opgebouwd.

Onze resultaten dragen bij aan de kennis van knip- en zoekmechanismen van DNA-eiwitten. We hebben ook ontdekt hoe sommige dubbel-bindende restrictie-enzymen werken en wat voor invloed dit heeft op de knipreactie. De geconstrueerde optisch-pincet opstelling is verder uitgebouwd zodat er ook twee DNA-moleculen tegelijk mee kunnen worden gemanipuleerd. Deze mogelijkheid hebben we gebruikt voor een nieuwe DNA-scan techniek om DNA-gebonden eiwitten te detecteren. Daarnaast hebben we sommige openstaande vragen over DNA condensatie opgelost.

In de nabije toekomst kunnen de hier beschreven experimenten worden gecombineerd om zo een antwoord te kunnen geven op de vraag in welke mate de DNA sites in gecondenseerd DNA bereikbaar zijn voor eiwitten. Met de experimentele opstelling zullen steeds complexere dynamische reacties en bindingen tussen meerdere DNA-moleculen onderzocht worden, teneinde bij te dragen aan onze kennis van de elementaire bouwstenen van levende systemen.