

**Imaging of DNA and DNA-RAP1 assembly  
by STM, TEM and SFM**

A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH**

for the degree of  
**Doctor of Natural Sciences**

presented by

**Thomas Müller**



Cat E

Dipl. Biologe J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main (Germany)  
M.S. Zoology Eastern Illinois University (USA)  
born January 3<sup>rd</sup>, 1962  
citizen of Frankfurt/Main (Germany)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Moor, examiner  
Dr. H. Gross, co-examiner  
Dr. S.M. Gasser, co-examiner

## Summary

In conventional Transmission Electron Microscopy (TEM) small, filamentous structures like DNA have to be contrast enhanced at low elevation angles prior to imaging. This shadowing at low elevation angles results in self-shadowing, which limits the analysis of TEM specimens mainly to length measurements.

As a non-contact surface imaging technique the Scanning Tunneling Microscope (STM) uses the electrical current flowing between the metal tip and a conductive substrate as an imaging signal. For imaging by STM DNA has been adsorbed to freshly cleaved mica. To achieve sufficient electrical conductivity of DNA on mica two different techniques have been applied: A, Ethanol-dried samples were embedded in a Pt/C film. The metal film was peeled off the mica and the previously mica exposed side of the metal film was embedded, bare DNA molecules could be analyzed by STM. However, only hollow trenches in the metal film, but not the DNA itself could be visualized applying this technique. B, DNA has been coated by 0.7-1 nm Pt/Ir/C. Because of the high Z-resolution of the STM coating could be carried out at a high elevation angle thereby minimizing the problem of self shadowing. By STM imaging has been achieved routinely. Coating by Pt/Ir/C allows visualization of freeze-dried biological specimens under atmospheric conditions. Compared to freeze-dried molecules DNA after ethanol drying appeared to be about 15-20 % broadened and about 20-30 % flattened.

A combination of STM and TEM has been applied to study telomeric DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. By binding to a 13 bp consensus found in the telomeric repeat sequences, the multifunctional nuclear factor RAP1 (Repressor Activator Protein 1) participates in telomeric structure as the major yeast protein. The following structural features of DNA-RAP1 assembly have been analyzed: (1) RAP1-induced DNA bending. By TEM analysis it has been demonstrated that both, RAP1 and its minimal DNA-binding domain (DBD) bind efficiently and specifically to their single telomeric recognition sequence on cloned DNA fragments. By STM it has been shown that RAP1 is able to induce a bend in the double helix of  $\geq 50^\circ$ . A protein-induced DNA bend  $\leq 30^\circ$  could be detected for the DBD. This has been the first visualization of a eukaryotic DNA-protein complex in which DNA binding and bending domains could be mapped to separate parts of the polypeptide. (2) RAP1-induced supercoiling. It could

be shown by TEM that RAP1 is able to induce supercoiling upon association with its binding sites on circular DNA. It has been demonstrated (Gilson *et al.*, 1994) that this RAP1-induced change in DNA topology is due to negative supercoiling. This alteration in DNA topology caused by RAP1 was found to be due to untwisting the double helix slightly at its binding site, and not to be due to a change in writhe, which occurs upon the wrapping of DNA around its ligand. (C), Higher order telomeric structure. The ability of RAP1 to induce a higher order structure has been analyzed. Despite of its ability to bend DNA a RAP1-induced folding into a non-nucleosomal, compact structure could not be observed by TEM.

Scanning force microscopy (SFM) has been applied to analyze DNA and DNA-RAP1 complexes. DNA was embedded in carbon and peeled off the mica. Embedded DNA could be imaged in air, in buffer solution, and in ethanol without lateral displacement. Coating by Pt/Ir/C to achieve sufficient attachment of DNA to mica appeared to be disadvantageous. Good results have been obtained by imaging of bare DNA in ethanol. Scanning in ethanol had the advantage of "cleaning" contaminated tips during scanning. Compared to STM images DNA-RAP1 complexes embedded in carbon and imaged in air appeared to be of lower resolution.

## Zusammenfassung

Dünne, filamentöse Strukturen wie DNA müssen in der konventionellen Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zur besseren Visualisierung bei kleinem Winkel kontrastverstärkt werden. Dieses Bedampfen mit Schwermetallen resultiert allerdings in Eigenbeschattung und beschränkt daher die Analyse von elektronenmikroskopischen Bildern weitgehend auf Längenmessungen.

Das Raster-Tunnelmikroskop (RTM) nutzt einen kleinen Strom, der zwischen einer Metallspitze und einer leitenden Probe fließt, zur Bildentstehung. Zur Abbildung mit dem RTM wurde DNA auf frisch gespaltenem Glimmer adsorbiert. Um eine hinreichende elektrische Leitfähigkeit zu erreichen, wurden zwei Methoden angewandt: A) Ethanol-luftgetrocknete Proben wurden in einen Pt/C-Film eingebettet. Der Metallfilm wurde vom Glimmer abgezogen, um die vormals adsorbierte Seite des Metallfilms mit eingebetteter "nackter" DNA zu analysieren. Unter Anwendung dieser Technik konnte allerdings nicht die DNA selbst, sondern nur "hohle Gräben" in der Metallschicht abgebildet werden. B) DNA wurde mit einem Metallfilm aus Pt/Ir/C (0.7-1 nm Schichtdicke) überzogen und routinemäßig abgebildet. Bedingt durch die hohe Z-Auflösung des Mikroskops konnten die Proben unter steilem Winkel bei 65 ° bedampft und damit die Probleme der Eigenbeschattung minimalisiert werden. Auch die Abbildung gefriergetrockneter Proben war unter atmosphärischen Bedingungen möglich. Im Vergleich zu gefriergetrockneten Molekülen war bei Ethanol-luftgetrockneten Proben eine Verbreiterung um etwa 15-20 % und eine Abflachung um etwa 20-30 % zu beobachten.

Eine Kombination von RTM und TEM wurde zur Analyse von telomerischer DNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* angewandt. Der multifunktionelle Faktor RAP1 (Repressor-Aktivator-Protein 1) bindet dabei an eine aus 13 Basenpaaren bestehende telomerische Konsensus-Sequenz. Als Hauptbestandteil der Hefetelomeren ist RAP1 an der Etablierung der Chromatinstruktur der Chromosomenenden beteiligt. Folgende Fragestellungen wurden hierzu untersucht: (1) RAP1-induzierter "Knick" der DNA (bending). Mittels TEM wurde zunächst die korrekte Bindung von RAP1 und der minimalen DNA-Bindungsdomäne an eine telomerische Erkennungssequenz auf einem klonierten DNA-Fragment bestätigt. Mit dem RTM konnte nachgewiesen werden, daß RAP1 einen Knick  $\geq 50^\circ$  und die Bindungsdomäne einen Knick von

$\leq 30^\circ$  in der DNA-Doppelhelix induziert. Zum ersten Mal konnte damit ein eukaryontischer DNA-Protein-Komplex abgebildet werden, bei dem eine Bindungs- und eine "Bending-Domäne" verschiedenen "Abschnitten" eines Polypeptids zugeordnet werden konnten. (2) RAP1-induziertes "supercoiling". Durch Assoziation mit zirkulärer DNA konnte nachgewiesen werden, daß RAP1 "supercoiling" induzieren kann. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß diese Änderung der DNA-Topologie durch ein negatives "supercoiling" hervorgerufen wird (Gilson *et al.*, 1994). Diese Änderung der DNA-Topologie ist dabei die strukturelle Konsequenz einer leichten Entdrilling der DNA an der RAP1-Bindungsstelle; ein Umwinden der DNA um RAP1 konnte ausgeschlossen werden. (3) Strukturen höherer Ordnung. Die Bildung von nicht-nukleosomalen, kompakten Strukturen durch RAP1 konnte mit dem TEM nicht nachgewiesen werden.

Auch die Raster-Kraftmikroskopie (RKM) wurde zur Analyse von DNA und DNA-RAP1-Komplexen angewandt. DNA wurde dazu in Kohlenstoff eingebettet und von der Glimmeroberfläche abgezogen. Die eingebettete DNA konnte ohne laterale Verschiebung an Luft, in Pufferlösung und in Ethanol abgebildet werden. Eine Bedampfung mit Pt/Ir/C zur Stabilisierung der Moleküle erwies sich als nachteilig. Gute Ergebnisse wurden jedoch durch Abbildung von "nackter" DNA in Alkohol erreicht. Zudem wurde bei einer Abbildung in Alkohol eine Reinigung der Spitze beobachtet. Im Vergleich zu einer Visualisierung von DNA-RAP1-Komplexen mit dem RTM ergab die Abbildung von Kohlenstoff-eingebetteter DNA mit dem RKM schlechtere Ergebnisse.