

SCALING PROPERTIES OF DNA KNOTS STUDIED BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

THÈSE N° 4041 (2008)

PRÉSENTÉE LE 4 AVRIL 2008

À LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BASE
LABORATOIRE DE PHYSIQUE DE LA MATIÈRE VIVANTE
PROGRAMME DOCTORAL EN PHYSIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Erika ERCOLINI

laurea in fisica, Università degli studi di Roma "La Sapienza", Italie
et de nationalité italienne

acceptée sur proposition du jury:

Prof. R. Schaller, président du jury
Prof. G. Dietler, directeur de thèse
Prof. P. De Los Rios, rapporteur
Prof. R. Metzler, rapporteur
Dr A. Stasiak, rapporteur



ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

Suisse
2008

Scaling Properties of DNA Knots Studied by Atomic Force Microscopy

PhD Thesis

Erika Ercolini

Laboratory of Physics of Living Matter, IPMC, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL),
CH-1015 Lausanne, Switzerland

Abstract

The main subject of the present thesis is the experimental study of the scaling properties of DNA knots of different complexities by tapping mode atomic force microscopy (AFM) in air. Homo- or heterogeneous mixture of DNA knot types were deposited onto mica in regimes of (i) strong adsorption, which induces a kinetic trapping of the molecules, and of (ii) weak adsorption, which permits relaxation on the surface. The contour of each knotted molecule was analyzed by a box counting algorithm, giving the number of boxes containing a part of the molecule, $N(L)$, as a function of the box size, L , allowing to recover the relation $N(L) \approx L^{-d_f}$, where d_f is the fractal dimension and $\nu = 1/d_f$ is the scaling exponent. This relationship is complicated by the presence of a persistence length of DNA (about 50 nm) which introduces a crossover from a rigid rod behavior to a self-avoiding walk behavior. In (i) the radius of gyration of the adsorbed DNA knot scales with the 3D Flory exponent $\nu \approx 0.58$ within error. In (ii), the value $\nu \approx 0.66$, intermediate between the 3D and 2D ($\nu = 3/4$) exponents, was found, indicating an incomplete 2D relaxation or a different polymer universality class. A different analysis, where the fractal dimension was determined by a customized box counting algorithm giving the knot mass as a function of the box size, yielded compatible results.

In the case of weak binding conditions, AFM images show evidence of the localization of knot crossings, which is an effect theoretically predicted for knotted polymers confined in two dimensions (flat knots).

Part of this thesis is dedicated to a fascinating application of AFM: the imaging of biomolecules in an aqueous buffer. In particular, images of plasmids adsorbed to mica strong enough to be visualized and loosely enough to see them moving in consecutive scans will be shown. The possibility of imaging under buffer molecules loosely anchored to the substrate opens the way to the investigation of biological processes near physiological conditions. The first step of the study of homologous recombination will be presented. We will also show images concerning our study of the activity of topoisomerase I on supercoiled plasmids. Clusters of DNA molecules and proteins were found when imaging in presence of magnesium, in agreement with recent findings by AFM in air. The research on topoisomerases and their interactions with inhibitors or poisons is a hot topic, being these enzymes targets of anti-cancer drugs. Our study paves the way to the investigation of the activity of topoisomerase II, the enzyme which removes knots from DNA.

Finally, the principles of static and dynamic light scattering, and the results of dynamic light scattering on latex beads of known size will be presented. Particular emphasis will be given to the discussion of the contribution of light scattering techniques for future experiments on the study of the static and dynamic properties of DNA knotted molecules in solution. These experiments would contribute to shed light on the possible dependence of the gyration radius of knotted polymers on the knot type, and would allow testing theoretical predictions about their relaxation time.

KEYWORDS: atomic force microscopy, light scattering, polymer physics, Flory exponent, DNA, DNA knots, homologous recombination, RecA-ssDNA complex, topoisomerases, trapping, equilibration.

Propriétés d'échelle des nœuds d'ADN étudiées par microscopie à force atomique

Thèse de doctorat

Erika Ercolini

Laboratoire de Physique de la Matière Vivante, IPMC, École Polytechnique Fédérale de Lausanne
(EPFL), CH-1015 Lausanne, Suisse

Résumé

Le sujet principal de cette thèse est l'étude expérimentale des propriétés d'échelle des nœuds d'ADN de différentes complexités par microscopie à force atomique (AFM) en air. Des échantillons de types de nœuds d'ADN homo- ou hétérogènes ont été déposés sur mica en régime (i) d'adsorption forte, qui cause un piégeage cinétique des molécules (*trapping*), et (ii) d'adsorption faible, qui permet aux molécules de s'équilibrer sur la surface. Le contour de chaque molécule nouée a été analysé avec un algorithme de *box counting*, donnant le nombre de cases contenant une partie de la molécule, $N(L)$, en fonction de la dimension de la case, L , permettant ainsi d'exprimer la relation $N(L) \approx L^{-d_f}$, où d_f est la dimension fractale et $\nu = 1/d_f$ l'exposant d'échelle. Cette relation est complexifiée par la longueur de persistance de l'ADN (environ 50 nm), qui introduit une transition d'un comportement de cylindre rigide à celui d'une marche aléatoire auto-évitante. Dans le cas (i), le rayon de giration du nœud d'ADN adsorbé obéit à une loi d'échelle caractérisée par un exposant de Flory tridimensionnel $\nu \approx 0.58$. Dans le cas (ii) la valeur $\nu \approx 0.66$, intermédiaire entre les exposants tridimensionnel et bidimensionnel ($\nu = 3/4$) a été trouvée, indiquant une relaxation bidimensionnelle partielle ou une classe d'universalité différente. Une analyse différente des données, où la dimension fractale a été calculée par un algorithme de *box counting* spécifique donnant la masse du nœud en fonction de la dimension de la case, a produit des résultats comparables.

En conditions d'adsorption faible, les images AFM montrent la localisation des croisements du nœud, un effet prévu théoriquement pour des polymères noués confinés en deux dimensions (nœuds plats).

Une partie de cette thèse est dédiée à une application fascinante de l'AFM : l'imagerie de molécules en liquide. En particulier, des images de plasmides adsorbés au mica assez fortement pour les visualiser et assez faiblement pour les voir en mouvement seront montrées. L'imagerie AFM en liquide avec des molécules faiblement liées à la surface ouvre la voie à l'étude de processus biologiques dans des conditions quasi physiologiques. La première étape de l'étude de la recombinaison homologue sera présentée. On montrera aussi des images de l'étude de l'activité de la topoisomérase I sur l'ADN surenroulé. Des agrégats de molécules d'ADN et de protéines ont été trouvés lors de l'imagerie en présence de magnésium, en accord avec de récents résultats d'AFM en air. La recherche sur les topoisomérases et leurs interactions avec des inhibiteurs ou des poisons est un sujet d'actualité, ces enzymes étant des cibles de médicaments anti-cancer. Notre étude prépare à celle de la topoisomérase II, l'enzyme qui dénoue l'ADN.

Finalement, les principes de base de la diffusion statique et dynamique de la lumière, ainsi que les résultats de diffusion dynamique de la lumière sur des sphères en latex de rayon connu seront présentés. On mettra en particulier en évidence la contribution des techniques de diffusion de la lumière pour de futures expériences sur l'étude des propriétés statiques et dynamiques des nœuds d'ADN en solution. Ces expériences contribueraient à clarifier la possible dépendance entre le rayon de giration des polymères noués et le type de nœud, et pourraient permettre la vérification des prévisions théoriques sur leur temps de relaxation.

MOTS CLÉS : microscopie à force atomique, diffusion de la lumière, physique des polymères, exposant de Flory, ADN, nœuds d'ADN, recombinaison homologue, complexe RecA-ADN simple brin, topoisomérases, trapping, équilibration.

Contents

Introduction	1
1 Atomic Force Microscopy	5
1.1 Introduction	5
1.2 Scanning Probe Microscopy	5
1.3 Atomic Force Microscopy	6
1.3.1 Basic principles of an AFM	7
1.4 Primary AFM imaging modes	9
1.4.1 Contact mode imaging	9
1.4.2 Non-contact mode imaging	11
1.4.3 Intermittent-contact mode imaging (tapping mode)	12
1.4.4 Experimental methods to excite the cantilever in dynamic AFM modes	13
1.4.5 Oscillation tip dynamics in the tapping mode AFM	15
1.5 Force spectroscopy	16
2 Fractal Properties of DNA Knots Studied by Atomic Force Microscopy	19
2.1 Introduction	19
2.2 A bit of knot history	20
2.3 Some basic knot theory	21

2.3.1	What is a knot?	21
2.3.2	Classification of knots	21
2.3.3	Prime knots and composite knots	22
2.3.4	Reidemeister moves	24
2.3.5	Knot invariants	24
2.4	General aspects of polymer chains	26
2.4.1	Polymer chains	26
2.4.2	Polymers as random walks	26
2.4.3	Persistence length of a polymer	29
2.4.4	Polymers as self-avoiding walks (SAWs)	30
2.5	Knotted polymers	32
2.5.1	Scaling properties of knotted polymers	33
2.5.2	Localization	33
2.6	Knots in biopolymers	34
2.6.1	Knots in proteins	34
2.6.2	Knots in deoxyribonucleic acid (DNA) molecules	36
2.6.3	Knots in DNA and their biological relevance	38
2.6.4	How to produce DNA knots	39
2.7	Imaging of DNA knots by Atomic Force Microscopy	41
2.7.1	DNA sample preparation for AFM imaging	42
2.7.2	Mica	42
2.7.3	APTES modified mica	42
2.7.4	Deposition from a solution containing divalent cations	44
2.7.5	AFM images of complex and simple DNA knots	45
2.7.6	Separation of different DNA knot types by gel electrophoresis	48

2.8	Study of the scaling properties of DNA knots by AFM	50
2.8.1	Experimental results for the scaling exponents	51
2.8.2	Discussion	55
2.8.3	Results for the persistence length	57
2.8.4	Result for the localization	58
2.9	Imaging with high-resolution tips	60
2.10	Conclusions and perspectives	63

3 Imaging of Mobile DNA Molecules and Study of the Activity of Topoisomerase I by AFM in Liquid 67

3.1	Introduction	67
3.2	AFM in liquid	68
3.3	AFM imaging of DNA molecules in liquid	68
3.4	Imaging of molecules in motion	70
3.4.1	Mobile DNA	71
3.4.2	RecA-single stranded DNA complexes	74
3.5	Study of the activity of Topoisomerase I by AFM in liquid	78
3.5.1	Circular DNA	78
3.5.2	Topological and geometrical aspects of covalently closed circular DNA	78
3.5.3	Topoisomerases	81
3.5.4	Sample preparation	85
3.5.5	Results	85
3.5.6	Artifact of liquid AFM imaging	90
3.5.7	Discussion	91
3.6	Conclusions and perspectives	92

4	Static and Dynamic Light Scattering to study DNA Knots in Solution	95
4.1	Introduction	95
4.2	Basic light scattering theory	95
4.2.1	Static light scattering	96
4.2.2	Dynamic light scattering	99
4.3	Static and dynamic light scattering on monodispersed latex spheres .	100
4.3.1	Static light scattering results	101
4.3.2	Dynamic light scattering results	101
4.4	Study of DNA molecules by light scattering	103
4.5	Applications of light scattering to the study of DNA knots	104
	General Conclusions and Perspectives	107
A	Air AFM imaging of DNA molecules deposited on different substrates	111
B	Knot tracing trials	115
C	pBR322 DNA and topoisomerase I imaged in air	117
D	Static light scattering measurements on toluene and 112 nm-diameter latex spheres	119
	Bibliography	121
	Acknowledgements	145