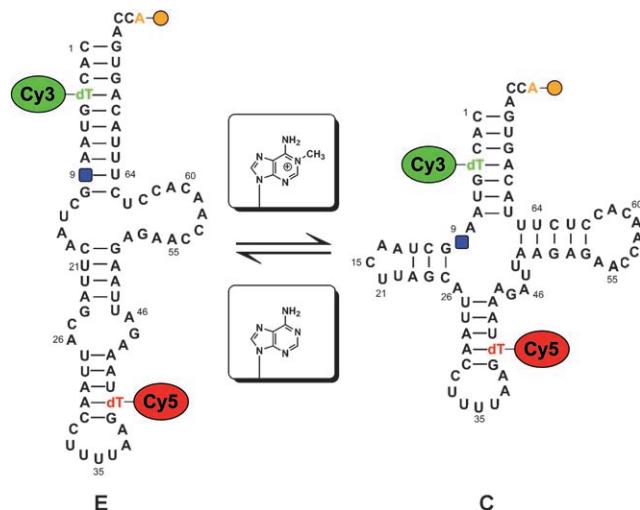


# Ausformung einer RNA-Konformationsenergielandschaft durch eine Methylgruppenmodifikation – eine Einzelmolekül-FRET-Studie\*\*

Andrei Yu. Kobitski, Martin Hengesbach, Mark Helm und G. Ulrich Nienhaus\*

RNA ist an einer Vielzahl biologischer Vorgänge beteiligt, z.B. der Speicherung und Weitergabe von Informationen, dem Aufbau von Strukturgerüsten sowie der Genexpression und -regulation. Ähnlich wie Proteine faltet sich RNA zu kompakten dreidimensionalen Strukturen. RNA-Faltung und -Dynamik werden durch Übergänge in einer komplexen Konformationsenergielandschaft beschrieben, die eine große Zahl von Faltungszuständen umfasst. RNA bildet räumlich begrenzte, stabile Strukturmotive aus, die sich mithilfe von tertiären Wechselwirkungen zu größeren dreidimensionalen Strukturen zusammenlagern.<sup>[1-3]</sup> Das begrenzte Repertoire an funktionellen Gruppen wird häufig durch posttranskriptionelle Modifikationen der Ribonucleotide erweitert, die sterische Konflikte hervorrufen, Ladungen einführen oder die Anordnung von Wasserstoffbrücken und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen verändern können.<sup>[4]</sup> Dadurch kann die Konformationsenergielandschaft so verändert werden, dass eine bestimmte funktionelle Faltung der RNA selektiv stabilisiert wird. Ein typisches Beispiel hierfür ist die humane mitochondriale (mt) Lysin-Transfer-RNA (tRNA<sup>Lys</sup>), die insgesamt sechs modifizierte Basen enthält.<sup>[5]</sup> Von einer dieser Modifikationen, der Methylierung von N1 des Adenosins 9 ( $m^1A9$ ), ist bekannt, dass sie das Gleichgewicht zwischen einer nichtfunktionellen, erweiterten Haarnadelstruktur und der funktionellen Kleeblattstruktur stark beeinflusst (Abbildung 1).<sup>[6-8]</sup> Hier untersuchen wir den Einfluss dieser biologisch relevanten Modifikation auf die Struktur und Energetik der mt-tRNA<sup>Lys</sup> mithilfe von resonantem Fluoreszenz(oder Förster)-Energietransfer einzelner Moleküle (emFRET). Die Methode ist außerordentlich empfindlich für strukturelle Veränderungen auf atomarer Ebene und ermöglicht es, un-



**Abbildung 1.** Sekundärstrukturen humaner mt-tRNA<sup>Lys</sup>. Das Gleichgewicht zwischen der erweiterten Haarnadel- (E) und der Kleeblattstruktur (C) wird deutlich durch den Methylierungszustand des Adenosins 9 (blaues Quadrat) beeinflusst. Die Ankerpunkte der Cy3- und Cy5-Farbstoffe (mittels eines flexiblen Linkers) sind grün bzw. rot dargestellt; der gelbe Punkt steht für eine Biotingruppe, die zu Immobilisierungszwecken angebracht wurde.<sup>[8]</sup>

terschiedliche thermisch verfügbare Konformationen innerhalb eines Ensembles zu unterscheiden.<sup>[9-11]</sup>

Zwei FRET-markierte Vorläufer von mt-tRNA<sup>Lys</sup> wurden synthetisiert: die unmodifizierte (Wildtyp-)RNA, die der genomischen Sequenz entspricht (Kwt), und ein  $m^1A9$ -modifiziertes Konstrukt (Km<sup>1</sup>A).<sup>[8]</sup> Mithilfe eines hochempfindlichen konfokalen Mikroskops<sup>[12]</sup> wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten von Cy3-Donor- und Cy5-Akzeptor-Fluoreszenz, die während der Diffusion der Moleküle durch das konfokale Volumen des Mikroskops registriert wurden, die FRET-Effizienz einzelner Moleküle ermittelt. Während der kurzen Verweildauer im Messvolumen wurde die Fluoreszenzanregung periodisch zwischen einem grünen und einem roten Laser alterniert. Dies ermöglicht die Selektion derjenigen Moleküle, die ein funktionelles FRET-Paar tragen.<sup>[13,14]</sup> Mehrere tausend Fluoreszenzpulse wurden aufgenommen; die FRET-Effizienz wurde in Histogrammen zusammengefasst, indem Gruppen von Molekülen innerhalb von 0.04 FRET-Intervallen gebildet wurden. Diese Messungen wurden bei sechzehn Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen zwischen 0.0125 und 400 mM vorgenommen, da zweiwertige Kationen im Allgemeinen die tertiäre Faltung von RNA-Molekülen wirkungs- voll stabilisieren und insbesondere Mg<sup>2+</sup>-Ionen physiologisch von besonderer Bedeutung sind.<sup>[2,9,10,15-17]</sup> Variation der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration verändert die freien Enthalpien der RNA-

[\*] Dr. A. Y. Kobitski, Prof. Dr. G. U. Nienhaus

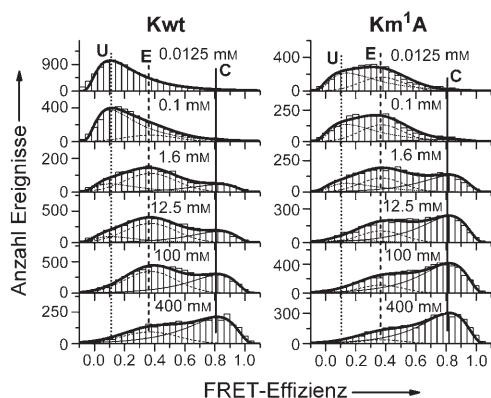
Institut für Biophysik, Universität Ulm  
89069 Ulm (Deutschland)  
Fax: (+49) 731-502-3059  
E-Mail: uli@uiuc.edu  
Homepage: <http://www.uni-ulm.de/navi/navi-biophys.html>  
M. Hengesbach, Dr. M. Helm  
Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie  
Universität Heidelberg  
69120 Heidelberg (Deutschland)  
Prof. Dr. G. U. Nienhaus  
University of Illinois at Urbana-Champaign  
Urbana, IL 61801 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (HE 3397/3), die Volkswagen-Stiftung und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Konformationen; die energetischen Parameter der  $Mg^{2+}$ -RNA-Wechselwirkungen können durch emFRET-Messung der Teilpopulationen der RNA-Konformationen bestimmt werden.<sup>[12,18]</sup> Mit diesem Ansatz wurden die thermodynamischen Auswirkungen der m<sup>1</sup>A9-Modifikation in tRNA<sup>Lys</sup> untersucht.

Sechs ausgewählte Histogramme der FRET-Effizienz von Kwt und Km<sup>1</sup>A sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Form der Histogramme verändert sich deutlich bei Änderung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration. Alle gemessenen Histogramme können durch



**Abbildung 2.** Histogramme der FRET-Effizienzen, gemessen an frei diffundierenden Kwt- (links) und Km<sup>1</sup>A-tRNA-Molekülen (rechts) in Pufferlösung bei sechs  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen. Die gepunkteten, gestrichelten und durchgezogenen Linien markieren die optimalen Modellverteilungen für die Zustände **U**, **E** bzw. **C**; die durchgezogene, stärkere Linie repräsentiert die Summe der drei Verteilungen.

Überlagerung dreier Verteilungen der FRET-Effizienz modelliert werden, deren jeweiliges Maximum bei niedrigen, mittleren und hohen FRET-Werten zu finden ist. Sie spiegeln drei Subpopulationen wider, die mit **U** (für ungefaltet), **E** (für erweiterte Haarnadel) und **C** („cloverleaf“; kleeblattähnliche L-Form) bezeichnet werden; die Gründe hierfür werden im weiteren Text erläutert. Für die quantitative Analyse wurden an die FRET-Histogramme die Summe zweier lognormaler Funktionen für die **U**- und **C**-Zustände sowie eine Gaußsche Normalverteilung für den **E**-Zustand angepasst.<sup>[12,19–21]</sup> Da die einzelnen Subpopulationen wegen ihrer Breite überlappen, wurde ein simultaner (globaler) Angleich für alle 32 Histogramme vorgenommen, wobei für alle drei Verteilungen identische Parameter für Position und Halbwertsbreite verwendet wurden; die optimalen Angleichparameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zwischen den Angleichen (Linien in Abbildung 2) und den experimentellen Ergebnissen wurde eine ausgezeichnete Übereinstimmung erzielt, was nahelegt, dass beide tRNA-Konstrukte die drei unterschiedlichen Konformationen **U**, **E** und **C** einnehmen können. Hierbei sind die strukturellen Eigenschaften dieser Zustände für beide Konstrukte so ähnlich, dass mit der verwendeten Methode nicht zwischen ihnen unterschieden werden kann.

FRET-Experimente können Strukturinformationen liefern, da die Donor-Akzeptor-Kopplung stark vom Abstand  $r$  abhängt [Gl. (1)], wobei der Förster-Radius für frei drehbare

**Tabelle 1:** Mittlere FRET-Effizienz,  $\langle E \rangle$ , und Halbwertsbreite (HWB) der drei Modellverteilungen für die **U**, **E**- und **C**-Konformationen, die durch einen globalen Angleich an die gemessenen Histogramme der FRET-Effizienz von tRNA<sup>Lys</sup> bestimmt wurden. Die aus  $\langle E \rangle$  berechneten Abstände  $r$  der Donor- und Akzeptorfarbstoffe sind ebenfalls aufgeführt (siehe Text).

	Funktion	$\langle E \rangle$	HWB	$r(\langle E \rangle)$ [Å] berechnet
<b>U</b>	lognormal	$0.25 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.03$	81
<b>E</b>	normal	$0.37 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.03$	65
<b>C</b>	lognormal	$0.69 \pm 0.02$	$0.37 \pm 0.03$	46

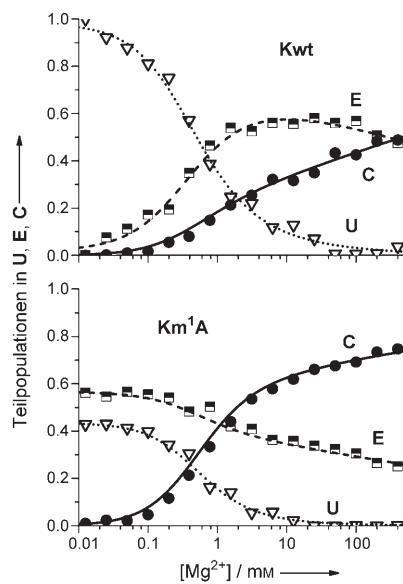
Cy3- und Cy5-Farbstoffe in wässriger Lösung  $R_0 = 53$  Å beträgt.<sup>[22,23]</sup>

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (1)$$

Für die Verteilung des **C**-Zustandes entspricht die gemessene  $\langle E \rangle$  nach Gleichung (1) einem Abstand  $r = 46.4$  Å. Dieser Wert ist dem Abstand von 42.8 Å zwischen den Befestigungspunkten ähnlich, welcher in der Kristallstruktur von tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe gemessen wurde.<sup>[24]</sup> Bei FRET-Messungen an farbstoffmarkierten DNA-Konstrukten hatten wir bereits bemerkt, dass der Förster-Radius recht genau dem Abstand der Befestigungspunkte entspricht, da die Farbstoffe durch flexible Linker mit dem Konstrukt verbunden sind und um diese Punkte herum fluktuieren.<sup>[23]</sup> Die gemessene FRET-Effizienz ist daher im Einklang mit der Zuordnung des **C**-Zustandes zur kleeblattähnlichen L-Form der gefalteten tRNA. Die Struktur des **E**-Zustandes ist nicht bekannt, doch Vergleiche durch chemische Kartierung zeigen, dass die RNA die Form einer erweiterten Haarnadel annimmt, die aus drei durch Schleifen verbundenen Helices besteht (Abbildung 1).<sup>[25]</sup> Außerdem wurde durch Messungen der transientes elektrischen Doppelbrechung ein Winkel von 140° zwischen Akzeptor- und Anticodon-Stamm bestimmt.<sup>[5]</sup> Unter Annahme eines Abstandes von 3.4 Å bzw. 6.3 Å je Nucleotid in einer Helix bzw. Schleife und eines Winkels von 140° zwischen beiden Armen kann ein Abstand von ca. 75 Å zwischen den beiden Befestigungspunkten abgeschätzt werden. Anwendung der einfachen Förster-Beziehung [Gl. (1)] ergibt einen etwas geringeren Abstand von  $r = 58$  Å für  $\langle E \rangle = 0.37$ . Es ist jedoch anzunehmen, dass die **E**-Konformation flexibel ist, sodass die Annahme eines konstanten Farbstoffabstandes nicht zutrifft. Bei Modellierung der RNA als fluktuierende Gauß-Kette ergibt sich  $\langle E \rangle$  als Mittelwert über alle relativen Abstände und Orientierungen des FRET-Paares;<sup>[12,20,26]</sup> dies ergibt einen Abstand  $r = 65$  Å, was noch immer unter unserer Abschätzung liegt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Bereich zwischen der zentralen Domäne und der Anticodon-Schleife stärker verdichtet ist, als in Abbildung 1 dargestellt. Für den **U**-Zustand ist a priori keine strukturelle Information verfügbar. Eine zufällige, gaußsche RNA-Kette ergäbe einen mittleren Abstand von 102 Å zwischen den Farbstoffen (siehe Hintergrundinformationen), wohingegen  $\langle E \rangle = 0.25$  einem Abstand von  $r = 81$  Å im **U**-Zustand entsprechen würde, wenn man die Förster-Beziehung für eine fluktuierende Kette

zugrunde legt.<sup>[12]</sup> Der gemessene kleinere Wert deutet an, dass die RNA im **U**-Zustand noch immer etwas Reststruktur besitzt.

In Abbildung 3 sind die Teilpopulationen der **U**-, **E**- und **C**-Zustände von Kwt und Km<sup>1</sup>A gegen die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration aufgetragen. Für beide Konstrukte ist ein ausgeprägter



**Abbildung 3:** Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Teilpopulationen in den Zuständen **U**, **E** und **C**. Linien kennzeichnen die Ergebnisse der Anpassung mit dem thermodynamischen Modell (siehe Abbildung 4).

Rückgang der Population im **U**-Zustand bei steigender Mg<sup>2+</sup>-Konzentration zu beobachten. Die **U**-Population hat ihren Mittelwert bei ca. 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> und wird von einem gleichzeitigen Anstieg der Population im **C**-Zustand begleitet. Die Population im **E**-Zustand steigt im Fall von Kwt an, wird aber bei Km<sup>1</sup>A kleiner. Bei höherer Konzentration ( $\approx 100$  mM) findet ein zweiter Übergang statt, bei dem der **C**-Zustand zu Lasten des **E**-Zustandes stärker besetzt wird. Um die Besetzung der **U**-, **C**- und **E**-Zustände in Abhängigkeit der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration zu untersuchen, wurde die Mg<sup>2+</sup>-abhängige RNA-Faltung für jeden der drei Zustände in eine RNA-Faltungsreaktion und eine Mg<sup>2+</sup>-Bindungsreaktion zerlegt, was zu einem thermodynamischen Modell mit sechs Zuständen führt (Abbildung 4). Die Teilpopulationen dieser sechs Zu-

stände werden von fünf unabhängigen Gleichgewichten bestimmt.

Drei davon betreffen die Besetzungsverhältnisse zwischen den Mg<sup>2+</sup>-freien und den Mg<sup>2+</sup>-gebundenen Konformationen innerhalb der **U**-, **C** und **E**-Zustände [Gl. (2)].

$$K_i = \frac{[i_0]}{[i_{Mg}]} \exp\left(-\frac{\Delta G_i(Mg)}{RT}\right) \quad (2)$$

Hier bezeichnen die eckigen Klammern die Teilpopulationen;  $K_i$  und  $\Delta G_i(Mg)$  sind die Gleichgewichtskoeffizienten bzw. die Änderungen der freien Enthalpie zwischen Mg<sup>2+</sup>-gebundenen (tiefgestelltes „Mg“) und Mg<sup>2+</sup>-freien (tiefgestellte „0“) Konformationen innerhalb des Zustandes  $i$ ;  $R$  und  $T$  bezeichnen die Gaskonstante bzw. die absolute Temperatur. Es ist zu betonen, dass die hier verwendete FRET-Methode lediglich zwischen den verschiedenen Konformationen (**U**, **C** und **E**) unterscheiden kann, nicht jedoch zwischen den Mg<sup>2+</sup>-gebundenen und Mg<sup>2+</sup>-freien Zuständen innerhalb dieser; daher können nur die Summen der Zustände (d.h.  $[U_0] + [U_{Mg}]$ ,  $[E_0] + [E_{Mg}]$  und  $[C_0] + [C_{Mg}]$ ) gemessen werden, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Die Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der freien Enthalpien wird durch Gleichung (3) modelliert,<sup>[27]</sup> in der  $\Delta G_i^\circ$  für die freie Standardenthalpie des Zustandes  $i$  steht.

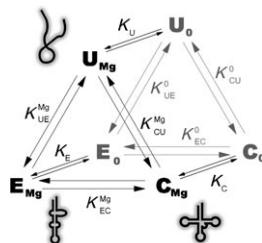
$$\Delta G_i(Mg) = \Delta G_i^\circ + n_i R T \ln[Mg^{2+}] \quad (3)$$

Der Kooperativitätsparameter (oder Hill-Koeffizient),  $n_i$ , misst die Schärfe dieses Übergangs. Zwei weitere Gleichungen (4a,b) bestimmen die relativen Populationen der drei Zustände **U**, **E** und **C**.

$$K_{UE}^0 = \frac{[E_0]}{[U_0]} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{UE}^\circ}{RT}\right) \quad (4a)$$

$$K_{EC}^0 = \frac{[C_0]}{[E_0]} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{EC}^\circ}{RT}\right) \quad (4b)$$

Mathematische Details des thermodynamischen Modells sind in den Hintergrundinformationen hinterlegt. Die Linien in Abbildung 3, die aus einer nichtlinearen Regression dieses Modells an die Messdaten gewonnen wurden, zeigen die Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Besetzung von **U**, **E** und **C**; die sich ergebenden Angleichparameter,  $\Delta G_i^\circ$ ,  $n_i$  und die zwei Differenzen der freien Enthalpie  $\Delta G_{UE}^\circ$  und  $\Delta G_{EC}^\circ$  werden in Tabelle 2 für Kwt und Km<sup>1</sup>A dargestellt. Die im Rahmen der



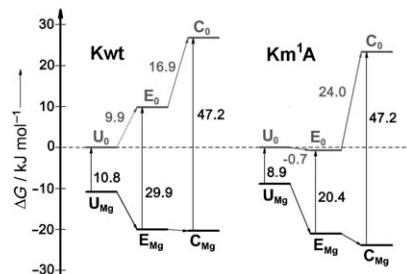
**Abbildung 4:** Thermodynamisches Schema der Gleichgewichte zwischen den Mg<sup>2+</sup>-freien und Mg<sup>2+</sup>-gebundenen Formen der **U**-, **E**- und **C**-Zustände.

**Tabelle 2:** Kooperativitätsparameter und freie Enthalpien aus der Datenanalyse mit dem thermodynamischen Modell.

Parameter	Kwt	Km <sup>1</sup> A
$n_U$	$0.7 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.1$
$n_E$	$1.06 \pm 0.03$	$1.10 \pm 0.04$
$n_C$	$1.21 \pm 0.03$	$1.20 \pm 0.04$
$\Delta G_U^\circ [\text{kJ mol}^{-1}]$	$10.8 \pm 1.2$	$8.9 \pm 2.8$
$\Delta G_E^\circ [\text{kJ mol}^{-1}]$	$29.9 \pm 0.3$	$24.0 \pm 0.2$
$\Delta G_C^\circ [\text{kJ mol}^{-1}]$	$47.2 \pm 0.3$	$47.2 \pm 0.2$
$\Delta G_{UE}^\circ [\text{kJ mol}^{-1}]$	$9.9 \pm 0.4$	$-0.7 \pm 0.3$
$\Delta G_{EC}^\circ [\text{kJ mol}^{-1}]$	$16.9 \pm 0.3$	$24.0 \pm 0.2$

Messgenauigkeit identischen Hill-Koeffizienten von Kwt und  $\text{Km}^1\text{A}$  innerhalb der drei Zustände, welche aus den Verteilungen der FRET-Effizienz hergeleitet wurden, sind eine unabhängige Bestätigung unserer Hypothese, dass die Zustände **U**, **E** und **C** für  $\text{Km}^1\text{A}$  und Kwt strukturell ähnlich sind. Die  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Populationen der sechs thermodynamischen Zustände sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Die freien Enthalpien der  $\text{Mg}^{2+}$ -freien und  $\text{Mg}^{2+}$ -gebundenen (bei 1 M) Zustände sind in Abbildung 5 dargestellt; der **U**<sub>0</sub>-Zustand beider Konstrukte wurde jeweils bei null ange-



**Abbildung 5.** Energiediagramm der Populationen **U**<sub>0</sub>, **E**<sub>0</sub> und **C**<sub>0</sub> der  $\text{Mg}^{2+}$ -freien sowie **U**<sub>Mg</sub>, **E**<sub>Mg</sub> und **C**<sub>Mg</sub> (bei 1 M  $\text{Mg}^{2+}$ ) der  $\text{Mg}^{2+}$ -gebundenen Kwt- und  $\text{Km}^1\text{A}$ -tRNA<sup>Lys</sup>, resultierend aus Angleichen mit dem Modell in Abbildung 4.

setzt. Der Vergleich zwischen Kwt und  $\text{Km}^1\text{A}$  zeigt, dass für  $\text{Km}^1\text{A}$  der **E**<sub>0</sub>-Zustand ca. 10 kJ mol<sup>-1</sup> und die Zustände **C**<sub>0</sub> und **C**<sub>Mg</sub> jeweils ca. 3 kJ mol<sup>-1</sup> niedriger liegen als für Kwt. Die Stabilisierung des **E**<sub>0</sub>-Zustandes für  $\text{Km}^1\text{A}$  ist schon wegen seiner starken Besetzung bei niedriger  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration offensichtlich (Abbildung 3). Der Übergang von **U**<sub>0</sub> nach **E**<sub>0</sub> und somit auch die Kompaktisierung von Kwt im  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Zustand setzen die freie Enthalpie durch elektrostatische Abstoßung herauf. Für  $\text{Km}^1\text{A}$  hingegen ist hier eine leichte Herabsetzung der freien Enthalpie zu beobachten, was wahrscheinlich auf eine elektrostatische Stabilisierung von **E**<sub>0</sub> durch die positive Ladung des methylierten A9 zurückzuführen ist. Für den  $\text{Mg}^{2+}$ -gebundenen Zustand **E**<sub>Mg</sub> von  $\text{Km}^1\text{A}$  hingegen fällt der stabilisierende Effekt deutlich geringer aus. Möglicherweise beeinträchtigt die Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$  im **E**-Zustand die Ausbildung günstigerer Wasserstoffbrücken von  $\text{m}^1\text{A}9$ , z. B. im Basenpaar  $\text{m}^1\text{A}9\text{-U}64$ . Im **C**-Zustand ist der stabilisierende Effekt der positiven Ladung vergleichsweise gering, was darauf hindeutet, dass die Nucleobase von  $\text{m}^1\text{A}9$  nicht an der Stabilisierung der Basenpaare der Kleeblattstruktur mitwirkt und wahrscheinlich für das Solvens zugänglich ist.<sup>[28]</sup>

Zusammenfassend wurden die  $\text{Mg}^{2+}$ -RNA-Wechselwirkungen und Konformationsgleichgewichte zwischen drei Konformationen von humaner mt-tRNA<sup>Lys</sup> im Detail untersucht. Durch Anwendung der emFRET-Methode auf RNAs mit modifizierten Nucleotiden konnte der wesentliche Einfluss einer einzelnen Methylgruppe auf das Konformationsgleichgewicht quantitativ erfasst werden. Alle drei Hauptkonformationen sind bei physiologischer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration signifikant besetzt. Frühere chemische Kartierungsstudien hatten hingegen darauf hingedeutet, dass die Modifikation zu

$\text{m}^1\text{A}9$  die tRNA von der gestreckten **E**-Form in die Kleeblattform **C** überführt.<sup>[6]</sup> Diese Diskrepanz kann daher röhren, dass – anders als bei Kartierungsstudien – emFRET-Experimente exakt im thermischen Gleichgewicht durchgeführt werden. In der näheren Zukunft werden wir unsere Arbeiten auf andere natürlich vorkommende Modifikationen ausweiten, inklusive der fünf in humaner mt-tRNA<sup>Lys</sup> verbleibenden Modifikationen.<sup>[4]</sup> Dieser Ansatz kann auch problemlos auf Struktur-Funktions-Studien von RNA (oder DNA) genutzt werden, bei denen nichtnatürliche Nucleotidmodifikationen verwendet werden; dieser Ansatz ist auch als „atomare Mutagenese“ bekannt.

## Experimentelles

FRET-markierte Kwt- und  $\text{Km}^1\text{A}$ -Konstrukte wurden wie bereits beschrieben hergestellt.<sup>[8]</sup> Kurz zusammengefasst wurde das RNA-Fragment, das die  $\text{m}^1\text{A}9$ -Modifikation trägt, durch Festphasensynthese (Phosphoramidit-Kupplung mit 1-Methyladenosinphosphoramidit) und abgewandelte Schutzgruppenchemie synthetisiert.<sup>[25]</sup> Weitere RNA-Fragmente wurden käuflich erworben (IBA, Göttingen). Cy3 und Cy5 wurden durch postsynthetische NHS-Kupplung an Aminolinker tragende 2'-Desoxythymidine (Positionen 4 und 41 in den tRNA-Konstrukten) in separate Oligoribonucleotide eingeführt, die dann durch Splint-Ligation zusammengesetzt wurden.<sup>[8,29]</sup>

tRNA-Lösungen ( $\approx 100 \text{ pm}$ ) in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei unterschiedlichen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen wurden durch Mischen von destilliertem Wasser (Fluka, Taufkirchen), 250 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4), 1 M  $\text{MgCl}_2$  und tRNA-Lösungen in entsprechenden Anteilen zubereitet. Vor den Messungen wurden die tRNA-Lösungen 3 min auf 60°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die emFRET-Messungen wurden die Proben zwischen zwei Deckgläsern eingebracht.<sup>[9]</sup>

Einzmolekülfloreszenzmessungen wurden mit einem selbstentwickelten konfokalen Laserrastermikroskop durchgeführt, das die Emission in zwei Farbkanälen parallel registriert.<sup>[12,30]</sup> Die Laseranregung wurde mit einem akustooptischen Filter (AOTF, AA Opto-Electronic, Orsay, Frankreich) alle 100 µs zwischen der grünen 514.5-nm-Linie eines  $\text{Ar}^+/\text{Kr}^+$ -Lasers (modifiziertes Modell 164, Spectra-Physics, Mountain View, USA) für Cy3 sowie der roten 633-nm-Linie eines He/Ne-Lasers für Cy5 alterniert. Die Fluoreszenzemission wurde mit einem Wasserimmersionsobjektiv (UPlan-Apo 60×/1.20 w, Olympus, Hamburg) aufgenommen, durch eine Lochblende mit 100 µm Durchmesser geführt, mit einem Strahlteiler bei 640 nm (HQ640DCXR, AHF, Tübingen) aufgeteilt, gefiltert (Donor: 555–610 nm, HQ582/50, AHF; Akzeptor: 650–750 nm, Emitter Cy3/Cy5, AHF) und schließlich mit Avalanche-Photodioden (SPCM-CD 3017, PerkinElmer, Boston, USA) detektiert. Die gezählten Photonen wurden in einem Computer mit einem multifunktionellen Datenerfassungsmodul (NI PCI-6229, National Instruments, München) in 10-µs-Zeitschritten registriert. Details der Datenanalyse sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Eingegangen am 11. Dezember 2007  
Online veröffentlicht am 30. April 2008

**Stichwörter:** Einzmolekülfloreszenzmessungen · FRET (Resonanter Fluoreszenzenergietausch) · Konformationsanalyse · RNA · Thermodynamische Analyse

- [1] D. Thirumalai, C. Hyeon, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4957–4970.  
[2] P. Brion, E. Westhof, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 113–137.

- [3] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, P. G. Wolynes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 545–600.
- [4] M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 721–733.
- [5] M. A. Leehey, C. A. Squassoni, M. W. Friederich, J. B. Mills, P. J. Hagerman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16235–16239.
- [6] M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13338–13346.
- [7] M. Helm, G. Attardi, *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 545–560.
- [8] F. Voigts-Hoffmann, M. Hengesbach, A. Y. Kobitski, A. van Aerschot, P. Herdewijn, G. U. Nienhaus, M. Helm, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13382–13383.
- [9] H. D. Kim, G. U. Nienhaus, T. Ha, J. W. Orr, J. R. Williamson, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4284–4289.
- [10] V. K. Misra, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **2002**, *317*, 507–521.
- [11] G. U. Nienhaus, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 907–922.
- [12] A. Y. Kobitski, A. Nierth, M. Helm, A. Jäschke, G. U. Nienhaus, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2047–2059.
- [13] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8936–8941.
- [14] B. K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle, D. C. Lamb, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3508–3522.
- [15] X. W. Fang, T. Pan, T. R. Sosnick, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1091–1095.
- [16] R. Russell, X. Zhuang, H. P. Babcock, I. S. Millett, S. Doniach, S. Chu, D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 155–160.
- [17] G. Bokinsky, D. Rueda, V. K. Misra, M. M. Rhodes, A. Gordus, H. P. Babcock, N. G. Walter, X. Zhuang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9302–9307.
- [18] D. Grilley, A. M. Soto, D. E. Draper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14003–14008.
- [19] B. Schuler, E. A. Lipman, W. A. Eaton, *Nature* **2002**, *419*, 743–747.
- [20] E. V. Kuzmenkina, C. D. Heyes, G. U. Nienhaus, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 313–324.
- [21] E. V. Kuzmenkina, C. D. Heyes, G. U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15471–15476.
- [22] Y. Ishii, T. Yoshida, T. Funatsu, T. Wazawa, T. Yanagida, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 163–173.
- [23] O. Coban, D. C. Lamb, E. Zaychikov, H. Heumann, G. U. Nienhaus, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4605–4617.
- [24] H. Shi, P. B. Moore, *RNA* **2000**, *6*, 1091–1105.
- [25] M. Helm, H. Brulé, F. Degoul, C. Cepanec, J. P. Leroux, R. Giegé, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1636–1643.
- [26] B. Schuler, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1206–1220.
- [27] D. E. Draper, D. Grilley, A. M. Soto, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 221–243.
- [28] P. F. Agris, H. Sierzputowska-Gracz, C. Smith, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5126–5131.
- [29] W. C. Kurschat, J. Müller, R. Wombacher, M. Helm, *RNA* **2005**, *11*, 1909–1914.
- [30] E. V. Amirgoulova, J. Groll, C. D. Heyes, T. Ameringer, C. Röcker, M. Möller, G. U. Nienhaus, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 552–555.