

Faltung einer RNA-Haarnadel in der dicht gedrängten Zelle

Mimi Gao[†], David Gnuett[†], Axel Orban, Bettina Appel, Francesco Righetti, Roland Winter, Franz Narberhaus, Sabine Müller und Simon Ebbinghaus*

Abstract: Eine korrekte und präzise Faltung der Sekundär- und Tertiärstruktur ist von entscheidender Bedeutung für die zelluläre Funktionalität von Ribonukleinsäuren (RNA). Faltungsstudien von RNA wurden allerdings überwiegend *in vitro* durchgeführt, ohne die Möglichkeit solche Experimente *in vivo* zu validieren. In dieser Arbeit konnten wir die Faltungsstabilität einer RNA-Haarnadel direkt in lebenden Säugerzellen auflösen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Faltungsstabilität innerhalb der Zelle mit der in einer verdünnten physiologischen Pufferlösung vergleichbar ist. Die *In-vitro*-Verwendung von künstlichen Crowding-Reagentien, mit der Ausnahme vom hochmolekularen PEG, führt hingegen zu einer Destabilisierung der Haarnadel, die aus Oberflächenwechselwirkung und Verminderung der Wasseraktivität resultiert. Ferner ist die Faltungsstabilität der RNA äußerst variabel, sowohl innerhalb einer Zellpopulation als auch auf der subzellulären Ebene des Zellkerns und des Zytosplasmas. Demzufolge unterliegt die RNA im Inneren der Zelle (lokalisierten) stabilisierenden und destabilisierenden Effekten, die im Mittel und im Vergleich zu der verdünnten Pufferlösung nur eine geringfügige Modulation der Faltungsstabilität verursachen.

Der Prozess der RNA-Faltung wurde in der Vergangenheit sehr intensiv erforscht.^[1] In der Regel wurden die Experimente in verdünnten wässrigen Pufferlösungen und häufig in Anwesenheit von speziellen Ionen durchgeführt, um die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats abzuschirmen

und somit die Faltung zu fördern.^[2] Solche *In-vitro*-Studien sind allerdings nicht hinreichend für das Verständnis der Faltung und Funktion von RNA-Molekülen in der nativen zellulären Umgebung, in der unterschiedlich große Biopolymere, Lipide, Osmolyte und Salze bis zu 40 % des verfügbaren Volumens ausfüllen („Crowding“).^[3] Für das Verständnis einer möglichen RNA-Faltungsmodulation durch die zelluläre Umgebung wurden bereits unterschiedliche Versuche unternommen, um das zelluläre Milieu *in vitro* experimentell durch Zugabe synthetischer Crowding-Reagentien wie Polyethylenglykol oder Ficoll nachzuahmen.^[4] Die Effekte solcher Crowding-Reagentien auf die Nukleinsäurefaltung sind vielfältig und hängen von der Komplexität des Faltungsprozesses ab. Der Crowding-Effekt auf tertiäre und quartäre Strukturen kann als stabilisierend aufgefasst werden,^[5] während dessen Auswirkung auf die Sekundärstruktur zumeist destabilisierend ist.^[5c, 6] Für die Beschreibung der RNA-Faltungsmodulation durch Crowding wurden drei wesentliche Beiträge diskutiert. Erstens, Crowding führt zu einer Reduzierung des verfügbaren Volumens für die RNA-Entfaltung.^[4] Der sogenannte Volumenausschlusseffekt stabilisiert dabei die gefaltete und kompakte native Struktur im Vergleich zu der ungefalteten und damit ausgedehnteren Konformation. Die Größenordnung dieses Effekts hängt von der relativen Größe der RNA und des Crowding-Reagens ab.^[4b, 6a, 7] Die stärksten Stabilisierungseffekte wurden deshalb bei Tertiär- und Quartärstrukturen von RNA gefunden. Zweitens, erhöhtes Crowding verursacht eine Verminderung der Wasseraktivität und -polarität.^[8] Da für die Bildung der Duplex- und Haarnadelstrukturen eine erhöhte Hydratisierung der RNA angenommen wird, wurden die stärksten Destabilisierungseffekte bei Sekundärstrukturen festgestellt.^[6] Drittens, spezifische Oberflächenwechselwirkungen wurden zwischen den Nukleobasen und dem Crowding-Reagens beobachtet.^[5e, 9] Derartige Wechselwirkungen begünstigen den ungefalteten Zustand der RNA und verursachen somit eine Destabilisierung der Sekundärstruktur.

Trotz mechanistischer Aufklärung der Faltungsmodulation der RNA durch künstliche Crowding-Reagentien bleibt es allerdings unklar, ob diese das zelluläre Milieu angemessen widerspiegeln und Erkenntnisse über die zelluläre Struktur und Funktionalität der RNA liefern können. Jüngste RNA-Studien zeigen, dass unterschiedliche Crowding-Reagentien zu unterschiedlichen Ergebnissen über die Bildung der Tertiärstruktur und somit zur Fehlinterpretation der nativen Funktionalität führen.^[10] Weitere Hinweise kommen von einer Reihe von Proteinfaltungsstudien in lebenden Zellen, die zeigen, dass Crowding-Reagentien das Verhalten des nativen Zellmilieus in seiner Gesamtheit nicht imitieren können.^[11]

[*] M. Gao,^[†] D. Gnuett,^[†] Prof. Dr. S. Ebbinghaus
Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstr. 150, 44801 Bochum (Deutschland)
E-Mail: simon.ebbinghaus@rub.de

A. Orban, Dr. B. Appel, Prof. Dr. S. Müller
Institut für Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
F. Righetti, Prof. Dr. F. Narberhaus
Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstr. 150, 44801 Bochum (Deutschland)
Prof. Dr. R. Winter
Lehrstuhl für Physikalische Chemie I, TU Dortmund
Otto-Hahn-Str. 4a, 44227 Dortmund (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

 Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201510847> zu finden.

 © 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

In dieser Studie untersuchten wir die Faltung einer RNA-Haarnadel direkt in lebenden Zellen und zogen zur Interpretation der Ergebnisse vergleichbare In-vitro-Experimente in Crowding-Reagentien heran. Als Modellsystem verwendeten wir eine gut erforschte temperatursensitive RNA-Struktur. Das *Salmonella*-fourU-RNA-Thermometer (4U) liegt in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) des agsA-Gens (aggregation-suppression protein) und fungiert als temperatursensitives Steuerelement auf der mRNA-Ebene für die Genexpression von kleinen Hitzeschockproteinen.^[12] Frei lebende Mikroorganismen verwenden häufig solche eingebauten Biosensoren, um die Umgebungstemperatur wahrzunehmen und sich an Änderungen anzupassen.^[13] Hier untersuchten wir, wie die Temperatursensitivität des 4U-RNA-Thermometers innerhalb der zellulären Umgebung moduliert wird. Änderungen der Faltungsstabilität konnten mit subzellulärer Auflösung bestimmt werden und wurden mit In-vitro-Ergebnissen in synthetischen Crowding-Reagentien verglichen. Dafür verwendeten wir Fast Relaxation Imaging (FRel), eine kürzlich entwickelte Relaxationsmethode zur Untersuchung biomolekularer Kinetik und Thermodynamik in einzelnen lebenden Zellen.^[14] FRel kombiniert schnelle laserinduzierte Temperatursprünge mit Förster-Resonanz-Energietransfer(FRET)-Mikroskopie. Für die Untersuchung des 4U-RNA-Thermometers wurde ein maßgeschneidertes Protokoll mit sukzessiven 2.4°C-Temperatursprüngen implementiert. Dies erlaubte die Aufnahme von thermischen Schmelzkurven der 4U RNA in der Zelle und innerhalb von 300 s unter Vermeidung von zytotoxischen Effekten (Abbildung 1A).^[14b]

Für eine FRET-basierte Untersuchung des Entfaltungsgleichgewichts der 4U RNA wurde die RNA durch Endgruppenkupplung mit Atto488 und Atto565 über orthogonale *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)- und Click-Chemie funktionaliert (Abbildung 1B, siehe die Hintergrundinformationen für Details). Eine thermische Entfaltung der RNA-Haarnadel verursachte eine FRET-Minderung zwischen den beiden Fluorophoren, die mit einer Fluoreszenzzunahme des Donors (D, Atto488) und einer Abnahme des Akzeptors (A, Atto565) einherging und somit zu einer Zunahme des D/A-FRET-Signals führte (Abbildung 1D,E). Die intrinsische Reaktion des D/A-FRET-Signals auf die Temperatur war unbedeutend gering (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Jeder Temperatursprung wurde für 20 s gehalten, um eine vollständige Äquilibrierung der Probe zu gewährleisten (Abbildung S3).

Der thermische Entfaltungsprozess der 4U war vollständig reversibel und die RNA blieb intakt (Abbildung 1C, S4A). Aufgrund der kooperativen Entfaltung der 4U^[12b] wurde für die thermodynamische Datenanalyse ein Zweizustandsmodell angenommen (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Die Schmelztemperatur der 4U stimmte mit denen aus früheren In-vitro-Experimenten überein (Tabelle S1).^[12b] Dies zeigt, dass die Farbstoffmarkierungen die thermische Entfaltung von 4U nicht störten. In der physiologischen Pufferlösung DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) lag die Schmelztemperatur bei $T_m = 52.7 \pm 1.6^\circ\text{C}$. Für eine genaue Thermodynamik-Analyse der 4U wäre allerdings der anzuwendende Temperaturbereich in einem

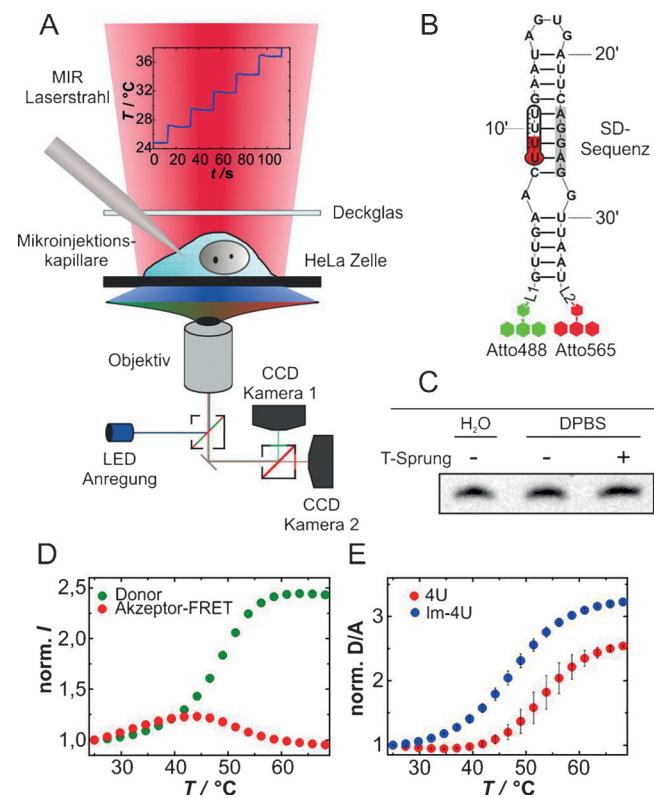


Abbildung 1. Thermische Entfaltung von 4U RNA untersucht mit Fast Relaxation Imaging (FRel). A) Schematischer Aufbau eines FRel-Experiments. B) Struktur der 4U RNA markiert mit den beiden FRET-fähigen Farbstoffen Atto488 und Atto565. SD = Shine-Dalgarno. Für eine detaillierte Struktur der Linkerregionen L1 und L2 siehe Abbildung S1. C) Gelektrophorese und EtBr-Färbung zeigen die Unversehrtheit der Haarnadel nach einer Reihe von Temperatursprüngen in DPBS-Pufferlösung. D) Normalisierte Donor- und Azeptor-FRET-Fluoreszenzintensitäten der 4U RNA untersucht mit FRel und in der Pufferlösung DPBS. E) Normalisierte D/A-FRET-Signale als Funktion der Temperatur für 4U-RNA und ihre niedrig schmelzende Variante G12A-C23U (Im-4U) in der Pufferlösung DPBS. $n = 4$. Daten mit Fehlerbalken repräsentieren $M \pm SD$.

FRel-Experiment zu hoch für die HeLa-Zellen. Deshalb wurde im Folgenden die niedrig schmelzende Variante (G12A-C23U) der 4U RNA^[15] verwendet, die wir fortan als Im-4U RNA bezeichnen. In DPBS besaß Im-4U eine Schmelztemperatur von $T_m = 47.4 \pm 0.6^\circ\text{C}$ und eine freie Entfaltungsenthalpie von $\Delta G^\circ_u(37^\circ\text{C}) = 5.9 \pm 0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Abbildung S4B, Tabelle S1).

Als Nächstes wurde die Faltungsstabilität der Im-4U RNA in verschiedenen In-vitro-Crowding-Umgebungen untersucht. Als Erstes testeten wir die Größenabhängigkeit des Crowding-Effekts, indem wir das gebräuchliche Crowding-Reagens Polyethylenglykol (PEG) mit verschiedenen Polymerisationsgraden (Molekulargewichte: 200 Da, 400 Da, 6 kDa und 20 kDa) sowie das monomere Äquivalent Ethylenglykol (EG, 62 Da) einsetzen. Die Im-4U-Haarnadel wurde destabilisiert in Anwesenheit von (P)EG mit Molekulargewichten kleiner 6 kDa, wie durch den erniedrigten Schmelzpunkt und die erniedrigte freie Entfaltungsenthalpie gezeigt wurde (Tabelle S1, Abbildung 2 A).

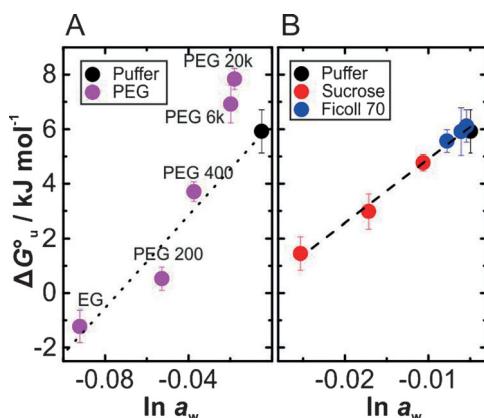


Abbildung 2. In-vitro-Faltungsstabilität der lm-4U RNA in verschiedenen Crowding-Lösungen. Freie Entfaltungsenthalpie bei 37°C, ΔG°_u , aufgetragen gegen den natürlichen Logarithmus der Wasseraktivität, $\ln a_w$. DPBS wird als verdünnte Referenzpufferlösung verwendet. A) Größenabhängiger Effekt von PEG (300 g L^{-1}) auf die Faltungsstabilität der RNA. Die gepunktete Linie gibt die Abhängigkeit der Faltungsstabilität von $\ln a_w$ für PEG < 6 kDa an. B) Konzentrationsabhängiger Effekt von Sucrose und Ficoll 70 (100, 200 und 300 g L^{-1}) auf die Faltungsstabilität. Die gestrichelte Linie zeigt eine globale Anpassung einer linearen Regressionsfunktion an die Datenpunkte. Die individuellen Anpassungen für Sucrose und Ficoll 70 wiesen keine signifikanten Unterschiede in einer Kovarianzanalyse auf. $n=4$. Daten mit Fehlerbalken repräsentieren $M \pm SD$.

Wir fanden eine monotone Abnahme von ΔG°_u mit abnehmender Wasseraktivität ($\ln a_w$) durch Zugabe von EG, PEG 200 und PEG 400. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Wasseraktivität und der Stabilität der Haarnadelstruktur hin. Eine solche Wassersensitivität wurde auch für andere Nukleinsäurestrukturen beschrieben.^[6] Die Zugabe von 300 g L^{-1} PEG 6 kDa oder 20 kDa führte hingegen zu einer signifikanten Stabilisierung des gefalteten Zustands trotz einer Reduktion der Wasseraktivität (siehe Hintergrundinformationen für Details). Diese Stabilisierung kann durch den Volumenausschlusseffekt erklärt werden, der das Faltungsgleichgewicht zu dem kompakteren nativen Zustand verschiebt und so die Stabilität der Haarnadel erhöht.^[4b, 6b, 7]

Als Nächstes wurde die Haarnadel-Stabilität in Anwesenheit von Ficoll 70 und dem monomeren Baustein Sucrose bei verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 und 300 g L^{-1} untersucht. Ficoll 70 und PEG 20 kDa haben vergleichbare Partikelgrößen. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Haarnadel-Stabilität für Sucrose und Ficoll 70 linear mit derselben Abhängigkeit mit $\ln a_w$ abnahm (Abbildung 2B). Der Vergleich zwischen PEG und Ficoll zeigte weiterhin, dass chemisch unterschiedliche Crowding-Reagentien unterschiedlichen Einfluss auf die RNA-Stabilität haben, wie durch die unterschiedlichen Steigungen von ΔG°_u gegen $\ln a_w$ gezeigt werden konnte. Diese Diskrepanz könnte durch verschiedene Wechselwirkungen zwischen dem Kosolvans und den Nukleobasen bei der Entfaltung erklärt werden. Kleine PEG-Moleküle können mit der RNA durch hydrophobe Effekte mit den Nukleobasen in einer PEG-größenabhängigen Art interagieren.^[9b, 16] Im Gegensatz dazu weist Sucrose mehr verfügbare Hydroxygruppen auf im Vergleich zu EG bei

gleichen Massenkonzentrationen. Dadurch werden bevorzugte und hydrophile Interaktionen mit den Nukleobasen, welche während der Entfaltung solvensexponiert sind, möglich.^[6a] Neue MD-Simulationen sowie experimentelle Daten deuten auf Wasserstoffbrücken zwischen Kosolvans und Nukleinsäure hin.^[6a, 9a] Unsere Resultate zeigen somit, dass der stabilisierende Effekt des ausgeschlossenen Volumens eine Reduktion der Wasseraktivität sowie attraktive Wechselwirkungen zwischen Kosolvans und Nukleobase, beide mit destabilisierenden Beiträgen, entgegenwirken.

Im nächsten Schritt injizierten wir die lm-4U RNA direkt in lebende HeLa-Zellen, um ihre Faltungsstabilität mithilfe von FReI zu bestimmen. Wir fanden heraus, dass sich der intrazelluläre T_m und ΔG°_u und die Resultate in verdünnter DPBS-Pufferlösung ähnelten (Abbildung 3 A,B). Dies ist überraschend, weil bei hohen Konzentrationen von 300 g L^{-1} , die vergleichbar sind mit der zellulären Crowding-Dichte, verschiedene signifikante Beiträge der unterschiedlichen Kosolventien in vitro beobachtet wurden. Das bedeutet, dass eine intrazelluläre Destabilisierung der lm-4U RNA aufgrund von reduzierter intrazellulärer Wasseraktivität^[8a,c] oder durch Wechselwirkungen der Nukleobasen^[5c, 9] durch stabilisierende Beiträge, wie z. B. durch Volumenausschlusseffekte, kompensiert werden und somit nur eine marginale Veränderung der Stabilität beobachtet wurde.

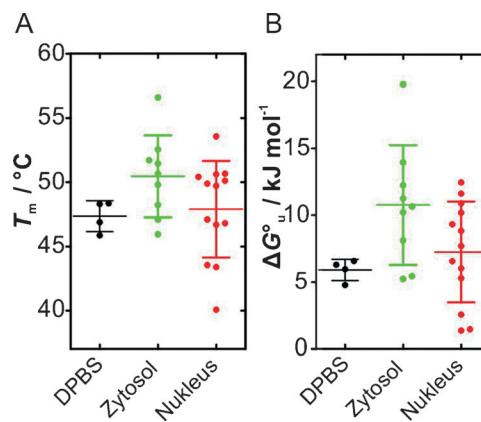


Abbildung 3. Faltungsstabilität der lm-4U in einzelnen HeLa-Zellen. Box-Plot-Diagramme für A) die Schmelztemperatur, T_m , und B) die freie Entfaltungsenthalpie bei 37°C, ΔG°_u . Daten mit Fehlerbalken repräsentieren $M \pm SD$ und wurden mithilfe eines ungepaarten t-Tests auf statistische Signifikanz geprüft.

Allerdings beobachteten wir eine breite Verteilung der Schmelztemperatur und der freien Entfaltungsenthalpie (Tabelle S1, Abbildung 3 A,B). Die Breite der Verteilung wurde durch zwei Standardabweichungen abgeschätzt, wodurch 95 % der Verteilung von ΔG°_u beschrieben werden. Die Verteilung von ΔG°_u entsprach einer Variabilität von ca. 2.9 bis $3.5 k_B T$ (7.6 und 9.0 kJ mol^{-1}) im Nukleus und Zytosol. Obwohl im Mittel keine signifikanten Unterschiede zwischen Zytosol und Nukleus beobachtet wurden, war die RNA in manchen Zellen stabiler im Zytosol als im Nukleus oder umgekehrt (Abbildung S5). Eine solche Variabilität des zellulären Crowding-Effekts auf subzellulärer Ebene könnte mit

verschiedenen physiologischen Prozessen in Verbindung stehen, wie z.B. dem Zellzyklus oder genetischem Rauschen.^[17] Insbesondere der Zellzyklus könnte zu Veränderungen der intrazellulären Crowding-Dichte führen: Es wurde gezeigt, dass während des Zellzyklus das Zellvolumen und die zelluläre Trockenmasse in unterschiedlichen Raten zunehmen.^[18] Es wurde weiterhin vorgeschlagen, dass solche Änderungen Proteinfaltung während des Zellzyklus modulieren könnten.^[19]

Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Faltungsstabilität von lm-4U RNA heterogen verteilt war innerhalb des Zytosols und des Nukleus, wie durch die farbkodierte Zellkarte sowie das Histogramm gezeigt wird (Abbildung 4). Subzelluläre Heterogenität führte zu Variationen von ΔG°_u zwischen ca. 1.7 und 2.9 $k_B T$ (4.4 und 7.6 kJ mol^{-1} verglichen zu 0.4 kJ mol^{-1} für vergleichbare In-vitro-Experimente) im Zytosol und Nukleus. Obwohl diese energetischen Modulationen klein waren, könnten sie signifikanten Einfluss auf die kooperative Faltung der RNA haben. Da die Zelle hochstrukturiert und kompartmentalisiert auf vielen Längenskalen ist,^[20] könnte spekuliert werden, dass subzelluläre Variationen von der Zelle verwendet werden können, um die lokale Energielandschaft der RNA-Faltung zu regulieren.

In dieser Studie haben wir die ersten thermodynamischen Einblicke in die Faltungsstabilität einer RNA-Haarnadel in der lebenden Zelle mit subzellulären Auflösungen präsentiert. Die lm-4U RNA hat in lebenden Zellen eine, im Mittel,

ähnliche Stabilität wie in einer physiologischen Pufferlösung. Dies ist das Resultat verschiedener Beiträge: stabilisierende Volumenauslasseffekte, destabilisierende nichtspezifische Wechselwirkungen sowie Veränderungen der Wasseraktivität. Dennoch können sowohl räumliche als auch zeitliche Fluktuationen eine Variabilität der Faltungsstabilität bis hin zu rund $3 k_B T$ verursachen, wie wir durch die beobachtete Zell-zu-Zell- und subzelluläre Heterogenität zeigen konnten. Dies ist im Einklang mit verschiedenen Studien, die die zelluläre und subzelluläre Variabilität von Crowding als auch Proteinfaltungslandschaften gezeigt haben.^[21] Wir konnten weiterhin zeigen, dass einzelne synthetische Crowding-Reagentien nicht in der Lage sind, das zelluläre Milieu in seiner Gesamtheit darzustellen. Stattdessen führen diese Kosolventien zu einem unausgeglichenen Bild des zellulären Crowding-Effekts, indem sie die destabilisierende Wirkung der Wasseraktivitätsabnahme oder nichtspezifische Wechselwirkungen überrepräsentieren. Daher ist die Entwicklung und Anwendung neuer experimenteller Methoden wie z.B. intrazellulärer chemischer Modifikation,^[10a,b] intrazellulärer NMR-Spektroskopie,^[10c] Einzelmolekül-FRET^[22] oder Temperatur-Modulationstechniken^[23] notwendig, um RNA-Faltung direkt in der lebenden Zelle zu untersuchen. Solche Studien werden es erlauben, einzelne Beiträge des zellulären Crowding-Effekts zu entschlüsseln und so helfen zu verstehen, wie RNA-Struktur und -Funktion sich in lebenden Zellen entwickelten.

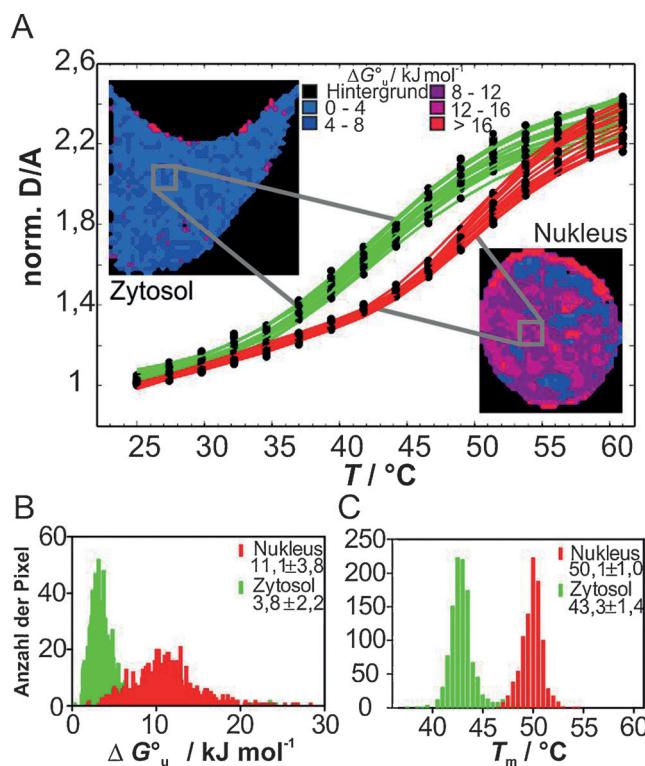


Abbildung 4. A) Einzelpixel-basierte Titrationskurven für zytosolische und nukleäre Regionen einer Zelle. Einschub: Falschfarbenbilder der berechneten freien Entfaltungsenthalpie bei 37°C , ΔG°_u , für jedes Pixel. Einzelpixel-Histogramm des Zytosols und des Nukleus für B) ΔG°_u (37°C) und C) T_m .

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen (Rückkehrerprogramm) und vom Exzellenzcluster RESOLV (EXC 1069) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt. M.G. wird unterstützt durch den Fonds der Chemischen Industrie und D.G. durch die Internationale Graduiertenschule für Neurowissenschaften (Ruhr-Universität Bochum). Wir danken bei J. Drenckhan für die Hilfestellung bei der RNA-Synthese und -Markierung.

Stichwörter: Biophysik · Faltungsstabilität · Intrazelluläre Spektroskopie · Makromolekulares Crowding · RNA

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3224–3228
Angew. Chem. **2016**, *128*, 3279–3283

- [1] a) R. Schroeder, A. Barta, K. Semrad, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 908–919; b) S.-J. Chen, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 197–214; c) S. A. Woodson, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 61–77.
- [2] D. E. Draper, D. Grilley, A. M. Soto, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 221–243.
- [3] a) S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599–620; b) R. J. Ellis, A. P. Minton, *Nature* **2003**, *425*, 27–28.
- [4] a) S. I. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2733–2758; b) H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.

- [5] a) S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 6309–6326; b) S. Nakano, H. T. Karimata, Y. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16881–16888; c) D. Kilburn, J. H. Roh, L. Guo, R. M. Briber, S. A. Woodson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8690–8696; d) N. F. Dupuis, E. D. Holmstrom, D. J. Nesbitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8464–8469; e) D. Lambert, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 993–1005.
- [6] a) S. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi, J. Kawakami, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14330–14331; b) C. H. Spink, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1999**, *38*, 496–508; c) S. Nakano, D. Yamaguchi, H. Tateishi-Karimata, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 2808–2817; d) E. Rozners, J. Moulder, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 248–254.
- [7] D. Kilburn, J. H. Roh, R. Behrouzi, R. M. Briber, S. A. Woodson, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10055–10063.
- [8] a) K. D. Garlid, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 281–302; b) D. K. Sasmal, S. Ghosh, A. K. Das, K. Bhattacharyya, *Langmuir* **2013**, *29*, 2289–2298; c) R. Harada, Y. Sugita, M. Feig, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4842–4849.
- [9] a) D. L. Pincus, C. Hyeon, D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7364–7372; b) D. B. Knowles, A. S. Lacroix, N. F. Deines, I. Shkel, M. T. Record, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12699–12704.
- [10] a) J. Tyrrell, J. L. McGinnis, K. M. Weeks, G. J. Pielak, *Biochemistry* **2013**, *52*, 8777–8785; b) J. Tyrrell, K. M. Weeks, G. J. Pielak, *Biochemistry* **2015**, *54*, 6447–6453; c) R. Hänsel, F. Löhr, S. Foldynová-Trantírková, E. Bamberg, L. Trantírek, V. Dötsch, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5768–5775.
- [11] a) I. Guzman, H. Gelman, J. Tai, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 11–20; b) J. Danielsson, X. Mu, L. Lang, H. Wang, A. Binolfi, F. Theillet, B. Bekei, D. T. Logan, P. Selenko, H. Wennerström, M. Oliveberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 12402–12407; c) W. B. Monteith, R. D. Cohen, A. E. Smith, E. Guzman-Cisneros, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1739–1742.
- [12] a) T. Waldminghaus, N. Heidrich, S. Brantl, F. Narberhaus, *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 413–424; b) J. Rinnenthal, B. Klinkert, F. Narberhaus, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3834–3847.
- [13] J. Kortmann, F. Narberhaus, *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 255–265.
- [14] a) S. Ebbinghaus, A. Dhar, J. D. McDonald, M. Gruebele, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 319–323; b) M. Guo, Y. Xu, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17863–17867.
- [15] J. Rinnenthal, B. Klinkert, F. Narberhaus, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8258–8270.
- [16] R. Buscaglia, M. C. Miller, W. L. Dean, R. D. Gray, A. N. Lane, J. O. Trent, J. B. Chaires, J. Graham, B. Cancer, S. Hancock, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 7934–7946.
- [17] a) A. B. Pardee, R. Dubrow, J. L. Hamlin, R. F. Kletzien, *Animal Cell Cycle. Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 715–750; b) M. Elowitz, A. Levine, E. Siggia, P. Swain, *Science* **2002**, *297*, 1183–1186.
- [18] a) A. Tzur, R. Kafri, V. S. Lebleu, G. Lahav, M. W. Kirschner, *Science* **2009**, *325*, 167–171; b) M. Mir, Z. Wang, Z. Shen, M. Bednarz, R. Bashir, I. Golding, S. G. Prasanth, G. Popescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13124–13129.
- [19] A. J. Wirth, M. Platkov, M. Gruebele, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19215–19221.
- [20] M. Weiss, M. Elsner, F. Kartberg, T. Nilsson, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3518–3524.
- [21] a) D. Gnutt, M. Gao, O. Brylski, M. Heyden, S. Ebbinghaus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2548–2551; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2578–2581; b) S. Ebbinghaus, M. Gruebele, *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 314–319; c) A. Dhar, K. Girdhar, D. Singh, H. Gelman, S. Ebbinghaus, M. Gruebele, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 421–430.
- [22] I. König, A. Zarrine-Afsar, M. Aznauryan, A. Soranno, B. Wunderlich, F. Dingfelder, J. C. Stüber, A. Plückthun, D. Nettels, B. Schuler, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 773–779.
- [23] I. Schoen, H. Krammer, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21649–21654.

Eingegangen am 23. November 2015
Online veröffentlicht am 2. Februar 2016