

Abb. 1. Posttranskriptionale Einführung einer Methylgruppe am N1 von Adenin 9 verschiebt das dynamische Gleichgewicht der humanen mitochondrialen tRNA<sup>Lys</sup> von einer Haarnadel (links) zur biologisch aktiven Kleeblattstruktur (rechts). Insetts zeigen aufgelöste Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren der Farbstoffe Cy3 (grün) und Cy5 (rot) und die daraus errechnete FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ , schwarz in Anwesenheit, blau in Abwesenheit der Methylgruppe). Die Konjugationspunkte der Farbstoffe an den tRNAs symbolisieren grüne (Cy3) und rote (Cy5) Punkte.

## RNA-Einzelmolekül-Biochemie

◆ Die zuletzt neu entstandenen Felder der RNA-Biochemie, RNAi und RNA-Schalter, wurden erst kürzlich hier behandelt [s. *Nachr. Chem.* 2008, 56, 1232]. Deshalb soll der Fortschritt der RNA-Biochemie nicht nach Themengebieten sortiert, sondern aus einer methodischen Perspektive betrachtet werden.

Der Trend, RNA-Moleküle und -Komplexe durch Einzelmolekül-techniken zu beobachten, verstärkt sich. Darunter sind einige Faltungsstudien an RNA (u. a. RNA-Schalter).<sup>1)</sup> Es finden sich aber zunehmend Arbeiten zu Protein-RNA-Komplexen, die z. B. bei der Biopolymerisation von Nucleinsäuren und Proteinen mitwirken.

Technisch sehr weit fortgeschritten ist die Untersuchung von Einzelmolekülen durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (smFRET). Bei dieser Technik wird die Übertragung von Anregungsenergie eines Donorfarbstoffs auf einen Akzeptorfarb-

stoff beobachtet. Aus der relativen Fluoreszenz beider Farbstoffe ergibt sich die Kenngröße  $E_{\text{FRET}}$ , also die Effizienz dieses Vorganges. Sie hängt hauptsächlich von der Entfernung der beiden Farbstoffe ab. Je nach Farbstoffkombination werden Strukturveränderungen von Makromolekülen mit hoher zeitlicher Auflösung in einem Bereich von 30 bis 100 Ångström beobachtet.

### RNA-Faltung

◆ Außer vom räumlichen Abstand der Farbstoffe hängt  $E_{\text{FRET}}$  auch von deren relativer räumlicher Orientierung  $\kappa$  ab, die bei freier Drehbarkeit der Farbstoffe mit einem konstanten Wert in die Berechnung von  $E_{\text{FRET}}$  einfließt. Wechselwirkungen der Farbstoffe mit DNA und RNA, wie sie die Gruppe von Lilley untersuchte, können die freie Drehbarkeit der Farbstoffe und damit den Orientierungsfaktor  $\kappa$  beeinflussen. Die Auswirkungen der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung der in smFRET-Messungen ubiquitären Cyaninfarbstoffe Cy3 und Cy5 mit dem 5'-Ende von Nucleinsäurehelices der

A- und B-Formen bestimmten Iqbal et al. Sie modellierten die Auswirkungen derartiger Wechselwirkungen auf  $\kappa$  und somit auf  $E_{\text{FRET}}$ .<sup>2,3)</sup>

Fast schon traditionell sind smFRET-Studien an Ribozymen, in denen die beiden Farbstoffe in separaten Oligonucleotiden platziert und dann durch Hybridisierung zu einem Komplex zusammengefügt wurden.<sup>4,5)</sup> Wie kürzlich demonstriert, lassen sich durch smFRET-Analysen auch echte intramolekulare RNA-Faltungsvorgänge beobachten. Dazu müssen die farbstofftragenden Oligoribonucleotide, statt durch Hybridisierung, durch Ligation kovalent verbunden werden. Dies ist besonders bei kleinen RNAs von Interesse. Durch Titration mit Magnesiumionen ließen sich z. B. beim Diels-Alderase-Ribozym und bei einer tRNA mehrere Faltungsintermediate inklusive teilstrukturierter und ungefalteter Konformationen beobachten und thermodynamisch charakterisieren.<sup>6-8)</sup>

Für humane mitochondriale tRNA<sup>Lys</sup> wurde gezeigt, dass diese in einem dynamischen Gleichgewicht

mehrerer Konformationen vorliegt. Post-transkriptionale Einführung einer einzelnen Methylgruppe verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der biologisch aktiven Kleeblattstruktur (Abbildung 1).

**Polymerasen**

◆ Einzelmolekültechniken helfen auch bei Studien zur Biosynthese von Nucleinsäuren. So sind unlängst dynamische Prozesse bei Polymerasen beleuchtet worden, z.B. beim Studium der Prozessivität von T7-RNA-Polymerase<sup>9)</sup> oder RNA-Polymerase II.<sup>10)</sup> Höhepunkte des letzten Jahres sind smFRET-Untersuchungen der hochkomplexen Aktivitäten der reversen Transkriptase von HIV bei der Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA.<sup>11,12)</sup>

Das Enzym hat zwei katalytische Zentren: Die Polymeraseaktivität katalysiert die Synthese von DNA, sowohl von einer RNA- als auch von einer DNA-Matrize, gegebenenfalls sogar unter gleichzeitiger Ablösung eines komplementären Stranges; parallel dazu degradiert die RNase-H-Aktivität an einem DNA-Strang hybridisierte RNA, wie sie z. B. direkt nach der reversen Transkription entsteht.

Zu den vielen nicht verstandenen Charakteristika der Replikation von HIV zählen die dabei entstehenden purinreichen Sequenzen (PPT, polypurine tracks). Sie entgehen der Degradation durch die RNase-H-Aktivität, und dienen so der reversen Transkriptase als Primer bei der nachfolgenden Synthese des zweiten DNA-Stranges. Für ihre Untersuchungen zum dynamischen Verhalten der reversen Transkriptase in Nucleinsäurekomplexen brachten die Gruppen von Zhuang und Le Grice Cy3-Markierungen entweder an der Polymerase- oder der RNase-H-Domäne des Proteins an, während sie den korrespondierenden Akzeptorfarbstoff Cy5 in der Nähe des 3'-bzw. des 5'-Endes des Matrizenstranges platzierten. Dadurch waren zwei Bindungsmodi des Proteins auf einem RNA-DNA-Hybrid charakterisierbar: ein Degradationsmodus und

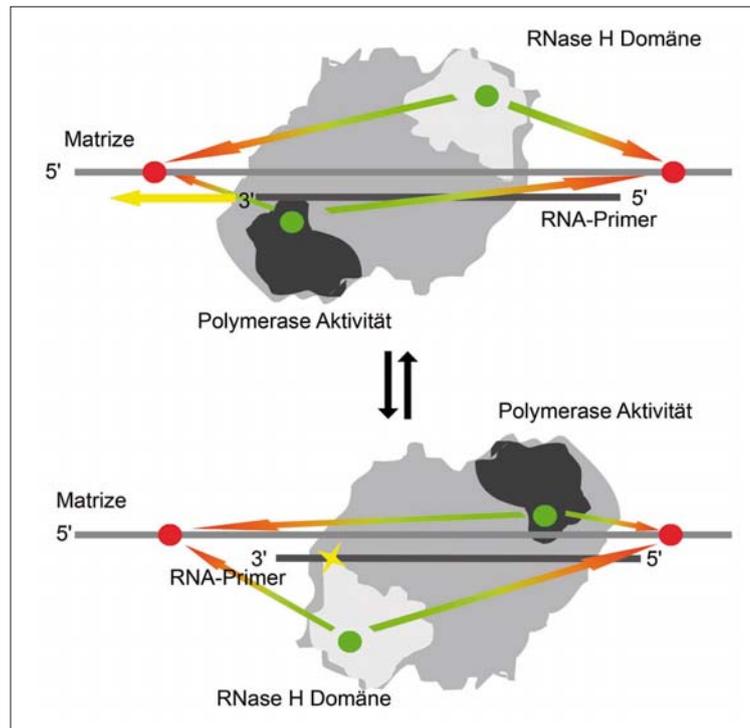


Abb. 2. Die zwei Orientierungen der reversen Transkriptase von HIV auf einem Hybrid-Duplex, bestehend aus einer DNA-Matrize und einem RNA-Primer. Im oberen Teil ist die Polymerisierungs-kompetente Konformation durch räumliche Nähe des aktiven Zentrums der Polymeraseaktivität zum 3'-Ende des RNA Primers charakterisiert. Ein gelber Pfeil symbolisiert die Polymerisierungsreaktion. Diese Konformation steht im dynamischen Gleichgewicht mit der umgekehrten Orientierung, in der sich das katalytische Zentrum der RNase-H-Aktivität in räumlicher Nähe zur RNA befindet. Die RNase-Aktivität ist durch einen gelben Stern dargestellt. Die Konjugationspunkte der Farbstoffe symbolisieren grüne (Cy3) und rote (Cy5) Punkte. Pfeile mit grünroten Farbübergängen zeigen die räumlichen Entfernungen, deren Veränderungen durch FRET beobachtet wurden.

ein Polymerisationsmodus. Beide wandeln sich dynamisch ineinander um – ohne sich von der Matrize zu lösen (Abbildung 2). Der Degradationsmodus herrschte bei normalen RNA-Primern auf einer DNA-Matrize vor, bei DNA-Primern oder PPT-RNA-Primern war jedoch der Polymerisations-Modus bevorzugt, den zusätzlich dNTPs stabilisieren.<sup>13)</sup>

In ähnlichen Studien, die eine Gleitbewegung der reversen Transkriptase entlang eines RNA-DNA-Doppelstranges untersuchten, wurde beobachtet, dass das Enzym am RNA-3'-Ende im Degradationsmodus vorlag, aber bei Erreichen des 3'-Endes der Primer DNA in den Polymerisationsmodus übergang.<sup>14)</sup> Die beschriebene Gleitbewegung steht im Einklang mit der Beobachtung von RNase-H-Aktivität an mehreren Stellen im RNA-DNA-Hybrid. Das beobachtete häufige Gleiten weg

von der Polymerisierungsstelle am DNA 3'-Ende, könnte die relativ geringe Prozessivität der reversen Transkriptase von HIV erklären.<sup>12)</sup>

In beiden Arbeiten wurde in Gegenwart von Nevapirin eine beschleunigte Gleichgewichtsdynamik zwischen beiden Modi beobachtet. Dies eröffnet erste Perspektiven zur Aufklärung des Wirkmechanismus dieses nicht nucleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmers.

**Proteinbiosynthese auf dem Ribosom**

◆ Die Erforschung der Proteinbiosynthese hat nach der Aufklärung der Ribosomstruktur besonders von Einzelmolekültechniken profitiert.<sup>13,14)</sup> Einige zentrale Aspekte der vielen bekannten und postulierten Intermediate zeigt Abbildung 3 (S. 284), beginnend mit dem Andocken des

ternären Komplexes aus Aminoacyl-tRNA, GTP und EF-Tu, der tRNA-Selektion und -Akkomodierung, womit der so genannte Prä-Translokationszustand erreicht wird, der auch den Peptidyltransfer mit einschließt. Nach Bindung von von EF-G, Translokation und GTP-Spaltung, wird unter Abspaltung von EF-G der Post-Translokationszustand erreicht, der mit dem Andocken des nächsten ternären Komplexes in einen neuen Zyklus mündet.

Einzelmolekültechniken können Subpopulationen in heterogenen Proben charakterisieren. Dadurch entdeckten früheren Studien mit

Cryo-Elektronenmikroskopie einige ungewöhnliche Aspekte von Ribosomen. Obwohl Cryo-Elektronenmikroskopie dynamische Vorgänge nicht direkt untersuchen kann, zeigten einige der charakterisierten Subpopulationen Strukturen, die Hinweise auf die Dynamik der Proteinbiosynthese geben.<sup>15,16)</sup> Aus einer Verdrehung der beiden ribosomalen Untereinheiten relativ zueinander postulierte man den Ratschen-Mechanismus (von Ratchet: Ratsche oder Knarre),<sup>15)</sup> dessen Rotationsbewegung die Dynamik der Peptidsynthese koordinieren könnte.<sup>16)</sup>

Im Jahr 2008 erschienen drei Arbeiten, die unabhängig voneinander mit smFRET die zeitliche Übereinstimmung der Ratschenbewegung mit einem dynamischen Konformations-Gleichgewicht von tRNAs auf dem Ribosom untersuchten (s. Kästen in Abbildung 3).<sup>17-19)</sup> In diesem Gleichgewicht coexistiert die klassische Konformation, in der die tRNAs sowohl mit Anticodon als auch mit dem 3'-Ende in den jeweiligen P-Sites bzw. A-Sites der beiden ribosomalen Untereinheiten binden, mit einer Hybridkonformation. Diese Konformation, in der die tRNA mit dem Anticodon noch in

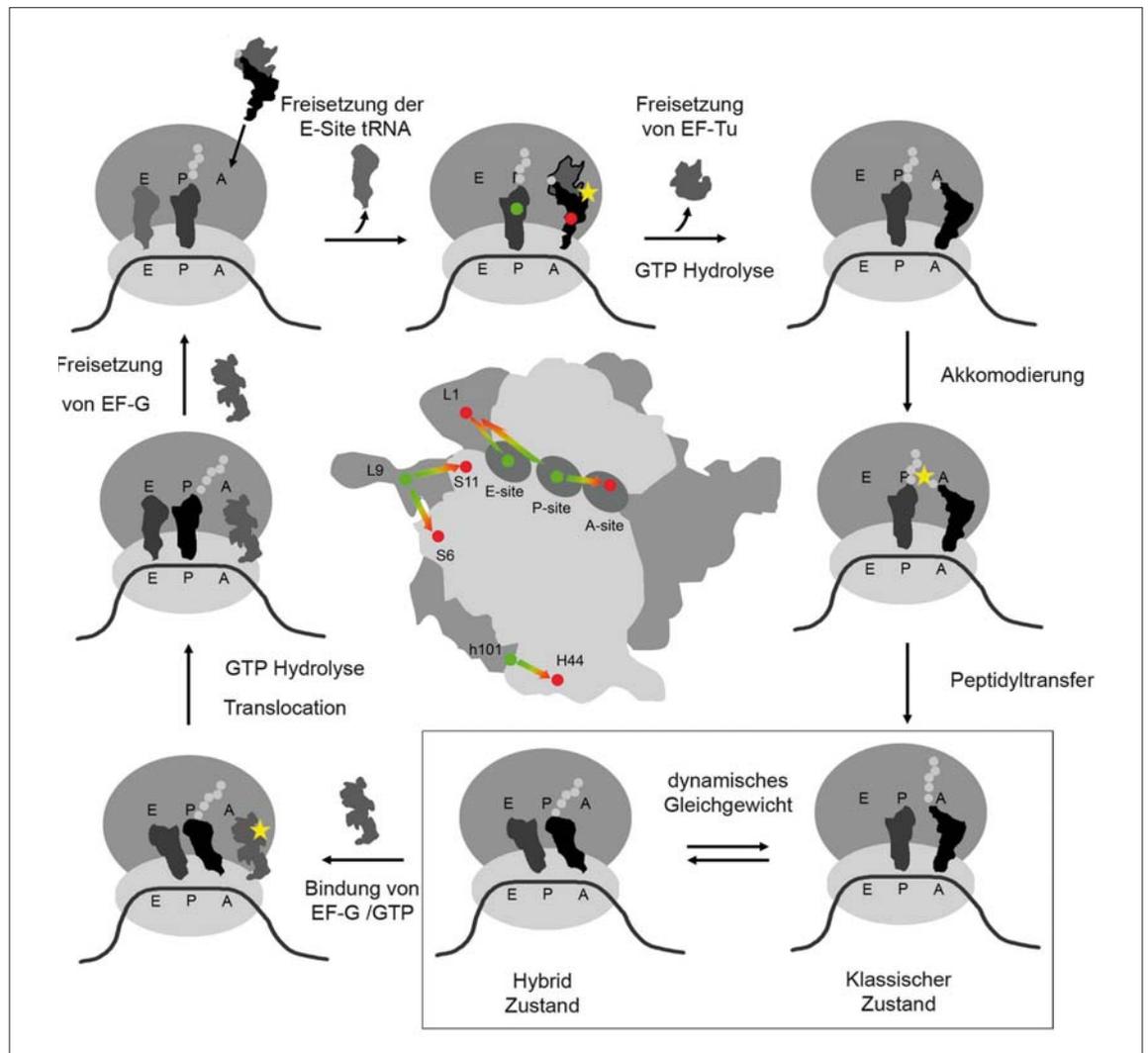


Abb. 3. smFRET-Messungen der Dynamik des Ribosoms während der Translation. Gezeigt sind Stationen der Proteinbiosynthese. Die Konjugationspunkte der Farbstoffe an den tRNAs nach dem Andocken des ternären Komplexes symbolisieren grüne (Cy3) und rote (Cy5) Punkte. Gelbe Sterne symbolisieren Schritte, in denen die chemische Bindungsenergie in GTP oder in der Aminoacyl-tRNA umgesetzt wird. Im Kasten: Dynamisches Gleichgewicht der klassischen und der Hybridkonformation der tRNAs auf dem Ribosom. Die Aufsicht in der Mitte gibt eine Übersicht über die Positionierung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 auf der großen (dunkelgrau) und der kleinen (hellgrau) ribosomalen Untereinheit. Pfeile mit grün-roten Farbübergängen zeigen die räumlichen Entfernungen, deren Veränderungen durch FRET beobachtet wurden.

der P-Site der kleinen Unterheit bindet, während das deacylierte 3'-Ende sich schon in der E-Site der großen Untereinheit befindet, ist als Intermediat auf dem Weg einer tRNA von der P-Site zur E-Site durch smFRET Untersuchungen recht gut charakterisiert.<sup>20–22</sup> Weil die chemische Energie, die bei Hydrolyse einer energiereichen Aminoacyl-tRNA-Bindung und durch die GTPase-Aktivität von EF-Tu und EF-G umgesetzt wird, die Proteinbiosynthese vorantreibt, ist der Einfluss dieser Ereignisse auf die Ribosomendynamik untersuchenswert.

Alle drei Arbeiten beobachteten die Ratschenbewegung direkt, jedoch an unterschiedlichen Stellen des Ribosoms. Die Gruppen um Noller und Ha platzierten die Fluorophore an den Proteinen S6 auf der kleinen und L9 auf der großen ribosomalen Untereinheit in der Nähe des L1-Stalks.<sup>17</sup> Sie beobachteten eine spontane, reversible relative Bewegung der beiden Farbstoffe und korrelierten dies mit dem Gleichgewicht der tRNAs auf dem Ribosom zwischen klassischem und Hybridbindungsmodus (Kasten in Abbildung 3). Sie charakterisierten die Dynamik als thermisch getrieben, also als nicht direkt abhängig von GTP-Hydrolyse oder Peptidyltransfer.

Von einer ähnlichen Korrelation der Dynamik des L1-Stalks mit

tRNA, die zwischen klassischer und Hybridkonformation oszilliert, berichtete auch die Gruppe von Gonzalez Jr. Ihre Farbstoffmarkierungen erlaubten es, die Entfernung des L1-Proteins und einer tRNA auf dem Ribosom direkt zu beobachten (Abbildung 3).<sup>18</sup>

Die Gruppe von Puglisi markierte eine Region des Ribosoms in größerer Entfernung zu mRNA, tRNA und Peptidyltransferasezentrum. Die Region gilt als wenig flexibel und daher repräsentativ für globale Bewegungen der ribosomalen Untereinheiten. Im Gegensatz zu vorhergehenden Studien beobachteten Puglisi et al. an diesem Teil des Ribosoms keine thermischen Gleichgewichte der Ratschenbewegung. Stattdessen kommt es zunächst zur Assoziation kleiner und großer Untereinheiten, und anschließend zu einer relativen Verdrehung gegen den Uhrzeigersinn. Die Autoren korrelierten diese in einem Dreifarbenexperiment mit der Ankunft von aminoacylierter tRNA. Die Inhibition dieses ersten Teils der Ratschenbewegung durch Chloramphenicol, aber nicht durch Puromycin, deutet darauf hin, dass sie mit der Bildung der neuen Peptidbindung assoziiert ist. Die Umkehr der Ratschenbewegung ist abhängig von GTP-Hydrolyse durch EF-G.

Trotz experimenteller Unterschiede (z.B. aus der Synthese der farbstoffmarkierten Ribosomen, unter-

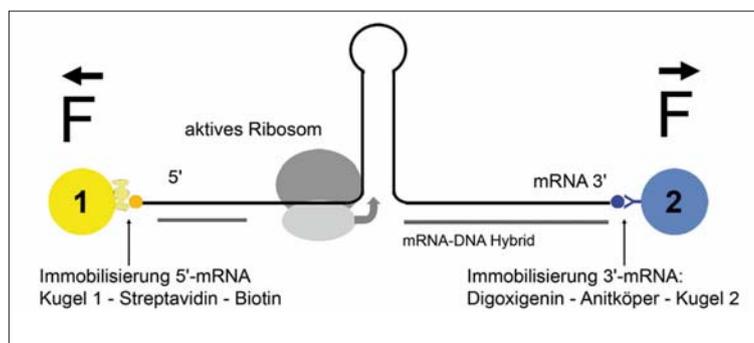


Abb. 4. Messanordnung mit optischen Pinzetten zur Echtzeitmessung der Translokation einzelner Ribosomen über eine mRNA mit Haarnadelstruktur. Mindestens eine der beiden mit 1 und 2 bezeichneten Kugeln, auf denen die Enden der mRNA immobilisiert sind, kann mit einem Laserstrahl räumlich manipuliert werden. Beim Auseinanderziehen der beiden Kugeln wird die rückholende Kraft zwischen ihnen gemessen. Aus technischen Gründen wurden Bereiche der mRNA, deren Translation nicht untersucht wurde, mit komplementären DNA-Oligonucleotiden hybridisiert.

**GDCh**

**Die Gesellschaft Deutscher Chemiker**

- bietet allen in Chemie und Lebenswissenschaften ein lebendiges Netzwerk
- unterstützt die internationale Zusammenarbeit
- sucht den intensiven und konstruktiven Dialog
- bietet Expertenwissen aus 25 Fachgruppen
- agiert unabhängig
- garantiert mit Fortbildungskursen und Tagungen den Informations- und Erfahrungsaustausch
- vermittelt neue Mitarbeiter und Arbeitsplätze
- bietet spezielle Vorteile für Firmen
- fördert die Chemie in Forschung und Lehre
- bearbeitet Fragen der beruflichen Entwicklung
- berät Fachkräfte und ermittelt einen Einkommenspiegel
- verantwortet viele wissenschaftliche Zeitschriften wie die *Nachrichten aus der Chemie* und die *Angewandte Chemie*
- ist mit einem von 62 Ortsverbänden auch in Ihrer Nähe

Gesellschaft Deutscher Chemiker  
Postfach 900440  
60444 Frankfurt am Main  
gdch@gdch.de

[www.gdch.de](http://www.gdch.de)

schiedlichen Ionenstärken oder Rekonstitutionsmethoden für tRNAs auf dem Ribosom) fügen sich die drei Arbeiten zu einem Gesamtbild: Beide Teile der globalen Ratschenbewegung stimmen zeitlich mit biochemischen Reaktionen der Proteinbiosynthese überein und werden möglicherweise von deren chemischer Energie getrieben. Gleichzeitig gibt es wohl in der als flexibel bekannten L1-Stalk-Region des Ribosoms thermisch getriebene Gleichgewichte, die mit den Bindungsmodi der tRNAs auf dem Ribosom assoziiert sind.

### Optische Pinzetten

◆ Informationen zur Wirkung intermolekularer Kräfte im Piconewton-Bereich liefert die Technik der optischen Pinzetten (Optical Tweezers). Dabei wird der zu untersuchende Komplex an zwei Stellen verankert, typischerweise durch Biotin-Streptavidin- und Digoxigenin-Antikörper-Wechselwirkungen (Abbildung 4, S. 285). Mindestens einer der Ankerpunkte liegt auf einer kleinen Kugel und ein Laserstrahl manipuliert mit hoher Genauigkeit deren Platzierung. Bei einer kontrollierten räumlichen Trennung der Ankerpunkte sind mit dieser Technik Veränderungen der Kräfte zwischen den Ankerpunkten im pN-Bereich messbar. So wurden Aspekte der Wechselwirkung zwischen Ribosom und Shine-Dalgarno-Sequenz der mRNA analysiert.<sup>23)</sup> Erstmals wurde mit dieser Technik die Fortbewegung des Ribosoms auf einer mRNA mit Haarnadelstruktur untersucht.<sup>24)</sup> Die dem Ribosom intrinsische Helikase-Aktivität entwindet bei der Bewegung entlang der mRNA dessen doppelsträngige Bereiche. Die daraus entstehende Entspannung der an beiden Enden aufgespannten mRNA wurde in kleinen Schritten sichtbar, die jeweils der Passage eines Codon-Triplets entsprechen. Die Zeiten, die einzelne Ribosomen für die Decodierung eines Codons der mRNA benötigen, sind offenbar keineswegs immer gleich, sondern unter-

liegen starken Schwankungen. Dies verdeutlicht die Stärke von Einzelmolekültechniken, die im Gemisch gleichzeitig ablaufende, nicht synchronisierte Reaktion identifizieren und nach Vereinzelung untersuchen kann. So zeigte die Echtzeitbeobachtung von Folgen von Translokationsereignissen und Pausen, dass Translation kein kontinuierlicher Prozess ist, wie man ihn von einer molekularen Maschine möglicherweise erwartet hätte. Mehrere Faktoren beeinflussen die zeitliche Heterogenität, darunter die Codonfolge, die Sekundärstruktur der mRNA und die Anwesenheit interner Shine-Dalgarno-Sequenzen.

Es ist spürbar, dass die Qualität von Informationen, welche die Einzelmolekültechniken zugänglich machen, die RNA-Biochemie stark beeinflusst. Da derartige Techniken immer mehr Arbeitsgruppen zugänglich werden, ist zu erwarten, dass sich dieser Trend fortsetzt.

**Mark Helm**, Jahrgang 1969, ist seit dem Jahr 2002 Forschungsgruppenleiter in der Abteilung Chemie am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, wo er sich 2008 in den Fächern Pharmazeutische Chemie und Biochemie habilitierte. Er studierte Chemie in Würzburg und promovierte 1999 in Molekularbiologie an der Universität Strasbourg. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf RNA-Modifikationen und dynamische Prozesse von Nukleinsäuren. [mark.helm@urz.uni-heidelberg.de](mailto:mark.helm@urz.uni-heidelberg.de)



### Literatur

- 1) W. J. Greenleaf, K. L. Frieda, D. A. Foster, M. T. Woodside, S. M. Block, *Science* 2008, 319, 630.
- 2) A. Iqbal, S. Arslan, B. Okumus, T. J. Wilson, G. Giraud, D. G. Norman, T. Ha, D. M. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 11176.
- 3) A. Iqbal, L. Wang, K. C. Thompson, D. M. Lilley, D. G. Norman, *Biochemistry* 2008, 47, 7857.
- 4) X. Zhuang, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2005, 34, 399.
- 5) M. Steiner, K. S. Karunatilaka, R. K. Sigel, D. Rueda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 13853.
- 6) A. Y. Kobitski, A. Nierth, M. Helm, A. Jaschke, G. U. Nienhaus, *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 2047.

- 7) 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.
- 8) A. Y. Kobitski, M. Hengesbach, M. Helm, G. U. Nienhaus, *Angew. Chem.* 2008, 120, 4398.
- 9) G. Q. Tang, R. Roy, T. Ha, S. S. Patel, *Mol. Cell* 2008, 30, 567.
- 10) J. Andrecka, R. Lewis, F. Bruckner, E. Lehmann, P. Cramer, J. Michaelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 135.
- 11) E. A. Abbondanzieri, G. Bokinsky, J. W. Rausch, J. X. Zhang, S. F. Le Grice, X. Zhuang, *Nature* 2008, 453, 184.
- 12) S. Liu, E. A. Abbondanzieri, J. W. Rausch, S. F. Le Grice, X. Zhuang, *Science* 2008, 322, 1092.
- 13) M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* 2001, 292, 883.
- 14) R. A. Marshall, C. E. Aitken, M. Dorywalska, J. D. Puglisi, *Annu. Rev. Biochem.* 2008, 77, 177.
- 15) J. Frank, R. K. Agrawal, *Nature* 2000, 406, 318.
- 16) J. Frank, H. Gao, J. Sengupta, N. Gao, D. J. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 19671.
- 17) P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, H. F. Noller, T. Ha, *Mol. Cell* 2008, 30, 578.
- 18) J. Fei, P. Kosuri, D. D. MacDougall, R. L. Gonzalez, Jr., *Mol. Cell* 2008, 30, 348.
- 19) R. A. Marshall, M. Dorywalska, J. D. Puglisi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 15364.
- 20) S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez, H. D. Kim, S. Chu, J. D. Puglisi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, 11, 1008.
- 21) S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. Gonzalez, Jr., J. D. Puglisi, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 12893.
- 22) T. H. Lee, S. C. Blanchard, H. D. Kim, J. D. Puglisi, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 13661.
- 23) S. Uemura, M. Dorywalska, T. H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, S. Chu, *Nature* 2007, 446, 454.
- 24) J. D. Wen, L. Lancaster, C. Hodges, A. C. Zeri, S. H. Yoshimura, H. F. Noller, C. Bustamante, I. Tinoco, *Nature* 2008, 452, 598.