

De RNA-helix lijkt niet altijd op die van DNA

Met de enkel-molecuulmethode magnetische pincetten kunnen de mechanische eigenschappen van moleculen zoals DNA- en RNA-helices bestudeerd worden. Onze metingen laten zien dat DNA en RNA in veel opzichten op elkaar lijken, maar toch ook verrassende verschillen tonen.

Jan Lipfert en Nynke Dekker

224

Door samenwerking van natuurkundigen en biologen is een vruchtbaar onderzoeksterrein ontstaan waarbij individuele biologische moleculen opgespannen kunnen worden en veranderingen in hun lengte (en torsie in sommige gevallen) nauwkeurig kunnen worden gemeten. Een voorbeeld van een molecuul dat op deze enkel-molecuulmanier is bekeken, is het DNA-molecuul, waarin de genetische informatie van cellulair leven ligt opgeslagen. Het is mogelijk geworden om alle mechanische eigenschappen van dit molecuul in kaart te brengen (zie kader *Hoe beschrijven we de mechanische eigenschappen van een molecuul?* en figuur 1 daarin). Vanuit verschillende invalshoeken is dit interessant. Zo wordt een DNA-molecuul dat

twee meter lang is in de celkern met een diameter van 5 µm door allerlei eiwitten niet alleen opgekruld om het passend te maken, maar ook nog eens uitgelezen en gekopieerd. De mogelijkheid om een enkel DNA-molecuul te kunnen beheersen, maakt het ook mogelijk om daarop actieve eiwitreacties te bestuderen en de daarmee gepaard gaande kinetiek bloot te leggen. Ook zijn er parallelle ontwikkelingen geweest die het mogelijk maken om allerlei verschillende vormen van DNA-moleculen te maken (figuur 2). DNA is dus een bouw materiaal aan het worden [1, 2], waarvan het nuttig is om de mechanische eigenschappen goed te begrijpen.

Overeenkomsten tussen DNA en RNA

De chemische benaming van DNA is desoxyribonucleïnezuur. Maar er is ook het chemisch sterk gerelateerde ribonucleïnezuur, oftewel RNA. Ook dit molecuul speelt een belangrijke rol in de cel: zo vormt enkelstrengs-RNA een intermediair molecuul in de vertaling van DNA naar eiwit en speelt dubbelstrengs-RNA vaak een belangrijke rol in genregulatie (zie kader *De basisverschillen tussen DNA- en RNA-moleculen* en figuur 3 voor een vergelijking van DNA- en RNA-moleculen). Het is bekend dat de mechanische

eigenschappen van DNA een grote rol spelen in DNA-eiwitinteracties. Voor RNA-moleculen zal dit niet anders zijn, maar dat is veel minder bekend. Daarom hebben wij recentelijk een zogeheten magnetisch pincet gebruikt om ook individuele (dubbelstrengs-) RNA-moleculen te bestuderen. Dit is een variant van een lichtmicroscop die uitgebreid is met magneetvelden en die we zelf in elkaar zetten, deels uit commerciële onderdelen maar met daarnaast ook een aanzienlijk aantal onderdelen die in onze mechanische werkplaats vervaardigd wordt om de stabiliteit en precisie te optimaliseren (figuur 4 boven). Een schematische weergave van het experiment dat we in zo'n magnetische pincet uitvoeren is te zien in figuur 4 (onder). Hierin

Jan Lipfert studeerde natuurkunde en economie in Heidelberg (Duitsland), Uppsala (Zweden) en Urbana-Champaign (Verenigde Staten). Hij is gepromoveerd in de biofysica aan Stanford University (Verenigde Staten) in 2008. Van 2008 tot 2013 was hij postdoctoraal onderzoeker in de groep van Nynke Dekker, onder meer met een Veni-beurs van NWO. Sinds 2013 is hij hoogleraar experimentele biofysica aan de Ludwig-Maximilians-Universität in München (Duitsland).



Jan.Lipfert@lmu.de

Nynke Dekker studeerde natuurkunde en toegepaste wiskunde aan de Yale University (Verenigde Staten). Zij promoveerde in de atoomfysica aan de Harvard University (Verenigde Staten) in 2000. Na een postdoctorale periode aan de Ecole Normale Supérieure in Parijs, waar zij kennis opdeed van biofysica, werd zij in 2002 groepsleider aan de TU Delft. Sinds 2008 is zij daar werkzaam als hoogleraar. Het onderzoek van haar groep wordt medegefinancierd door NWO en de Europese Unie.



n.h.dekker@tudelft.nl

bevestigen we een stukje RNA tussen een glasplaatje en een klein ($\sim 1\ \mu\text{m}$) magnetisch bolletje. Het magnetische bolletje wordt vervolgens beïnvloed door een magnetisch veld, dat zowel kracht als torsie op het bolletje kan uitoefenen. Dit laatste wordt mogelijk gemaakt doordat het magnetische veld de oriëntatie van de bolletjes in het vlak loodrecht op het RNA vastlegt: door de draaiing van het magnetisch veld draait het magnetische bolletje en vervolgens het RNA [4]. Ook hebben we een zogeheten magnetisch koppelpincet gebruikt [5], waarbij de oriëntering/gerichtheid van het magnetisch veld iets anders is en we hoekdetectie gebruiken. Het meten van veranderingen van de hoek onder torsie maakt het mogelijk om het in het RNA opgelegde koppel te meten. Het lastige in deze RNA-experimenten is overigens niet per se het gebruik van dergelijke verfijnde technieken: het was eerder het kunnen maken van het RNA-molecuul, inclusief bevestiging aan het bolletje en oppervlak. Pas na een geniale ingeving van collegabioloog Gary Skinner was deze stap mogelijk.

De metingen laten zien dat RNA op een aantal vlakken erg op DNA lijkt [4]. Het verschil in de persistentielengtes tussen de twee moleculen bedraagt slechts 20% [4, 6, 7], en in de torsionele persistentie slechts 10% (zie kader *Hoe beschrijven we de mechanische eigenschappen van een molecuul?* en figuur 1 daarin) [7]. De moduli van Young verschillen een factor 3, waarbij het RNA de lagere waarde heeft (met andere woorden, het is makkelijker uit te rekken) [6, 7]. Ook vertoont RNA dezelfde structurele overgangen als het DNA-molecuul: bij een koppel van $-10\ \text{pN}\cdot\text{nm}$ zullen beide moleculen hun dubbele-helixvorm verliezen en weer gedeeltelijk enkelstrengs worden (een negatief koppel betekent hier ontwinden van de helix). Ook bij een koppel van $+40\ \text{pN}\cdot\text{nm}$ veranderen beide moleculen van vorm [5, 7].

Verschillen tussen DNA en RNA

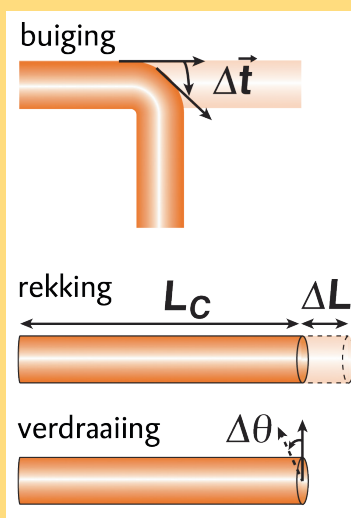
Maar verrassend genoeg zijn er ook aanzienlijke verschillen tussen DNA en RNA [7]. Om een eerste verschil te visualiseren is het handig om een natte handdoek in gedachten te nemen die moet worden uitgewrongen. Als men deze handdoek tussen twee handen spant en uitwringt, zal de afstand

Hoe beschrijven we de mechanische eigenschappen van een molecuul?

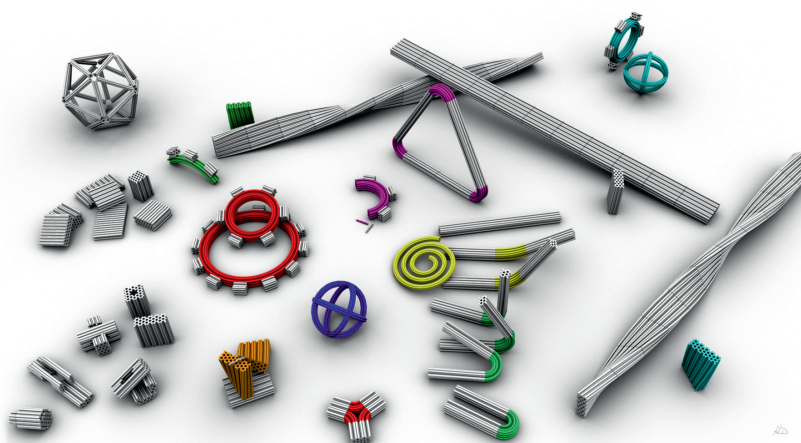
Om de mechanische eigenschappen van een dubbelstrengsmolecuul op lengteschalen groter dan een basepaar te beschrijven, wordt vaak het model van een (isotrope) elastische staaf gebruikt. Een elastische staaf heeft drie manieren om van vorm te veranderen (figuur 1). We kunnen dan de volgende integraal over de lengte opschrijven voor de opgeslagen energie in een molecuul [3]:

$$E = \int dE(s) = \frac{1}{2}k_B T \int_0^{L_{tot}} (A\beta^2 + Bu^2 + C\omega^2 + 2Du\omega) ds$$

waarbij β beschrijft hoe de helix van richting verandert, u is een maat voor het uitrekken en ω voor het verdraaien van de helix. k_B is de Boltzmannconstante en T de absolute temperatuur. A is de parameter die de stijfheid van het molecuul ten opzichte van buigingen weergeeft (de zogeheten persistentielengte) (figuur 1 boven), B de weerstand ten opzichte van uitrekkingen beschrijft (gerelateerd aan de modulus van Young, S) (figuur 1 midden), C de parameter is die de stijfheid van het molecuul ten opzichte van draaiingen beschrijft (ook wel torsionele persistentielengte genoemd) (figuur 1 onder) en D de parameter is die de koppeling tussen uitrekking en draaiing beschrijft. De parameters A , B (of S), C en D beschrijven collectief de eigenschappen van het molecuul in de elastische limiet, waarin geen structurele veranderingen van het molecuul plaatsvinden.



Figuur 1 Weergave van de mogelijke vervormingen van een isotrope elastische staaf. Figuur: adaptatie uit [7].



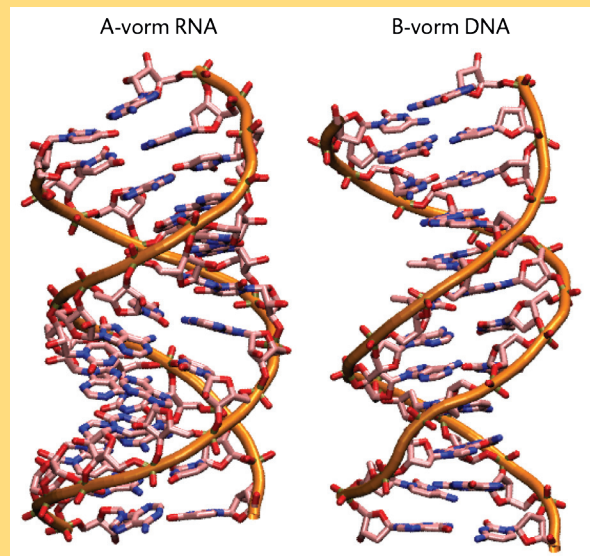
Figuur 2 Voorbeelden van bouwstenen op de nano- en microschaal gemaakt van DNA via de zogeheten 'DNA origami'-methode. Overige details beschikbaar in [1, 2]. Figuur: Hendrik Dietz (TU München).

tussen de twee handen afnemen: met andere woorden, de handdoek wordt korter. Toen vergelijkbare metingen

in 2006 op DNA werden uitgevoerd [8, 9], werd men aanvankelijk verrast door het feit dat DNA onder hoge

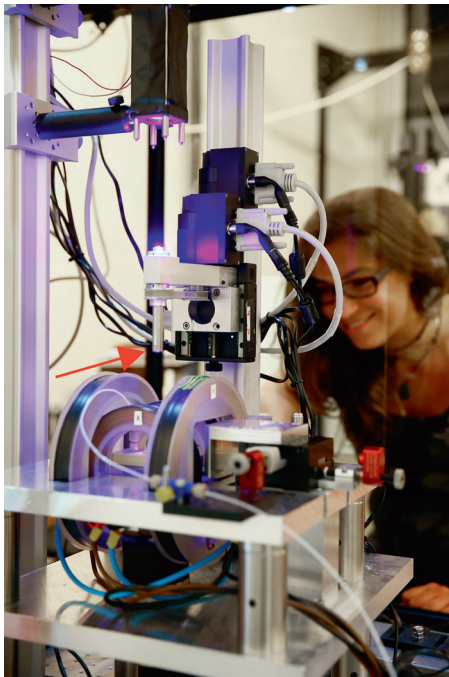
De basisverschillen tussen DNA- en RNA-moleculen

Het DNA in onze cellen is een molecuul met een diameter van ongeveer twee nanometer, waarbij de afstand tussen de bouwstenen (de baseparen) 0,34 nanometer is. DNA is een dubbelstrengsmolecuul: elke base (A,C,G,T) is gekoppeld aan een complementaire base (T,G,C,A), waardoor twee strengen aan elkaar gekoppeld worden en daarnaast ook om elkaar heen wentelen (figuur 3 rechts). RNA, dat per base een extra hydroxylgroep bevat, bestaat uit vergelijkbare bases (A,C,G,U) maar verkeert vaak in een enkelstrengsvorm. Toch bestaat er ook dubbelstrengs-RNA, met een diameter van 2,4 nanometer en een afstand tussen de baseparen van 0,28 nanometer (figuur 3 links). Dubbelstrengs-RNA wordt benut als het genoom van een groot aantal virussen en het speelt ook een belangrijke rol in het proces van RNA-interferentie, waarbij genen waarvan de sequenties overeenkomen met dat van een naburig dubbelstrengs-RNA-molecuul 'uitgezet' kunnen worden. De ontdekking van deze laatstgenoemde rol van dubbelstrengs-RNA is in 2006 beloond met de Nobelprijs voor de Geneeskunde.

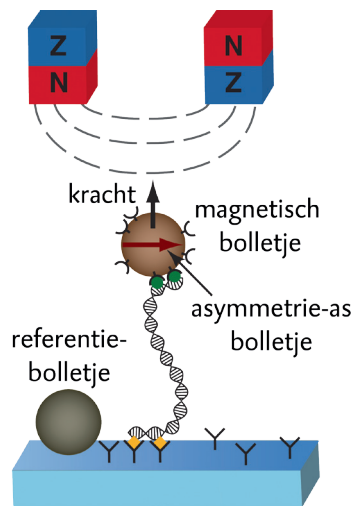


Figuur 3 Moleculaire structuren van dubbelstrengs-RNA, een helix met A-vorm (links), en dubbelstrengs-DNA, een helix met B-vorm (rechts). Figuur: adaptatie uit [7].

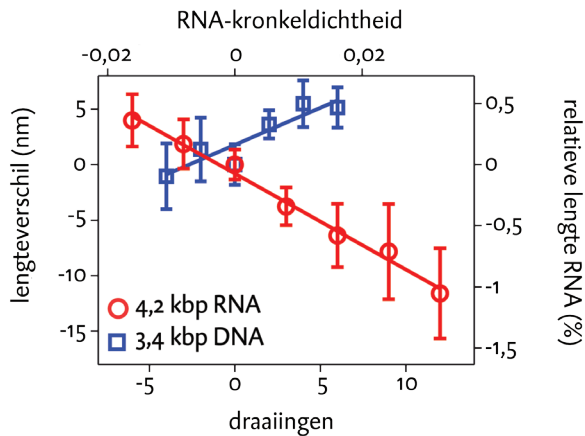
226



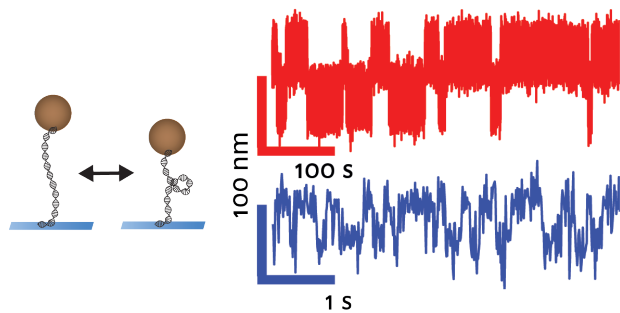
Figuur 4 Links: Een magnetisch pincetopstelling (met promovenda Orkide Ordu op de achtergrond). Helemaal bovenin is de belichting zichtbaar. Het ledlicht straalt via de magneetkop (bevestigd aan twee motoren voor translatie en rotatie; de magneten zelf bevinden zich bij de rode pijl) op een vloeistofcelletje (niet zichtbaar, maar gepositioneerd op de bovenste horizontale aluminium plaat) waarin de RNA-moleculen zich bevinden. Op de foto staat de magneetkop ver van het vloeistofcelletje af; tijdens een meting zullen ze slechts een fractie van een millimeter van elkaar af staan. De aanwezige magneetspoelen maken geen deel uit van standaard magnetische pincet maar zijn nuttig voor aanvullende torsiemetingen. Rechts: schematische weergave van een magnetisch pincet (niet op schaal). Magnetten (boven) creëren een magnetisch veld dat krachten en koppelen (vanwege de asymmetrie-as van de bolletjes) op magnetische bolletjes uitoefent die via enkele DNA- of RNA-moleculen aan een oppervlak gebonden zijn. Figuur: adaptatie uit [7].



kracht en positieve draaiing langer wordt – het tegenovergestelde van de handdoek dus. Er werden echter al snel nieuwe modellen opgeworpen die dit gedrag van DNA meenden te verklaren. Maar door onze uitvoering van het vergelijkbare experiment op RNA neemt deze discussie een interessante wending, want RNA wordt korter – vergelijkbaar met de handdoek maar in scherpe tegenstelling tot DNA (figuur 5)[7]. Dit is verrassend, juist omdat de overige mechanische eigenschappen veelal op elkaar lijken. Samen met collega's hebben wij simulaties verricht om dit te onderzoeken. Hierbij maken we gebruik van de databases van RNA-kristalstructuren om te bepalen hoe een RNA-basepaar zich in termen van translatie, rotatie en dergelijke gemiddeld zal verhouden tot zijn buurman. Vervolgens bouwen we via een Monte Carlo-procedure een volledig RNA-molecuul op en meten we in de simulatie de mechanische eigenschappen ervan. Dergelijke studies wijzen uit dat de parameter D (de koppeling tussen uitrekking en draaiing) helaas het lastigst terug te brengen is tot een eenduidige verschuiving tussen naastgelegen RNA-baseparen [10]. Het is, met andere woorden, nog niet direct op moleculair niveau aan te wijzen waarom deze mechanische eigenschap van RNA zo sterk verschilt



Figuur 5 Veranderingen in de lengte van een dubbelstrengs-DNA-molecuul (blauwe vierkanten) en van een dubbelstrengs-RNA-molecuul (rode cirkels) bij constante kracht (7 pN) en een verschillend aantal draaiingen. Lineaire fits (lijnen) laten zien dat het DNA met $\sim 0,5$ nm per draaiing verlengd wordt, terwijl het RNA met $\sim 0,8$ nm per draaiing verkort wordt. Figuur: adaptatie uit [7].



Figuur 6 Lengte als functie van de tijd van een RNA-molecuul (rood) en van een DNA-molecuul (blauw) dat net op het punt staat om te 'kronkelen' (links). Let op het verschil in de tijdsassen. Figuur: adaptatie uit [7].

van die van DNA. Maar interessant is het wel, want het zou gevolgen kunnen hebben voor hoe eiwitten het RNA-molecuul kunnen onderscheiden van het DNA-molecuul.

Een tweede verschil betreft een dynamische eigenschap van het RNA. Als je aan het RNA-molecuul draait terwijl het onder een lage kracht staat, dan zal het op een gegeven moment een soort lus of kronkel vormen (vergelijkbaar met een lus in een ouderwetse telefoondraad; figuur 6). Ook DNA heeft deze eigenschap. Maar onze metingen tonen aan dat de dynamiek waarmee de eerste kronkel vormt en zich weer ontvouwt (zichtbaar als het molecuul zich op het punt bevindt waar het tussen de gekronkelde vorm en de rechte conformatie springt) heel anders is voor RNA dan voor DNA (figuur 6): voor RNA is deze dynamiek minimaal een factor honderd langzamer [7]. Een aanzienlijk verschil dus.

Conclusies en vooruitzicht

Onze metingen geven een gedetailleerd overzicht van de mechanische eigenschappen van dubbelstrengs-RNA: belangrijke informatie voor het maken (en testen!) van modellen voor RNA in de biologische context en voor nieuwe toepassingen van RNA als bouw materiaal. Ze tonen met name aan dat de modellen die uitspraak doen over de mechanische eigenschappen van nucleïnezuren dienen te worden uitgebreid om ook het gedrag van RNA te verklaren.

De mogelijkheid om RNA in een magnetisch pincet te manipuleren in

combinatie met een beter begrip van de mechanische eigenschappen van RNA biedt nieuwe kansen om RNA-eiwitinteracties te bestuderen. Recente studies op dit terrein hebben bijvoorbeeld de kinetiek van eiwitten die het genomisch RNA van virussen openen [11] of kopiëren [12] in kaart gebracht. Ook is de manier belicht waarop het RNA in onze cellen door het ribosoom uitgelezen wordt om eiwitopbouw mogelijk te maken [13]. De torsionele manipulatie van RNA die we hebben laten zien en het daarvoor verkregen verbrede inzicht in de mechanische eigenschappen van RNA zullen toekomstige studies van RNA-eiwitinteracties ten goede komen.

Dankwoord

Wij bedanken graag onze collega's die bijgedragen hebben aan dit onderzoek, met name Gary M. Skinner, Johannes M. Keegstra, Toivo Hensgens, Tessa Jager, David Dulin, Serge P. Donkers, Fang-Chieh Chou en Rhiju Das.

Referenties

- 1 P. W. Rothmund, *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*, *Nature*, **440**, pp. 297-302, (2006).
- 2 H. Dietz, S. M. Douglas en W. M. Shih, *Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes*, *Science*, **325**, pp. 725-30, (2009).
- 3 P. C. Nelson, M. Radosavljevic en S. Bromberg, *Biological physics: energy, information, life*, Updated 1st ed. New York: W.H. Freeman and Co., (2008).
- 4 J. A. Abels et al., *Single-molecule measurements of the persistence length of double-stranded RNA*, *Biophysical Journal*, **88**, pp. 2737-44, (2005).

- 5 J. Lipfert et al., *Magnetic torque tweezers: measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNA filaments*, *Nat Methods*, **7**, pp. 977-80, (2010).
- 6 E. Herrero-Galan et al., *Mechanical identities of RNA and DNA double helices unveiled at the single-molecule level*, *J Am Chem Soc*, Dec 6 (2012).
- 7 J. Lipfert et al., *Double-stranded RNA under force and torque: Similarities to and striking differences from double-stranded DNA*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, pp. 15408-13, (2014).
- 8 J. Gore et al., *DNA overwinds when stretched*, *Nature*, **442**, pp. 836-9, (2006).
- 9 T. Lionnet et al., *Wringing out DNA*, *Phys Rev Lett*, **96**, p. 178102, (2006).
- 10 F. C. Chou, J. Lipfert en R. Das, *Blind predictions of DNA and RNA tweezers experiments with force and torque*, *PLoS Comput Biol*, **10**, p. e1003756, (2014).
- 11 W. Cheng et al., *Single-base pair unwinding and asynchronous RNA release by the hepatitis C virus NS3 helicase*, *Science*, **333**, pp. 1746-9, (2011).
- 12 D. Dulin et al., *Elongation-Competent Pauses Govern the Fidelity of a Viral RNA-Dependent RNA Polymerase*, *Cell Rep*, (2015).
- 13 J. D. Wen et al., *Following translation by single ribosomes one codon at a time*, *Nature*, **452**, pp. 598-603, (2008).