

Hochauflösende Festkörper-NMR-Spektroskopie an vollständig ^{13}C , ^{15}N -markierter RNA**

Alexey V. Cherepanov, Clemens Glaubitz und Harald Schwalbe*

Professor Horst Kessler zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie mit Probenrotation um den magischen Winkel (MAS-NMR) ist eine hochentwickelte, nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von biologischen Makromolekülen. MAS-NMR-Experimente können an gefrorenen Lösungen, in Membranen, an mikrokristallinen und gefriergetrockneten Proteinen durchgeführt werden. Sie liefern Information über Abstände zwischen Atomkernen, über Torsionswinkel und über die Orientierung und Dynamik von Molekülen. Mittels MAS-NMR-Spektroskopie können in einzigartiger Weise Makromoleküle in natürlicher Umgebung *in vitro* und *in vivo* untersucht werden, z. B. als isoliertes gereinigtes Protein,^[1] als Teil eines großen Multiproteinkomplexes,^[2,3] im fibrillären Zustand,^[4] in Zellorganellen,^[5] innerhalb einer gesamten Zelle, im Gewebe^[6,7] und im gesamten Organismus.^[8] Zusätzlich konnten erste Experimente zeigen, dass sich die Festkörper-NMR-Spektroskopie zu einer leistungsfähigen Methode für zeitaufgelöste Studien der makromolekularen Faltung und Katalyse entwickelt.^[9–11] Dabei können strukturelle und chemische Übergänge des Proteins durch Änderung der Temperatur selektiv fixiert („eingefroren“) oder zeitaufgelöst verfolgt werden.^[11–13]

Hier untersuchen wir Ribonukleinsäuren (RNA) durch Festkörper-NMR-Spektroskopie in atomarer Auflösung, wobei wir eine cUUCGg-Schlaufen-RNA als Modell verwenden. Vor kurzem haben wir diese Schlaufen-RNA in Lösung untersucht und eine hochaufgelöste Struktur (RMSD = 0.3 Å) bestimmt.^[14,15] Hier nutzen wir nun die ^{13}C -MAS-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung von RNA in

gefrorener Lösung, vergleichen Resultate mit Ergebnissen von Lösungs-NMR-Untersuchungen und analysieren Unterschiede anhand der Struktur der Schlaufen-RNA. Soweit wir wissen, ist dies die erste hochauflösende MAS-NMR-Studie an vollständig ^{13}C , ^{15}N -markierter RNA. Durch Festkörper- ^2H -NMR-Spektroskopie konnte die Bewegung einzelner Nukleotide der TAR-RNA aus HIV-1 im Verlauf der Erkennung durch ein Protein analysiert werden.^[16] NH...N-Wasserstoffbrücken in einer (CUG)₉₇-RNA wurden durch ^{15}N -MAS-NMR-Spektroskopie nachgewiesen.^[17] ^1H -Korrelationsexperimente wurden dabei mit hochauflösenden NHHN-, CHHC- und NHHC-Experimenten kombiniert.^[18] Doch trotz einer beeindruckenden Empfindlichkeit konnten wegen der geringen Dispersion der chemischen Verschiebung einzelne Reste nicht zugeordnet werden.

Das ^{13}C , ^{13}C -RFDR-MAS-NMR-Spektrum (RFDR: radiofrequenzgetriebene dipolare Einkopplung) der 14-meren Schlaufen-RNA ist in Abbildung 1 gezeigt. Alle Kreuzpeaks im Spektrum stammen von intraresidualen Korrelationen. Von den 168 möglichen Kreuzpeaks aufgrund des kurzreichweitigen direkten Kohärenztransfers im Festkörper können 158 im Spektrum beobachtet werden. In Cytidinen werden C4C5-Korrelationen nicht beobachtet. In Uridinen beobachten wir schwache C4C5-Kreuzpeaks bei einer Mischzeit von 5.74 ms. Zusammenfassend können wir 116 der 132 Kohlenstoffe eindeutig identifizieren, und nicht-eindeutige Zuordnungen werden insbesondere für C2- und C8-Kohlenstoffatome in der Nukleobase beobachtet. Neun dieser Signale konnten zugeordnet werden, da die Signale nicht überlagern und die Differenz zur chemischen Verschiebung in Lösung kleiner als 0.3 ppm ist (Abbildung 1, beschriftete Diagonalpeaks). Zusätzlich zu den Kreuzpeaks, die zwischen benachbarten Kohlenstoffatomen beobachtet werden, sehen wir auch weitreichendere Korrelationen über eine Distanz von ca. 2.4 Å (C1'C3', C3'C5' und C4C6). Kreuzpeaks zwischen Kohlenstoffatomen, die über Heteroatome verknüpft sind (z. B. C1'C4' und C2C4), konnten nicht beobachtet werden. Aus dieser Beobachtung kann man schließen, dass die weitreichenderen Korrelationen auf einem Kohlenstoff-vermittelten Kohärenztransfer beruhen, z. B. C1' → C2' → C3'. Von 112 möglichen weiterreichenderen Kreuzpeaks wurden 30 beobachtet, von denen 18 zugeordnet werden konnten (Abbildung 1, rote Schrift).

Zwölf weitreichende Kreuzpeaks können zu vier zusammengesetzten Kreuzpeakclustern zusammengefasst werden (Abbildung 1, Peaks 1–4). In Purinen beobachtet man langreichweitige Kreuzpeaks aufgrund eines C4C6-Transfers. Die entsprechenden Korrelationen konnten in Pyrimidinen nicht

[*] Dr. A. V. Cherepanov, Prof. Dr. H. Schwalbe
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Center for Biomolecular Magnetic Resonance (BMRZ)
Johann Wolfgang Goethe-Universität
60438 Frankfurt/M. (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29515
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

Prof. Dr. C. Glaubitz
Institut für Biophysikalische Chemie
Center for Biomolecular Magnetic Resonance (BMRZ)
Johann Wolfgang Goethe-Universität
60438 Frankfurt/M. (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurden im Rahmen des EU-geförderten Projekts „EU-NMR“ finanziert. Das Center for Biomolecular Magnetic Resonance (BMRZ) wird vom Land Hessen unterstützt. H.S. und C.G. sind Mitglieder des DFG-geförderten Exzellenzclusters „Makromolekulare Komplexe“.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906885> zu finden.

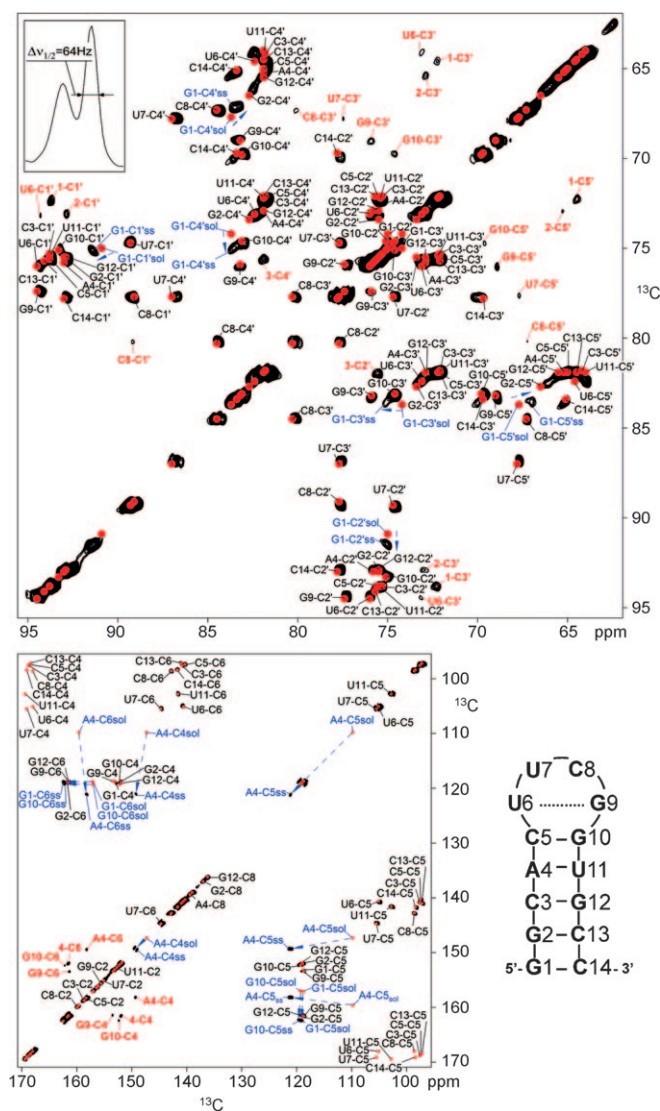


Abbildung 1. Regionen des ^{13}C , ^{13}C -RFDR-MAS-NMR-Spektrums der 14-meren Schleifen-RNA. Korrelationen über eine Bindung (rot) wurden auf der Basis der Zuordnung der Resonanzen in Lösung^[14,15] dargestellt. Kreuzpeaks zwischen nicht direkt gebundenen Kohlenstoffatomen sind in roter Schrift gekennzeichnet. Die größten Unterschiede zwischen Festkörper- (ss) und Lösungsdaten (sol) sind durch Pfeile markiert. Der Einschub oben links zeigt die Linienbreite der Signale im RFDR-Spektrum.

beobachtet werden. Die ^{13}C -chemischen Verschiebungen, die Daten der Lösungs-NMR-Untersuchungen^[14] und die Unterschiede zwischen beiden sind Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen zu entnehmen. Abbildung 1 und Tabelle S1 belegen, dass die chemischen Verschiebungen im Festkörper denen in Lösung sehr ähnlich sind: 89% der chemischen Verschiebungen sind bis auf 0.3 ppm gleich. Nur bei sechs Kohlenstoffatomen sind die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen größer als 1 ppm.

Um strukturelle Informationen zu erhalten, haben wir die ^{13}C -chemischen Verschiebungen eingehender untersucht. Solche Analysen werden zur Vorhersage der Proteinrückgratkonformation herangezogen und wurden sogar für die

De-novo-Strukturbestimmung bzw. Strukturverfeinerung genutzt.^[19,20] Wir untersuchen deshalb hier, welche Informationen bezüglich der Konformation aus den chemischen Verschiebungen von RNA-Molekülen im Festkörper abgeleitet werden können. Die Konformation des D-Aldofuranosersings kann durch zwei sterische Parameter beschrieben werden:^[21] den Phasenwinkel P der Pseudorotation und die Amplitude v_{max} der Auslenkung eines Atoms aus der Ebene. Der Torsionswinkel χ der N-glycosidischen Bindung (C1'N3 bzw. C1'N9) und der Torsionswinkel γ der exocyclischen C5'C4'-Bindung definieren die Konformation in der Peripherie des Rings. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome des Ribosersings hängen von diesen Parametern ab und werden zum größten Teil von diesen Parametern bestimmt. (Die Umkehrung des Problems, nämlich die Vorhersage der Torsionswinkel aus den beobachteten chemischen Verschiebungen, ist allerdings nicht trivial.)

Der von uns verwendete Ansatz nutzt empirische Kombinationen der chemischen Verschiebungen, die mit den einzelnen konformationellen Parametern korrelieren. Dabei werden die kanonischen Koordinaten *can1* und *can2* eingeführt [Gl. (1) und (2)].^[22]

$$\text{can1} = 0.179 \delta_{\text{C1}'} - 0.225 \delta_{\text{C2}'} - 0.0575 \delta_{\text{C5}'} \quad (1)$$

$$\text{can2} = -0.0605 \delta_{(\text{C2}'+\text{C3}')} - 0.0556 \delta_{\text{C4}'} - 0.0524 \delta_{\text{C5}'} \quad (2)$$

Mithilfe der Gleichungen (1) und (2) kann die Ribosekonformation für unterschiedliche Pseudorotationsphasen P und exocyclische Torsionswinkel γ abgeleitet werden (Abbildung 2 C).

Die Riboseringe der Nukleotide U7 und C8 der 14-meren Schleifen-RNA nehmen in Lösung eine fast exakte C2'-endo-Konformation mit einer Phase $P = 157 \pm 1^\circ$ bzw. $159 \pm 4^\circ$ ein. G9 zeigt eine *gt*-artige Torsion mit einem Winkel $\gamma = 165 \pm 11^\circ$, und G10 weist eine +anticlinale Torsion mit einem Winkel $\gamma = 100 \pm 8^\circ$ auf. Abbildung 2 C zeigt die Verteilung der Konformere im kanonischen Raum. Die (*can1*, *can2*)-Parameter sagen die Konformation des terminalen Nukleotids G1 falsch voraus, denn es ist weder in einer S-artigen Konformation ($P \approx 12^\circ$) noch weist es eine *gt*-Torsion ($\gamma \approx 83^\circ$) um γ auf. Lösungs- und Festkörper-NMR-Daten zeigen nur sehr kleine Unterschiede, ein starkes Indiz, dass die Struktur der Schleifen-RNA durch Einfrieren nicht verändert wird. Die kanonischen Daten von G1 im Festkörper sind in Richtung *N/gg*-Konformation verschoben, ein Zeichen dafür, dass das 5'-Ende der RNA weniger flexibel ist und deshalb „etwas helicaler“ wird, wenn die RNA im Eis eingefroren wird.

Um die Verwendung der kanonischen Koordinaten weiter zu nutzen und die statistische Basis der empirischen Gleichungen zu verbessern, haben wir Daten einer 44-meren RNA (BMRB-Eintrag 4120, Abbildung 2, graue Kreise) verwendet. Die Analyse eines kombinierten Datensatzes zeigt, dass die (*can1*, *can2*)-Transformation 14 falsche Vorhersagen liefert (Abbildung 2 C). Dabei fällt auf, dass (*can1*, *can2*)-Koordinaten nicht orthogonal sind ($\text{can2} \approx 0.3 \text{ can1} - 15$). Dieses Ergebnis erhält man auch für einen großen, strukturell diversen Datensatz.^[23] Um die Orthogo-

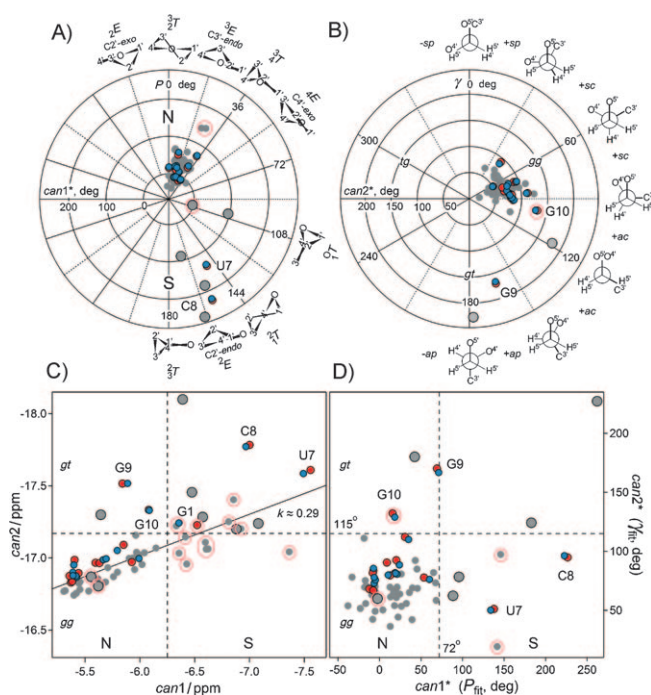


Abbildung 2. ^{13}C -chemische Verschiebungen der Ribose-Kohlenstoffatome als Funktion der Pseudorotationsphase P und des Torsionswinkels γ ; Einträge 4120 (grau) und 5705 (rote und blaue Kreise) in der BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank). A) Korrelation von can1^* [Gl. (3)] mit der Pseudorotationsphase P . B) Abhängigkeit von can2^* [Gl. (4)] vom Torsionswinkel γ . C) Kanonische Koordinaten gemäß Gleichungen (1) und (2). can1 -Werte kleiner als -6.25 ppm sagen eine Konformation des Riboserrings mit $90 < P < 270^\circ$ voraus (siehe A). Reste mit $\text{can2} < -17.2$ ppm nehmen bevorzugt die *gauche-trans*(*gt*)-Konformation um die $\text{C5}'\text{-C4}'$ -Bindung an, wie in (B) gezeigt. D) Kanonische Koordinaten gemäß Gleichungen (3) und (4). Die MAS-NMR-Daten sind blau gekennzeichnet, die Lösungs-NMR-Daten rot. Große graue Kreise kennzeichnen Reste mit S-förmiger Zuckerkonformation und/oder +*ac*-, +*ap*-Konformation. Reste, für die eine andere Konformation aufgrund der chemischen Verschiebungen vorhergesagt wird als in der Strukturbestimmung beobachtet, sind durch rosa Kreise markiert. N, S = north, south; k = Steigung der Geraden, die durch den Angleich der kanonischen Koordinaten mittels einer linearen Regression definiert ist.

nalität zu verbessern, haben wir eine neue Korrelation kanonischer Koordinaten abgeleitet [Gl. (3) und (4), siehe auch Hintergrundinformationen].

$$\text{can1}^* = -14.7 \delta_{\text{C1}'} + 22.1 \delta_{\text{C2}'} + 13.2 \delta_{\text{C3}'} + 6.5 \delta_{\text{C4}'} - 2.9 \delta_{\text{C5}'} - 1595 = P_{\text{fit}} \quad (3)$$

$$\text{can2}^* = 9.8 \delta_{\text{C1}'} + 16.5 \delta_{\text{C2}'} - 0.5 \delta_{\text{C3}'} - 1.7 \delta_{\text{C4}'} + 13.5 \delta_{\text{C5}'} - 2781 = \gamma_{\text{fit}} \quad (4)$$

can1^* umfasst Winkel P von -40° bis 260° ; die beobachteten Werte für P sind zwischen -10° und 170° verteilt. can2^* umfasst Winkel von 20° bis 230° bzw. von 16° bis 180° für die experimentellen γ -Daten (Abbildung 2D). Die durchschnittliche Genauigkeit der Winkel (can1^* , can2^*) ist $\pm 30^\circ$ bzw. $\pm 20^\circ$, was ausreicht, um eine qualitative Konformationsanalyse einer unbekannten Struktur durchzuführen. Am

Datensatz mit 58 Nukleotiden zeigt sich, dass (can1^* , can2^*)-Koordinaten linear unabhängiger sind als (can1 , can2) und nur vier falsche Vorhersagen ergeben, was einer Verbesserung um einen Faktor 3.5 entspricht. Die Genauigkeit der Vorhersage verbessert sich von 76 % auf 93 %. Eine weitere Verbesserung der Genauigkeit könnte sich durch das Anpassen einzelner Torsionswinkel $\nu_0\text{-}\nu_4$ und $\gamma\text{-}\chi$ an die Daten ergeben. Die kanonische Analyse zeigt, dass die Riboserringe der 14-meren RNA eine sehr ähnliche Konformation in Lösung und im Festkörper haben. In Abbildung 3 sind die Unterschiede der ^{13}C -chemischen Verschiebungen zwischen dem Lösungs- und Festkörperzustand auf die Struktur der Schlaufen-RNA übertragen. Dabei können vier übergeordnete Trends ausgemacht werden, die auf spezifische Modulationen der Struktur deuten.

Als ersten Trend beobachtet man eine Tieffeldverschiebung um 0.2–0.3 ppm der $\text{C5}'$ -, $\text{C4}'$ - und $\text{C3}'$ -Zuckerresonanzen im Festkörper, was man am besten anhand der leicht blauen Tönung der Atome entlang der kleinen Furche der RNA-Helix sieht. Der zweite Trend ist eine gegenläufige Hochfeldverschiebung um 0.1–0.2 ppm der $\text{C1}'$ -Zuckerresonanzen. Als drittes beobachtet man eine Hochfeldverschiebung der Kohlenstoffsignale der Nukleotide innerhalb der Schlaufe. Als viertes schließlich beobachtet man große Verschiebungen der Signale der Nukleotide G1, A4 und G10. Dieser vierte Trend wird nur für einige Kohlenstoffatome innerhalb der Nukleobasen beobachtet, während andere Kohlenstoff innerhalb dieser Nukleotide keine unterschiedlichen chemischen Verschiebungen aufweisen. Die anderen Änderungen der chemischen Verschiebungen sind wenigstens um einen Faktor 10 kleiner als die Änderungen, die innerhalb der Schlaufenregion und der Helix beobachtet werden (Tabelle S1 und Abbildung S3). Daraus schließen wir, dass die konformationellen Unterschiede sehr klein sein sollten.

Eisgitter haben eine hohe Affinität für nicht-gefrorenes Wasser in der Hydratationssphäre von Makromolekülen.^[24,25] Eine RNA-Helix in Lösung wird durch Wassercluster, die man in der großen Furche findet, sowie durch Tandemwassermoleküle in der kleinen Furche stabilisiert.^[26] Eine partielle Dehydratation während des Gefriervorgangs verdrängt einige diese Wassermoleküle.^[27] Die Verdrängung der Wassermoleküle aus der kleinen Furche könnte eine der Ursachen für die Hochfeldverschiebung der $\text{C1}'$ -Resonanzen sein. Die Packung der Schleifenregion in der gefrorenen Umgebung könnte die Struktur stabilisieren und zu einer Hochfeldverschiebung der Kohlenstoffsignale führen. Die Bindung von Na^+ -Ionen aufgrund von Ladungsaggregation und der Bildung von Bjerrum-Ionenpaaren könnte wie in einzelnen Nukleotiden^[28] die Kohlenstoffatome des Phosphodiester-rückgrats tieffeldverschieben.

Es ist bekannt, dass Stapel-effekte in Nukleinsäuren die Resonanzen der Kohlenstoffatome in der Nukleobase hochfeldverschieben,^[29] während Wasserstoffbrücken der benachbarten Heteroatome umgekehrt eine Tieffeldverschiebung bewirken.^[30,31] In der 14-meren RNA sind die C2 -, C4 -, C5 - und C8 -Resonanzen des Nukleotids A4 gegenüber freiem ATP hochfeldverschoben, während die C6 -Resonanz tieffeldverschoben ist (Tabelle S2). Ähnliche Verschiebungen der C6 -Resonanzen der Nukleotide G1 und G10 könnten von

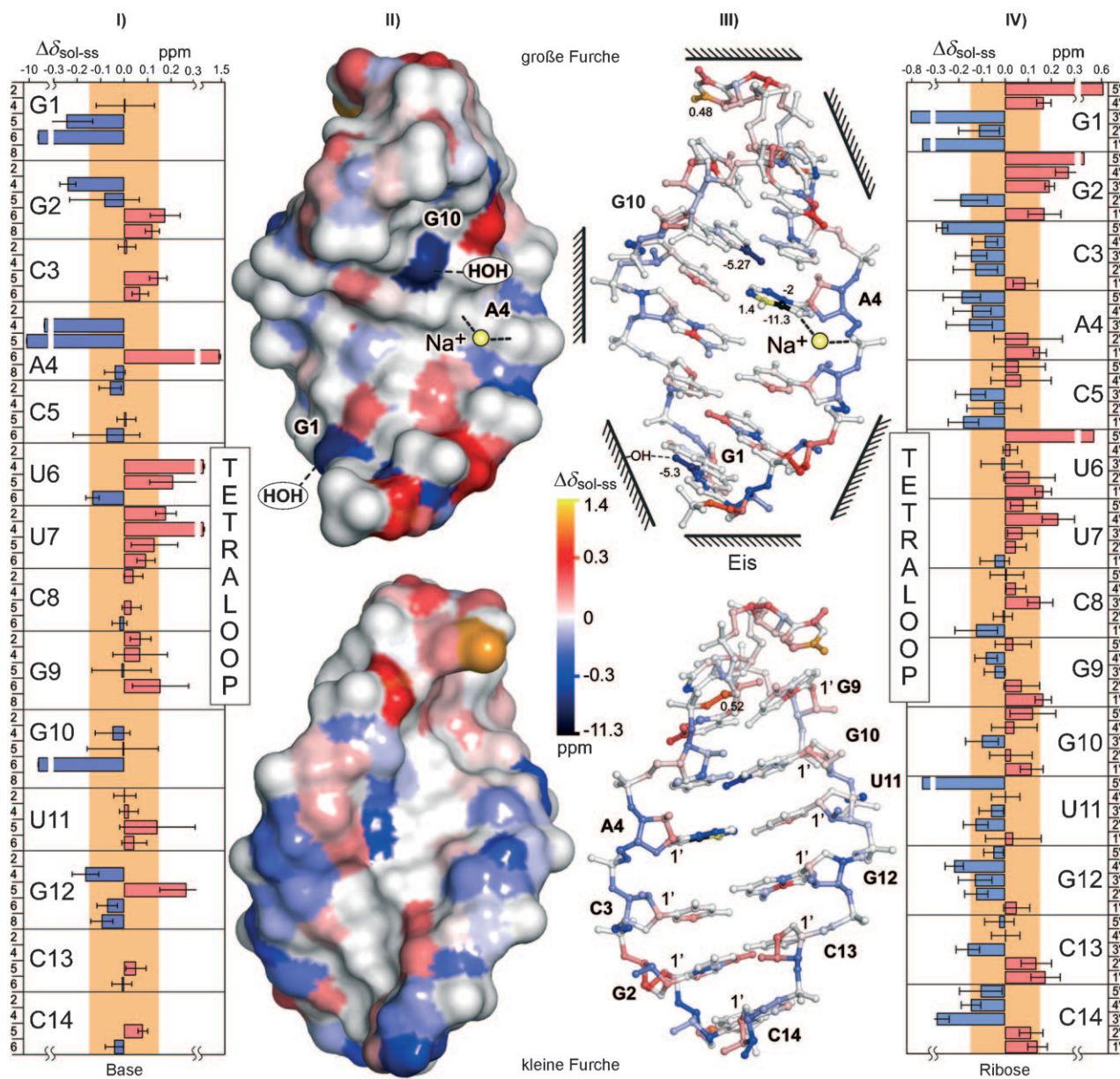


Abbildung 3. Lösungsdaten (sol)^[14] und MAS-NMR-Daten (ss) im Vergleich: Unterschiede in den ¹³C-chemischen Verschiebungen. I, IV) Atome der Nukleobasen bzw. der Ribosegruppen, die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. Die Linienbreiten in den RFDR-Experimenten sind als hellbrauner Balken angedeutet. II, III) Übertragung der Änderungen der chemischen Verschiebung auf die Struktur der 14-meren Schlaufen-RNA (PDB-Code 2koc)^[15]. Der Farbbalken codiert die Unterschiede in ppm. Die Lage des an A4 gebundenen Na⁺-Ions und postulierte Wasserstoffbrücken zu externen Wassermolekülen sind angedeutet. Aus Darstellungsgründen sind die an die Kohlenstoffatome gebundenen Sauerstoff- und Wasserstoffatome in gleicher Farbe gezeigt.

Wasserstoffbrücken des O6-Atoms mit externen, eingefrorenem Wasser herrühren. Die Bindung von Na^+ im gefrorenen Zustand durch die Atome N7 und O α (Abbildung 3, II und III) könnte die Ursache für die Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Nukleobasen des Nukleotids A4 sein.

Zusammenfassend ist es uns gelungen, durch ^{13}C -MAS-NMR-Spektroskopie eine 14-mere Schlaufen-RNA mit den Schlaufenresten cUUCGg zu charakterisieren. Die Analyse der chemischen Verschiebungen zeigt, dass die Strukturen der Schlaufen-RNA in Eis und in Lösung sehr ähnlich sind.

Kleinere Unterschiede der Struktur können vermutlich auf eine partielle Dehydratation der RNA, auf die Bindung von Na^+ -Ionen und die Bildung von Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen auf der Eisoberfläche zurückgeführt werden. Unsere Untersuchungen zeigen, dass RNA-Moleküle einen Wasser-Eis-Phasentransfer durchlaufen können, ohne dass sich die Struktur in signifikanter Weise änderte. Die NMR-Spektren sind gut aufgelöst und liefern hervorragende Signalintensität. Man kann einheitlich markierte RNA-Moleküle anstelle von selektiv markierten Molekülen einsetzen, da die Signale, die in NMR-Korrelationsexperimenten be-

obachtet werden, eine bemerkenswert schmale Linienbreite und sehr gute Dispersion aufweisen. Unsere Ergebnisse zeigen erstmalig, dass Gefrierschock-Experimente die Untersuchung von Struktur-Funktions-Korrelationen in RNA-Molekülen während ihrer Faltung, Ligandenerkennung und Katalyse ermöglichen. Die Ergebnisse schaffen eine Basis für neuartige molekulare RNA-Studien und könnten auch das Interesse der „RNA-Community“ für die Festkörper-NMR-Spektroskopie wecken.

Eingegangen am 7. Dezember 2009,
veränderte Fassung am 16. Februar 2010
Online veröffentlicht am 8. Juni 2010

Stichwörter: Festkörperstrukturen · Gefriertrocknung · Konformationsanalyse · NMR-Spektroskopie · RNA

-
- [1] A. McDermott, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 385.
 [2] A. Alia, S. Ganapathy, H. J. M. de Groot, *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 415.
 [3] I. Kawamura, Y. Ikeda, Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, S. Yamaguchi, S. Tuzi, H. Saito, N. Kamo, A. Naito, *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 339.
 [4] O. N. Antzutkin in *Modern Magnetic Resonance, Vol. 1* (Hrsg.: G. E. Webb), Springer, Dordrecht, **2006**, S. 19.
 [5] M.-A. Sani, O. Keech, P. Gardestrom, E. J. Dufourc, G. Grobner, *FASEB J.* **2009**, *23*, 2872.
 [6] J. Kelly, H. Jarrell, L. Millar, L. Tessier, L. M. Fiori, P. C. Lau, B. Allan, C. M. Szymanski, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 2427.
 [7] T. E. Sjobakk, R. Johansen, T. F. Bathen, U. Sonnewald, R. Juul, S. H. Torp, S. Lundgren, I. S. Gribbestad, *NMR Biomed.* **2008**, *21*, 175.
 [8] H. Winning, N. Viereck, B. Wollenweber, F. H. Larsen, S. Jacobsen, I. Sondergaard, S. B. Engelsens, *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 291.
 [9] J. N. S. Evans, R. J. Appleyard, W. A. Shuttleworth, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1588.
 [10] A. V. Cherepanov, E. V. Doroshenko, J. Matysik, S. de Vries, H. J. de Groot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8563.
 [11] A. V. Cherepanov, E. V. Doroshenko, J. Matysik, S. de Vries, H. J. de Groot, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6820.
 [12] A. V. Cherepanov, S. De Vries, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, *1656*, 1.
 [13] A. L. Fink, G. A. Petsko in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Hrsg.: M. Alton), **2006**, S. 177.
 [14] B. Fürtig, C. Richter, W. Bermel, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2004**, *28*, 69.
 [15] S. Nozinovic, B. Fürtig, H. R. Jonker, C. Richter, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 683.
 [16] G. L. Olsen, M. F. Bardaro, Jr., D. C. Echodu, G. P. Drobny, G. Varani, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 303.
 [17] J. Leppert, C. R. Urbinati, S. Hafner, O. Ohlenschläger, M. S. Swanson, M. Görlach, R. Ramachandran, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1177.
 [18] C. Herbst, K. Riedel, Y. Ihle, J. Leppert, O. Ohlenschläger, M. Görlach, R. Ramachandran, *J. Biomol. NMR* **2008**, *41*, 121.
 [19] Y. Shen, O. Lange, F. Delaglio, P. Rossi, J. M. Aramini, G. Liu, A. Eletsky, Y. Wu, K. K. Singarapu, A. Lemak, A. Ignatchenko, C. H. Arrowsmith, T. Szyperski, G. T. Montelione, D. Baker, A. Bax, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4685.
 [20] K. Seidel, M. Etzkorn, R. Schneider, C. Ader, M. Baldus, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2009**, *35*, 235.
 [21] *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 1273.
 [22] M. Ebrahimi, P. Rossi, C. Rogers, G. S. Harbison, *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 1.
 [23] O. Ohlenschläger, S. Haumann, R. Ramachandran, M. Görlach, *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 139.
 [24] A. S. Goryunov, *Gen. Physiol. Biophys.* **2006**, *25*, 303.
 [25] M. Falk, A. G. Poole, C. G. Goymour, *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 1536.
 [26] M. Egli, S. Portmann, N. Usman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8489.
 [27] S. A. Kazakov, S. V. Balatskaya, B. H. Johnston, *RNA* **2006**, *12*, 446.
 [28] H. A. Tajmir-Riari, T. Theophanides, *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 2065.
 [29] M. P. Stone, S. A. Winkle, P. N. Borer, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1986**, *3*, 767.
 [30] P. N. Borer, S. R. LaPlante, N. Zanatta, G. C. Levy, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 2323.
 [31] E. A. Boudreau, I. Pelczer, P. N. Borer, G. J. Heffron, S. R. LaPlante, *Biophys. Chem.* **2004**, *109*, 333.
-