

Der Einbau von 2-Aminopurin beeinflusst die Dynamik und Struktur von DNA**

André Dallmann, Lars Dehmel, Torben Peters, Clemens Mügge, Christian Griesinger, Jennifer Tuma* und Nikolaus P. Ernsting*

2-Aminopurin (2AP) ist ein Strukturisomer des Adenins (A) mit der Aminogruppe an C2 statt an C6, das ein stabiles Watson-Crick(WC)-analoges Basenpaar mit Thymin (T) bilden kann (Abbildung 1).^[1,2] Anders als die natürlichen

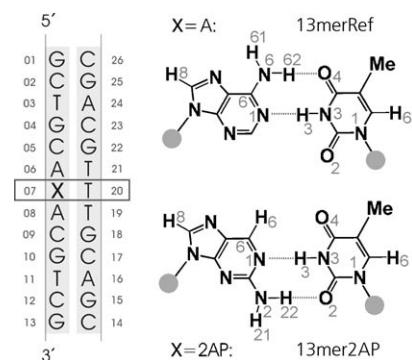


Abbildung 1. Sequenz des DNA-Duplex mit der chemischen Struktur der 2AP:T- und A:T-Basenpaare. Eine symmetrische, nichtpalindromische Sequenz aus 13 Basenpaaren wurde ausgewählt, um Fehlpaarungen oder Schleifenbildung zu vermeiden, das „Ausfransen“ zu minimieren, und um lediglich eine Modifikationsstelle einzuführen.

Nukleobasen fluoresziert 2AP in erheblichem Maße, und – was noch wichtiger ist – die Fluoreszenzquantenausbeute sinkt um das 100-Fache, wenn 2AP in eine Doppelhelix eingebunden wird.^[3] Zahlreiche Arbeiten bedienen sich der 2AP-Fluoreszenz, um Fragestellungen in der Strukturbioologie und Biophysik zu untersuchen: durch Methyltransferase induziertes Herausdrehen von Basen („base flip“),^[4–6] Konformationsänderungen und der enzymatische Abbau des Hammerhead-Ribozyme,^[7,8] Promoterbindung und Beweg-

lichkeit der T7-RNA-Polymerase,^[9,10] Bindung und Doppelstrangdissoziation von Primer-Templat-DNA durch T4-DNA-Polymerase^[11–13] und Ladungstransfermechanismen in DNA, die mit polarer Solvation gekoppelt sind.^[14–16] Alternativ können Strukturänderungen auch über eine niedrigerenergetische CD-Bande verfolgt werden. Dieses Verfahren wurde bisher nur auf RNA- und DNA-Haarnadelschleifen angewendet.^[17,18] Die große Zahl an Publikationen, in denen 2AP verwendet wird, zeigt dessen Bedeutung für Untersuchungen an biologischen Makromolekülen.

Werden Strukturübergänge in biologischen Systemen mithilfe einer Molekülsonde untersucht, so geht man davon aus, dass das modifizierte System sich genauso verhält wie das natürliche. Folglich sollte die Einbettung der Sonde die Struktur und Dynamik des Makromoleküls unverändert lassen. Vom Fluorophor induzierte Strukturstörungen wurden bereits mehrfach mithilfe der NMR-Spektroskopie in Lösung analysiert.^[19–23] Im Fall des Einbaus von 2AP waren die Änderungen jedoch so gering, dass zu jener Zeit keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten.^[24,25] Mit modernen Hochfeldspektrometern und einer großen Auswahl an NMR-Parametern ist es angebracht, durch 2AP induzierte Änderungen nochmals detailliert zu untersuchen.

Zu diesem Zweck präsentieren wir die NMR-Struktur in Lösung und die Basenpaardynamik von zwei 13mer-DNA-Duplexen (Abbildung 1) mit X = A in der Referenzsequenz und X = 2AP in der modifizierten Probe (im Folgenden 13merRef bzw. 13mer2AP genannt). Die einzige Änderung, die in die Helix eingeführt wird, ist die unterschiedliche Stellung der Aminogruppe in A und 2AP. Wie stark werden Struktur und Dynamik davon beeinflusst? Um diese Frage zu beantworten, haben wir 2D-NMR-Spektroskopie und Messungen von dipolaren Restkopplungen (RDC) in Verbindung mit „Simulated-Annealing“-Rechnungen für die Strukturbestimmung eingesetzt. Selektive NMR- T_1 -Experimente wurden genutzt, um die Basenpaardynamik einzuschätzen, und temperaturabhängige Absorptions- und Fluoreszenzmessungen, um ein lokales Schmelzen zu charakterisieren. Durch die Kombination der Informationen aus diesen verschiedenen Ansätzen sollte der Effekt einer Einzelsubstition A → 2AP bewertet werden.

Alle NMR-Resonanzen außer den stark überlappenden H5'/H5"-Signale konnten auf der Grundlage von Intra- und Internukleotid-NOEs zugeordnet werden.^[26] Die Bildung eines WC-analogen Basenpaares für 2AP wird durch das Iminoprotonensignal von T20 belegt, das – wenn auch verbreitert – für 13mer2AP bei 298 K beobachtet wird.^[26] Im Unterschied zu einer früheren Arbeit^[24] sind alle Kreuzpeaks, die für reguläre B-DNA-Strukturen erwartet werden, in den

[*] Dr. C. Griesinger, Dr. J. Tuma
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: jetu@nmr.mpiibpc.mpg.de

Dr. A. Dallmann, L. Dehmel, T. Peters, Dr. C. Mügge,
Dr. N. P. Ernsting
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie
12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: nernst@chemie.hu-berlin.de

[**] Wir danken der Humboldt-Universität zu Berlin (N.P.E.) und der Max-Planck-Gesellschaft (C.G.) für die Unterstützung. Diese Arbeit wurde durch die DFG-Projekte ER 154/9-1 (N.P.E.) und GR 1211/14-1 (C.G.) gefördert. Wir danken Dr. H. Schmidt, Göttingen, für die Hilfe bei der Phagenpräparation und konstruktive Diskussionen sowie Dr. C. Schwieters für seine Hilfe bei der Implementierung von Methyl-RDCs in die Strukturberechnungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001312> zu finden.

NOESY-Spektren beider Proben präsent. Für das T20-Iminoprotonensignal wurde im NOESY-Spektrum jedoch ein schneller Intensitätsabfall mit steigender Mischzeit verzeichnet. Um zu überprüfen, ob Wasseraustausch der Grund für dieses Phänomen ist, haben wir Wassersättigungstransfer-Experimente durchgeführt. Das Fehlen bzw. die Reduktion des T20- und der benachbarten Iminoprotonensignale nach der (Vor)Sättigung des Wassersignals deutet auf einen sehr schnellen Austausch von 2AP:T und erhöhte Austauschgeschwindigkeiten der benachbarten Basenpaare hin.

Dieser Befund wurde anschließend mithilfe von Basenpaarlebensdauer-Messungen überprüft. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 einer Resonanz wird unter Zugabe einer Base B, die den Protonenaustausch katalysiert, gemessen [Gl. (1)]. T_{10} bezeichnet dabei die T_1 -Zeit des Protons ohne Zusatz von Base.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{10}} + \frac{1}{\tau_{ex}} \quad (1)$$

Unter der Bedingung, dass der katalysierte Iminoprotonenaustausch bestimmt ist, hängt die Austauschzeit τ_{ex} linear von der inversen Katalysatorkonzentration ab [Gl. (2)].^[27] K_D bezeichnet hier die scheinbare Dissoziationskonstante.

$$\tau_{ex} = \tau_{op} + \frac{1}{K_D} \frac{1}{[B]} \quad (2)$$

Durch Extrapolation auf unendliche Katalysatorkonzentration kann man so die Basenpaarlebensdauer τ_{op} errechnen. Abbildung 2 zeigt die entsprechenden Daten und linearen Anpassungen für die sieben zentralen Basenpaare und deren extrapolierte Lebensdauern für 13merRef und 13mer2AP. Alle berechneten Lebensdauern liegen im Bereich bereits publizierter Daten.^[25,28,29] Lebensdauern in Grün beziehen sich auf überlappende Resonanzen in der Iminoprotonenregion. Da die Überlappung total und die Signalerholung identisch ist, können nur gemittelte Lebensdauern angegeben werden. Die R^2 -Werte für alle linearen Anpassungen liegen über 0.996. Die Vertrauensintervalle der Lebensdauern wurden ebenfalls aus den Anpassungen ermittelt.

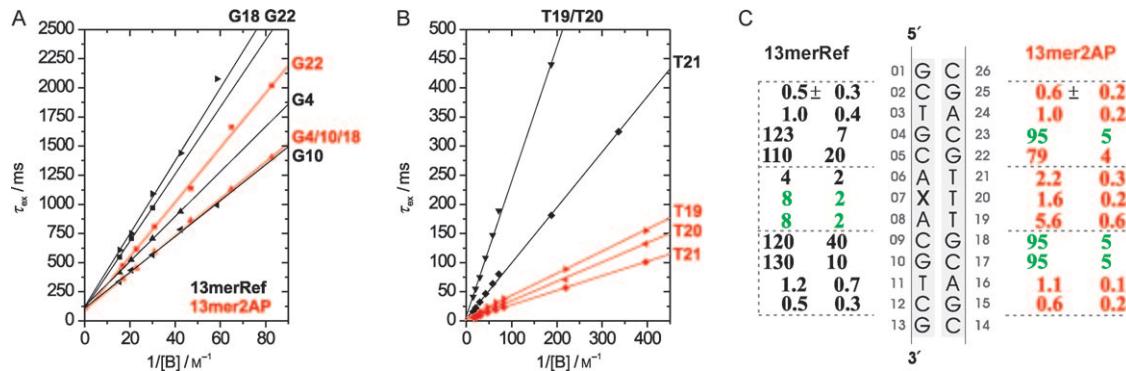


Abbildung 2. Bestimmung der Basenpaarlebensdauern. Die Rückkehr des Iminoprotonensignals nach Inversion wird durch TRIS (=Tris(hydroxymethyl)aminomethan) beeinflusst, das als Base den Austausch mit Wasser katalysiert. Die Austauschzeit τ_{ex} ist abhängig von der inversen Basenkonzentration $1/[B]$, mit verschiedenen Bereichen für G:C- und A:T-Paare. Durch Extrapolation auf unendliche Katalysatorkonzentration erhält man die Basenpaarlebensdauern, die im rechten Teil des Bildes aufgeführt sind. Lebensdauern in Grün konnten nicht separat bestimmt werden, aber sie sollten wegen des identischen Rückkehrverhaltens nach Inversion ähnlich sein.

Die Lebensdauern der terminalen Basenpaare konnten aufgrund des „Ausfransens“, das am Helixende üblicherweise beobachtet wird, nicht bestimmt werden. Dort sind die Basenpaarlebensdauern stark verkürzt, was eine Signalverbreiterung bis hin zum Verschwinden der Signale für die terminalen Basen und die Schwächung der Signale für benachbarte Basenpaare zur Folge hat.^[29,30] Obwohl sie durch das „Ausfransen“ beeinflusst werden, sind die Lebensdauern für die semiterminalen G:C- (0.5 ms) und A:T-Basenpaare (1.1 ms) für 13merRef und 13mer2AP identisch im Rahmen des ermittelten Fehlers. Da das „Ausfransen“ von den Eigenschaften der Lösung (pH, Puffer, Temperatur) abhängt, zeigt die Übereinstimmung, dass selbst die Bestimmung von Lebensdauern unter 1 ms noch verlässliche Ergebnisse liefert und die Eigenschaften der Proben vergleichbar sind. Anders als bei den äußeren Basenpaaren unterscheiden sich die Lebensdauern für die sieben inneren Basenpaare von 13merRef und 13mer2AP. Die Substitution A → 2AP reduziert τ_{op} drastisch für die zentralen A:T-Paare (um 45%, 80%, 30% für T21, T20 bzw. T19) und weniger stark für die entfernteren G:C-Paare (um 20–30%).

Kommen wir nun zum Sättigungstransfer zurück (Abbildung 3), der Informationen über die Dynamik ohne Zusatz einer Base als Katalysator liefert. Die beobachtete Reduktion des Signals ist zurückzuführen auf eine Öffnung des Basenpaares, gefolgt vom Austausch durch intrinsische Katalyse. Betrachten wir zum Beispiel die T3- und T20-Iminoprotonen von 13mer2AP. Obwohl ihr τ_{op} vergleichbar ist, ist die Signalreduktion durch die Wassersättigung wesentlich ausgeprägter für T20 als für T3. Dies impliziert eine höhere Austauschgeschwindigkeit durch intrinsische Katalyse für das 2AP:T-Basenpaar. Die Reduktion der Signale für die drei zentralen Basenpaare (Abbildung 3) stimmt mit den Ergebnissen aus den Basenpaarlebensdauer-Messungen überein. Wir haben demzufolge gezeigt, dass die Dynamik des gesamten Zentrums durch eine einzelne Substitution A → 2AP beeinflusst wird.

Schmelzkurven von 13mer2AP (Abbildung 4) liefern einen unabhängigen, thermodynamischen Beweis für die Kooperativität unter den zentralen Basenpaaren. Anhand der UV-Absorption kann das Schmelzverhalten des gesamten

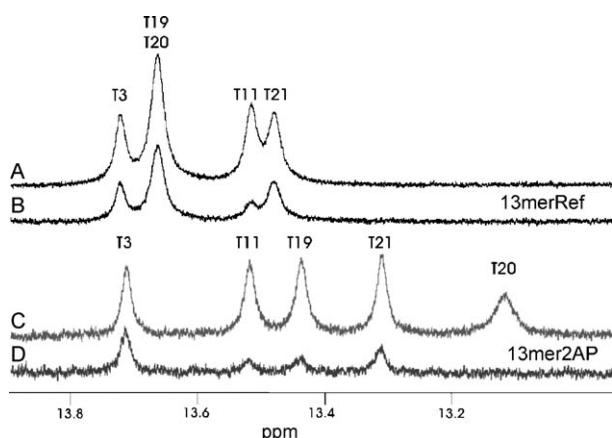


Abbildung 3. Sättigungstransferexperimente in H_2O . Die Signalintensitäten für austauschbare Protonen sind in den 1D-Spektren (B,D) reduziert. Dies spiegelt die relativen Geschwindigkeiten wider, mit denen die Iminoprotonen mit dem Lösungsmittel austauschen. Eine Wassersättigung wird in den 1D-WATERGATE-Spektren (A,C), die zum Vergleich dargestellt sind, vermieden.

Duplex untersucht werden, während die 2AP-Fluoreszenz nur durch die nähere Umgebung beeinflusst wird. In einem anderen Dodecamer^[31] unterscheiden sich die Schmelzpunkte, die durch Absorption (Duplex) und Fluoreszenz (nur 2AP) ermittelt wurden, um 1.6 K, was auf ein „Initialschmelzen“ an der 2AP-modifizierten Stelle hindeutet. Wir beobachten Schmelzpunkte von 59.2 bzw. 59.7°C, sodass ein zu vernachlässigendes „Initialschmelzen“ an der Modifikationsstelle angenommen werden kann. Das Zentrum des Duplex schmilzt als Ganzes, wodurch der Schmelzpunkt insgesamt um $\Delta T_2 = 3.5$ K gegenüber dem von 13merRef sinkt. Dieser Effekt deutet auf eine Verminderung der Schmelzentropie um etwa 3.4 cal mol⁻¹ K⁻¹ bei der Verlagerung der Aminogruppe von der großen zur kleinen Furche hin. Diese Verschiebung befreit O4 von T20 aus der Wasserstoffbrücke, sodass dieses Atom für eine Hydratation zugänglich ist. Folglich sind die Hydratationsänderungen beim Schmelzvor-

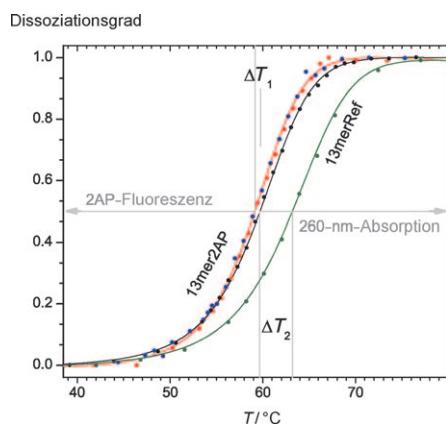


Abbildung 4. Schmelzkurven, die über die Absorption von 13mer2AP (schwarz) und die 2AP-Fluoreszenzquantenausbeute (blaue Punkte: Aufheizen; rote Punkte: Abkühlen) erhalten wurden. Eine Schmelzkurve für 13merRef ist ebenfalls abgebildet (grün). Es wurde jeweils bei einer Einzelstrang-Gesamtkonzentration von 23.7 μM gemessen.

gang kleiner und die aufzuwendende Entropie geringer, was mit den Ergebnissen unserer Basenpaarlebensdauer-Messungen übereinstimmt. Aber Enthalpieänderungen sind ebenso beteiligt, wie wir als Nächstes sehen.

Nachdem auf NOE-Basis eine Struktur berechnet worden war, wurden die RDC-Nebenbedingungen (Standardabweichung der Messung: 0.6 Hz) in die Strukturverfeinerung unter Verwendung eines variablen Ausrichtungstensors einbezogen. Aus einem Satz von 100 berechneten Strukturen für 13merRef und 13mer2AP sind in Abbildung 5 die zehn ener-

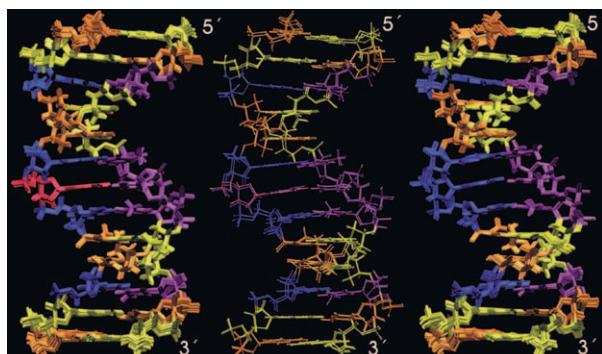


Abbildung 5. Die Überlagerung der zehn energieärmsten Strukturen ohne Verletzung der Nebenbedingungen für 13merRef und 13mer2AP. Die Standardabweichungen (RMSDs) für jeden Satz an Strukturen sind 0.30 Å bzw. 0.33 Å. Die gemittelten Strukturen der beiden Duplexe werden im mittleren Bildteil verglichen (RMSD 0.46 Å).

gieärmsten Strukturen ohne Verletzung der Nebenbedingungen gezeigt. Diese Strukturen wurden genutzt, um jeweils eine gemittelte Struktur zu berechnen. Die Richtigkeit der Rechnungen wurde durch Rückrechnung des NOESY-Spektrums und der RDCs aus der gemittelten Struktur und Vergleich mit dem experimentellen Spektrum bzw. den RDCs überprüft ($R = 1.000$, für Details siehe die Hintergrundinformationen). Die Präzision der Rechnungen kann aus der Standardabweichung (RMSD) der zehn besten Strukturen von ihrer gemittelten Struktur abgeschätzt werden, die 0.30 Å für 13merRef und 0.33 Å für 13mer2AP beträgt. Eine Überlagerung der beiden gemittelten Strukturen (RMSD 0.46 Å) ist im mittleren Teil von Abbildung 5 zu sehen.

Die geringeren RMSDs unter den zehn besten Strukturen stützen die These, dass, obwohl die Gesamtkonformation identisch ist, geringe, aber signifikante Unterschiede existieren. Es stellt sich die Frage, ob diese Unterschiede lokalisiert werden können. Zu diesem Zweck wurden Helixparameter für jede der zehn besten Strukturen mit dem Programm 3DNA berechnet.^[32] Geringe aber signifikante Störungen werden über die gesamte Helix verteilt beobachtet (Details siehe Abbildungen S8–S13 und Tabellen S14–S26 in den Hintergrundinformationen). Propeller-Verdrehung („propeller twist“,) und Öffnung („opening“) des Basenpaares X7:T20 weisen mit 7.0° bzw. 3.3° die größten Differenzen auf.

Wir haben zwei DNA-Duplexe mit einem zentralen ...AXA...-Motiv untersucht, die sich nur in einer Nukleobase unterscheiden (X = A oder 2AP, siehe Abbildung 1). Die intrinsische Austauschgeschwindigkeit für 2AP:T ist stark

erhöht, wie der rasche Wasseraustausch selbst bei Fehlen eines externen Katalysators zeigt. Die HNH···O=C-Wasserstoffbrücke wird durch die Substitution A→2AP von der großen in die kleine Furche verlagert. Diese Änderung hat einen kooperativen Effekt vor allem in der Dynamik zur Folge: Die Lebensdauern der drei benachbarten Basenpaare in jeder Richtung sind reduziert. Diese Kooperativität wird auch durch thermodynamische Daten gestützt, da der 2AP-Einbau kein signifikantes „Vorschmelzen“, stattdessen aber eine Absenkung des Schmelzpunkts insgesamt zur Folge hat. Die helikale Struktur an sich ist nicht von der Substitution betroffen. An der Modifikationsstelle finden wir jedoch kleine, aber signifikante Änderungen der Werte für Propeller-Verdrehung und Öffnung. Geringe Änderungen werden über die gesamte Helix verteilt beobachtet, vornehmlich in Scherung und Verschiebung („shear“, „shift“, „slide“). Alle Strukturstörungen sind jedoch klein verglichen mit den Störungen, die von anderen Basen- oder Basenpaaranaloga verursacht werden.^[19–22] Man beachte, dass andere Sequenzen zu anderen Ergebnissen bezüglich Struktur und Dynamik führen können, da z. B. eine starke exzitonische Kopplung mit benachbarten A erwiesenermaßen einen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenz von 2AP hat.^[33,34] 2AP wird hauptsächlich als Fluoreszenzsonde für großflächige Bewegungen wie Stapelung/Entstapelung („stacking–unstacking“) von Nukleobasen verwendet.^[4–13] In diesem Fall können strukturelle Analogien zur nichtmodifizierten Probe ohne Einschränkung hergestellt werden, aber die Geschwindigkeiten von Stapelungs-Entstapelungs-Bewegungen werden signifikant durch die reduzierten Basenpaarlebensdauern um die Modifikationsstelle herum beeinflusst. Letzteres hat ebenfalls einen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Restriktionsenzyme und Methyltransferasen, deren Funktionsweise auf einem Herausdrehen von Basen beruht.^[35,36] Die Beobachtungen könnten die analoge Betrachtungsweise von dynamischen Daten komplizieren.

Experimentelles

Alle NMR-Messungen wurden bei 298 K an einem Bruker-Avance-600-Spektrometer bei einer Duplexkonzentration von 3 mM durchgeführt. Die Strukturrechnungen wurden mit Xplor-NIH Version 2.20 vorgenommen. Das Schmelzen des Duplex wurde anhand der Absorption bei 260 nm oder der Fluoreszenzquantenausbeute bei Anregung mit 310 nm bei einer Einzelstrang-Gesamtkonzentration von 23.7 μM verfolgt. Die Koordinaten und Eingabedateien sind in der Proteindatenbank unter den PDB-Nummern 2kuz (13merRef) und 2kv0 (13mer2AP) hinterlegt. Eine vollständige Beschreibung der Experimente ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 4. März 2010

Online veröffentlicht am 14. Juli 2010

Stichwörter: 2-Aminopurin · Basenpaarlebensdauer · DNA · Helicale Strukturen · NMR-Spektroskopie

[1] A. Ronen, *Mutat. Res.* **1979**, *75*, 1–47.

[2] L. C. Sowers, G. V. Fazakerley, R. Eritja, B. E. Kaplan, M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 5434–5438.

- [3] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228–1237.
- [4] B. W. Allan, N. O. Reich, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14757–14762.
- [5] J. T. Stivers, K. W. Pankiewicz, K. A. Watanabe, *Biochemistry* **1999**, *38*, 952–963.
- [6] T. Lenz, E. Bonnist, G. Pljevaljcic, R. Neely, D. Dryden, A. Scheidig, A. Jones, E. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6240–6248.
- [7] M. Menger, T. Tuschl, F. Eckstein, D. Porschke, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14710–14716.
- [8] S. R. Kirk, N. W. Luedtke, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2295–2301.
- [9] Y. Jia, A. Kumar, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30451–30458.
- [10] C. Liu, C. T. Martin, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2725–2731.
- [11] L. A. Marquez, L. J. Reha-Krantz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28903–28911.
- [12] J. M. Beechem, M. R. Otto, L. B. Bloom, R. Eritja, L. J. Reha-Krantz, M. F. Goodman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10144–10155.
- [13] D. Tleugabulova, L. Reha-Krantz, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6559–6569.
- [14] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375–381.
- [15] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781–788.
- [16] S. J. O. Hardman, K. C. Thompson, *Int. J. Quantum Chem.* **2007**, *107*, 2092–2099.
- [17] N. P. Johnson, W. A. Baase, P. H. Von Hippel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3426–3431.
- [18] N. P. Johnson, W. A. Baase, P. H. von Hippel, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32177–32183.
- [19] K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6841–6847.
- [20] K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 954–959.
- [21] K. C. Engman, P. Sandin, S. Osborne, T. Brown, M. Billeter, P. Lincoln, B. Norden, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5087–5095.
- [22] S. Smirnov, T. J. Matray, E. T. Kool, C. de Los Santos, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5561–5569.
- [23] D. A. Klewer, A. Hoskins, P. Zhang, V. J. Davisson, D. E. Bergstrom, A. C. LiWang, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4514–4522.
- [24] T. M. Nordlund, S. Andersson, L. Nilsson, R. Rigler, A. Graeslund, L. W. McLaughlin, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9095–9103.
- [25] P. O. Lycksell, A. Graeslund, F. Claesens, L. W. McLaughlin, U. Larsson, R. Rigler, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 9011–9025.
- [26] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*, University Science Books, South Orange, NJ, **2000**.
- [27] J.-L. Leroy, D. Broseta, M. Gueron, *J. Mol. Biol.* **1985**, *184*, 165–178.
- [28] M. Kochyan, G. Lancelot, J. L. Leroy, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7685–7702.
- [29] M. Leijon, A. Graslund, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5339–5343.
- [30] S. Nonin, J.-L. Leroy, M. Gueron, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10652–10659.
- [31] S. M. Law, R. Eritja, M. F. Goodman, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12329–12337.
- [32] X.-J. Lu, W. K. Olson, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5108–5121.
- [33] P. Rai, T. D. Cole, E. Thompson, D. P. Millar, S. Linn, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2323–2332.
- [34] T. Takaya, C. Su, K. de La Harpe, C. E. Crespo-Hernández, B. Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10285–10290.
- [35] E. G. Malygin, V. V. Zinoviev, N. A. Petrov, A. A. Evdokimov, L. Jen-Jacobson, V. G. Kosykh, S. Hattman, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1135–1144.
- [36] Y. V. Reddy, D. N. Rao, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 597–610.