

Konformationsbestimmung der 2'OH-Gruppe in RNA durch NMR-Spektroskopie und Dichtefunktionalrechnungen**

Senada Nozinovic, Puneet Gupta, Boris Fürtig, Christian Richter, Sandor Tüllmann, Elke Duchardt-Ferner, Max C. Holthausen* und Harald Schwalbe*

Im Vergleich zu DNA weist RNA eine erheblich höhere funktionelle, strukturelle und chemische Diversität auf, was als essenziell für die Evolution der RNA-Welt erachtet wird.^[1] Die zusätzliche 2'OH-Gruppe beeinflusst die Konformation der Zuckereinheit und verleiht RNA katalytische Aktivität, reduziert aber gleichzeitig ihre chemische Stabilität. Ferner kann die Hydroxygruppe nichtkanonische Strukturregionen durch Wasserstoffbrücken stabilisieren, und sie ist dafür verantwortlich, dass sich in kanonischen Doppelstrangstrukturen ein geordnetes Wassernetzwerk über die kleine Furche spannt.^[2] Es ist daher von großem Interesse, die Konformation der 2'OH-Gruppe experimentell zu bestimmen.

Molekulardynamik(MD)-Simulationen sagen bei Vorliegen einer C3'-endo-Konformation des Zuckers drei bevorzugte Orientierungen der 2'OH-Gruppe aus (Abbildung 1),^[3] wohingegen für eine C2'-endo-Konformation ausschließlich Orientierungen in der O3'-Domäne vorausgesagt werden. Experimentelle Untersuchungen des exocyclischen Torsionswinkels stellen eine große Herausforderung für die RNA-Strukturbestimmung dar, weil die Elektronendichte des Wasserstoffatoms der 2'OH-Gruppe nur in Kristallstrukturen mit einer Auflösung von < 1 Å bestimmt werden kann und deshalb in der Regel nicht detektierbar ist. Die Neutronenbeugungsanalyse stellt eine alternative Methode zur Bestim-

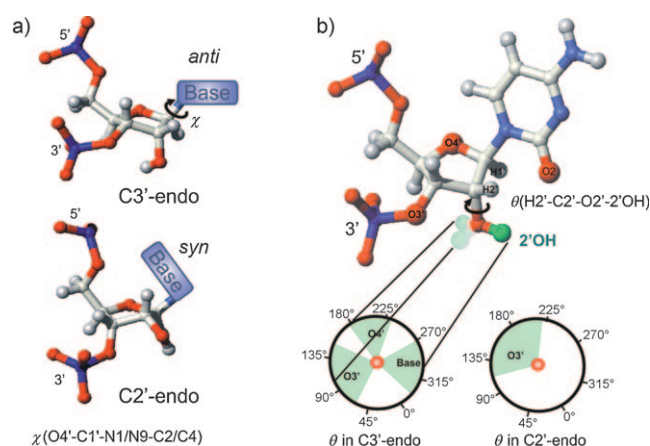


Abbildung 1. a) Darstellung der Konformation des Zuckers und der Nukleobase anhand von zwei Beispielstrukturen mit den C3'-endo/anti- und C2'-endo/syn-Konformationen. b) Orientierung der 2'OH-Gruppe: Die Struktur repräsentiert die drei bevorzugten Orientierungen, in denen die 2'OH-Gruppe (grün) hin zu O3', O4' und zur Nukleobase ausgerichtet ist. Die Konformationsräder zeigen die Verteilungsmaxima des Torsionswinkels $\theta(H2'-C2'-O2'-2'OH)$ gemäß MD-Simulationen.^[3]

mung von Wasserstoffpositionen dar, jedoch gibt es insbesondere für größere RNAs nur eine geringe Anzahl entsprechender Veröffentlichungen. In den letzten Jahren gestatteten Tieftemperatur-NMR-Untersuchungen Konformationsanalysen zur Stellung der 2'OH-Gruppe. Solche Untersuchungen setzen jedoch voraus, dass chemischer Austausch der Hydroxygruppe mit dem Lösungsmittel nur in geringem Umfang auftreten.^[4] Nun tauschen 2'OH-Gruppen in nichtkanonischen Bereichen der RNA allerdings schnell Wasserstoffatome mit dem Lösungsmittel aus, sodass entsprechende Signale nicht beobachtet werden können und Messungen der Strukturparameter zur Bestimmung des exocyclischen Torsionswinkels nicht möglich sind.

Auf Grundlage der Interpretation von $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten schlagen wir hier eine allgemein anwendbare Methode zur Bestimmung der Zuckerkonformationen und der Orientierung von Nukleobasen und 2'OH-Gruppen in großen RNAs vor. Im Unterschied zu $^3J(H,H)$ -Kopplungskonstanten, die typischerweise sehr gut einem einzelnen Torsionswinkel zugeordnet werden können, sind $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten von Bindungslängen abhängig,^[5] die ihrerseits von der lokalen Struktur und somit von mehreren Torsionswinkeln beeinflusst werden.^[5b,6] Deshalb ließen sich 1J -Kopplungen bislang nur schwer in konformative Informationen übersetzen.

[*] Dipl.-Chem. S. Nozinovic, Dr. B. Fürtig, Dr. C. Richter, Prof. Dr. H. Schwalbe
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Zentrum für biomolekulare magnetische Resonanzspektroskopie (BMRZ)
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+49) 69-7982-9515
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de
Dr. E. Duchardt-Ferner
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Institut für Biochemie
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)
M. Sc. P. Gupta, Dipl.-Chem. S. Tüllmann, Prof. Dr. M. C. Holthausen
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Institut für anorganische und analytische Chemie
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29417
E-Mail: max.holthausen@chemie.uni-frankfurt.de

[**] Wir bedanken uns bei Beatrix Suess und Julia E. Weigand für die Überlassung der 27mer-RNA-Schalter-Probe und bei Jens Wöhnert für hilfreiche Diskussionen. Die Arbeiten wurden unterstützt durch das Bundesland Hessen (BMRZ), durch die DFG (SFB 579: „RNA-Ligand-Wechselwirkungen“), die Studienstiftung des Deutschen Volkes (Stipendien an S.N. und B.F.) und durch die CitySolar AG (P.G.). H.S. ist Mitglied des DFG-geförderten Exzellenzclusters „Makromolekulare Komplexe“.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201007844> zu finden.

Die vorliegende Untersuchung wurde durch frühere Arbeiten inspiriert, in denen der Einfluss hyperkonjugativer Effekte ($n \rightarrow \sigma^*/\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Donierung) auf die Größe der $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstante in Ethanol und Methylamin nachgewiesen wurde.^[7] Diese Befunde legten die Vermutung nahe, dass auch die freien Elektronenpaare der 2'OH-Gruppe einen ähnlichen Einfluss auf die Größe der $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten der benachbarten C1'- und C2'-Ringpositionen ausüben. Die Ermittlung einer solchen Abhängigkeit sollte also die Bestimmung der Konformation der 2'OH-Gruppe ermöglichen.

Um die unterschiedlichen Einflüsse auf die Konformationsabhängigkeit der $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstante zu quantifizieren, wurden experimentelle NMR-Messungen mit Vorhersagen aus DFT-Rechnungen verglichen. Im ersten Schritt wurden $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten für nukleotid-ähnliche Modellstrukturen berechnet, um die Abhängigkeit der $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten von der Zuckerkonformation und Nukleobasenorientierung zu quantifizieren. Im zweiten Schritt wurde dann der Einfluss der 2'OH-Gruppe durch systematische Variation ihrer Orientierung untersucht, während gleichzeitig die Konformationen des Zuckers und der Base fixiert wurden. Die Ergebnisse bestätigen, dass sowohl die Konformationen des Zuckers und der Nukleobase als auch die Orientierung der 2'OH-Gruppe einen signifikanten Einfluss auf die $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen ausüben. Bei Kenntnis der Zucker- und Nukleobasenkonformationen kann die Orientierung der 2'OH-Gruppe allein durch die Interpretation der $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen bestimmt werden. Wie wir im Folgenden zeigen werden, ist dies auch für Reste möglich, deren 2'OH-Gruppe aufgrund des Austauschs mit H_2O oder D_2O nicht detektierbar ist. $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen können generell mit hoher Empfindlichkeit sehr genau gemessen werden, sodass die vorgeschlagene Methode auch für größere RNAs anwendbar ist.

Zur Durchführung der DFT-Rechnungen wurde das B3LYP/TZVP(+PCM:water)-Niveau gewählt, das sich in Benchmark-Rechnungen zu NMR-Kopplungskonstanten an relevanten Modellsystemen als besonders geeignet erwies (siehe Hintergrundinformationen). Aus der Ribosom-Kristallstruktur (pdb-code: 2ffk)^[8] und der zuvor bestimmten Lösungsstruktur der 14mer-RNA (pdb-code: 2koc)^[4e] wurden für jeden Nukleotidtyp vier Modellstrukturen konstruiert, die die in RNA vorkommenden charakteristischen Hauptkonformationen von Zucker und Base repräsentieren (C3'-endo/*anti* oder *syn*, C2'-endo/*anti* oder *syn*) (Tabelle S6 in den Hintergrundinformationen). Die Orientierungen der 2'OH-Gruppe wurden in der O3'-Domänenkonformation mit den Torsionswinkeln 160° für C3'-endo und 100° für C2'-endo fixiert. Details zur Konstruktion der Modellstrukturen und die für die partiellen Geometrieoptimierungen eingeführten Restriktionen sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Abbildung 2a zeigt die vorhergesagten $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen für jeden Nukleotid-Typ mit der Base in *anti*- und *syn*-Orientierung jeweils für beide Zuckerkonformationen (C3'-endo bzw. C2'-endo). Die berechneten Daten belegen einen signifikanten Einfluss der Zuckerkonformation auf beide Kopplungen, wohingegen sich die Basenorientierung (*anti*

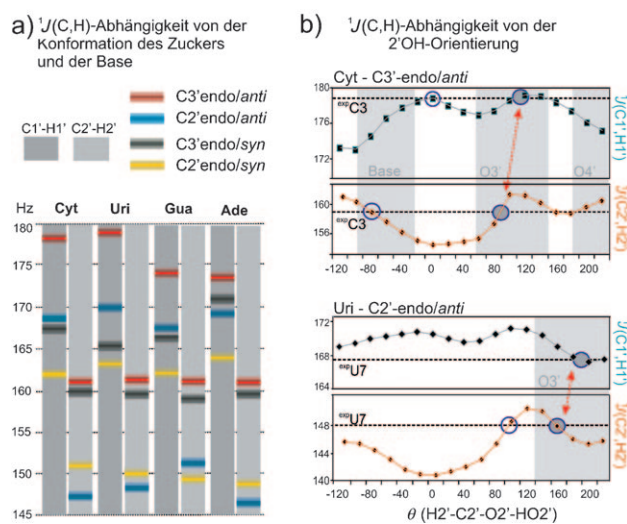


Abbildung 2. a) Mit DFT gerechnete $^1J(\text{C}1',\text{H}1')$ - und $^1J(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplungen für jedes Nukleotid (Cytosin, Uracil, Guanin, Adenosin) in den vier Hauptkonformationen mit dem Zucker in der C3'-endo- oder C2'-endo- und der Nukleobase in *anti*- oder *syn*-Orientierung. b) Mit DFT gerechnete $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten für die Reste C3 und U7 als Funktion des Torsionswinkels $\theta(\text{H}2'-\text{C}2'-\text{O}2'-\text{H}2')$. Experimentelle Werte für C3 und U7 der 14mer-RNA sind mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die Übereinstimmung mit den theoretischen Werten ist mit einem farbigen Kreis hervorgehoben. Die 2'OH-Orientierungen, die in der MD-Simulation am stärksten populiert sind, wurden grau unterlegt.

oder *syn*) hauptsächlich auf die $^1J(\text{C}1',\text{H}1')$ -Kopplung auswirkt. Die berechneten Kopplungskonstanten zeigen Variationen bis zu 14 Hz, so dass durch Vergleich mit experimentell bestimmten $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten eine verlässliche Unterscheidung der vier Hauptkonformationen möglich ist. Wir schlagen daher das in Abbildung 2a dargestellte Diagramm als einfaches Hilfsmittel zur Bestimmung der RNA-Konformation vor. Zur unabhängigen Validierung haben wir dieses Diagramm für die Konformationsanalyse eines 27mer-RNA-Schalters eingesetzt, über dessen Struktur und Dynamik kürzlich in einer NMR-spektroskopischen Untersuchung berichtet wurde.^[9a,b] Die experimentellen Ergebnisse und die Vergleichsprüfung mit den vorhergesagten Werten sind in Abbildung S9 detailliert dargestellt. Insgesamt lassen sich auf diesem Weg die Konformationen von 21 Resten eindeutig zuordnen. Die verbleibenden fünf Reste sind experimentell durch gemittelte Kopplungen charakterisiert, die sich nicht auf einzelne Konformationen zurückführen lassen. Tatsächlich befinden sich diese Reste innerhalb der Ausbuchtung und am 3'-Ende dieser RNA – zwei Regionen, für die in der vorhergehenden NMR-Untersuchung eine erhöhte Dynamik und Flexibilität ermittelt worden war.^[9b]

Im zweiten Satz von DFT-Rechnungen wurde der Torsionswinkel $\theta(\text{H}2'-\text{C}2'-\text{O}2'-\text{H}2')$, der die Orientierung der exocyclischen 2'OH-Gruppe beschreibt, in 20° -Schritten von 0° bis 340° variiert. Abbildung 2b zeigt die Ergebnisse für die Nukleotide Cytosin und Uracil, die aus den Resten C3 und U7 der 14mer-RNA-Lösungsstruktur mit einer C3'- bzw. C2'-endo-Konformation des Zuckers bei *anti*-Stellung der Base konstruiert wurden. Es lässt sich ein beträchtlicher Einfluss

der Orientierung der 2'OH-Gruppe auf $^1J(\text{C,H})$ beobachten: $^1J(\text{C1}',\text{H1}')$ variiert um 6 Hz (Cyt) bzw. 3 Hz (Uri); $^1J(\text{C2}',\text{H2}')$ erweist sich mit Unterschieden von 7 Hz (Cyt) bzw. 9 Hz (Uri) als noch empfindlicher. Für beide 14mer-RNA-Reste (C3, U7) lässt sich eine Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Kopplungen nur für jeweils eine bestimmte 2'OH-Orientierung finden (Abbildung 2b). In beiden Fällen sind dies die gleichen Orientierungen, die auch schon in der MD-Simulation als bevorzugt identifiziert worden waren.^[4e]

Wir haben in einer früheren Arbeit mit umfassenden NMR-Messungen eine hoch aufgelöste Lösungsstruktur (0.3 Å) der 14mer-RNA vorgestellt.^[4e] Die Analyse der Homokernkopplungen und der gekreuzkorrelierten Relaxationsraten hatte ergeben, dass die Zuckerreste innerhalb der Doppelhelix und des Schlaufenbasenpaars U6-G9 eine C3'-endo-Konformation annehmen. Die beiden Schlaufenreste U7 und C8 liegen in C2'-endo-Konformation vor und durchlaufen auf der NMR-Zeitskala keine konformativen Austauschprozesse. Die G9-Nukleobase nimmt die ungewöhnliche *syn*-Konformation ein.^[10] In dieser früheren Arbeit wurden die NOE-Kontakte der 2'OH-Gruppen analysiert, um eine bevorzugte Orientierung zu ermitteln. Das endgültige Strukturbündel, das mit der NOE-Analyse konsistent ist, zeigt, dass sich die 2'OH-Gruppen der Doppelhelixreste hauptsächlich in Richtung der O3'-Domäne ausrichten, während sich die 2'OH-Gruppe von U6 in Richtung der Basen-Domäne orientiert. Für die endständigen Reste G1 und C14 wie auch für die Schlaufenreste U7, C8 und G9 war es aufgrund des schnellen Austauschs mit Wasser nicht möglich, NMR-Signale der OH-Gruppen zu detektieren und die entsprechende NOE-Analyse durchzuführen. Daher sind die resultierenden Orientierungen der genannten Reste innerhalb des Strukturbündels nur durch das Kraftfeld des ARIA-Programms bestimmt und deshalb nicht experimentell definiert.^[11]

Die experimentell bestimmten $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen der 14mer-RNA in H₂O sind in Abbildung 3c und d dargestellt. (Messungen in D₂O stimmen mit denen in H₂O überein, Abbildung S1). Für die Reste mit C3'-endo-Konformation sind die $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen tendenziell größer als für solche mit C2'-endo-Konformation. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse für G9 dar, was sich mit der *syn*-Konformation der Nukleobase erklären lässt.

Auf Grundlage der hoch aufgelösten Lösungsstruktur haben wir DFT-Rechnungen für alle Kopplungen in der 14mer-RNA durchgeführt. Hierbei wurde die 2'OH-Gruppe entsprechend der experimentell bestimmten Orientierung fixiert (Abbildung 3, siehe auch die Hintergrundinformationen). Die Abbildungen 3c und d zeigen, dass die theoretisch berechneten Kopplungskonstanten die experimentellen Daten sehr gut reproduzieren, sowohl hinsichtlich der absoluten Beträge als auch hinsichtlich der Konformationsabhängigkeit. Eine Ausnahme stellt der Rest G10 dar (mit einem Stern in Abbildung 3d gekennzeichnet). Zur Erklärung der Diskrepanz weisen wir darauf hin, dass auch andere NMR-Daten auf einen Austauschprozess an dieser Stelle hindeuten.^[12] In dem gemessenen Bereich der Kopplungen (140–180 Hz) weichen die theoretisch berechneten Werte im

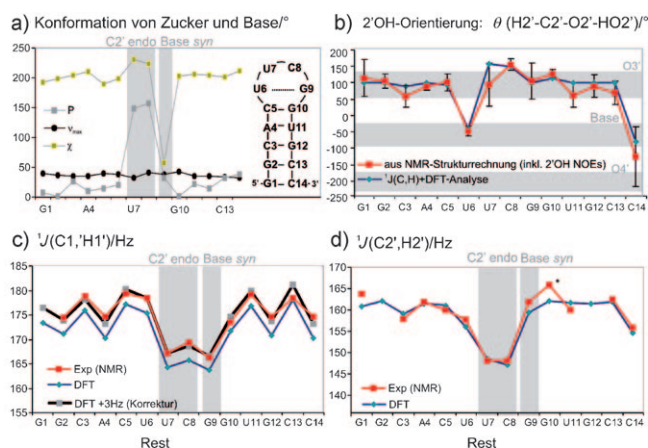


Abbildung 3. a,b) Sekundärstruktur und Konformation der 14mer-RNA: Nukleobasen-Orientierung beschrieben durch den Torsionswinkel χ , Zuckermodus beschrieben durch P und ν_{max} ^[14] und 2'OH-Orientierung beschrieben durch den Torsionswinkel θ wurden aus den 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie in der Strukturrechnung ermittelt. Schlaufenreste mit der *syn*-Nukleobasen-Orientierung (G9) und C2'-endo-Zuckerkonformation (U7 und C8) sind in (a), (c) und (d) grau unterlegt. Die Orientierungen in Richtung von O3', O4' und der Nukleobase wurden aus MD-Simulationen übernommen und sind in (b–d) grau unterlegt (Abbildung 1). c,d) Experimentelle (NMR) und berechnete Kopplungskonstanten $^1J(\text{H1}',\text{C1}')$ und $^1J(\text{H2}',\text{C2}')$. Die DFT-Daten für die $^1J(\text{C1}',\text{H1}')$ -Kopplungen sind mit und ohne lineare Korrektur (+3 Hz) gezeigt. Die experimentelle $^1J(\text{C2}',\text{H2}')$ -Kopplung von G10 ist mit einem Stern gekennzeichnet (siehe Text).

Mittel um 4 Hz und 1.7 Hz von den experimentellen ab. Der mittlere Fehler wird auf 1 Hz für $^1J(\text{C1}',\text{H1}')$ reduziert, wenn eine lineare Korrektur um +3 Hz vorgenommen wird, und es resultiert ein maximaler Fehler von 2.9 Hz für alle berechneten Kopplungen (G10 ausgenommen).^[13] Die kombinierte NMR- und DFT-Analyse liefert genaue Informationen über die Orientierung der 2'OH-Gruppen der 14mer-RNA und gestattet sogar die Konformationsanalyse für 2'OH-Gruppen, die aufgrund des Lösungsmittelaustauschs experimentell nicht direkt detektierbar sind. Die in Abbildung 2b dokumentierten Ergebnisse demonstrieren, dass die $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen, wie sie anhand der systematischen Veränderung des Torsionswinkels θ berechnet wurden, eine eindeutige konformative Charakterisierung der 2'OH-Gruppe ermöglichen.

Zusammenfassend haben wir die Konformationsabhängigkeit der $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen, also eines einfach zu messenden NMR-Parameters, untersucht und demonstriert, dass eine signifikante Abhängigkeit der $^1J(\text{C1}',\text{H1}')$ - und $^1J(\text{C2}',\text{H2}')$ -Kopplungen von der Konformation des Zuckers, der Nukleobase und der 2'OH-Gruppe besteht. Experimentelle und theoretische Ergebnisse sind in sehr guter Übereinstimmung, was die Genauigkeit sowohl der 14mer-RNA-Lösungsstruktur als auch der gewählten DFT-Methode bestätigt. $^1J(\text{C1}',\text{H1}')$ - und $^1J(\text{C2}',\text{H2}')$ -Kopplungen geben verlässliche Hinweise auf die Zucker- und Nukleobasen-Konformation und können deshalb als Hilfsmittel in der Konformationsanalyse eingesetzt werden. Für die Mehrheit der Nukleotide eines RNA-Moleküls häufen sich die Konformationen in einem engen Bereich, der entweder der C3'-endo

oder C2'-endo-Konformation mit der Nukleobase in *anti*- oder *syn*-Stellung entspricht.^[15] Die qualitative Interpretation der ¹J(C,H)-Kopplungen stellt daher eine Methode dar, die zwischen den vier Hauptkonformationen unterscheiden kann, wie es für die Strukturermittlung in den meisten Fällen ausreichend ist. Unsere Methode ist insbesondere für die Strukturbestimmung von großen RNAs von Bedeutung, weil ¹J(C,H)-Kopplungen auch ohne Isotopenmarkierungen unproblematisch messbar sind. Die Anwendbarkeit unserer Methode wurde durch eine eindeutige Konformationsanalyse der starren Strukturelemente und die Identifizierung flexibler Bereiche für einen 27mer-RNA-Schalter erfolgreich demonstriert. Bislang war die konformative Charakterisierung der 2'OH-Gruppe, die die spezifischen Eigenschaften der RNA im Vergleich zur DNA ausmacht, nur in wenigen Fällen und nur eingeschränkt möglich. Dank der deutlichen Abhängigkeit der ¹J(C,H)-Kopplungen von der Orientierung der 2'OH-Gruppe gelingt eine indirekte Bestimmung dieses schwer zugänglichen Strukturparameters sogar bei schnellem Lösungsmittelaustausch.

Eingegangen am 13. Dezember 2010

Online veröffentlicht am 20. April 2011

Stichwörter: Dichtefunktionalrechnungen · Konformationsanalyse · NMR-Spektroskopie · RNA

- [1] W. Gilbert, *Nature* **1986**, 319, 618.
- [2] M. Egli, S. Portmann, N. Usman, *Biochemistry* **1996**, 35, 8489.
- [3] P. Auffinger, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1997**, 274, 54.
- [4] a) M. Hennig, J. Fohrer, T. Carlomagno, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2028; b) J. Ying, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8372; c) J. Fohrer, M. Hennig, T. Carlomagno, *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 280; d) J. Fohrer, U. Reinscheid, M. Hennig, T. Carlomagno, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7033; e) S. Nozinovic, B. Fürtig, H. R. A. Jonker, C. Richter, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 683.
- [5] a) C. Thibaudeau, R. Stenutz, B. Hertz, T. Klepach, S. Zhao, Q. Wu, I. Carmichael, A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15668; b) F. Cloran, I. Carmichael, A. S. Serianni, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 3783.
- [6] a) D. B. Davies, P. Rajani, M. MacCoss, S. S. Danyluk, *Magn. Reson. Chem.* **1985**, 23, 72; b) M. L. Munzarová, V. Sklenar, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3649; c) J. T. Fischer, U. M. Reinscheid, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2074; d) Z. Vokáčová, F. M. Bickelhaupt, J. Šponer, V. r. Sychrovský, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 8379; e) P. C. Kline, A. S. Serianni, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1772; f) C. A. Podlasek, W. A. Stripe, I. Carmichael, M. Shang, B. Basu, A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1413; g) A. S. Serianni, J. Wu, I. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8645; h) J. M. Duker, A. S. Serianni, *Carbohydr. Res.* **1993**, 249, 281; i) J. H. Ippel, S. S. Wijmenga, R. de Jong, H. A. Heus, C. W. Hilbers, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Magn. Reson. Chem.* **1996**, 34, S156.
- [7] a) S. Watanabe, I. Ando, Y. Sakamoto, *J. Mol. Struct.* **1982**, 82, 237; b) R. H. Contreras, J. E. Peralta, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2000**, 37, 321; c) N. C. Maiti, Y. Zhu, I. Carmichael, A. S. Serianni, V. E. Anderson, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2878.
- [8] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 905.
- [9] a) J. E. Weigand, M. Sanchez, E.-B. Gunnesch, S. Zeiher, R. Schroeder, B. Suess, *RNA* **2008**, 14, 89; b) E. Duchardt-Ferner, J. Weigand, O. Ohlenschläger, S. Schmidtke, B. Suess, J. Wöhnert, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 6352; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6216.
- [10] a) E. Duchardt, C. Richter, O. Ohlenschläger, M. Görlach, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1962; b) J. Rinnenthal, C. Richter, J. Ferner, E. Duchardt, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2007**, 39, 17.
- [11] a) M. Nilges, M. J. Macias, S. I. O'Donoghue, H. Oschkinat, *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 408; b) J. P. Linge, S. I. O'Donoghue, M. Nilges, *Methods Enzymol.* **2001**, 339, 71.
- [12] A. Cherepanov, C. Glaubitz, H. Schwalbe, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 4855; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 4747.
- [13] A. Bagno, F. Rastrelli, G. Saielli, *Magn. Reson. Chem.* **2008**, 46, 518.
- [14] C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 8205.
- [15] B. Schneider, Z. Moravek, H. M. Berman, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 1666.