

Direkte Identifizierung von nichtkanonischen RNA-Strukturelementen durch den Nachweis von $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{P}$ -, $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{P}$ - und $\text{NH}_2\cdots\text{O}=\text{P}$ -Wasserstoffbrücken mit NMR-Spektroskopie in Lösung**

Elke Duchardt-Ferner, Jan Ferner und Jens Wöhnert*

Professor Heinz Rüterjans zum 75. Geburtstag gewidmet

Wasserstoffbrücken sind von fundamentaler Bedeutung für die Bildung funktioneller Nukleinsäure-Strukturen. In der DNA-Doppelhelix findet man Wasserstoffbrücken, die dem klassischen Watson-Crick-Basenpaarungsschema entsprechen. Dagegen sind Wasserstoffbrücken in RNA weitaus vielfältiger in Bezug auf ihre Donor- und Akzeptorgruppen. Vor allem aber sind nichtkanonische, vom Watson-Crick-Schema abweichende Wasserstoffbrücken die Basis für die komplexen, globulären proteinähnlichen Faltungen, die in funktionellen RNA-Molekülen wie tRNAs, selbstschneidenden Introns, Ribozymen, RNA-Schaltern und der ribosomalen RNA beobachtet werden.

In diesen Wasserstoffbrücken spielen auch die Hoogsteen- und Zuckerseiten der Nukleobasen sowie die 2'-Hydroxygruppen der Ribose und die Sauerstoffatome des Phosphatrückgrats eine Rolle als Donor- und Akzeptorgruppen. Dabei sind Wasserstoffbrücken mit den negativ geladenen Sauerstoffatomen des Phosphatrückgrats als Akzeptorgruppen energetisch besonders vorteilhaft.^[1] Sie sind sehr wichtig als Alternative zur Kationenbindung bei der Neutralisierung der negativen Ladung der Rückgrat-Phosphatgruppen und reduzieren dadurch die elektrostatische Abstößung zwischen eng benachbarten Rückgratsegmenten in komplexen RNA-Strukturen. Folglich sind viele der häufig wiederkehrenden dreidimensionalen Faltungsmotive von

funktionellen RNAs durch motivspezifische Wasserstoffbrücken zu den Rückgrat-Phosphatgruppen stabilisiert. Klassische Beispiele sind das „U-Turn“-Motiv, das zunächst im Anticodon- und T-„Loop“ der tRNAs identifiziert wurde, in dem eine Wasserstoffbrücke zwischen dem U-Iminoproton und der Phosphatgruppe des (N+3)-Nucleotids eine scharfe Wendung im RNA-Rückgrat stabilisiert, das extrem stabile GNRA-„Tetraloop“-Motiv mit einer gegabelten Wasserstoffbrücke zwischen der Amino- und der Iminogruppe des Guanins und dem Phosphatrückgrat oder das Sarcin/Ricin-„Internal-Loop“-Motiv.^[2]

Die Analyse von RNA-Strukturen wurde durch die Erkenntnis revolutioniert, dass sich Wasserstoffbrücken in RNA und DNA direkt mithilfe von NMR-Spektroskopie nachweisen lassen, da zwischen den Kernen der Donor- und Akzeptorgruppen eine skalare Kopplung besteht, die auf dem teilweise kovalenten Charakter der Wasserstoffbrücke beruht.^[3] NMR-Experimente, die spezifische Donor- und Akzeptorgruppen miteinander korrelieren, wurden ursprünglich zur Identifizierung von $\text{NH}\cdots\text{N}$ -Wasserstoffbrücken in Watson-Crick- und nichtkanonischen Basenpaaren entwickelt und später für die Charakterisierung von $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ - und $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Wasserstoffbrücken in RNA erweitert.^[3,4] In vielen Fällen reicht allein die Information aus solchen Experimenten aus, um die Sekundärstruktur abzuleiten und auch Einblicke in die Tertiärstruktur der RNAs zu erhalten.^[5]

Für Proteine, die phosphatgruppenhaltige Cofaktoren wie GTP und FMN binden, wurde gezeigt, dass auch Wasserstoffbrücken zwischen den Rückgrat-Amid- oder Hydroxygruppen der Aminosäure-Seitenketten und der Phosphatgruppe mithilfe von NMR-Spektroskopie beobachtet werden können.^[6] Ähnliche Beobachtungen wurden auch für kleine organische Phosphat-Rezeptormoleküle gemacht.^[7] Überraschenderweise wurde bislang jedoch noch nicht über NMR-Experimente zur direkten Identifizierung von Wasserstoffbrücken mit einer Phosphatgruppe als Wasserstoffbrücken-Akzeptor in RNA-Strukturen berichtet, obwohl diese so wichtig für die Stabilisierung von nichtkanonischen RNA-Strukturelementen sind.

Hier zeigen wir, dass $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{P}$ -, $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{P}$ - und $\text{NH}_2\cdots\text{O}=\text{P}$ -Wasserstoffbrücken, die typisch für verschiedene nichtkanonische RNA-Strukturelemente sind, leicht durch NMR-Spektroskopie in Lösung nachgewiesen werden können, da sie zu einer signifikanten skalaren $^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Kopplung zwischen den Donorgruppen-Protonen und den ^{31}P -Kernen des Phosphatrückgrats führen. In unseren Experimenten

[*] Dr. E. Duchardt-Ferner, Prof. Dr. J. Wöhnert
Institut für Molekulare Biowissenschaft
Biomolekulares Magnetresonanz Zentrum (BMRZ)
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: woehnert@bio.uni-frankfurt.de

Dr. J. Ferner
Institut für organische Chemie und chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz Zentrum (BMRZ)
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Aventis Foundation (Stiftungsforschung „Chemische Biologie“ für J.W.), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (WO 901/1-2 an J.W.), das Biomolekulare Magnetresonanz Zentrum (BMRZ) und das Exzellenzzentrum „Makromolekulare Komplexe“ der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt unterstützt. Wir danken J. Weigand, B. Suess, S. Häfner, M. Görlach und H. Schwalbe für die Bereitstellung von RNA-Proben sowie H. Schwalbe und J. P. Wurm für wertvolle Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101743> zu finden.

nutzten wir zwei Modellsysteme – einen synthetischen Neomycin-gesteuerten 27nt-RNA-Schalter (nt = Nucleotid) im Komplex mit Ribostamycin und eine 14nt-RNA mit einem stabilen UUCG-„Tetraloop“-Motiv. Für beide Systeme sind bereits hochaufgelöste 3D-Strukturen veröffentlicht worden.^[8]

Die auf der Basis von NOEs erhaltene Struktur des RNA-Schalters enthüllt zwei ineinander verwobene Strukturelemente, die Wasserstoffbrücken mit den Rückgrat-Phosphatgruppen als Akzeptoren enthalten: ein Motiv mit ausgestülpter Base („bulged-out base“; Abbildung 1, A16-A17-

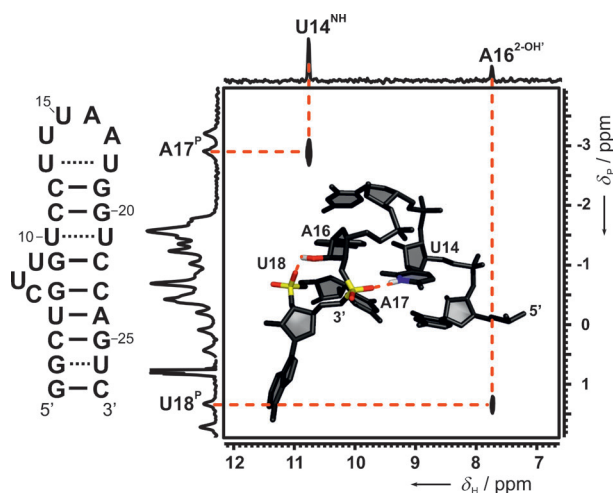


Abbildung 1. Links: Sekundärstruktur und Nummerierung des 27nt-Neomycin-RNA-Schalters gebunden an Ribostamycin. Rechts: langreichweitiges WATERGATE- ^1H , ^{31}P -HSQC-Spektrum des RNA-Ribostamycin-Komplexes, aufgenommen bei 5 °C unter Verwendung einer ^2H -markierten RNA. Auf der linken Seite ist das 1D- ^{31}P -Spektrum der RNA mit den relevanten ^{31}P -Zuordnungen dargestellt.^[10] Die beiden beobachteten Korrelationen belegen die Existenz von Wasserstoffbrücken zwischen A16-2'-OH und der U18-Phosphatgruppe sowie zwischen U14-NH und der A17-Phosphatgruppe. Der Ausschnitt der NOE-basierten 3D-Struktur, einschließlich des „Bulged-out-base“-Motivs (A16-A17-U18) und des „U-Turn“-Motivs (U14 bis A17) sind als Einschub gezeigt. Funktionelle Gruppen, für die Wasserstoffbrücken mit den Rückgrat-Phosphatgruppen vorhergesagt werden, sind farblich hervorgehoben (H weiß, N blau, O rot, P gelb). Die Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte rote Linien angedeutet.

U18), das durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-OH-Gruppe von Nucleotid N und der 5'-Phosphatgruppe von Nucleotid (N+2) stabilisiert wird, sowie ein „U-Turn“-Motiv (Abbildung 1, U14-U15-A16-A17) mit einer Wasserstoffbrücke zwischen der U-Iminogruppe und der Phosphatgruppe des Nukleotids (N+3).^[2a,9]

In beiden Motiven deuten bereits die kurzen Atomabstände und die Bindungswinkel in der NOE-basierten Struktur auf das Vorliegen der entsprechenden Wasserstoffbrücken hin. Darüber hinaus sind Signale sowohl für das A16-2'-OH- als auch für das U14-NH-Proton in Standard-NMR-Spektren auch bei Raumtemperatur zu beobachten (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Ihr Schutz vor schnellem chemischen Austausch mit dem Lösungsmittel sowie die Tieffeldverschiebung ihrer Signale (A16-2'-OH δ =

7.7 ppm, U14-NH δ = 10.8 ppm) stimmen mit ihrer Einbindung in stabile Wasserstoffbrücken überein.

Wir konnten das Vorhandensein von Wasserstoffbrücken zwischen diesen beiden Protonen und den Gruppen des Phosphatrückgrats durch die Detektion von durch Wasserstoffbrücken vermittelten skalaren Kopplungen zwischen den Protonen den Wasserstoffbrückendonoren-Gruppen und den ^{31}P -Kernen der Akzeptor-Gruppen eindeutig nachweisen. Dafür haben wir ein 2D-WATERGATE- ^1H , ^{31}P -HSQC-Experiment mit einer verlängerten INEPT-Zeit (35–70 ms) für den Magnetisierungstransfer zwischen ^1H und ^{31}P mit einer deuterierten, aber ansonsten unmarkierten Probe (siehe Experimentelles) bei 5 oder 20 °C aufgenommen. Das resultierende Spektrum zeigt deutlich zwei Signale, welche die Resonanz des A16-2'-OH-Protons mit der U18-Phosphatgruppe und die U14-NH-Protonenresonanz mit der A17-Phosphatgruppe miteinander korrelieren (Abbildung 1 und Abbildung S4; ^{31}P -Zuordnung siehe Abbildung S2). Neben den skalaren Kopplungen über die Wasserstoffbrücken kann auch kreuzkorrelierte Relaxation zwischen der P,H-Dipol-Wechselwirkung und der ^{31}P -chemischen Verschiebungsanisotropie zum beobachteten Magnetisierungstransfer in diesem Experiment beitragen. Dieser zusätzliche Mechanismus des Magnetisierungstrfers erfordert ebenfalls eine enge räumliche Nähe zwischen dem Proton und der Phosphatgruppe, die für Wasserstoffbrücken typisch ist, und trägt damit sogar positiv zum Signal-Rausch-Verhältnis in diesem Experiment bei.

Alternativ führten wir ein nicht-refokussiertes Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)-Echo- ^1H , ^{31}P -HSQC-Experiment aus, bei dem ^1H , ^{31}P -Antiphase-Magnetisierung während t_2 aufgezeichnet wird (Abbildung S3). Dieses Experiment ist konzeptionell sehr ähnlich zu einem Experiment, das Hennig und Mitarbeiter zur Detektion von 2'-OH...N- Wasserstoffbrücken vorgeschlagen haben.^[4g] Es zeigte die gleichen Korrelationen wie das Standard-HSQC-Experiment (Abbildung S3).

Zur Quantifizierung der skalaren $^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Kopplungen verglichen wir Signalintensitäten in 1D- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Spin-Echo-Experimenten (Abbildung 2a) mit und ohne Protonenentkopplung und einer variablen Spin-Echo-Zeit. Für diese Experimente war eine deuterierte Probe vorteilhaft, da unerwünschte Magnetisierungstrfers zwischen den ^{31}P -Kernen und den Ribose-Protonen über kovalente Bindungen sowie ^{31}P -Relaxation durch dipolare Wechselwirkungen mit Protonen minimiert werden konnten und somit längere Dephasierungsperioden möglich wurden. Besonderer Wert wurde auf die Unterdrückung der skalaren Kopplungen zu den verbleibenden RNA-Ribose-Protonen (Abbildung 2, Abbildung S5) und der Beiträge von kreuzkorrelierter Relaxation zwischen den P,H-dipolaren Wechselwirkungen und der ^{31}P -chemischen Verschiebungsanisotropie gelegt. Die skalaren $^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Kopplungen über die A16-2'-OH...U18-Phosphat- und die U14-NH...A17-Phosphat-Wasserstoffbrücken betragen (1.8 ± 0.06) bzw. (2.2 ± 0.07) Hz. Somit ist ihre Größe ähnlich den $^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Kopplungskonstanten zwischen den funktionellen Gruppen von Proteinen und den Phosphatgruppen von fest gebundenen Cofaktoren.^[6] Die gemessenen skalaren Kopplungen in diesem Experiment sind kleiner als die tatsächlichen

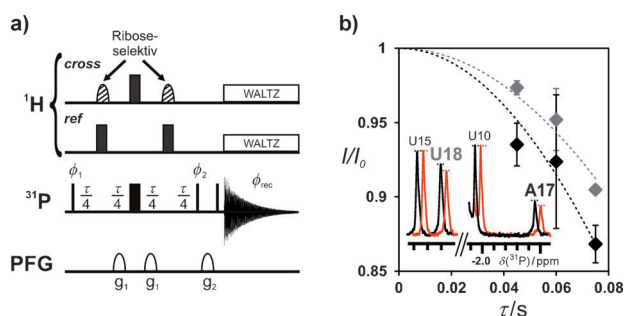


Abbildung 2. Quantifizierung von skalaren ${}^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Kopplungen für $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{P}$ - und $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{P}$ -Wasserstoffbrücken im Neomycin-RNA-Schalter. a) Pulssequenz für Kreuz- und Referenzspektren der 1D- ${}^{31}\text{P}\{{}^1\text{H}\}$ -Spin-Echo-Experimente. Schmale und breite schwarze Balken kennzeichnen harte 90° - bzw. 180° -Pulse, offene Halbellipsen stellen Feldgradientenpulse dar. Die schraffierten Halbellipsen im Kreuzexperiment sind auf die Riboseprotonen ausgerichtete selektive ${}^1\text{H}$ - 180° -Pulse. Die Phasenzyklen waren $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, x, -x, -x$; $\phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$. Sinusförmige Gradienten von 1 ms Dauer mit einer Amplitude von 11 G cm^{-1} (g_1) und 22 G cm^{-1} (g_2) wurden verwendet. b) Signalintensitätsdaten für die A17- (schwarz) und U18-Phosphorresonanz (grau) mit variabler Spin-Echo-Zeit. Die im Text angegebenen ${}^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Werte wurden entsprechend der Gleichung $I/I_0 = \cos(\pi J \tau)$ ermittelt.

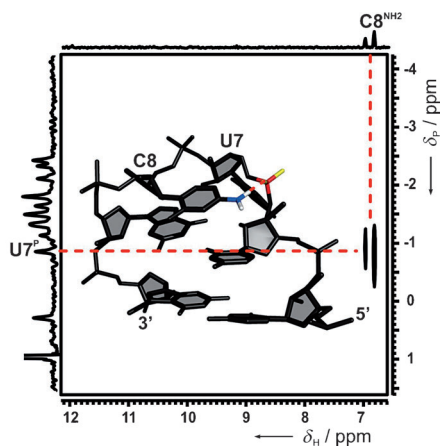


Abbildung 3. Links: Sekundärstruktur und Nukleotid-Nummerierung der 14-nt-RNA, die das stabile UUCG-Motiv enthält. Rechts: Langreichweitiges WATERGATE- ${}^1\text{H}$, ${}^{31}\text{P}$ -HSQC-Spektrum, aufgenommen bei 5°C an der ${}^{15}\text{N}$ -markierten RNA. Auf der linken Seite ist das 1D- ${}^{31}\text{P}$ -Spektrum der RNA dargestellt. Die ${}^{31}\text{P}$ -Zuordnungen wurden bereits berichtet.^[12] Die beobachtete Korrelation zeigt direkt das Vorliegen einer Wasserstoffbrücke zwischen der C8-Aminogruppe und der U7-Phosphatgruppe an (in der 3D-Struktur des UUCG-Motivs hervorgehoben).

chen Kopplungen, da der chemische Austausch zwischen den Protonen der Wasserstoffbrücken und den Wasserprotonen zur Selbstentkopplung führt. Jedoch ergibt ein ${}^1\text{H}$ -Spin-Echo-Experiment, das nicht von dieser Selbstentkopplung betroffen ist, nur einen geringfügig größeren Wert von $(2.5 \pm 0.09) \text{ Hz}$ für die ${}^2\text{h}J_{\text{HP}}$ -Kopplungskonstante zwischen U14-NH und der A17-Phosphatgruppe (Abbildung S6).

Die NH_2 -Gruppen der Basen sind die dritte Art von in RNA vorkommenden Wasserstoffbrückendonoren. Eine $\text{NH}_2\cdots\text{O}=\text{P}$ -Wasserstoffbrücke, die zur Stabilisierung des YNCG-„Tetraloops“ beiträgt, wird aus NOE-basierten NMR- und Röntgenkristallstrukturen vorhergesagt und erklärt die Notwendigkeit von C an Position 3 der Konsensus-Sequenz für diese „Loops“.^[8a-c,11] Um zu testen, ob Wasserstoffbrücken mit Aminogruppen als Donor auch direkt über die skalaren Kopplungen der Wasserstoffbrücke detektierbar sind, führten wir ein weitreichendes ${}^1\text{H}$, ${}^{31}\text{P}$ -HSQC-Experiment mit der ${}^{15}\text{N}$ -markierten 14nt-RNA mit dem UUCG-„Tetraloop“ aus (Abbildung 3). Neben zahlreichen Korrelationen zwischen den Ribose-Protonen und den ${}^{31}\text{P}$ -Kernen, vermittelt durch skalare Kopplungen über kovalente Bindungen, zeigt das resultierende Spektrum eine Korrelation zwischen dem ${}^{31}\text{P}$ -Kern der U7-Phosphatgruppe und einem Proton mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 6.8 \text{ ppm}$. Dieses Proton ist an ein Stickstoffatom gebunden. Daher erscheint es ohne ${}^{15}\text{N}$ -Entkopplung als Dublett mit einer Aufspaltung um 90 Hz ; dieses Proton wurde bereits zuvor der Aminogruppe an C8 zugeordnet. Somit können auch Wasserstoffbrücken mit NH_2 -Gruppen als Donor- und Rückgrat-Phosphatgruppen als Akzeptorgruppen zu messbaren skalaren Kopplungen über die Wasserstoffbrücke führen und direkt mithilfe von NMR-Spektroskopie identifiziert werden.

Zusammengefasst haben wir hier gezeigt, dass alle drei in RNA vorkommenden Arten von Wasserstoffbrücken mit Phosphatgruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren zu

messbaren ${}^2\text{h}J$ -Kopplungen über die Wasserstoffbrücken zwischen dem Proton der Donorgruppe (OH , NH , NH_2) und dem ${}^{31}\text{P}$ -Kern des Akzeptors führen. Diese Wasserstoffbrücken sind auch in unmarkierten RNA-Proben mit Standard- ${}^1\text{H}$, ${}^{31}\text{P}$ -Korrelationsexperimenten, die nur eine moderate Messdauer erfordern, überraschend einfach zu detektieren, selbst wenn nur Standard-Raumtemperatur-NMR-Probenköpfe zur Verfügung stehen (Abbildung S7). Wasserstoffbrücken zu Rückgrat-Phosphatgruppen treten nicht in regulären Sekundärstrukturelementen auf (z. B. A-Form-Helices), sondern nur in nichtkanonischen Strukturelementen. Dies sollte in vielen Fällen zu gut separierten Signalen für die relevanten Phosphatgruppen führen. Daher sind Donor- und Akzeptorgruppen oft auf einfache Weise identifizierbar. Darüber hinaus sind viele wiederkehrende dreidimensionale Struktur motive in RNA durch spezifische Wasserstoffbrücken zu Phosphatgruppen stabilisiert. Daher erwarten wir, dass die direkte Identifizierung der $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{P}$ -, $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{P}$ - und $\text{NH}_2\cdots\text{O}=\text{P}$ -Wasserstoffbrücken durch die hier beschriebenen Experimente die schnelle Charakterisierung von RNA-Tertiärstrukturen mittels NMR-Spektroskopie wesentlich erleichtern wird, auch in Fällen, in denen nur begrenzte Signalzuschreibungen verfügbar sind.

Experimentelles

Der 27nt-Neomycin-RNA-Schalter wurde durch In-vitro-Transkription mit ${}^2\text{H}$ -markierten Nukleotiden (Silantes GmbH, München) synthetisiert und wie beschrieben aufgereinigt.^[8d] Eine 0.9 mM Probe in NMR-Puffer mit 25 mM Kaliumphosphat ($\text{pH } 6.2$) und 50 mM KCl in 10% (v/v) D_2O wurde für alle NMR-Experimente verwendet. Die 14nt-„Tetraloop“-RNA wurde von der Silantes GmbH (München) in ${}^{13}\text{C}$ - und ${}^{15}\text{N}$ -markierter Form erworben. Die Probenkonzentration betrug 0.7 mM , gelöst in 20 mM Kaliumphosphat ($\text{pH } 6.4$) und 0.4 mM EDTA in 10% (v/v) D_2O .

Alle 2D-H,P-Korrelationsspektren wurden auf einem Bruker-Avance-600-MHz-Spektrometer, ausgestattet mit einem Tieftemperatur-HCP-z-Gradienten-Probenkopf (5 mm), aufgenommen. Langreichweitige ^1H , ^{31}P -HSQC-Spektren wurden mit einer optimierten INEPT-Transferzeit von 34 ms bei 278 K aufgezeichnet. Die Temperatur wurde für die Signalintensität sowohl der NH als auch der 2'-OH-Resonanz optimiert. Ein Spektrum mit einer Bandbreite von 10 ppm in der indirekten ^{31}P -Dimension wurde mit 24 komplexen Punkten und 256 Transienten pro Inkrement in rund 7 h aufgenommen. Für die NH_2 -Gruppe in der 14nt-RNA wurde das ^1H , ^{31}P -HSQC-Spektrum mit einer Transferzeit von 30 ms, 20 komplexen Punkten in t_1 und 2560 Transienten pro Inkrement in etwa 60 h aufgezeichnet. Die Bestimmung der $^2J_{\text{HP}}$ -Kopplungskonstanten der 27nt-RNA erfolgte aus quantitativen Spin-Echo- ^{31}P -1D-Spektren auf einem Bruker-DRX300-Spektrometer mit einem Raumtemperatur-BBO-z-Gradienten-Probenkopf (5 mm). Kopplungs-Evolutions-Zeiten von 45, 60 und 75 ms wurden in doppelten Messungen mit jeweils 45056, 67584 und 81920 Transienten aufgenommen. Bandbreitenselektive 180° -Q3-Gauß-Kaskadenpulse mit einer Bandbreite von 860 Hz und Dauer von 2.8 ms wurden für die selektive Entkopplung der 2', 3', 4'- und 5'-Protonen von Ribose in den Kreuzexperimenten verwendet und bei 4.1 ppm angewendet.^[13] Die Prozessierung der Spektren und die Peak-Dekonvolution wurden mit der Topspin2.1-Software (Bruker Biospin) durchgeführt. Die Kurvenanpassung der dekonvoluierten Signalintensitäten erfolgte mit Origin8 (OriginLab).

Eingegangen am 10. März 2011,
veränderte Fassung am 31. Mai 2011
Online veröffentlicht am 21. Juli 2011

Stichwörter: NMR-Spektroskopie · Phosphatgruppen · RNA · Tertiärstrukturen · Wasserstoffbrücken

- [1] C. L. Zirbel, J. E. Sponer, J. Sponer, J. Stombaugh, N. B. Leontis, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4898–4918.
- [2] a) G. J. Quigley, A. Rich, *Science* **1976**, *194*, 796–806; b) A. A. Szewczak, P. B. Moore, Y. L. Chan, I. G. Wool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9581–9585; c) F. M. Jucker, H. A. Heus, P. F. Yip, E. H. Moors, A. Pardi, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 968–980.
- [3] a) A. J. Dingley, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8293–8297; b) K. Pervushin, A. Ono, C. Fernandez, T. Szyperski, M. Kainosho, K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14147–14151.
- [4] a) A. J. Dingley, J. E. Masse, J. Feigon, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 279–289; b) A. Majumdar, A. Kettani, E. Skripkin, D. J. Patel, *J. Biomol. NMR* **1999**, *15*, 207–211; c) J. Wöhnert, A. J. Dingley, M. Stoldt, M. Görlach, S. Grzesiek, L. R. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3104–3110; d) A. Majumdar, A. Kettani, E. Skripkin, *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 67–70; e) A. Z. Liu, A. Majumdar, W. D. Hu, A. Kettani, E. Skripkin, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3206–3210; f) D. P. Giedroc, P. V. Cornish, M. Hennig, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4676–4677.
- [5] J. M. Hart, S. D. Kennedy, D. H. Mathews, D. H. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10233–10239.
- [6] a) F. Löhr, S. G. Mayhew, H. Ruterjans, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9289–9295; b) M. Mishima, M. Hatanaka, S. Yokoyama, T. Ikegami, M. Walchli, Y. Ito, M. Shirakawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5883–5884.
- [7] R. M. Gschwind, M. Armbruster, I. Z. Zubrzycki, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10228–10229.
- [8] a) F. H. T. Allain, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 333–353; b) E. Ennifar, A. Nikulin, S. Tishchenko, A. Serganov, N. Nevskaya, M. Garber, B. Ehresmann, C. Ehresmann, S. Nikonov, P. Dumas, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 35–42; c) S. Nozinovic, B. Fürtig, H. R. A. Jonker, C. Richter, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 683–694; d) E. Duchardt-Ferner, J. E. Weigand, O. Ohlenschläger, S. R. Schmidtke, B. Suess, J. Wöhnert, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6352–6355; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6216–6219.
- [9] N. B. Ulyanov, T. L. James, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 910–917.
- [10] S. R. Schmidtke, E. Duchardt-Ferner, J. E. Weigand, B. Suess, J. Wöhnert, *Biomol. NMR Assignments* **2010**, *4*, 115–118.
- [11] O. Ohlenschläger, J. Wöhnert, E. Bucci, S. Seitz, S. Häfner, R. Ramachandran, R. Zell, M. Görlach, *Structure* **2004**, *12*, 237–248.
- [12] B. Fürtig, C. Richter, W. Bermel, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2004**, *28*, 69–79.
- [13] L. Emsley, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 135–148.