

# Untersuchung von Protein-RNA-Interaktionsstellen mithilfe $^1\text{H}$ -detekterter MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie\*\*

Sam Asami, Magdalena Rakwalska-Bange, Teresa Carluomagno und Bernd Reif\*

In den zurückliegenden Jahrzehnten hat sich die NMR-Spektroskopie zu einem wichtigen analytischen Instrument in der Strukturbioologie von Proteinen entwickelt, das es ermöglicht, kristalline<sup>[1]</sup> und vor allem nichtkristalline<sup>[2]</sup> Systeme strukturell zu charakterisieren. Bisher wurden lediglich Proteinproben in der festen Phase untersucht, wogegen nur wenige Untersuchungen an RNA oder DNA dokumentiert sind.<sup>[3]</sup> Dies steht in keinem Verhältnis zur Bedeutung von Protein-RNA-Komplexen, die eine Rolle bei grundlegenden biochemischen Prozessen, wie der Translation, spielen. Vor dem Zusammensetzen des eukaryotischen Ribosoms, das die Translation der Messenger-RNA katalysiert, wird die RNA der ribosomalen Untereinheiten modifiziert.<sup>[4]</sup> Diese Modifizierungen umfassen die Umwandlung von Uridinen in Pseudouridine sowie die Methylierung von Nukleinbasen und 2'-O-Riboseresten, die in funktional wichtigen Bereichen auftreten.<sup>[5]</sup> Es wird angenommen, dass diese Veränderungen eine wichtige Rolle bei der RNA-Faltung spielen.<sup>[6]</sup> In Eukaryoten wird 2'-O-Ribose ortsspezifisch mithilfe kleiner nukleolarer RNAs (snoRNAs) methyliert.<sup>[7]</sup> Diese snoRNAs bestehen aus zwei konservierten Sequenzelementen: der C-Box (RUGAUG; R steht für ein Purin) und der D-Box (CUGA).<sup>[8]</sup> snoRNAs sind mit spezifischen Proteinen komplexiert und verbinden sich zu Ribonukleinprotein-Partikeln (snoRNPs). In Archaeen ist das kleine Ribonukleinprotein-Partikel (sRNP) aus einer Box-C/D-snoRNA-ähnlichen RNA (sRNA) und drei Proteinen – L7Ae, Nop56/58 und Fibrillarin – aufgebaut, wobei Fibrillarin die Methyltransferase ist.<sup>[9]</sup> Der Zusammenbau von Archaeen-sRNP wird durch die Bindung von L7Ae an die Box-C/D-RNA initiiert, und während der Bindung faltet die sRNA in eine K-Turn-Struktur.

<sup>[9b,10]</sup> Hier beschreiben wir einen neuen Zugang zur Charakterisierung von Protein-RNA-Schnittstellen. Dieser beruht auf protondetektierten MAS-Festkörper-NMR-spektroskopischen Experimenten (MAS = Rotation um den magnetischen Winkel) mit protonierten und deuterierten Proben.

Festkörper-NMR-Spektroskopie ist großenunabhängig und eignet sich ideal zur Untersuchung von großen makromolekularen Komplexen, die nicht kristallisiert werden können.<sup>[11]</sup> Mit MAS-Frequenzen von ca. 60 kHz, die mit handelsüblichen Instrumenten erreicht werden, lassen sich  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -dipolare Kopplungsnetzwerke in protonierten Proteinproben nur partiell ausmitteln.<sup>[12]</sup> Kürzlich wurde für verschiedene Proteine nachgewiesen, dass schon bei mittleren MAS-Rotationsfrequenzen (20–24 kHz) und Feldstärken (9–14 T) eine hohe Empfindlichkeit und Auflösung bei  $^1\text{H}$ -detektierten Experimenten unter Verwendung perdeuterierter Proteine, in denen labile Protonen rückgetauscht wurden, erreicht werden kann.<sup>[13]</sup> In ähnlicher Weise lassen sich nichttauschende Protonen unter Verwendung geeigneter Markierungsschemata beobachten.<sup>[14]</sup>

Wir verwendeten einen ähnlichen Deuterierungsansatz, um die Protein-RNA-Interaktion zwischen dem Archaeen-Protein L7Ae (ca. 13.4 kDa) von *Pyrococcus furiosus* (PF) und der entsprechenden Box-C/D-RNA (ca. 8.6 kDa) zu untersuchen (Abbildung 1). Röntgenographisch aufgeklärt wurde bisher die Kristallstruktur eines homologen Komplexes von *Archaeoglobus fulgidus* (AF);<sup>[9b]</sup> der PF-Komplex konnte nicht kristallisiert werden.<sup>[3d]</sup> Für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden zwei unterschiedlich markierte L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplexe präpariert, und in beiden Proben wurde das Protein gleichmäßig deuteriert sowie mit dem  $^{15}\text{N}$ -Isotop angereichert. Die RNA wurde aus vollständig  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ - oder  $^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten Nucleotiden synthetisiert; die entsprechenden Proben werden als  $^1\text{H}$ - bzw.  $^2\text{H}$ -RNA bezeichnet. In beiden Proben wurden labile Protonen zu 10 % rückgetauscht.

Bei  $^1\text{H}$ -detektierten  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimenten bei moderaten MAS-Frequenzen zwischen 15 und 20 kHz wurden alle erwarteten Signale des Proteins und der RNA detektiert (Abbildung 2a). In Protein-RNA-Komplexen überlappen die jeweiligen spektralen Fenster nicht.<sup>[15]</sup> Die Imino- und Aminospektralregionen können Signale von Histidin- bzw. Argininseitenketten enthalten (die Primärsequenz von L7Ae enthält einen Histidinrest und vier Argininreste). Die durchschnittliche  $^1\text{H}-(^{15}\text{N})$ -Linienbreite des Proteins beträgt ca. 100 (ca. 60) Hz und die Linienbreite für die Amino- und Iminosignale ca. 150 (ca. 140) bzw. ca. 300 (ca. 160) Hz. Chemischer Austausch, lokale Dynamik oder Strukturheterogenität aufgrund von Kristallimperfektionen könnten prinzipiell für die unterschiedlichen Linienbreiten

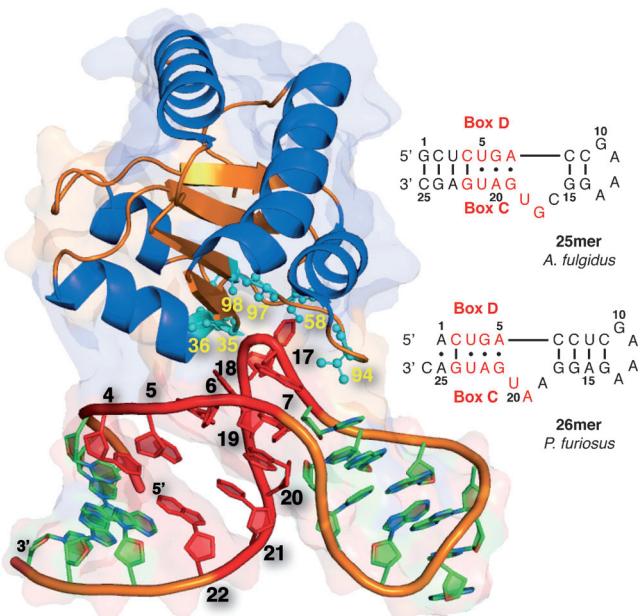
[\*] S. Asami, Prof. Dr. B. Reif

Munich Center for Integrated Protein Science (CIPS-M)  
am Department Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
und  
Helmholtz-Zentrum München (HMGU),  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt  
Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg (Deutschland)  
E-Mail: reif@tum.de

M. Rakwalska-Bange, Dr. T. Carluomagno  
Computational and Structural Biology Unit, EMBL  
Heidelberg (Deutschland)

[\*\*] Wir danken dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) für die Bereitstellung von Messzeit sowie U. Fink für die technische Unterstützung im Labor. Diese Arbeit wurde im Rahmen des SFB 1035 der DFG durchgeführt. MAS = Rotation um den magnetischen Winkel.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208024> zu finden.

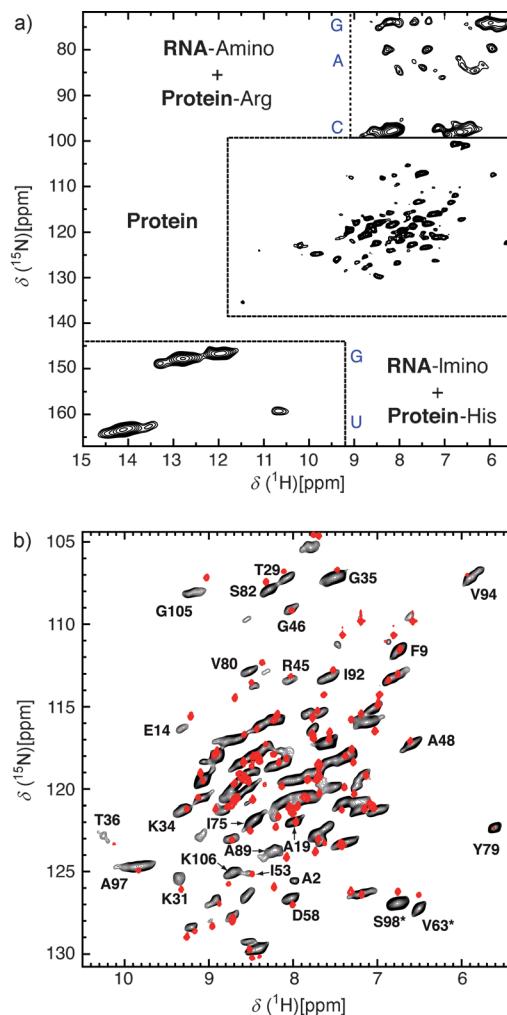


**Abbildung 1.** Kristallstruktur des L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplexes von *Archaeoglobus fulgidus* (PDB-Code: 1RLG). In dieser Studie wurde das homologe L7Ae von *Pyrococcus furiosus* im Komplex mit der gezeigten 26meren Box C/D-RNA desselben Organismus untersucht. Die Box-C/D-Elemente sind rot und die Proteinreste an den Interaktionsbereichen cyan markiert (Gly35, Thr36, Asp58, Val94, Ala97, Ser98);  $\beta$ -Faltblätter und Schleifen von L7Ae sind gold, Helices marineblau dargestellt.

für Protein- und RNA-Signale verantwortlich sein. Festkörper- und Lösungs-NMR-Spektren zeigen eine große Ähnlichkeit bei vergleichbarer Auflösung (Abbildung 2b).

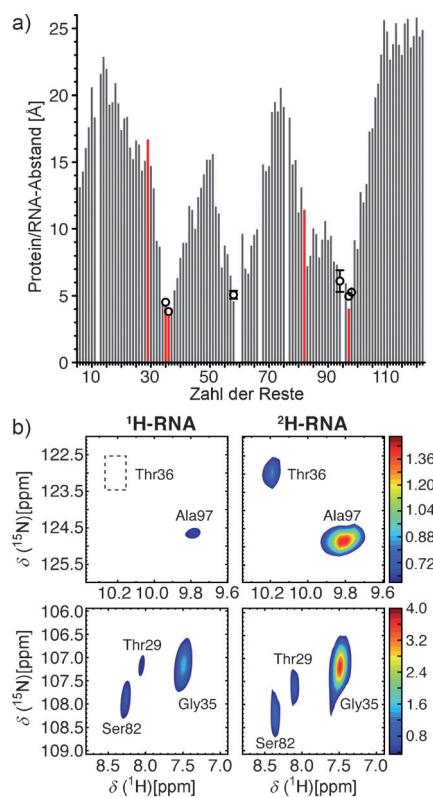
Hier stellen wir eine experimentelle Strategie vor, die die Identifizierung von Protein-RNA-Interaktionsstellen ermöglicht. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass in der  $^1\text{H}$ -RNA-Probe Proteinbereiche in Nachbarschaft zu RNA-Protonen aufgrund dipolvermittelter Linienverbreiterung verminderte Signalstärken zeigen: Protein-Amidprotonen, die weit von der RNA entfernt sind ( $>6 \text{ \AA}$ ), zeigen ähnliche Signalstärken in der  $^1\text{H}$ -RNA- wie in der  $^2\text{H}$ -RNA-Probe ( $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}] \approx 1$ ), während Amidsignale an der Schnittstelle wesentlich weniger intensiv sind ( $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}] < 1$ ). Da die absoluten Intensitäten auch von der Menge der Proben abhängen, wurden die Intensitäten für beide Proben normiert, bevor das  $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}]$ -Verhältnis ermittelt wurde. Für diesen Zweck wurde Ala48 verwendet, das gut aufgelöst und weit ( $14.7 \text{ \AA}$ ) von seinem nächsten RNA- $^1\text{H}^\text{C}$ -Proton entfernt ist (Abbildung 2b). Kristallkontakte wurden bei dieser Analyse berücksichtigt (Abbildung S4d der Hintergrundinformationen (SI)). Für die Berechnung der relativen Intensitäten wurden ausschließlich Kontakte zwischen Protein- $^1\text{H}^\text{N}$ - und RNA- $^1\text{H}^\text{C}$ -Protonen berücksichtigt, da austauschbare Protonen zu 10 % rückgetauscht wurden und dipolare  $^1\text{H}^\text{N}$ - $^1\text{H}^\text{N}$ -Interaktionen entsprechend vernachlässigbar sind.

In Abbildung 3a ist jeweils der kleinste Abstand zwischen einem Protein- $^1\text{H}^\text{N}$ - und einem RNA- $^1\text{H}^\text{C}$ -Proton in Abhängigkeit vom Proteinrest dargestellt. Die Abstände wurden aus der AF-Kristallstruktur (PDB-Code: 1RLG) extrahiert. Diese Struktur fungiert wegen ihrer starken Homologie als



**Abbildung 2.** a)  $^1\text{H}$ -detektiertes  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum des ausgefällten L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplexes von PF unter Anwendung einer  $^2\text{H}$ -RNA-Probe. Deutlich zu erkennen sind die charakteristischen Protein- und RNA-Spektralbilder. Die Prozessierung wurde für jeden Bereich optimiert, um die unterschiedlichen natürlichen Linienbreiten beider Biomoleküle adäquat darzustellen. Das Spektrum wurde bei einer Feldstärke von  $16.4 \text{ T}$  (700 MHz), 20-kHz-MAS und einer effektiven Temperatur von ca.  $27^\circ\text{C}$  aufgenommen. Der Iminobereich zeigt erhöhte Empfindlichkeit und Auflösung bei niedrigeren Temperaturen. Deshalb wurde dieser Bereich aus einem Spektrum, das bei ca.  $0^\circ\text{C}$ , 15-kHz-MAS und einer Feldstärke von  $14.1 \text{ T}$  (600 MHz) aufgenommen wurde, extrahiert. Die Spektralbereiche der Nucleobasen sind entsprechend der durchschnittlichen chemischen Verschiebung laut BMRB-Datenbank angegeben. b) Proteinbereich der  $^1\text{H}$ -RNA-Probe mit provisorischen Zuordnungen. Das NMR-Spektrum in Lösung ist rot dargestellt. Ser98 und Val63\* (markiert mit \*) sind gefaltet.

Modell (Abbildung S4a (SI)). Die Proteinreste an der Protein-RNA-Schnittstelle, insbesondere Gly35, Thr36, Asp58, Val94, Ala97 und Ser98, zeigen sehr kleine RNA-Protein-Abstände (Abbildung 3a). Experimentell kann der Abstand zwischen Proteinresten und der RNA durch den Vergleich der normierten Intensitäten der  $^1\text{H}$ - und der  $^2\text{H}$ -RNA-Proben ermittelt werden. In der Abbildung werden für jeden Satz von Kreuzsignalen die gleichen Konturniveaus verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Abbildungen zu gewährleisten. So



**Abbildung 3.** a) Abstand zwischen Protein- $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Proton und dem nächstgelegenen RNA- $^1\text{H}^{\text{C}}$ -Proton in Abhängigkeit von der Proteinpri-märsequenz. Berechnete Abstände beruhen auf der Kristallstruktur des L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplexes von AF (PDB-Code: 1RLG; Protonen wurden mit WHAT IF<sup>[17]</sup> ergänzt). Experimentell bestimmte Abstände sind als offene Kreise dargestellt. b)  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren unter Anwendung der  $^1\text{H}$ - (links) und  $^2\text{H}$ -RNA-Probe (rechts). Absolute Intensitäten wurden mithilfe von Ala48 normiert. Die dargestellten Reste (Thr29, Gly35, Thr36, Ser82, Ala97) sind in (a) Rot hervorgehoben. In der  $^1\text{H}$ -RNA-Probe zeigen die Proteinreste, die sich nahe an der RNA (Gly35, Thr36, Ala97) befinden, eine verringerte Intensität.

sind z. B. die Intensitäten von Gly35, Thr36 und Ala97 in der  $^1\text{H}$ -RNA-Probe deutlich verringert. Diese Reste befinden sich in der Nähe von RNA- $^1\text{H}^{\text{C}}$ -Protonen (innerhalb 3.6–4.3 Å), im Unterschied zu Thr29 und Ser82, die weit entfernt sind (> 11 Å).

Zur quantitativen Beschreibung der experimentellen  $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}]$ -Intensitätsverhältnisse wurden Simulationen unter Anwendung des SIMPSON-Softwarepaketes durchgeführt.<sup>[16]</sup> Als Basis-Spin-System wurden vier Spins herangezogen, entsprechend den Protein- $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ - und den RNA- $^1\text{H}^{\text{C}}, ^{13}\text{C}$ -Kernen (Abbildung S2 (SI)). Da die Signalreduktion in der  $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ -Korrelation des Proteins in großer Nähe zur RNA durch dipolvermittelte Linienverbreiterung induziert wird, wird erwartet, dass das simulierte  $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}]$ -Verhältnis sowohl vom Abstand als auch von der relativen Orientierung aller berücksichtigten Dipole abhängt. Deshalb wurden zwei Winkel –  $\beta_1$  und  $\beta_2$  – einbezogen, um alle wechselseitigen Ausrichtungen der  $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ - und der  $^1\text{H}^{\text{C}}, ^{13}\text{C}$ -Dipoltensoren zu berücksichtigen. Außer den Winkeln  $\beta_1$  und  $\beta_2$  ist der  $^1\text{H}^{\text{N}}, ^1\text{H}^{\text{C}}$ -Abstand die einzige weitere Variable. Es zeigt sich, dass die simulierten  $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}]$ -Verhältnisse abhängig von der relativ-

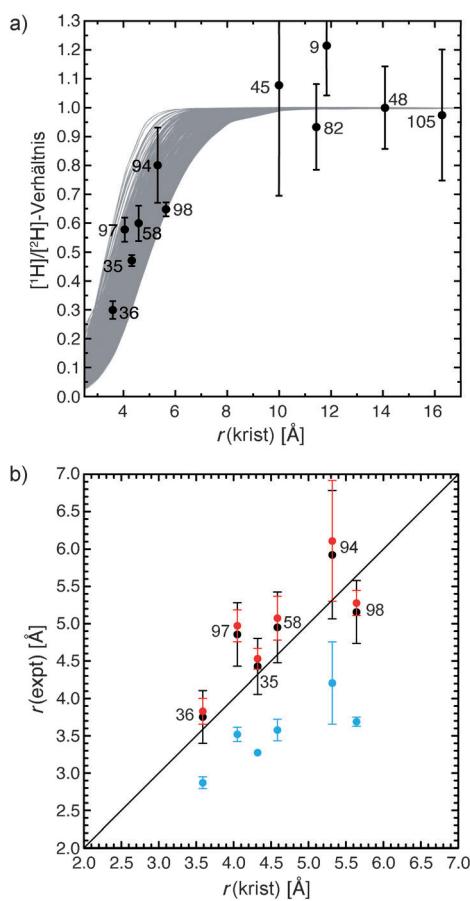
ven Ausrichtung der beiden Dipol-Dipol-Vektoren sind. Diese Abhängigkeit nimmt mit zunehmendem Abstand ab. Die Simulation zeigt eine vierfache Entartung im Winkelraum (Abbildung S2 (SI)). Um die Entartung zu reduzieren, wurden für den L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplex und für zwei weitere Protein-RNA-Komplexe  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Winkelverteilungen errechnet, um den Konformationsraum während der Anpassung einzuschränken (Abbildung S3 (SI)). Die simulierte  $I[^1\text{H}]/I[^2\text{H}]$ -Datenmatrix als Funktion von  $^1\text{H}^{\text{N}}, ^1\text{H}^{\text{C}}$ -Abstand sowie von  $\beta_1$  und  $\beta_2$  ist in Abbildung 4a gezeigt.

Die Anpassung an die experimentellen Daten setzt keine Kenntnis über die Struktur des Systems voraus. Im ersten Schritt wird eine lineare Anordnung der  $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^{\text{C}}, ^{13}\text{C}$ -Dipoltensoren angenommen. Dies führt zu einer schwachen Korrelation (Abbildung 4b, cyan). Die Einführung der Winkel  $\beta_1$  und  $\beta_2$  verbessert die Korrelation hingegen signifikant (Abbildung 4b, schwarz). Wie erwartet führt die Einschränkung des Konformationsraums für  $\beta_2$  zu geringeren Fehlern, was aber keine signifikante Veränderung der ermittelten Abstände zur Folge hat (Abbildung 4b, rot). Details zur Anpassung sind in den Hintergrundinformationen zusammengestellt; die ermittelten Parameter sind in Tabelle S1 (SI) zusammengefasst. Die gemessenen Abstände sind in Abbildung 3a, zusammen mit den Abständen aus der Kristallstruktur, abgebildet. Die ermittelten Abstände und Winkel liegen innerhalb der Fehlertoleranzen. Für die Experimente wurden  $^2\text{H}$ -RNA-Proben von lediglich ca. 2 mg verwendet. Eine verbesserte Messgenauigkeit kann durch die Erhöhung der experimentellen Empfindlichkeit beider Proben erreicht werden.

RNA weist von Natur aus eine geringere Protonendichte als ein Protein auf. Bei unserem Verfahren erleichtert die geringe Protonendichte den Erhalt von Strukturparametern, weil sich in erster Näherung jedes Protein- $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Proton in Nachbarschaft zu wenigen RNA- $^1\text{H}^{\text{C}}$ -Protonen befindet.

Wir konnten hier zeigen, dass durch die Verwendung deuterierter Proben hochaufgelöste Spektren für einen Protein-RNA-Komplex erhalten werden können. Wir präsentieren damit erstmals  $^1\text{H}$ -detektierte  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren eines Protein-RNA-Komplexes in der festen Phase. Des Weiteren konnten mithilfe einer neuen Methode zur Bestimmung von Strukturparametern im Festkörper Protein-RNA-Interaktionsstellen identifiziert und die Abstände und Orientierungen der beteiligten Kerne quantitativ bestimmt werden.

Die Tatsache, dass die Absorption von Amid-Protein-Signalen in der  $^1\text{H}$ -RNA-Probe vom Abstand und der relativen Ausrichtung der Atomepaare abhängt, eröffnet neue Möglichkeiten für die Strukturberechnung. Zusätzlich zum Abstands-Restraint kann nun ein Winkel-Restraint für Systeme erhalten werden, für die bislang nur spärliche Daten verfügbar sind. Dies sollte die Genauigkeit für die Strukturbestimmung erhöhen. Diese Parameter können als Restraints in iterative Strukturberechnungsalgorithmen eingebunden werden. Dieser Ansatz ist auf andere Protein-RNA-, aber auch auf Protein-Ligand-Komplexe anwendbar. Der L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplex fungierte hier lediglich als Modellsystem. Es ist geplant, diesen Ansatz in Zukunft auf vollständig rekonstituierte sRNP-Komplexe<sup>[18]</sup> anzuwenden, die



**Abbildung 4.** a) Anpassung an die experimentell ermittelten  $[{}^1\text{H}]/[{}^2\text{H}]$ -Intensitätsverhältnisse.  $[{}^1\text{H}]/[{}^2\text{H}]$  ist als Funktion des  ${}^1\text{H}^N(\text{Protein}), {}^1\text{H}^c(\text{RNA})$ -Abstandes  $r(\text{krist.})$ , so wie er in der Kristallstruktur des L7Ae-Box-C/D-RNA-Komplexes (PDB-Code: 1RLG) gefunden wird, dargestellt. Simulierte Kurven sind grau. Angepasste Abstände sind in Abbildung 3 a gezeigt und in Tabelle S1 (SI) aufgelistet. b) Korrelation der  ${}^1\text{H}^N(\text{Protein}), {}^1\text{H}^c(\text{RNA})$ -Abstände aus der Kristallstruktur,  $r(\text{krist.})$ , und den simulierten Abständen,  $r(\text{exp.})$ . Für die Anpassung wurden drei Fälle angenommen: 1)  $\beta_1 \in [0^\circ, 180^\circ]$ ,  $\beta_2 \in [0^\circ, 360^\circ]$  (schwarz); 2)  $\beta_1 \in [-10^\circ, 180^\circ]$ ,  $\beta_2 \in [70^\circ, 100^\circ]$  (rot); 3)  $\beta_1 = \beta_2 = 0^\circ$  (cyan). Für (2) wurde der Winkelraum  $\beta_2$ , wie in den Hintergrundinformationen beschrieben, eingeschränkt (Abbildung S3 (SI)). Die Anpassung wird bei Berücksichtigung der Winkel  $\beta_1$  und  $\beta_2$  signifikant verbessert und resultiert in einer linearen Korrelation zwischen dem experimentellen und dem aus der Röntgenstruktur ermittelten Abstand. Für eine lineare Funktion mit einem Achsenabschnitt von null ergibt sich eine Steigung von ca. 1.05 für den nichtlinearen/nichteingeschränkten, ca. 1.08 für den nichtlinearen/eingeschränkten und ca. 0.76 für den linearen Fall. Auf diese Weise kann für Protein-RNA-Komplexe ein robuster Abstands-Restraint ermittelt werden, unabhängig von Vorkenntnissen über die Struktur. Der Fehler der experimentellen Intensitäten wurde auf die zweifache Standardabweichung des Rauschens festgelegt. Die Unsicherheit der Intensitätsverhältnisse wurde durch Fehlerfortpflanzung bestimmt, wohingegen der Fehler der experimentellen Abstände durch 1000 Monte-Carlo-Simulationen abgeschätzt wurde.

das durch molekulares Taumeln (molecular tumbling) bedingte Molekülgewichtslimit überschreiten, das momentan Lösungs-NMR-Spektroskopie-Anwendungen einschränkt.

## Experimentelles

Das L7Ae-Protein von *P. furiosus* wurde exprimiert und gereinigt wie an anderer Stelle beschrieben; Gleches gilt für die Transkription und Reinigung der 26meren RNA.<sup>[3d]</sup> Für die  ${}^1\text{H}$ - und  ${}^2\text{H}$ -RNA Probe wurden u-[ ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}$ ]- bzw. u-[ ${}^2\text{H}, {}^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}$ ]-Nucleotide verwendet. Beide zusammengefügten Komplexe (molares Verhältnis 1:1) wurden in einer Pufferlösung 2–4 Wochen lang mit einem  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Verhältnis von 10:90 rückgetauscht, um vollständigen H/D-Austausch zu gewährleisten. Vor der Präzipitation betrug die Proteinkonzentration  $7 \text{ mg mL}^{-1}$  (in 40 mM HEPES, 14% PEG-400 und 50 mM Magnesiumacetat). Die Präzipitation des Komplexes wurde durch Dampfdiffusion in einer SpeedVac unter 60 mbar Vakuum bei  $30^\circ\text{C}$  induziert. Wie erwartet<sup>[9b]</sup> fiel der Komplex bei halbem Volumen aus. Das so erhaltene kristalline Material (ca. 10 mg für den  ${}^1\text{H}$ -RNA- und ca. 2 mg für den  ${}^2\text{H}$ -RNA-Protein-Komplex) wurde in 3.2-mm-MAS-Rotoren gefüllt.

Die Festkörper-NMR-spektroskopischen Experimente wurden mit Bruker-Biospin-Avance-Spektrometern mit  ${}^1\text{H}$ -Larmor-Frequenzen von 600 oder 700 MHz durchgeführt, wobei handelsübliche 3.2-mm-Tripelresonanz-Probenköpfe verwendet wurden. Details zur Probentemperatur und der MAS-Rotationsfrequenz finden sich in den Bildunterschriften. Der  ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -Magnetisierungstransfer wurde durch einen Kreuzpolarisationschritt mit Rampe erreicht (Hartmann-Hahn-Bedingung,  $n=1$ ). Die Stickstoffevolution wurde  ${}^1\text{H}$ - und  ${}^{13}\text{C}$ -entkoppelt aufgenommen, während in der Protonevolution  ${}^{15}\text{N}$  entkoppelt wurde. Für alle Entkopplungen wurde WALTZ-16<sup>[19]</sup> mit einer RF-Feldstärke von 2 bis 3 kHz verwendet.

Eingegangen am 4. Oktober 2012  
Online veröffentlicht am 18. Januar 2013

**Stichwörter:** NMR-Spektroskopie · Proteine · RNA · Protonendetektion · Strukturelle Restraints

- [1] a) F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98–102; b) W. T. Franks, B. J. Wylie, H. L. F. Schmidt, A. J. Nieuwkoop, R. M. Mayrhofer, G. J. Shah, D. T. Graesser, C. M. Rienstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4621–4626.
- [2] a) C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523–1526; b) J. M. Lopez Del Amo, U. Fink, M. Dasari, G. Grelle, E. E. Wanker, J. Bieschke, B. Reif, *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 517–524; c) J. M. Lopez del Amo, M. Schmidt, U. Fink, M. Dasari, M. Fandrich, B. Reif, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6240–6243; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6136–6139; d) A. Loquet, N. G. Sgourakis, R. Gupta, K. Giller, D. Riedel, C. Goosmann, C. Griesinger, M. Kolbe, D. Baker, S. Becker, A. Lange, *Nature* **2012**, *486*, 276–279.
- [3] a) K. Riedel, C. Herbst, S. Hafner, J. Leppert, O. Ohlenschläger, M. S. Swanson, M. Gorlach, R. Ramachandran, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5748–5751; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5620–5623; b) A. V. Cherepanov, C. Glaubitz, H. Schwabe, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4855–4859; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4747–4750; c) W. Huang, G. Varani, G. P. Drobny, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17643–17645; d) S. Jehle, M. Falb, J. P. Kirkpatrick, H. Oschkinat, B. J. van Rossum, G. Althoff, T. Carloni, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3842–3846; e) W. Huang, G. Varani, G. P. Drobny, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 347–356; f) I. V. Sergeyev, L. A. Day, A. Goldbourt, A. E. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20208–20217.
- [4] B. E. Maden, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1990**, *39*, 241–303.
- [5] W. A. Decatur, M. J. Fournier, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 344–351.

- [6] M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 721–733.
- [7] a) Z. Kiss-Laszlo, Y. Henry, T. Kiss, *EMBO J.* **1998**, *17*, 797–807; b) T. Kiss, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3617–3622.
- [8] a) K. Tyc, J. A. Steitz, *EMBO J.* **1989**, *8*, 3113–3119; b) K. Q. Ye, R. Jia, J. Z. Lin, M. H. Ju, J. Peng, A. B. Xu, L. M. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13808–13813.
- [9] a) A. D. Omer, S. Ziesche, H. Ebhardt, P. P. Dennis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5289–5294; b) T. Moore, Y. M. Zhang, M. O. Fenley, H. Li, *Structure* **2004**, *12*, 807–818; c) S. Oruganti, Y. M. Zhang, H. Z. Li, H. Robinson, M. P. Terns, R. M. Terns, W. Yang, H. Li, *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 1141–1150.
- [10] M. Falb, I. Amata, F. Gabel, B. Simon, T. Carlomagno, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6274–6285.
- [11] a) A. Mainz, S. Jehle, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15968–15969; b) A. Mainz, B. Bardiaux, F. Kuppler, G. Multhaup, I. C. Fell, R. Pierattelli, B. Reif, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1128–1138.
- [12] A. Marchetti, S. Jehle, M. Felletti, M. J. Knight, Y. Wang, Z. Q. Xu, A. Y. Park, G. Otting, A. Lesage, L. Emsley, N. E. Dixon, G. Pintacuda, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10914–10917; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10756–10759.
- [13] a) V. Chevelkov, K. Rehbein, A. Diehl, B. Reif, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3963–3966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3878–3881; b) M. Huber, S. Hiller, P. Schanda, M. Ernst, A. Bockmann, R. Verel, B. H. Meier, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 915–918; c) M. J. Knight, A. L. Webber, A. J. Pell, P. Guerry, E. Barbet-Massin, I. Bertini, I. C. Fell, L. Gonnelli, R. Pierattelli, L. Emsley, A. Lesage, T. Herrmann, G. Pintacuda, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11901–11905; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11697–11701; d) R. Linser, M. Dasari, M. Hiller, V. Higman, U. Fink, J. M. L. del Amo, S. Markovic, L. Handel, B. Kessler, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, B. Reif, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4601–4605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4508–4512.
- [14] a) V. Agarwal, A. Diehl, N. Skrynnikov, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12620–12621; b) S. Asami, P. Schmieder, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15133–15135; c) P. Schanda, M. Huber, J. Boisbouvier, B. H. Meier, M. Ernst, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11198–11202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11005–11009.
- [15] B. Fürtig, C. Richter, J. Wohnert, H. Schwalbe, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 936–962.
- [16] M. Bak, J. T. Rasmussen, N. C. Nielsen, *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296–330.
- [17] G. Vriend, *J. Mol. Graphics* **1990**, *8*, 52–56.
- [18] J. Z. Lin, S. M. Lai, R. Jia, A. B. Xu, L. M. Zhang, J. Lu, K. Q. Ye, *Nature* **2011**, *469*, 559–U140.
- [19] A. J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkel, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 335–338.