

# Struktur der parallelen Poly(A)-RNA-Doppelhelix: Bewertung einer 50 Jahre alten Vorhersage\*\*

Nozhat Safaee,\* Anne M. Noronha, Dmitry Rodionov, Guennadi Kozlov, Christopher J. Wilds, George M. Sheldrick und Kalle Gehring\*

Die antiparallele B-DNA-Doppelhelix mit Watson-Crick-Basenpaaren war die erste Nukleinsäure-Struktur, die aufgeklärt werden konnte. DNA kommt üblicherweise als B-DNA vor, es gibt aber auch alternative Strukturen wie A-DNA<sup>[1]</sup> und Z-DNA<sup>[2]</sup> sowie sequenzspezifische Doppel-,<sup>[3–5]</sup> Dreifach-<sup>[6]</sup> und Vierfachhelices,<sup>[7,8]</sup> die in einigen Fällen von physiologischer Relevanz sind.<sup>[5]</sup> RNA ist zudem in der Lage, verschiedene Strukturen höherer Ordnung zu bilden, einschließlich einer homopolymeren Poly(rA)-Doppelhelix, wie sie von Rich et al.<sup>[9]</sup> auf der Basis der Beugungsmuster von Poly(rA)-Fasern, die sich bei niedrigem pH-Wert gebildet hatten, vorgeschlagen wurde. Mithilfe möglicher alternativer Helixmodelle von Poly(rA) und einem Vergleich berechneter mit beobachteten Faserbeugungsbildern entwarfen die Autoren ein paralleles Doppelhelixmodell von Poly(rA), das durch Protonierung an N1 stabilisiert ist. Später zeigte Patubiraman,<sup>[10]</sup> dass die Bildung einer rechtsgängigen Nukleinsäure-Doppelhelix thermodynamisch günstig ist. Kikuchi et al.<sup>[11]</sup> gelang es, Adenosin-reiche Fragmente von RNA und DNA zu kristallisieren. Kürzlich konnten Chakraborty et al.<sup>[12]</sup> mithilfe von NMR-Spektroskopie und Hitzedenaturierungs-Untersuchungen zeigen, dass Poly(dA) in saurer Lösung bei niedriger Salzkonzentration eine parallele Doppelhelix bildet. Trotz vieler Studien konnte die atomare Struktur von Poly(rA) bis jetzt nicht bestimmt werden. Da es uns nun, 50 Jahre nach der Vorhersage der Struktur durch

Rich et al., gelungen ist, gut geordnete Kristalle von Poly(rA) zu züchten, stellen wir hier die von uns bestimmte Struktur mit einer Auflösung von 1 Å vor. Die Entstehungsbedingungen sowie die Stabilität der Poly(rA)-Doppelhelix in Lösung wurden mit Hitze-Denaturierungsuntersuchungen ebenfalls ausgelotet.

Kristalle von (rA)<sub>11</sub> wurden nur in Gegenwart eines Fragments des Poly(A)-bindenden Proteins (PABP), das die Domänen RRM1-2 enthielt, gebildet. Vermutlich reduziert die Bindung von (rA)<sub>11</sub> an das Protein die Geschwindigkeit der Assoziation der RNA-Stränge und erlaubt so die Bildung gut geordneter Kristalle. Die hochaufgelösten Daten von mehreren Einkristallen wurden kombiniert und die Phasen durch direkte Ab-initio-Methoden mit der MultiProcessor-Version des Programms SHELXD<sup>[13]</sup> bestimmt. Das Strukturmodell wurde mit Coot<sup>[14]</sup> gebaut und mit SHELXL<sup>[13]</sup> unter Verwendung von Daten mit einer Auflösung von 1.0 Å verfeinert (Tabelle 1).

Die Struktur enthält eine parallele (rA)<sub>11</sub>-Doppelhelix (Abbildung 1) mit symmetrischen Basenpaaren aus zwei Adeninnukleotiden (Abbildung 1 A). Diese A-A-Basenpaare sind „N7-Amino-symmetrisch“, d. h., dass das Atom N7 eines Adenins eine Wasserstoffbrücke mit der Aminogruppe der

**Tabelle 1:** Datensammlung und Verfeinerung der (rA)<sub>11</sub>-Doppelhelixstruktur.<sup>[a]</sup>

Datensammlung von (rA) <sub>11</sub> (PDB-Code:4JRD)	
Raumgruppe	P41212
Zellkanten a, b, c [Å]	22.8, 22.8, 163.7
Auflösung (Å)	22.58–1.0 (1.1–1.0)
Rmerge	0.094 (0.142)
I/σ	34.4 (4.7)
Vollständigkeit [%]	92.6 (73.1)
Redundanz	2.73 (1.20)
Verfeinerung von (rA) <sub>11</sub>	
Auflösung [Å]	22.58–1.0 (1.1–1.0)
Zahl Reflexe	22972
Rwork/Rfree	0.126/0.158
Zahl Atome	
Poly(A)-RNA	478
Wasser	94
B-Werte	
Poly(A)-RNA	13.4
Wasser	29.2
Q.m.s.-Abweichungen <sup>[b]</sup>	
Bindungslängen [Å]	0.007
Bindungswinkel [°]	1.4

[a] Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

[b] Q.m.s. = Quadratischer Mittelwert.

[\*] N. Safaee, D. Rodionov, Dr. G. Kozlov, Prof. K. Gehring  
Department of Biochemistry, McGill University  
Montréal, Québec, H3G 0B1 (Kanada)  
E-Mail: nozhat.safaee@mail.mcgill.ca  
kalle.gehring@mcgill.ca

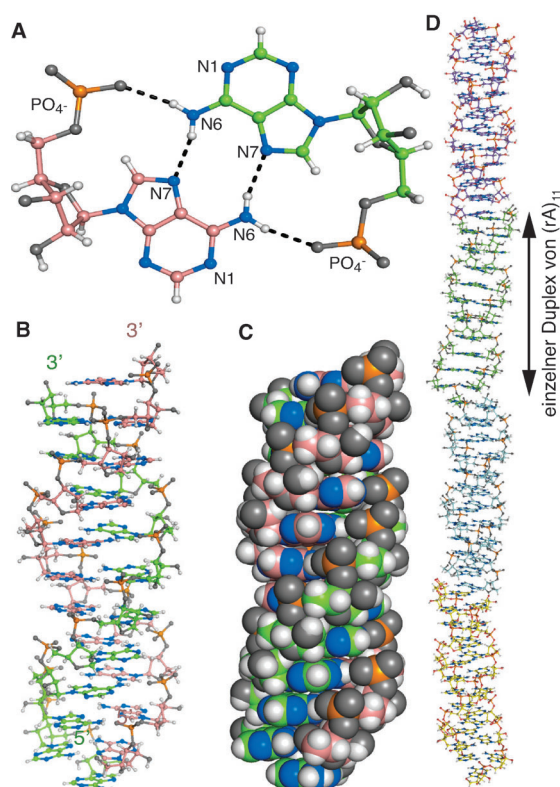
Dr. A. M. Noronha, Prof. C. J. Wilds  
Department of Chemistry and Biochemistry,  
Concordia University  
Montréal, Québec, H4B 1R6 (Kanada)

N. Safaee, Dr. A. M. Noronha, D. Rodionov, Dr. G. Kozlov,  
Prof. C. J. Wilds, Prof. K. Gehring  
Groupe de recherche axé sur la structure des protéines,  
McGill University  
Montréal, Québec, H3G 0B1 (Kanada)

Prof. G. M. Sheldrick  
Abteilung für Strukturchemie,  
Georg-August-Universität Göttingen  
37077 Göttingen (Deutschland)

[\*\*] Vorläufige Datensammlung an der McGill University. Zusätzliche Daten wurden von Pawel Grochulski und Shaunivan Labiak am Canadian Light Source, Saskatoon, SK, Kanada und am Cornell High Energy Synchrotron Source, Ithaca, NY (USA) gesammelt.

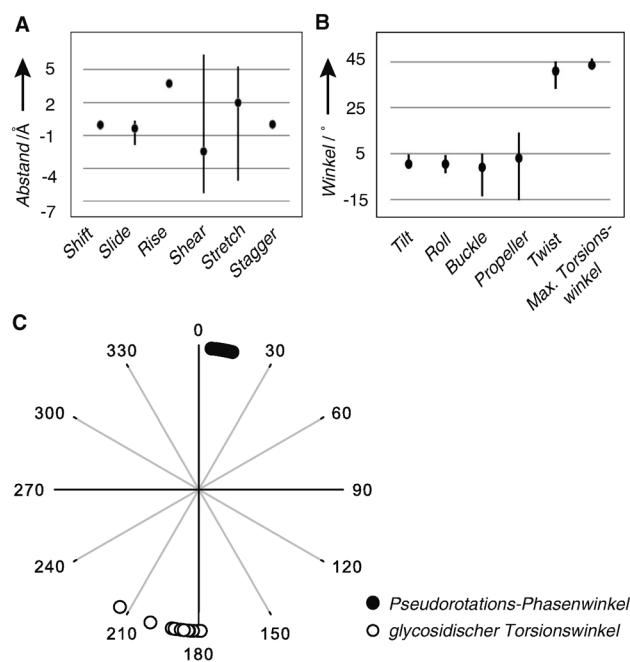
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201303461> zu finden.



**Abbildung 1.** (rA)<sub>11</sub> bildet eine parallele, rechtsgängige Doppelhelix. A) Das für die Bildung der Poly(rA)-Doppelhelix verantwortliche A-A-Basenpaar. Die Phosphatgruppen werden in Richtung der helikalen Achse gedrängt und bilden zwei der vier Wasserstoffbrücken. B) Kugel-Stab-Darstellung der (rA)<sub>11</sub>-Doppelhelix. C) Kalottenmodell von (rA)<sub>11</sub>. D) Durch Assoziation von (rA)<sub>11</sub>-Molekülen gebildete, fortlaufende Poly(rA)-Helix, mit den einzelnen (rA)<sub>11</sub>-Einheiten in unterschiedlichen Farben.

jeweils entgegengesetzten Base eingeht. Derartige Basenpaare konnten zuvor schon bei CpA-Dinukleotidmonophosphat (CpA = Cytidyl-3',5'-adenosin) beobachtet werden.<sup>[15]</sup> Eine weitere Wasserstoffbrücke wird zwischen einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe eines Strangs und dem zweiten Wasserstoffatom der Aminogruppe des gegenüberliegenden Strangs gebildet (Abbildung 1A). Die A-A-Basenpaarung wird unter Beteiligung der Hoogsteen- und Watson-Crick-Flächen der Adenine durch vier Wasserstoffbrücken vermittelt. Diese Wechselwirkungen führen zur Bildung einer parallelen Doppelhelix, deren Basen senkrecht zur Helixachse orientiert sind (Abbildung 1B). Die asymmetrische Einheit des Kristalls enthält eine parallele (rA)<sub>11</sub>-Doppelhelix mit zehn Basenpaaren und einem Überhangnukleotid an jedem Ende. Diese endständigen Nukleotide bilden Basenpaare, die zu fortlaufenden Doppelhelices führen (Abbildung 1D; Abbildung S1 der Hintergrundinformationen (SI)).

Poly(rA) hat (im Unterschied zu antiparallelen Doppelhelices, die große und kleine Furchen enthalten) gleich große Furchen. Der glycosidische Winkel ist *trans* (187°), die Zuckerpucker-Konformation ist 3'-*endo* mit einem mittleren Pseudorotations-Phasenwinkel *P* von 10.7° und einem maximalen Torsionswinkel ( $\nu_{\max}$ ) von 43.5° (Abbildung 2). Die Ganghöhe von 30 Å umfasst acht Basenpaare, und der An-

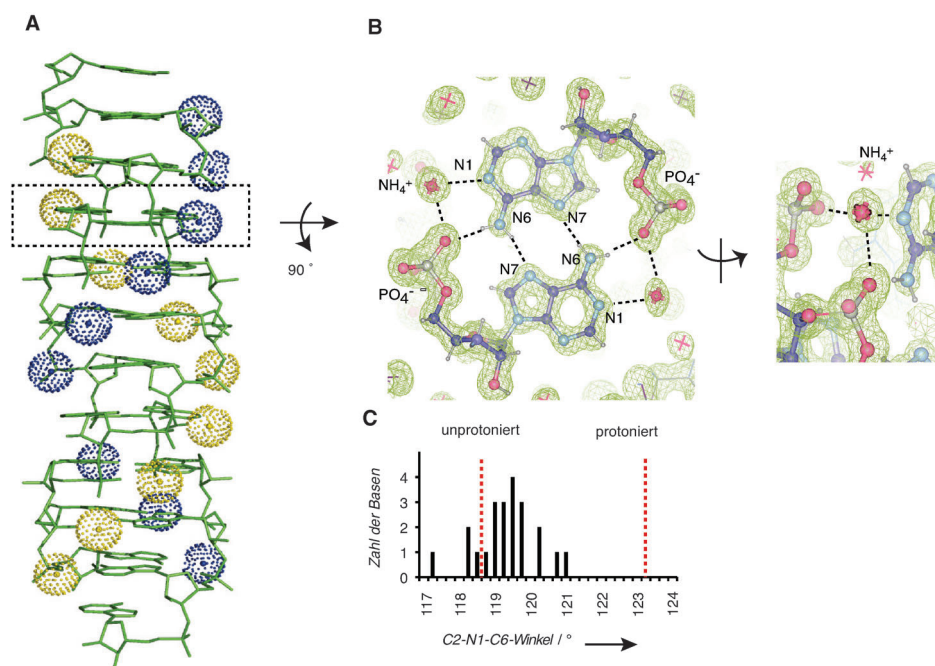


**Abbildung 2.** Basenpaare und helikale Eigenschaften der parallelen (rA)<sub>11</sub>-Doppelhelix. A), B) Verteilung und Mittelwerte (gefüllte Ellipsen) der Basenpaar- und Helix-Parameter in der Kristallstruktur. C) Pseudorotationsphase und glycosidische Torsionswinkel.

stieg pro Basenpaar beträgt 3.7 Å (Abbildung 2). Die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Hauptketten-Phosphatgruppe und der Adeninbase drängt die erstere zur helikalen Hauptachse hin und führt so zu einer kompakten Doppelhelixstruktur (Abbildung 1C), die mit den Faserbeugungsdaten<sup>[9]</sup> übereinstimmt. Um die Struktur zu bestätigen, wurde die anomale Dichte der Phosphoratome mit dem Programm AnoDe<sup>[16]</sup> anhand eines 1.9-Å-Datensatzes von einem einzelnen (rA)<sub>11</sub>-Kristall bestimmt. Eine derartige Dichte wird aus den gemessenen anomalen Differenzen und Phasen, die um 90° von den Modellphasen verschoben sind, berechnet. Die anomale Dichte stimmt mit den Phosphoratomenlagen des ab initio bestimmten Strukturmodells gut überein (Abbildung S2 (SI)). Da dieses Verfahren frei von „model bias“ ist, dient es als unabhängiger Beleg der Richtigkeit der Struktur.

Die Stabilität der Doppelhelix hängt von der Positionierung der negativ geladenen Phosphatgruppen nahe der Hauptachse ab, die die Bildung von Wasserstoffbrücken mit den Adenin-Aminogruppen ermöglicht (Abbildung 1). Rich et al.<sup>[9]</sup> haben anhand der Ordnung der Fasern bei pH 4 vorgeschlagen, dass eine Protonierung an N1 erforderlich sei, um die Ladung der Phosphatgruppen auszugleichen.

Allerdings wurden unsere Kristalle bei pH 7 gezüchtet. An 18 Nukleotiden konnten wir eine hohe Dichte für ein Molekül oder Ion beobachten, das in einer optimalen Lage wäre, um drei Wasserstoffbrücken zu bilden: eine zum Purin-Stickstoffatom N1 desselben Nukleotids, eine zu dessen Phosphatgruppe sowie eine zur Phosphatgruppe des vorhergehenden Nukleotids (Abbildung 3A,B). Die niedrigen Temperaturfaktoren dieser Moleküle (bis hinab zu 13.5 Å<sup>2</sup>)



**Abbildung 3.** In Gegenwart von Ammoniumionen bilden neutrale Adenine Homobasenpaare. A) Stab-Darstellung der Doppelhelix mit den gebundenen Ammoniumionen an beiden Strängen als gelb oder blau gepunktete Kugeln; erstellt mit PyMol. B) Darstellung der A-A-Wasserstoffbrücken und der  $2F_o-F_c$ -Dichte bei  $1.3\sigma$  (als Gitternetz) in einer Schicht der  $(rA)_{11}$ -Struktur; erstellt mit Coot.<sup>[16]</sup> Eine rotierte Ansicht derselben Schicht zeigt, dass die Ammoniumionen auch Wasserstoffbrücken mit zwei Phosphatgruppen benachbarter Nukleotide am gleichen Strang bilden. C) Histogramm der 22 C2-N1-C6-Winkel der Struktur. Zum Vergleich werden die Mittelwerte für protonierte und neutrale Adenine gezeigt.

zeigen, dass letztere als integraler Bestandteil der Struktur fest gebunden sind. Aufgrund der Nähe zu den Phosphaten ist es möglich, dass es sich um Ammoniumionen handelt, die in der Mutterlauge in hoher Konzentration vorlagen. Da  $H_2O$  und  $NH_4^+$  effektiv isoelektronisch sind, können sie nicht anhand der Elektronendichte unterschieden werden.

Eine genaue Bestimmung der Winkel und Abstände in den Adeninringen belegt das Fehlen einer Ringprotonierung: Hochaufgelöste kristallographische Untersuchungen an Adenin-Nukleosiden haben gezeigt, dass der interne Winkel am Stickstoff größer ist ( $121.9^\circ$ – $124.1^\circ$ ), wenn N1 protoniert ist, und kleiner ( $117.7^\circ$ – $120.8^\circ$ ), wenn dies nicht der Fall ist.<sup>[17]</sup> Um die C2-N1-C6-Winkel zu bestimmen, wurde die Struktur in SHELXL mit abgeschwächten Restraints verfeinert, und die Winkel wurden mit den so generierten Koordinaten berechnet. Die C2-N1-C6-Winkel in der Doppelhelix waren im Bereich  $117.1^\circ$ – $120.8^\circ$ , mit einem Mittelwert von  $119.2^\circ$  (Abbildung 3C), was darauf hindeutet, dass die Adenine nicht protoniert sind und dass das Atom N1 für Wasserstoffbrücken mit  $NH_4^+$  zur Verfügung steht (Abbildung 3B).

Der Einfluss der  $NH_4^+$ -Konzentration und des pH-Werts auf den Dissoziationspunkt (thermal melting transition,  $T_m$ ) von Poly(rA)-Doppelhelices wurde untersucht (Abbildung 4), um die Voraussetzungen für deren Bildung zu ermitteln. Oberhalb von pH 5.0 und in der Abwesenheit von  $NH_4^+$  konnte die Poly(rA)-Doppelhelix nicht nachgewiesen werden (Abbildung S3 A (SI)). Die Zugabe von  $NH_4^+$  erhöht die Stabilität der Doppelhelix, sodass der Übergang von

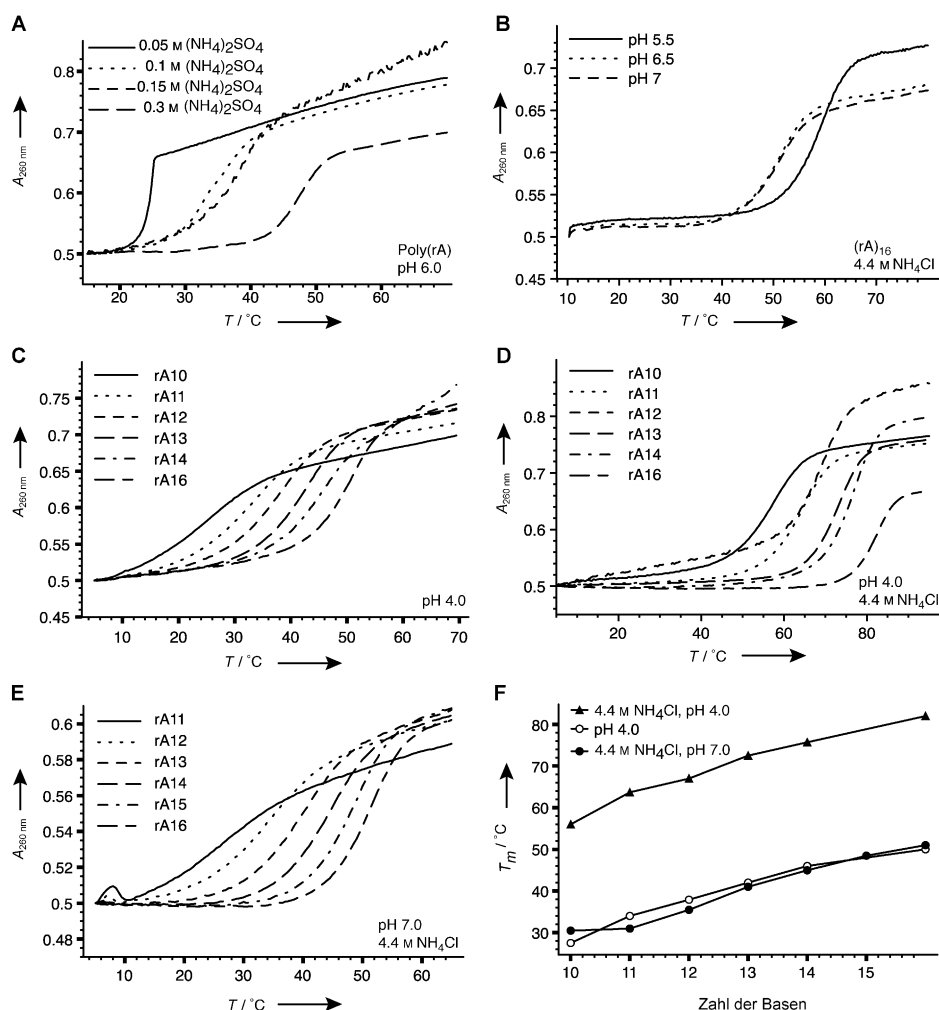
Doppel- zu einfachem Strang (hyperchromatic transition) auch bei physiologischem pH-Wert beobachtet wird (Abbildung S3 B (SI); Abbildung 4). Ein Anstieg der  $NH_4^+$ -Konzentration verbessert die Hitzestabilität der Poly(rA)-Doppelhelix (Abbildung 4 A). Bei niedrigen  $NH_4^+$ -Konzentrationen variiert  $T_m$  der Poly(rA)-Doppelhelix mit dem pH-Wert (Abbildung S3 (SI)), was darauf hindeutet, dass die Protonierung die Stabilität beeinflusst. Bei einer  $NH_4^+$ -Konzentration von 4.4 M ist die Doppelhelix unabhängig vom pH-Wert stabil und kann auch um pH 7 nachgewiesen werden (Abbildung 4 B). Es ist bemerkenswert, dass  $Na^+$  die Doppelhelix nicht stabilisiert (Abbildung S3 D (SI)). Dies bestätigt, dass eine Wasserstoffbrücke zwischen  $NH_4^+$  und N1 essenziell ist, um die A-A-Basenpaare zu stabilisieren.

Durch die Untersuchung von RNA-Oligonukleotiden unterschiedlicher Längen konnten wir zeigen, dass mit zunehmender

Länge die Schmelzpunkttemperatur  $T_m$  der Poly(rA)-Doppelhelix zunimmt, sowohl bei niedrigem pH-Wert ohne  $NH_4^+$  als auch bei mittlerem pH-Wert in der Gegenwart von  $NH_4^+$ -Ionen (Abbildung 4 C–F). Dies belegt, dass die Basenpaarung entlang den Poly(rA)-Stränden bei mittlerem und niedrigem pH kooperativ ist.

Die gegenseitige Kompensierung von pH-Wert und  $NH_4^+$ -Konzentration sowie die Fähigkeit zur kooperativen Stabilisierung der parallelen Poly(A)-Doppelhelix deuten auf einen raschen Wechsel zwischen der hier vorgestellten  $NH_4^+$ -stabilisierten Doppelhelix und der durch  $H^+$  stabilisierten Doppelhelix hin, wie sie von Rich et al. postuliert wurde.<sup>[9]</sup> Die Strukturen sind vermutlich nahezu isoster, mit kleineren Unterschieden durch die Protonierung von N1 und den Austausch der gebundenen  $NH_4^+$ -Ionen mit Wassermolekülen. Unsere 1-Å-Kristallstruktur liefert eine Bestätigung der 1961 postulierten parallelen RNA-Doppelhelix und ist zudem ein neuartiges Strukturmotiv in der supramolekularen Chemie.

In einer frühen RNA-Welt könnten parallele Poly(rA)-Doppelhelices eine wichtige Rolle gespielt haben. Bei Änderungen der Umgebung einer Zelle könnte die Ribozymfunktion durch Doppelhelix-Assoziation reguliert worden sein. Ein Großteil eukaryotischer Messenger-RNAs (mRNAs) trägt 100–250 Adenine an ihren 3'-Enden – und auch heutzutage ist der Poly(rA)-Polymorphismus für zelluläre Prozesse relevant, besonders für die Translation, die Speicherung und den Zerfall von mRNA. Unter zellulärem



**Abbildung 4.** Ammoniumionen stabilisieren die Poly(rA)-Doppelhelix bei physiologischem pH-Wert. A) Die UV-thermische Denaturierung langer Poly(rA)-Doppelhelices bei 260 nm in 50 mM Natriumkodylat (pH 6.0) bei Zugabe von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zeigt einen Anstieg von  $T_m$  bei höherer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration. B) UV-thermische Denaturierung von  $(\text{rA})_{16}$  bei 260 nm in Gegenwart von 4.4 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bei verschiedenen pH-Werten. C) UV-thermische Denaturierung von Adenylat-Oligonucleotiden mit verschiedenen Längen bei pH 4.0; D) bei pH 4.0, in Gegenwart von 4.4 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; und E) bei pH 7.0 in Gegenwart von 4.4 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . F) Schmelztemperaturen, aufgetragen gegen die Länge verschiedener Oligonucleotide. Die Absorbanz der Proben bei 260 nm wurde bei 10°C normiert auf 0.5.

Stress werden intrazelluläre mRNAs in Stressaggregaten („stress granules“) mit einer höheren lokalen Poly(rA)-Konzentration transportiert. Vielleicht sind Proteine wie PABP im Laufe der Evolution auch entstanden, um das Vorkommen von Poly(rA)-Doppelhelices in Zellen zu regulieren.

### Experimentelles

Aufbau, Reinigung und Charakterisierung von RNA-Oligomeren,  $(\text{rA})_n$ , erfolgten wie zuvor beschrieben.<sup>[18]</sup> Poly(rA) (Sigma-Aldrich) ist Polyadenylsäure als Kaliumsalz mit einer mittleren Länge von 500 Nukleotiden. PABP und eIF4G wurden hergestellt wie zuvor beschrieben.<sup>[19]</sup>

UV-thermische Denaturierungsuntersuchungen: 0.5 OD von Poly(rA) wurden lyophilisiert und 10 min in Puffer suspendiert, auf 90°C erwärmt, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und vor den Messungen bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Die Denaturierungs-

kurven wurden bei 260 nm und  $0.5^\circ\text{C min}^{-1}$  mit einem Varian-CARY-Model-3E-Spektrophotometer gemessen. Die Daten wurden entsprechend der Vorschrift von Puglisi und Tinoco analysiert.<sup>[20]</sup>

Kristalle von  $(\text{rA})_{11}$  wurden mit dem Hanging-drop- wie auch mit dem Sitting-drop-Verfahren in einem Tropfen aus 1  $\mu\text{L}$  der äquilibrierten Mischung  $(\text{rA})_{11}$ :RRM1-2:eIF4G-(178-203) in einem 1.5:1:3-Verhältnis (gepuffert in 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH 7.0) und 1  $\mu\text{L}$  2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 M  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  bei 22°C gezüchtet. Die Röntgendaten stammen von Kristallen in einer Gefrierschutzlösung aus 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 M  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 20% (v/v) Glycerol und wurden bei  $-180^\circ\text{C}$  mit einem MarMosaic-CCD-300-Detektor bei Beamline 08ID-1 am CLS (SK, Kanada) und Beamline A1 bei CHESS (Ithaca, USA) gesammelt.

Die Datensätze wurden mit HKL2000<sup>[21]</sup> prozessiert, anomal skaliert und dann gemittelt. Die Struktur wurde mit der Multiprozessor-Version von SHELXD<sup>[13]</sup> gelöst. Das Startmodell wurde mit dem Programm Coot<sup>[14]</sup> angepasst sowie vervollständigt und in mehreren Zyklen mit SHELXL<sup>[13]</sup> anisotrop verfeinert, indem zwei Zeilen zur Instruktionsdatei hinzugefügt wurden: 1) ANIS und 2) ISOR\_HOHO. Die Verfeinerungstatistiken sind in Tabelle 1 angegeben. In der asymmetrischen Einheit der Kristalle befindet sich eine  $(\text{rA})_{11}$ -Doppelhelix mit  $V_m$  von  $1.5 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  und einen Lösungsmittelanteil von 17.7%. Die Struktur wurde mit dem Programm 3DNA<sup>[22]</sup> analysiert.

Eingegangen am 23. April 2013  
Online veröffentlicht am 28. Juni 2013

**Stichwörter:** Helicale Strukturen · Nucleobasen · Parallele Doppelhelix · RNA · Strukturaufklärung

- [1] B. Basham, G. P. Schroth, P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 6464–6468.
- [2] A. H. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature* **1979**, 282, 680–686.
- [3] T. Kobuna, T. Sunami, J. Kondo, A. Takénaka, *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2002**, 179–180.
- [4] E. M. Everts, K. Rippe, T. M. Jovin, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3293–3303.
- [5] K. Rippe, V. Fritsch, E. Westhof, T. M. Jovin, *EMBO J.* **1992**, 11, 3777–3786.
- [6] M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 65–95.
- [7] K. Gehring, J. L. Leroy, M. Guéron, *Nature* **1993**, 363, 561–565.

- [8] F. W. Smith, J. Feigon, *Nature* **1992**, 356, 164–168.
  - [9] A. Rich, D. R. Davies, F. H. C. Crick, J. D. Watson, *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 71–86.
  - [10] N. Pattabiraman, *Biopolymers* **1986**, 25, 1603–1606.
  - [11] K. Kikuchi, Y. Sato, E. C. M. Juan, A. Takénaka, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, 50, 217–218.
  - [12] S. Chakraborty, S. Sharma, P. K. Maiti, Y. Krishnan, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 2810–2817.
  - [13] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2008**, A64, 112–122.
  - [14] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2010**, 66, 486–501.
  - [15] E. Westhof, M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1852–1856.
  - [16] A. Thorn, G. M. Sheldrick, *J. Appl. Crystallogr.* **2011**, 44, 1285–1287.
  - [17] R. Taylor, O. Kennard, *J. Mol. Struct.* **1982**, 78, 1–28.
  - [18] F. P. McManus, Q. Fang, J. D. M. Booth, A. M. Noronha, A. E. Pegg, C. J. Wilds, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4414–4426.
  - [19] N. Safaei, G. Kozlov, A. M. Noronha, J. Xie, C. J. Wilds, K. Gehring, *Mol. Cell* **2012**, 48, 375–386.
  - [20] J. D. Puglisi, I. Tinoco, *Methods Enzymol.* **1989**, 180, 304–325.
  - [21] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.* **1997**, 276, 307–326.
  - [22] X. J. Lu, Z. Shakked, W. . Olson, *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 819–840.
-