

# Biochemie 2010

Andres Jäschke, Ronald Micura, Arnold Grünweller, Roland Hartmann, Mark Helm,  
Wolfgang Liebl, Lars Merkel, Nediljko Budisa, Uschi Sundermann, Susanna Kushnir, Frank Schulz

*Nukleotidmodifikationen: Wertvoll für Grundlagenforschung und therapeutische Anwendung.*

*Synthetische Biologie: Was ist sie, welche Perspektiven hat sie und welche Techniken setzt sie ein?*

*Kombinatorische Biosynthese: Jenseits der Polyketide.*

## Nukleotidmodifikationen

◆ Das auf wenige Bausteine beschränkte chemische Repertoire von Nukleinsäuren wird in der Forschung ständig durch neue Nukleotidmodifikationen bereichert, während aus diversen Organismen ebenfalls ständig über neue Nukleotidmodifikationen berichtet wird. Auch im vergangenen Jahr erweiterte sich so das Repertoire der Einsatzmöglichkeiten von Nukleinsäuren in Chemie und Lebenswissenschaften. Zu den aktuellen Beispielen gehören Photoschalter, post-synthetische Funktionalisierung, RNA-Klick-Chemie und katalytische Nukleinsäuren. Einige Nukleotidmodifikationen haben bereits die eigentliche Grundlagenforschung hinter sich gelassen und befinden sich in Tests für therapeutische Anwendungen.

### Neue photoschaltbare Nukleotidmodifikationen

◆ Licht ist ein leistungsfähiges und breit anwendbares Werkzeug zur Steuerung der Funktion von Biomolekülen. In typischerweise lichtunempfindlichen Molekülen können kleine photoaktive Moleküle Photosensitivität induzieren, die ein optisches Eingangssignal bei-

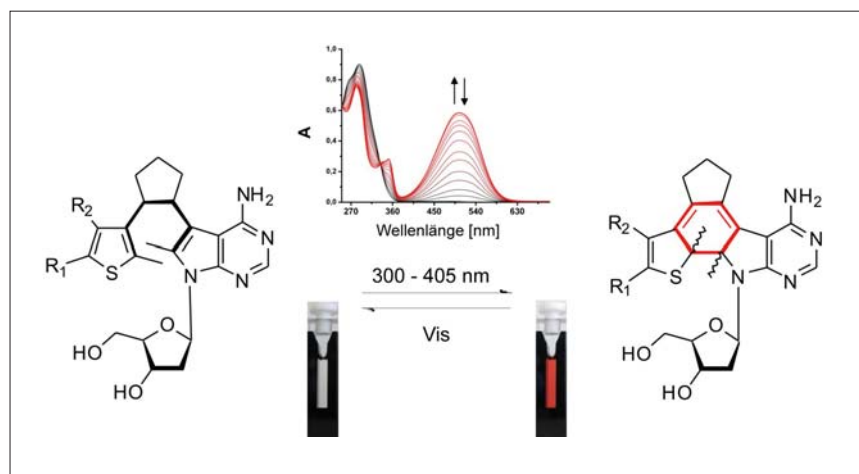


Abb. 1. Reversibel photoschaltbare Nukleoside auf Diarylethen-Basis.

spielsweise durch Photospaltung oder -isomerisierung in ein chemisches oder physikalisches Ausgangssignal umwandeln. Singer und Jäschke entwarfen zu diesem Zweck photochrome Nukleoside, die eine lichtgesteuerte elektrocyclische Reaktion eingehen.<sup>1)</sup> Die Zielverbindungen bestehen aus einer 7-Deazapurineinheit, die über einen 1,2-Cyclopentenyllinker mit einem substituierten Thiophen verknüpft sind. Während der durch kurzwellige UV-Strahlung ausgelösten Ringschlussreaktion entstehen stark gefärbte Isomere, die durch Belichtung im sichtbaren Bereich wieder in die farblosen, ringgeöffneten Formen übergehen (Abbildung 1). Bemerkenswert sind das nahezu quantitative Schaltverhal-

ten, sowie die hohe Reversibilität und Stabilität der Verbindungen. Über die Substituenten sind die Wellenlängen für die Schaltvorgänge steuerbar. So ließ sich ein Paar orthogonaler Schalter generieren, die in derselben Probe unabhängig geschaltet werden konnten. Diese Photoschalter sind viel versprechende Bausteine für die Synthese lichtempfindlicher Nukleinsäuren, z. B. mit katalytischer Aktivität.<sup>2)</sup>

### Postsynthetische Nukleinsäuremodifikationen

◆ Kurze synthetische Oligonukleotide lassen sich recht leicht positionsspezifisch mit Farbstoffen, reaktiven Gruppen oder Peptiden cosynthetisch derivatisieren. Post-

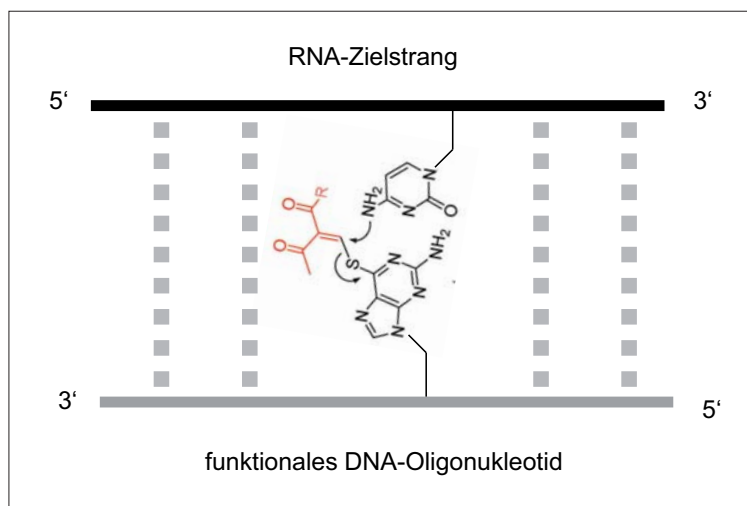


Abb. 2. Prinzip des sequenzspezifischen Funktionalitätstransfers. Gezeigt ist der reaktive Duplex aus funktionalem Oligodesoxynukleotid und RNA-Zielstrang, innerhalb dessen die Funktionalität zielgerichtet auf das Cytidin im RNA Strang übertragen wird.

synthetische Methoden für größere Nukleinsäuren und insbesondere für deren interne Positionen sind dagegen kaum entwickelt. Solche Techniken brächten zellbiologische Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Dynamik von RNA dramatisch voran. Onizuka und Kollegen berichteten über Oligonukleotide mit Funktionalitätstransfer (functionality transfer oligonucleotides), in denen sie die Thiofunktion von 6-Thioguanosin in einem synthetischen DNA-Oligonukleotid zunächst mit einem substituierten Methylendiketon derivatisieren.<sup>3)</sup> Bei Hybridisierung mit einem komplementären RNA-Strang (der auch sehr lang sein kann) greift die exocyclische Aminogruppe des mit dem Thioguanosin paar-

renden Cytidins nukleophil an der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe an, übernimmt diese und eliminiert Thioguanosin als Abgangsgruppe (Abbildung 2). Damit gelingt die positionsspezifische interne Derivatisierung von RNA in brauchbaren Ausbeuten; zunächst allerdings nur in vitro.

Ein anderer Zugang zur Lösung desselben Problems stellten die Arbeitsgruppen Motorin, Weinhold und Helm vor.<sup>4)</sup> Statt der Sequenzspezifität eines Oligonukleotids wurde hier die strukturelle Spezifität eines RNA-bindenden Enzyms zur Zielfindung genutzt. Dieses Enzym, eine RNA-Methyltransferase, kann statt ihres natürlichen Cofaktors S-Adenosylmethionin auch das synthetische Analogon EnYn (Ab-

bildung 3) umsetzen. Sie überträgt dabei statt einer Methylgruppe eine Seitenkette mit einer terminalen Alkinfunktion auf die RNA. Die Alkinfunktion lässt sich anschließend per Klick-Chemie beispielsweise mit einem Farbstoffazid markieren.

### CoMA-Methode: Ribonukleotide zur Analyse von DNA-Enzymen

◆ Desoxyribozyme (DNA-Enzyme) sind synthetische, einzelsträngige DNA-Moleküle, die chemische Umwandlungen mit hoher Selektivität katalysieren.<sup>5)</sup> DNA-Enzyme finden zum Schneiden und Ligieren von RNA-Strängen bis heute neuartige und wichtige Anwendungen, zum Beispiel kürzlich für die Semisynthese von nichthydrolysierbaren 3'-Peptidyl-tRNAs<sup>6)</sup> oder zum Nachweis von tRNA-Nukleosid-Modifikationen.<sup>7)</sup> Umso erstaunlicher ist es daher, dass bisher kein DNA-Enzym strukturell in atomarer Auflösung charakterisiert wurde. Deshalb kommt Methoden zur Identifikation der für die Katalyse entscheidenden Nukleotide besondere Bedeutung zu. Allerdings ist die traditionelle, systematische Deletion und Substitution individueller Nukleotide und die Analyse der Reaktionskinetik vieler separater Desoxyribozym-Mutanten zeit- und arbeitsintensiv.

Höbartner und Mitarbeiter berichteten über einen kombinatorischen Ansatz zur Mutationsinterferenz-Analyse. Die Methode lässt sich generell für die Charakterisierung funktioneller einzelsträngiger DNA einsetzen und eignet sich besonders, um essenzielle Nukleotide in DNA-Enzymen zu identifizieren.<sup>8)</sup> Die kombinatorische Mutationsinterferenz-Analyse (CoMA) erlaubt die gleichzeitige Beurteilung der katalytischen Aktivität aller möglichen Punktmutanten eines Desoxyribozyms. Hierfür werden die Desoxyribozym-Mutanten über Festphasensynthese in vier kombinatorischen Bibliotheken hergestellt. Zur Kodierung der Nukleobasenmutation in der Bibliothek

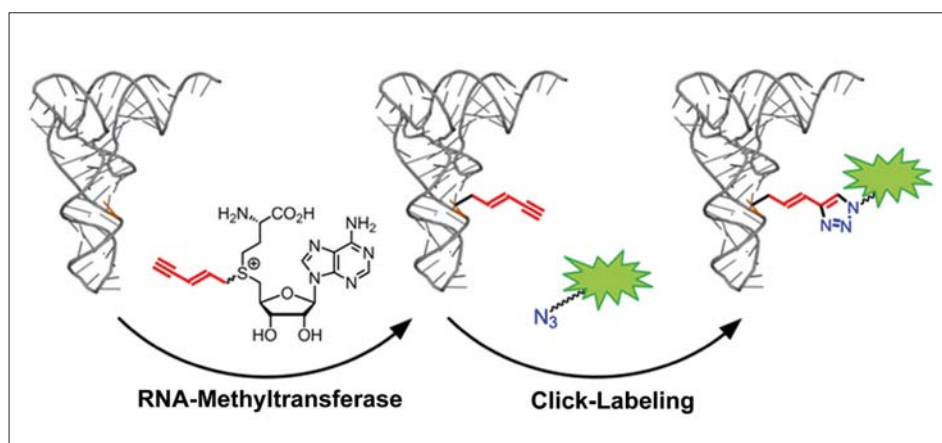


Abb. 3. Prinzip der enzymatischen Alkinylierung von RNA durch das Substratanalogon EnYn (links) und anschließende Konjugation durch  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -catalysierte Azid-Alkin-1,3-Cycloaddition (CuAAC).

dienen die 2'-OH Gruppen von Ribonukleotiden als chemische Markierung. Jede Bibliothek besitzt daher eines der vier Standard-Ribonukleotide statistisch verteilt im katalytischen Bereich. Der CoMA-Arbeitsablauf besteht aus vier Schritten (Abbildung 4):

- Festphasensynthese der vier 2'-OH-kodierten kombinatorischen Mutationsbibliotheken,
- Trennung aktiver und inaktiver Individuen der Bibliothek,
- spezifische Spaltung des Rückgrats an mutierten Stellen durch alkalische Hydrolyse und
- Analyse des Interferenzmusters durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).

So ließen sich beispielsweise die katalytisch essenziellen Nukleotide zweier DNA-Enzyme, eines mit RNA-2'-5'-Lariat- und eines mit RNA-3'-5'-Ligase-Aktivität, in hoch-effizienter Weise identifizieren. Darüber hinaus macht CoMA es möglich, die katalytische Einheit rational zu verkleinern. Bestechend ist die Qualität der experimentellen Daten, welche die Methode liefert, da die alkalische Hydrolyse ausschließlich die 2'-OH-markierten Rückgratpositionen spaltet, während die jeweiligen DNA-Produktstränge unter den verwendeten Bedingungen absolut stabil sind. Die CoMA-Methode besitzt so das Potenzial, in der Charakterisierung von DNA-Enzymen wegweisend zu werden.

### Verbesserte therapeutische Anwendung der RNA-Interferenz

◆ RNA-Interferenz (RNAi) ist ein wirksamer, da katalytischer Weg zur gezielten Inhibierung der Genexpression, an den hohe therapeutische Erwartungen geknüpft werden. Elf Jahre nach der ersten Beschreibung der RNA-Interferenz<sup>9)</sup> und vier Jahre nach der Vergabe des Nobelpreises an Fire und Mello gab es im letzten Jahr bereits über ein Dutzend RNAi-basierte Wirkstoffe in klinischen Phasen der Stufe 2.<sup>10)</sup> Diese zügige Entwicklung geht unter anderem auf eine breite Palette von Nukleotidmodifikationen zurück,

für die es bereits klinische Daten aus vorangegangenen Antisense-basierten Ansätzen gibt. Dementsprechend enthalten therapeutische siRNAs in klinischen Tests derzeit typischerweise Phosphorothioate und 2'-Methoxymodifikationen. Der Einbau neuerer Modifikationen in small interfering RNAs (siRNAs) lieferte auch im vergangenen Jahr wieder Einblicke in den Mechanismus der RNAi.

Ein zentraler Aspekt des RNAi-Mechanismus ist die sequenzspezifische Watson-Crick-Basenpaarung von siRNAs oder micro RNAs (miRNAs) mit der entsprechenden mRNA. Dadurch wird die mRNA entweder endonukleolytisch gespalten und abgebaut (siRNA-Weg), die Translation blockiert oder ein Abbau über Deadenylierung und Decapping in zytoplasmatischen Processing (P)-Bodies induziert (miRNA-

Wege). RNAi kann mRNAs, die übermäßig stark exprimiert werden und dadurch Krankheiten verursachen (z.B. Krebs, Stoffwechselerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen), gezielt blockieren oder durch Abbau ausschalten. Das gleiche Therapieprinzip ist anwendbar, wenn fremdes genetisches Material (z.B. Viren) in den Organismus eindringt. Die RNAi-Effektormoleküle sind siRNAs, kleine doppelsträngige RNA-Moleküle mit einem üblicherweise zwei Nukleotide langen 3'-Überhang an beiden Helixenden. Einer der beiden Stränge wird dann vom Effektor-Komplex RISC (RNA-induced silencing complex) selektiert, während der andere Strang von der Endonuklease Ago2 gespalten und abgebaut wird. Der selektierte Strang bindet dabei mit RISC an die Ziel-mRNA, wodurch diese ebenfalls von Ago2 gespalten

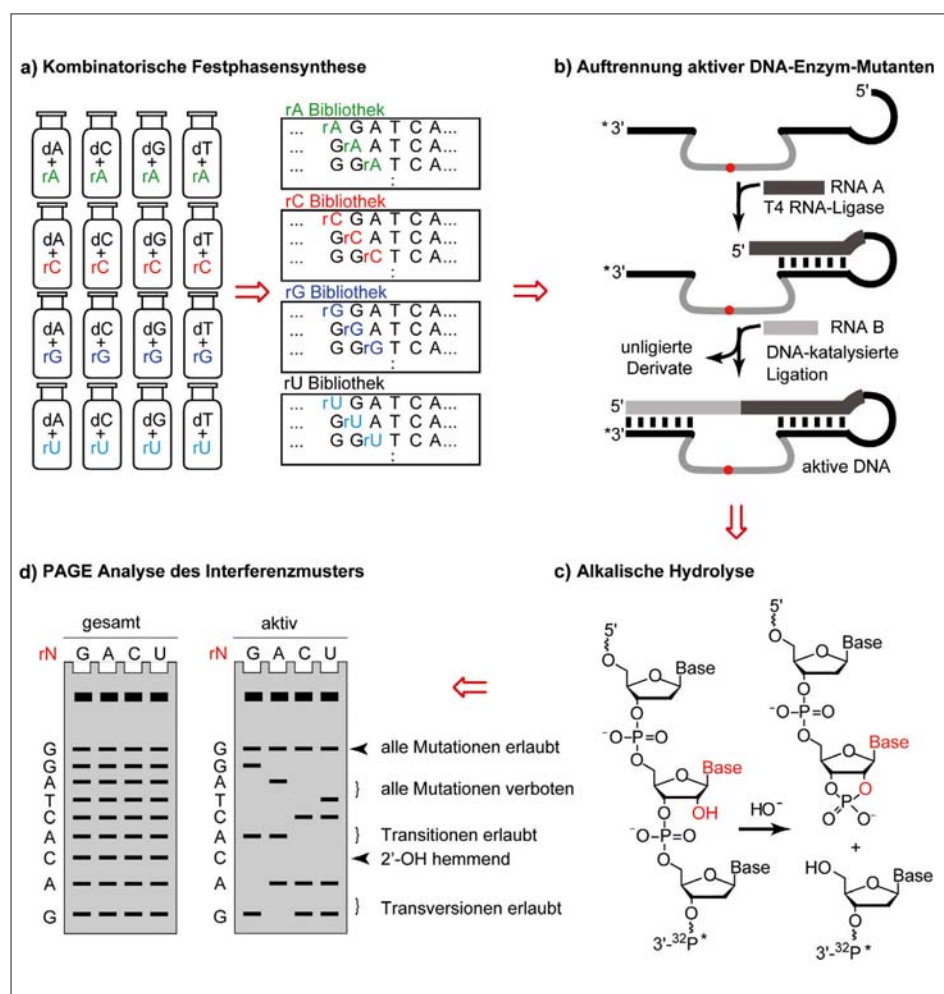
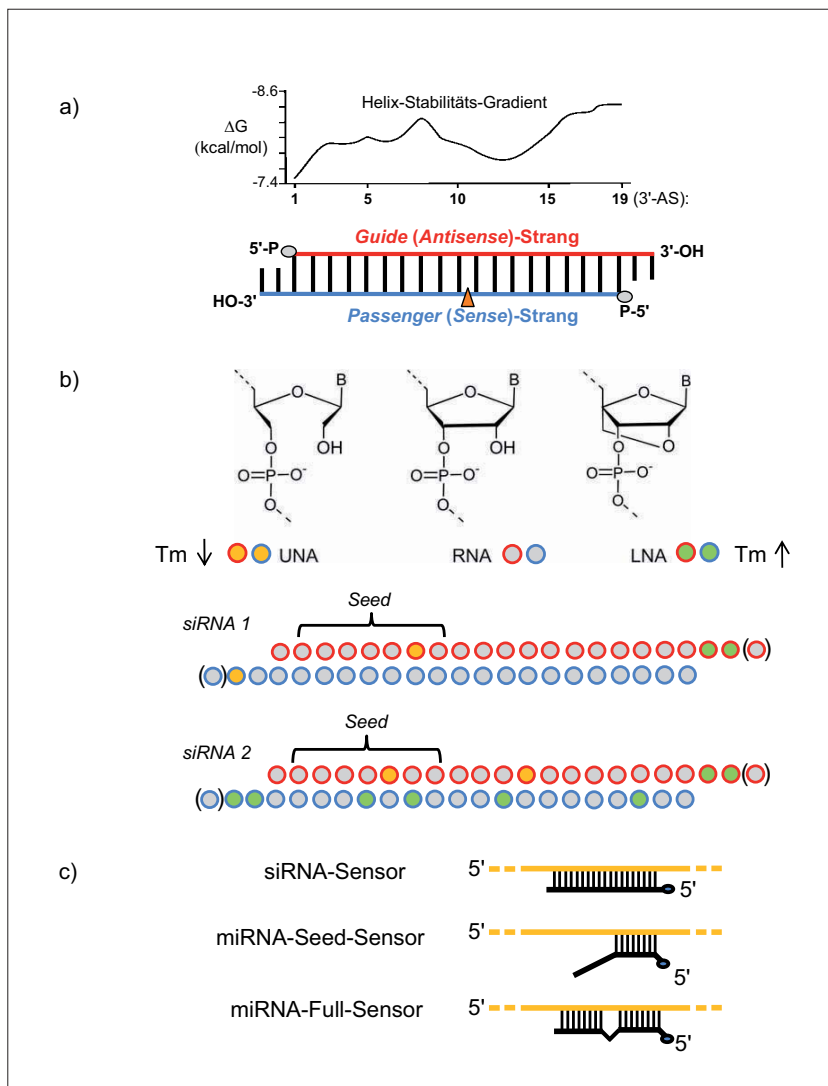


Abb. 4. Arbeitsablauf der kombinatorischen Mutationsinterferenz-Analyse (CoMA) zur Bestimmung funktioneller Nukleotide in Desoxyribozymen. (adaptiert nach Lit. <sup>8)</sup>)



und anschließend weiter abgebaut wird. SiRNAs werden nun so konzipiert, dass Risc überwiegend den zur Ziel-mRNA komplementären Strang selektiert. Dieser wird als Guide- oder Antisense-Strang bezeichnet, der andere Strang heißt Passenger- oder Sense-Strang. Die Strangauswahl erfolgt hauptsächlich über einen thermodynamischen Gradienten (Abbildung 5a) zwischen den Helixenden der siRNA-Duplex. Wenn die Helixstabilität im 3'-nahen Bereich des Guide-Strangs höher ist als in seinem 5'-Bereich, wird die Selektion des Guide-Strangs begünstigt.<sup>11)</sup>

Nukleotidmodifikationen werden zurzeit verstärkt dazu eingesetzt, Probleme beim therapeutischen Einsatz von siRNAs im Menschen zu entschärfen. Dazu gehört neben dem schnellen Abbau unmodifizierter siRNAs in körpereigenen Flüssigkeiten wie Blut vor allem das Problem der unspezifischen Off-Target-Effekte (zu unterscheiden von den gewünschten On-Target-Effekten). Gründe für Off-Target-Effekte sind neben einer siRNA-vermittelten Induktion des Immunsystems die unspezifische Herunterregulation von Genen. Eine Ursache hierfür liegt darin, dass in unseren Zellen auch endogene miRNAs die RNAi-Maschinerie zur Genregulation nutzen. Die Basenpaarung von miRNAs mit einer Ziel-mRNA wird dabei im Wesentlichen über eine Seed-Region (Nukleotide 2 bis 8 der miRNA, gezählt vom 5'-Ende) hergestellt. SiRNAs können miRNA-ähnliche Effekte hervorrufen, indem sie unspezifisch mit solchen miRNA-Seeds eine kurze Basenpaarung eingehen.

Ein wichtiges Problem bei der Applikation von siRNAs ist die geringe Bioverfügbarkeit, da die Nieren siRNA sehr schnell wieder ausscheiden (renale Clearance). Aus pharmazeutischer Sicht gab es kürzlich zwei Durchbrüche bei RNAi-basierten Wirkstoffen: die erste erfolgreiche Applikation von oral verfügbaren siRNAs<sup>12)</sup> und den ersten RNAi-Effekt im Menschen,

der auf systemische Verabreichung von siRNA-Formulierungen in Nanopartikeln zurückgeht.<sup>13)</sup>

Normalerweise nehmen Zellen siRNAs aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen nicht spontan auf. Auch hier gibt es mittlerweile diverse Strategien, um die Aufnahme von siRNAs in Zellen zu steigern, unter anderem Nukleotidmodifikation (darunter locked nucleic acids, LNAs, Abbildung 5b). Die Verwendung von Cholesterolkonjugaten, die Transport und zelluläre Aufnahme verbessern, ist eine bekannte Strategie, die kürzlich um eine Disulfid-Strategie erweitert wurde (siehe unten). Chen und Kollegen zeigten am Beispiel von Zellen des zentralen Nervensystems einen erhöhten RNAi-Effekt Cholesterolkonjugatierter siRNAs gegenüber konventionellen siRNAs, die nur Phosphorothioate und 2'-Methoxymodifikationen enthielten. Die Einführung einer Disulfidbrücke zwischen siRNA und Cholesterol, um die siRNA im reduktiven Milieu der Zelle freizusetzen, erhöhte den RNAi-Effekt noch einmal deutlich.<sup>14)</sup>

Trotz deutlicher Fortschritte gab es bisher kaum Modifikationen oder Modifikationskombinationen, die alle Aspekte der therapeutischen Anwendung von siRNAs verbessern. So geht z.B. eine erhöhte Duplex-Stabilität meist mit einer geringeren Wirksamkeit der siRNAs einher.

Drei Publikationen aus dem Labor von Jørgen Kjems untersuchten den Einfluss von Unlocked-Nucleic-Acids(UNA)- und Locked-Nucleic-Acids(LNA)-Modifikationen (Abbildung 5b) auf die Wirksamkeit von siRNAs in vitro und in vivo.<sup>15)</sup> Hier lag ein besonderer Fokus auf Nukleinsäure-Modifikationen, die unspezifische Off-Target-Effekte verringerten. Dabei stellte sich heraus, dass singuläre positionsspezifische UNA-Modifikationen diese Eigenschaft mit sich bringen. UNA-Modifikationen destabilisieren Hybridhelices zwischen einer Ziel-RNA und einer Effektor-RNA (siRNA oder miRNA) um 5 bis 8°C pro UNA-Baustein. Im Gegensatz

dazu wirken LNA-Modifikationen helixstabilisierend.<sup>16)</sup>

Wie gelang es nun, die Off-Target-Effekte von siRNAs durch die Einführung von UNA-Modifikationen zu reduzieren? Der Schlüssel hierfür liegt in der Seed-Region des Guide-Strangs. Dieser Bereich, der für die Interaktion mit der Ziel-mRNA unabdingbar ist, steht allerdings auch im Verdacht, die meisten unspezifischen Effekte auszulösen, indem es zu Basenpaarungen mit miRNA-Seeds in anderen mRNAs kommt. Jesper Bramsen aus der Gruppe von Jørgen Kjems testete deshalb systematisch positionsspezifische UNA-Modifikationen in der Seed-Region von siRNAs auf verringerte Off-Target-Effekte; letztere wurden anhand einer Reporter-mRNA mit Seed-Bindungsstellen

evaluiert (Abbildung 5c, miRNA-Seed-Sensor und miRNA-Full-Sensor).

Eine UNA-Modifikation – optimal geschieht diese an Position 7 der Seed-Region – verringerte Off-Target-Effekte stark, ohne dass die Knock-down-Effizienz für die spezifische Ziel-mRNA beeinträchtigt wurde.<sup>15b)</sup> Zudem erhöhte sich die Vitalität der Zellen. Das Ergebnis impliziert, dass die durch den UNA-Rest vermittelte thermodynamische Destabilisierung keinen messbaren Effekt auf die etwa 20 Nukleotide lange Basenpaarung zwischen dem Guide-Strang einer siRNA und der dazu komplementären Ziel-mRNA hat. Allerdings werden die kürzeren miRNA-typischen Basenpaarungen empfindlich destabilisiert. →

**Für Neugierige:**

## Der GDCh-Newsletter

**Über 7500  
Abonnenten!**



Nützliche  
Informationen  
aktuell im  
2-Wochen-Rhythmus.

**Lesen und bestellen Sie den Newsletter hier:**  
[www.gdch.de/newsletter](http://www.gdch.de/newsletter)

**Andres Jäschke**, Jahrgang 1962, ist seit dem Jahr 2002 Lehrstuhlinhaber für pharmazeutische Chemie an der Universität Heidelberg. Er studierte Chemie an der HU Berlin und promovierte dort 1993 bei Dieter Cech. Von 1993 bis 1995 war er Postdoktorand bei Alexander Rich am MIT. 2000 habilitierte er sich an der FU Berlin in bioorganischer Chemie. Seine Forschungsinteressen umfassen katalytische und regulatorische Nucleinsäuren, molekulare Schalter sowie Hybridkatalysatoren.



**Ronald Micura**, Jahrgang 1970, ist seit dem Jahr 2004 Professor für organische Chemie an der Universität Innsbruck. Er studierte Wirtschaftsingenieurwesen/Technische Chemie an der Universität Linz, wo er 1995 promovierte. Nach einem Postdocaufenthalt von 1996 bis 1998 an der ETH Zürich und am Scripps Research Institute habilitierte er sich im Jahr 2002 an der Universität Innsbruck in organischer Chemie. Sein Forschungsgebiet ist die chemische Biologie von Nukleinsäuren.



**Roland K. Hartmann**, Jahrgang 1956, ist seit dem Jahr 2003 C4-Professor am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg. Er studierte Biochemie an der FU Berlin. Nach Promotion und Habilitation (1993) am Fachbereich Chemie der FU Berlin wechselte er 1995 an das Institut für Biochemie der Universität Lübeck. Seine Forschungsinteressen sind katalytischer und regulatorischer RNA-Moleküle.



**Arnold Grünweller**, Jahrgang 1964, ist seit dem Jahr 2004 Akademischer Oberrat in der Arbeitsgruppe Hartmann an der Universität Marburg. Er studierte Biologie an der Universität Gießen. Nach seiner Promotion 1997 an der Universität Lübeck im Institut für medizinische Molekularbiologie arbeitete er als Postdoc am MPI für Molekulare Genetik in Berlin und am Institut für Biochemie der FU Berlin. Seine Forschungsinteressen liegen in den Bereichen regulatorischer RNA-Moleküle, modifizierter Nukleinsäuren und Regulation der Chromatinstruktur.



**Mark Helm**, Jahrgang 1969, ist seit dem Jahr 2009 Professor für pharmazeutische/medizinische Chemie an der Universität Mainz. Er promovierte 1999 in Molekularbiologie an der Universität Straßburg. Es folgten Postdoktorate am California Institute of Technology und an der FU Berlin. Danach war er Forschungsgruppenleiter in der Abteilung Chemie am Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, wo er sich 2008 in den Fächern pharmazeutische Chemie und Biochemie habilitierte. Seine Forschungsgebiete: Struktur- und Funktionsdynamik von RNAs, Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von siRNA-Ribonukleotidmodifikationen, RNA-Biokonjugate.



Eine zweite Ursache für Off-Target-Effekte liegt in der Selektion des Passenger-Strangs anstelle des Guide-Strangs durch RISC. Auch dadurch können ungewollt andere Ziel-mRNAs mit partieller Komplementarität zum Passenger-Strang gehemmt werden. Dass der Guide-Strang bevorzugt ist, lässt sich ebenfalls durch die Positionierung von LNA- und UNA-Modifikationen in den 3'-Überhängen der siRNA-Duplexe erreichen. Als günstig erwies sich der Einbau von zwei LNA-Resten in den 3'-Überhang des Guide-Strangs sowie eines singulären UNA-Rests in den 3'-Überhang des Passenger-Strangs (Abbildung 5b; siRNA 1). Die Modifikationen in den 3'-Überhängen erhöhen zudem die Biostabilität der siRNA-Duplexe.<sup>15a,b)</sup>

Multiple LNA-Modifikationen im Passenger-Strang eignen sich dazu, die Biostabilität und zelluläre Aufnahme nackter siRNAs zu verbessern, können jedoch die Entwindung des siRNA-Duplex durch RISC und damit den RNAi-Effekt verschlechtern. Kjems und Mitarbeiter zeigten, dass sich der Knock-down mit stärker LNA-modifizierten siRNAs verbessert, wenn zwei destabilisierende UNA-Modifikationen im Guide-Strang positioniert werden (Abbildung 5b, siRNA 2).<sup>15c)</sup>

Schließlich zeigte ein siRNA-Duplex mit je einer UNA-Modifikation in den 3'-Überhängen gegenüber einer unmodifizierten siRNA-Kontrolle eine deutlich verbesserte Biostabilität und Knock-down-Effizienz in einem Xenograft-Mausmodell eines humanen Bauchspeicheldrüsentumors.<sup>15a)</sup>

Mit LNA- und UNA-Modifikationen stehen also Stellschrauben zur Verfügung, welche die Eigenschaften von siRNAs bezüglich Selektivität, Effizienz, Biostabilität und Zellaufnahme verbessern und feinjustieren können. Dies ist ein wichtiger Schritt, um siRNAs für therapeutische Anwendungen zu optimieren.

## Literatur

- 1) M. Singer, A. Jäschke, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 8372.
- 2) A. Nierth, M. Singer, A. Jäschke, Chem. Commun. 2010, 46, 7975.
- 3) K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, Bioconjug. Chem. 2009, 20, 799.
- 4) Y. Motorin, J. Burhenne, R. Teimer, K. Koyunov, S. Willnow, E. Weinhold, M. Helm, Nucleic Acids Res. 2010, doi: 10.1093/nar/gkq825.
- 5) S. K. Silverman, Angew. Chem. 2010, 122, 7336.
- 6) a) D. Graber, H. Moroder, J. Steger, K. Trapp, N. Polacek, R. Micura, Nucleic Acids Res. 2010, 38, 6796; b) J. Steger, D. Graber, H. Moroder, A. S. Geiermann, M. Aigner, R. Micura, Angew. Chem. 2010, 122, 7632.
- 7) M. Hengesbach, M. Meusburger, F. Lyko, M. Helm, RNA 2008, 14, 180.
- 8) F. Wachowius, F. Javadi-Zarnaghi, C. Höbartner, Angew. Chem. 2010, 122, 8682.
- 9) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, Nature 1998, 391, 806–11.
- 10) A. K. Vaishnav, J. Gollub, C. Gamba-Vitalo, R. Hutabarat, D. Sah, R. Meyers, T. de Fougerolles, J. Maraganore, Silence 2010, 1, 14.
- 11) M. R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz, Ann. Rev. Biochem. 2010, 79, 351.
- 12) M. Aouadi, G. J. Tesz, S. M. Nicoloso, M. Wang, M. Chouinard, E. Soto, G. R. Ostroff, M. P. Czech, Nature 2009, 458, 1180.
- 13) M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, Nature 2010, 464, 1067.
- 14) Q. Chen, D. Butler, W. Querbes, R. K. Pandey, P. Ge, M. A. Maier, L. Zhang, K. G. Rajeev, L. Nechev, V. Kotlianski, M. Manoharan, D. W. Sah, J. Control Release 2010, 144, 227.
- 15) a) M. B. Laursen, M. M. Pakula, S. Gao, K. Fluiter, O. R. Mook, F. Baas, N. Langkjaer, S. L. Wengel, J. Wengel, J. Kjems, J. B. Bramsen, Mol. Biosyst. 2010, 6, 862; b) J. B. Bramsen, M. M. Pakula, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, D. Odadzic, R. Smicius, S. L. Wengel, J. Chattopadhyaya, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems, Nucleic Acids Res. 2010, 38, 5761; c) J. B. Bramsen, M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, B. R. Babu, T. Hojland, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Odadzic, R. Smicius, J. Haas, C. Andree, J. Barman, M. Wenska, P. Srivastava, C. Zhou, D. Honcharenko, S. Hess, E. Muller, G. V. Bobkov, S. N. Mikhailov, E. Fava, T. F. Meyer, J. Chattopadhyaya, M. Zerial, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems, Nucleic Acids Res. 2009, 37, 2867.
- 16) A. Grünweller, R. K. Hartmann, BioDrugs 2007, 21, 235.
- 17) A. Khvorov, A. Reynolds, S. D. Jayasena, Cell 2003, 115, 209.