

Modulation der pri-miRNA-Reifung durch ein die apikale Schleife bindendes Aptamer**

Christina E. Lünse, Gracjan Michlewski, Christine S. Hopp, Andrea Rentmeister, Javier F. Cáceres, Michael Famulok* und Günter Mayer*

MikroRNAs (miRNAs) sind kurze nichtkodierende RNAs, die komplementäre Basen auf ihrer Ziel-mRNA erkennen und dadurch entweder zu einer Inhibition der Translationsinitiation führen oder zum Abbau der mRNA.^[1,2] MikroRNAs haben einzigartige Expressionsmuster und sind an fast jedem wichtigen biologischen Prozess beteiligt, einschließlich der Zellproliferation und -differenzierung und der Apoptose.^[3] Demnach ist die Fehlregulation der miRNA-Expressionsmuster entscheidend für den Anfang und den Verlauf der Tumorbildung.^[4,5]

Nach der Herstellung des primären Transkripts (der pri-miRNA) umfasst der Reifungsprozess von miRNAs mehrere Schritte.^[6] Zuerst wird die pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex, der aus Drosha/DGCR8 besteht, hydrolysiert, wodurch haarnadelförmige RNA-Vorstufen (pre-miRNAs) freigesetzt werden. Danach wird die pre-miRNA in das Zytosol exportiert und durch die Typ-III-Ribonuklease Dicer weiterverarbeitet, wobei die ausgereiften miRNAs entstehen.

Aufgrund der herausragenden Rolle von miRNAs in der Regulation der Genexpression wurde nach selektiven Hilfsmitteln gesucht, um direkt an miRNAs angreifen zu können und dadurch deren Biogenese oder Funktion zu beeinflussen. Eine solche Substanzklasse sind kurze 2'-Methoxy-modifizierte Einzelstrang-Oligonukleotide („Antagomirs“).^[7] Antagomirs erkennen miRNAs durch komplementäre Basen, wodurch eine miRNA-mRNA-Assoziation verhindert wird.

Hier stellen wir eine weitere Klasse von „molekularen Werkzeugen“ auf Nukleinsäurebasis vor, die mit der miRNA-Aktivität interferieren, und zwar RNA-Aptamere, die spezifisch die Schleifenregionen der pri-miRNA erkennen und so deren Reifung modulieren.

Aptamere sind kurze Einzelstrang-Nukleinsäuren, die sich in definierte dreidimensionale Strukturen falten und so eine spezifische Zielmolekülerkennung ermöglichen.^[8,9] Aptamere können durch einen In-vitro-Selektionsprozess isoliert werden, wobei bereits eine große Vielfalt an Zielen, beispielsweise Proteine, Zellen, niedermolekulare Verbindungen oder auch Nukleinsäuren, zur Aptameridentifizierung genutzt worden ist. Vor allem für Nukleinsäuren konnte bewiesen werden, dass sich die Aptamer-Ziel-RNA-Wechselwirkung auf aneinander passende dreidimensionale Formen stützt und nicht nur aufgrund bloßer Erkennung von komplementären Basen zustande kommt.^[10–13]

Wir haben untersucht, ob RNA-Aptamere zur spezifischen Beeinflussung der Biogenese einzelner miRNAs genutzt werden können, und beschreiben hier die Isolierung und Charakterisierung eines RNA-Aptamers, das spezifisch an das pri-miRNA-Polycistron 17~18a~19a~20a~19b-1~92 bindet. Wir zeigen, dass das Aptamer unter anderem mit der apikalen Schleife der pri-miR18a wechselwirkt und dadurch die Biogenese aller miRNAs 17-19b-1 innerhalb des Clusters verhindert. Unsere Ergebnisse belegen, dass Aptamere die pri-miRNA-Verarbeitung modulieren können und somit auch als Mittel zur Erforschung dieser Prozesse infrage kommen. Darüber hinaus unterstreicht die Tatsache, dass die miRNA-Reifung durch Bindung an die apikale Schleife beeinflusst wird, die Bedeutung dieser Regionen während der pri-miRNA-Entwicklung.


Um Aptamere zu erhalten, die spezifisch an die pri-miR17~18a~19a~20a~19b-1~92 binden, haben wir ein In-vitro-Selektionsverfahren angewendet, in dem das 791 Nukleotide (nt) lange miRNA-Polycistron, welches die pri-miR17~18a~19a~20a~19b-1 enthält, an seinem 5'-Ende biotinyliert und auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Kügelchen immobilisiert wurde (Abbildung 1).^[14,15] Die Kügelchen wurden mit einer RNA-Bibliothek inkubiert, die eine randomisierte Region mit 25 Nukleotiden aufweist. Um eine Beteiligung der konstanten Regionen der RNA-Bibliothek an der Bindung zur pri-miRNA auszuschließen, wurden diese Regionen durch Hybridisierung zu komplementären Oligodesoxynukleotiden (ODNs) blockiert, sodass die randomisierten Nukleotide in der Lage sind, sich frei zu falten.

Nach dem Entfernen aller nichtgebundenen RNA-Sequenzen wurden die zurückgehaltenen RNAs durch die Zugabe von EDTA eluiert. EDTA setzt bevorzugt solche

[*] C. E. Lünse, C. S. Hopp, Dr. A. Rentmeister,^[†] Prof. M. Famulok, Prof. G. Mayer
Life and Medical Sciences (LIMES), Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-734-809
E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de
gmayer@uni-bonn.de

Dr. G. Michlewski, Dr. J. F. Cáceres
Medical Research Council, Human Genetics Unit
Institute of Genetics and Molecular Medicine
Western General Hospital, Edinburgh EH4 2XU (Großbritannien)
Prof. G. Mayer
Strathclyde Institute of Pharmacy and Biological Sciences
University of Strathclyde
27 Taylor Street, Glasgow G4 0NR (Großbritannien)

[†] Aktuelle Adresse:
Department Chemie, Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Universität Hamburg, 20146 Hamburg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken Nicole Kuhn für technische Unterstützung.
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906919> zu finden.

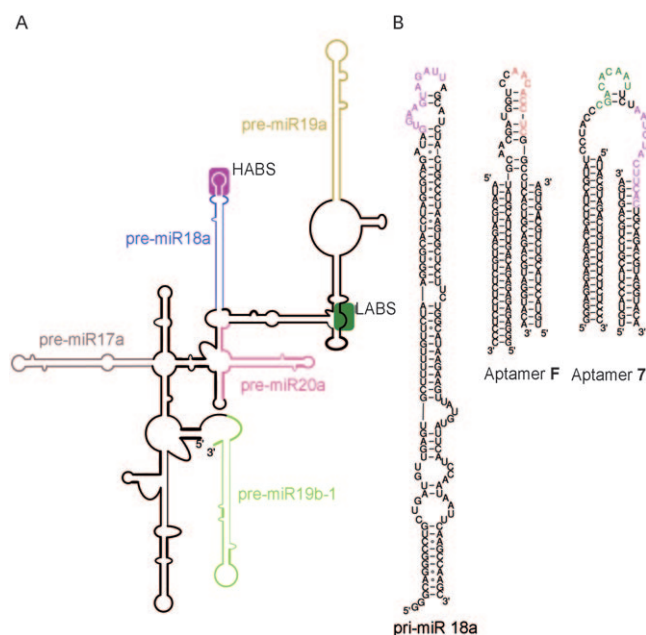


Abbildung 1. A) Sekundärstruktur des pri-miR17~18a~19a~20a~19b-1-Clusters; Farben veranschaulichen die verschiedenen pre-miRNAs. B) Die pri-miR18a sowie die Aptamere 7 und F (einschließlich der hybridisierten Oligonukleotide zur Blockierung der konstanten Regionen). Die hervorgehobenen Nukleotide von F und 7 in (B) binden an die pre-miRNA, die in (A) gezeigt ist. Bereiche der pri-miRNA, die durch das Aptamer 7 gebunden werden, sind in (A) durch farbige Kästen kenntlich gemacht. HABS: hoch-affine Bindungsstelle (magenta); LABS: niedrig-affine Bindungsstelle (grün). Die magentafarbenen Nukleotide der pri-miR18a in (B) wechselwirken mit dem Aptamer 7 mit hoher Affinität.

Moleküle frei, die Mg^{2+} -Ionen für die RNA-Bindung benötigen, nicht hingegen solche, die ausschließlich durch komplementäre Basenpaarung binden.

Nach sieben Selektionszyklen konnte eine verstärkte Bindung an die pri-miRNA beobachtet werden, die dann durch fünf weitere Selektionszyklen noch verbessert werden konnte (Abbildung S1 A). Die RNA-Bibliothek des zwölften Selektionszyklus wurde kloniert und sequenziert. Unter den 17 untersuchten Sequenzen zeigten neun das Konsensusmotiv I (5'-AACACCUC), das komplementär zu einer Region am 5'-Ende des pri-miRNA-Clusters ist (Abbildung S2).

Zwei weitere Motive, Motiv II (5'-AUCGACAC) und Motiv III (5'-CCGCAC), die komplementär zu Regionen außerhalb von für pre-miRNA kodierenden Sequenzen lagen, wurden ebenfalls angereichert (Abbildung S2). Die Sequenz 15 trägt zwei Motive, Motiv I und II. Desweiteren wurden zwei Sequenzen identifiziert, Aptamer 7 und 17, die keines der drei genannten Motive enthalten. Aptamer 7 enthält jedoch eine Sequenz (5'-AUCUAC), die komplementär zur apikalen Schleife von pri-miRNA18a ist, sowie die Sequenz 5'-CGACACAAU, die komplementär zu einer Region zwischen pri-miR19a und pri-miR20a ist (Abbildung 1 und Abbildung S2), was auf zwei mögliche Bindungsstellen hinweist. Aptamer 17 zeigte keine offensichtliche Sequenzkomplementarität zur Ziel-pri-miRNA und wurde nicht weiter untersucht. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Analysen

enthüllten eine Bindung zum pri-miRNA-Cluster mit einer Dissoziationskonstante von 9 nM für Aptamer 7, wobei Aptamer F, vertretend für Motiv I, mit $K_D = 13$ nM bindet (Tabelle 1 und Abbildung S3).

Tabelle 1: Bestimmung von Dissoziationskonstanten von Aptamer 7 in Gegenwart blockierender ODNs mithilfe von Oberflächenplasmonresonanz-Analysen.

pri-miRNA	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	χ^2
pri-miR17~18~19a~20~19b-1	6.4×10^4	1.2×10^{-3}	9×10^{-9}	4
pri-miR18a~19a	2.8×10^4	1.1×10^{-3}	40×10^{-9}	2
pri-miR18a mut~19a	1.7×10^3	5.7×10^{-4}	—[a]	—[a]
pri-miR18a~19a mut	3.3×10^4	1.3×10^{-3}	40×10^{-9}	6

[a] Aufgrund von sehr niedrigen k_d -Werten und einer nicht gesättigten Kurve konnten keine K_D -Werte bestimmt werden.

Die Wechselwirkung von 7 mit der pri-miRNA ist stark von der Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und den zu den konstanten Regionen komplementären ODNs abhängig, entsprechend der Bedingungen, die auch während der Selektion herrschten (Tabelle S1 A). Desweiteren zeigte 7 eine bemerkenswerte, wenngleich 20fach niedrigere Affinität für die isolierte pri-miRNA18a, wohingegen das RNA-Konstrukt pri-miR18a~19a, das beide möglichen Bindungsstellen enthält, eine Dissoziationskonstante von 40 nM aufwies (Tabelle 1).

Die isolierte pri-miRNA19a, die nur die zweite Bindungsstelle enthält, wurde ebenfalls vom Aptamer erkannt, aber die Affinität war beträchtlich niedriger als bei dem pri-miR18a~19a-Konstrukt (Tabelle S1 B). Um die Bindungsstellen von 7 genauer lokalisieren zu können, wurden Bindungsstudien mit der apikalen Schleifendomäne von pri-miR18a sowie von Mutanten von pri-miR18a~19a durchgeführt (Abbildung S4 und S6). Es wurde angenommen, dass die Mutanten der apikalen Schleife, wenn überhaupt, nur einen geringfügigen Einfluss auf die Bildung einer weitläufigeren Stammstruktur haben, was durch computergestützte Sekundärstrukturanalysen bestätigt werden konnte.^[16] Keine der pri-miR18a-Mutanten der apikalen Schleife zeigte eine messbare Wechselwirkung mit Aptamer 7, was darauf hindeutet, dass die Wildtypvariante dieser Schleifenregion in der Tat den Bereich umfasst, mit dem das Aptamer wechselwirkt (Abbildung S3 und S4).

Diese Erkenntnis wird durch SPR-Studien mit einem pri-miR18a~19a-Konstrukt, in dem die zweite potenzielle Bindungsstelle mutiert wurde (pri-miR18a~19a mut), gestützt, welche eine hochaffine Bindung enthüllen (40 nM, Tabelle 1). Dagegen führt eine Mutation der apikalen Schleife von pri-miR18a in miR18a~19a (pri-miR18a mut~19a) zu einem Affinitätsverlust (Tabelle 1). Diese Daten beweisen, dass das Aptamer 7 zwei potenzielle Bindungsstellen enthält: eine hoch-affine Bindungsstelle (HABS) in der apikalen Schleife von pri-miR18a und eine Bindungsstelle mit niedriger Affinität (LABS) in der Region zwischen pri-miR19a und pri-miR20a (Abbildung 1 A).

Diese Ergebnisse wurden durch „Footprinting“-Analysen verifiziert. Hierbei wurde die pri-miR18a mithilfe chemischer

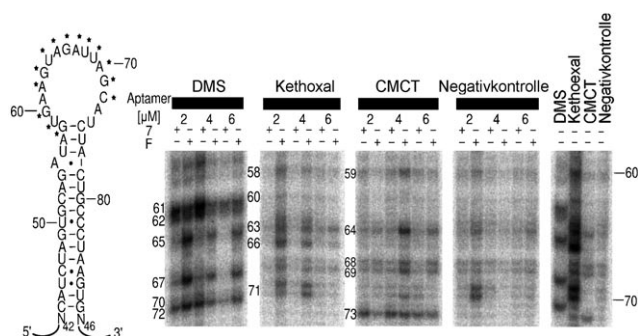


Abbildung 2. „Footprinting“-Analyse der Bindung von Aptamer **7** an pri-miR18a. Die Untersuchung mithilfe chemischer Sonden wurde in Gegenwart von **7** oder **F** zu dargestellten Konzentrationen gemacht. Links: Die apikale Schleifenregion von pri-miR18a. Die Nukleobasen, die durch die Bindung von Aptamer **7** geschützt wurden, sind durch Punkte gekennzeichnet. Mitte: Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie nach der Umsetzung der apikalen Schleifenregion der pri-miR18a mit den chemischen Sonden DMS (Dimethylsulfat), Kethoxal oder CMCT (1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimid-metho-*p*-toluolsulfonat) in Gegenwart steigender Konzentrationen von **7** oder **F** (2 µM, 4 µM und 6 µM). Negativkontrolle: mit Aptameren und ohne Chemikalien. Rechts: Umsetzung mit chemischen Sonden ohne **7** und **F**.

Sonden in An- oder Abwesenheit von Aptamer **7** oder Kontrollaptamer **F** untersucht.^[17] Wie in Abbildung 2 und Abbildung S5 zu sehen, schützt das Aptamer **7** die apikale Schleife vor Modifikation durch die chemischen Sonden, wohingegen **F** keinen solchen Effekt zeigte. Die Daten aus Bindungsanalysen und „Footprinting“ stützten die Schlussfolgerung, dass das Aptamer **7** die apikale Schleife von pri-miR18a erkennt.

In letzter Zeit haben sich Hinweise gehäuft, dass konservierte apikale Schleifen eine wichtige, wenn nicht sogar essenzielle Rolle während der miRNA-Reifung spielen.^[18] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass 2'-Methoxy-modifizierte Oligonukleotide („LooptomiRs“), die vollkommen komplementär zu konservierten terminalen pri-miRNA-Schleifen sind, eine Drosha-vermittelte Verarbeitung von Ziel-miRNAs unterbinden können.

Deshalb haben wir untersucht, ob das Aptamer **7** die Reifung von pri-miRNA18a beeinflusst. Dabei fanden wir heraus, dass **7** die Bildung von pre-miR18a in konzentrationsabhängiger Weise beeinflusst, nicht jedoch die von pri-let-7a-1. Interessanterweise inhibiert die Zugabe dieses Aptamers gleichzeitig die Entstehung von pri-miR17 und pri-miR-19 (Abbildung 3). Dies könnte durch eine Veränderung der zwei- oder dreidimensionalen Struktur des gesamten Clusters zustandekommen, die eventuell durch die zusätzliche Wechselwirkung des Aptamers mit der LABS in der Nähe der pri-miR18a verursacht wird.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das LooptomiR gegen pri-miR18a die Bildung der pre-miR18a verhindert, während die Entstehung von pri-miR17 und pri-miR-19 leicht gesteigert wurde.^[18] Dies deutet darauf hin, dass LooptomiRs und Aptamere wahrscheinlich durch unterschiedliche Mechanismen die miRNA-Reifung beeinflussen.

Es sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Zugabe künstlicher RNAs (Aptamer **F**) eine unspezifische

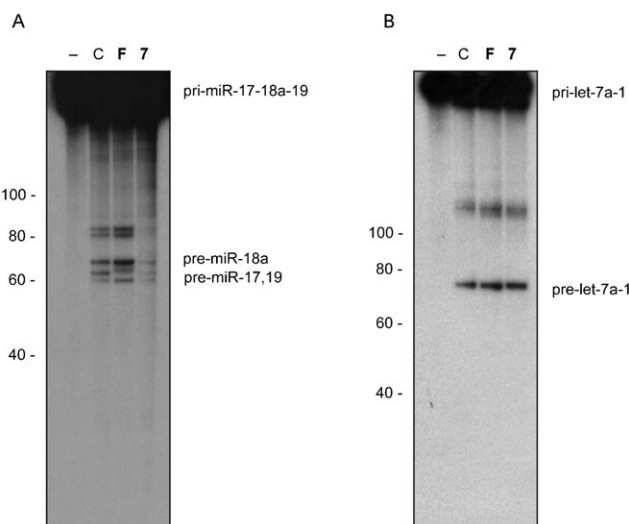


Abbildung 3. A) In-vitro-Reifung von pri-miR-17-18a-19a (pri-miR-17-19). Radioaktiv markierte primäre MikroRNA (100×10^3 cpm) wurde mit HeLa-Zellkernextrakt inkubiert. Inkubation der RNA in Gegenwart des Aptamers **7** oder des Kontrollaptamers **F** (6 µM). Die Spur (–) zeigt die Negativkontrollen ohne Extrakt, und die Spur (C) zeigt die Kontrollreaktion ohne Aptamere, aber mit Zellkernextrakt. Reaktionsprodukte wurden auf einem 8 % Polyacrylamidgel analysiert. Die Zahlen zur Linken zeigen einen RNA-Größenstandard. B) In-vitro-Reifung von pri-let-7a-1. Radioaktiv markierte primäre RNA-Sequenzen (100×10^3 cpm) wurden mit HeLa-Zellkernextrakt inkubiert. Inkubation der RNA mit den Aptameren **7** (6 µM) oder **F** (6 µM). Spur (C) zeigt die Kontrolle mit HeLa-Zellkernextrakt, aber ohne Zugabe von Aptameren. Spur (–) zeigt die Negativkontrolle ohne Extrakt. Die Analysebedingungen sind wie unter (A) beschrieben.

Erhöhung der pri-miRNA-Weiterverarbeitung verursachte (Abbildung 3A). Steigende Konzentrationen an Aptamer **7** bewirkten jedoch eine deutliche Inhibition der miRNA-Entstehung, wohingegen das Kontrollaptamer **F** keine inhibitorische Wirkung zeigte (Abbildung 4). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Effizienz, mit der das Aptamer **7** die pri-miR18a erkennt und die MikroRNA-Entstehung blockiert.

Im Vorfeld wurde gezeigt, dass hnRNP A1 mit der apikalen Schleifendomäne der pri-miR18a assoziiert und dadurch deren Reifung unterstützt.^[18] Um die Einflüsse von Aptamer **7** auf die pri-miRNA-Entwicklung weiter aufzuklären, haben wir untersucht, ob dieses Aptamer mit hnRNP A1 um die Bindung an die apikale Schleifenstruktur konkurrieren kann. RNA-Chromatographie-Experimente enthüllten, dass das Aptamer **7** die Menge des an pri-miR18a gebundenen hnRNP A1 reduziert, wohingegen das Kontrollaptamer **F** fast gar keinen Effekt zeigte (Abbildung 5). Bemerkenswerterweise wurde die Assoziation von hnRNP A1 mit der Kontroll-pri-miRNA pri-let7a-1 nicht durch das Aptamer beeinflusst, was die Spezifität des Aptamers beweist.^[19]

Wir haben ein RNA-Aptamer identifiziert, das hauptsächlich mit der apikalen Schleifenstruktur von pri-miR18a innerhalb des pri-miRNA-Clusters wechselwirkt. Mutations- und „Footprinting“-Analysen sowie RNA-Chromatographie haben die Bindungsstellen für das Aptamer **7** aufgeklärt. Überdies konnte wir zeigen, dass das Aptamer in vitro in die Reifung von miRNA und damit in deren Funktion eingreift, was einen Unterschied zu den bisher beschriebenen Ant-

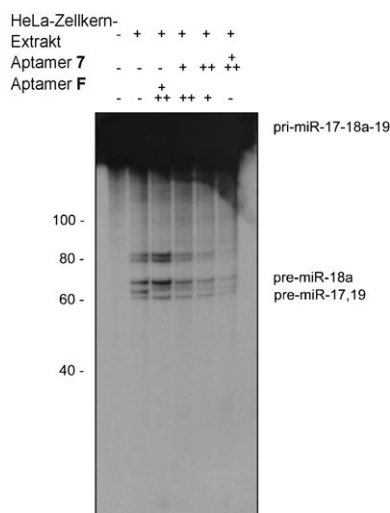


Abbildung 4. In-vitro-Reifung der pri-miR-17-18a-19a (pri-miR-17-19). Radioaktiv markierte primäre MikroRNAs (100×10^3 cpm) wurden in Gegenwart von HeLa-Zellkernextrakten inkubiert. Inkubation der RNA in Gegenwart von Aptamer 7 und Kontrollaptamer F (+: $1.5 \mu\text{M}$, ++: $3 \mu\text{M}$, +++: $6 \mu\text{M}$). Die erste Spur von links zeigt die Negativkontrolle ohne Zugabe von Extrakten. Die zweite Spur zeigt die Kontrollreaktion ohne Aptamere, aber in Gegenwart von Zellkernextrakt. Reaktionsprodukte wurden auf einem 8% Polyacrylamidgel untersucht. Die Zahlen auf der linken Seite bezeichnen den RNA-Größenstandard.

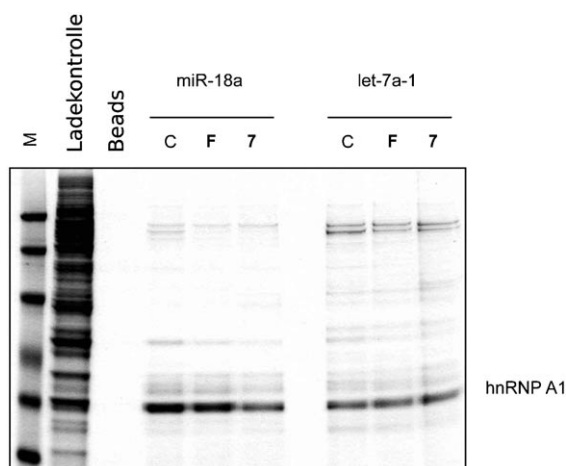


Abbildung 5. Das Aptamer 7 verdrängt hnRNP A1 spezifisch von der terminalen Schleife der miR-18a. RNA-Chromatographie der terminalen Schleifen von pri-miR-18a und pri-let-7a-1 wurde in HeLa-Zellkernextrakten in Gegenwart von Aptamer F ($6 \mu\text{M}$), Aptamer 7 ($6 \mu\text{M}$) oder ohne Aptamer (C) durchgeführt. Die Proben der RNA-Chromatographie wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mithilfe von GelCode-Blue (Pierce) visualisiert. Das hnRNP-A1-Protein wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

agomirs und LooptomiRs darstellt. In dieser Untersuchung wurde erstmalig offengelegt, dass Aptamere als effiziente Hilfsmittel zur Beeinflussung der miRNA-Entwicklung genutzt werden können und dass sie einen Einfluss auf die miRNA-Funktion haben. So eröffnet diese Herangehensweise einen neuen Weg zur Herstellung spezifischer Reagentien, die bei der miRNA-Entwicklung und -Reifung, vor

allem in einem frühen Stadium der miRNA-Entstehung angreifen. Es ist von höchstem Interesse, ob sich die hier in vitro nachgewiesenen Effekte auch in einem komplexen zellulären Umfeld auswirken. Darüber hinaus vermitteln unsere Ergebnisse, dass kleine strukturierte RNA-Motive im Prinzip in der Lage sind, die pri-miRNA-Reifung spezifisch zu modulieren. Zu diesem Zeitpunkt gibt es keinen Grund dafür auszuschließen, dass ein natürliches RNA-Motiv existiert, das die pri-miRNA-Entstehung über einen ähnlichen Mechanismus reguliert. Diese Hypothese versuchen wir zurzeit mithilfe von genomischen SELEX-Experimenten zu stützen.

Eingegangen am 8. Dezember 2009,
veränderte Fassung am 15. Februar 2010

Stichwörter: Aptamere · In-vitro-Selektion · MikroRNA · RNA-Prozessierung · SELEX

- [1] V. Ambros, *Nature* **2004**, 431, 350.
- [2] a) L. He, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, 5, 522; b) R. Garzon, G. A. Calin, C. M. Croce, *Annu. Rev. Med.* **2009**, 60, 167.
- [3] a) D. P. Bartel, *Cell* **2004**, 116, 281; b) B. D. Brown, L. Naldini, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, 10, 578.
- [4] M. S. Kumar, J. Lu, K. L. Mercer, T. R. Golub, T. Jacks, *Nat. Genet.* **2007**, 39, 673.
- [5] L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Nature* **2005**, 435, 828.
- [6] a) J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, V. N. Kim, *Genes Dev.* **2004**, 18, 3016; b) J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs, *Nat. Cell Biol.* **2009**, 11, 228.
- [7] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, 438, 685.
- [8] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 2710; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2672.
- [9] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3715.
- [10] G. Mayer, M. S. Raddatz, J. D. Grunwald, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 563; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 557.
- [11] M. Watrin, E. Dausse, I. Lebars, B. Rayner, A. Bugaut, J. J. Toulme, *Methods Mol. Biol.* **2009**, 535, 79.
- [12] F. Darfeuille, S. Reigadas, J. B. Hansen, H. Orum, C. Di Primo, J. J. Toulme, *Biochemistry* **2006**, 45, 12076.
- [13] a) A. Rentmeister, G. Mayer, N. Kuhn, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 3713; b) A. Rentmeister, G. Mayer, N. Kuhn, M. Famulok, *Biol. Chem.* **2008**, 389, 127–134.
- [14] G. Mayer, M. Famulok, *Methods Mol. Biol.* **2009**, 540, 291.
- [15] a) G. Sengle, A. Jenne, P. S. Arora, B. Seelig, J. S. Nowick, A. Jaschke, M. Famulok, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1317; b) S. Fusz, A. Eisenführ, S. Srivatsan, A. Heckel, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 941–950.
- [16] M. Zuker, P. Stiegler, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 133.
- [17] G. Mayer, B. Wulffen, C. Huber, J. Brockmann, B. Flicke, L. Neumann, D. Hafenbradl, B. M. Kleibl, M. J. Lohse, C. Krasel, M. Blind, *RNA* **2008**, 14, 524.
- [18] G. Michlewski, S. Guil, C. A. Semple, J. F. Caceres, *Mol. Cell* **2008**, 32, 383.
- [19] Diese hochaffinen RNA-RNA-Bindungsmotive könnten zudem als Stützen für DNA-Nanoarchitekturen dienen, ähnlich den kürzlich beschriebenen „kissing loop“-Motiven. Siehe: G. Mayer, D. Ackermann, N. Kuhn, M. Famulok *Angew. Chem.* **2008**, 120, 985; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 971; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 971.