

# Ein intrinsisch 5-Fluor-2'-desoxyuridin beinhaltendes Aptamer für die gezielte Chemotherapie\*\*

Sven Kruspe und Ulrich Hahn\*

**Abstract:** Ein Aptamer, das spezifisch an den Interleukin-6-Rezeptor bindet und intrinsisch mehrere Einheiten des Nukleosidanalogons 5-Fluor-2'-desoxyuridin beinhaltet, ist in der Lage, gezielt einen zytostatischen Effekt auf Zellen auszuüben, die diesen Rezeptor tragen. Das Aptamer kann in einem einzigen enzymatischen Schritt synthetisiert werden und bindet an einen Zelloberflächenrezeptor, der in das Lysosom transportiert wird. Ausschließlich dort in den Zielzellen führt der Abbau durch intrazelluläre Nukleaseen zur Freisetzung des aktivierte Wirkstoffs. Dadurch erfüllt das Aptamer als Prodrug zwei grundlegende Voraussetzungen eines Systems zur gezielten Pharmakotherapie: das spezifische Ansteuern von Zielzellen und die durch einen endogenen Stimulus ausgelöste kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung.

Aptamere sind *in vitro* selektierte Oligonukleotide, die spezifisch an Zielmoleküle wie etwa bestimmte Zelloberflächenrezeptoren binden und daher für therapeutische Ansätze als Werkzeuge zur gezielten Wirkstoff-Freisetzung geeignet sind. Übliche Strategien des aptamerbasierten Wirkstofftransports bedingen meist mehrstufige Synthesen kovalenter oder nichtkovalenter Konjugation des Aptamers mit dem Wirkstoff oder Wirkstoff tragenden Nanomaterialien. Ein wichtiger Aspekt besteht darin, dass Aptamer-Wirkstoff-Konjugate unwirksam bleiben, sofern der Wirkstoff nicht aus einem endozytotischen Vesikel freigesetzt werden kann, oder falls er durch lysosomalen Abbau in einen inaktiven Metaboliten umgesetzt wird. Vielseitige Bemühungen wurden bereits unternommen, um die intrazelluläre Freisetzung typischer Wirkstoffe für die gezielte Therapie (z. B. siRNAs oder Anthracycline) sicherzustellen.<sup>[1]</sup> Ein Schlüssel zu dieser Problematik kann dabei in der sorgfältigen Wahl eines Therapeutikums liegen, das keiner zusätzlichen „Endosomal-escape“-Unterstützung bedarf, im Unterschied zu beispielsweise siRNAs.<sup>[2]</sup>

Therapeutische Nukleosid- oder Nukleobasenanaloga stellen eine Klasse derartiger Wirkstoffe dar.<sup>[3]</sup> Einer dieser Stoffe, 5-Fluoruracil (5-FU), wird seit über fünfzig Jahren als Zytostatikum in der Krebstherapie und zur Behandlung vieler anderer Krankheiten eingesetzt.<sup>[4]</sup> Die Wirksamkeit von 5-FU beruht dabei auf drei Angriffspunkten auf die Vi-

talität oder Proliferation der betroffenen Zellen (Abbildung S1).<sup>[5]</sup> So bewirkt der Einbau von 5-FU-Metaboliten in RNA oder DNA (FUTP oder FdUTP) eine fehlerhafte RNA-Reifung<sup>[6]</sup> beziehungsweise DNA-Strangbrüche.<sup>[7]</sup> Den signifikantesten Einfluss übt 5-FU nach dessen Umsetzung zum Desoxyribonukleotid (FdUMP) aus, das als starker Inhibitor der Thymidylat-Synthase (TS) fungiert, dem Schlüsselenzym der De-novo-Biosynthese des Desoxythymidinmonophosphates (dTTP).<sup>[8]</sup>

Um Nebenwirkungen zu vermeiden, kann 5-FU als Prodrug verabreicht werden, welches nur in bestimmten Zelltypen, z. B. Prostatakrebszellen, in eine aktive Form überführt wird.<sup>[9]</sup> Eine andere Strategie zur Vermeidung der Schädigung von Nicht-Zielzellen stellt der gezielte Wirkstofftransport dar. Derzeit befinden sich Nanopartikel, Nanogele oder Nanopolymere im Fokus des Interesses am aktiven Transport von 5-FU.<sup>[10]</sup> Hier stellen wir die Anwendung eines zellspezifischen zytotoxischen Aptamers vor, das in einer enzymatischen Einschrittreaktion unter Einbau mehrerer Einheiten eines Nukleosidanalogons in ein Zytokinrezeptor-bindendes Aptamer hergestellt werden kann. Die kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung innerhalb der Zielzellen wird durch die intrazelluläre nukleolytische Hydrolyse des Aptamers initiiert. In unserem Ansatz wird der nichtphosphorylierte Vorläufer des FdUMP, 5-Fluor-2'-desoxyuridin (5-FUDR), verwendet und anstelle aller Uridine (30 pro Molekül) in das Aptamer selbst integriert. Wir zeigen, dass eine Exposition der Zielzellen mit diesem modifizierten Aptamer zu Wachstumsemmung und Zelltod führt.

Kürzlich berichteten wir über die Selektion des RNA-Aptamers AIR-3 zur spezifischen Bindung an den humanen Interleukin-6-Rezeptor (hIL-6R) mit einer Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich.<sup>[11]</sup> Nach Bindung an hIL-6R-positive Zellen wird das Aptamer durch Endozytose internalisiert. Diese rezeptorvermittelte Endozytose beruht auf Rezeptor-Recyclingvorgängen. In den meisten Fällen führt der intrazelluläre Stoffwechselweg von ligandgesteuerten Rezeptoren zum lysosomalen Abbau des assoziierten Liganden oder sogar des ganzen Rezeptor-Liganden-Komplexes.<sup>[12]</sup>

Zytotoxische Nukleosid- und Nukleobasenanaloga wie 5-FUDR repräsentieren geeignete Wirkstoffe für die gezielte rezeptorvermittelte Pharmakotherapie, da der erwähnte intrazelluläre Umsatz sich positiv auf deren Wirksamkeit auswirkt. Wir nehmen an, dass der kontrollierten intrazellulären Freisetzung des Wirkstoffs der natürliche Abbau durch lysosomale Nukleaseen zugrunde liegt.<sup>[13]</sup> Aus der Hydrolyse des Aptamers ginge 5-FUDR hervor, welches aus dem Lysosom über aktive Nukleosidtransporter, z. B. ENT3,<sup>[14]</sup> entweichen könnte. Diese dienen normalerweise als Recyclingportale für lysosomal abgebauten Nukleinsäuren (Abbildung 1).

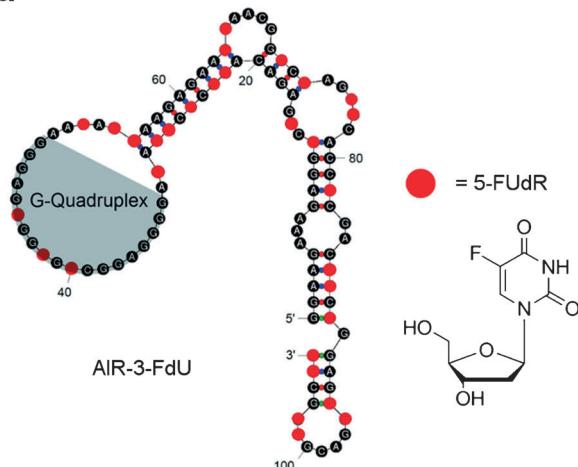
[\*] Dipl.-Chem. S. Kruspe, Prof. Dr. U. Hahn

Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg  
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg (Deutschland)  
E-Mail: uli.hahn@uni-hamburg.de

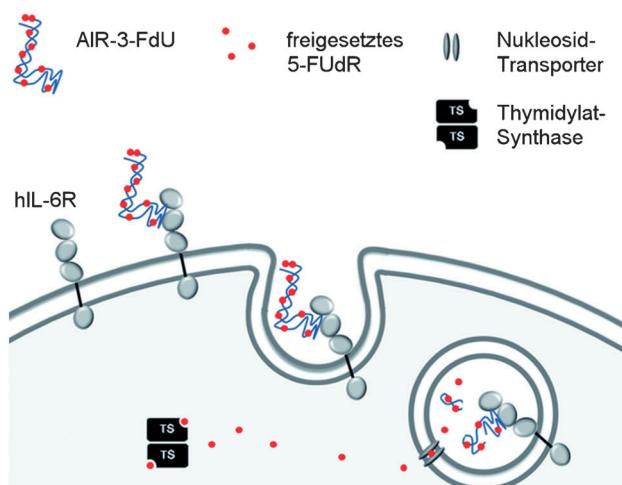
[\*\*] Wir danken Prof. Dr. Andrea Rentmeister für hilfreiche Diskussionen und Kristina Szameit für die Übersetzung ins Deutsche.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201405778> zu finden.

a

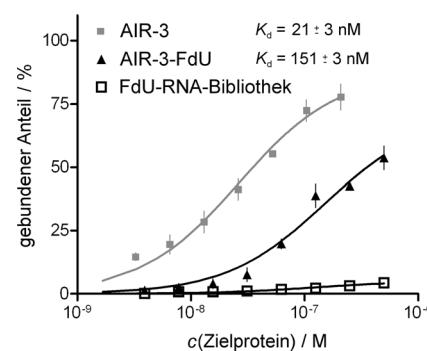


b



**Abbildung 1.** Selektiver Wirkstofftransport durch AIR-3-FdU. a) 2D-Struktur von AIR-3-FdU auf Grundlage der Strukturvorhersage des AIR-3-Templats. Jedes Aptamermolekül enthält 30 5-FUDR-Einheiten. Der grau unterlegte Bereich umfasst das minimale Bindemotiv AIR-3A, das einen G-Quadruplex bildet.<sup>[11]</sup> b) Das 5-FUDR-modifizierte Aptamer (AIR-3-FdU) bindet an den humanen Interleukin-6-Rezeptor an der Zelloberfläche und wird internalisiert. Durch den lysosomalen Abbau des Aptamers wird 5-FUDR frei und durch Phosphorylierung in FdUMP umgesetzt, einen starken Inhibitor der Thymidylat-Synthase (TS), die für die Biosynthese von dTMP und somit auch der DNA verantwortlich ist.

Unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase-Variante Y639F<sup>[15]</sup> stellten wir eine 5-FUDR-modifizierte Variante von AIR-3 her, wobei die Transkription in Gegenwart von 5-FdUTP anstelle von UTP durchgeführt wurde (Abbildung 1a). Das resultierende modifizierte Aptamer AIR-3-FdU wies noch eine effektive und spezifische Bindung an hIL-6R auf, wobei die Affinität ( $K_d = 151 \pm 3$  nM) im Vergleich zum nichtmodifizierten Aptamer ( $K_d = 21 \pm 3$  nM; Abbildung 2) verringert war. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Austausch aller 30 in AIR-3 enthaltenen Uridine gegen 5-FUDR keinen erheblichen Einfluss auf die Tertiärstruktur hat. Da sowohl AIR-3 als auch AIR-3-FdU in vergleichbarer Weise an ihr Zielmolekül binden, ist anzunehmen, dass beide



**Abbildung 2.** Bindungsanalyse von AIR-3-FdU. Die konzentrationsabhängige Bindung von AIR-3-FdU wurde mittels Filterretentionsanalyse ermittelt. Die Affinität des modifizierten Aptamers (Dreiecke) war im Vergleich zu dem nichtmodifizierten Aptamer AIR-3 (graue Quadrate) reduziert. Die 5-FUDR-modifizierte SELEX-Ausgangsbibliothek diente als Negativkontrolle (weiße Quadrate).

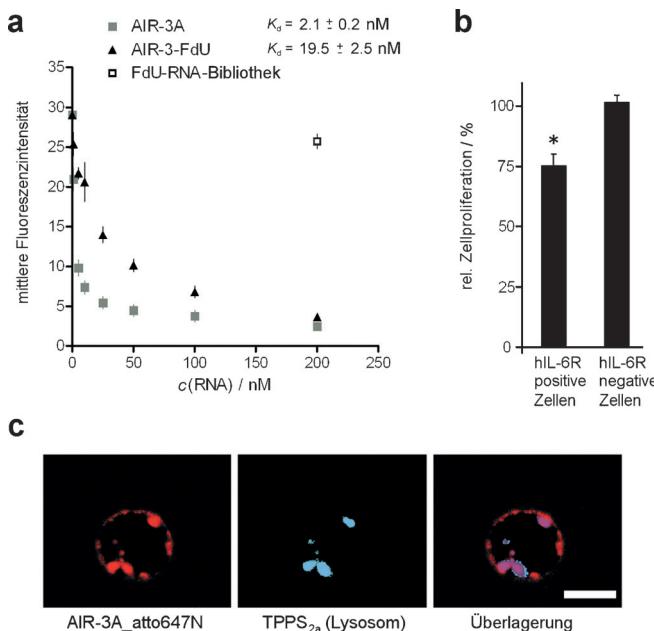
Moleküle übereinstimmende minimale Bindemotive aufweisen, nämlich parallele G-Quadruplexe, die einen Bereich von 19 nt mit nur 3 Uridinen umfassen. In dem Aptamer (106 nt) befinden sich zudem doppelsträngige Regionen, die einen stabilisierenden Stamm mit Ausbuchtungen bilden<sup>[16]</sup> und dadurch die korrekte Faltung dieses G-Quadruplexes unterstützen und den Einbau modifizierter Nukleoside ermöglichen.<sup>[17]</sup>

Die Stammstruktur sollte durch das Nukleosidanalogon 5-FUDR nicht beeinflusst werden, da dieses in der Lage ist, die gleichen Watson-Crick-Basenpaarungen einzugehen wie die ersetzen kanonischen Nukleoside.<sup>[18]</sup> Wir stellten weiterhin eine AIR-3 Variante her, die anstelle von 5-FUDR 5-Fluoruridin (5-FUR) enthielt. Dieses modifizierte Aptamer (AIR-3-FU) wies mit einem  $K_d$  von  $74 \pm 8$  nM (Abbildung S2) ähnliche Bindungseigenschaften wie das Ausgangsaptamer auf. Im Unterschied zu AIR-3-FdU konnte für diese Variante jedoch kein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

Durch konfokale Laserrastermikroskopie (kLSM) konnten wir nachweisen, dass ein wesentlicher Anteil des internalisierten Aptamers zum Lysosom transportiert wird (Abbildung 3c). Dies ergänzt die Ergebnisse vorangegangener Experimente, nach denen AIR-3 sowie die verkürzte Form AIR-3A, an BaF3\_hIL-6R Zellen binden. Vorherige Arbeiten zeigten bereits, dass das Aptamer für die Internalisierung verschiedener Effektoren wie Fluoreszenzfarbstoffe, Proteine oder Photosensibilisatoren nach deren Konjugation mit dem Aptamer geeignet ist.<sup>[19]</sup>

Auch AIR-3-FdU bindet, mit einem  $K_d$  von etwa 20 nM, an BaF3\_hIL-6R Zellen (Abbildung 3a). Nach Exposition mit 250 nM AIR-3-FdU konnten wir bei hIL-6R präsentierenden Zellen einen signifikanten Proliferationsrückgang von 25 % durch Inkubation mit dem FdUR-Aptamer beobachten (Abbildung 3b). Um weiterhin nachzuweisen, dass dieser Effekt nicht durch extrazelluläre Abbauprodukte der RNA bedingt war, wurde ein Kontrollexperiment mit hIL-6R-defizienten BaF3-Zellen durchgeführt. Hier wurde kein Effekt nachgewiesen.

Um festzustellen, ob dieser antiproliferative Effekt auf einen der zuvor genannten Antimetaboliten des 5-FU zu-

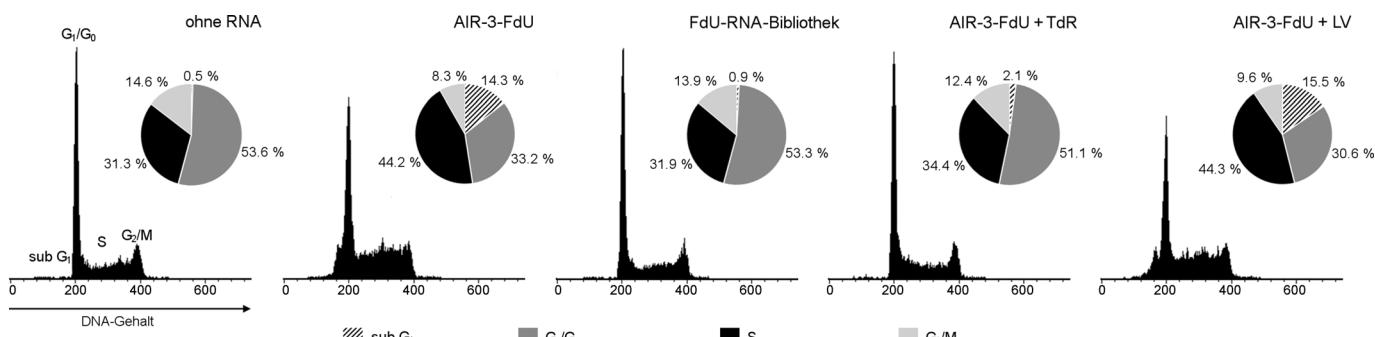


**Abbildung 3.** Zelluläre Bindung, Aufnahme und Toxizität bei BaF3\_hIL-6R Zellen. a) Bindungsanalyse von AIR-3-FdU, FdU-RNA-Bibliothek und AIR-3A (Positivkontrolle) an hIL-6R-präsentierenden BaF3-Zellen. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie anhand einer zweiten Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem AIR-3A ermittelt. Bindende Spezies führten einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Fluoreszenzintensität herbei. b) Antiproliferativer Effekt von AIR-3-FdU auf hIL-6R-präsentierende Zellen. BaF3-Zellen, die entweder hIL-6R-positiv oder -negativ waren, wurden mit AIR-3-FdU inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in wirkstofffreiem Medium weiter kultiviert. Die Proliferation wurde aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt, die beide in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden ( $n=6$ ). Ein Stern kennzeichnet eine statistische Signifikanz von  $p<0.05$ . c) cLSM-Lebendzellanalyse zur Visualisierung von AIR-3A\_atto647N in BaF3\_hIL-6R. Maßstabsbalken: 10 μm.

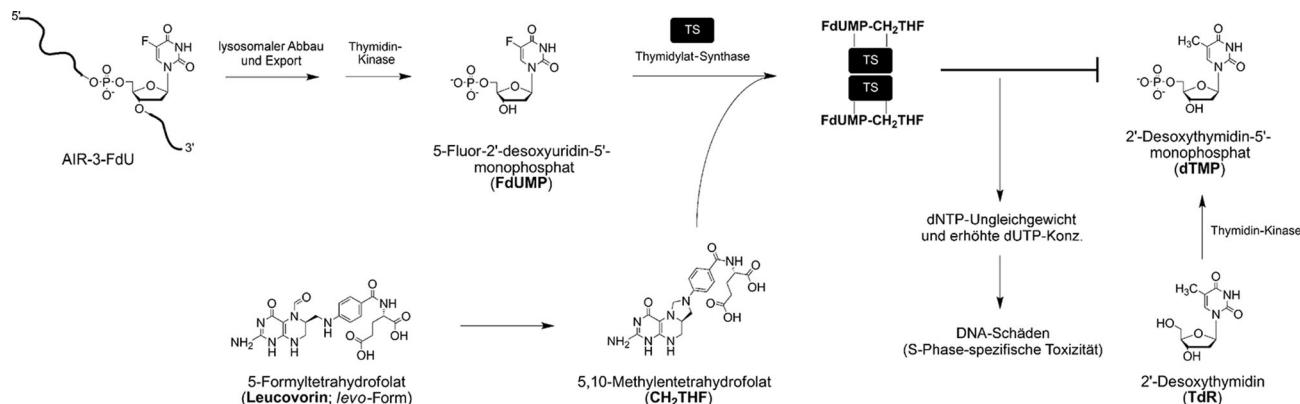
rückzuführen ist, analysierten wir die Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit AIR-3-FdU. Das 5-FUDR-modifizierte Aptamer bedingte einen anteiligen Zuwachs der S-Phase-Population von  $31.3 \pm 1.8\%$  (unbehandelte Zellen) auf  $44.2 \pm$

$1.1\%$  (Abbildung 4). Zudem verzeichneten wir einen Anteil von apoptotischen Zellen (hypodiploide Zellen, gekennzeichnet als subG1 mit  $14.3 \pm 0.5\%$ ). Ein solcher S-Phase-Arrest ist ein typischer Effekt, den FdUMP durch Inhibition der TS erzeugt. Freies 5-FUDR wirkte sich in Konzentrationen von  $5 \mu\text{M}$  auf BaF3 Zellen bei einer Inkubation für mindestens 5 h in gleicher Weise aus.<sup>[20]</sup> Der S-Phase-Arrest konnte verhindert werden, wenn das Experiment in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  2'-Desoxythymidin (TdR), einem Antidot zu FdUMP, durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen verursachte AIR-3-FdU im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Daraus leiten wir ab, dass 5-FdUMP als aktiver Antimetabolit im Zellinneren fungiert, indem es die dTMP-de-novo-Synthese durch Inhibition der TS behindert. Die Verarmung an 2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat (dTMP) führt zu einem verlangsamten Übergang in die S-Phase (DNA-Re-duplikation) und DNA-Schädigungen aufgrund von Nukleotid-Ungleichgewichten. Diese Effekte konnten durch eine extern gespeiste dTMP-Quelle wie TdR kompensiert werden.<sup>[21]</sup> Wir versuchten auch, den antiproliferativen Effekt durch Zusatz von Leucovorin (LV), einer Vorstufe von 5,10-Methylentetrahydrofolat (CH<sub>2</sub>THF), des Cosubstrats der TS, zu verstärken. Allerdings übte LV keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation aus, sondern es führte nur zu einer leichten Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen ( $15.5 \pm 0.8\%$ ). Sowohl TdR als auch LV alleine hatten keinen Einfluss auf die Zellen.

Diese Ergebnisse implizieren, dass FdUMP der aktive Hauptantimetabolit ist, der in den betroffenen Zellen zur Inhibition der TS führt (Schema 1). Die beobachtete Apoptose kann entweder aus dem Einbau von 5-FUDR oder, als Folge der Verarmung an dTMP, aus dem Einbau von 2'-Desoxyuridin in die DNA resultieren. Gleichwohl wird die Vermutung der TS-Inhibition als zentraler Angriffspunkt durch folgende Fakten gestützt: 1) FdUMP ist mit einem  $K_i$  von  $5 \text{ nm}$  der bei weitem effektivste Metabolit zur Inhibition der TS.<sup>[22]</sup> 2) Das Aptamer zeigte keinen zellulären Effekt wenn statt 5-FU-2'-desoxyribonukleosiden 5-FU-Ribonukleoside enthalten waren. Für 5-FU-Ribonukleoside (wie



**Abbildung 4.** Zellzyklusanalysen von BaF3\_hIL-6R-Zellen nach Exposition mit AIR-3-FdU. Die Zellen wurden in Gegenwart von  $100 \text{ nm}$  AIR-3-FdU für 3 h inkubiert, gewaschen und anschließend in wirkstofffreiem Medium für weitere 4 h kultiviert. Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Zellen, die dem Einfluss von AIR-3-FdU ausgesetzt waren, wiesen einen Zuwachs im prozentualen Anteil der S-Phase-Fraktion auf sowie eine zusätzliche subG1-Fraktion, die apoptotischen Zellen entsprach. Die FdU-RNA-Bibliothek diente als Negativkontrolle. Zugabe von 2'-Desoxythymidin (TdR) kompensierte den Effekt auf den Zellzyklus. Durch Zugabe von Leucovorin (LV) wurde der Anteil apoptotischer Zellen leicht erhöht.



**Schema 1.** Vorgeschlagener Mechanismus für die Zytotoxizität von AIR-3-FdU. Das 5-FUDR-modifizierte Aptamer AIR-3-FdU wird von hIL-6R-präsentierenden Zellen internalisiert. Die Hydrolyse durch lysosomale Nukleasen erzeugt freies 5-FUDR, aus dem durch Phosphorylierung der Thymidylat-Synthase(TS)-Inhibitor FdUMP entsteht. Es kommt zur irreversiblen Inhibition der TS durch die Bildung eines kovalenten ternären Komplexes der TS mit FdUMP und dem Cosubstrat CH<sub>2</sub>THF und einer daraus resultierenden S-Phase-Toxizität aufgrund von Verarmung an dTMP, einer unentbehrlichen Vorstufe in der DNA-Biosynthese. Der Effekt kann durch exogenes TdR, einer dTMP-Vorstufe, aufgehoben werden. Die CH<sub>2</sub>THF-Vorstufe Leucovorin verstärkt den Effekt.

auch für die freie Base 5-FU) ist der Umsatz zu FdUMP weniger effizient, da mehrere Stoffwechselschritte durchlaufen werden müssen (Abbildung S1). Dies resultiert in höheren IC<sub>50</sub>-Werten für 5-FU-Therapeutika. Obwohl AIR-3-FdU ausreichend stabil für den Einsatz in den durchgeführten Experimenten unter Zellkulturbedingungen ist, wäre es für zukünftige In-vivo-Anwendungen von Vorteil, ein Aptamer mit erhöhter Resistenz gegenüber Serumnukleasen zur Verfügung zu haben. Vielversprechende Ergebnisse wurden in dieser Hinsicht durch den Einbau 2'-F-modifizierter Cytidine in AIR-3-FdU erzielt. Diese Derivate hatten in serumhaltigem Medium eine Halbwertszeit von mehreren Stunden. Allerdings scheint diese Modifikation die antiproliferative Wirksamkeit herabzusetzen, was vermutlich auf einen weniger ausgeprägten lysosomalen Abbau zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein zytotoxisches Nucleosidanalogon in ein rezeptorbindendes Aptamer integriert wurde, das von Zielzellen internalisiert, zum Lysosom transportiert und dort abgebaut wird. Wir nehmen an, dass der Wirkmechanismus darin besteht, dass das Aptamer im Anschluss zu Nukleosiden abgebaut wird, wobei 5-FUDR freigesetzt wird. Letzteres kann durch die zelluläre Thymidinkinase phosphoryliert werden woraus 5-FdUMP resultiert, ein starker Inhibitor der TS, das zu einem Rückgang der Proliferation und zum Zelltod führt. Beachtenswert ist, dass dieses zytotoxische Aptamer enzymatisch in einem Schritt synthetisiert werden kann. Wir gehen davon aus, dass unser Konzept nicht nur auf andere Aptamere angewendet werden kann, die über einen Zelloberflächenrezeptor internalisiert und zum Lysosom geleitet werden, sondern auch auf andere Nukleosidanaloge wie z.B. Gemcitabin. Zudem könnte es sich als vorteilhaft erweisen, DNA-Aptamere anstelle von RNA-Aptameren zu verwenden, sowohl in Bezug auf die Stabilität gegenüber Nukleasen als auch angesichts der näheren strukturellen Verwandtschaft von 5-FUDR zu TdR als zu Uridin. Der hier vorgestellte Ansatz könnte insbesondere bei Krankheiten, die mit einer erhöhten Plasmakonzentration maligner Zellen einhergehen, wie lympho-

proliferative Erkrankungen (z.B. Plasmazell-Leukämie, Multiples Myelom) oder Morbus Castleman für eine klinische Anwendung in Betracht gezogen werden.<sup>[23]</sup>

Eingegangen am 2. Juni 2014

Online veröffentlicht am 21. August 2014

**Stichwörter:** Aptamere · Chemotherapeutika · Gezielte Pharmakotherapie · Nukleosidanaloge · Wirkstofftransport

- [1] a) J. Zhou, M. L. Bobbin, J. C. Burnett, J. J. Rossi, *Front. Genet.* **2012**, *3*, 234; b) J. P. Dassie, P. H. Giangrande, *Ther. Delivery* **2013**, *4*, 1527–1546; c) C. Meyer, U. Hahn, A. Rentmeister, *J. Nucleic Acids* **2011**, 904750.
- [2] a) J. C. Burnett, J. J. Rossi, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 60–71; b) A. Mescalchin, A. Detzer, M. Wecke, M. Overhoff, W. Wunsche, G. Szczakiel, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2007**, *7*, 1531–1538.
- [3] a) P. Ray, M. A. Cheek, M. L. Sharaf, N. Li, A. D. Ellington, B. A. Sullenger, B. R. Shaw, R. R. White, *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 295–305; b) R. Wang, G. Zhu, L. Mei, Y. Xie, H. Ma, M. Ye, F. L. Qing, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2731–2734.
- [4] D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330–338.
- [5] M. Malet-Martino, R. Martino, *Oncologist* **2002**, *7*, 288–323.
- [6] a) J. Maybaum, B. Ullman, H. G. Mandel, J. L. Day, W. Sadée, *Cancer Res.* **1980**, *40*, 4209–4215; b) X. Zhao, Y. T. Yu, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 550–558; c) R. A. Silverstein, E. Gonzalez de Valdivia, N. Visa, *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 332–340.
- [7] C. Kunz, F. Focke, Y. Saito, D. Schuermann, T. Lettieri, J. Selfridge, P. Schar, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e91.
- [8] a) W. H. Gmeiner, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 191–202; b) B. Van Triest, H. M. Pinedo, G. Giaccone, G. J. Peters, *Ann. Oncol.* **2000**, *11*, 385–391.
- [9] M. Malet-Martino, P. Jolimaitre, R. Martino, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2002**, *2*, 267–310.
- [10] a) Y. Wang, P. Li, L. Chen, W. Gao, F. Zeng, L. X. Kong, *Drug Delivery* **2014**, im Druck; b) C. W. Burke, E. t. Alexander, K. Timbie, A. L. Kilbanov, R. J. Price, *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 321–328.

- [11] C. Meyer, K. Eydeler, E. Magbanua, T. Zivkovic, N. Piganeau, I. Lorenzen, J. Grotzinger, G. Mayer, S. Rose-John, U. Hahn, *RNA Biol.* **2012**, *9*, 67–80.
- [12] a) N. F. Neel, E. Schutyser, J. Sai, G. H. Fan, A. Richmond, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16*, 637–658; b) T. A. Korolenko, P. K. Heinrich, U. Hemmann, O. Weiergraber, E. Dittrich, L. Graeve, *Bull. Exp. Biol. Med.* **1997**, *124*, 527–529; c) Y. Tanaka, N. Tanaka, Y. Saeki, K. Tanaka, M. Murakami, T. Hirano, N. Ishii, K. Sugamura, *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4805–4818.
- [13] R. L. Pisoni, *Subcell. Biochem.* **1996**, *27*, 295–330.
- [14] a) C. L. Hsu, W. Lin, D. Seshasayee, Y. H. Chen, X. Ding, Z. Lin, E. Suto, Z. Huang, W. P. Lee, H. Park, M. Xu, M. Sun, L. Rangell, J. L. Lutman, S. Ulufatu, E. Stefanich, C. Chalouni, M. Sagolla, L. Diehl, P. Fielder, B. Dean, M. Balazs, F. Martin, *Science* **2012**, *335*, 89–92; b) S. A. Baldwin, S. Y. Yao, R. J. Hyde, A. M. Ng, S. Foppolo, K. Barnes, M. W. Ritzel, C. E. Cass, J. D. Young, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15880–15887.
- [15] R. Sousa, R. Padilla, *EMBO J.* **1995**, *14*, 4609–4621.
- [16] a) M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415; b) R. Lorenz, S. H. Bernhart, C. Honer Zu Siederdissen, H. Tafer, C. Flamm, P. F. Stadler, I. L. Hofacker, *Algorithms Mol. Biol.* **2011**, *6*, 26.
- [17] C. Meyer, K. Berg, K. Eydeler-Haeder, I. Lorenzen, J. Grotzinger, S. Rose-John, U. Hahn, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 57–65.
- [18] a) B. Puffer, C. Kreutz, U. Rieder, M. O. Ebert, R. Konrat, R. Micura, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7728–7740; b) M. Hennig, L. G. Scott, E. Sperling, W. Bermel, J. R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14911–14921.
- [19] S. Kruspe, C. Meyer, U. Hahn, *Mol. Ther.–Nucleic Acids* **2014**, *3*, e143.
- [20] C. Muñoz-Pinedo, F. J. Oliver, A. López-Rivas, *Biochem. J.* **2001**, *353*, 101–108.
- [21] G. Pizzorno, Z. Sun, R. E. Handschumacher, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 553–557.
- [22] S. Cox, J. Harmenberg, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1992**, *25*, 17–23.
- [23] K. Inoue, H. Sugiyama, H. Ogawa, T. Yamagami, T. Azuma, Y. Oka, H. Miwa, K. Kita, A. Hiraoka, T. Masaoka, et al., *Blood* **1994**, *84*, 2672–2680.