

Dendritische Nanostrukturen zur rezeptorvermittelten Aufnahme von siRNA in neurale Zellen**

Korbinian Brunner, Johannes Harder, Tobias Halbach, Julian Willibald, Fabio Spada, Felix Gnerlich, Konstantin Sparrer, Andreas Beil, Leonhard Möckl, Christoph Bräuchle, Karl-Klaus Conzelmann und Thomas Carell*

Abstract: Wir berichten über die Entwicklung von dendritischen siRNA-Nanostrukturen, die das Einbringen von siRNA in schwierig zu transzierende Zellen wie Neuronen mithilfe eines speziellen Rezeptorliganden ermöglichen. Die Nanopartikel rufen trotz ihrer dendritischen Struktur eine starke siRNA-Antwort hervor. Durch siRNA-Dendrimere gegen das Nukleoprotein (N-Protein) und das Phosphoprotein (P-Protein), zwei Schlüsselproteine des Tollwutvirus (RABV), konnte der Virusstiter in Neuronen unter die Nachweisgrenze gesenkt werden. Die mithilfe von Klick-Chemie aufgebauten siRNA-Dendrimere weisen den Weg für eine neuartige Heilmöglichkeit dieser tödlichen Krankheit.

RNA-Interferenz ist ein wichtiges Verfahren zur sequenzspezifischen Regulation der Expression einzelner Gene durch kurze interferierende RNA (siRNA).^[1] Auf dem Weg hin zu einer therapeutischen Anwendung von siRNA ist das Fehlen von effizienten, spezifischen und nicht zytotoxischen Methoden zum Einbringen von siRNA-Duplexen in Zellen und Gewebe ein großes Hindernis.^[2] Gemeinhin verwendete Transfektionsreagentien, basierend auf Liposomen oder kationischen Polymeren, haben die Nachteile, heterogen bezüglich der Partikelgröße und Zusammensetzung zu sein und bei einer Verwendung mit empfindlichen Zelltypen wie Neuro-

nen zum Teil erhebliche Zytotoxizität zu zeigen.^[3] Kürzlich haben wir gezeigt, dass all-cis-konfiguriertes Anandamid (Arachidonylethanolamin, AEA) in der Lage ist, einen effizienten Import von AEA-siRNA-Addukten in Zellen zu vermitteln, deren Oberfläche Cannabinoid-Rezeptoren aufweist.^[4] Da Zellen des Immunsystems und neurale Zellen diese Rezeptoren tragen, gelingt auf diesem Weg ein effizienter Transport von siRNA in diese empfindlichen Zelltypen.^[5]

Problematisch bei einer rezeptorvermittelten Aufnahme von siRNA ist die eingeschränkte Expression einiger Rezeptoren. Dies führt zu einer schnellen Sättigung der Rezeptoren, was wiederum die aufgenommene siRNA-Menge beschränkt. Hier zeigen wir, dass ein AEA-Ligand in der Lage ist, die Aufnahme dendritischer siRNA-Nanostrukturen mit bis zu neun siRNA-Duplexen auszulösen. Trotz der komplexen Struktur weisen die Nanopartikel dabei eine hohe biologische Aktivität auf (Abbildung 1). Auf diese Weise ist es uns prinzipiell möglich, Sättigungseffekte zu vermindern und die Aufnahme von siRNA zu steigern.

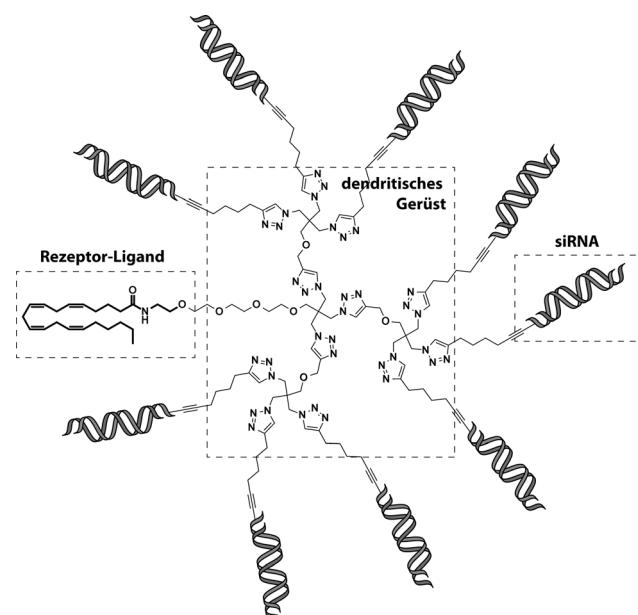
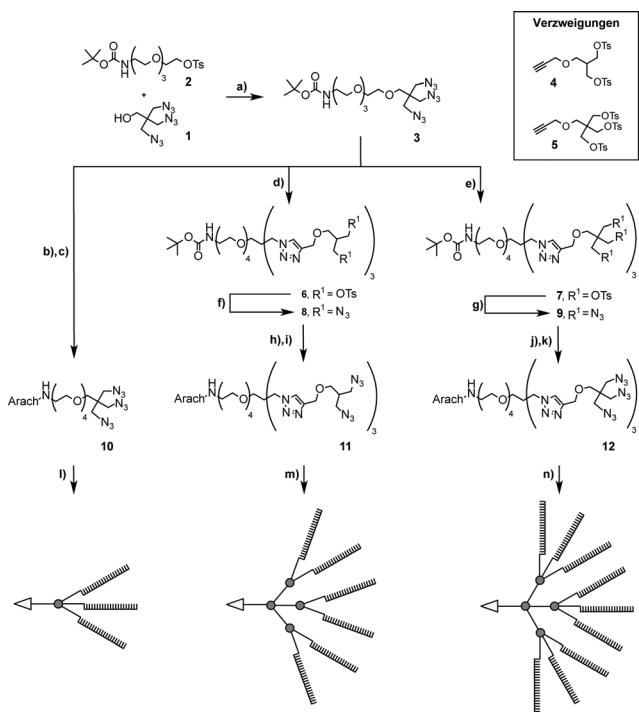


Abbildung 1. Ein dendritisches siRNA-Nanopartikel mit Anandamid-Rezeptor-Liganden. Die „Passenger“-Strände der siRNA-Duplexe sind kovalent mit dem dendritischen Gerüst verbunden, während die „Guide“-Strände durch Hybridisierung an die Nanostruktur gebunden werden.

[*] M. Sc. K. Brunner,^[+] Dr. J. Harder,^[+] Dr. J. Willibald, Dr. F. Spada, M. Sc. F. Gnerlich, M. Sc. A. Beil, M. Sc. L. Möckl, Prof. Dr. C. Bräuchle, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrative Protein Science, Department Chemie Ludwig-Maximilians-Universität München Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: Thomas.Carell@lmu.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>
M. Sc. T. Halbach,^[+] Dr. K. Sparrer, Prof. Dr. K.-K. Conzelmann Max von Pettenkofer-Institut und Genzentrum Ludwig-Maximilians-Universität München München (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB1032, SFB870) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen 01KI1016B) für finanzielle Unterstützung. Auch danken wir für zusätzliche Unterstützung durch den Excellence-Cluster Nanoinitiative Munich (NIM) und das Center for Integrative Protein Science (CiPS^M). Auch wurde diese Arbeit durch den Fonds der Chemischen Industrie und Novartis Pharma AG gefördert. Wir danken auch Prof. Dr. Magdalena Götz vom Helmholtz-Zentrum München, Institut für Stammzellforschung, für die Bereitstellung der primären Neuronen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409803> zu finden.



Schema 1. Synthese der siRNA-Dendrimere AEA-[3ORN], AEA-[6ORN] und AEA-[9ORN]. a) NaH, 15-Krone-5, DMF, RT, 46%; b) TFA, CHCl₃, RT, 94%; c) Arachidonsäure, TBTU, DIPEA, DMF, RT, 95%; d) **4**, CuSO₄, Natriumascorbat, H₂O/THF (1:1), RT, 80%; e) **5**, CuSO₄, Natriumascorbat, H₂O/THF (1:1), RT, 65%; f) NaN₃, DMF, 110°C, 85%; g) NaN₃, DMF, 110°C, 97%; h) TFA, CHCl₃, RT, 71%; i) Arachidonsäure, HATU, DIPEA, DMF, RT, 81%; j) TFA, CHCl₃, RT, 76%; k) TBTU, DIPEA, DMF, 40°C, 70%; l) Alkin-modifizierte Oligonukleotide (ORN), CuBr, TBTA, DMSO/H₂O, 89%; m) Alkin-modifizierte Oligonukleotide (ORN), CuBr, TBTA, DMSO/H₂O, 78%; n) Alkin-modifizierte Oligonukleotide (ORN), CuBr, TBTA, DMSO/H₂O, 65%.

Ein auf Klick-Chemie basierender Ansatz ermöglichte die effiziente Synthese der benötigten monodispersen siRNA-Nanopartikel (siehe Abbildung 1).^[6] Die bei der Synthese der siRNA-Strukturen verfolgte Strategie ist in Schema 1 dargestellt. Ausgehend von Pentaerythritol wurde das Triazid **1** in zwei Schritten hergestellt. Verbindung **1** wurde im nächsten Schritt mit dem mono-Boc-mono-Ts-funktionalisierten Tetraethylenglycol **2** umgesetzt, wodurch die verzweigte Kernverbindung **3** hergestellt wurde. In einer Cu^I-katalysierten Klick-Reaktion wurde **3** mit **4** und **5** umgesetzt. Diese beiden verzweigten Moleküle sind über eine zweistufige Synthese zugänglich (Schema S1). Anschließend wurden die Tosylate **6** und **7** in die entsprechenden Azide **8** und **9** umgewandelt. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe der Verbindungen **3**, **8** und **9** wurden die resultierenden Amine mit Arachidonsäure umgesetzt. Die so erhaltenen Anandamid-Azide **10**, **11** und **12** wurden nun mit den Alkin-modifizierten „Passenger“-Strängen der entsprechenden siRNAs mittels Cu^I-katalysierter Klick-Reaktion kovalent verknüpft, wodurch die dendritischen RNA-Nanopartikel erhalten wurden.^[6,7]

In allen Fällen wurde nach der Klick-Reaktion ein einziges Hauptprodukt erhalten, das durch semipräparative Umkehrphasen-HPLC isoliert wurde. Zur Überprüfung der

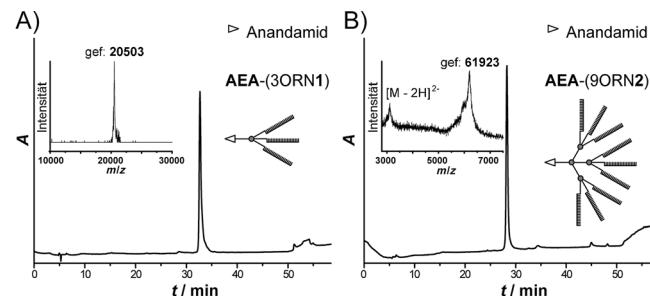


Abbildung 2. HPL-Chromatogramme der auf **10** und **12** basierenden aufgereinigten siRNA-Dendrimere. Die Einschübe zeigen die MALDI-TOF-Spektren. MALDI-TOF-Daten: A) berechnet (AEA-[3ORN1]): m/z 20506, gef.: 20503. B) berechnet (AEA-[9ORN2]): m/z 62124, gef.: 61923 (breites Signal).

korrekten Struktur und Monodispersität wurden die dendritischen RNA-Strukturen anschließend durch analytische HPLC und MALDI-TOF untersucht (zwei Beispiele sind in Abbildung 2 dargestellt). So konnten die dendritischen Strukturen in ausgezeichnetener Reinheit isoliert werden. Die korrekten Molekülmassen wurden dabei im Rahmen der experimentellen Grenzen einer MALDI-TOF-Messung erhalten, wodurch die erwartete Monodispersität der Nanopartikel nachgewiesen werden konnte. Durch Hybridisierung mit der entsprechenden Zahl an korrespondierenden „Guide“-Strängen wurden die transfektionsbereiten siRNA-Dendrimere erhalten.

Um die biologische Aktivität der siRNA-Dendrimere zu untersuchen, verwendeten wir in einem ersten Schritt ein duales Luciferase-Reporterassay in RBL-2H3-Zellen.^[4,8] Wie in Abbildung 3 dargestellt, zeigten alle siRNA-Dendrimere einen starken regulatorischen Effekt. Dabei hielten wir in den Experimenten die Menge an siRNA-Duplexen konstant. Dies erreichten wir durch eine Reduktion der Konzentration der dendritischen Strukturen auf den Kehrwert der Zahl an

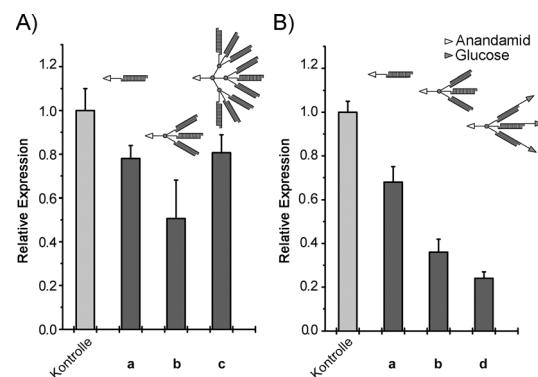


Abbildung 3. Relative Regulation der Expression von Renilla-Luciferase im Vergleich zur Expression von Firefly-Luciferase durch dendritische Anandamid-tragende siRNA-Nanopartikel in RBL-2H3-Zellen. Untersucht wurde: A) der Einfluss der Verzweigung (1, 3, 9 siRNAs pro Ligand) auf die biologische Aktivität; B) der Einfluss einer zusätzlichen Glucose-Modifikation am „Guide“-Strang der siRNA. In allen Fällen wurde die Zahl der siRNAs pro Nanopartikel auf die Konzentration der monomeren Struktur normalisiert. Die Quantifizierung erfolgte über die Luciferaseaktivität. a: AEA-[1siRNA-Luc], b: AEA-[3siRNA-Luc], c: AEA-[9siRNA-Luc], d: AEA-[27siRNA-Luc]-Glc.

siRNA-Duplexen pro Nanopartikel. Dabei zeigte sich, dass die Struktur mit drei siRNA-Duplexen (AEA-[3siRNA]) die bei weitem stärkste regulatorische Aktivität entfaltete. Dies ist bemerkenswert, da die Konzentration der dendritischen Struktur nur ein Drittel derjenigen des monomeren Anandamid-modifizierten siRNA-Duplexes beträgt. Erstaunlicherweise zeigte sogar das Dendrimer AEA-[9siRNA], trotz seiner Größe und der niedrigeren Konzentration der Nanopartikel, eine mit der des Anandamid-modifizierten siRNA-Duplexes vergleichbare biologische Aktivität (Abbildung 3A).

Das 3'-Ende der „Guide“-Stränge der siRNA ermöglicht eine weitere Funktionalisierung.^[9] Durch eine solche Modifikation kann die Stabilität der RNA im Inneren einer Zelle gesteigert werden, was ihre regulatorische Aktivität steigern sollte.^[7e,10] Um diese Möglichkeit zu nutzen, wurden die siRNA-Duplexe der Dendrimere am 3'-Ende mit Glucosemolekülen funktionalisiert.^[11] Glucose bildet Wasserstoffbrücken mit dem RNA-Duplex und erhöht die Wasserlöslichkeit. Die Einführung der 3'-Modifikation erfolgte durch die Hybridisierung der „Passenger“-Strang enthaltenden Nanopartikel mit einem entsprechenden Glucose-modifizierten „Guide“-Strang. Tatsächlich führte die Schützung der 3'-Enden durch Glucose zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität. Dies könnte daran liegen, dass die siRNA-Dendrimere nach der Aufnahme in die Zellen einem Abbau der RNA in den Endosomen ausgesetzt sind, was durch die Glucose-Modifikation vermieden würde.^[10a,12]

Wie in Abbildung 3B zu erkennen ist, ist die Auswirkung der Glucose-Schützung im Fall der trimeren siRNA-Struktur erheblich. Hierbei wurde eine Reduzierung der Expression um 80% erreicht, was im Vergleich zur monomeren Struktur, trotz der reduzierten Konzentration, eine Steigerung um das Zweieinhalbfache bedeutet.

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Möglichkeit, eine Regulation in schwer zu transzierenden neuralen Zellen mithilfe unserer dendritischen siRNA-Strukturen zu erzielen (Abbildung 4). Daher wurde die Aufnahme der Nanopartikel in neurale Stammzellen untersucht. Wir synthetisierten siRNA-Dendrimere, bei denen die Glucose-Modifikationen der 3'-Enden der „Guide“-Stränge durch Alexa-Fluor 647 ersetzt wurde. Tatsächlich konnte die effiziente Aufnahme der fluorophormodifizierten trimeren Strukturen in neurale Stammzellen mittels Konfokalmikroskopie bestätigt werden (Abbildung 4A).

Um die Fähigkeit der siRNA-Strukturen zur Regulation eines endogenen Gens zu zeigen, behandelten wir neurale Stammzellen mit einem trimeren siRNA-Konstrukt gegen Tet1. Kürzlich wurde gezeigt, dass dieses Enzym für die bei der Zelldifferenzierung wichtige Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin und 5-Carboxycytosin sorgt.^[13] Die Expression von Tet1 wurde dabei mittels qPCR untersucht (Abbildung 4B). Tatsächlich führten die siRNA-Dendrimere zu einer signifikanten Reduktion der Tet1-Expression. Somit konnte gezeigt werden, dass eine kovalente Bindung der siRNA an die dendritische Struktur die regulatorische Aktivität nicht negativ beeinflusst. Im Gegenteil konnte die stärkste Regulation nach Behandlung mit der trimeren siRNA-Struktur beobachtet werden.

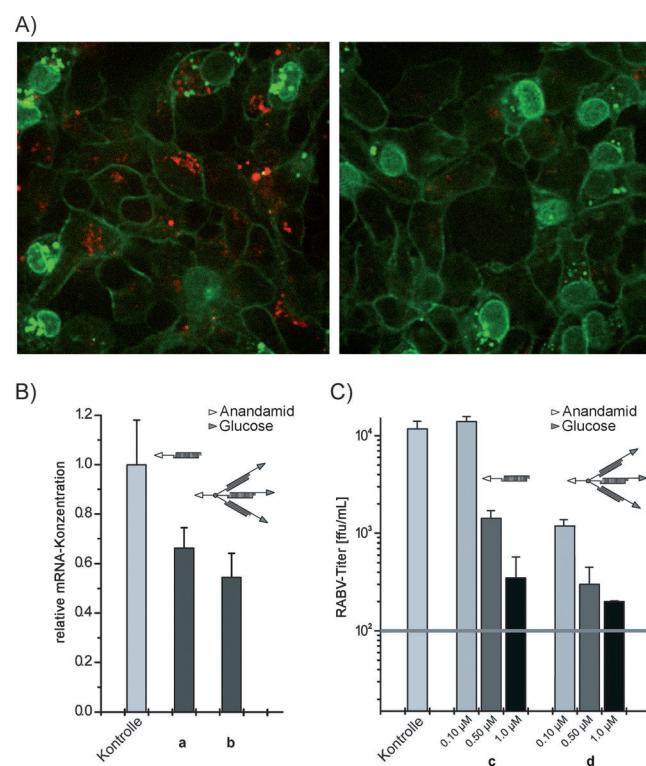


Abbildung 4. A) Aufnahme Anandamid-tragender dendritischer siRNA-Strukturen durch neurale Stammzellen. Links: AlexaFluor-647-modifizierte trimere siRNA wurde mit neuralen Stammzellen inkubiert. Rechts: Als Negativkontrolle wurden neurale Stammzellen mit einer fluorophormodifizierten siRNA ohne AEA-Rezeptorliganden inkubiert (rot: siRNA, grün: Zellmembran). Die Kontrasteinstellungen für siRNA-Signale wurden für beide Aufnahmen identisch gewählt. B) Die erfolgreiche Aufnahme der Nanopartikel durch neurale Stammzellen wurde zusätzlich durch die Regulation der Expression von Tet1 mittels qPCR gezeigt. a: AEA-[1siRNA-Tet1], b: AEA-[3siRNA-Tet1]-Glc. C) Regulation des RABV-Titers in kortikale E14-Neuronen durch die Behandlung mit unterschiedlichen AEA-modifizierten siRNA-Strukturen gegen das P-Protein des Tollwutvirus. c: AEA-[1siRNA-P-Protein], d: AEA-[3siRNA-P-Protein]-Glc.

Schließlich sollte untersucht werden, ob die neuartigen dendritischen siRNA-Nanopartikel eine medizinisch relevante Funktion in primären Neuronen, die mit herkömmlichen Methoden kaum zu transzieren sind, erfüllen können.^[3f,14] Als Ziel wählten wir dabei das neurotrope Tollwutvirus (RABV). Tollwut verursacht mehr als 55 000 Todesfälle pro Jahr und kann nach dem Einsetzen klinischer Symptome nicht mehr behandelt werden.^[15] Für diese Untersuchung wurden murine kortikale E14-Neuronen mit RABV infiziert und anschließend mit zwei siRNA-Dendrimeren (AEA-[3siRNA]-Glc) gegen die mRNA des viralen Nukleoproteins (N-Protein) und des Phosphoproteins (P-Protein) behandelt. Die siRNA-Sequenzen wurden dabei mit dem Programm si-DESIGN generiert. Beide Proteine sind für die Transkription und Replikation des Virus essenziell und gelten daher als vielversprechende Ziele für die Behandlung einer RABV-Infektion.^[16] Darüber hinaus ist das P-Protein ein wichtiger Antagonist des angeborenen Immunsystems, wobei es sowohl die Produktion von IFN β als auch die Aktivierung verschiedener Signalwege unterdrückt.^[17] Eine Unterdrückung der

Expression des P-Proteins sollte daher die angeborene Immunantwort fördern und somit die Ausbreitung von RABV verhindern. Die Daten des Experiments zeigen eindeutig, dass die Behandlung der infizierten Neuronen mit den beiden dendritischen siRNA-Nanopartikel AEA-[3siRNA]-Glc (anti-P and anti-N) zu einer deutlichen Reduktion des Virus-titers führt (Abbildung 4C; für Daten über die Regulation des N-Proteins siehe Abbildung S2 und Abbildung S3). Der Virustiter wurde dabei um zwei Zehnerpotenzen im Vergleich zum Kontrollexperiment mit einer unspezifischen AEA-modifizierten siRNA gesenkt. In diesem Fall war die trimere dendritische siRNA-Struktur in der Lage, den Virustiter nahe an die experimentell realisierbare Nachweisgrenze zu senken. Wichtig sind dabei die Beobachtungen, dass die Reduktion des Titers dosisabhängig ist und mit einer Lipofectamin-2000-basierten Transfektion der nichtmodifizierten siRNA lediglich die Reduktion um den Faktor zehn beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig die verbesserte Wirksamkeit der siRNA-Dendrimere.

Zusammenfassend ermöglichen die hier vorgestellten neuartigen dendritischen siRNA-Nanostrukturen eine wirksame siRNA-Behandlung von schwierig zu transfizierenden Zellen wie Stammzellen und primären Neuronen.^[18] In einem auf Klick-Chemie basierenden Ansatz wurden die „Passenger“-Stränge der siRNAs kovalent an die dendritisch aufgebauten Strukturen gebunden. Daher war uns eine genaue Kontrolle der Monodispersität der Partikel und der Zahl der an einen AEA-Rezeptor-Liganden gebundenen siRNA-Duplexe möglich. Diese dendritischen siRNA-Nanostrukturen machen eine effektive Kontrolle der Genexpression in neuronalen Stammzellen und primären Neuronen möglich. Dieses System konnte von uns dazu genutzt werden, den Virustiter in mit RABV infizierten primären Neuronen an die Nachweisgrenze zu senken. Somit stellt es eine mögliche Strategie für eine siRNA-basierte Therapie dieser tödlichen Krankheit dar.

Eingegangen am 6. Oktober 2014,
veränderte Fassung am 30. Oktober 2014
Online veröffentlicht am 17. Dezember 2014

Stichwörter: Anandamid · Antivirale Wirkstoffe · Genstummschaltung · Stammzellen · Wirkstofftransport

- [1] a) A. Z. Fire, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966–6984; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7094–7113; b) S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498; c) C. C. Mello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985–6994; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7114–7124.
- [2] a) K. Tiemann, J. J. Rossi, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 142–151; b) H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555.
- [3] a) H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109; b) Z. Ma, J. Li, F. He, A. Wilson, B. Pitt, S. Li, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 755–759; c) S. Akhtar, I. F. Benter, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3623–3632; d) J. Godfray, P. Estibeiro, *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, *7*, 363–376; e) M. J. A. Wood, B. Trülzsch, A. Abdelgany, D. Beeson, *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, R279–R284; f) I. Posadas, F. J. Guerra, V. Cena, *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1219–1236; g) A. M.

- O'Mahony, B. M. Godinho, J. Ogier, M. Devocelle, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 744–752; h) J. Wu, W. Huang, Z. He, *Sci. World J.* **2013**, 630654.
- [4] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330–12333.
- [5] a) M. Glass, M. Dragunow, R. L. Faull, *Neuroscience* **1997**, *77*, 299–318; b) A. Bieggon, I. A. Kerman, *NeuroImage* **2001**, *14*, 1463–1468; c) I. Svizenska, P. Dubovy, A. Sulcova, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2008**, *90*, 501–511.
- [6] E. Paredes, S. R. Das, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 125–131.
- [7] a) J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642; b) P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487; c) T. Yamada, C. G. Peng, S. Matsuda, H. Addepalli, K. N. Jayaprakash, M. R. Alam, K. Mills, M. A. Maier, K. Charisse, M. Sekine, M. Manoharan, K. G. Rajeev, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1198–1211; d) E. Paredes, S. R. Das, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5313–5316; e) S. E. Averick, E. Paredes, S. K. Dey, K. M. Snyder, N. Tapinos, K. Matyjaszewski, S. R. Das, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12508–12511.
- [8] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624–1625.
- [9] a) Y. Wang, S. Juranek, H. Li, G. Sheng, G. S. Wardle, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2009**, *461*, 754–761; b) F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Akgün, A. Klippe, G. J. Pronk, K. Giese, J. Kaufmann, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2705–2716.
- [10] a) Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 549–561; b) J.-P. Shaw, K. Kent, J. Bird, J. Fishback, B. Froehler, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 747–750.
- [11] C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2084–2092.
- [12] a) J. M. Layzer, A. P. McCaffrey, A. K. Tanner, Z. Huang, M. A. Kay, B. A. Sullenger, *RNA* **2004**, *10*, 766–771; b) Y. Ikeda, D. Kubota, Y. Nagasaki, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1685–1690.
- [13] a) H. Bagci, A. G. Fisher, *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 265–269; b) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300–1303; c) T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truß, M. Müntzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeier, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008–7012; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7146–7150; d) Y.-F. He, B.-Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.-X. Song, K. Zhang, C. He, G.-L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303–1307.
- [14] A. Nath, K. L. Tyler, *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 412–422.
- [15] a) M. J. Schnell, J. P. McGettigan, C. Wirblich, A. Papaneri, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 51–61; b) P. K. Gupta, A. A. Sonwane, N. K. Singh, C. D. Meshram, S. S. Dahiya, S. S. Pawar, S. P. Gupta, V. K. Chaturvedi, M. Saini, *Virus Res.* **2012**, *163*, 11–18.
- [16] a) Y.-J. Yang, P.-S. Zhao, T. Zhang, H.-L. Wang, H.-R. Liang, L.-L. Zhao, H.-X. Wu, T.-C. Wang, S.-T. Yang, X.-Z. Xia, *Virus Res.* **2012**, *169*, 169–174; b) G. Castel, M. Chtéoui, G. Caignard, C. Préraud, S. Méhouas, E. Réal, C. Jallet, Y. Jacob, R. W. H. Ruigrok, N. Tordo, *J. Virol.* **2009**, *83*, 10808–10820; c) E. Real, J.-C. Rain, V. Battaglia, C. Jallet, P. Perrin, N. Tordo, P. Christment, J. D'Alayer, P. Legrain, Y. Jacob, *J. Virol.* **2004**, *78*, 7410–7417; d) P. E. Brandão, J. G. Castilho, W. Fahl, P. Carniel, Jr., R. d. N. Oliveira, C. I. Macedo, M. L. Carrieri, I. Kotait, *Braz. J. Infect. Dis.* **2007**, *11*, 224–225.
- [17] a) K. Brzozka, S. Finke, K. K. Conzelmann, *J. Virol.* **2005**, *79*, 7673–7681; b) M. Rieder, K. Brzózka, C. K. Pfaller, J. H. Cox, L. Stitz, K.-K. Conzelmann, *J. Virol.* **2011**, *85*, 842–852.
- [18] X. Liu, J. Zhou, T. Yu, C. Chen, Q. Cheng, K. Sengupta, Y. Huang, H. Li, C. Liu, Y. Wang, P. Posocco, M. Wang, Q. Cui, S. Giorgio, M. Fermeiglia, F. Qu, S. Prich, Y. Shi, Z. Liang, P. Rocchi, J. J. Rossi, L. Peng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11822–11827; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12016–12021.