

Aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Stabilisierung von *DNAzymen* gegenüber Nukleasen durch
Entwicklung eines zirkulären *DNAzyms***

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Georg Johannes Seifert
aus Kiel

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. Dr. med. Karl Seeger
2. Prof. Dr. med. Norbert Graf
3. Prof. Dr. med. Meinolf Suttorp

Datum der Promotion: 01.06.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Geninhibitionsstrategien	5
1.2	DNAzyme	6
1.2	Stabilität von DNAzymen im Serum	7
2	Fragestellung	7
3	Ergebnisse	7
3.1	Design und Optimierung linearer DNAzyme gegen TEL-AML1-mRNA	7
3.2	Spezifität der Kontroll-DNAzyme	8
3.3	Design und Optimierung zirkulärer DNAzyme (Circozym)	9
3.4	Stabilität linearer und zirkulärer DNAzyme	10
4	Diskussion	10
5	Methoden	12
5.1	Klonierung	12
5.2	mRNA-Synthese	12
5.3	Synthese der Circozyme	12
5.4	Synthese einzelsträngiger Desoxyribozyme	13
6	Weitere Publikationen	14
6.1	Cancer Genetics Cytogenetics 2006	14
6.2	Haematologica 2006, Fatal course after administration of rituximab in a boy with relapsed all: a case report and review of literature.	14
6.3	BMC Cancer 2006, Intraluminal instillation of urokinase and autologous plasma: A method to unblock occluded central venous ports	14
6.4	Blood 2002, Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.	15
6.5	Clinical Chemistry 2001, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology.	15
7	Publikationen	16
8	Literaturverzeichnis	17
9	Erklärung über Art und Umfang der Mitwirkung bei der Bearbeitung des Forschungsthemas und bei der Erstellung der Publikationen	18
10	Lebenslauf	19
11	Erklärung	20
12	Danksagung	21

**Stability and catalytic activity of novel circular DNAzymes.
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2006**

Seifert G, Taube T, Paal K, von Einsiedel HG, Wellmann S, Henze G, Seeger K, Schroff M, Wittig B.

Abstract

DNAzymes represent a new generation of catalytic nucleic acids for specific RNA targeting in order to inhibit protein translation from the specifically cleaved mRNA. The 10-23 DNAzyme was found to hydrolyze RNA in a sequence-specific manner both in vitro and in vivo. Although single-stranded DNAzymes may represent the most effective nucleic acid drug to date, they are nevertheless sensitive to nuclease degradation and require modifications for in vivo application. However, previously used stabilization of DNAzymes by site-specific phosphorothioate (PT) modifications reduces the catalytic activity, and the PT displays toxic side effects when applied in vivo. Thus, improving the stability of DNAzymes without reducing their catalytic activity is essential if the potential of these compounds should be realized in vivo. The Circozyme was tested targeting the mRNA of the most common genetic rearrangement in pediatric acute lymphoblastic leukemia TEL/AML1 (ETV6/RUNX1). The Circozyme exhibits a stability comparable to PT-modified DNAzymes without reduction of catalytic activity and specificity and may represent a promising tool for DNAzyme in vivo applications. The inclusion of the catalytic site and the specific mRNA binding sequence of the DNAzyme into a circular loop-stem-loop structure (Circozyme) of approximately 70 bases presented here is a new effective possibility of DNAzyme stabilization.

Zusammenfassung

DNAzyme sind synthetische katalytisch aktive Desoxyribonukleinsäuren mit der Fähigkeit, RNA sequenzspezifisch zu hydrolysieren und so die Translation zu inhibieren. DNAzyme (10-23er DNAzym) leiten sich prinzipiell von den Ribozymen ab, deren Wirkmechanismus ein ähnlicher ist. Sie können als Konstrukte sowohl zur Untersuchung von Genfunktionen als auch zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze eingesetzt werden. Da DNAzyme aus einzelsträngiger DNA bestehen ist es notwendig, diese vor einer Degradation durch DNAasen zu schützen. Der bisher verwendete Ansatz zur Stabilisierung von DNAzymen ist meistens der Einbau von Phosphothioaten. Dass diese jedoch einige nachteilige Eigenschaften und Nebenwirkungen aufweisen, ist aus der Forschung mit Antisense- Oligodesoxyribonukleotiden bekannt. Es treten in vivo sowohl spezifische als auch unspezifische Nebenwirkungen auf, die die therapeutische Dosis limitieren. In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines neuen zirkulären, kovalent geschlossenen DNAzyms dem Circozym dargestellt. Das Circozym besitzt eine etwa 70bp lange Loop-Stem-Loop Struktur und enthält die katalytisch aktive Sequenz eines konventionellen 10-23 DNAzyms. Das Circozym wurde am Beispiel von TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) mRNA entwickelt. TEL-AML1 ist eine der häufigsten genetischen Rearrangements bei akuter lymphoblastischer Leukämie im Kindesalter. Es konnte gezeigt werden, dass erstaunlicherweise die katalytische Aktivität des Circozyms durch die strukturelle Veränderung zu einer Hantelform nicht verloren geht. Da das Circozym verglichen, mit Phosphothioat-stabilisierten DNAzymen vergleichbare Stabilität besitzt, scheint die phosphothioatfreie Form der Stabilisierung von DNAzymen gerade in Hinsicht auf eine *in vivo*-Nutzbarkeit interessant.

1 Einleitung

1.1 Geninhibitionsstrategien

Konzepte für eine gezielte therapeutische Genausschaltung, deren Pathogenese mit einzelnen identifizierbaren Genen oder Fusionsgenen assoziiert ist, sind seit etwa dreißig Jahren für maligne, kardiovaskuläre und angeborene genetische Erkrankungen vorhanden. In diesem Zeitraum entstand eine Vielzahl an unterschiedlichen Techniken zur spezifischen Genausschaltung (siehe Tabelle 1). Das gemeinsame Ziel unterschiedlicher Techniken zur Genausschaltung und konsekutiven Inhibierung der Proteinsynthese besteht dabei entweder in der Zerstörung oder der Unterdrückung der Expression pathogenetisch bedeutsamer Genprodukte.

Zu den ältesten bis in die klinische Anwendung entwickelten Techniken gehört die Inhibierung der Translation und Transkription durch *Antisense*-Oligonukleotide (ODN).¹ Die *Antisense*-Technologie nutzt zur kodierenden mRNA komplementäre DNA-Fragmente, die mit der RNA-Doppelstränge bilden und so die Translation blockieren. Es sind eine Vielzahl von *Antisense*-Versuchen zur Inhibition von krankheitsassoziierten Genen bei kardiovaskulären- und onkologischen Krankheiten publiziert.²⁻⁵ Wie für *Antisense*-ODN befindet sich die experimentelle Anwendung von katalytischen Ribonukleinsäuren, den Ribozymen, inzwischen ebenfalls in der klinischen Erprobungsphase, z.B. bei soliden Tumoren als ein antiangiogenetischer Wirkstoff.⁶ Ribozyme, wie z.B. ‚hammerhead‘ oder ‚hairpin‘ Ribozyme, können mRNA sequenzspezifisch enzymatisch spalten und so die Translation der RNA verhindern. Große Hoffnungen wurden in die Entwicklung von Ribozymen gesetzt, da sie im Gegensatz zur mRNA-Blockierung durch *Antisense*-Oligonukleotide die Ziel-mRNA aktiv zerstören.^{2,7-9} Für die *in vivo* Anwendung sind Ribozyme aber insbesondere mit dem Nachteil einer geringen Resistenz gegen Nukleasen behaftet, was eine therapeutische Anwendung erschwert.

Eine gezielte Weiterentwicklung von Ribozymen wurde mit der fortschreitenden Entwicklung der Nukleidchemie möglich und hat zu mRNA-schneidenden katalytischen Desoxyribonukleinsäuren, den Desoxyribozymen oder *DNAzymen* geführt.^{10,11} *DNAzyme* können sequenzspezifisch die Fusions-mRNA binden und zerstören, was konsekutiv zur Verminderung des Transkripts und nachfolgend des Proteins führt.

Ein Beispiel für ein sinnvolles *Ziel* für eine Anti-Genstrategie ist die bei akuten lymphoblastischen (ALL) und myeloischen Leukämien (CML) vorkommende Translokation t(9;22)(q34;q11) (Philadelphia Translokation) mit dem resultierenden Fusionstranskript *BCR-ABL*.^{12,13} *BCR-ABL* positive Leukämiezellen zeichnen sich, wie alle translokationsassoziierten malignen Erkrankungen, durch die nur in den neoplastischen Zellen vorhandenen Fusionstranskripte und deren Proteinprodukte aus. Diese translokationsassoziierten spezifischen Veränderungen in den malignen Zellen bieten die Möglichkeit eines gezielten therapeutischen Ansatzes, da eine zentrale Rolle der Fusionstranskripte bzw. der Fusionsproteine in der Pathogenese der malignen Erkrankungen bekannt ist. Im Bereich der Fusionsregion existieren Gensequenzen, die sich von den Wildtypsequenzen unterscheiden. Somit stellen diese varianten Moleküle ideale leukämiezellspezifische Ziele für eine therapeutische Anti-Genstrategie dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Technik der Stabilisierung von *DNAzymen* am Beispiel des leukämiezellspezifischen Fusionstranskriptes *TEL-AML1* (Translokation t12:21) etabliert. Diese Translokation ist bei etwa 20-25% der ALL im Kindesalter nachweisbar und mit einer eher günstigen Prognose assoziiert.¹⁴

Tabelle 1: Übersicht Nukleinsäure-basierte posttranskriptionelle Geninhibierungstechniken

Technik	Effektor Mechanismus
<i>Antisense</i> Oligodesoxynucleotides (AS-ODN) ¹	Induktion der RNase H
<i>Antisense</i> RNA (AS-RNA)	Inhibition der Translation
2'-O-methyl phosphorothioate <i>Antisense</i> oligodesoxynucleotides (AO) ¹⁵	Inhibition des Spleißens (Exon skipping)
<i>DNAzymes</i> ¹¹	Protein-unabhängige katalytische Destruktion von RNA
External guide sequences (EGS) ¹⁶	RNase-P vermittelte Inhibition
Morpholino <i>Antisense</i> (MF-AS) ¹⁷	Inhibition der Translation
Micro RNAs (miRNA) ¹⁸	RNAi (Inhibition der Translation)
Peptide nucleic acids (PNA) ¹⁷	Inhibition der Translation
Phosphorothioate oligodeoxynucleotides (PS-ODN) ¹	RNase H Induktion
Ribozymes (RBZ) ¹⁹	Protein-unabhängige katalytische Inhibition
Small interfering RNA (siRNA) ²⁰	RNA interference (RNAi), RNA-Inhibition
Small hairpin RNA (shRNA) ²¹	RNAi

1.2 DNAzyme

DNAzyme sind seit wenigen Jahren bekannte, katalytisch aktive Desoxyribonukleinsäuren mit der Fähigkeit, *RNA* sequenzspezifisch zu hydrolysieren.¹¹ *DNAzyme* leiten sich prinzipiell von den Ribozymen ab, deren Wirkmechanismus ein ähnlicher ist. Die spezifische Wirkung der *RNA*-spaltenden *DNAzyme* wurde u.a. an HIV-*RNA*²²⁻²⁶ und *BCR-ABL-*RNA** (p210)²⁷ analysiert und eindeutig gezeigt.

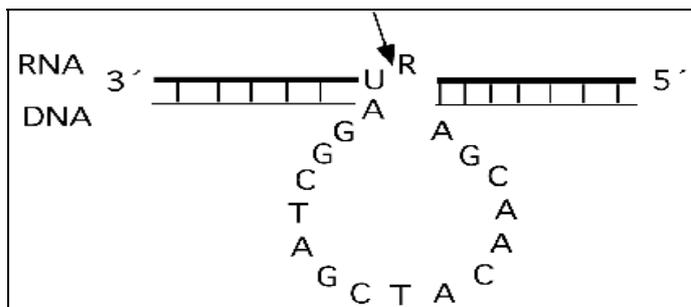


Abbildung 1: Struktur eines 10-23er *DNAzyms*. Der Pfeil (↓) markiert den Ort der enzymatischen Spaltung auf der Ziel-*mRNA*. R ist entweder eine Adenin- oder Guanin-Base.

DNAzyme besitzen gegenüber Ribozymen erhebliche Vorteile: 1.) Eine wesentlich höhere katalytische Aktivität,²⁸ 2.) eine höhere Stabilität *in vivo* und 3.) eine einfachere Synthese. Da *DNAzyme* (Einzelstrang-DNA) verglichen mit Ribozymen (Einzelstrang *RNA*) wesentlich resistenter gegen Fragmentierung durch Endo- und Exonukleasen sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivität der *DNAzyme* nicht nur höher ist, sondern auch aufgrund der höheren Stabilität deutlich länger anhält. *DNAzyme* sind also ideale Konstrukte, sowohl zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze als auch zur Untersuchung von Genfunktionen.

1.2 Stabilität von *DNAzymen* im Serum

Im extrazellulären Raum sind 3' Exonukleasen die hauptsächlich die Stabilität von DNA beeinflussenden Faktoren.²⁹ Endo- und Exonukleasen dienen *in vivo* unter anderem dazu, fehlsynthetisierte DNA-Stränge (Oligonukleotide) abzubauen und die einzelnen Nukleotide für den intrazellulären Stoffwechsel zu *recycle*n. Intrazellulär sind sowohl Endo- als auch Exonukleasen aktiv und stellen einen limitierenden Faktor für Funktion und Stabilität von einzelsträngigen ODN und somit auch *DNAzymen* dar.²⁹

Da *DNAzyme* (Abb.1) aus einzelsträngiger DNA bestehen, ist es notwendig, diese vor einer normalerweise stattfindenden Fragmentierung durch intra- und extrazelluläre Nukleasen zu schützen. Die *in vivo* und *in vitro* am häufigsten verwendeten Stabilisierungen sind phosphatsubstituierte ODN, sogenannte *Phosphothioate (PTO)*.^{30,31} PTO besitzen statt eines nicht überbrückenden Sauerstoff-Atoms der Phosphodiester-Gruppe ein Schwefel-Atom. Eine geringe Zahl von *PTO*-stabilisierten *Antisense-ODN* wird aktuell in klinischen Prüfungen untersucht.³² Diese Studien berichten über relevante, auf die chemische Struktur bezogene Toxizitäten. Im Wesentlichen sind dies mäßige Thrombozytopenien, Hyperglykämien, Komplement und Gerinnungsaktivierungen sowie Hypotonien. Dosislimitierende Toxizität war mit hepatozellulärer Degeneration assoziiert.^{32,33} Werden modifizierte *PTO-Antisense-ODN* in der Zelle fragmentiert, so fallen Spaltprodukte an, die für die DNA- und RNA-Synthese der Zelle wieder verwendet werden können. *PTO*'s und ihre Spaltprodukte kommen natürlicherweise in Zellen nicht vor. In diesem Zusammenhang könnte es durchaus Probleme bei der Langzeitnutzung *in vivo* durch die Toxizität der *PTO* geben.^{34,35} Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte für ein mutagenes Potential von *PTO*, wie sie von bereits klinisch eingesetzten *Topoisomeraseinhibitoren* (Etoposid oder Topotecan) bekannt sind.³⁶⁻³⁸

2 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Erprobung einer vergleichbaren oder stabileren Molekülstruktur für *DNAzyme*, die auf potentiell toxische *PTO* verzichten kann, ohne dabei an katalytischer Aktivität zu verlieren. Das Konstrukt soll als katalytisches Zentrum die beschriebene Sequenz des *10-23er DNAzyms* enthalten. Als Testsystem wurden *DNAzyme* gegen die bei der ALL häufigste Fusions-mRNA Sequenz *TEL-AML1* (resultierend aus der Translokation t12;21) entwickelt,¹⁴ die zur Spaltung derselben geeignet sind.

Der hier gewählte Ansatz sieht dabei vor, *DNAzyme* mit dem bekannten katalytisch wirksamen Nukleinsäuresequenzabschnitt und den diesen Nukleinsäuresequenzabschnitt flankierenden RNA-Sequenz-Bindungsarmen kovalent zu einem zirkulären Konstrukt zu verbinden. Bei diesem Konstrukt ist ein doppelsträngiger, basengepaarter Bereich an beiden Enden von einer einzelsträngigen Schleife flankiert, bei dem sich in einer Schleife die katalytisch wirksame *DNAzym*-Sequenz befindet.

3 Ergebnisse

3.1 Design und Optimierung linearer *DNAzyme* gegen *TEL-AML1-mRNA*

Bei der Herstellung und Konstruktion des *DNAzyms* wurden die 3'- und 5'-Enden der gewählten Schnittstelle komplementär zur kodierenden Sequenz von *TEL-AML1* als so genannte Bindungs-

zyms.²⁷ Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass die gegen *TEL-AML1* gerichteten Kontroll-*DNAzyme* in den *in-vitro* Experimenten keine katalytische Aktivität besitzen (siehe Publikation dieser Arbeit³⁹).

3.3 Design und Optimierung zirkulärer *DNAzyme* (*Circozym*)

Das Design und die Optimierung der katalytischen Aktivität und Spezifität der *DNAzyme* waren Grundlage für die Synthese des zirkulären *DNAzyms*. Hierzu wurden die Bindungsarme der *mRNA*-Zielsequenz *TEL-AML1*-flankierend zu dem katalytischen Sequenzabschnitt angeordnet (Abb. 7). Die optimierte Sequenz des *DNAzyms* 2 konnte erfolgreich in ein Helix-Loop-Helix-Konstrukt integriert und kovalent geschlossen werden. Die kovalente Bindung konnte durch einen t7-DNA-Polymerase Verdau bewiesen werden (Abb. 5). Da die Version 2 des linearen *DNAzyms* die *in vitro* aktivere Form ist, wurde diese Sequenz in zwei zirkularisierten Varianten (*Circozym* 2z und *Circozym* 2zz) getestet. Der Unterschied der beiden synthetisierten *Circozyme* besteht in der Größe des Rings, in den das *DNAzym* integriert wurde. Das *Circozym* 2zz bestand aus einem größeren Ring (60 Basen), in den das *DNAzym* integriert wurde, das *Circozym* 2z bestand aus einem engeren Ring (48 Basen). Ein wesentliches Ergebnis der Untersuchungen der katalytischen Aktivität ist, dass das *Circozym* wie die einzelsträngige *DNAzym*-Variante aktiv ist. Die weiteren Ergebnisse der Untersuchung der katalytischen Aktivität zeigten, dass das *Circozym* 2zz, mit dem größeren Ring, eine bessere katalytische Aktivität aufweist als das kleiner konzipierte *Circozym* 2z (Abb. 4). Alle weiteren Versuche wurden mit diesem Konstrukt durchgeführt.

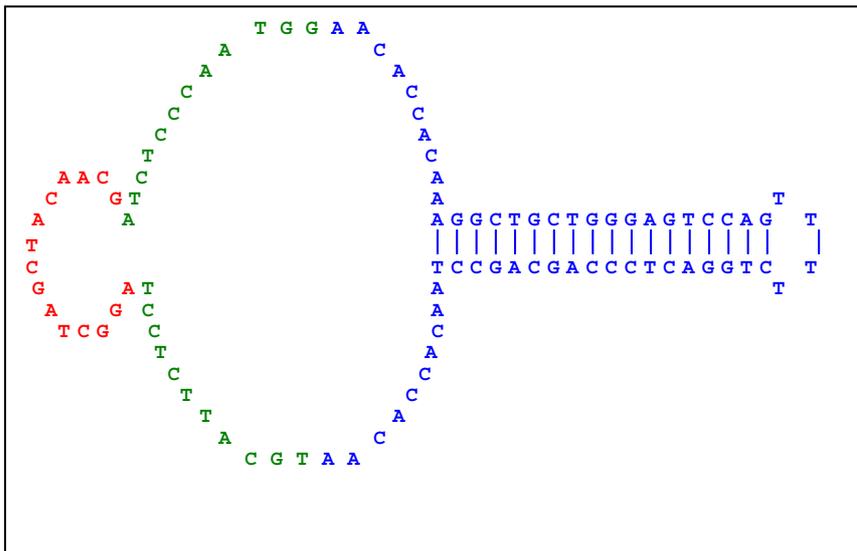


Abb. 4: Struktur des *Circozyms* 2zz
blau – katalytische Sequenz,
schwarz – Substrat-Bindungssequenz,
rot – stabilisierende Sequenz des *Circozyms*,

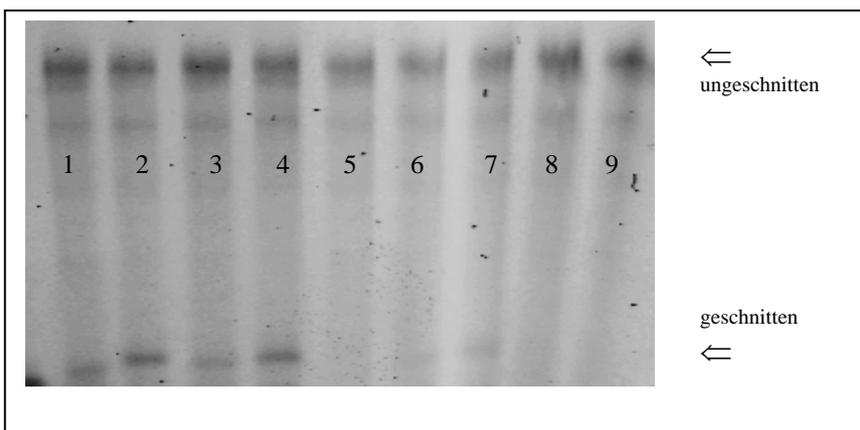


Abb. 5: RNA-Gel-elektrophorese nach *in vitro* Inkubation von *mRNA* mit *Circozymen*. Die Bahnen 1 und 3 zeigen *Circozym* 2z und Bahnen 2 und 4 zeigen *Circozym* 2zz. Die durch die verschiedenen *DNAzyme* unterschiedlich effizient geschnittene *RNA* ist durch einen Pfeil markiert. Bahn 5, 6, 7, 8 sind Kontrollen mit t7-DNA-Polymerase: Kontrolle ohne *DNAzym* in Bahn 9.

3.4 Stabilität linearer und zirkulärer *DNAzyme*

Die *Circozyme* zeigen eine deutlich längere Halbwertszeit im Serum, verglichen mit „klassischen“ *DNAzymen*. Zur Verbesserung der Stabilität und Optimierung der katalytischen Wirkung wurden die *DNAzyme* durch eine in der *Antisense-Technologie* häufig angewandte Modifikation (Phosphothioat-Verbindungen) verändert. Das *DNAzym 2* ist die unmodifizierte Variante. *DNAzym 2.1* wurde an den 5´- und 3´-Enden durch jeweils 3 *PTO* verstärkt. *DNAzyme 2.2* hat die Bindungsarme komplett als *PTO* erhalten. *DNAzym 2.3* ist vollständig mit *PTO-Backbone* synthetisiert. Es zeigt sich, dass die Degradierung von *DNAzym 2* nach 11 Stunden weit fortgeschritten ist. Im Zeitverlauf ist je nach Stabilisierung eine mehr oder weniger schnelle Reduktion des intakten *DNAzyms* zu verzeichnen. Nach 24 h ist kein intaktes unmodifiziertes *DNAzym* nachzuweisen. Die Zirkularisierung sowie Phosphothioatmodifikationen von je drei Bindungen am 5´- und 3´-Ende bzw. sämtlicher Bindungen im *DNAzym* führen zu einer wesentlichen Stabilisierung der Konstrukte, die noch nach mehr als 2 Tagen Inkubationszeit nachweisbar ist.

Vergleicht man die katalytische Aktivität der verschiedenen Stabilisierungen (*Circozym*, *DNAzym 2*, 2.1, 2.2, 2.3), so zeigt sich, dass sich *DNAzyme* mit je drei modifizierten *PTO* am 5´- und 3´-Ende als mit *Circozymen* vergleichbar aktiv erweisen. *DNAzyme* mit mehr als drei *PTO*-modifizierten Basen (*DNAzym 2.2* und 2.3) verlieren deutlich an Aktivität.

Zusammengefasst beweisen die experimentellen Ergebnisse, dass es möglich ist, ein kovalent geschlossenes *Circozym* (*DNAzym*) ohne Verlust der katalytischen Aktivität zu synthetisieren. Dabei erweist es sich als wesentlich stabiler, verglichen mit unmodifizierten - oder einzelnen *PTO*-stabilisierten *DNAzymen*.

4 Diskussion

Mit der Entdeckung der natürlich vorkommenden Ribozyme und der Entwicklung der *DNAzym*- und *RNAi*-Technologie zeigte sich eine völlig neue Eigenschaft von Nukleinsäuren. Hatte man bis dahin DNA/RNA-Moleküle eher als passive Informationsträger angesehen, so demonstrieren sie als Ribozyme oder *siRNA* aktive enzymähnliche und sogar die eigene Sequenz modifizierende Mechanismen.

Je mehr sich diese Konstrukte in der *in vivo*-Anwendung als effizient erweisen, umso wichtiger wird neben der Effektivität auch die biologische und pharmakologische Sicherheit. Dies gilt grundsätzlich sowohl für *DNAzyme* als auch für jedes andere Medikament. Das Ziel dieser Arbeit war, eine geeignete und stabile zirkuläre Molekülstruktur für *DNAzyme* zu konstruieren, herzustellen und zu evaluieren. Vorgabe war ein Verzicht auf toxische *PTO*, ohne dabei die katalytische Aktivität zu beseitigen. Das hier dargestellte *Circozym* bietet einen Lösungsansatz für zwei wesentliche Probleme von linearen *DNAzymen*:

- A) Vermeidung toxischer *PTO*- Verbindungen
- B) Stabilisierung von *DNAzymen*

Zu A) Im Folgenden soll auf die Nebenwirkungen von *PTO* im Zusammenhang mit dem zirkulären *DNAzym* eingegangen werden. Nebenwirkungen von *PTO* sind *in vivo* und *in vitro* gut untersucht.^{32,33} Eine analoge Übertragung der Toxizitätsergebnisse auf *DNAzyme* scheint gerechtfertigt, wenn die chemischen Moleküle von der Strukturformel her vergleichbar sind. Wichtige Voraussetzung ist jedoch eine in etwa vergleichbare Länge der DNA-Sequenzen, um unspezifische Effekte aufgrund der Länge auszuschließen. Eine unbeabsichtigte spezifische Bindung der *DNAzym*-Sequenz muss ebenso ausgeschlossen werden. Sind diese Voraussetzungen gegeben, scheint es legitim, die toxikologischen *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Toxizitätsdaten.^{32,33} von *Antisense-PTO* auf *DNAzyme* zu übertragen.

Die bekannten, dosisabhängigen, unspezifischen Nebenwirkungen von *PTO*-stabilisierten Oligonukleotiden limitieren eine *in vivo*-Anwendung und zeigten sich bereits in Phase III-Studien eines *BCL-2*-spezifischen *ASO*.⁴⁰

Darüber hinaus wird üblichen Stabilisierungen von *DNAzymen* mittels *PTO*- Verbindungen eine topoisomeraseinhibierende Wirkung zugeschrieben.^{41,42} Topoisomeraseinhibitoren wie Etoposid werden für Sekundärleukämien verantwortlich gemacht. Ob es sich hier um einen klinisch relevanten Mechanismus handelt, ist bisher nicht bekannt. Aus Gründen der pharmakologischen Sicherheit ist es deswegen ein wesentliches Ziel, weitere Stabilisierungen für katalytische Nukleinsäuren zu entwickeln und zu evaluieren. Für diesen Aspekt bietet das neue zirkuläre *DNAzym* einen Lösungsansatz. Darüber, wie die spezifische und unspezifische Toxizität der zirkulären *DNAzyme* aussieht, lässt sich bisher nur spekulieren.

Zu B) Der zweite limitierende Faktor der Effektivität von *DNAzymen* ist die Stabilität und reduzierte Aktivität von *PTO*-stabilisierten *DNAzymen in vivo* unter physiologischen Bedingungen.

Der Ansatz, Nukleinsäuren gegenüber extra- und intrazellulären Nukleasen zu schützen, ist besonders in der *ASO*-Technologie entwickelt worden.⁴³ Durch die Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der *DNAzyme* zum *Circozym* konnte ein wesentlicher stabilisierender Effekt erzielt werden. In dieser Arbeit konnte erstmalig bewiesen werden, dass die Stabilisierung von *DNAzymen* durch Exonukleaseverdau mittels einer zirkularisierten, kovalenten Bindung der „freien“ Enden möglich ist. Nachdem es gelang, die Effektivität dieser Methode zu bestätigen, erscheint es sinnvoll, vor einer Erprobung im Zellsystem die Sekundärstruktur von *Circozymen* zu optimieren. Da die Anwendung von zirkulären *ASO* in einem Zellmodell prinzipiell erfolgreich gewesen ist, spricht alles dafür, dass auch *Circozyme* trotz ihrer etwas größeren molekularen Struktur mit etablierten Transfektionsmethoden, wie Lipofektion oder Elektroporation, in die Zelle gebracht werden können. Dabei dürfte die etwas größere molekulare Struktur (ca. 90 Basen) kein wesentliches Hindernis sein. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, ist das *DNAzym* in der zirkularisierten Form weiterhin katalytisch aktiv. Es behält seine Fähigkeit, im Gegensatz zu den einzelsträngigen *DNAzymen*, die Ziel-*RNA* am definierten Bruchpunkt von *TEL-AML* zu hydrolysieren, ohne die Kontrollfragmente *TEL* oder *AML* zu fragmentieren.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Ergebnissen darauf hin, dass der "*proof of principle*" in der beschriebenen Weise für die Stabilisierung von *DNAzymen* durch eine Zirkularisierung gelungen ist. Die katalytische Aktivität von *Circozymen* ist in etwa mit der Aktivität von *PTO*-stabilisierten *DNA-*

zymen vergleichbar. Zum Teil ist sogar ein weitaus größerer Verlust an katalytischer Aktivität durch PTO-Stabilisierung zu vermuten, da die Stabilisierung mittels PTO-Verbindungen mit einem Verlust an katalytischer Aktivität erkaufte wird. Exakte Aussagen über Enzymkinetik von *Circozymen* bleiben jedoch kommenden Untersuchungen vorbehalten. Mit dieser Arbeit konnten das Synthesekonzept und die katalytische Funktion von *Circozymen* bewiesen werden.

5 Methoden

5.1 Klonierung

Eine 400 Basen lange Sequenz des *TEL-AML1*-Transkripts, die den Bruchpunkt zwischen TEL Exon 5 und AML1 Exon 2 enthält, sowie ein die Exons 5–6 bzw. die Exons 1–4 von *AML1* enthaltendes Fragment wurden in ein Plasmid (pCR 2.1) mit T7-Promotor ligiert und kloniert (Topo TA[®]Cloning Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). Zur Bestätigung des Einbaus der korrekten Sequenz wurden die Plasmidinserts sequenziert (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit und ABI Prism 377 Automated Sequencer, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.2 mRNA-Synthese

Zur Synthese von mRNA wurde das RiboMax[™] Kit (T7-Polymerase) verwendet. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Visualisierung erfolgte mittels denaturierender RNA-PAGE-Elektrophorese und SYBRGold-Färbung am Fluorimager (Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig).

5.3 Synthese der *Circozyme*

Zur Herstellung von zirkulären, hantelförmigen *DNAzymen* wurden die beiden verschiedenen, synthetisch hergestellten Oligonukleotide

ODN1 (80mer): 5'-TCCCAGCAGCCTAACACCACAATGCATTCTCCTAGGCTAGCTACAACGAT-
CTCCCAATGGAACACCACAAAGGCTGCT

ODN2 (20mer): 5'-GGGAGTCCAGTTTTCTGGAC, TIBMOBBIOL, Berlin)

am 5'-Ende phosphoryliert. Die beiden einzelnen Oligonukleotide (ODN1 und ODN2) wurden getrennt auf 90 °C erhitzt und zusammen wieder auf Raumtemperatur abgekühlt, damit sich die *stem-loop-stem*-Struktur ausbilden konnte. Die Oligonukleotide wurden in äquimolarem Verhältnis und mit einer Konzentration von 0,55 mg/ml gelöst und die Ligation in Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1.5 mM ATP pH 7.8 bei 25 C) mit 10 Weiss U/mg DNA T4 DNA Ligase (Fermentas UAB, Vilnius, Lithauen) bei 37 C für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Ligase durch Inkubation für 20 Minuten bei 70 °C inaktiviert und nicht ligierte DNA durch einen T7-DNA-Polymerase-Verdau (Fermentas UAB) hydrolysiert.

Nur kovalente Verbindungen können danach stabil bleiben und die zirkularisierten ODN bleiben zurück. Dazu wurde das Volumen mit T7-DNA-Polymerasepuffer (40 mM Tris/HCl; 10 mM MgCl₂; 1

mM DTT pH 7.5 bei 25° C) so vergrößert, dass die DNA-Konzentration nunmehr bei 0.35 mg/ml lag. Es wurden 25 U/mg DNA T7-DNA-Polymerase hinzugefügt und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Anionenaustauschchromatographie an Fractogel-DMAE® (Merck) aufgereinigt. Dazu wurde eine Säule mit 0.5 ml Volumen pro ml DNA hergestellt und in Puffer E (20 mM Tris/HCl; pH 7; 0,4 M NaCl) äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen, mit 10 Gelvolumina Puffer E gewaschen und die DNA mit 10 Gelvolumina Puffer C (20 mM Tris/HCl; pH 7; 0,85 M NaCl) eluiert. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2; 10 mM MgCl₂ und 2 Volumina Ethanol gefällt. Das Endprodukt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Die kovalente Bindung der beiden ODNmere nach der Reinigung wurde mit einem T7-DNA-Polymerase-Verdau bewiesen.

5.4 Synthese einzelsträngiger Desoxyribozyme

Die Oligonukleotide wurden als Produkte aus chemischer Festphasensynthese von einem kommerziellen Hersteller (Firma Metabion, Planegg-Martinsried) synthetisiert. Der katalytische DNAzym-Aktivitäts-Assay (*in vitro*-Schneiden von synthetischer RNA mit DNAzymen) wurde in einem Ansatz von insgesamt 10µl (50 mM Tris-HCL, 10mM MgCl, 150 mM NaCl und 1 % SDS) wie im Artikel beschrieben durchgeführt.

6 Weitere Publikationen

6.1 Cancer Genetics Cytogenetics 2006

Genetic investigations of Saethre-Chotzen syndrome presenting with renal cell carcinoma

Seifert G, Kress W, Meisel C, Henze G, Seeger K.

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie

6.2 Haematologica 2006

Fatal course after administration of rituximab in a boy with relapsed ALL: a case report and review of literature.

Seifert G, Reindl T, Lobitz S, Seeger K, Henze G.

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie

Wir berichten über einen 14 Jahre alten Jungen mit einem frühen Rezidiv einer prä-B lymphoblastischen Leukämie (prä-B) und einem anaplastischen Astrozytom WHO° III. Das Astrozytom konnte subtotalresiziert werden und er erhielt eine Chemotherapie/Strahlentherapie nach dem Protokoll HIT-GBM-D. Im Verlauf zeigte sich, dass die Erkrankung nicht auf die Rezidivtherapie ansprach und es wurde ein Therapieversuch mit einem humanen anti-CD20 Antikörper (IDEC-C2B8, Rituximab) begonnen. Nach einer Teilmenge der Standarddosis (375 mg/m²) musste die Infusion wegen massiver Rückenschmerzen unterbrochen werden. Zwei Tage später wurde die Therapie fortgesetzt. Dabei entwickelte sich ein fataler Verlauf eines systemisch-inflammatorischen Syndroms (systemic inflammatory response syndrome), assoziiert mit einer Sepsis. In dieser Arbeit wird der Verlauf berichtet und auf der Basis eines systematischen Reviews der Literatur diskutiert.

6.3 BMC Cancer 2006

Intraluminal instillation of urokinase and autologous plasma:

A method to unblock occluded central venous ports

Georg Seifert¹, Hanno Riess², Karl Seeger¹, Günter Henze¹ and Anja Borgmann¹

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

Department of Paediatric Oncology/Haematology¹

Department of Hematology and Oncology²

HINTERGRUND: Der therapeutische Nutzen von rekombinanter Urokinase (r-UK) zur Behandlung von Katheterokklusionen erfordert das Vorhandensein von relevanten Mengen Plasminogen, da r-UK für die enzymatische Reaktion auf Plasminogen angewiesen ist. Als „proof of principle“-Studie sollte die Durchführbarkeit und Wirksamkeit des gemeinsamen Einsatzes von r-UK und autologem Plasma zur Beseitigung von Katheterokklusionen, die durch die Routineprozeduren nicht zu behe-

ben waren, untersucht werden. Dazu wurden 5 Patienten eingeschlossen, deren Okklusion durch alleinigen Einsatz von r-UK und Routineprozeduren nicht zu beheben war.

ERGEBNISSE: Alle Patienten wurden erfolgreich mit einer thrombolytischen Therapie mittels r-UK und autologem Plasma behandelt.

DISKUSSION: Der Einsatz von r-UK und autologem Plasma scheint eine sichere und effektive Methode zur Behandlung einer Katheterokklusion zu sein.

6.4 Blood 2002

Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.

Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Wellmann S, **Seifert G**, Henze G, Seeger K.

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie

6.5 Clinical Chemistry 2001

Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology.

Wellmann S, Taube T, Paal K, Graf Einsiedel H, Geilen W, **Seifert G**, Eckert C, Henze G, Seeger K.

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie

7 Publikationen

Publikation 1: Stability and catalytic activity of novel circular DNAzymes; Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2006

Publikation 2: Intraluminal instillation of urokinase and autologous plasma: A method to unblock occluded central venous ports, BMC Cancer 2006

Publikation 3: Genetic investigations of Saethre-Chotzen syndrome presenting with renal cell carcinoma, Cancer Genetics Cytogenetics 2006

Publikation 4: Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002

Publikation 5: Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. Clin Chem. 2001

8 Literaturverzeichnis

1. Scanlon KJ. Anti-genes: siRNA, ribozymes and antisense. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004;5:415-420.
2. Santiago FS, Khachigian LM. Nucleic acid based strategies as potential therapeutic tools: mechanistic considerations and implications to restenosis. *J Mol Med.* 2001;79:695-706.
3. Tomita N, Morishita R. Antisense oligonucleotides as a powerful molecular strategy for gene therapy in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2004;10:797-803.
4. Stein CA, Narayanan R. Antisense oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Oncol.* 1994;6:587-594.
5. Tortora G, Ciardiello F. Antisense strategies targeting protein kinase C: preclinical and clinical development. *Semin Oncol.* 2003;30:26-31.
6. Kobayashi H, Gail Eckhardt S, Lockridge JA, et al. Safety and pharmacokinetic study of RPI.4610 (ANGIOZYME), an anti-VEGFR-1 ribozyme, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;20:20.
7. James HA, Gibson I. The therapeutic potential of ribozymes. *Blood.* 1998;91:371-382.
8. Tanner NK. Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23:257-275.
9. Bartolome J, Castillo I, Carreno V. Ribozymes as antiviral agents. *Minerva Med.* 2004;95:11-24.
10. Breaker RR. Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology. *Nature.* 2004;432:838-845.
11. Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol.* 1994;1:223-229.
12. Pui CH, Evans WE. Genetic abnormalities and drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:383-389.
13. Butturini A, Arlinghaus RB, Gale RP. BCR/ABL and leukemia. *Leuk Res.* 1996;20:523-529.
14. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol.* 2000;12:3-12.
15. Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3185-3193.
16. Zhang H, Altman S. Inhibition of the expression of the human RNase P protein subunits Rpp21, Rpp25, Rpp29 by external guide sequences (EGSs) and siRNA. *J Mol Biol.* 2004;342:1077-1083.
17. Angerer LM, Angerer RC. Disruption of gene function using antisense morpholinos. *Methods Cell Biol.* 2004;74:699
18. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *Rna.* 2002;8:842-850.
19. Schubert S, Kurreck J. Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. *Curr Drug Targets.* 2004;5:667-681.
20. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391:806-811.
21. Tang FC, Yang HB, Meng GL, et al. [RNA interference directed by small hairpin RNA expressed in COS-7 cells]. *Yi Chuan Xue Bao.* 2003;30:295-300.
22. Dash BC, Harikrishnan TA, Goila R, et al. Targeted cleavage of HIV-1 envelope gene by a DNA enzyme and inhibition of HIV-1 envelope-CD4 mediated cell fusion. *FEBS Lett.* 1998;431:395-399.
23. Basu S, Sriram B, Goila R, Banerjee AC. Targeted cleavage of HIV-1 coreceptor-CXCR-4 by RNA-cleaving DNA-enzyme: inhibition of coreceptor function. *Antiviral Res.* 2000;46:125-134.
24. Goila R, Banerjee AC. Sequence specific cleavage of the HIV-1 coreceptor CCR5 gene by a hammer-head ribozyme and a DNA-enzyme: inhibition of the coreceptor function by DNA-enzyme. *FEBS Lett.* 1998;436:233-238.
25. Unwalla H, Banerjee AC. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/Rev RNA. *Biochem J.* 2001;357:147-155.
26. Zhang X, Xu Y, Ling H, Hattori T. Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett.* 1999;458:151-156.
27. Wu Y, Yu L, McMahon R, Rossi JJ, Forman SJ, Snyder DS. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther.* 1999;10:2847-2857.
28. Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4262
29. Akhtar S, Kole R, Juliano RL. Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci.* 1991;49:1793-1801.
30. Hoke GD, Draper K, Freier SM, et al. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5743-5748.
31. Baertschi AJ. Antisense oligonucleotide strategies in physiology. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;101:R15-24.
32. Jason TL, Koropatnick J, Berg RW. Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;201:66-83.
33. Zon G. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides: introductory concepts and possible molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol Lett.* 1995;82-83:419-424.
34. Henry SP, Taylor J, Midgley L, Levin AA, Kornbrust DJ. Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a 4-week study in CD-1 mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997;7:473-481.
35. Henry SP, Monteith D, Bennett F, Levin AA. Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified antisense oligonucleotide inhibitors of PKC-alpha and C-raf kinase. *Anticancer Drug Des.* 1997;12:409-420.
36. Burgin AB, Jr., Huizenga BN, Nash HA. A novel suicide substrate for DNA topoisomerases and site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:2973-2979.
37. Burgin AB. Synthesis and use of DNA containing a 5'-bridging phosphorothioate as a suicide substrate for type I DNA topoisomerases. *Methods Mol Biol.* 2001;95:119-128.
38. Darby MK, Vosberg HP. Relaxation of supercoiled phosphorothioate DNA by mammalian topoisomerases is inhibited in a base-specific manner. *J Biol Chem.* 1985;260:4501-4507.
39. Seifert G, Taube T, Paal K, et al. Brief communication: stability and catalytic activity of novel circular DNAzymes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2006;25:785-793.
40. Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1457
41. Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Wang L, Sun LQ. Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nat Biotechnol.* 1999;17:480-486.
42. Cairns MJ, King A, Sun LQ. Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:2883-2889.
43. Croke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1489:31-44.

9 Erklärung über Art und Umfang der Mitwirkung bei der Bearbeitung des Forschungsthemas und bei der Erstellung der Publikationen

Erklärung

Dieser Dissertationsschrift, die im Rahmen einer Publikationspromotion durchgeführt wurde, liegen die am Ende angegebenen Veröffentlichungen zugrunde. Die verschiedenen Leistungsanteile gliedern sich in die Planung und Durchführung der Experimente, die Erstellung der Manuskripte und in die Bereitstellung der Arbeitsmittel. Der wesentliche Teil entfiel auf die Durchführung der Experimente (Publikation 1), ein geringerer auf die Erstellung der Publikationen und die Einwerbung von Sachmitteln.

Erklärung an Eides Statt

Diese Dissertation ist von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst worden. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Benutzte Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1: Stability and catalytic activity of novel circular DNAzymes; Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2006

70 Prozent; Beitrag im Einzelnen: Einwerbung von Sachmitteln, Planung und Durchführung der Experimente. Erstellung des Manuskriptes.

Publikation 2: Intraluminal instillation of urokinase and autologous plasma: A method to unblock occluded central venous ports, BMC Cancer 2006

70 Prozent; Beitrag im Einzelnen: Sammlung der Daten. Auswertung und Erstellung des Manuskriptes.

Publikation 3: Genetic investigations of Saethre-Chotzen syndrome presenting with renal cell carcinoma, Cancer Genetics Cytogenetics 2006

85 Prozent; Beitrag im Einzelnen: Planung der Untersuchungen und Zusammenstellung der Daten. Auswertung und Erstellung des Manuskriptes.

Publikation 4: Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002

5 Prozent; Beitrag im Einzelnen: Untersuchungen, Auswertung und Erstellung des Manuskriptes.

Publikation 5: Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. Clin Chem. 2001

5 Prozent; Beitrag im Einzelnen: Untersuchungen, Auswertung und Erstellung des Manuskriptes.

PD. Dr. med. Dr. rer. nat. Karlheinz Seeger
Berlin, 21.09.2007

Georg Seifert
Berlin 03.09.2007

10 Lebenslauf

Angaben zur Person und zum Lebenslauf werden aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht gemacht.

11 Erklärung

„Ich, Georg Johannes Seifert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **"Stabilisierung von DNAzymen gegenüber Nukleasen durch Entwicklung eines zirkulären DNAzyms"** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 21.09.2007

Georg Seifert

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. rer. nat. Dr. med. Karlheinz Seeger für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche und begeisternde Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Tillmann Taube möchte ich herzlich für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung danken. Herrn Dr. rer. nat. Matthias Schroff danke ich für die Unterstützung bei der Synthese der Circozyme.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für die unterstützende Begleitung.

Berlin, 21.09.2007

Georg Seifert