

**„Isolierung und funktionelle Charakterisierung von
Saccharid mimikrierenden Peptiden zur Blockierung der
Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an Epithelien des
Respirationstraktes“**

D I S S E R T A T I O N

**Im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

vorgelegt von

Jens Franke

Hamburg 2004

Tag der Disputation: 09 Juli 2004

Gutachter: Prof. Dr. Hans Marquardt

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Gutachter: Dr. Patrick Ziegemüller

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Melitta Schachner im Zentrum für Molekulare Neurobiologie an der Universität Hamburg angefertigt. An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, all jenen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen danke ich:

Frau Prof. Dr. Melitta Schachner für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung.

Herrn Prof. Dr. Hans Marquardt für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit sowie die Vertretung meiner Arbeit im Fachbereich.

Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst und Herrn Dr. Kashinath S. Sadalapure und den Laborkollegen für die Kooperationsbereitschaft und kompetente wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung der Disaccharid-Synthese.

Herrn PD. Dr. Karl-Erich Jaeger und seinen Mitarbeiter für das zur Verfügung stellen des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-II.

Herrn Dr. A. Salam Khan für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung bei der Entwicklung des *in vitro* Tests.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher für die freundliche Unterstützung.

Meinen Laborkollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre freundliche und motivierende Unterstützung.

Publikationen

Simon-Haldi M., Mantei N., Franke J., Voshol H. und Schachner M. (2002)
Identification of a peptide mimic of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope.
J Neurochem. **83**, 1380-1388.

Franke J., Sadalpure K. S., Schachner M. und Lindhorst T.K. (2004) Synthesis of
analogs of carbohydrate receptor sequence, D-GalNAc-(1→4)-β-D-Gal found in
binding to *Pseudomonas aeruginosa* pili. *Carbohydr. Res.*, eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Zusammenfassung	4
3	Abkürzungen	7
4	Einleitung	9
4.1	Mukoviszidose/ Cystische Fibrose	9
4.2	Mukoziliäre Clearance	16
4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
4.4	Therapie	24
5	Zielsetzung	28
6	Material und Methoden	32
6.1	Chemikalien	32
6.2	Material und Geräte	37
6.3	Firmenverzeichnis	38
6.4	Methoden	39
6.4.1	Allgemeine Methoden	39
6.4.1.1	Biotinylierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	39
6.4.1.2	Peptid-BSA-Konjugate	39
6.4.1.2.1	Lösungen und Medien	39
6.4.1.3	Darstellung von Peptid-BSA-Konjugaten	40
6.4.1.4	Darstellung von Peptid-BSA-Konjugaten mit Hilfe des „Albumin Konjugations Kits“	40
6.4.1.5	BCA-Proteinbestimmung	41
6.4.1.6	Bestimmung der willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren	41
6.4.2	<i>Biopanning</i> mit <i>Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit</i>	41
6.4.2.1	Lösungen und Medien	41
6.4.2.2	<i>Biopanning</i> mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	44
6.4.2.2.1	Immobilisierung der Lectine an MaxiSorp Röhrchen	44
6.4.2.2.2	<i>Biopanning</i> -Runde I	44
6.4.2.2.3	Titerbestimmung und Amplifizierung der Eluate	45
6.4.2.2.4	Aufbereitung des Amplifikates (Trennung der Phagen von <i>E. coli</i>)	45
6.4.2.2.5	Präzipitation/ Aufbereitung der amplifizierten Eluate	45
6.4.2.2.6	<i>Biopanning</i> -Runde II und Runde III	46
6.4.2.2.7	Isolierung einzelner bindender Phagen	46
6.4.2.2.8	DNA-Fällung der einzelnen isolierten Phagen	47
6.4.2.2.9	Sequenzierung der Phagen DNA	47
6.4.2.2.10	Amplifikation einzelner bindender Phagen-Lösungen	47
6.4.2.3	Erneutes <i>Biopanning</i> mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	48

6.4.2.4	<i>Biopanning</i> mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II und synthetischem biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144)	48
6.4.2.4.1	Immobilisierung von Epoxybeads M270	48
6.4.2.4.2	<i>Biopanning</i> -Runde I	49
6.4.2.4.3	<i>Biopanning</i> -Runde II und III	50
6.4.2.5	Erneutes <i>Biopanning</i>	50
6.4.3	ELISA mit amplifizierten Phagenlösungen	50
6.4.3.1	Lösungen und Medien	50
6.4.3.2	Immobilisierung von Lectin PA-I an ELISA Modulen und Phagen-Bindung	51
6.4.3.3	Immobilisierung von PA-II und PAK-Pilin-Protein (128-144) an ELISA Modulen und Phagen-Bindung	52
6.4.4	Kompetition der Phagen-Bindung an adsorbiertem Lectin	52
6.4.4.1	Lösungen und Medien	52
6.4.4.2	Kompetition der Phagen-Bindung an adsorbiertem Lectin PA-I	53
6.4.4.3	Kompetition der Phagen-Bindung an adsorbiertem PA-II und PA-I	53
6.4.4.4	Kompetition der Bindung des Phagen A, SSAWWSYWPPVA, bei höherer Saccharid-Konzentration	53
6.4.5	Inhibition von spezifischen Bindungen durch synthetisierte Peptide	54
6.4.5.1	Lösungen und Medien	54
6.4.5.2	Inhibition der Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I mit Peptiden	55
6.4.5.3	Inhibition der Phagen-Bindung an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-II durch synthetisierte Peptidsequenzen	55
6.4.5.4	Inhibition der Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1	56
6.4.6	Bindungsstudien in Anwesenheit von Peptid-BSA-Konjugaten	57
6.4.6.1	Bindung des biotinylierten Lectins PA-I an Peptid-BSA-Konjugate	57
6.4.6.2	Inhibition der Bindung des biotinylierten Lectins an Peptid-BSA-Konjugate	57
6.4.6.3	Kompetition der Bindung des Phagens (A) SSAWWSYWPPVA an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II Oberfläche durch BSA-Peptid Konjugate	58
6.4.7	Funktioneller Test <i>in vitro</i>	58
6.4.7.1	Lösungen und Medien	58
6.4.7.2	Inhibition der Adhäsion biotinylierter <i>Pseudomonas aeruginosa</i> an A549 menschliche Lungenkarzinomzellen	58
6.4.7.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Kultur und Biotinylierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
6.4.7.2.2	Adhäsions-Experiment	60
6.4.8	Plasmon-Resonanz Methode (BIACORE)	60
6.4.8.1	Immobilisierung von Streptavidin auf dem Sensor-CM5-BIACORE-Chip und Adsorption von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	61
6.4.8.2	Immobilisierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I auf dem Sensor-SA-BIACORE-Chip	61
6.4.8.3	Bindungsstudien an adsorbiertem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I auf dem Sensor-CM5-BIACORE-Chip	62
6.4.8.4	Bindung der BSA-Konjugate auf immobilisiertem Sensor-CM5-BIACORE-Chip	62
6.4.8.5	Kompetitionsstudien auf immobilisiertem Sensor-SA-BIACORE-Chip	62

6.4.8.6	Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Peptids SHLDPTLFPLYKG	62
6.4.9	Darstellung von Octyl-4- <i>O</i> -(2-desoxy-2-acetamido- β -D- galactopyranosyl)-2- <i>O</i> - <i>n</i> -propyl- β -D-galactopyranosid	63
6.4.9.1	Octyl-3,4- <i>O</i> -isopropyliden- β -D-galactopyranosid (6)	64
6.4.9.2	Octyl-6- <i>O</i> -tert-butyltrimethylsilyl-3,4- <i>O</i> -isopropyliden- β -D-galactopyranosid (7)	65
6.4.9.3	Octyl-6- <i>O</i> -tert-butyltrimethylsilyl-3,4- <i>O</i> -isopropyliden-2- <i>O</i> -propyl- β -D-galactopyranosid (8)	66
6.4.9.4	Octyl-2- <i>O</i> -propyl- β -D-galactopyranosid (9)	67
6.4.9.5	Octyl-3,6-di- <i>O</i> -benzoyl-2-propyl- β -D-galactopyranosid (10)	68
6.4.9.6	Thiomethyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-2- <i>N</i> -DTPM- β -D-galacto- pyranosid (12)	69
6.4.9.7	Octyl-3,6-di- <i>O</i> -benzoyl-2- <i>O</i> -propyl-4- <i>O</i> -(3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl -2-desoxy-2- <i>N</i> -DTPM- β , α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (13 und 14)	70
6.4.9.8	Octyl-3,6-di- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -propyl-4- <i>O</i> -(2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (15)	72
6.4.9.9	Octyl-3,6-di- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -propyl-4- <i>O</i> -(2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (16)	73
6.4.9.10	Octyl-2- <i>O</i> -propyl-4- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (3)	74
6.4.9.11	Octyl-2- <i>O</i> -propyl-4- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (4)	75
7	Ergebnisse	76
7.1	D-Galactose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	76
7.2	L-Fucose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	90
7.3	β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal mimikrierendes/de Peptid/ Peptide zur Inhibition des Pilus	99
7.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	105
8	Diskussion	107
8.1	D-Galactose-Replika-Peptid zur Inhibition des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I	108
8.2	L-Fucose-Replika-Peptid zur Inhibition des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-II	111
8.3	β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-Replika-Peptid zur Inhibition des Pilus	113
9	Literatur	120

Inhaltsverzeichnis

10	Anhang	134
10.1	Tabellarischer Anhang	134
10.2	Lebenslauf	150
10.3	Eidesstattliche Erklärung	151

1 Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitary and opportunistic gram negative bacterium. Patients who suffer from the autosomal-recessive cystic fibrosis have an infection with the antibiotics resistant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, which leads to a lethal progression of the disease (Elkin and Geddes, 2003; Warneer, 1992). The adhesion to epithelial cells of the respiratory tract is deemed to be the initiating step in *Pseudomonas aeruginosa* infection. The D-galactose-specific lectin PA-I, as well as the L-fucose-specific lectin PA-II and the pili plays an important role in the adhesion. The GalNAc-Gal-specific adhesion function of the pili is located at the pilin subunits which assemble the pili. The main concern is the development of effective therapeutics. The employment of equal saccharides for the inhibition of the adhesion is limited by glycolysis which leads to a short half life of the saccharides, of a few minutes. To manage this problem it is necessary to transfer the characteristics of the saccharides to other molecules. The possibility to use peptides to mimic saccharides was the basis for the thesis. The aim of this thesis was the search for glyco-replica-peptides able to mimic saccharide-structures which play important roles in the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to epithelial cells of the respiratory tract by *Random Peptide Phage Display Libraries*. The use of *Random Peptide Phage Display Libraries* affords the employment of peptide presenting phages with a variance of 10^8 to 10^{10} . The peptide displayed by the phage which is interacting with the target is easy to identify by the inserted sequences in the phage genome. The D-galactose-specific lectin PA-I, the L-fucose-specific lectin PA-I and a synthesized peptide of the pilin subunit, PAK-Pilin-Protein (128-144) KCTSDQDEQFIPKGCSK were chosen as targets for the isolation of possible glyco-replica-peptides. A commercial 12-mer *Random Peptide Phage Display Library* was used for each *in vitro* selection process, called *Biopanning*. The *Biopanning* with the D-galactose-specific lectin PA-I identified to specific binding phages with the sequence **SHLDPTLFPLYK**. These phages were found by specific elution with phenyl-β-D-galactopyranoside and also by an unspecific elution with glycine-HCl (pH 2,2). A consensus sequence of eight amino acids **PTLFPLYK** was identified. The binding of the phage with the sequence **SHLDPTLFPLYK** showed the highest affinity to the Lectin PA-I and was inhibited

by the phenyl- β -D-galactopyranoside, whereas phenyl- β -D-glucopyranoside used as control showed no inhibition.

The binding of the biotinylated *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-I to the adsorbed glycoprotein P1 was inhibited in a concentration dependant manner by Phenyl- β -D-galactopyranosid and by the identified peptide. By this way the mimic potential of the identified peptide was confirmed. The specificity of this sequence was approved by competition studies with the synthesized peptide sequence using the *surface plasmon resonance* method (BIAcore). In a functional *in vitro* test the binding of the of biotinylated bacteria *Pseudomonas aeruginosa* to A549 human lung carcinoma cells could be inhibited by the found D-galactose-replica-peptide. For the first time a D-galactose-replica-peptide was found that achieved the desired function.

For the L-fucose-specific lectin PA-II *Biopanning* was performed with specific L-fucose elution and repeated two times. The first *Biopanning* yielded 19 specific binding phages. The two sequences (A) **SSAWWSYWPPVA** (7 x) and (B) **SWPYSFWFPLEN** (5 x) were found with high frequency. The second *Biopanning* yielded 31 specific binding phages. The sequence (C) **ILANDLTAPGPR** (15 x) and (D) **AHRHPISFLSTL** (6 x) were found with high frequency. These four phages bound to the target L-fucose-specific lectin PA-II as well as to the D-galactose-specific lectin PA-I. The binding of the phages to the L-fucose-specific lectin PA-II could only be inhibited by very high concentrations of L-fucose. Further investigations of the specificity of the identified phages for the lectin PA-II binding were confined to the sequence (A) **SSAWWSYWPPVA** because of the highest ratio of hydrophobic amino acids. A higher affinity of hydrophobic ligands to the *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-II was described by Garber et al. (1987 and 1992). There were no differences for inhibition of the phage binding between the synthesized peptide **SSAWWSYWPPVAC** and by a scrambled peptide with an arbitrary order of the 12 amino acids. The peptide **HSVSNIRPMFPSC** from the *Biopanning* against the PAK-Pilin-Protein (128-144) used as control showed no inhibition. The specificity of the peptide sequence **SSAWWSYWPPVAC** was demonstrated on the basis of a BSA-conjugate. The BSA-conjugate of the arbitrary sequence and the control BSA-conjugate showed no inhibition of the phage binding. The peptide-**SSAWWSYWPPVAC**-BSA-conjugate showed an inhibition of 31 %.

With the non-biotinylated PAK-Pilin-Protein (128-144) the *Biopanning* yielded 18 specific binding phages. For the investigations of the specificity the most frequently identified sequence **HSVSNIRPMFPS** was used. The binding of the biotinylated PAK-Pilin-Protein (128-144) to the ganglioside asialo GM1 was inhibited by the synthesized peptide **SSAWWSYWPPVAC** and as well as by the peptide with an arbitrary order of the 12 amino acids. There were no significant differences between the two peptides. A control peptide showed no inhibition.

Three glyco-replica-peptides were isolated and identified which mimic the searched saccharide-ligands for inhibition of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*.

- **S H L D P T L F P L Y K** as D-galactose-replica-peptide
- **S S A W W S Y W P P V A** as L-fucose-replica-peptide
- **H S V S N I R P M F P S** as β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-replica-peptide

Further investigations are necessary to employ these peptides to protect cystic fibrosis patient from infection with *Pseudomonas aeruginosa* and increase the life expectancy of the patients.

2 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitäres und opportunistisches gramnegatives Bakterium. Bei Patienten mit autosomal-rezessiver Mukoviszidose nimmt die Infektion mit dem Antibiotika resistenten Bakterium, *Pseudomonas aeruginosa*, einen letalen Verlauf (Elkin und Geddes, 2003; Warneer, 1992). Die Adhäsion an die Epithelien des Respirationstraktes gilt als initiiender Schritt einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion. Eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion des Bakteriums an Saccharid-Liganden spielt das D-Galactose-spezifische Lectin PA-I, das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II und die Pili. Die GalNAc-Gal-spezifische Adhäsionsfunktion der Pili ist auf den Pilin-Untereinheiten lokalisiert, aus denen die Pili aufgebaut sind. Ein Hauptinteresse gilt der Entwicklung spezifischer Therapeutika zur Inhibition der Adhäsion. Der Einsatz der entsprechenden Saccharide ist unter anderem aufgrund der geringen Halbwertszeit der Saccharide von nur wenigen Minuten durch die Glycolyse eingeschränkt. Um dieses Problem zu lösen, wird versucht die Eigenschaften der Saccharide auf andere Moleküle zu übertragen. Die Möglichkeit, Saccharide mittels Peptiden zu mimikrieren, war die Grundlage dieses Forschungsvorhabens. Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von *Random Peptide Phage Display Libraries* Glyco-Replika-Peptide zu finden, die in der Lage sind, Saccharidstrukturen zu mimikrieren. Diese sind für die Adhäsion des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* an die Epithelzellen des Respirationstraktes essentiell. Die Verwendung von *Random Peptide Phage Display Libraries* ermöglicht den Einsatz von Peptid präsentierenden Phagen mit einer Varianz von 10^8 - 10^{10} . Das mit dem *Target* interagierende vom Phagen exprimierte Peptid ist durch die Insertionssequenz im Phagen genom leicht zu identifizieren. Für die Isolierung möglicher Glyco-Replika-Peptide zur Inhibition der Adhäsion des Bakteriums wurden als *Target* das D-Galactose-spezifische Lectin PA-I, das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II und ein synthetisiertes Peptid der Pilin-Untereinheit, das PAK-Pilin-Protein (128-144) KCTSDQDEQFIPKGCSK, eingesetzt. Eine kommerzielle 12-mer *Random Peptide Phage Display Library* wurde jeweils für den *in vitro* Selektionsprozess, das *Biopanning*, eingesetzt. Beim *Biopanning* mit dem D-Galactose-spezifischen *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I wurden spezifisch bindende Phagen mit der Peptidsequenz **SHLDPTLFPLYK** gefunden. Diese Phagen wurden sowohl bei spezifischer Elution mit Phenyl-β-D-

galactopyranosid als auch bei unspezifischer Elution mit Glycin-HCl (pH 2,2) gefunden. Bei den Sequenzen der an das Lectin PA-I bindenden Phagen konnte eine Konsensussequenz **PTLFPLYK** von acht Aminosäuren identifiziert werden. Die Bindung des Phagens mit der Peptidsequenz **SHLDPTLFPLYK** zeigte die höchste Affinität zum Lectin PA-I und ließ sich durch Phenyl-β-D-galactopyranosid kompetitieren, während das als Kontrolle eingesetzte Phenyl-β-D-glucopyranosid keine Competition zeigte. Die Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an adsorbiertes Glycoprotein P1 konnte konzentrationsabhängig durch Phenyl-β-D-galactopyranosid so wie durch das identifizierte Peptid inhibiert werden. Hierdurch konnte das Vorliegen eines Glyco-Replika-Peptids bewiesen werden. Die Spezifität dieser Sequenz konnte zusätzlich durch Kompetitionsstudien mit der synthetisierten Peptidsequenz mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Methode (BIAcore) bestätigt werden. In einem funktionellen *in vitro* Test konnte die Bindung biotinylierter Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* an menschlichen Lungenkarzinomzellen A549 hier erstmalig durch das gefundene D-Galactose-Replika-Peptid inhibiert werden.

Für das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II wurden zwei unabhängige *Biopannings* mit L-Fucose Elution durchgeführt. Im ersten *Biopanning* wurde bei 19 bindenden Phagen die Sequenz (A) **SSAWWSYWPPVA** (7mal), und (B) **SWPYSFWFPLEN** (5mal), gefunden. Beim zweiten *Biopanning* wurde bei 31 bindenden Phagen die Sequenz (C) **ILANDLTAPGPR** (15mal) und (D) **AHRHPISFLSTL** (6mal), identifiziert. Die vier Phagen banden sowohl an das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II (*Target*) als auch an das D-Galactose-spezifische Lectin PA-I. Die Bindungen der Phagen an das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II waren mit L-Fucose erst bei sehr hohen Konzentrationen inhibierbar. Weiterführende Untersuchungen zur Spezifität der gefundenen Phagen für das Lectin PA-II wurden aufgrund des höchsten Anteils von hydrophoben Aminosäuren auf die Sequenz **SSAWWSYWPPVA** (A) beschränkt. Eine höhere Affinität von hydrophoben Liganden an das *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II ist bei Garber et al. (1987 und 1992) beschrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Inhibition der Phagen-Bindung zwischen dem synthetisierten Peptid **SSAWWSYWPPVAC** und dem Kontroll-Peptid mit der willkürlichen Reihenfolge der 12 Aminosäuren der Sequenz festgestellt werden. Das hier als Kontrolle verwendete Peptid **HSVSNIRPMFPSC** aus dem

Biopanning mit PAK-Pilin-Protein (128-144) zeigte hingegen Inhibition. Die Spezifität der Peptidssequenz **SSAWWSYWPPVAC** konnte anhand von BSA-Konjugaten nachgewiesen werden. Das BSA-Konjugat des Peptids mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren und das Kontroll BSA-Konjugat zeigten keine Inhibition der Phagen-Bindung. Das Peptid-**SSAWWSYWPPVAC**-BSA-Konjugat zeigte eine Inhibition von 31 %.

Mit dem nicht biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144) konnten im *Biopanning* mit unspezifischer Elution 18 bindende Phagen isoliert werden. Zur Untersuchung der Spezifität wurde die am häufigsten vorkommende Sequenz **HSVSNIRPMFPS** verwendet. Die Bindung des biotinylierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1 ließ sich sowohl mit dem synthetisierten Peptid als auch mit dem Peptid mit willkürlicher Reihenfolge der Aminosäuren der Sequenz inhibieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Peptid und dem Peptid mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren detektiert werden. Ein weiteres Kontroll-Peptid aus dem *Biopanning* mit Lectin PA-II zeigte keine Inhibition der Bindung des biotinylierten PAK-Pilin-Proteins an das Glycosphingolipid asialo-GM1.

Es konnten drei Glyco-Replika-Peptide isoliert und identifiziert werden, die die gesuchten Saccharid-Liganden zur Inhibition der Adhäsion des Bakteriums mimikrieren.

- **S H L D P T L F P L Y K** als D-Galactose-Replika-Peptid
- **S S A W W S Y W P P V A** als L-Fucose-Replika-Peptid
- **H S V S N I R P M F P S** als β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-Replika-Peptid

Nach weiteren Untersuchungen könnten diese zum Schutz der Mukoviszidose-Patienten vor der *Pseudomonas aeruginosa* Infektion eingesetzt werden, um so die Lebenserwartung der Patienten zu erhöhen.

3 Abkürzungen

A	
ABC	ATP-Binding-Cassette
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz
AHC	Austrian Health Communication
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B	
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovine Serum Albumin/Rinderserumalbumin
C	
cAMP	Adenosin-3',5-monophosphat
CCA	α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure
Cer	Ceramid
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
D	
DC	Dünnschichtchromatographie
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTPM	1,3-Dimethyl-2,4,6-(1H,3H,5H)-trioxypyrimidin-5-yliden-methyl
E	
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelial Sodium Channel
F	
FCS	Foetal Bovin Serum/foetales Kälberserum
G	
Gal	D-Galactose
GalNAc	N-Acetyl-D-Galactosamin
Glc	D-Glucose
x g	Fallbeschleunigung
H	
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
I	
IPTG	D-Thiogalactosid
J/K	
ka	Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die bimolekulare Assoziation
K _D	Bindungskonstante
kd	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die unimolekulare Dissoziation
kDa	Kilo Dalton
L	
LB	Luria-Bertani

Abkürzungen

M

M Mol

MALDI-TOF Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry

ml Milliliter

N

NBF1 Nukleotidbindungsfalte 1

NBF2 Nukleotidbindungsfalte 2

NIS N-Iodsuccinimid

O

OD₆₀₀ Optische Dichte bei 600 nm

ORCC Outwardly Rectified Chloride Channel

P

PBS Phosphate-Buffered Saline

pfu plaque forming units

ppm parts per million

Q/R

rpm rounds per minute/Umdrehungen pro Minute

RT Raumtemperatur

RU *Resonance Units*/Resonanzeinheiten

S

Sec Sekunden

SPR Surface-Plasmon-Resonance

T

TBDMSCl tert-Butyldimethylchlorsilan

TFA Trifluoressigsäure

TfOH Trifluormethansulfonsäure

TM1 Transmembranregion 1

TM2 Transmembranregion 2

TMS Tertamethylsilan

Tris-HCl Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

U/V/W/X

Xgal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Y/Z

4 Einleitung

Die Infektionen mit dem Antibiotika resistenten Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* sind verantwortlich für Morbidität und Mortalität bei Mukoviszidose-Patienten (Emerson et al., 2002; Koch und Hoiby, 1993).

4.1 Mukoviszidose/ Cystische Fibrose

Der Name Mukoviszidose (lat. Mucus: Schleim, viscidus: klebrig, zähflüssig) geht auf Farber zurück (Farber, 1944) und beschreibt den bei der Krankheit produzierten und abgesonderten zähen Schleim. Die Gewebeumwandlung der befallenen Organe durch Schleimdrüsen wird eher im Synonym Cystische Fibrose wiedergegeben (Tutas, 1998; Zink und Zabransky, 2000).

Laut der AHC Austrian Health Communication (2003) ist die Mukoviszidose definiert als autosomal-rezessive vererbliche Erkrankung, bei der eine pathologische Zusammensetzung der exokrinen Drüsensekrete zu charakteristischen sekundären Organveränderungen führt.

Mukoviszidose ist die häufigste autosomal-rezessive letale Erbkrankheit der weißen (kaukasischen) Bevölkerung (Leutz und Sybrecht, 2001). Abhängig vom ethnischen Ursprung liegt die Inzidenz in Nordamerika und Europa zwischen 1:2.500 und 1:1.600, in der asiatischen Population bei 1:100.000 und bei der afrikanisch-amerikanischen Bevölkerung unter 1:17.000 (Gallati, 2001). Die mittlere Inzidenz der kaukasischen Bevölkerung liegt bei 1:3200 (The Cystic Fibrosis Foundation, 2003). Etwa 5 % der kaukasischen Bevölkerung sind heterozygote Erbmalerträger, (AHC, 2003; Zink und Zabransky, 2000), d. h. sie tragen ein gesundes und ein mutiertes CF-Allel und sind klinisch asymptomatisch (Gallati, 2001). In der deutschen Bevölkerung sind etwa vier Millionen Menschen heterozygot (HEXAL AG, 2003; Tutas, 1998). Die Angaben zur Zahl der Patienten mit Cystischer Fibrose in Deutschland schwanken zwischen ca. 4.000 (Leutz und Sybrecht, 2001) und 8.000-10.000 (HEXAL AG, 2003). Jährlich werden etwa 400 homozygote Kinder geboren (Tutas, 1998).

Die Mukoviszidose ist eine seit langem bekannte Krankheit. Bereits im Jahre 1606 beschrieb der spanische Anatom Alfonso y de los Ruyzes die Krankheit (Deutsches Humangenomprojekt, 2003; Tutas, 1998). In folkloristischen Überlieferungen aus dem Mittelalter findet man weitere Hinweise auf die Krankheit:

„Das Kind stirbt bald wieder, dessen Stirne beim Küssen salzig schmeckt“ (Wood et al., 1976). Das für die Mukoviszidose verantwortliche Gen wurde im Jahr 1985 auf dem Chromosom 7 (7q31) lokalisiert (Tsui et al., 1985; Wainwright et al., 1985; White et al., 1985) und im Jahre 1989 charakterisiert (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989) (siehe **Abbildung 1A**).

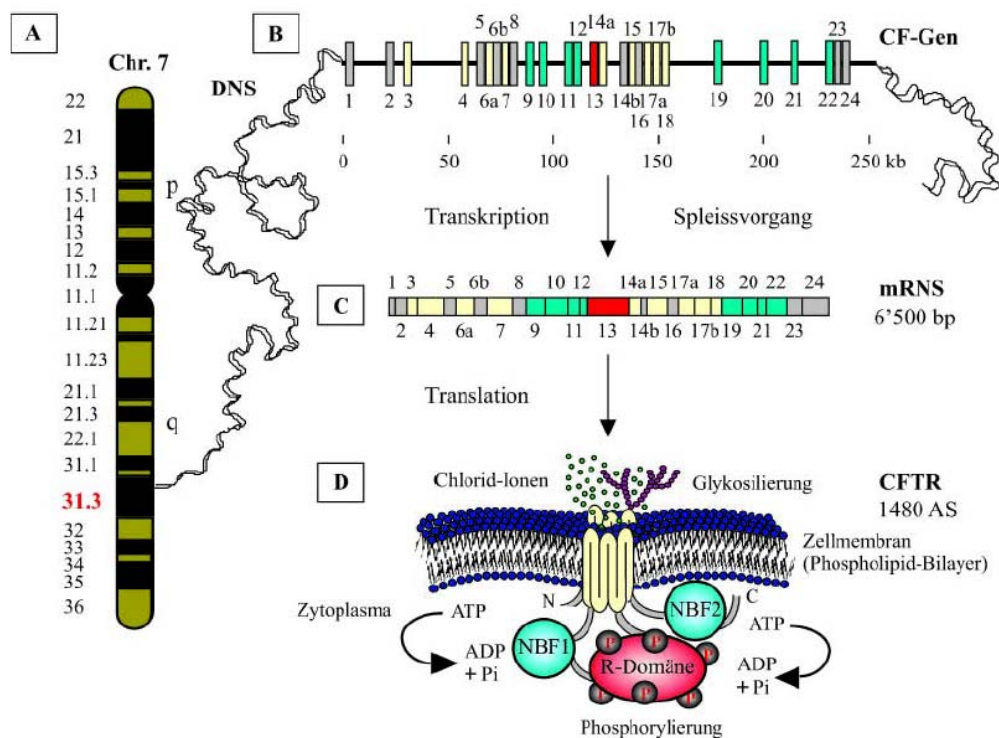


Abbildung 1: Molekulare Grundlagen der Cystischen Fibrose. Quelle: Gallati (2001). Auf dem Chromosom 7 (7q31) (A) erstreckt sich das Gen mit 27 Exons über 250.000 Basenpaare (B). Das Transkript des Gens führt zu einer 6.500 Basen langen mRNA (C). Die Translation der mRNA führt zum 1480 Aminosäuren langen membranständigen Glycoprotein CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, das als Chloridkanal fungiert (D).

Das Gen besteht aus 27 Exons und erstreckt sich über 250.000 Basenpaare (siehe **Abbildung 1B**). Die Transkription des Gens führt zu einer 6.500 Basen langen mRNA (siehe **Abbildung 1C**). Das Transkript kodiert für das aus 1480 Aminosäuren zusammengesetzte membranständige Glycoprotein CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (siehe **Abbildung 1D**). Es wird in Lunge, Hoden, Darm, Luftröhre, Niere, Bauchspeicheldrüse und Schweißdrüsen exprimiert (Crawford et al., 1991). Vom N-Terminus beginnt die Sekundärstruktur des Proteins mit einer aus sechs hydrophoben Segmenten (Loops) bestehenden Transmembranregion (TM1), gefolgt von einer ATP bindenden Nukleotidbindungsfalte (NBF1). Anschließend folgt die regulatorische R-Domäne. Ein weiteres Set von sechs membrandurchspannenden Segmenten bildet die zweite Transmembranregion (TM2). Die folgende zweite ATP bindende Nukleotidbindungsfalte (NBF2) vervollständigt die symmetrische Struktur des Proteins (Gallati, 2001; Helmkamp, 2000; Morales et al., 1999) (siehe **Abbildung 1D**). Die Nukleotidbindungsfalten (NBF1 und NBF2) und die regulatorische R-Domäne sind im Zytoplasma lokalisiert. Die Struktur zeigt Homologie zur Familie der ABC-ATP-Binding-Cassette Transporter. Die ABC-Transporter sind durch zwei membranintegrierte Domänen und zwei im Zytoplasma befindliche Nukleotidbindungsfalten charakterisiert. Diese Nukleotidbindungsfalten enthalten die beiden charakteristischen Sequenzmotive (Walkerboxen A: GylxxGlyxGlyLysThr/Ser und B: hhhhAsp; x: beliebige Aminosäure, h: beliebige hydrophobe Aminosäure), die für die Bindung und Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zur Energiegewinnung verantwortlich sind (Schneider, 2000). ATP-bindende Proteindomänen enthalten zusätzlich eine Signatursequenz, LeuSerGlyGylGlnGln/Arg/LysArg, die zur Identifizierung genutzt wird. Mutationen in dieser Signatursequenz führen zu schweren Fällen der Mukoviszidose (Schneider, 2000). Das CFTR-Protein fungiert als Chloridkanal. Die Aktivierung des Chloridionen-Transports erfolgt durch Phosphorylierung der multiplen Serinreste in der R-Domäne durch die von zyklischem Adenosin-3',5-monophosphat (cAMP) abhängige Proteinkinase A, meist nach β -adrenerger Stimulation der Epithelzellen. Das Öffnen und Schließen der aus den zwei Transmembranregionen gebildeten Pore wird durch Bindung und Hydrolyse von ATP an den Nukleotidbindungsfalten reguliert.

Die Dephosphorylierung der Serinreste in der R-Domäne durch Phosphatase 2C versetzt den Kanal in seinen Ruhezustand (Akabas, 2000; Helmkamp, 2000; Sheppard und Welsh, 1999; Welsh und Smith, 1995) (siehe **Abbildung 2**).

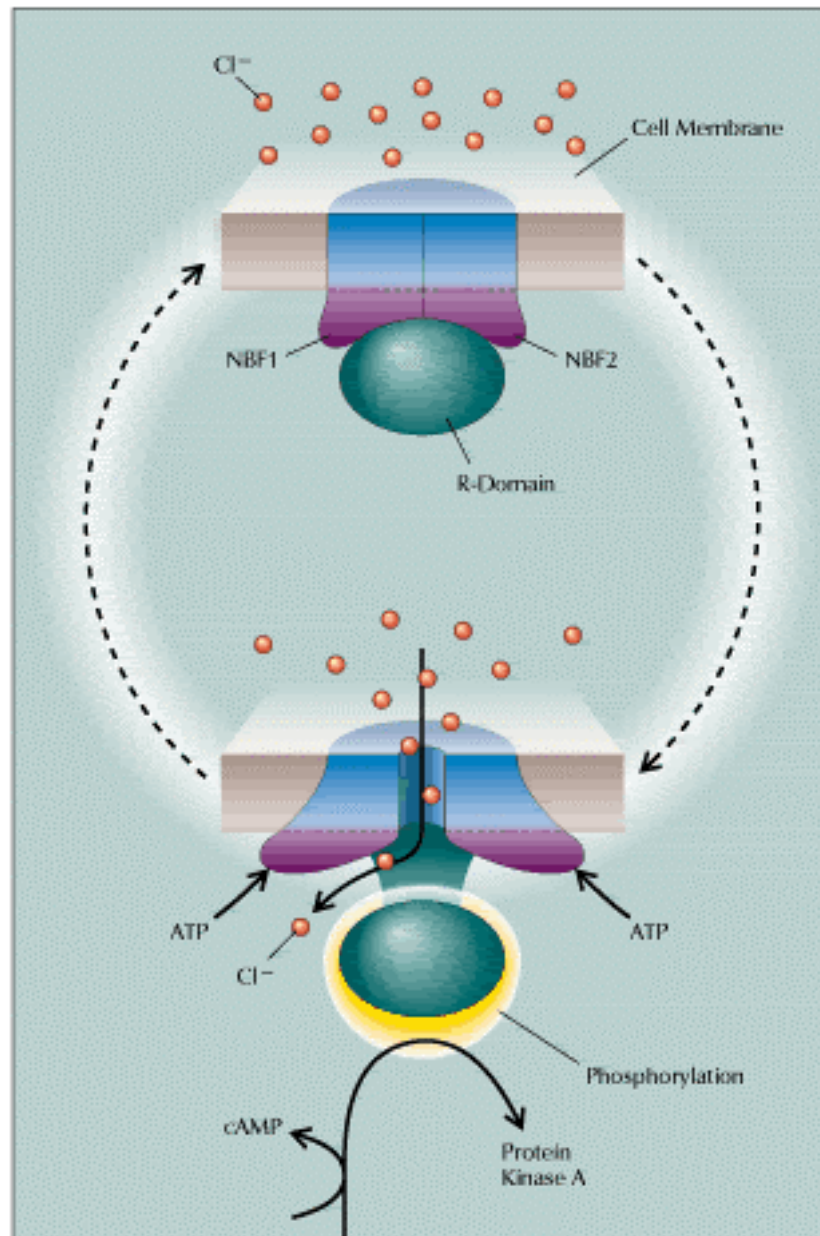


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Regulierung des CFTR-Chloridkanals. Quelle: Tsui und Durie (1997).

Die vom zyklischen Adenosin-3',5-monophosphat (cAMP) abhängige Proteinkinase A ermöglicht die Phosphorylierung der multiplen Serinreste in der R-Domäne. Dies führt zur Aktivierung des Chloridionen-Transports. Bindung und Hydrolyse von ATP an die zwei Transmembranregionen regulieren das Öffnen und Schließen der aus ihnen gebildeten Pore. Der Ruhezustand des Kanals wird durch Phosphatase 2C erreicht, die für die Dephosphorylierung der Serinreste in der R-Domäne verantwortlich ist.

Der Chloridionenkanal hat eine Effizienz von ca. 2×10^6 Ionen/sec (Helmkamp, 2000; Pilewski und Frizzell, 1999). Neben der Funktion als Chloridionenkanal spielt das CFTR-Protein eine multiple Rolle im epithelialen Transport. So werden z. B. die epithelialen Natriumkanäle (ENaC, *Epithelial Sodium Channel*) inhibiert, während die sogenannten Ca^{2+} -aktivierbaren Chloridkanäle (ORCC, *Outwardly Rectified Chloride Channel*) aktivierend beeinflusst werden. Diese sind an der Regulation des Zellvolumens, der Zellteilung sowie der Apoptose in Lymphozyten beteiligt (Morales et al., 1999; Schwiebert et al., 1999).

In der Datenbank des *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* (2004) sind seit dem Jahre 1989 bis heute 1291 Mutationen des CFTR-Gens registriert. Die Mutationen werden aufgrund ihrer Auswirkungen auf das CFTR-Protein in sechs Klassen unterteilt (Gallati, 2001; Pilewski und Frizzell, 1999; Stuhmann et al., 1999; Tsui und Durie, 1997) (siehe **Abbildung 3**).

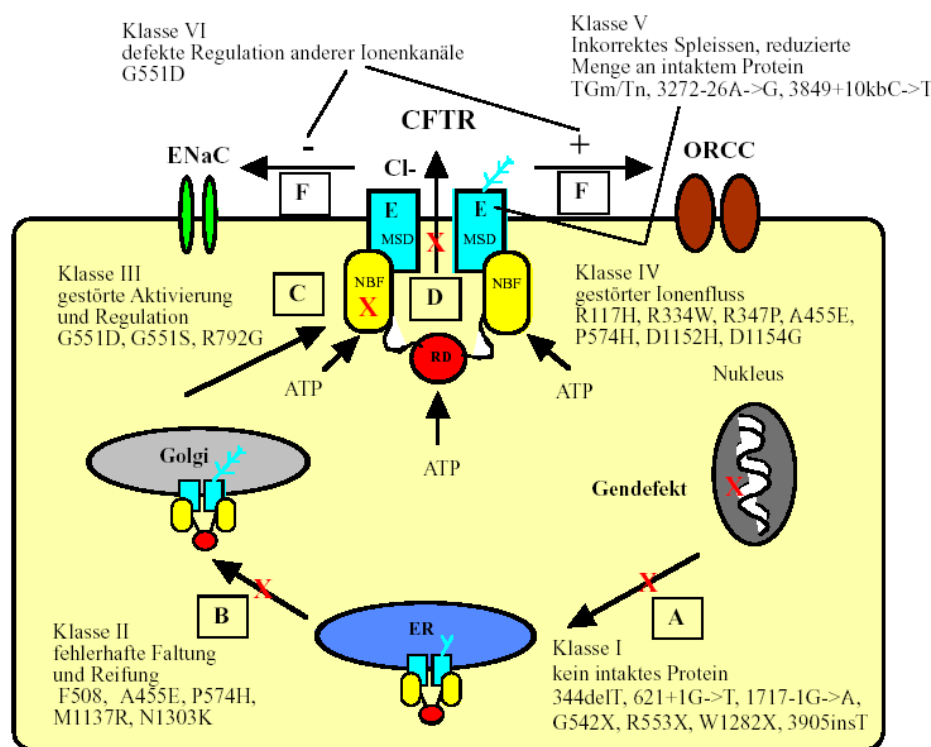


Abbildung 3: Differenzierung der Mutationen des CFTR-Gens in sechs Mutationsklassen. Quelle: Gallati (2001).

Die Mutationsklassen I-VI sind hier mit Beispielen in der Abbildung wiedergegeben. Die Buchstaben A-F kennzeichnen die Positionen und Auswirkungen auf die Expression des CFTR-Proteins und seine Funktionen.

In der ersten Hälfte des Gens überwiegen zu 60 % Punkt- und Missense-Mutationen, in der zweite Hälfte werden zu 80 % Nonsense-, Frameshift- oder Spleißmutationen vorgefunden (Morales et al., 1999). Die weltweit häufigste und bestcharakterisierte Mutation ist $\Delta F508$, eine drei Basen Deletion im Exon 7. Diese Deletion resultiert im Verlust der Aminosäure Phenylalanin an der Position 508. Diese Mutation beeinträchtigt die Struktur, Funktion und Faltung der ersten Nukleotidbindungsfalte (NBF1) des CFTR-Proteins. Die $\Delta F508$ CFTR-Protein Mutante unterliegt einer defekten Prozessierung und wird nicht vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportiert, daraus folgt eine drastische Reduktion des CFTR-Proteins an der apikalen Plasmamembran der Zelle (Helmkamp, 2000; Morales et al., 1999; Welsh und Smith, 1995). Die weltweite Häufigkeit der $\Delta F508$ Mutation liegt bei 66 % (Cystic Fibrosis Consortium, 2004), während die einzelnen anderen Mutationen unter 10 % liegen. In Europa liegt der Prozentsatz der Mutation $\Delta F508$ bei 71,5 % (Helmkamp, 2000; Tummeler et al., 1996). Es wird angenommen, dass die $\Delta F508$ -Mutation vor etwa 50.000 bis 60.000 Jahren ihren Ursprung hatte und sich im Neolithikum vom mittleren Osten aus verbreitete (Dawson und Frossard, 2000; Helmkamp, 2000; Pier, 1999; Tattersson et al., 2001; Tsui und Durie, 1997). Hypothesen gehen aufgrund der hohen Verbreitung der $\Delta F508$ -Mutation im Genpool von einem Selektionsvorteil für heterozygote Erbmalerträger aus, wie z. B. Resistenz gegen Cholera Toxin (Gabriel et al., 1994) oder *Salmonella typhi* (Guggino, 1999; Pier et al., 1998; Pier, 1999).

Die einzelnen Mutationen führen zu einem chromosomal codierten individuellen Phänotyp. Aufgrund der durch Mutationen hervorgerufenen Abwesenheit oder funktionellen Beeinträchtigung des CFTR-Proteins kommt es zu einem gestörten Elektrolyt- und Wassertransport an Zellmembranen verschiedener Epithelzellen sezernierender Gewebe. Sekrete exokriner Drüsen zeigen eine deutliche Erhöhung der Viskosität. Diese hochviskosen Sekrete verstopfen die Drüsenausführungsgänge. Sekundär werden Organe zystisch und fibrotisch umgebaut (Leutz und Sybrecht, 2001; Zink und Zabransky, 2000). Die durch die Mutationen des CFTR-Proteins sekundär betroffenen Organe sind in einer Übersicht in **Abbildung 4** abgebildet.

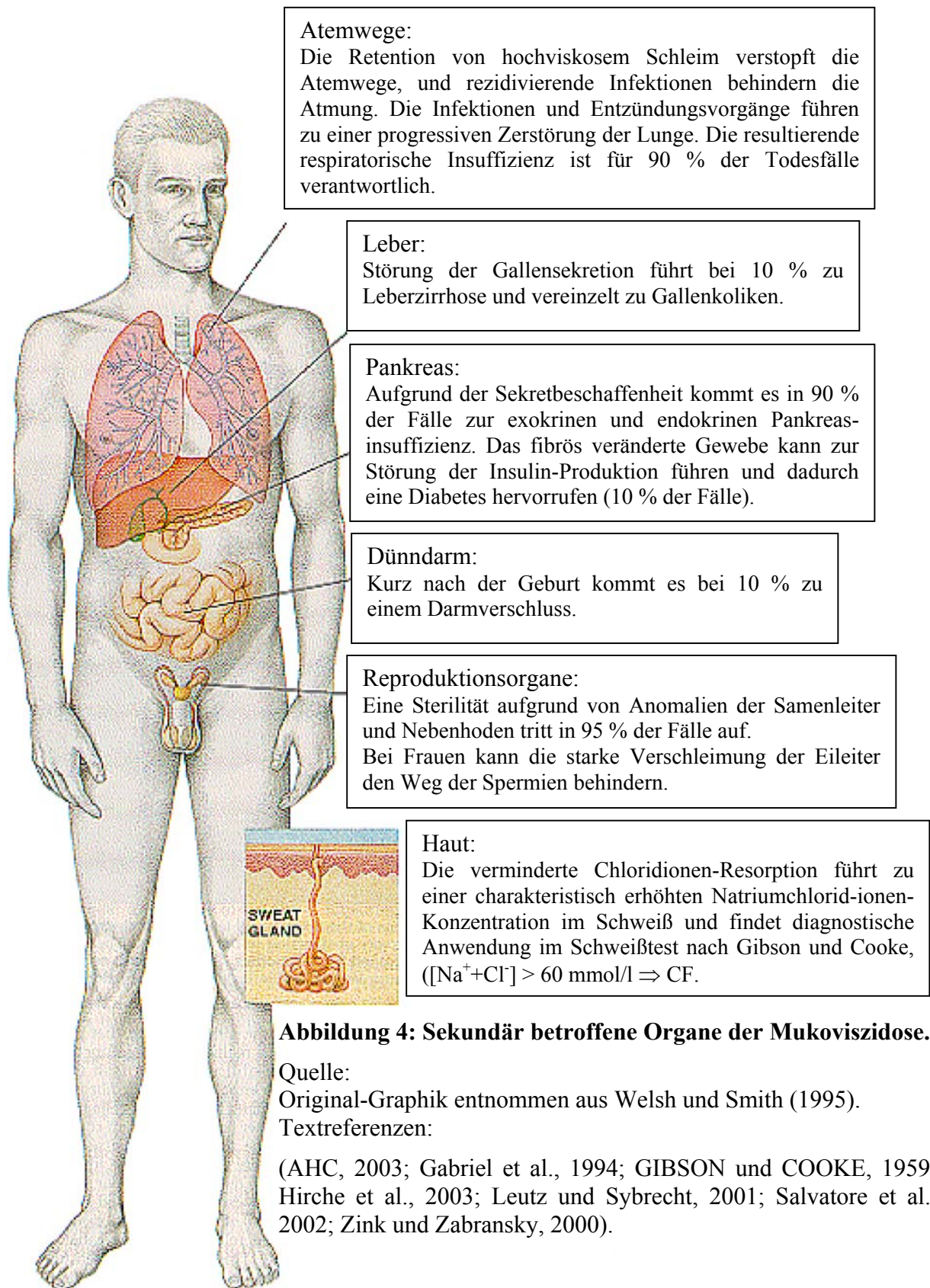


Abbildung 4: Sekundär betroffene Organe der Mukoviszidose.

Quelle:

Original-Graphik entnommen aus Welsh und Smith (1995).

Textreferenzen:

(AHC, 2003; Gabriel et al., 1994; GIBSON und COOKE, 1959; Hirche et al., 2003; Leutz und Sybrecht, 2001; Salvatore et al., 2002; Zink und Zabransky, 2000).

Betrug die mittlere Lebenserwartung der Patienten im Jahre 1980 noch 8,3 Jahre, konnte durch ständige Optimierung der Symptom bezogenen Therapieansätze die mittlere Lebenserwartung stetig gesteigert werden, so dass sie im Jahre 2000 bei 32 Jahren lag (Hirche et al., 2003; Rubin, 1999). Die Symptomatik der Verdauungsorgane ist mittlerweile gut behandelbar. Beim Respirationstrakt führen zystisch-fibrotische Degenerationen, wiederkehrende bakterielle Infektionen und Entzündungsprozesse zu einer fortschreitenden Reduktion der Lungenfunktion. Im fortschreitenden Alter resultiert daraus eine respiratorische Insuffizienz, die für 90 % der Todesfälle bei CF-Patienten verantwortlich ist (Hirche et al., 2003; Leutz und Sybrecht, 2001; Stuhmann et al., 1999).

4.2 Mukoziliäre Clearance

Die Epithelzellen des respiratorischen Traktes sind von einem Flüssigkeitsfilm mit unterschiedlicher Viskosität bedeckt. Dieser wird unterteilt in die periziliäre niederviskose Sol-Phase (Wasseranteil >90 %) und die hochviskose, Gel-Phase (Mucus) (Gehr et al., 2000). Die Gel-Phase enthält eine Vielzahl von Proteinen, Proteoglycanen, Glycoproteinen (Muzine) und Lipiden und ist ein ideales Transportmittel zur Beseitigung von Fremdstoffen (Pilewski und Frizzell, 1999; Scharfman et al., 1996). Die Muzine bilden den Hauptbestandteil des Mucus. Die hohe Diversität ihrer Saccharidketten am Peptidkern ermöglicht eine Vielzahl von Interaktionen mit Mikroorganismen und Fremdpartikeln und bildet einen wichtigen Faktor zur Aufrechterhaltung der Sterilität des Respirationstraktes (de Bentzmann et al., 1996a). In der Sol-Phase schlagen pro Flimmerepithelzelle ca. 2.000 Kinozilien in einem annähernd synchronen (Metasynchronizität) Schlagzyklus (Gehr et al., 2000). In **Abbildung 5** zeigen die Phasen 10-12 die eigentliche Schlagbewegung (1.000-1.500 Schlagzyklen/min), bei der die Zilien die Gel-Phase berühren und so Fremdpartikel rachenaufwärts befördern (V (Schleimschicht) $\sim 0,5-1$ mm/min) (Godwin, 1995). Die anderen Phasen 1-9 zeigen die Rückbewegung zur Startposition.

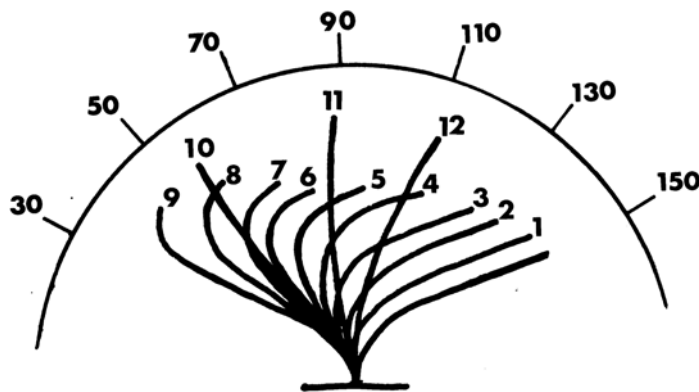


Abbildung 5: Schlagzyklus der Zilien. Quelle: Evans et al. (2004).

Die Phasen 1-9 von links nach rechts zeigen die Rückbewegung zur Startposition an. Die Phasen 10-12 zeigen die eigentliche Schlagbewegung.

Abhängig von der Partikelgröße werden inhalierte Fremdpartikel größtenteils nach 24 Stunden aus der Lunge entfernt, dabei handelt es sich zu 90 % um Partikel der Größe $\geq 6-8 \mu\text{m}$ und zu 10 % um Partikel $\leq 1 \mu\text{m}$ (Gehr et al., 2000). Die Effizienz des mucoziliären Transportes hängt von der Funktionsfähigkeit der Zilien und den Eigenschaften des epithelialen Flüssigkeitsfilms ab. Der Wassergehalt des Flüssigkeitsfilms im respiratorischen Trakt wird durch den transepithelialen Natrium- und Chloridionen-Transport reguliert. An der basolateralen Seite werden Chloridionen durch einen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter transportiert und auf der apikalen Seite durch CFTR und Ca^{2+} -aktivierbare Chloridkanäle (ORCC) herausgeschleust. In entgegengesetzter Richtung verläuft der Natriumtransport. Auf der apikalen Seite wird Natrium durch epitheliale Natriumkanäle (ENaC) aufgenommen und basolateral unter Energieverbrauch durch die Na^+K^+ -ATPase gegen Kaliumionen ausgetauscht (Rückes-Nilges et al., 1999). Wasser folgt passiv osmotisch dem transepithelialen Ionentransport (Boucher, 1994a; Boucher, 1994b). Bei CF entfällt die inhibitorische Regulation der epithelialen Natriumkanäle (ENaC) und es kommt zu einer gestörten Regulation der Chloridionensekretion. Dies führt zu einer gesteigerten Natriumionen-Absorption und zum transepithelialen Einstrom von Wasser (Chmiel und Davis, 2003; Helmkamp, 2000; Leutz und Sybrecht, 2001; Pilewski und Frizzell, 1999; Rückes-Nilges et al., 1999; Wine, 1999) (siehe **Abbildung 6**).

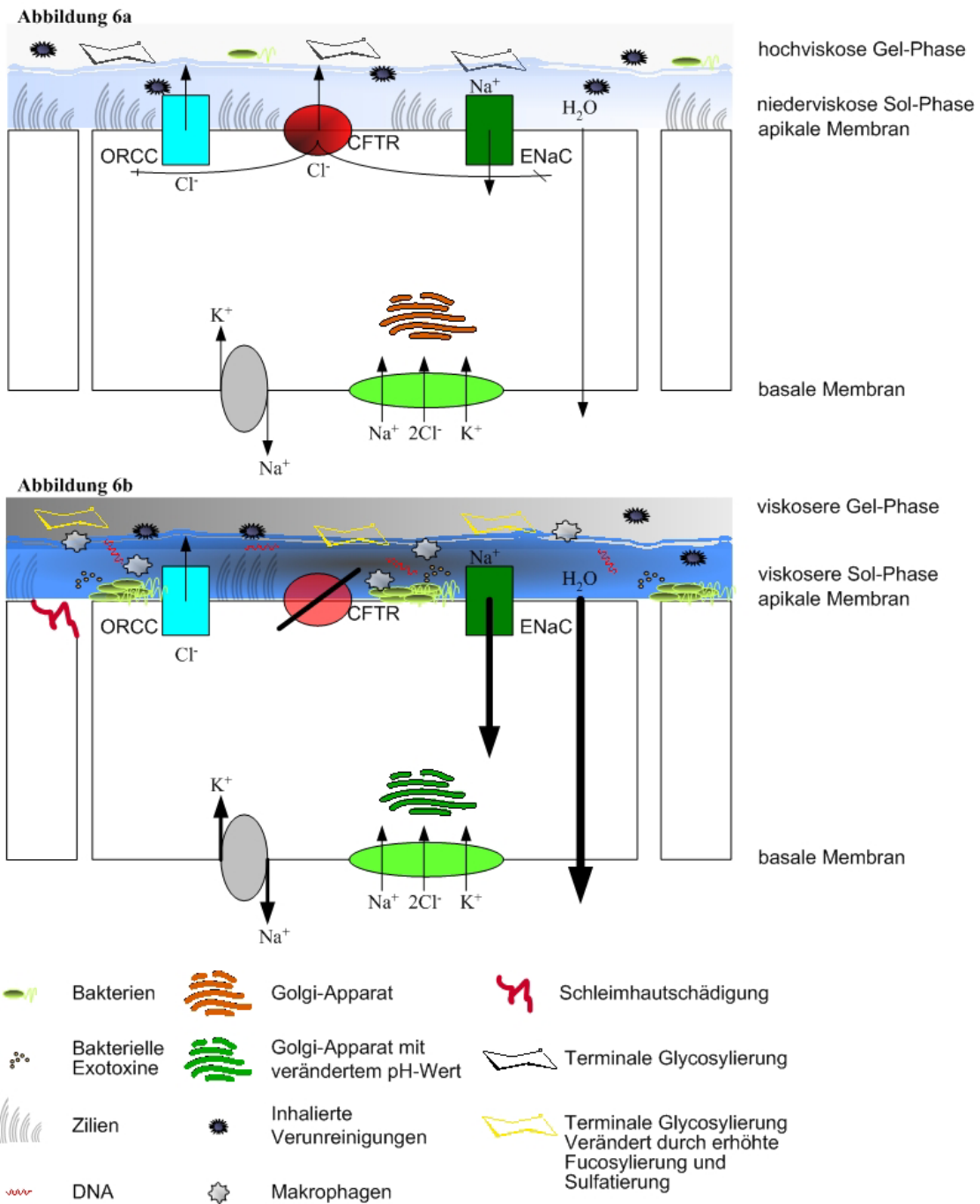


Abbildung 6: Schematische Darstellung des respiratorischen Epithels.

Abbildung 6a zeigt das respiratorische Epithel mit funktionierendem CFTR-Protein. In Abbildung 6b ist das respiratorische Epithel bei der Cystischen Fibrose und bei gestörter mukoziliärer Clearance durch Veränderungen der Eigenschaften des epithelialen Flüssigkeitsfilms dargestellt.

Die Reduktion der Wasserkonzentration im Flüssigkeitsfilm ist mit Zunahme der Viskosität verbunden und führt zu einer Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance (de Bentzmann et al., 1996a; Knowles et al., 1996; Rückes-Nilges et al., 1999; Trout et al., 1998).

Bei CF-Patienten weist die terminale Glycosylierung einen deutlichen höheren Anteil an Fucosyl- und Sulfatgruppen auf (Cheng et al., 1989; Davril et al., 1999; Glick et al., 2001; Kube et al., 2001; Mendicino und Sangadala, 1999; Nieuw Amerongen et al., 1998; Scanlin und Glick, 1999; Scharfman et al., 1996). Glycohistologische Untersuchungen an Nasenpolypen von CF-Patienten und gesunden Menschen zeigten deutliche Unterschiede der terminalen Glycosylierung (Hassid et al., 2000). Eine mögliche Erklärung der veränderten terminalen Glycosylierung bei der Cystischen Fibrose ist eine Veränderung des Golgi pH-Wertes bzw. des Trans-Golgi-Netzwerkes (Kube et al., 2001; Scanlin und Glick, 1999; Tatterson et al., 2001). Der Golgi pH-Wert liegt in der Regel unter dem des Zytoplasmas zwischen pH 6,2 und pH 6,4 (al-Awqati, 1995; Barasch und al-Awqati, 1993). Enzyme für die terminale Einführung der Sialinsäure bei Glycoproteinen und Glycolipiden haben bei pH 5,8 bis 5,9 ihr Optimum. Bei Sulfo- und Fucosyltransferasen liegt das Optimum bei pH 7 bis 7,5 und sie haben das gleiche Ziel wie Sialyltransferasen (al-Awqati, 1995). Bei Erhöhung des pH-Werts dominieren die Sulfo- und die Fucosyltransferasen. Übersulfatierte Muzine haben eine höhere Viskosität und beeinträchtigen zusätzlich die mukoziliäre Clearance (al-Awqati, 1995). Erhöhungen im Golgi pH-Wert wurden in mehreren Studien gefunden (al-Awqati 1995; Barasch und al-Awqati 1993). Eine verstärkte Expression des Glycosphingolipids asialo-GM1 wurde an der Oberfläche von CF-Zellen beobachtet (Imundo et al., 1995; Saiman und Prince, 1993; Scharfman et al., 1996).

Der Einfluss und die Bedeutung des CFTR-Proteins bzw. seiner Mutationen auf die terminale Glycosylierung sind bis heute nicht entschlüsselt. Das veränderte Milieu im Respirationstrakt fördert die Adhäsion und Kolonisation von Bakterien, wie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* und *Staphylococcus aureus*, deren Infektionen im frühen Patientenalter auftreten können (de Bentzmann et al., 1996c; Gilligan, 1991; Govan und Deretic, 1996; Ramphal und Vishwanath, 1987). Im Alter von 10 bis 14 Jahren beginnt meistens die Infektion mit dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*. Mit fortschreitendem Alter sind mehr als 80 % der Patienten mit dem Bakterium infiziert (de Bentzmann et al., 1996c; Gilligan, 1991; Govan und Deretic, 1996).

4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistisches gram-negatives Bakterium (ähnlich der **Abbildung 7**) mit einer Flagella zur Fortbewegung. Charakteristisch sind die Pigmente Pyocyanin (blau), Pyorubin (rot) und Pyoverdin (gelbgrüne Fluoreszenz unter UV) und der fruchtige Geruch (Bradley, 2003). Es findet sich im Boden, in Wasser, in Pflanzen und in Nahrungsmitteln (Wilson und Dowling, 1998) und ist in der Lage bei Temperaturen bis zu +42 °C zu wachsen (Iglewski, 1996). *Pseudomonas aeruginosa* besitzt unter anderem die Fähigkeit zur Cyanwasserstoff-Synthese (Bradley, 2003).

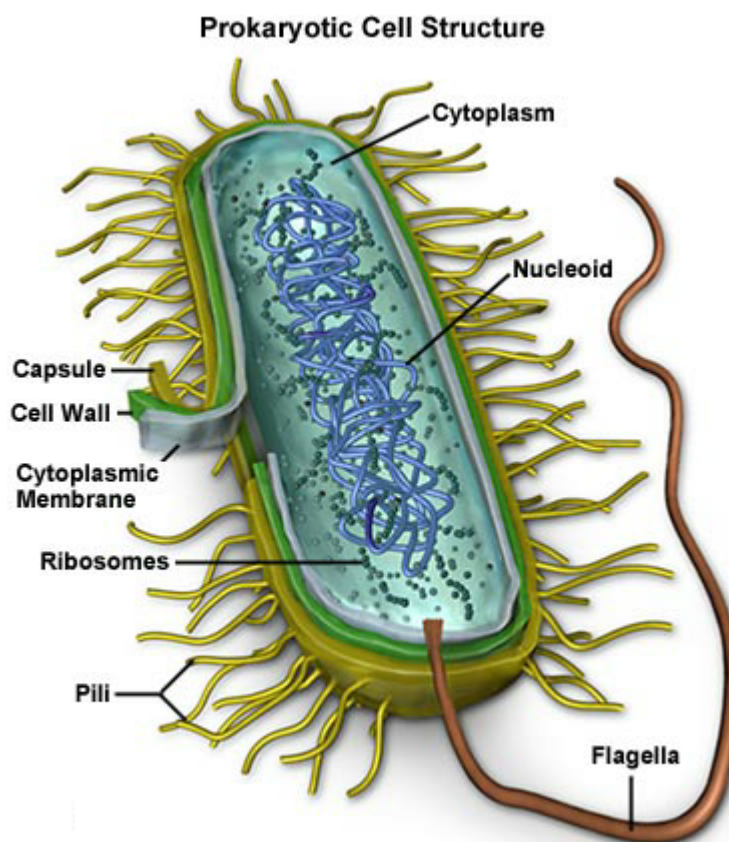


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer prokaryontischen Zelle.

Quelle: Davidson und Florida State University (2004). Die schematische Darstellung in dieser Abbildung entspricht in etwa dem Aussehen des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*.

Die *Pseudomonas aeruginosa* Infektion führt im allgemeinen nur bei immun-kompromittierten Patienten zu ernsthaften Komplikationen. Zu dieser Gruppe von Patienten zählen unter anderem künstlich beatmete Menschen, Brandopfer und solche, die an Cystischer Fibrose (CF) leiden. Bei CF-Patienten nimmt die Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* durch progressive Zerstörung der Lunge einen letalen

Verlauf (Gilligan, 1991; Pier, 1985; Ramphal und Vishwanath, 1987; Warneer, 1992; Wilson und Dowling, 1998). Der initiiierende Schritt einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion, die in einer chronischen Kolonisierung endet, ist die Adhäsion an die Epithelien des Respirationstraktes (Beachey, 1981; Doig et al., 1990; Smith, 1984). Die Adhäsion ist eine komplexe Interaktion zwischen Rezeptoren und auf den Zelloberflächen exprimierten Liganden (Bos et al., 1999). Neben vielen anderen Adhäsionsrezeptoren wie dem Alginat (Doig et al., 1987; Ramphal und Pier, 1985), dem Oberflächen-assoziierten Exoenzym S (Baker et al., 1991; Lingwood et al., 1991) und der Flagella (Schroeder et al., 2001; Wilson und Dowling, 1998) produziert das Bakterium Pili. Die Pili spielen eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion und sind für die initiiierende Interaktion des Bakteriums mit der Zelloberfläche verantwortlich. Adhäsionsexperimente von Chi et al. (1991) an A549 menschlichen Lungenkarzinomzellen zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung des Pili präsentierenden Wildtyps mit maximal 50 bis 70 Bakterien/A549-Zelle, während eine isogene nicht Pili präsentierende Mutante eine drastisch reduzierte Bindung von 4 bis 6 Bakterien/A549-Zelle zeigte. Es wurde daraufhin angenommen, dass die epitheliale Bindung des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* von der Existenz der Pili abhängig war (Hahn, 1997). Die Struktur des Pilus ist gut charakterisiert. Die chromosomal codierten flexiblen Filamente haben einen Durchmesser von 5,2 nm und eine mittlere Länge von 2.500 nm (Bradley, 1972; Folkhard et al., 1981; Paranchych et al., 1979). Paranchych et al. (1986) postulierte folgendes Strukturmodell: Der Pilus ist aus fünf identischen 15 kDa Pilin-Untereinheiten aufgebaut. Ihre helicale Anordnung führt zu einem Hohlzylinder mit einem äußeren Durchmesser von 5,0 nm und einem inneren von 1,2 nm. Es konnte gezeigt werden, dass die Modelldaten mit den biophysischen Daten des nativen *Pseudomonas aeruginosa* Pilus übereinstimmen (Parge et al., 1995). Der Pilus gehört der Typ-IV Klasse an, die auch als N-Methylphenylalanin-Pilus-Klasse bekannt ist (Paranchych et al., 1990). Der Pilus weist Ähnlichkeiten zu anderen Bakterienpili auf, wie z. B. zu den Pili von *Neisseria gonorrhoeae* und *Vibrio cholerae* (Bradley, 2003; Soto und Hultgren, 1999). Die Pili einzelner *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme weisen eine stark konservierte etwa 30 Aminosäuren lange Sequenz am Ende des Proteins auf, beginnend mit N-terminalem N-Methylphenylalanin. Diese hydrophobe Sequenz ist involviert in die Interaktion der Untereinheiten miteinander (Strom et al., 1994; Watts et al., 1983). Charakteristisch für alle *Pseudomonas aeruginosa* Pilin-Prototypen und Typ-IV-Pilin anderer

Bakterien ist ein C-terminaler Disulfidloop mit einer Größe von 12 bis 17 Aminosäuren (Hahn et al., 1997). Die Adhäsionsfunktion der Untereinheiten ist im Disulfidloop lokalisiert und ermöglicht eine multivalente Lectin-Saccharid-Interaktion an der Spitze des Pilus (Campbell et al., 1997; Hahn et al., 1997; Hahn, 1997; Hazes et al., 2000; Irvin, 1993; Jones et al., 1997; Keizer et al., 2001; Lee et al., 1994; Paranchych et al., 1986; Wong et al., 1995). Die für die Interaktion erforderliche minimale Bindungsdomäne ist das Disaccharid *O*-D-2-Acetamino-galactopyranosyl- β -(1-4)-galactopyranosid.

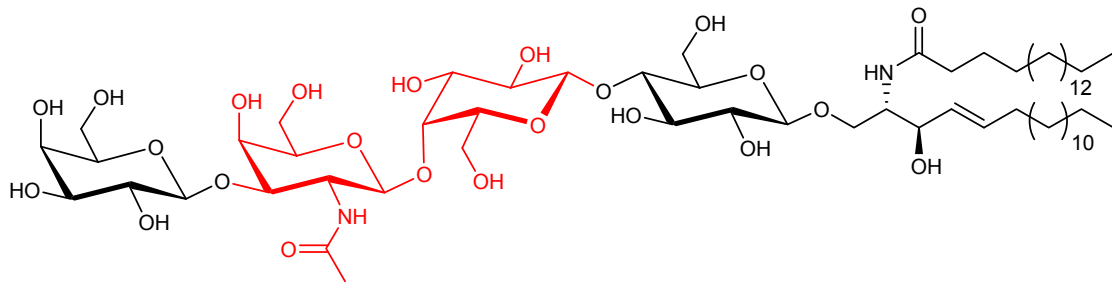


Abbildung 8: Struktur des Glycosphingolipids asialo-GM1.

(Gal β (1-3)GalNAc β (1-4)Gal β (1-4)Glc β (1-1)Ceramid).

In rot ist die minimale Bindungsdomäne GalNAc β (1-4)Gal β wiedergegeben.

Die Bindungsdomäne wird von apikalen membranständigen Glycosphingolipid-Liganden hauptsächlich durch das Glycosphingolipid asialo-GM1, aber auch durch Fucosylasialo-GM1 und asialo-GM2 repräsentiert (Campbell et al., 1997; Campbell et al., 2000; Comolli et al., 1999; de Bentzmann et al., 1996b; Hahn, 1997; Hazes et al., 2000; Krivan et al., 1988; Schweizer et al., 1998; Sheth et al., 1994). Das Glycosphingolipid asialo-GM1 wurde in Lungengewebe gefunden (Krivan et al., 1988) und wird auf der Oberfläche von CF-Epithelzellen verstärkt exprimiert (Bryan et al., 1998; Saiman und Prince, 1993), kommt aber nicht in humanen Muzinen vor (Scharfman et al., 2001). Die minimale Bindungsdomäne wird von vielen pathogenen Organismen (Krivan et al., 1988) wie z. B. *Candida albicans* (Yu et al., 1996) und dem uropathogenen *Escherichia coli* (Khan et al., 2000) erkannt.

Pseudomonas aeruginosa produziert eine Anzahl von Exoprodukten wie Exotoxin A, Proteasen, Hemolysine, Exoenzym S und weitere für die Infektion wichtige Moleküle. Diese spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Lungeninfektionen (Saiman und Prince, 1993; Woods und Sokol, 1986) und beeinträchtigen die Zilienfunktion (Kanthakumar et al., 1996). Die Exoprodukte des Bakteriums

verursachen *in vitro* einen weiteren Anstieg von Glycosphingolipid asialo-GM1 (Cacalano et al., 1992).

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* produziert zwei Lectine.

1. Das D-Galactose-spezifische Lectin PA-I mit folgender Saccharid Spezifität: Phenyl- β -thioGal > Phenyl- β -Gal > Isopropyl- β -thioGal > p-Nitro-phenyl- β -Gal > Methyl- β -thioGal > Methyl- α -Ga >> Melibiose > Gal (K_a 3.4×10^{-6}) / p-Nitro-phenyl- β -Gal > Methyl- β -Gal > GalNAc > L-Rhamnose (Chen et al., 1998; Garber et al., 1992; Gilboa-Garber et al., 1997; Kirkeby und Hoyer, 1999).

2. Das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II mit folgender Saccharid Spezifität: p-Nitrophenyl- α -L-Fucose > L-Fucose (K_a 1.5×10^{-6}) > Fucosylamin = L-Galactose > D-Mannose (K_a 3.1×10^{-1}) > Fructose (Avichezer und Gilboa-Garber, 1987; Garber et al., 1987; Gilboa-Garber et al., 1997, 2000).

Die Lectine binden spezifisch an Blutgruppenantigene. Das D-Galactose-spezifische Lectin PA-I zeigt interagiert mit den Blutgruppenantigenen B, P^k, P₁ und I, während das L-Fucose-spezifische Lectin PA-II mit den Antigenen H, A und B interagiert (Gilboa-Garber et al., 1994; Gilboa-Garber und Sudakevitz, 1999).

Das Lectin PA-I reduziert die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten und hat *in vitro* zytotoxische Effekte an respiratorischen Epithelzellen (Bajolet-Laudinat et al., 1994; Sudakevitz und Gilboa-Garber, 1982). Beide Lectine reduzieren bzw. inhibieren die Zilienschlagfrequenz in menschlichen Atemwegen *in vitro*. Studien der Reduktion durch das Lectin PA-II zeigten, dass durch Zugabe von L-Fucose die Inhibition der Schlagfrequenz reversibel ist (Adam et al., 1997a; Adam et al., 1997b). Die Lectine sind hauptsächlich im Inneren der Zelle, im periplasmatischen Raum, lokalisiert (Gilboa-Garber, 1988). In geringen Konzentrationen findet man sie aber auch an der Zelloberfläche und im Medium (Glick und Garber, 1983). Untersuchungen mit *Pseudomonas aeruginosa*-Lysaten zeigten, dass die Lectine die Adhäsion von nicht lysierten Bakterienzellen an die Zelloberfläche fördern können (Wentworth et al., 1991). Unter anaeroben oder metabolischen Bedingungen kommt es zur Freisetzung dieser Lectine. Die Co-Expression der Lectine mit vielen anderen virulenten Faktoren wird durch die Signalmoleküle N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserin-Lacton und N-Butyryl-L-

homoserin-Lacton reguliert (de Kievit et al., 2001; de Kievit und Iglewski, 2000; Erickson et al., 2002; Favre-Bonte et al., 2002; Gilboa-Garber et al., 1997; Parsek und Greenberg, 2000; Pearson et al., 2000; Coval et al., 1999; Winzer et al., 2000). Die Bakterien-Zellmembran ist für diese Signalmoleküle permeabel. Bei einer großen Anzahl von Bakterien akkumulieren die Signalmoleküle bis zur für die Expression erforderlichen Konzentration. Die in die Zelle diffundierenden Signalmoleküle interagieren mit ihren entsprechenden Transkriptions-Aktivator-Proteinen und lösen so die Synthese zahlreicher virulenter Faktoren und Proteine aus. Diese Art der Zell-Zell-Kommunikation wird *Quorum Sensing* genannt und ermöglicht eine koordinierte, kontrollierte, gleichgeschaltete und von der Zelldichte abhängige Produktion der virulenten Faktoren. Für *Pseudomonas aeruginosa* sind zwei *Quorum Sensing* Systeme bekannt. Das „las-System“, welches unter anderem die Expression von LasB Elastase reguliert und als zweites das „rhl-System“ (Pesci et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa ist resistent gegen eine Vielzahl von Antibiotika wie z. B. Penicillin, Ampicillin, Cephalothin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Sulfoamide und Aminoglycoside wie Streptomycin und Kanamycin (Bradley, 2003; Livermore, 2002). Verantwortlich hierfür ist neben zahlreichen Plasmiden unter anderem die intrinsische Resistenz. Hervorgerufen wird diese durch die geringe äußere Membran-Permeabilität des Bakteriums, die etwa 12 bis 100fach schwächer ist als bei *E. coli* (Hancock, 1998; Hancock und Speert, 2000). Zusätzlich wirken effiziente Efflux-Pumpen, die Antibiotikum aus dem Bakterieninneren hinaus pumpen, synergistisch.

4.4 Therapie

Antibiotikatherapien in Abständen von drei bis vier Monaten werden in der Regel als Kombinationsbehandlung bei CF-Patienten durchgeführt. Dies soll das Risiko einer Resistenzentwicklung reduzieren. Die Keimzahl und die Virulenz können zwar reduziert und damit die chronische Kolonialisierung deutlich verzögert werden, aber eine endgültige Elimination der Bakterien wird nicht erreicht (Stuhrmann et al., 1999). Im Vordergrund steht daher die Suche nach neuen Therapieansätzen. Mit Hilfe rekombinanter Viren wird unter anderem versucht das intakte CFTR-Gen in Patientenzellen einzuschleusen. Dies würde die Expression des vollfunktionstüchtigen CFTR-Proteins in Patientenzellen hervorzurufen und damit eine Gentherapie ermöglichen.

Studien mit spezifischen Zuckerlösungen der Saccharide D-Galactose, D-Mannose, Neuraminsäure (Steuer et al., 1993), D-Galactose und L-Fucose (von Bismarck et al., 2001), für die Lectine PA-I und PA-II zeigten Erfolge bei der Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen. Synthetische Derivate der minimalen Bindungsdomäne GalNAc-Gal konnten die Bindungen des Pili *in vitro* inhibieren (Schweizer et al., 1998). Saccharid-basierende Therapeutika zeigen neben dem häufig hohen Synthese-Aufwand weitere Nachteile. Häufig auftretende schwache unspezifische Wechselwirkungen erfordern den Einsatz hoher Konzentrationen, um spezifische Interaktionen zu ermöglichen. Der selektive Abbau durch Glycosidasen und Glycolyse reduziert die Halbwertszeit je nach Struktur des Saccharids auf wenige Minuten (Dove, 2001; Maeder, 2002). Ein viel versprechender Weg ist die Entwicklung von Saccharidstrukturen mimikrierender Peptide, den so genannten Glyco-Replika-Peptiden (Taki und Ishikawa, 1999). Eine Vielzahl von Publikationen berichtet von der Entwicklung von Glyco-Replika-Peptiden und nichtpeptidliganden-Replika-Peptiden mit Hilfe von *Peptid Phage Display Libraries* (Devlin et al., 1990; Fairbrother et al., 1998; Giebel et al., 1995; Hoess et al., 1993; Ishikawa und Taki, 1998; O et al., 2000; Oldenburg et al., 1992; Ramanujam et al., 2002; Scott et al., 1992; Taki und Ishikawa, 1999; Zhan et al., 2003; Ziebell et al., 2001). *Phage Display* wurde von Smith im Jahr 1985 zur Isolierung monoklonaler Antikörper etabliert (Smith, 1985). *Phage Display* findet weitere Anwendungen beim Epitop-Mapping, der Untersuchung von Peptid–Peptid-Wechselwirkungen (Couet et al., 1997; Healy et al., 1995; Koivunen et al., 1993), beim Drug-Design (Benhar, 2001; Smith und Petrenko, 1997) und auch *in vivo* (Pasqualini et al., 2003).

Das verbreitetste System beruht auf einem fadenförmigen M13-Phagen Vektor zur N-terminalen Expression von kombinatorischen Peptiden an Hüllproteinen, wobei jeder Phage nur das Peptid präsentiert, das im Vektor codiert ist (siehe **Abbildung 9**) (Benhar, 2001; FitzGerald, 2000; Rodi und Makowski, 1999; Smith und Petrenko, 1997). Hauptsächlich wird das pIII-Hüllprotein (fünf Kopien) verwendet, gefolgt vom pVIII (2670 Kopien) (Rodi und Makowski, 1999). Das pIII-Hüllprotein ist an der Spitze des Phagen-Partikels verankert und ermöglicht die N-terminale Präsentation von langen Peptiden und Proteinen ohne den Verlust der Infektivität (Koivunen et al., 1999).

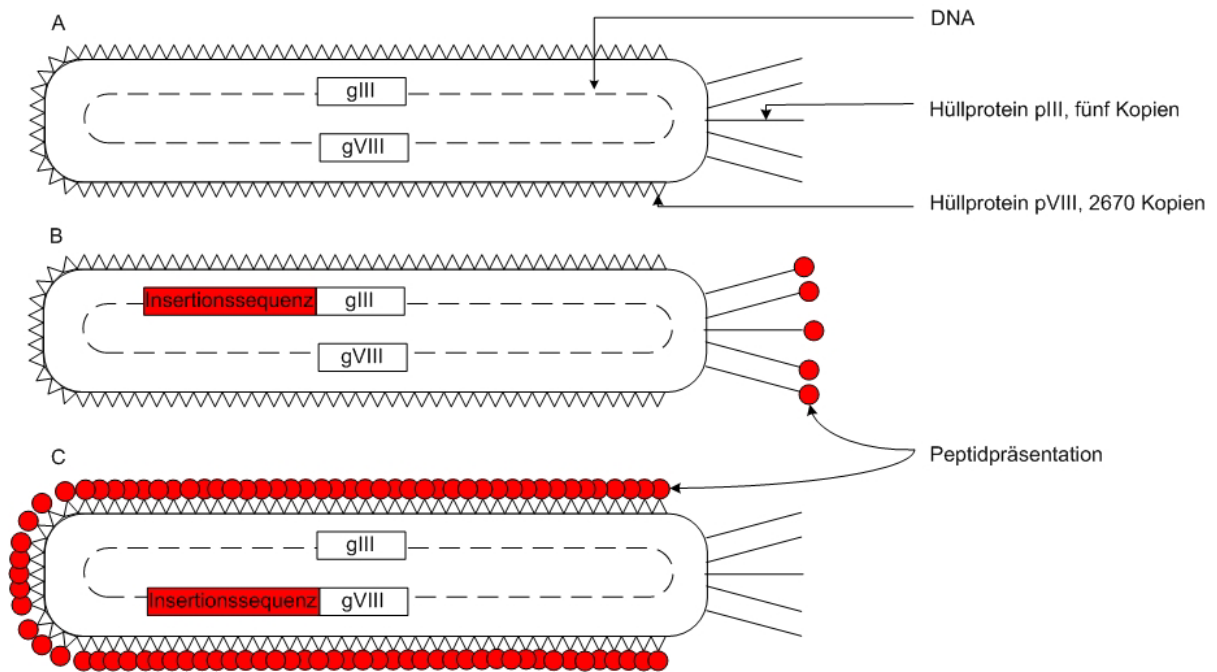


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines M13-Phagen-Partikels.

A: M13-Phage Wildtyp, B: Rekombinater M13-Phage mit Insertionssequenz für das Hüllprotein pIII, C: Rekombinater M13-Phage mit Insertionssequenz für das Hüllprotein pVIII.

Die Phagen infizieren das F-Pilus tragende *E. coli*-Bakterium. Der Phage hat einen nicht lytischen Replikationszyklus und wird ins Medium des Bakteriums sekretiert (Koivunen et al., 1999). Die Phagenausbeute kann bis zu 0,3 mg/ml erreichen (Smith und Petrenko, 1997). Einige *Phage Display Library* Konstrukte erfordern die Verwendung von Wildtyp Helferphagen, um die selbst nicht rekombinante Version (Phagemid) zu amplifizieren. Diese Systeme ermöglichen die Präsentation von größeren Peptiden an der Oberfläche (Collins, 1997; Smith und Petrenko, 1997). Man unterscheidet die *Libraries* je nach Anzahl der präsentierten Peptide an den Hüllproteinen (Rodi und Makowski, 1999). Eine genau Beschreibung zur Konstruktion von *Phage Display Libraries* bei Barbas et al. (2003) aufgeführt.

Die 1 µm langen und 6 nm breiten Phagen-Partikel zeigen eine hohe Resistenz gegenüber denaturierenden Bedingungen bei pH-Werten um 2 oder 12 und hohen Harnstoff-Konzentrationen bei [4-6 M] ohne Verlust der Infektivität nach Neutralisation (Kay et al., 1998; Koivunen et al., 1999; Smith und Petrenko, 1997). Peptid-präsentierende Phagen, die an das *Target* binden, werden eluiert und in Bakterien amplifiziert. Dieser Selektionsprozess wird *Biopanning* genannt (Parmley und Smith, 1988; Smith und Scott, 1993) und mehrfach durchlaufen, um die Population von spezifisch bindenden Phagen zu erhöhen, deren Sequenzbestimmung

durch Sequenzierung erfolgt (siehe **Abbildung 10**). Die Verwendung von *Phage Display Libraries* hat neben der hohen Varianz (10^8 - 10^{10} Rekombinante) (Kay et al., 1998) zwei Vorteile:

1. Das exprimierte Peptid oder Protein, das mit einem *Target* interagiert, ist über die codierende DNA schnell zu identifizieren und amplifizieren.
2. *Phage Display* präsentierte Peptide haben nahezu die gleichen funktionalen Eigenschaften wie nativ in Lösung vorliegende (Katz, 1997; Ryu und Nam, 2000).

Durch Zyklisierung oder Einführung von D-Aminosäuren kann die Proteolyse der Peptide minimiert werden. Hierdurch kann die Halbwertszeit und Wirkungsdauer erhöht werden, die Halbwertszeit liegt normal etwa bei 25 min (Kay et al., 1998; Smith und Petrenko, 1997). Weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Halbwertszeit sind die Integration oder terminale-Kopplung von β - bzw. γ - Aminosäuren (Seebach und Rueping, 2003) oder die Verwendung von *Target*-spezifischen, synthetischen D-Peptiden aus dem *Mirror-Image Phage Display* (Eckert et al., 1999; Schumacher et al., 1996; Smith und Petrenko, 1997). Ein weiterer Vorteil der Peptide ist der geringere Synthese-Aufwand bei der Darstellung von Konjugaten gegenüber den Sacchariden.

5 Zielsetzung

Die Resistenzentwicklung des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* gegen Antibiotika macht die Entwicklung neuer therapeutischer Substanzen und Strategien erforderlich. Die Adhäsion an die Epithelien des Respirationstraktes gilt als initiiierender Schritt der Infektion. Die Adhäsion verläuft über Saccharid-Liganden, die mit dem Bakterium interagieren. Der Einsatz von entsprechenden Saccharid-basierenden Therapeutika ist stark reglementiert. Besonders die geringe Halbwertszeit der Saccharide aufgrund der Glycolyse schränkt die Anwendung ein. Deshalb sollte hier eine alternative Strategie verfolgt werden. Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, mit Hilfe von *Random Peptide Phage Display Libraries* sogenannte Glyco-Replika-Peptide zu finden, die in der Lage sind, die Saccharidstrukturen zu mimikrieren, die eine bedeutende Rolle in der Adhäsion des Bakteriums spielen (siehe **Abbildung 10**).

Es sollten die folgenden Glyco-Replika-Peptide identifiziert und charakterisiert werden:

- Ein D-Galactose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I.
- Ein L-Fucose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-II.
- Ein β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-spezifisches mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des Pilus.

Zielsetzung

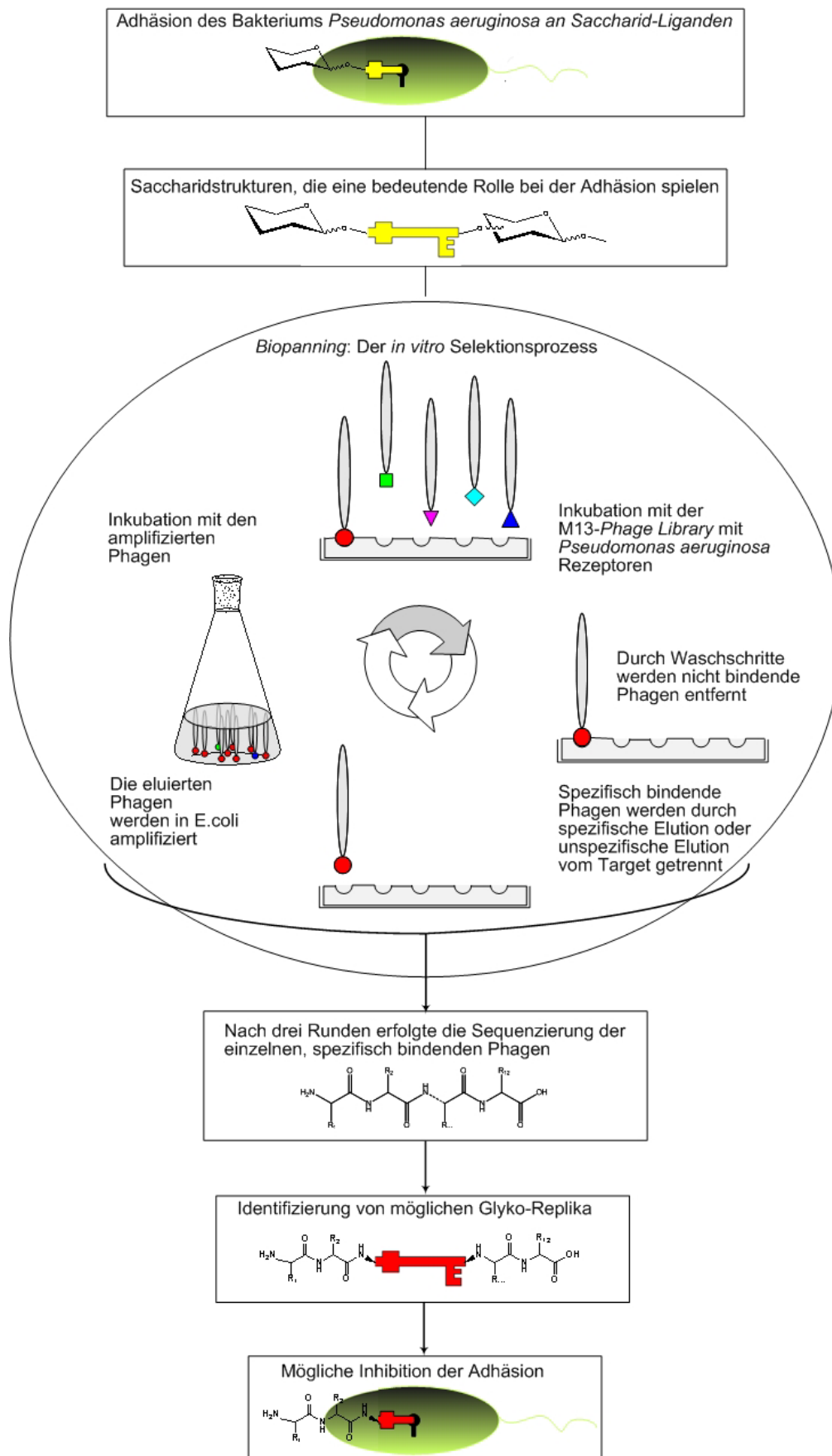


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ziele des Forschungsvorhabens.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Glyco-Replika Peptide gliedert sich folgendermaßen:

- *Phage Display Library Biopanning*

Die Affinität der *Targets* zu den zu mimikrierenden Saccharidstrukturen sowie die Möglichkeit, Saccharidstrukturen durch Peptide zu mimikrieren, sollte hier genutzt werden. An die *Targets* bindende Peptid-präsentierende Phagen sollten mit Hilfe von unspezifischer Elution und gegebenenfalls spezifischer Elution mit entsprechenden Saccharid-Liganden aus dem Phagengemisch selektioniert werden.

- Überprüfung der *Target*-Bindung der selektionierten bindenden Phagen

An den in Mikrotiterplatten adsorbierten *Targets* sollte die Bindung der selektionierten Phagen mit Hilfe eines M13-Phagen Antiköpers untersucht werden, um potentielle Peptid-Liganden der *Targets* zu identifizieren.

- Überprüfung potentieller Liganden durch Kompetitionsstudien

Die Bindung der potentiellen Liganden an die adsorbierten *Targets* sollte in Abhängigkeit von Saccharid-Liganden der *Targets* untersucht werden. Hierdurch sollte die Spezifität der von den Phagen-präsentierten Peptide überprüft werden. Die korrespondierenden Peptide sollten nach der Prüfung der Sequenzen synthetisiert werden.

- Überprüfung der synthetisierten Peptide bzw. Peptid-BSA-Konjugate

Die synthetischen Peptide bzw. Peptid-BSA-Konjugate sollten auf ihre Fähigkeit getestet werden, die Bindung der korrespondierenden Phagen zu kompetitieren. Die Bindung der Phagen in Abhängigkeit von den Peptiden bzw. Konjugaten sollte parallel zu den *Target*-spezifischen Saccharid-Liganden untersucht werden. Gegebenenfalls sollten entsprechende Kompetitionsstudien mit biotinylierten *Targets* an *Target*-spezifischen adsorbierten Glycoproteinen durchgeführt werden.

- Funktioneller Test *in vitro*

Mögliche identifizierte Glyco-Replika-Peptide sollten in einem Zellkultursystem mit Atemwegsepithelzellen anhand der Bindung von biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien untersucht werden. In einem parallelen Ansatz sollte die

inhibitorische Fähigkeit der *Target*-spezifischen Saccharid-Liganden mit den Glyco-Replika-Peptiden bzw. den entsprechenden BSA-Konjugaten verglichen werden.

Aufbauend auf dieser Arbeit sollen in zukünftigen *in vitro* wie *in vivo* Experimenten die Potentiale identifizierter Glyco-Replika-Peptide bestimmt werden. Ein Hauptaugenmerk liegt auf der Untersuchung des Inhibitionspotentials der entsprechenden Glyco-Replika-Peptide zur Inhibition der Sistierung des Zilienschlages. Die Sistierung wird durch die beiden Lectine PA-I und PA-II *in vitro* beobachtet. Die nächsten Schritte wären dann toxikologische und pharmakologische Studien. Die Resistenzbildung beim basalen Mechanismus der Adhäsion des Bakteriums dürfte sehr schwierig sein gegenüber der erfolgreichen Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika. Der Einsatz von Glyco-Replika-Peptiden ermöglicht deshalb eine innovative Strategie, die Adhäsion und damit den initiierten Schritt der Bakterieninfektion zu inhibieren.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien

Name	Firma	Gefahrensymbol
A		
A549 menschliche Lungenkarzinomzellen	DSMZ	
ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz R: 36/37/38; S: 26-36	SIGMA-ALDRICH	
Aceton R: 11; S: 9-16-23.2-33	MERCK	F
Acetonitril, reinst R: 11-20/21/22-36; S: 16-36/37	MERCK	F; Xn
Agar	SIGMA-ALDRICH	
Agarose	INVITROGEN	
Ammoniumsulfat	MERCK	
Ammoniumchlorid R: 22-36; S: 22	MERCK	Xn
Glycosphingolipid asialo-GM1, asialo Gangliosid GM1 S: 22-24/25	SIGMA-ALDRICH	
B		
BCA Protein Assay Kit	PIERCE	
Benzoylchlorid R: 34 S 26-45	MERCK	C
Big Dye TM Terminator Ready Reaction Mix with AmpliTaq®FS	ABI PRISM, PERKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS	
Biotin	NEW ENGLAND BIOLABS	
Biotinamidocappoat-N-hydroxy-succinimidester	SIGMA-ALDRICH	
1-Brompropan R: 10-20; S: 9-24	MERCK	Xn
BSA	CALBIOCHEM	
BSA	SIGMA-ALDRICH	
tert-Butyldimethylchlorsilan R: 34; S: 26-36/37/39-45	MERCK	C

C		
Calciumchlorid, CaCl ₂ x H ₂ O R: 36; S: 26-36	SIGMA-ALDRICH	Xi
α-Cyano-4-hydroxymethylbenzoesäure R: 36/37/38, S: 26-36	SIGMA-ALDRICH	Xi
D		
Dichlormethan R: 40; S: 23.2-24/25-36/37	MERCK	Xn
1, 2-Dichlorethan R: 45.3-11-E22-36/37/38; S: 53-16-29-44	MERCK	T; F
Dihydroxybenzoesäure S: 24/25	MERCK	
2,2-Dimethoxypropan R: 11-36-66; S: 9-16-26	MERCK	F; Xi
N,N-Dimethylformamid R: 61-E20/21-36; S: 53-45	MERCK	T
Dowex [®] 50 W X 8 R: 36/37/38; S: 26-36	FLUKA	
Epoxybeads M270	DYNAL	
E		
<i>E. coli</i> ER2537	NEW ENGLAND BIOLABS	
<i>E. coli</i> ER2738	NEW ENGLAND BIOLABS	
Essigsäureanhydrid R: 10-20/22-34; S: 26-36/37/39-45	MERCK	C
Ethanol R: 11; S: 7-16	MERCK	F
Ethylacetat R : 11 ; S : 16-23.2-29-33	MERCK	F
ExtrAvidin [®] /alkalische Phosphatase	SIGMA-ALDRICH	
EZ-Link [™] Sulfo-NHS-LC-Biotin	PIERCE	
F		
FCS (Foetal Bovin Serum)	GIBCO	
L-Fucose (6-Desoxy-L-galactose)	SIGMA-ALDRICH	
G		
D-Galactose	SIGMA-ALDRICH	
Glutaraldehyd 25 % Lösung in Wasser R: 22 - 23 - 34 - 42/43; S: 26 - 3/37/39 - 45 - 61	SERVA ELECTROPHORESIS GMBH	C
D-Glucose	SIGMA-ALDRICH	

Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste	Zur Verfügung gestellt von Dr. Watkins, Middlesex, England	
H		
H ₂ O ₂ (30 %) R: 34; S: 28-36/39-45	FLUKA	C
Hefeextrakt	CARL ROTH	
HEPES, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure	SIGMA-ALDRICH	
Hexan R: 11-20-48; S: 9-16-24/25-29-51	MERCK	Xn; F
HRP-Anti-M13	PHARMACIA	
I		
<i>ImmunoPure TMB Substrate Kit</i>	PIERCE	
N-Iodsuccinimid	MERCK	
IPTG S: 22-24/25	PEQLAB	
J/K		
Kaliumchlorid	MERCK	
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK	
Kieselgel 60 (230-400 Korngröße, 40-63 µm)	MERCK	
Kieselgel 60/Kieselgur F254 Alufolie	MERCK	
di-Kaliumhydrogenphosphat	MERCK	
di-Natriumhydrogenphosphat	MERCK	
L/M		
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MERCK	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MERCK	
3-Maleimidobenzoessäure-N- hydroxysuccinimidester	SIGMA-ALDRICH	
Mannose	SIGMA-ALDRICH	
Methanol R: 11-23/24/25-39/23/24/25; S: 7-16-36/37-45	MERCK	F, T
N		
α-Naphthol R: 21/22-36/38; S: 22-28.2	MERCK	Xn
Natriumazid R: 28-32-50/53; S: 28.1-45-60-61	MERCK	T+, N
Natriumcarbonat R: 36; S: 22-26	MERCK	Xi
Natriumchlorid, NaCl	MERCK	

Natriumhydrid (Suspension 55-65 %) R: 15-36; S: 24/25-26-43-7/8	FLUKA	F, C
Natriumhydrogencarbonat	MERCK	
Natriumhydroxid R: 35; S: 2-26-37/39	MERCK	C
Natriumiodid	MERCK	
Natriumsulfat	MERCK	
NeutrAvidin™ Meerrettich-Peroxidase-Konjugat	PIERCE	
p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid S: 22-24/25; Löslichkeit in Wasser 0,01 M	SIGMA-ALDRICH	
p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid S: 22-24/25; Löslichkeit in Wasser 0,01 M	SIGMA-ALDRICH	
O		
Octyl β -D-galactopyranoside R: 36/37/38; S: 26-36	SIGMA-ALDRICH	
Optimem	INVITROGEN	
P		
Penicillin/Streptomycin	PAA LABORATORIES GMBH	
Peptide PTLFPLYKG SHLDPTLFPLYKG TLLPHDYPLFKSG SHLDPTLFPLYKGC TLLPHDYPLFKSGC SSAWWSYWPPVAC VWPYSASWPSAWC HSVSNIRPMFPSC ISSHSVFPPNRMIC PAK-Pilin-Protein (128-144)- KCTSDQDEQFIPKGCSK biotinyliertes PAK-Pilin-Protein (128-144)- Biotin-GGGKCTSDQDEQFIPKGCSK	EUROGENTEC EUROGENTEC EUROGENTEC EUROGENTEC EUROGENTEC SCHAFFER-N SCHAFFER-N SCHAFFER-N SCHAFFER-N SCHAFFER-N Dr. Heukeshoven, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg	
Pepton aus Kasein pankreatisch verdaut	VWR	
Petrolether R: 11; S: 9-16-29-33	MERCK	
<i>Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kits</i>	NEW ENGLAND BIOLABS	
Phenyl- β -D-galactopyranosid	SIGMA-ALDRICH	
Phenyl- β -D-glucopyranosid	SIGMA-ALDRICH	
Polyethylenglykol 8.000	FLUKA	

Material und Methoden

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	SIGMA-ALDRICH	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	Zur Verfügung gestellt von Prof. Jaeger, K.-E., Jülich, Deutschland	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stamm 53308	ATCC	
Pyridin R: 11-20/21/22; S: 26-28.1	MERCK	Xn; F
Schwefelsäure R: 35; S: 2-26-30	MERCK	C
R/S		
Sequenzierungs-Primer- 96 gIII 5'- ^{HO} CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3', [100 pmol]	NEW ENGLAND BIOLABS	
Sigma 104 [®] Phosphatasesubstrat S: 22-24/25	SIGMA-ALDRICH	
Streptavidin	NEW ENGLAND BIOLABS	
T		
Tetracyclin Hydrochlorid R: 36/37/38; S: 26-36	SIGMA-ALDRICH	Xi
Tetramethylharnstoff R 22	MERCK	
Tetramethylsilan, TMS R: 12; S: 9-16-29-43.3	MERCK	F⁺
Thiamin		
Toluol-4-sulfonsäure-monohydrat R: 36/37/38; S: 26-37	MERCK	Xi
Triethylamin R: 11-20//21/22-34 S: 16-26-29-36	MERCK	C ; F
Trifluormethansulfonsäure, TfOH R 10-35; S 23.2-26-36/37/39-45	MERCK	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Tris-HCl	MERCK	Xi
Trypsin-EDTA-Lösung	INVITROGEN/GIBCO	
Tween20	MERCK	
U/V/W/X		
Xgal	PEQLAB	
Y/Z		

6.2 Material und Geräte

Material und Geräte	Firma
15 ml Tube	FALCON
A	
ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer	PERKIN ELMER
B	
BIACORE®-3000-Biosensor-System	BIACORE
Brutschrank	NUAVRE
C/D/E	
ELISA Reader Micronaut Skan Type 352 Serie 35200	MERLIN
ELISA Module F8 Maxisorp loose ELISA Riegel	NUNC
Eppendorf Tubes Safe-Lock Reaktionsgefäße 2 ml	EPPENDORF
F/G/H/I	
<i>ImmunoTM Wash 8</i>	NUNC
LH-20 Säule	SEPHADEX
J/K/L/M	
MaxiSorp Röhrchen Immuno TM	NUNC
Microcon YM-3 (yellow top) 3.000 NMWL Filter	MILLIPORE
Microcon YM-30 (clear top) 30.000 NMWL Filter	MILLIPORE
Molekular Sieb	MERCK
N	
NMR Geräte ARX 300, AMX 400 und DRX 500 Instrument	BRUKER
Nunclo TM 96-Well-Platte	NUNC
O/P	
PD-10 Größenausschlußchromatographie Säule	AMERSHAM PHARMACIA
Petrischalen	GREINER
Q/R	
Rollinkubator TRM-V	IDL
S	
SafeSeal-Tips (1.000 µl, 100 µl, 10 µl)	BIOZYM
Sensor-CM5-Chip	BIACORE
Sensor-SA-Chip	BIACORE

SpeedVac (Sg110)	SAVANT
Sterilbank Sterilgaird. Class II Type A/B3	THE BAKER COMPANY SANFORD, MAINE
T/U	
Ultrafree® Centrifugal Filter & Tube Biomax 5 K NMWL Membran 4 ml Vol.	MILLIPORE
Ultrafree® -4 Centrifugal Filter & Tube Biomax 50 K NMWL Membran 4 ml Vol.	MILLIPORE
UV-Meter Ultraspec 30000 UV/Visbl. Spectrophotometer	PHARMACIA BIOTECH
V	
Vortex Genie 2	VIBROFIX VF1 ELECTRONIC
W/X/Y/Z	
Zellkulturflaschen	NUNC
Zentrifugen Eppendorf Zentrifuge 5417 R Eppendorf Zentrifuge 5403 Joran CR 422 Megafuge 1.0R Sorvall® Rc-5C	EPPENDORF EPPENDORF JORAN KENDRO/SORVALL® KENDRO/SORVALL®

6.3 Firmenverzeichnis

A: AMERSHAM, siehe PHARMACIA; **ATCC** American Type Culture Collection, Manassas, USA; **B:** BIACORE, Stevanage, UK; **BRUKER** Daltonics Inc., Billerica, USA; **C:** CALBIOCHEM, siehe MERCK; **D:** DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland; **E:** EUROGENTEC, Seraing, Belgien; **F:** FLUKA Buchs SG, Schweiz; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; **G/H/I:** IDL GmbH & Co. Kg, Nidderau, Deutschland; **INVITROGEN** GmbH, Karlsruhe, Deutschland; **J/K:** KENDRO LABORATORY PRODUCTS GmbH, Langenselbold, Deutschland; **L/M:** MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland; **Merlin**, Bornheim-Hersel, Deutschland; **Millipore**, Billerica, USA; **N:** NEW ENGLAND BIOLABS, INC., Beverly, USA; **NUNC** GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland; **O/P:** PAA LABORATORIES GmbH, Pasching, Österreich; **PHARMACIA** und **PHARMACIA BIOTECH** bzw. **Pfizer**, Cambridge, USA; **PerkinElmer**, Wellesley, USA; **PIERCE** Biotechnology, Inc., Rockford, USA; **PEQLAB** Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland; **Q/R/S:** SAVANT INSTRUMENTS Inc., New York, USA; **SCHAFER-N**, Kopenhagen, Dänemark; **SERVA** ELECTROPHORESIS GmbH, Heidelberg, Deutschland; **SIGMA-ALDRICH**, Saint Louis, USA; **T/U/V:** Vibrofix VF1 Electronic, Staufen, Deutschland; **VWR** International GmbH, Hamburg, Deutschland; **W/X/Y/Z.**

6.4 Methoden

6.4.1 Allgemeine Methoden

6.4.1.1 Biotinylierung von *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

Die Biotinylierung erfolgte wie bei Chen et al. (1998) beschrieben. Das *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I (1 mg, 71,43 nmol) wurde in 1,250 ml PBS gelöst und mit 2 ml Biotinamidocappoat-N-hydroxy-succinimidester (100 µg Biotinester/ 200 µg Lectin) Lösung versetzt und geschüttelt. Nach einer halben Stunde bei RT wurde die Lösung auf Zentrifugeneinheiten Ultrafree[®] Centrifugal Filter & Tube-Biomax, 5 K NMUL Membran 4 ml Vol. gegeben und in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R bei 3.000 x g – 3.500 x g zentrifugiert bis sämtliche Flüssigkeit weitgehend abzentrifugiert war. Der Filter wurde je dreimal mit 2 ml bidest. H₂O und danach dreimal mit je 2 ml TBS-Lösung gewaschen, dann wurde der Rückstand in 1 ml TBS-Lösung aufgenommen. Die Konzentration der Lösung wurde mit Hilfe der BCA-Proteinbestimmung ermittelt.

PBS

Natriumchlorid [0,15 M], di-Natriumhydrogenphosphat [8,1 mM], Natriumdi-hydrogenphosphat [1,7 mM] wurden in 1 l Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 mit Salzsäure eingestellt

6.4.1.2 Peptid-BSA-Konjugate

6.4.1.2.1 Lösungen und Medien

Konjugations-Puffer

Natriumhydrogencarbonat [0,083 M] und Natriumchlorid [0,9 M] (pH 7,2)

Albumin Konjugations Kit

Pre-aktiviertes BSA

Rekonstitutions-Puffer

Konjugations-Puffer

L-Cystein-Lösung

L-Cystein 100 mg/ml in Konjugations-Puffer

MBS-Stock-Lösung

3-Maleimidobenzoessäure-N-hydroxysuccinimidester (MBS) [15 mg/ml] wurden in N,N-Dimethylformamid gelöst.

6.4.1.3 Darstellung von Peptid-BSA-Konjugaten

BSA (60 mg, 1 μ mol) (CALBIOCHEM) wurde in 12 ml Konjugations-Puffer gelöst und mit 840 μ l MBS-Stock-Lösung versetzt. Nach ca. 1.5 h wurde diese Lösung auf eine mit 50 ml Konjugations-Puffer equilibrierte PD-10 Größenausschluß-chromatographie Säule aufgetragen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden im UV-Meter PHARMACIA BIOTECH Ultraspec 30000 UV/Visbl. Spectrophotometer bei der Wellenlänge 280 nm gemessen, vereinigt und aliquotiert. Peptide mit terminalen Cystein-Resten wurden in entsprechendem moläquivalenten Verhältnis Peptid/ BSA in 1 ml Konjugations-Puffer gelöst, und zu den einzelnen Aliquots des aktivierten BSA gegeben. Nach 3 h Inkubationszeit wurden den Lösungen je 100 μ l L-Cystein-Lösung zugegeben und 1 h geschüttelt. Danach wurden die einzelnen Lösungen durch Zentrifugation in der Eppendorf Zentrifuge 5403 bei 7.500 x g und +4 °C auf Zentrifugeneinheiten Ultrafree[®]-4 Centrifugal Filter & Tube Biomax 50 K NMWL Membran 4 ml Vol. konzentriert und aufgereinigt. Die Filter wurden je fünfmal mit PBS gespült. Die Konjugate wurden in PBS aufgenommen und die Konzentration der Lösung mit Hilfe der BCA-Proteinbestimmung ermittelt.

6.4.1.4 Darstellung von Peptid-BSA-Konjugaten mit Hilfe des „Albumin Konjugations Kits“

Nach dem Protokoll von CALBIOCHEM wurden 4 mg des pre-aktivierten BSAs mit 2 ml Rekonstitutions-Puffer vermischt. Dieser Ansatz wurde in vier gleiche Aliquots aufgeteilt. Es wurden die folgenden Peptide gelöst in Konjugations-Puffer eingesetzt:

SSAWWSYWPPVAC [1.5 mg]

VWPYSASWPSAWC Peptid

mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren [1.7 mg] + 10 % DMSO

HSVSNIRPMFPSC [1.7 mg]

ISSHSVFPPNRMC Peptid

mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren [1.9 mg] + 10 % DMSO

Jede dieser Peptid-Lösungen wurde mit je einem Aliquot der BSA-Rekonstitutions-Puffer-Lösung vereinigt. Die Ansätze wurden 24 h bei +4 °C inkubiert. Danach wurden sie je auf einen Zentrifugen-Röhrchen (Microcon YM-30 (clear top) 30.000 NMWL Filter) aufgetragen, bei +4 °C und 5.000 x g in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R zentrifugiert, viermal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und zentrifugiert. Danach wurde der Filter umgedreht, der Rückstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen.

6.4.1.5 BCA-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden entsprechend der Beschreibung des BCA Protein Assay Kits durchgeführt. Hierzu wurden in ELISA Module pro zu bestimmender Probe je 10 µl/Well vorgelegt und mit 200 µl Reaktionsgemisch (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) vermischt und für 30 min bei +37 °C inkubiert. Die ELISA Platte wurde im ELISA-Reader (Micronaut Skan Type 352 Serie 35200) für 10 sec geschüttelt und dann bei einer Wellenlänge von 560 nm ausgewertet. Folgende BSA-Lösungs-Verdünnungsreihe wurde als Standard verwendet:

0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,2 mg/ml

6.4.1.6 Bestimmung der willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren

Die willkürlichen Peptide wurden durch verdecktes Ziehen der einzelnen Aminosäuren der entsprechenden Peptidsequenz bestimmt.

6.4.2 Biopanning mit *Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit*

6.4.2.1 Lösungen und Medien

Agarose Top

In einem Liter Wasser wurden 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid, 1 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat und 7 g Agarose gelöst und zu je 50 ml aliquotiert. Nach dem Autoklavieren wurden die Aliquots bei RT gelagert und bei Bedarf in der Mikrowelle erwärmt.

Blockierungs-Puffer

Zu einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung [0,1 M] wurde BSA [5 mg/ml] und 0,02 % Natriumazid zugegeben. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert.

Iodid-Puffer

Es wurden Tris-HCl [10 mM] und Natriumiodid [4 M] in Wasser gelöst (pH 8,0) und bei RT gelagert.

HBSS

In einem Liter Wasser wurden Magnesiumsulfat-Heptahydrat (0,41 mM, 0,1 g), Natriumchlorid (140 mM, 8 g), di-Natriumhydrogenphosphat (0,35 mM; 0,05 g), Magnesiumchlorid-Hexahydrat (0,49 mM, 0,1 g), Kaliumdihydrogenphosphat (0,44 mM, 0,06 g), Kaliumchlorid (5,37 mM, 0,4 g), Calciumchlorid-Hydrat (1,59 mM, 0,176 g) und Hepes (9,99 mM; 2,38 g) gelöst (pH 7,4) und sterilfiltriert.

Immobilisierungs-Puffer I

Natriumhydrogencarbonat-Lösung [0,1 M] (pH 8,6) wurde mit 0,02 % Natriumazid versetzt.

Immobilisierungs-Puffer II

PBS sterilfiltriert

LB/IPTG/Xgal Platten

In einem Liter LB Medium wurden 15 g Agar gelöst. Diese Lösung wurde autoklaviert, und nach Abkühlen auf +70 °C erfolgte die Zugabe von 1 ml IPTG/Xgal. Die Lösung wurde in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei +4 °C dunkel gelagert.

LB-Tet-Platten

Zu einem Liter LB-Medium wurden 15 g Agar gegeben und autoklaviert. Nach Abkühlen auf +70 °C wurde der Lösung 1 ml Tetracyclin-Lösung (20 mg/ml in Ethanol) zugegeben, das Medium gleichmäßig in Petrischalen verteilt und nach dem Erstarren bei +4 °C gelagert. Aus der *E. coli* ER2738 Glycerol-Stock-Lösung wurde eine kleine Probe entnommen und mit Hilfe einer zuvor ausgeglühten Platinöse

gleichmäßig auf einer bei +37 °C erwärmten Minimalplatte verteilt, bei +37 °C für 24 h inkubiert und danach bei +4 °C gelagert.

Minimalplatten

In 500 ml Wasser wurden 6 g di-Natriumhydrogenphosphat, 3 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g Natriumchlorid und 2 g Ammoniumchlorid gelöst und autoklaviert. In 500 ml einer 3 % Agar-Lösung wurden 20 ml 20%iger D-Glucose Lösung, 2 ml Magnesiumsulfat-Lösung [1 M], 0,1 ml Calciumchlorid-Lösung [1 M] und 1 ml Thiamin [10 mg/ml] zugegeben und autoklaviert. Nach Abkühlung auf +70 °C wurden die beiden Lösungen vereinigt, dieses Gemisch in Petrischalen verteilt und nach dem Erstarren bei +4 °C dunkel gelagert. Aus der *E. coli* ER2537 Glycerol - Stock-Lösung wurde eine kleine Probe entnommen und mit Hilfe einer zuvor ausgeglühten Platinöse gleichmäßig auf einer bei +37 °C erwärmten Minimalplatte verteilt, bei +37 °C für 24 h inkubiert und danach bei +4 °C gelagert.

Peg/NaCl Lösung

In Wasser wurden 20 % (w/v) Polyethylenglykol-8.000 und Natriumchlorid [2,5 mM] gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert.

***Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II**

Das für die Isolierung der L-Fucose mimikrierenden Peptide benötigte *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II wurde von Denis Tielker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jaeger, in einem T7-Expressionsvektor kloniert, überexprimiert im T7-Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) und gereinigt (Tielker, 2002).

Umpufferung von *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II

Drei Aliquots 100 µg/100 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II Lösung in Tris [10 mM], (pH 8,0) wurden auf Zentrifugen-Röhrchen (Microcon YM-3 (yellow top) 3.000 NMWL Filter) gegeben und nach dem Waschen mit 130 µl PBS für ca. 45 min bei +4 °C und 20.800 x g (14.000 rpm) in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R zentrifugiert. Die Rückstände wurden vereinigt und in 100 µl PBS aufgenommen.

TBS-Lösung

Es wurden Tris-HCl (pH 7,5) [50 mM] und Natriumchlorid [150 mM] in Wasser gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert.

6.4.2.2 Biopanning mit *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

Die Durchführung erfolgte nach dem *Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit* Instruction Manual Version 2.0. Alle Pipettierungsschritte wurden mit SafeSeal-Tips durchgeführt, um Kontamination bzw. Verschleppung von Phagen aus anderen Ansätzen zu vermeiden.

6.4.2.2.1 Immobilisierung der Lectine an MaxiSorp Röhrchen

MaxiSorp Röhrchen wurden mit je 2 ml *Target*-Lösung in Immobilisierungs-Puffer I (*Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [100 µg/ml], Streptavidin [0,1 µg/ml] und zur Negativkontrolle nur Immobilisierungs-Puffer I versetzt. Bei +4 °C erfolgte die Inkubation über Nacht unter leichtem Schütteln. Die *Targets* wurden so auf die Polystyrol-Oberfläche adsorbiert. Dieser Schritt wurde vor jeder *Biopanning*-Runde wiederholt.

6.4.2.2.2 Biopanning-Runde I

Nach der *Target* Adsorption über Nacht wurden die Immobilisierungs-Lösungen entfernt. Nach einer Blockierung mit 2 ml Blockierungs-Puffer I für 1 h wurden die Röhrchen je sechsmal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. Parallel wurde eine einzelne *E. coli* ER2537 Kolonie von einer der Minimalplatten in LB Medium bei +37 °C inkubiert. Die Röhrchen wurden mit je 1,990 ml der 0,1%igen Tween20-TBS-Lösung gefüllt, und dann je 9,5 µl Peptide 12-mer *Phage Display Library* [4×10^{12} pfu/ml] hinzupipettiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde 10 mal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. Die Elution wurde beim *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I mit Phenyl-β-D-galactopyranosid [1 mM] (bester Inhibitor bei Inhibitionsuntersuchungen (Chen et al., 1998)) und beim Streptavidin mit Biotin [0,1 mM] in TBS-Lösung 1 h bei RT durchgeführt. Die Eluate wurden abpipettiert und die Röhrchen dreimal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen, bevor eine nachträgliche unspezifische Elution mit pH-Shift durchgeführt wurde. Hierzu wurden 2 ml Glycin-HCl [0,2 M] (pH 2,2) in die Röhrchen gegeben

und diese für 10 min inkubiert. Dann erfolgte zur Neutralisation die Zugabe von 300 µl Tris-HCl [1 M] (pH 9,1).

6.4.2.2.3 Titerbestimmung und Amplifizierung der Eluate

Nach jeder *Biopanning*-Runde wurde für die Titerbestimmung ein Aliquot Agarose Top in der Microwelle erwärmt, in Reagenzgläser (3 ml/Glas) aliquotiert und bei +48 °C gelagert. Parallel wurden LB/IPTG/Xgal Platten bei +37 °C vorgewärmt. Folgende Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-4} , wurden aus 10 µl der Eluate in LB Medium hergestellt. Für die Titerbestimmung wurden je 10 µl der Verdünnungslösungen mit je 200 µl *E. coli* ER2537-Lösung versetzt und bei RT 10 min inkubiert. Bei späteren *Biopannings* mit einem neuen *Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit* für die *Targets Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II und dem Pilus Fragment wurden die im neuen Kit enthaltene *E. coli* ER2738-Lösungen verwendet. Diese Lösungen wurden dann mit dem flüssigen, bei +48 °C gelagerten Agarose Top vereinigt, auf den bei +37 °C vorgewärmten LB/IPTG/Xgal Platten durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt und über Nacht bei +37 °C inkubiert. Die vorhandenen blauen Plaques wurden ausgezählt. Die restlichen Eluate wurden je in 20 ml *E. coli* ER2537- bzw. *E. coli* ER2738-Lösung [$OD_{600} = 0,060$] gegeben und 4,5 h unter Schütteln (260-280 rpm) bei +37 °C amplifiziert.

6.4.2.2.4 Aufbereitung des Amplifikates (Trennung der Phagen von *E. coli*)

Die Lösungen der Amplifikate wurden 10 min bei $14.481 \times g$ (10.000 rpm) in der Sorvall® Rc-5C Zentrifuge im Du Pont Instruments Sorvall® SA-600 Rotor bei +4 °C zentrifugiert. Nach einem erneuten Zentrifugieren des Überstandes für 10 min bei $14.481 \times g$ wurde der Überstand mit 1:6 Volumen Peg/NaCl Lösung versetzt, um die Phagen bei +4 °C im Kühlraum über Nacht zu präzipitieren.

6.4.2.2.5 Präzipitation/ Aufbereitung der amplifizierten Eluate

Jeweils am nächsten Morgen wurde der Überstand nach der Zentrifugation bei $32.583 \times g$ (15.000 rpm) und +4 °C in der Sorvall® Rc-5C Zentrifuge im Du Pont Instruments Sorvall® SA-600 Rotor vorsichtig abpipettiert, die Zentrifugenröhrchen mit je 1 ml TBS-Lösung versetzt, auf dem Vortex Genie 2 homogenisiert und die Wandungen der Röhrchen je dreimal mit TBS-Lösung gespült. Die Lösung wurde mit 1:6 Volumen (~200 µl) Peg/NaCl versetzt und erneut für 1 h auf Eis präzipitiert. Nach

einer Zentrifugation bei +4 °C und 20.800 x g (14.000 rpm) in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R wurde das Sediment in 200 µl TBS-Lösung + 0,02 % NaN₃ aufgenommen. Für die Titerbestimmung wurden aus 10 µl der Lösung Verdünnungsreihen von 10⁻⁸ bis 10⁻¹¹ hergestellt. Je 10 µl dieser Verdünnungen wurden mit 200 µl *E. coli* ER2537-Lösung versetzt und bei RT 10 min inkubiert. Bei späteren *Biopannings* mit einem neuen *Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit* für die *Targets Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II und dem Pilus Fragment wurden *E. coli* ER2738-Lösungen verwendet. Diese Lösungen wurden dann mit dem flüssigen, bei +48 °C gelagerten Agarose Top vereinigt, auf den bei +37 °C vorgewärmten LB/IPTG/Xgal Platten durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt und über Nacht bei +37 °C inkubiert. Die vorhandenen blauen Plaques wurden ausgezählt.

6.4.2.2.6 *Biopanning*-Runde II und Runde III

Durchführung wie unter *Biopanning*-Runde I beschrieben. Sämtliche Waschschriffe wurden mit 0,5%iger Tween20-TBS-Lösung, d. h. mit höherer Detergenzkonzentration durchgeführt. Nach der Blockierung wurden die Röhrchen mit den Amplifikat-Lösungen versetzt und auf 2 ml mit der 0,5%igen Tween20-TBS-Lösung aufgefüllt. Am Ende der *Biopanning*-Runde III erfolgte nur die Titerbestimmung der Eluate (siehe 6.4.2.2.3).

Das unspezifische Eluat aus *Biopanning* Runde I wurde nach dem Amplifizieren für ein *Biopanning* wie oben beschrieben verwendet, wobei in allen drei Runden nur die unspezifische Elution durchgeführt wurde.

6.4.2.2.7 Isolierung einzelner bindender Phagen

Pro LB/IPTG/Xgal Platte wurden blaue Plaques mit Hilfe von Pipettenspitzen (SafeSeal-Tips) ausgestochen und 4,5 h mit 3 ml *E. coli* ER2537-Lösung [1:100 Übernachtskultur] in 15 ml Falcon Tubes amplifiziert. Bei späteren *Biopannings* mit einem neuen *Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit* für die *Targets Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II und dem Pilus Fragment wurden *E. coli* ER2738-Lösungen verwendet. Die 15 ml Falcon Tubes wurden 10 min bei 3.900 x g in der Joran CR 422 Zentrifuge bei +4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden weitestgehend in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei +4 °C und

10.600 x g (10.000 rpm) in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R für 1 min zentrifugiert. Von den Überständen wurde je 1 ml mit 1:6 Volumen PEG/NaCl-Lösung versetzt und 1 h bei +4 °C präzipitiert. Nach der Präzipitation wurde in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R bei +4 °C und 20.800 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Zusätzlich wurden 500 ml der Überstände für die DNA-Fällung entsprechend behandelt und wie unter 6.4.2.2.8 beschrieben weiter verwendet. Die verbleibenden Sedimente wurden für ELISA-Experimente in TBS resuspendiert und gegebenenfalls amplifiziert.

6.4.2.2.8 DNA-Fällung der einzelnen isolierten Phagen

Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente in je 100 ml Iodid-Puffer mit Hilfe der Pipette suspendiert. Nach Zugabe von 250 ml Ethanol (absolut) wurde 10 min bei RT inkubiert. Die Ethanolfällung wurde bei +4 °C und 20.800 x g (14.000 rpm) in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R für 10 min zentrifugiert. Nach der Abtrennung des Überstandes wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und danach 10 min zentrifugiert. Nach einem erneuten Zentrifugieren wurden verbleibende Ethanolreste abpipettiert. Die Sedimente wurden in der SpeedVac (Sg110) getrocknet und in je 30 µl autoklaviertem H₂O bidest. aufgenommen.

6.4.2.2.9 Sequenzierung der Phagen DNA

Für die Sequenzierung wurden je 7 µl von den DNA-Ansätzen mit je 1 µl Sequenzierungs-Primer-96 gIII [10 pM in H₂O] versetzt. Zur Sequenzierung wurde die Methode der Terminatorsequenzierung unter Verwendung von *Big DyeTM Terminator Ready Reaction Mix with AmpliTaq[®]FS* verwendet. Die Proben wurden mit dem ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer automatisch sequenziert und die Signale mit der Software ABI PRISMTM Model 377 Version 3.3 ABI 100 Version 3.2 ausgewertet.

6.4.2.2.10 Amplifikation einzelner bindender Phagen-Lösungen

Es wurden je 10 µl der Phagenlösungen in 20 ml *E. coli* ER2537-Lösung (Übernachtskultur 1:100 Verdünnung) gegeben, 4,5 h unter Schütteln bei +37 °C amplifiziert und wie die amplifizierten Eluate aufgearbeitet (siehe 6.4.2.2.5). Bei späteren *Biopannings* mit einem neuen *Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library*

Kit für die *Targets Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II und dem Pilus Fragment wurden *E. coli* ER2738-Lösungen verwendet.

6.4.2.3 Erneutes *Biopanning* mit *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

In einem späteren *Biopanning* wurde die erste *Biopanning* Runde mit 10 µl einer neuen *Peptide 12-mer Phage Display Library* mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^{13}$ pfu/ml durchgeführt. Die Elution der Phagen erfolgte in einem der Röhrchen spezifisch für 1 h mit Phenyl-β-D-galactopyranosid [10 mM] und im anderen parallel unspezifisch für 10 min mit 1,8 ml Glycin-HCl [0,2 M] (pH 2,2) mit anschließender Neutralisation durch Zugabe von 250 µl Tris-HCl [1M] (pH 9,1). Ansonsten wurde entsprechend wie unter *Biopanning Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I beschrieben fortgefahren.

6.4.2.4 *Biopanning* mit *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II und synthetischem biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144)

6.4.2.4.1 Immobilisierung von Epoxybeads M270

Epoxybeads M270 (20 mg, $13,33 \times 10^8$ Beads) wurden nach Angaben des Herstellers (DYNAL) in 100 µl di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer [0,1 M] (pH 7,4) aufgenommen. Aus dieser Stocklösung wurden vor jeder der drei *Biopanning*-Runden 10 µl (2mg, $1,33 \times 10^8$ Beads) zweimal mit 1 ml di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung [0,1 M] (pH 7,4) gewaschen und wie beschrieben weiter verarbeitet. Die Beads wurden nach der Abtrennung des Überstandes in 54 µl di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung [0,1 M] (pH 7,4) aufgenommen. Für die *Target* Adsorption wurden 13,5 µl Beadlösung (0,5 mg, $3,33 \times 10^7$ Beads), 13,5 µl *Target*-Lösung (10 µg, in PBS) und 13,5 µl Ammoniumsulfat-Lösung [3 M] zusammengegeben. Die Adsorption erfolgte für 24 h bei +4 °C.

Targets:

- *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II
- biotinyliertes PAK-Pilin-Protein (128-144)
(von Dr. Heukeshoven, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)

Für diese *Target*-Beads wurde in Immobilisierungs-Puffer II Streptavidin (M: ~60.000 g/mol; vier Bindungsstellen für Biotin; 0,16 nmol, $9,6 \times 10^{-5}$ g) gelöst und mit 10 Äquivalenten des synthetischen biotinylierten PAK-Pilin-Proteins (128-144)

[1,6 nmol] versetzt und ca. 0,5-1 h preinkubiert. Diese Lösung wurde dann zur Adsorption an den Beads verwendet.

- BSA:

Vor den *Biopanning*-Runden II und III wurden zusätzlich Beads nach dem oben beschriebenen Ansatz für die Preinkubation mit BSA adsorbiert.

- Streptavidin:

Vor den *Biopanning*-Runden II und III wurden zusätzlich Beads nach dem oben beschriebenen Ansatz für die Preinkubation mit Streptavidin adsorbiert.

Danach wurden die Beads auf dem Magneten abgetrennt und der Überstand verworfen. Nach dem viermaligen Waschen mit PBS wurden die Beads 1 h mit 0,5%iger BSA-Lösung in PBS bei +4 °C blockiert. Nach dem Füllen der Beads wurde der Überstand verworfen.

6.4.2.4.2 *Biopanning*-Runde I

Nach *Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit Instruction Manual Version 2.7* wurde das *Biopanning* durchgeführt. Die Beads wurden sechsmal in 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung gewaschen. Die Ansätze wurden auf 1 ml mit der HBSS-Lösung aufgefüllt, anschließend wurden 10 µl *Peptide 12-mer Phage Display Library* [$1,5 \times 10^{13}$ pfu/ml] zugegeben. Nach 1,5 h bei RT wurden die Ansätze je 10mal mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung gewaschen. Bei dem Streptavidin/synthetischen biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144) Ansatz wurde vor dem Waschen 5 min mit Biotin [0,1 µg/ml] inkubiert. Die Abtrennung der Beads erfolgte immer auf einem Magneten, wobei der Überstand verworfen wurde. Bei Waschschritten 3 und 6 wurde jeweils ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß verwendet.

Beim Ansatz mit Streptavidin/synthetischem biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144) wurde eine unspezifische Elution mit pH-Shift durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml Glycin-HCl [0,2 M] (pH 2,2) für 10 min in den Eppendorf Reaktionsgefäßen inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl Tris-HCl [1M] (pH 9,1). Für den *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II Ansatz erfolgte die spezifische Elution mit 1 ml L-Fucose-Lösung [100 mM]. Die Ansätze wurden je 1 h bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 6.4.2.2.3; 6.4.2.2.4; 6.4.2.2.5 durchgeführt.

6.4.2.4.3 *Biopanning*-Runde II und III

Vor dem eigentlichen *Biopanning* wurden die einzelnen Amplifikate mit BSA-Beads bzw. Streptavidin-Beads (für das biotinylierte PAK-Pilin-Protein) in 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung vor der Runde II für 10 min und vor der Runde III für 30 min, (Gesamtvolumen 1 ml) zur Reduktion unspezifisch bindender Phagen preinkubiert. Nach dem Fällern wurden diese Beads verworfen und die Überstände auf die 6mal mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung gewaschenen *Targetbeads* überführt. Nach 1,5 h bei RT wurden die Ansätze je 10mal mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung gewaschen. Ansonsten wurde wie unter 6.4.2.2 vorgegangen.

6.4.2.5 Erneutes *Biopanning*

Epoxybeads ($9,33 \times 10^8$ Beads, 14 mg) wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Für die *Target* Adsorption wurden 80 µl Beadlösung (2 mg, $1,33 \times 10^8$ Beads), 80 µl *Target*-Lösung (40 µg, in PBS) und 80 µl Ammoniumsulfat-Lösung [3 M] zusammengegeben. Die Adsorption erfolgte für 24 h bei +4 °C. Nach dem Blockieren wurden die Beads je in 400 µl PBS aufgenommen.

Targets:

- *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II
- PAK-Pilin-Protein (128-144)
- BSA

Für die *Biopanning*-Runden II und III wurden zusätzlich Beads nach dem oben beschriebenen Ansatz für die Preinkubation mit BSA adsorbiert. Für die einzelnen *Biopanning*-Runden wurden je 100 µl der *Target*-Bead-Stocklösungen eingesetzt. Ansonsten wurde wie unter 6.4.2.4.3 verfahren.

6.4.3 ELISA mit amplifizierten Phagenlösungen

6.4.3.1 Lösungen und Medien

ABTS-Lösung

In einer Natriumzitrats-Lösung [50 mM] (pH 4,0) wurden 0,22 mg/ml ABTS gelöst. Kurz vor der Verwendung wurde zu der Lösung pro 21 ml 36 µl H₂O₂ (30 %) zu pipettiert.

Amplifizierte Phagenlösungen

Siehe unter 6.4.2.2.10

Blockierungs-Puffer I

Zu einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung [0,1 M] wurden BSA [5 mg/ml] und 0,02 % Natriumazid zugegeben. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert.

Blockierungs-Puffer II

Sterilfiltrierte PBS-Lösung mit BSA [5 mg/ml] und 0,02 % Natriumazid

Immobilisierungs-Puffer I

Natriumhydrogencarbonat-Lösung [0,1 M] (pH 8,6) wurde mit 0,02 % Natriumazid versetzt.

Immobilisierungs-Puffer II

PBS sterilfiltriert

6.4.3.2 Immobilisierung von Lectin PA-I an ELISA Modulen und Phagen-Bindung

Die ELISA Module wurden mit je 100 µl/Well *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [100 µg/ml] und als Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] in Immobilisierungs-Puffer I bei +4 °C über Nacht adsorbiert. Die Immobilisierungs-Lösungen wurden entfernt, die Wells mit je 200 µl Blockierungs-Puffer I für 4 h bei +4 °C blockiert und dann je sechsmal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung mit Hilfe des *ImmunoTM Wash 8* gewaschen. In einer mit Blockierungs-Puffer I immobilisierten ELISA-Platten wurden nach Entfernung des Blockierungs-Puffer I die 1:4 Phagen-Verdünnungen [Start 5×10^9 pfu/ml] der Phagen durchgeführt. Die Wells wurden mit je 100 µl Phagen-Lösung versetzt und bei RT geschüttelt. Nach 1 h bei RT wurde sechsmal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. Nach der Inkubationszeit von 1 h mit HRP-Anti-M13 [1:5.000] und erneutem 6maligen Waschen wurde 1 h mit ABTS-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Platten 10 sec geschüttelt. Die Absorption der Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

6.4.3.3 Immobilisierung von PA-II und PAK-Pilin-Protein (128-144) an ELISA Modulen und Phagen-Bindung

Für die Adsorption wurden in Immobilisierungs-Puffer II gelöstes *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II [20 µg/ml] bzw. PAK-Pilin-Protein (128-144) [100 µg/ml] und als Kontrolle BSA [5 mg/ml] verwendet. Danach wurden die Wells mit je 100 µl Phagen-Lösung [1×10^9 pfu/ml] in HBSS versetzt und bei RT geschüttelt. Nach 1,5 h bei RT wurde 10mal mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung gewaschen. Die weiteren Waschschrirte mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung wurden je 10mal durchgeführt und der Antikörper [1:3.000] eingesetzt, ansonsten wurde wie unter 6.4.3.2 verfahren.

6.4.4 Kompetition der Phagen-Bindung an adsorbiertem Lectin

6.4.4.1 Lösungen und Medien

Amplifizierte Phagen Lösungen in TBS aus *Phage Display* mit Lectin PA-I

Phage mit Sequenz: SHLD**PTLFPLYK**

Amplifizierte Phagen-Lösungen in HBSS aus *Phage Display* mit Lectin PA-II

Phage mit Sequenz A: SSAWWSYWPPVA

Phage mit Sequenz B: SWPYSFWFPLEN

Phage mit Sequenz C: ILANDLTAPGPR

Phage mit Sequenz D: AHRHPISFLSTL

Die Konzentrationsbestimmungen der Lösungen erfolgten durch BCA-Proteinbestimmungen.

Saccharid-Lösungen

Phenyl-β-D-glucopyranosid	[10 mM] in TBS
Phenyl-β-D-galactopyranosid	[10 mM] in TBS
L-Fucose	[20 mM] und [1 M] in HBSS
D-Glucose	[20 mM] und [1 M] in HBSS
D-Mannose	[20 mM] und [1 M] in HBSS
D-Galactose	[20 mM] und [0,5 M] in HBSS
p-Nitrophenyl-α-L-fucopyranosid	[20 mM] und [~40 mM] in HBSS + DMSO
p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid	[20 mM] und [~40 mM] in HBSS + DMSO

6.4.4.2 **Kompetition der Phagen-Bindung an adsorbiertem Lectin PA-I**

Die Adsorption des *Target*-Lectins [50 µg/ml], der Kontrolle BSA [5 mg/ml] und die Blockierung der Wells erfolgte wie unter 6.4.3.2 beschrieben. In einer vollständig mit BSA adsorbierten ELISA Platte wurden nach Entfernung des Blockierungs-Puffers I die 1:4 Phagen-Verdünnungen (Phagen-Lösungen in TBS aus *Phage Display* mit Lectin PA-I; Start 5×10^9 pfu/ml) pipettiert. Die Wells wurden mit je 60 µl Phagen-Lösung versetzt und bei RT 1 h geschüttelt. Nach 6maligem Waschen mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung wurde 1 h mit 60 µl Phenyl-β-D-galactopyranosid [10 mM] und Phenyl-β-D-glucopyranosid [10 mM] in TBS-Lösung kompetitiert. Die Lösungen wurden verworfen und wie unter 6.4.3.2 fortgefahren.

6.4.4.3 **Kompetition der Phagen-Bindung an adsorbiertem PA-II und PA-I**

Für die Adsorption wurden *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II [10 µg/ml] und *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [10 µg/ml] nach 6.4.3.3 eingesetzt. Die Blockierung wurde für 2 h bei +4 °C durchgeführt. Danach wurde 3mal mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung gewaschen. Die Wells wurden mit je 100 µl einer der Saccharid-Lösungen [20 mM], entweder mit L-Fucose, D-Glucose, Mannose, p-Nitrophenyl-α-L-fucopyranosid oder p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid versetzt und bei RT 2 h geschüttelt. Die Kontrollwells für die reine Lectinbindung wurden nur mit HBSS inkubiert. Danach wurden zu den Saccharid-Lösungen je 100 µl Phagenlösung (Phagen-Lösungen aus *Phage Display* mit Lectin PA-II; 10 µg Protein/ml) in 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung zupipettiert und 1,5 h bei RT inkubiert und wie unter 6.4.3.3 verfahren.

6.4.4.4 **Kompetition der Bindung des Phagen A, SSAWWSYWPPVA, bei höherer Saccharid-Konzentration**

Dieser ELISA wurde wie unter 6.4.4.3 beschrieben durchgeführt. Die Wells wurden mit je 100 µl der entsprechenden Saccharid-Lösungen in HBSS L-Fucose [1 M], D-Glucose [1 M], D-Galactose [0,5 M], Mannose [1 M], p-Nitrophenyl-α-L-fucopyranosid [~40 mM] oder p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid [~40 mM] versetzt und bei +4 °C für 1 h geschüttelt. Nitrophenyl-α-L-fucopyranosid und p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid konnten durch die Zugabe von DMSO nicht vollständig gelöst werden. Die Phagen-Inkubation erfolgte mit der Lösung des Phagen (A) SSAWWSYWPPVA [8 µg/ml] in 0,5%iger BSA/Tween20-HBSS-Lösung für

10 min bei RT. Die Waschschritte wurden je 10mal mit 0,3%iger Tween20-HBSS-Lösung durchgeführt. Die Durchführung erfolgte weiter wie unter 6.4.3.3 beschrieben.

6.4.5 Inhibition von spezifischen Bindungen durch synthetisierte Peptide

6.4.5.1 Lösungen und Medien

Biotinyliertes *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

Blockierungs-Puffer

Zu einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung [0,1 M] wurde BSA [5 mg/ml] und 0,02 % Natriumazid zugegeben. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert.

Immobilisierungs-Puffer

Natriumhydrogencarbonat [0,1 M] und 0,02 % Natriumazid wurden in Wasser gelöst und die Lösung sterilfiltriert.

PBS-T-Lösung

Zur PBS-Lösung wurden 0,1 % [v/v] Tween20 zugegeben.

Peptid-Lösungen

SHLDPTLFPLYKG	[500 µM] in 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung
TLLPHDYPLFKSG	[500 µM] in 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung
SSAWWSYWPPVAC	[100 µM] in HBSS
VWPYSASWPSAWC	[100 µM] in HBSS
HSVSNIRPMFPSC	[100 µM] in HBSS
HSVSNIRPMFPSC	[3 und 6 µM] in 1%iger BSA PBS-Lösung
ISSHSVFPPNRMC	[3 und 6 µM] in 1%iger BSA PBS-Lösung
AHRHPISFLSTLC	[6 µM] in 1%iger BSA PBS-Lösung

Saccharid-Lösung

Phenyl-β-D-galactopyranosid	[200 mM] in 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung
-----------------------------	--

Sigma 104[®] Phosphatasesubstrat-Lösung

Eine Tablette wurde in 5 ml Lösung aus Natriumcarbonat [0,05 M] (pH 9,6) und Magnesiumchlorid [1 mM] gelöst.

6.4.5.2 Inhibition der Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I mit Peptiden

Die ELISA Module wurden mit je 100 µl/Well des freundlicherweise von Dr. Watkins (Middlesex, England) zur Verfügung gestellten Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydattidenzyste [1 µg/ml] in Immobilisierungs-Puffer 2 h bei RT adsorbiert. Die Lösungen wurden entfernt (Rest 20 µl). Nach einer Blockierung für 30 min mit 200 µl Blockierungs-Puffer pro Well bei RT wurden die Wells je 10mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. In einer mit Blockierungs-Puffer adsorbierten ELISA Platte wurden nach Entfernung des Puffers die 1:4 Verdünnungsreihen (siehe oben) pipettiert. Die Wells wurden mit je 50 µl der entsprechenden Peptid-Lösungen oder Phenyl-β-D-galactopyranosid-Lösungen in 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung bzw. für die reine Lectinbindung nur mit der TBS-Lösung mit je 50 µl biotinylierter *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [0,25 µg/Well] Lösung vereinigt und bei RT 1 h geschüttelt. Nach 6maligem Waschen mit TBS-T Lösung [0,05 % Tween 20] wurde 1 h mit ExtrAvidin[®]/alkalische Phosphatase [1:10.000] Lösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit und 6maligem Waschen wurden die Wells mit 100 µl/Well Sigma 104[®]-Lösung inkubiert. Die Absorption der Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

6.4.5.3 Inhibition der Phagen-Bindung an *Pseudomonas aeruginosa* PA-II durch synthetisierte Peptidsequenzen

ELISA Module wurden mit je 100 µl/Well *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II Lösung [3,76 µg/ml] bei +4 °C über Nacht adsorbiert und der Überstand am nächsten Morgen verworfen. Danach erfolgte sofort eine Blockierung mit 200 µl 5%iger BSA HBSS-Lösung je Well für 1,5 h bei +37 °C. Nach dem Verwerfen der Lösung wurde mit je 100 µl der Peptid-Lösungen in HBSS bei +37 °C 1,5 h geschüttelt. Die Kontrollwells für die reine Lectinbindung wurden nur mit HBSS inkubiert. Nach 1,5 h wurden je 100 µl Phagenlösung [13 µg/ml] in 5%iger BSA/0,2%iger Tween20-HBSS-Lösung zupipettiert und 10 min bei +37 °C inkubiert. Die Waschschritte mit 0,3%iger Tween20-HBSS-Lösung wurden je 10mal durchgeführt und der Antikörper

[1:5.000] in 5%iger BSA/Tween20-HBSS-Lösung eingesetzt, ansonsten wurde wie unter 6.4.3.2 verfahren.

6.4.5.4 Inhibition der Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1

ELISA Module wurde mit 100 µl Glycosphingolipid asialo-GM1-Lösung [1 µg/ml] in Methanol bei +37 °C adsorbiert. Nach dem Verdampfen der Methanol-Lösungen wurde mit 250 µl/Well Blockierungs-Puffer für 1 h inkubiert. Parallel wurde eine synthetische biotinylierte PAK-Pilin-Protein (128-144) Lösung [12,5 µM] mit dem synthetisierten Peptid HSVSNIRPMFPSC [6 µM, 3 µM], dem Peptid ISSHSVFPPNRMCMC [6 µM, 3 µM] mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren oder dem Kontroll-Peptid AHRHPISFLSTLC [6 µM] 1,5 h vorinkubiert. Die Wells wurden je 3mal mit 1%iger BSA PBS-Lösung mit der Mehrkanalpipette gewaschen, mit je 100 µl der entsprechenden preinkubierten Lösungen versetzt und 1,5 h bei RT geschüttelt. Für die reine Bindung an das Glycosphingolipid asialo-GM1 wurde nur mit synthetischer biotinylierter PAK-Pilin-Protein (128-144) Lösung [12,5 µM] inkubiert. Die Wells wurden je 3mal mit 1%iger BSA PBS-Lösung mit der Mehrkanalpipette gewaschen. Die Wells der ELISA Platte wurden dann mit NeutrAvidinTM Meerrettich-Peroxidase-Konjugat [1:3.000] in 1%iger BSA PBS-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Wells 6mal mit der PBS-Lösung mit der Mehrkanalpipette gewaschen, mit 100 µl/Well ABTS-Lösung für 30 min inkubiert. Die Absorption der Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

6.4.6 Bindungsstudien in Anwesenheit von Peptid-BSA-Konjugaten

6.4.6.1 Bindung des biotinylierten Lectins PA-I an Peptid-BSA-Konjugate

Die Adsorption der 1:3 Verdünnungen der Konjugate, des Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste und nur BSA zur Kontrolle und die Blockierung erfolgte wie unter 6.4.5.2 beschrieben.

Startkonzentrationen für die Verdünnungen:

Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste	[100 µg/ml]
~20-mer-BSA-Konjugat des Peptids SHLDPTLFPLYKGC	[98 µg/ml]
~20-mer-BSA-Konjugat des Peptids TLLPHDYPLFKSGC	[98 µg/ml]

mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren

Die Wells wurden mit je 100 µl biotinylierter *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I-Lösung [2,5 µg/ml] versetzt und bei RT 1 h geschüttelt. Ansonsten wurde wie unter 6.4.5.2 verfahren.

6.4.6.2 Inhibition der Bindung des biotinylierten Lectins an Peptid-BSA-Konjugate

Die Durchführung erfolgte wie unter 6.4.6.1 beschrieben. Die Startkonzentration der zu adsorbierenden Konjugate lag bei 417 µg/ml. Die beschichteten Wells wurden mit je 100 µl biotinylierter *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [1 µg/ml] Lösung versetzt. Bei einigen mit dem 20-mer-BSA-Konjugat des Peptids **SHLDPTLFPLYKGC** adsorbierten Wells wurde die Inkubation mit einem Gemisch aus biotinyliertem Lectin [1 µg/ml] und Phenyl-β-D-galactopyranosid [1 mM] durchgeführt. Ansonsten wurde wie unter 6.4.5.2 fortgefahren.

6.4.6.3 Konkurrenz der Bindung des Phagens (A) SSAWWSYWPPVA an *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II Oberfläche durch BSA-Peptid Konjugate

Dieser ELISA wurde wie unter 6.4.5.3 beschrieben durchgeführt. Nach dem Verwerfen des Blockierungs-Puffers wurde 1 x mit HBSS gewaschen und die Wells mit je 100 µl der entsprechenden Peptid-SSAWWSYWPPVAC-BSA-Konjugat-, Peptid-VWPYASWPSAWC-BSA-Konjugat- (mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren) und der Kontroll-Peptid-HSVSNIRPMFPSC-Konjugat-Lösung [20 µg/ml] versetzt und bei +37 °C 1,5 h lang geschüttelt. Ansonsten wurde wie unter 6.4.5.3 verfahren.

6.4.7 Funktioneller Test *in vitro*

6.4.7.1 Lösungen und Medien

Kultur-Medium

Zu 500 ml Optimem wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin –Lösung und 50 ml FCS (Foetal Bovin Serum (Gibco)) unter der Sterilbank Sterilgaird® Class II Type A/B3 (The Baker Company Sanford, Maine) vereinigt.

PBS-Lösung

Die folgenden PBS-Lösungen wurden hergestellt.

1%ige BSA PBS-Lösung (pH 7,4)

3%ige BSA PBS-Lösung (pH 7,4)

PBS (pH 7,6) + 0,1 mM Calciumchlorid + 1 mM Magnesiumchlorid

6.4.7.2 Inhibition der Adhäsion biotinylierter *Pseudomonas aeruginosa* an A549 menschliche Lungenkarzinomzellen

Die Durchführung erfolgte nach Anleitung von Dr. Khan (Würzburg). Unter der Sterilbank A549-Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen ausgesät und bei +37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre solange inkubiert, bis sie bis zur Konfluenz gewachsen waren. Danach wurde die

Kulturlösung abgenommen, die Zellen mit Kulturmedium gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Die Lösung wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in frischen Kulturmedium aufgenommen und die Zelldichte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Wells einer Nunclon™ 96-Well-Platte wurden mit je 100 µl/Well A549 Zell-Lösung [$2,5 \times 10^5$ Zellen/ml] gefüllt und über Nacht bei +37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Wells 3mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 1,25 % Glutaraldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach dem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurde mit 3%iger BSA PBS-Lösung für 1 h bei +37 °C blockiert. Nach zweifachen Waschen mit PBS (pH 7,4) wurde die Platte für Adhäsions-Experimente verwendet.

6.4.7.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* Kultur und Biotinylierung von *Pseudomonas aeruginosa*

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie bei Prof. Dr. Mack (Hamburg) wurde ein eingefrorenes Aliquot des *Pseudomonas aeruginosa*-Stamms ATCC 53308 in 100 ml LB-Medium gelöst und über Nacht im Brutschrank unter leichtem Schütteln bei +37 °C kultiviert. Je 30 ml dieser Kultur wurde am nächsten Morgen bei 6.000 g für 13 min in der Megafuge 1.0R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment 3mal mit 10 ml PBS (pH 7,6) gewaschen. Die Bakterienanzahl wurde mit Hilfe des Fotometers DU530 durch Absorptionsmessung bei 550 nm nach Anweisung von Dr. Khan bestimmt. Für die Berechnung der Zellmenge wurde zugrunde gelegt, dass die optische Dichte OD₆₀₀ = 1 einer Zahl von 8×10^8 Zellen pro ml entspricht (Sambrook et al., 1989). Von dieser Lösung [$5,6 \times 10^8$ Zellen/ml] und der EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin Lösung [0,4 mg/ml] wurden je 10 ml in einem 50 ml Erlenmeyerkolben vereinigt und für 2 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionslösung abzentrifugiert und die sedimentierten Bakterien 3mal mit 1%iger BSA PBS-Lösung (pH 7,4) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gewaschen. Die Bakterien wurden in entsprechendem Volumen 1%iger BSA PBS-Lösung (pH 7,4) gelöst, so dass sich eine Bakterien-Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml ergab.

6.4.7.2.2 Adhäsions-Experiment

In einer mit 3%iger BSA PBS-Lösung für 1 h bei +37 °C blockierten und gewaschenen 96-Well-Platte wurde eine Verdünnungsreihe 1:2 in 1%iger BSA PBS-Lösung (pH 7,4) angefertigt:

Phenyl- β -D-galactopyranosid Start [200 mM]

10-mer-BSA-Konjugat (M: 81.906) Start [146,51 μ M]

Die Konzentrationsangaben der Konjugate nach BCA-Proteinbestimmung der Konjugat-Lösung beziehen sich auf die theoretische Molmasse eines 10-mer-Peptid-BSA-Konjugats mit $M_{\text{Konjugat}} = M_{\text{Peptid}} (1.590,6 \text{ g/mol} \times 10) + M_{\text{BSA}} (66.000 \text{ g/mol})$. Je 50 μ l der Verdünnungen wurden pro Well auf den mit A549-Zellen adsorbierten NunclonTM 96-Well-Platten vorgelegt und dann mit je 50 μ l biotinylierter Bakterien-Lösung ATCC 53308 versetzt. Daraus ergab sich die folgende Endkonzentration: Zucker [100 mM] (Start der Verdünnungsreihe), Konjugat [73,25 μ M] (Start der Verdünnungsreihe), biotinylierte Bakterien-Lösung [$0,5 \times 10^8$ Zellen/ml]. Die Platte wurde 3 h bei +37 °C inkubiert, dann 3mal mit 1%iger BSA PBS-Lösung (pH 7,4) gewaschen und die Bakterien 10 min bei +37 °C durch Trocknung fixiert.

Die Wells wurden dann mit NeutrAvidinTM Meerrettich-Peroxidase-Konjugat [1:1.500] in 1%iger BSA PBS-Lösung für 1 h bei +37 °C inkubiert. Danach wurden die Wells je 3mal mit 150 μ l 1%iger BSA PBS-Lösung (pH 7,4) gewaschen und mit 100 μ l *ImmunoPure TMB Substrate Kit* Lösung für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μ l [2 M] H₂SO₄ gestoppt. Nachdem Schütteln für 10 sec wurde die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

6.4.8 Plasmon-Resonanz Methode (BIAcore)

Die BIAcore-Messungen wurden auf einem BIAcore[®]-3000-Biosensor-System durchgeführt. Das Prinzip beruht auf dem optischen Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface-Plasmon-Resonance, SPR). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software BIAevaluation 3.0. Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz ist ein optisches elektronisches Phänomen hervorgerufen durch die Interaktion von Licht mit Metalloberflächen. Elektronen können an der Oberfläche durch das eintreffende Licht zur kollektiven Oszillation angeregt werden. Dieses Phänomen wird bei einem bestimmten Einfallswinkel des auftreffenden Lichtes einer bestimmten Wellenlänge,

Resonanzwellenlänge, hervorgerufen und resultiert in einer nahezu absoluten Absorption des einfallenden Lichtes. Die Energie wird an Oberflächenelektronen bzw. Plasmonen transferiert. Bei allen anderen Wellenlängen wird das einfallende Licht an der Oberfläche reflektiert. Die Resonanzwellenlänge ist abhängig vom Metall, der Metalloberfläche und dem Brechungsindex des Mediums in Kontakt mit der Metalloberfläche. Am häufigsten wird Gold verwendet, das ein leicht zu messendes SPR-Signal nahe dem Infrarotbereich aufweist. Diese Methode ermöglicht ohne aufwendige Markierung der Bindungspartner die Untersuchung der Adhäsion und Dissoziation in Echtzeit. Die Änderung des Oberflächenplasmonresonanzwinkels gibt die Änderungen der Massenkonzentration innerhalb der Oberflächenschicht wieder, welche durch eine Anbindung eines Bindungspartners an das immobilisierte *Target* hervorgerufen werden. Die Änderungen des Resonanzwinkels werden in einem Sensorgramm wiedergegeben. Die Signaländerungen werden hier in Resonanzeinheiten (*Resonance Units*, RU) gegen die Zeit aufgetragen (1 RU entspricht einer Konzentrationsveränderung von 1 pg/mm² Oberflächenprotein) (Homola, 2003; Schulze, 2000; Szabo et al., 1995; Welford, 1991).

6.4.8.1 Immobilisierung von Streptavidin auf dem Sensor-CM5-BIACORE-Chip und Adsorption von *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

Die Kopplung des Streptavidins auf dem CM5-Chip wurde mit einer Konzentration von 20 mg/ml nach dem Standardprotokoll (BIACORE) durchgeführt. Nachträglich wurde die Oberfläche mit dem biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [20 mg/ml] adsorbiert. Um restliche freie Bindungsstellen des Streptavidins zu blockieren, wurden die Flusszellen des CM5-Chips mit Biotin [1 mg/ml] abgesättigt.

6.4.8.2 Immobilisierung von *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I auf dem Sensor-SA-BIACORE-Chip

Die Immobilisierung erfolgte durch Injektion des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I [20 mg/ml] für 1 min auf dem SA-Chip. Die Absättigung der Streptavidin- Oberfläche wurde wie oben beschreiben durchgeführt.

6.4.8.3 Bindungsstudien an adsorbiertem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I auf dem Sensor-CM5-BIACORE-Chip

Für die entsprechenden Bindungsstudien wurden Phenyl- β -D-galactopyranosid [10 μ M], Phenyl- β -D-glucopyranosid [10 μ M], das Peptid **SHLDPTLFPLYKG** [10 μ M], das Peptid **TLLPHDYPLFKSG** [10 μ M] mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren und das Peptid mit der Konsensussequenz **PTLFPLYKG** [10 μ M] zur Messung der Assoziation 5 min lang bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Danach wurde zur Messung der Dissoziation für 5 min Laufpuffer (0,5%ige Tween20-TBS-Lösung) mit einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Die Oberflächen wurden mit Glycin [50mM] (pH 2,0) regeneriert.

6.4.8.4 Bindung der BSA-Konjugate auf immobilisiertem Sensor-CM5-BIACORE-Chip

Die BSA-Konjugate [1,2 μ M], die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die theoretische Molmasse eines 20-mer-BSA-Konjugats mit $M = 97.812$ g/mol (BSA $M = 66.000$ g/mol; Peptid = 1.590,6 g/mol), wurden 5 min lang bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Danach wurde zur Messung der Dissoziation 5 min lang Laufpuffer (0,5%ige Tween20-TBS-Lösung) mit einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Die Oberfläche wurde mit Tris [10 mM] (pH 9,0) und NaCl [200 mM] versucht zu regenerieren. Der Chip zeigte aber einen nur unwesentlich reduzierten Response, und die Oberfläche konnte nicht regeneriert werden.

6.4.8.5 Kompetitionsstudien auf immobilisiertem Sensor-SA-BIACORE-Chip

Für die entsprechenden Kompetitionsstudien wurde das Peptid **SHLDPTLFPLYKG** [100 μ M], Phenyl- β -D-galactopyranosid [30 μ M] und eine Mischung des Peptids [100 μ M] und des Pyranosids [30 μ M] 5 min lang bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Danach wurde zur Messung der Dissoziation 5 min lang Laufpuffer (0,5%ige Tween20-TBS-Lösung) mit einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert.

6.4.8.6 Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Peptids **SHLDPTLFPLYKG**

Die Konzentrationsreihe 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 mM, 10 μ M, 30 mM und 100 μ M des Peptids wurden 5 min lang bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Danach wurde zur Messung der Dissoziation 5 min lang Laufpuffer (0,5%ige Tween20-TBS-

Lösung) mit einer Flussrate von 10 µl/min injiziert. Die Dissoziationskonstante wurde durch numerische Verfahren anhand der Sensorgramme mit Hilfe der Software BIAevaluation 3.0 (BIAcore) bestimmt.

6.4.9 Darstellung von Octyl-4-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-galactopyranosyl)-2-O-*n*-propyl-β-D-galactopyranosid

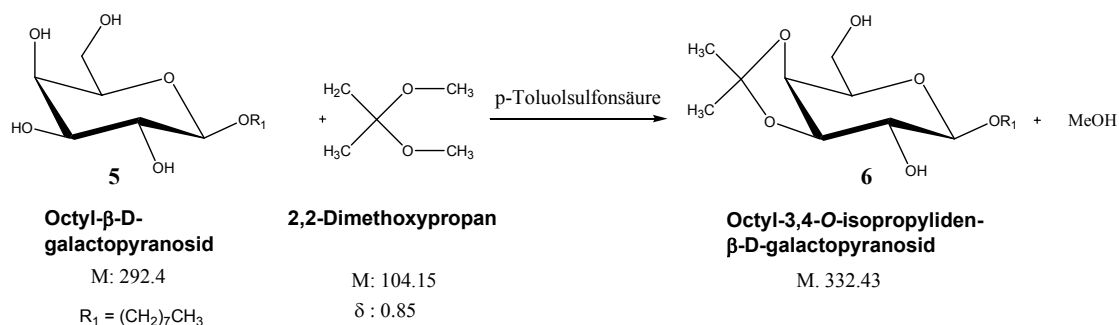
Um die spezifische Elution der an den Pilus bzw. an die Untereinheiten bindenden Phagen zu ermöglichen, wurde in Zusammenarbeit mit Kashinath S. Sadalapure aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lindhorst, das Analog der minimalen Bindungsdomäne Octyl-4-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-galactopyranosyl)-2-O-*n*-propyl-β-D-galactopyranosid synthetisiert.

Allgemeine Methoden

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde Kieselgel 60/Kieselgur F254 Alufolie und für die Säulenchromatographie Kieselgel 60 (230-400 Korngröße, 40-63 µm) verwendet. Die Zwischenprodukte wurden durch Besprühen der DC-Platten mit 5%iger α-Naphthol-Lösung in 20 % Ethanol/Schwefelsäure-Gemisch und Erhitzen detektiert. Wenn erforderlich wurde die Detektion der Zwischenprodukte unter UV-Licht vorgenommen. Zur Entsalzung wurde eine Sephadex LH-20 Säule in Methanol verwendet. Organische Lösungen wurden in einem Rotationsverdampfer bei einer Bad-Temperatur von < +40 °C konzentriert. Die NMR Spektraldaten, ¹H und ¹³C, wurden aufgenommen auf den Spektrometern ARX 300, AMX 400 und DRX 500 (Bruker Instruments) bei 298 K. Die Verschiebungen der Signale sind in ppm relativ zum Nullpunkt der Referenzsubstanz Tetramethylsilan TMS (δ = 0,00 für ¹H und ¹³C NMR) wiedergegeben. Wenn die Proben in D₂O gemessen wurden, wurden die Spektren relativ zum HOD (δ = 4.63) Signal für ¹H NMR und beim ¹³C NMR auf [D₄]-MeOH (δ = 49.30 für ¹³C NMR) kalibriert, welches der Lösung zugeführt wurde. Die Kopplungskonstante (*J*) ist in Hz angegeben. Zweidimensionale ¹H-¹H and ¹H-¹³C-COSY (HMQC) Experimente wurden wenn es erforderlich war zur Vervollständigung der Signale angefertigt. MALDI-TOF Massen-Spektren wurden mit Bruker Biflex und EI-MS mit Finnigan MAT 8230 Maschinen aufgezeichnet. Für MALDI-TOF Messungen wurden die Proben in Acetonitril/Wasser/TFA (2:1:0,1) in

einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Umkristallisationen wurde in 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CCA) durchgeführt. Die Massen-Peaks wurden anhand der $[M+H]^+$ Peaks von Angiotensin II (1.046.54), Angiotensin I (1.296.69), Bombesin (1.619.82), und am $[2 M+H]^+$ Peak von CCA (380,02) kalibriert. Optische Rotation wurde an der Na-D Linie, 589 nm, 20 °C, Zelllänge 10 cm und 1 cm in speziellen Fällen gemessen. Die Elementaranalyse wurde am Institut der Anorganischen Chemie, Christian-Albrechts-Universität (Kiel) durchgeführt. Thiomethyl-2-desoxy-2NDTPM- β -D-galactopyranosid wurde freundlicherweise von Dr. Laurent Bornaghi (Alchemia, Australia) zur Verfügung gestellt.

6.4.9.1 Octyl-3,4-O-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (6)

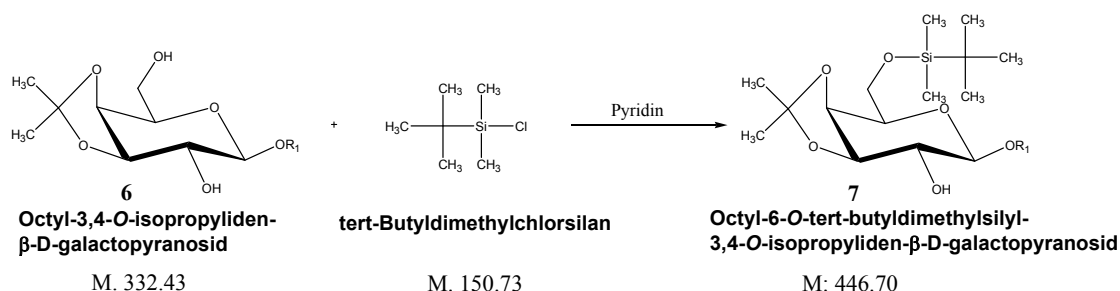


Zu einer Lösung von Octyl- β -D-galactopyranosid (**5**) (3,00 g, 10,3 mmol) in trockenem Aceton (50 ml) wurden 2,2-Dimethoxypropan (1,18 g, 11,3 mmol) und eine katalytische Menge Toluol-4-sulfonsäure (10 mg) gegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung auf +80°C erhitzt und eine weitere Stunde unter Rückfluss gerührt. Die saure Reaktionslösung wurde mit Triethylamin (0,1 ml) neutralisiert und dann konzentriert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit dem Eluent Ethylacetat/Toluol (2:1) aufgereinigt, um das Isopropyliden-Derivat (**6**) (2,17 g, 63 %) als farblose Kristallnadeln zu erhalten:

mp 78-80 °C (Hexan-Ethylacetat); R_f 0,27 (DC, Ethylacetat/Toluol 2:1); $[\alpha]_D$ 8° (c 0,5, Tetrahydrofuran); 1H NMR (400 MHz, $[D_6]$ -Aceton): δ 4,24 (dd, 1 h, $J_{3,4}$ 5,6 Hz, $J_{4,5}$ 2,0 Hz, H-4), 4,20 (d, 1 h, $J_{1,2}$ 8,6 Hz, H-1), 4,04 (dd, 1 h, $J_{2,3}$ 6,6 Hz, H-3), 3,90-3,75 (m, 4 H, H-5, H-6a, H-6b, OCH_2H_b), 3,48 (dt, 1 h, J 6,6, 9,9 Hz, OCH_2H_b), 3,41 (m, 1 h, H-2), 1,57 (m, 2 H, OCH_2CH_2), 1,42-1,29 (m, 16 H, 2 CH_3 , 5 CH_2), 0,9 (t, 3 H, J 7,12 Hz, CH_3) ppm; ^{13}C NMR (100,67 MHz, $[D_6]$ -Aceton): δ 109,7 ($(CH_3)_2C$),

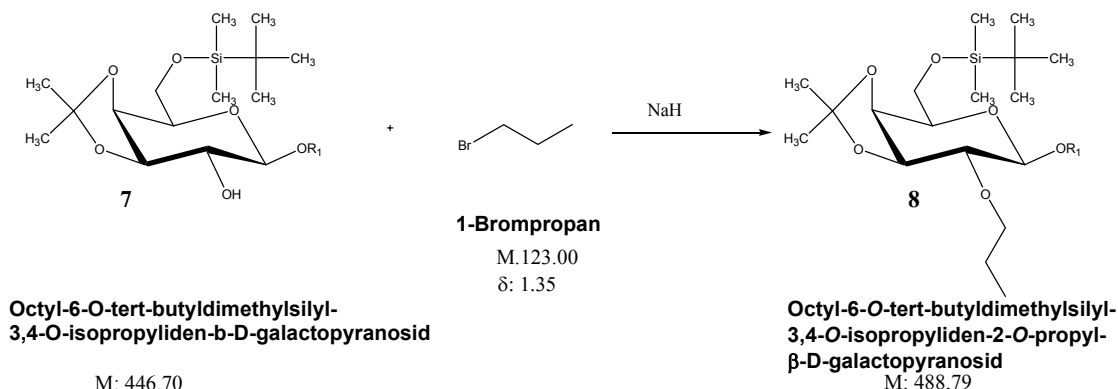
103,7 (C-1), 80,5 (C-5), 75,6 (C-3), 74,6, 74,5 (C-4, C-2), 69,8 (OCH₂CH₂), 62,3 (C-6), 32,5, 30,4, 30,4, 30,1 (4 C-CH₂), 28,4, 26,6 ((CH₃)₂C), 26,7, 23,2 (2 C-CH₂), 14,3 (C-CH₃) ppm. MALDI-ToF MS: m/z = 355,2 [M+Na]⁺, 371,1 [M+K]⁺.

6.4.9.2 Octyl-6-*O*-tert-butyldimethylsilyl-3,4-*O*-isopropyliden-β-D-galactopyranosid (7)

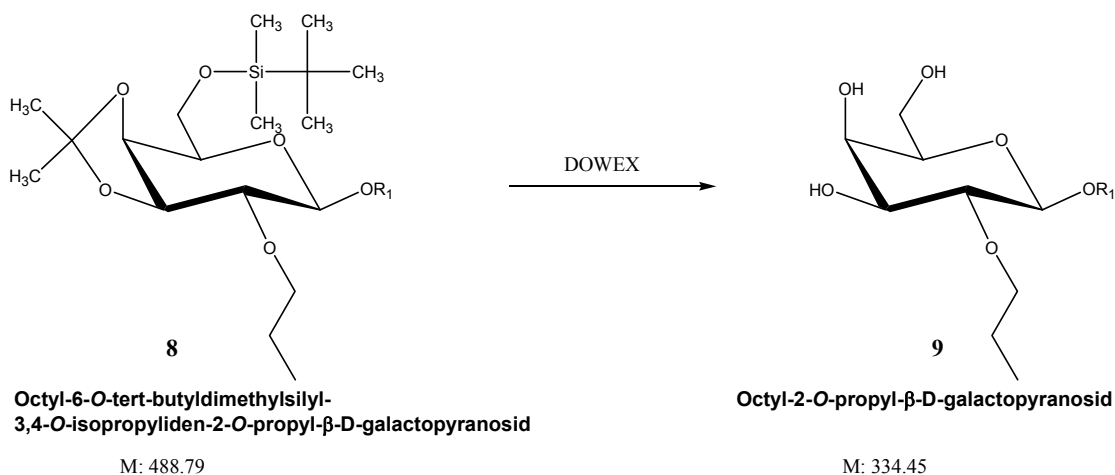


Zu einer Lösung von Octyl-3,4-*O*-isopropyliden-β-D-galactopyranosid (**6**) (1,17 g, 3,5 mmol) in reinem Pyridin (12 ml) wurde eine Lösung von tert-Butyldimethylchlorosilan (TBDMSCl) (0,58 g, 3,8 mmol) in reinem Pyridin (3 ml) gegeben und bei RT gerührt. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer mit einer Badtemperatur nicht höher als +30 °C konzentriert, um das Pyridin weitgehend zu entfernen. Der verbleibende Sirup wurde in Dichlormethan (30 ml) gelöst und nacheinander mit bidest. Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung geschüttelt. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit dem Eluent Ethylacetat/Toluol (1:2) aufgereinigt, um das Produkt (**7**) (1,52 g, 97 %) als zähen Sirup zu erhalten: R_f 0,74 (DC, Ethylacetat/Toluol 2:1); $[\alpha]_D - 2^\circ$ (c 0,5, Aceton); ¹H NMR (400 MHz, [D₆]-Aceton): δ 4,23 (dd, 1 h, $J_{3,4}$ 5,6 Hz, $J_{4,5}$ 1,6 Hz, H-4), 4,20 (d, 1 h, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,05 (dd, 1 h, $J_{2,3}$ 7,12 Hz, H-3), 3,85 (m_c, 4 H, H-5, H-6a, H-6b, OCH_aH_b), 3,5 (dt, 1 h, J_{gem} 9,9, J_{vic} 6,61, OCH_aH_b), 3,41 (m, 1 h, H-2), 1,58 (m_c, 2 H, OCH₂CH₂), 1,43-1,30 (m, 16 H, 2-CH₃, 5-CH₂), 0,93 (s, 9 H, ^tBu), 0,9 (t, 3 H, J 7,1 Hz, C-CH₃), 0,11 (s, 6 H, 2 Si-CH₃); ¹³C NMR (100,67 MHz, [D₆]-Aceton): δ 109,7 ((CH₃)₂C), 103,8 (C-1), 80,5 (C-5), 74,4, 74,3 (C-3, C-2), 74,2, 69,8 (C-4, OCH₂CH₂), 63,2 (C-6), 32,7, 32,5, 30,4, 30,1 (4 CH₂), 28,5, 26,6 (2 C-CH₃), 26,7, 23,3 (2 CH₂), 26,2 (C-(CH₃)₃), 18,7 (Si-C), 14,3 (C-CH₃), -5,2, -5,3 (2 Si-CH₃) ppm. MALDI-ToF MS: m/z = 469,2 [M+Na]⁺, 485,1 [M+K]⁺.

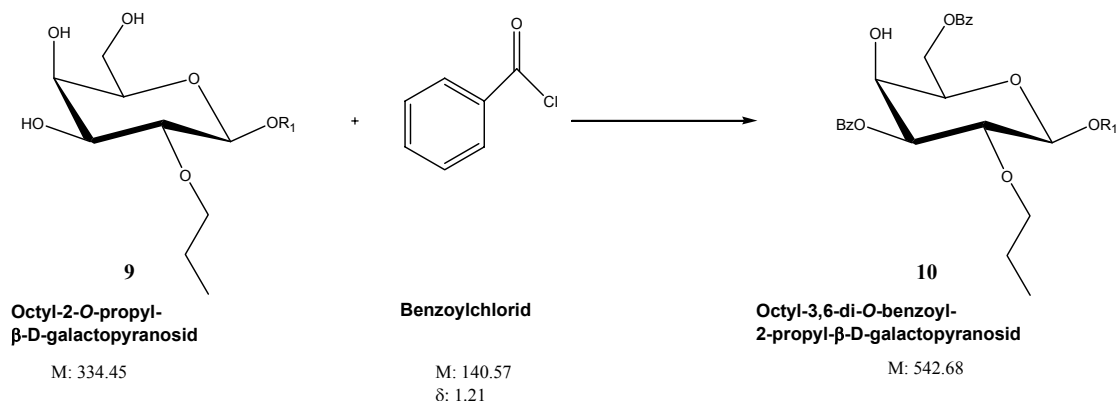
6.4.9.3 Octyl-6-*O*-tert-butyldimethylsilyl-3,4-*O*-isopropyliden-2-*O*-propyl- β -D-galactopyranosid (**8**)



Zu einer Lösung aus Octyl-6-*O*-tert-butyldimethylsilyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**7**) (1,08 g, 2,42 mmol) in 12 ml trockenem DMF und Natriumhydrid (Suspension 55-65 %, berechnet mit 60 %, 160 mg, 2,6 mmol) wurden 2 Äquivalente 1-Bromopropan (0,45 ml, 4,9 mmol) mit einer Spritze zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 7,5 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Dichlormethan (50 ml) aufgenommen und nacheinander mit bidest. Wasser geschüttelt (3 x 10 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit dem Eluent Ethylacetat/Petrolether (1:10) aufgereinigt, um das Produkt **8** (862 mg, 75 %) als farblosen Sirup zu erhalten: R_f 0,80 (DC, Ethylacetat/Toluol 2:1); $[\alpha]_D$ 0,4° (c 0,5, Aceton); ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ -Aceton): δ 4,25 (d, 1 h, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1) 4,23 (d, 1 h, $J_{3,4}$ 5,6 Hz, H-4), 4,07 (dd, 1 h, $J_{2,3}$ 7,1 Hz, H-3), 3,90-3,81 (m, 4 H, H-5, H-6a, H-6b, Octyl OCH_aH_b), 3,71 (dt, 1 h, J_{gem} 9,6 Hz, J_{vic} 6,6 Hz, Octyl OCH_aH_b), 3,60 (dt, 1 h, J_{gem} 9,6, J_{vic} 6,6, propyl OCH_aH_b), 3,49 (dt, 1H, J_{gem} 9,6 Hz, J_{vic} 6,6 Hz, Propyl OCH_aH_b), 3,15 (t, 1 h, $J_{2,3}$ 7,1 Hz, H-2), 1,63-1,52 (m, 4 H, Octyl OCH_2CH_2 , Propyl OCH_2CH_2), 1,47-1,30 (m, 16 H, 2 CH_3 , 5 CH_2), 0,95-0,88 (m, 15 H, ^tBu , Octyl C- CH_3 , Propyl C- CH_3), 0,11 (s, 6 H, 2 Si- CH_3); ^{13}C NMR (100,67 MHz, $[\text{D}_6]$ -Aceton): δ 109,8 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 103,8 (C-1), 82,0 (C-2), 80,1 (C-5), 74,3, 74,2 (C-3, Propyl OCH_2), 74,0, 69,7 (C-4, Octyl OCH_2), 63,1 (C-6), 32,5, 32,1, 30,9, 30,4, (4 CH_2), 28,4, 26,6 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 26,8, 23,3 (2 CH_2), 26,1 (C- $(\text{CH}_3)_3$), 24,0 (CH_2), 18,7 (Si-C), 14,3 (Octyl CH_3), 10,8 (Propyl CH_3), -5,2, -5,3 (2 Si- CH_3) ppm. MALDI-ToF MS: m/z = 511,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 527,1 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

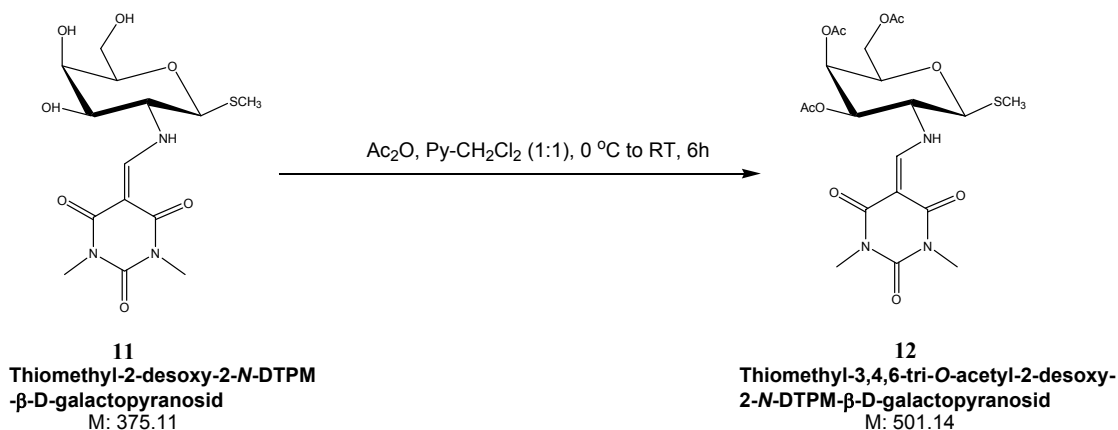
6.4.9.4 Octyl-2-*O*-propyl- β -D-galactopyranosid (9)

Octyl-6-*O*-tert-butyltrimethylsilyl-3,4-*O*-isopropyliden-2-*O*-propyl- β -D-galactopyranosid (**8**) (814 mg, 1,67 mmol) wurde in 10 ml Methanol gelöst und mit Ionenaustauscher DOWEX[®] 50 W X 8 (100 mg) versetzt. Die Lösung wurde bei einem pH-Wert zwischen 2-3 bei RT gerührt. Nach 30 Minuten erfolgte erneut eine Zugabe einer Spatelspitze des Ionenaustauschers. Nach 1 h bei RT wurde unter Rückfluss gearbeitet. Nach 1,5 h Rückfluss (70 °C) und Abkühlung bis zur Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz durch Filtration vom Ionenaustauscher DOWEX[®] befreit. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit dem Eluent Ethylacetat/Dichlormethan (1:4) aufgereinigt um das Produkt **9** (522 mg, 97 %) als weißen Feststoff zu erhalten: mp. 80 °C; R_f 0,10 (DC, Ethylacetat/Toluol 2:1); $[\alpha]_D - 4^\circ$ (c 0,5, Aceton); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]$ -Aceton): δ 4,24 (d, 1 h, $J_{1,2}$ 7,63 Hz, H-1) 3,91-3,47 (m, 4 H, H-4, H-5, 2 OCH_aH_b), 3,60-3,44 (m, 5 H, 2 OCH_aH_b , H-3, H-6a, H-6b), 3,23 (dd, 1 h, $J_{2,3}$ 9,61 Hz, H-2), 1,63-1,52 (m, 4 H, OCH_2CH_2 , Propyl OCH_2CH_2), 1,41-1,32 (m, 10 H, 5 CH_2), 0,93-0,88 (m, 6 H, 2 CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,61 MHz, $[\text{D}_6]$ -Aceton): 104,8 (C-1), 80,7 (C-2, C-5), 75,8, 74,8 (C-3, Propyl OCH_2), 74,2, 69,9 (Octyl OCH_2 , C-4), 62,3 (C-6), 32,5, 30,6, 30,3, 30,1, 26,9, 23,3 (Octyl CH_2), 24,1 (Propyl CH_2), 14,3 (Octyl CH_3), 10,9 (Propyl CH_3) ppm. MALDI-ToF MS: $m/z = 357,1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 373,1 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

6.4.9.5 Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-propyl- β -D-galactopyranosid (**10**)

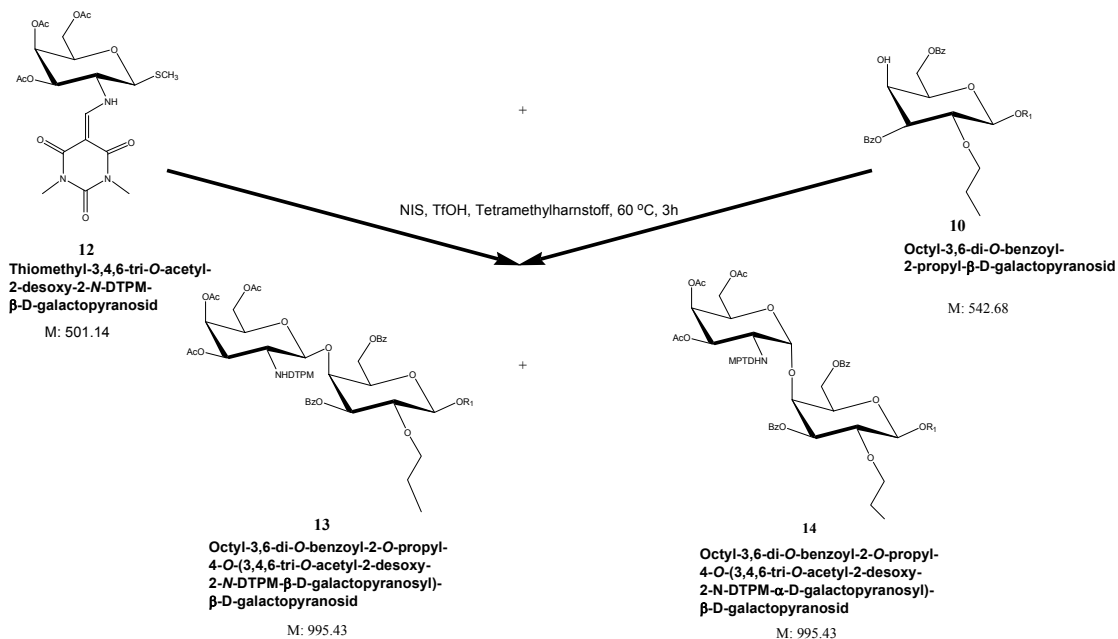
Zu einer im Eisbad gekühlten Octyl-2-*O*-propyl- β -D-galactopyranosid (**9**) (269 mg, 0,8 mmol) Lösung in Pyridin (10 ml) wurden 3 Äquivalente Benzoylchlorid (0,28 ml, 2,41 mmol) zugetropft. Unter weiterer Kühlung im Eisbad wurde für 30 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Dichlormethan (30 ml) aufgenommen und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, verdünnter Salzsäure (3 %) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und mit Toluol ko-distilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel mit dem Eluent Ethylacetat/Petrolether (1:6) aufgereinigt, um das Produkt **10** (291 mg, 67 %) als weißen kristallinen Feststoff zu erhalten: mp 67-68°C; R_f 0,33 (DC, Ethylacetat/Petrolether 1:6); $[\alpha]_D^{16}$ 16° (c 1,5, Chloroform); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8,09, 8,03 (dd, 4H, J 8,5, 1,4 Hz, aryl-CH), 7,57 (m_c, 2H, aryl-CH), 7,45 (m_c, 2H, aryl-CH), 5,13 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10,17 Hz, $J_{3,4}$ 3,05 Hz, H-3), 4,62 ($J_{5,6}$ 6,9 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6a), 4,52 (dd, 1H, H-6b), 4,45 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7,69 Hz, H-1), 4,20 (d, 1H, $J_{4,5}$ 2,61 Hz, H-4), 3,93 (m_c, 2H, H-5, Octyl OCH_aH_b), 3,80 (dt, 1 h, J_{gem} 9,3, J_{vic} 6,4 Hz, Propyl OCH_aH_b), 3,67 (dd, 1H, H-2), 3,52 (m_c, 2H, 2 OCH_aH_b), 1,65 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,47 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,27 (m_c, 10H, 5 CH₂), 0,87 (t, J 6,87 Hz, CH₃), 0,76 (t, 3H, J 7,33 Hz, CH₃); ^{13}C NMR (125,75 MHz, CDCl_3): δ 166,4, 165,8 (2 CO), 133,3, 133,2 (2 aryl-C_q), 129,8, 129,7, 129,6 (4 aryl-CH), 128,5, 128,4 (4 aryl-CH), 103,9 (C-1), 76,9 (C-3), 75,3 (C-5), 74,9 (OCH₂), 71,8 (C-2), 70,4 (OCH₂), 67,4 (C-4), 62,7 (C-6), 31,8, 29,7, 29,3, 26,2, 26,0, 23,2, 22,7 (7 CH₂), 14,1, 10,4 (2 CH₃) ppm. MALDI-ToF MS: m/z = 542,2 $[\text{M}]^+$, 565,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.4.9.6 Thiomethyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β -D-galactopyranosid (**12**)



Zu einer im Eisbad gekühlten Suspension von Thiomethyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β -D-galactopyranosid (**11**) (250 mg, 0,67 mmol) in einer Mischung von Dichlormethan und Pyridin (1:1, 5 ml) wurde Essigsäureanhydrid (5 ml, 5,32 mmol) zugegeben. Nach Entfernung des Eisbades wurde die Lösung 6 h bei RT gerührt, wobei eine homogene Lösung entstand. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingeeengt und der Rückstand in 10 ml Dichlormethan gelöst. Nacheinander wurde mit Salzsäure (3 %, 2×5 ml), bidest. Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel mit dem Eluent Aceton/Hexan (1:1) aufgereinigt, um den Galactosyl-Donor **12** (310 mg, 93 %) als weißen Schaum zu erhalten: R_f 0,45 (DC, Aceton/Hexan 2:3); $[\alpha]_D - 45^\circ$ (c 1,0, Chloroform); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 10,05 (dd, 1H, J 9,75, 13,64 Hz, NH), 8,13 (d, 1H, J 13,60, C=CHN), 5,46 (dd, 1H, J 1,20, 3,32 Hz, H-4), 5,18 (dd, 1H, J 3,31, 10,51 Hz, H-3), 4,63 (d, 1H, J 10,1 Hz, H-1), 4,20 (dd, 1H, J 6,79, 11,39 Hz, H-6), 4,16 (dd, 1H, J 6,79, 11,39 Hz, H-6'), 4,02 (ddd, 1H, J 1,20, 6,51, 7,76 Hz, H-5), 3,67 (ddd, 1H, J 3,56, 10,06, 14,81 Hz, H-2), 3,31 (s, 3H, NCH_3), 3,25 (s, 3H, NCH_3), 2,23, 2,20, 2,07, 2,01 (je s, je 3H, 3 OCOCH_3) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125,75 MHz, CDCl_3): δ 170,4, 170,1, 170,0 (3 CO), 164,8, 162,7, 159,5 (3 CO), 151,8 (C=C-NH), 92,1 (C=C-NH), 84,1 (C-1), 74,57 (C-3), 71,5 (C-4), 66,4 (C-5), 61,4 (C-2), 60,1 (C-6), 27,9, 27,1 (2 NCH_3), 20,7, 20,6, (3 OCOCH_3), 12,6 (SCH_3) ppm. MALDI-ToF MS: $m/z = 375,1$ $[\text{M}]^+$, 398,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.4.9.7 Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β , α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (**13** und **14**)



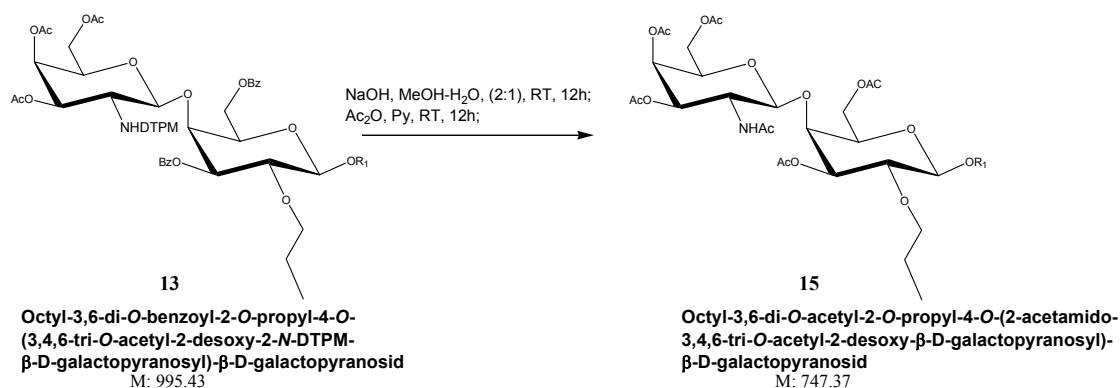
Eine Mischung aus fein gepulvertem wasserfreiem Molekular-Sieb (300 mg), Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-propyl- β -D-galactopyranosid (**10**) (50 mg, 0,09 mmol), Tetramethylharnstoff (21 mg, 0,18 mmol) und Thiomethyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β -D-galactopyranosid (**12**) (69 mg, 0,14 mmol) in 3 ml trockenem 1,2-Dichloroethan wurde für 3 h bei RT gerührt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von N-Iodsuccinimid NIS, (41 mg, 0,18 mmol) und Trifluormethansulfonsäure (0,1 g/ml, 10 μ l) in 1,2-Dichloroethan mit Hilfe einer Spritzpumpe zugegeben. Die Reaktionslösung verfärbte sich purpur und wurde für 3 h auf +60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Lösung in Dichlormethan (10 ml) aufgenommen und durch Kieselgur gefiltert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und konzentriert, um eine Mischung der beiden Diastereomere β -(1 $\rightarrow$ 4) und α -(1 $\rightarrow$ 4) des Disaccharids zu erhalten. Die Mischung wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel mit dem Eluent Aceton/Hexan (1:5) aufgetrennt, um das β -(1 $\rightarrow$ 4) Isomer **13** (8 mg, 9 %) und das α -(1 $\rightarrow$ 4) Isomer **14** (13 mg, 14 %) in einem Verhältnis von 1:1,6 zu erhalten. Die Konzentrierung der ersten Fraktionen erbrachte eine Rückgewinnung von nicht reagiertem Glycosyl-Akzeptor, Octanyl-2-*O*-propyl-3, 6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosid (**10**) (33 mg, 66 %). Spektraldaten für das β -(1 $\rightarrow$ 4) Isomer, (**13**): R_f 0,42 (DC, Aceton/Hexan 2:3); $[\alpha]_D^{27^\circ}$ (c 1,1, Chloroform); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10,41 (dd, 1H, J 9,85, 13,83

Hz, NH), 8,17 (d, 1H, J 13,80, C=CHN), 8,01 (m_c, 4H, aryl-CH), 7,60 (m_c, 2H, aryl-CH), 7,48 (m_c, 2H, aryl-CH), 5,31 (dd, 1H, J 0,89, 2,32 Hz, H-4'), 5,17 (dd, 1H, J 2,87, 10,28 Hz, H-6), 4,60 (dd, 1H, J 3,32, 11,17 Hz, H-6'), 4,57 (d, 1H, J 7,96 Hz, H-1), 4,43 (dd, 1H, J 1,10, 2,54 Hz, H-4), 4,41 (d, 1H, J 7,51 Hz, H-1'), 4,27 (m_c, 1H, H-6''), 4,20 (m_c, 1H, H-6'), 3,96 (m_c, 1H, H-6'''), 3,80 (m_c, 1H, H-5'), 3,90 (m_c, 2H, OCH₂), 3,73 (m_c, 1H, H-5), 3,70 (dd, 1H, J 3,63, 10,90 Hz, H-2), 3,55 (m_c, 2H, OCH₂), 3,38 (dd, 1H, J 6,64, 9,28 Hz, H-2), 3,32 (s, 3H, NCH₃), 3,29 (s, 3H, NCH₃), 2,17, 2,00, 1,93 (je s, je 3H, 3 OCOCH₃), 1,62 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,48 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,30 (m_c, 10H, 5 CH₂), 0,88 (t, J 6,63 Hz, CH₃), 0,65 (t, 3H, J 7,10 Hz, CH₃) ppm; ¹³C NMR (125,75 MHz, CDCl₃): δ 169,9, 169,8 (3 CO), 165,8, 165,7, 164,3, 162,9, 159,1 (5 CO), 152,1 (C=C-NH), 133,6, 133,4 (2 aryl-C), 129,8, 129,7, 129,6, 129,4, 129,3, 128,8, 128,6, 128,5 (10 aryl-C), 103,5 (C-1' $J_{C1',H1'}$ 163,2 Hz), 97,2 (C-1), 92,5 (C=C-NH), 76,8 (2 C-3), 74,7 (OCH₂), 72,3, 71,4 (2 C-4), 69,9 (OCH₂), 68,32, 77,1 (C-2), 67,1 (2 C-5), 61,9, 60,6 (2 C-6), 58,63 (C-2), 31,8, 31,7 (2 OCH₂CH₂), 29,7, 29,4 (2 NCH₃), 29,6, 27,8, 27,0, 26,1, 23,3 (5 CH₂), 20,7, 20,6, 20,5 (3 OCOCH₃), 14,1, 10,4 (2 CH₃) ppm; MALDI-ToF MS m/z = 1018,71 [M+Na]⁺.

Spektraldaten für das α-(1→4) Isomer, (**14**): R_f 0,40 (DC, Aceton/Hexan 2:3); [α]_D 61° (c 1,2, Chloroform); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 10,40 (dd, 1H, J 9,83, 14,44 Hz, NH), 8,15 (d, 1H, J 13,80, C=CHN), 8,09 (dd, 1H, J 1,28, 8,31 Hz, aryl-H), 7,98 (dd, 1H, J 1,28, 8,38 Hz, aryl-H), 7,58 (m_c, 2H, aryl-CH), 7,50 (m_c, 2H, aryl-CH), 7,43 (m_c, 2H, aryl-CH), 5,36 (dd, 1H, J 1,37, 3,16 Hz, H-4'), 5,29 (dd, 1H, J 3,07, 9,50 Hz, H-3'), 5,25 (dd, 1H, J 3,28, 9,81 Hz, H-3), 4,72 (dd, 1H, J 7,05, 11,46 Hz, H-6), 4,48 (d, 1H, J 6,97 Hz, H-1), 4,47 (dd, 1H, J 1,16, 3,30 Hz, H-4), 4,43 (d, 1H, J 1,21 Hz, H-1'), 4,26 (dd, 1H, J 7,50, 11,44 Hz, H-6), 4,03 (m_c, 1H, H-6'), 3,96 (m_c, 1H, H-6''), 3,86 (m_c, 1H, H-5'), 3,82 (m_c, 2H, OCH₂), 3,75 (m_c, 1H, H-5), 3,70 (dd, 1H, J 3,63, 10,90 Hz, H-2), 3,60 (m_c, 2H, OCH₂), 3,48 (ddd, 1H, J 6,35, 10,89, 15,12 Hz, H-2'), 3,30 (s, 3H, NCH₃), 3,21 (s, 3H, NCH₃), 2,11, 1,98, 1,78 (je s, je 3H, 3 OCOCH₃), 1,38 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,28 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,26 (m_c, 10H, 5 CH₂), 0,87 (t, J 7,16 Hz, CH₃), 0,78 (t, 3H, J 7,38 Hz, CH₃) ppm; ¹³C NMR (125,75 MHz, CDCl₃): δ 169,8 (3 CO), 165,8, 165,7, 164,3, 162,8, 159,1 (5 CO), 152,0 (C=C-NH), 133,5, 133,2 (2 aryl-C), 129,8, 129,6, 129,3, 128,8, 128,5, 128,4 (10 aryl-C), 103,5 (C-1' $J_{C1',H1'}$ 174,5 Hz), 97,2 (C-1), 92,5 (C=C-NH), 76,8 (2 C-3), 75,1 (OCH₂), 74,6, 73,9 (2 C-4), 73,3, 72,3 (2 C-5), 71,7 (OCH₂), 71,4, 70,8 (2 C-2), 67,1, 66,35 (2

C-6), 31,9, 31,8 (2 OCH₂CH₂), 27,8, 27,1 (2 NCH₃), 29,6, 29,2, 26,7, 25,9, 23,1 (5 CH₂), 20,6, 20,5, 20,3 (3 OCOCH₃), 14,1, 10,4 (2 CH₃) ppm; MALDI-ToF MS: m/z = 1018,75 [M+Na]⁺.

6.4.9.8 Octyl-3,6-di-*O*-acetyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-β-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (**15**)



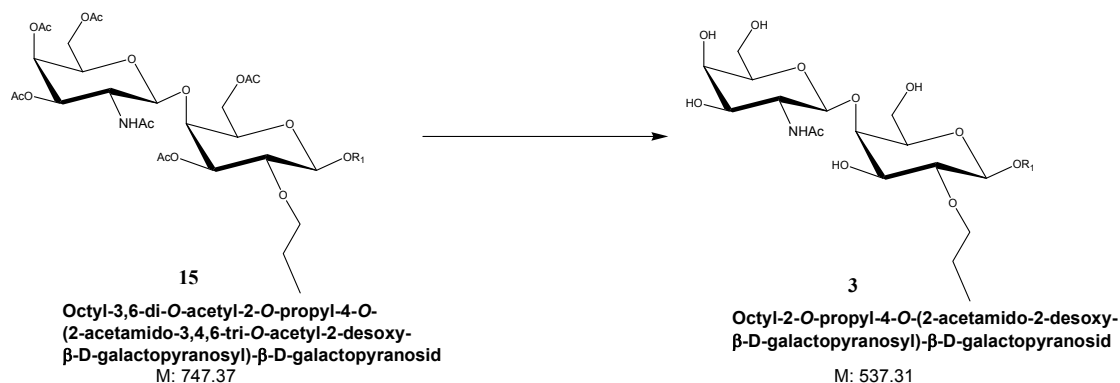
Zu einer Lösung von Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM-β-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (**13**) (39 mg, 0,04 mmol) in Methanol-H₂O-Lösung (2:1) wurden 0,5 ml wässrige 10%ige Natriumhydroxid-Lösung zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde vorsichtig auf ±0 °C abgekühlt und mit verdünnter Salzsäure versetzt, bis sich ein neutraler pH-Wert eingestellt hatte. Die Lösung wurde gefriergetrocknet, um das ungeschützte Disaccharid zu erhalten. Der weiße Schaum wurde in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1, 6 ml) gelöst und bei RT über Nacht gerührt. Die säulenchromatographische Aufreinigung auf Kieselgel mit dem Eluent Aceton/Hexan (1:5) erbrachte das Produkt **15** (16 mg, 21,39 μmol, 55 %) als farblosen Sirup: R_f 0,45 (DC, Aceton/Hexan 1:1); $[\alpha]_D^{20}$ 3° (c 1,6, Chloroform); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,81 (dd, 1H, J 3,42, 11,35 Hz, NH), 5,61 (d, 1H, J 7,17 Hz, H-3'), 5,40 (dd, 1H, J 1,17, 3,40 Hz, H-4'), 5,04 (d, 1H, J 8,19 Hz, H-1'), 4,87 (dd, 1H, J 2,96, 10,22 Hz, H-3'), 4,32 (d, 1H, J 7,67 Hz, H-1), 4,27 (d, 1H, J 0,66 Hz, H-4), 4,26 (dd, 1H, J 6,34, 11,67 Hz, H-2), 4,08 (dd, 1H, J 0,88, 2,98 Hz, H-2'), 4,05 (m_c, 2H, 2 H-6), 3,91 (m_c, 2H, 2 H-6'), 3,80 (ddd, 1H, J 6,27, 9,34, 12,49 Hz, H-5), 3,66 (ddd, 1H, J 0,96, 6,26, 7,24 Hz, H-5'), 3,49 (m_c, 2H, OCH₂), 3,41 (m_c, 2H, OCH₂), 2,18, 2,10, 2,07, 2,04, 2,00, 1,96 (je s, je 3H, 5 OCOCH₃, NHCOCH₃), 1,66 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,52 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,26 (m_c, 10H, 5 CH₂), 0,88 (t, J 7,53

Hz, CH₃), 0,86 (t, 3H, *J* 7,62 Hz, CH₃) ppm; ¹³C NMR (125,75 MHz, CDCl₃): δ 170,8, 170,6, 170,5, 170,2, 170,1, 169,9, (5 OCOCH₃, NHCOCH₃), 103,8 (C-1, *J*_{C1,H1} 162,9 Hz), 99,3 (C-1', *J*_{C1,H1} 166,2 Hz), 76,7 (C-3), 74,8 (OCH₂), 73,5 (C-3), 71,78 (C-2), 70,5 (OCH₂), 68,3, 66,9 (2 C-5), 63,3 61,5 (2 C-6), 53,43 (C-2), 31,8, 31,6, 29,7, 29,5, 29,4, 29,2, 26,0 (7 CH₂), 23,5, 23,3, 22,6, 20,9, 20,7, 20,6 (5 OCOCH₃, NHCOCH₃), 14,1, 10,6 (2 CH₃) ppm; MALDI-ToF MS: *m/z* = 770,4 [M+Na]⁺, 786,4 [M+K]⁺.

6.4.9.9 Octyl-3,6-di-*O*-acetyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (**16**)

Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM-α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (**14**) (31 mg, 0,03 mmol) wurde analog der Durchführung zu Produkt (**15**) verwendet und erbrachte das Produkt **16** (13 mg, 56 %) als farblosen Sirup: *R*_f 0,40 (DC, Aceton/Hexan 1:1); [α]_D 51° (c 1,3, Chloroform); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,94 (t, 1H, *J* 9,47 Hz, NH), 5,44 (dd, 1H, *J* 1,47, 3,21 Hz, H-4'), 5,18 (dd, 1H, *J* 3,22, 11,49 Hz, H-3'), 4,95 (d, 1H, *J* 3,94 Hz, H-1'), 4,93 (dd, 1H, *J* 3,19, 10,12 Hz, H-3), 4,66 (ddd, 1H, *J* 3,79, 9,66, 11,54 Hz, H-2'), 4,55 (ddd, 1H, *J* 1,46, 6,27, 7,66 Hz, H-5), 4,45 (dd, 1H, *J* 6,88, 11,21 Hz, H-6'), 4,35 (d, 1H, *J* 7,36 Hz, H-1), 4,13 (ddd, 1H, *J* 7,62, 11,26 Hz, H-6'), 4,09 (dd, 1H, *J* 0,9, 3,26 Hz, H-4), 4,02 (dd, 1H, *J* 6,40, 11,22 Hz, H-6'), 3,87 (m_c, 2H, OCH₂), 3,80 (ddd, 1H, *J* 6,46, 9,25, 12,69 Hz, H-5'), 3,67 (ddd, 1H, *J* 3,1, 8,08, 11,52 Hz, H-5), 3,50 (m_c, 2H, OCH₂), 3,41 (dd, 1H, *J* 7,60, 10,10 Hz, H-2), 2,16, 2,11, 2,07, 2,03, 2,02, 2,00 (je s, je 3H, 5 OCOCH₃, NHCOCH₃), 1,60 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,53 (m_c, 2H, OCH₂CH₂), 1,27 (m_c, 10H, 5 CH₂), 0,92 (t, *J* 7,37 Hz, CH₃), 0,88 (t, 3H, *J* 7,13 Hz, CH₃) ppm; ¹³C NMR (125,75 MHz, CDCl₃): δ 171,0, 170,4, 170,3, 170,2, 170,1 (5 OCOCH₃, NHCOCH₃), 103,9 (C-1, *J*_{C1,H1} 157,65 Hz), 98,3 (C-1', *J*_{C1,H1} 172,42 Hz), 77,1 (C-2), 74,7 (OCH₂), 73,2 (C-4), 72,8 (C-3), 71,7 (C-4), 70,5 (OCH₂), 68,2 (C-2), 66,9, 66,8 (2 C-5), 61,2, 60,9 (2 C-6), 47,4 (C-2'), 31,8, 29,7, 29,6, 29,3, 29,2, 26,0, 23,2 (7 CH₂), 23,4, 20,9, 20,8, 20,7, 20,6 (5 OCOCH₃, NHCOCH₃), 14,1, 10,5 (2 CH₃) ppm; MALDI-ToF MS: *m/z* = 770,4 [M+Na]⁺, 786,6 [M+K]⁺.

6.4.9.10 Octyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (**3**)



Eine Lösung von Octyl-3,6-di-*O*-acetyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (**15**) (16 mg, 21,39 μ mol) in trockenem Methanol wurde mit frisch zubereiteter Natriummethylat-Lösung (1N, 0,1 ml) versetzt. Diese Lösung wurde 3 h bei RT gerührt. Die basische Lösung wurde vorsichtig mit verdünnter Salzsäure auf neutralen pH-Wert gebracht und bis zum trockenen Rohprodukt konzentriert. Das Rohprodukt wurde auf einer Sephadex LH-20 Säule entsalzt, um das Produkt **3** (11 mg, 96 %) als blassgelben Feststoff zu erhalten.

R_f 0,32 (DC, Methanol/Dichlormethan 2:3); $[\alpha]_D - 2,2^\circ$ (c 0,55, Methanol); 1H NMR (500 MHz, $[D_4]$ -MeOH): δ 4,63 (d, 1H, J 8,47 Hz, H-1), 4,23 (d, 1H, J 7,78 Hz, H-1'), 4,02 (dd, 1H, J 1,18, 3,20 Hz, H-4), 3,84 (m_c, 2H, OCH₂), 3,80 (dd, 1H, J 2,58, 4,71 Hz, H-3), 3,77 (dd, 1H, J 2,19, 3,39 Hz, H-4), 3,70 (dd, 1H, J 4,25, 11,26 Hz, H-2), 3,60 (m_c, 4H, 4 H-6, H-2'), 3,52 (m_c, 1H, H-5), 3,48 (m_c, 1H, H-5), 3,20 (m_c, 1H, H-2), 2,02 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,60 (m_c, 4H, 2 OCH₂CH₂), 1,30 (m_c, 10H, 5 CH₂), 0,92 (t, J 7,40 Hz, CH₃), 0,90 (t, J 7,15 Hz, CH₃) ppm; ^{13}C NMR (125,75 MHz, $[D_4]$ -MeOH): δ 174,8 (NHCO), 105,1 (C-1), 104,4 (C-1'), 81,3 (C-5), 78,7 (C-3), 76,8 (C-3'), 75,96 (OCH₂), 75,3 (C-2), 74,5 (C-5'), 74,4 (C-4), 70,8 (OCH₂), 69,6 (C-4'), 62,7, 61,2 (2 C-6), 55,5 (C-2'), 33,0, 30,8, 30,5, 30,4, 27,3, 24,5, 23,7 (7 CH₂), 23,1 (NHCOCH₃), 14,4, 10,9 (2 CH₃) ppm; MALDI-ToF MS: $m/z = 560,4$ $[M+Na]^+$. Anal. Calcd. füt C₂₅H₄₇NO₁₁: C 55,8; H 8,8; N 2,6. gefunden: C 55,8; H 8,4; N 2,7.

6.4.9.11 Octyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (**4**)

Das Produkt (**4**) (7 mg, 89 %) wurde durch Acetylhydrolyse von Octyl-3,6-di-*O*-acetyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (**16**) (11 mg, 14,71 μ mol) analog der Darstellung von (**3**) als weißer Schaum gewonnen: R_f 0,30 (DC, Methanol/Dichlormethan 2:3); $[\alpha]_D^{59}$ (c 0,55, Methanol); 1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 4,94 (d, 1H, J 4,08 Hz, H-1), 4,37 (d, 1H, J 6,72 Hz, H-1'), 4,35 (m_c, 1H, H-4), 4,20 (dd, 1H, J 3,66, 111,05 Hz, H-2), 4,02 (m_c, 1H, H-3), 3,98 (m_c, 1H, H-4'), 3,93 (m_c, 2H, OCH₂), 3,78-3,59 (m, 8H, H-2', H-3', 4 H-6, OCH₂), 3,53 (m_c, 1H, H-5), 3,26 (m_c, 1H, H-2), 2,06 (NHCOCH₃), 1,58 (m_c, 4H, 2 OCH₂CH₂), 1,35 (m_c, 2H, CH₂), 1,26 (m_c, 8H, CH₂), 0,90 (t, J 6,32 Hz, CH₃), 0,86 (t, J 7,11 Hz, CH₃) ppm; ^{13}C NMR (125,75 MHz, [D₄]-MeOH): δ 176,7 (NHCO), 105,8 (C-1), 100,9 (C-1'), 81,7 (C-5), 79,0 (C-3), 77,2 (C-3'), 76,9 (OCH₂), 74,5 (C-2), 73,3 (C-5'), 72,5 (OCH₂), 70,7 (C-4), 69,7 (C-4'), 62,9 (C-6), 62,2 (C-6'), 52,5 (C-2'), 34,1, 32,2, 31,7, 28,3, 25,4, 24,8, 24,4 (7 CH₂NHCOCH₃), 16,1, 12,5 (2 CH₃) ppm; MALDI-ToF MS: m/z = 561,6 [(MH)+Na]⁺, 576,5 [M+K]⁺. Anal. Calcd. für C₂₅H₄₇NO₁₁: C 55,8; H 8,8; N 2,6. gefunden: C 55,5; H 8,9; N 2,3.

7 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von *Random Peptide Phage Display Libraries* Glyco-Replika-Peptide zu finden, die in der Lage sind, Saccharidstrukturen zu mimikrieren. Diese Saccharide spielen eine bedeutende Rolle in der Adhäsion des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*. Die Adhäsion des Bakteriums gilt als initiierender Schritt der Infektion. Bei Mukoviszidose Patienten verläuft die chronische Infektion mit dem Bakterium aufgrund der damit verbundenen progressiven Zerstörung der Lunge letal. *Pseudomonas aeruginosa* ist nahezu hauptverantwortlich für die hohe Sterblichkeit der Patienten (Miszkiel et al., 1997; Yu et al., 1998). Für die Identifizierung der Glyco-Replika-Peptide wurden kommerzielle 12-mer *Random Peptide Phage Display Library Kits* verwendet. Zur Isolierung *Target*-spezifischer Phagen wurde das *Biopanning* verwendet. Dieser *in vitro* Selektionsprozess beinhaltet die Bindung Peptid-präsentierender Phagen an spezifische *Targets*, die Elution und die Amplifizierung der eluierten Phagen. Dieser Prozess wird mehrfach durchlaufen. Die Ergebnisse der Identifizierung und folgender Charakterisierung sind nach den zu findenden Glyco-Replika-Peptiden gegliedert.

7.1 D-Galactose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

Im Laufe dieses Forschungsvorhabens wurde zur Identifizierung von D-Galactose-Replika-Peptiden *Biopanning* am *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I durchgeführt. Hierzu wurde das Lectin auf die Polystyrol-Oberfläche von MaxiSorp Röhrchen adsorbiert. Um die Funktion des *Random Peptide Phage Display Library Kits* zu überprüfen wurde zur Kontrolle parallel ein *Biopanning* über drei Runden an adsorbiertem Streptavidin durchgeführt. Durch spezifische Elution mit 0,1 mM Biotin konnten Phagen isoliert werden, deren Sequenzen das erwartete Motiv His-Pro-Gln (HPQ) enthielten.

F	D	W	K	?	N	L	L	A	H	P	Q
F	P	L	W	P	G	P	M	H	H	P	Q
S	F	T	?	T	L	L	T	D	H	P	Q
W	S	P	Q	K	W	L	L	Q	H	P	Q

Abbildung 11: Sequenzen der an adsorbiertem Streptavidin bindenden Phagen.

An adsorbiertem Streptavidin [0,1 µg/ml] wurde in der *Biopanning*-Runde I mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. In den Runden II und III wurde die Detergenzkonzentration auf 0,5 % Tween20erhöht und damit die Stringenz verstärkt. Die Elution wurde in den Runden I, II und III spezifisch mit 0,1 mM Biotin vorgenommen. Die nach den drei Runden des *Biopannings* isolierten Phagen wurden sequenziert und die Sequenzen analysiert. Die Sequenzen wiesen das für Streptavidin bindende Phagen charakteristische Aminosäuren-Motiv His-Pro-Gln (HPQ) (in blau dargestellt) auf (Devlin et al., 1990). Die Fragezeichen stehen für bei der Sequenzierung nicht identifizierte Aminosäuren.

Dieses von nicht konservierten Sequenzen flankierte Motiv findet man in allen an Streptavidin bindenden Peptiden (Giebel et al., 1995). Hierdurch konnte die Funktion des *Random Peptide Phage Display Library Kits* überprüft werden.

Für die an das adsorbierte *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I bindenden Phagen konnte nach den *Biopanning*-Runden I, II und III mit spezifischer 1 mM Phenyl-β-galcatopyranosid-Elution nach der Sequenzierung eine Konsensussequenz von acht Aminosäuren, **PTLFPLYK**, identifiziert werden.

S	P	G	P	D	V	R	P	A	R	L	V
H	H	L	P	L	T	A	F	P	I	W	K
S	H	L	D	P	T	L	F	P	L	Y	K
S	H	L	D	P	L	S	F	P	R	W	S
?	?	W	I	P	T	L	F	P	L	Y	K
C	I	W	T	P	T	L	F	P	L	Y	K

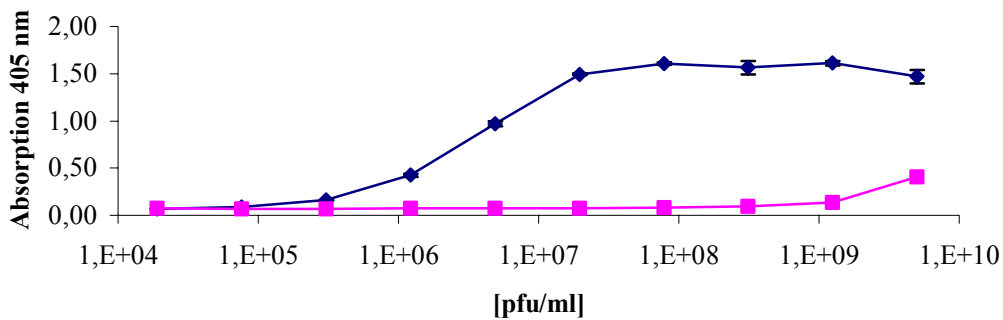
Abbildung 12: Sequenzen der an adsorbiertes Lectin PA-I bindenden Phagen.

An adsorbiertem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [100 µg/ml] wurde in der *Biopanning*-Runde I mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. In den Runden II und III wurde die Detergenzkonzentration auf 0,5 % Tween20erhöht und damit die Stringenz verstärkt. Die Elution wurde in den Runden I, II und III spezifisch mit 1 mM Phenyl-β-galcatopyranosid vorgenommen. Die nach den drei Runden des *Biopannings* isolierten Phagen wurden sequenziert und die Sequenzen analysiert. Die identifizierte Konsensussequenz ist in rot wiedergegeben. Die Fragezeichen stehen für bei der Sequenzierung nicht identifizierte Aminosäuren.

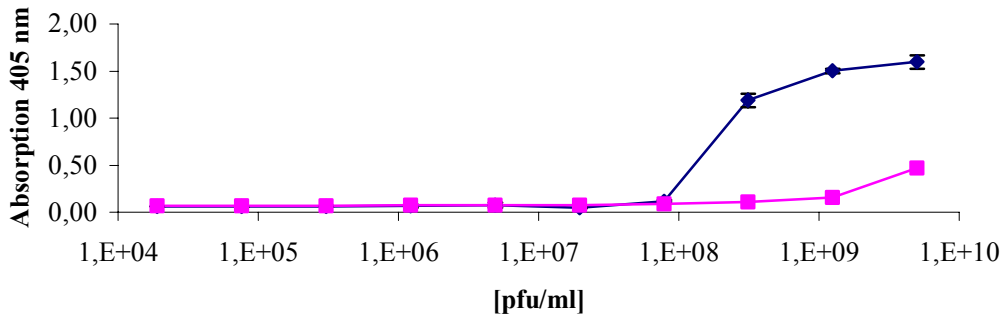
Bei einer späteren Wiederholung des *Biopannings* mit einem neuen 12-mer *Random Peptide Phage Display Library Kit* konnten erneut die Phagen mit der Sequenz **SHLDPTLFPLYK** sowohl bei der spezifischen Elution mit 10 mM Phenyl-β-D-galactopyranosid, als auch bei der unspezifischen Elution mit pH-Shift gefunden werden.

Die Spezifität der Bindung der isolierten Phagen an das *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I wurde durch den Einsatz einer Phagen-Verdünnungsreihe [Start 5×10^9 pfu/ml] untersucht. Hierzu wurde *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [100 µg/ml] und als Kontrolle BSA [5 mg/ml] auf der Oberfläche von ELISA Wells adsorbiert und mit BSA [5 mg/ml] blockiert. Die höchste Affinität zur mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I adsorbierten Oberfläche gegenüber der mit BSA beschichteten Oberfläche zeigten Phagen mit der Sequenz **SHLDPTLFPLYK** (siehe **Abbildung 13a**). Diese Phagen zeigten ab einer Konzentration von 1×10^6 pfu/ml Bindung an adsorbiertes Lectin PA-I. Bei der Konzentration von $7,81 \times 10^8$ pfu/ml erreichte die Absorption bei 405 nm einen Wert von 1,61 und damit den Beginn der Sättigung. Phagen mit nicht vollständiger Konsensussequenz zeigten deutlich schlechtere Bindungseigenschaften (siehe **Abbildung 13b**). So zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit dem Lectin und der mit BSA adsorbierten Oberfläche bei der Phagen-Konzentration von $7,81 \times 10^8$ pfu/ml. Erst ab Konzentrationen über 1×10^8 pfu/ml zeigte sich ein Anstieg der Absorption bei 405 nm und damit eine Bindung an die Lectinoberfläche. Diese Phagen wurden aufgrund der geringen Affinität zum Lectin PA-I nicht weiter untersucht.

(a)



(b)



(c)

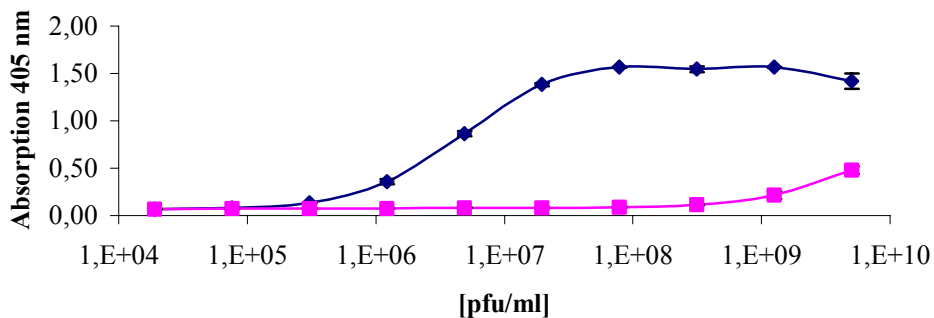


Abbildung 13: Bindung der Phagen an adsorbiertes Lectin PA-I und BSA.

Abbildung (a): Bindung des Phagens **SHLDP TLFPLYK** an adsorbiertes

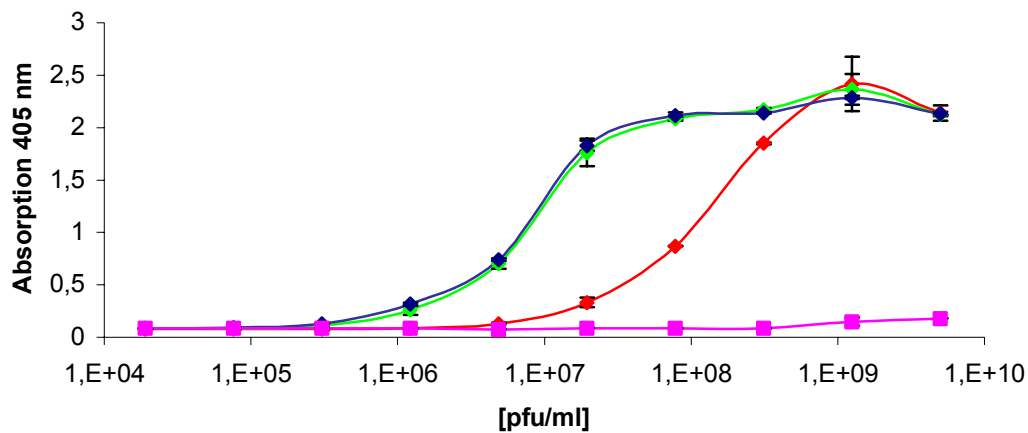
Abbildung (b): Bindung des Phagens **SHLDP LSFPRWS** an adsorbiertes

Abbildung (c): Bindung des Phagens **CIWT PTLFPLYK** an adsorbiertes

--♦-- *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I bzw. --■-- BSA

ELISA-Wells wurden mit 100 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [100 µg/ml], oder zur Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] adsorbiert und mit 5%iger BSA-Lösung blockiert. Die Inkubation mit je 100 µl der Phagen-Verdünnungsreihe, dem HRP-M13-AntiKörper und der ABTS-Lösung erfolgte für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 6mal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Phagen mit vollständiger Konsensussequenz und N-terminalem Aminosäurenaustausch zeigten eine geringere Bindung als Phagen mit der Sequenz **SHLDPTLFPLYK** (siehe **Abbildung 13c**). Der Aminosäurenaustausch in der Konsensussequenz hatte deutlich stärkere Auswirkungen auf die Bindungs-Affinität. Die folgenden Experimente wurden daraufhin mit **SHLDPTLFPLYK** Peptid-präsentierenden Phagen durchgeführt. Zur Überprüfung der Spezifität des Peptid-präsentierenden Phagens sollte die Konkurrenz der Bindung an das *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I durch Phenyl-β-D-galactopyranosid untersucht werden. In Konkurrenz-ELISA-Experimenten konnte eine deutliche Verdrängung von preinkubierten Verdünnungslösungen [Start 5×10^9 pfu/ml] des Phagens **SHLDPTLFPLYK** an der *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I Oberfläche (siehe **Abbildung 14**, blaue Kurve) durch die nachträgliche Zugabe von 10 mM Phenyl-β-D-galactopyranosid-Lösung (siehe **Abbildung 14**, rote Kurve) beobachtet werden. Die als Kontrolle verwendete 10 mM Phenyl-β-D-glucopyranosid-Lösung (siehe **Abbildung 14**, grüne Kurve) zeigte keinen kompetitierenden Effekt. Die Bindungsaffinität des Phagens an die mit *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I immobilisierter Oberfläche konnte erneut bestätigt werden (siehe **Abbildung 14**, Vergleich blau und rosa Kurve). Dieses Experiment zeigte, dass es sich bei der Bindung des Peptid präsentierenden Phagens **SHLDPTLFPLYK** an das adsorbierte *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I um eine spezifische Bindung handelt. Die Verdrängung der Lectin gebundenen Phagen durch den aus der Literatur bekannten Saccharid-Liganden Phenyl-β-D-galactopyranosid (Chen et al., 1998) zeigte, dass es sich bei der Interaktion der vom Phagen präsentierten Peptide **SHLDPTLFPLYK** mit dem Lectin um eine spezifische Wechselwirkung handelt. Phenyl-β-D-glucopyranosid ist in der Literatur als Ligand des D-Galactose-spezifischen Lectins PA-I nicht beschrieben und wurde aus diesem Grund als Negativkontrolle eingesetzt. Eine Verdrängung der gebundenen Phagen durch die Negativkontrolle Phenyl-β-D-glucopyranosid konnte nicht festgestellt werden. Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen dem Phagen präsentierten Peptid **SHLDPTLFPLYK** und dem Galactose-spezifischen Lectin PA-I konnte hierdurch eindeutig bewiesen werden. Eine unspezifische Bindung des Phagens über seine Hüllproteine an das adsorbierte Lectin konnte somit ausgeschlossen werden, da in diesem Fall die Verdrängung der Phagen durch den spezifischen Liganden Phenyl-β-D-galactopyranosid nicht erfolgt wäre.



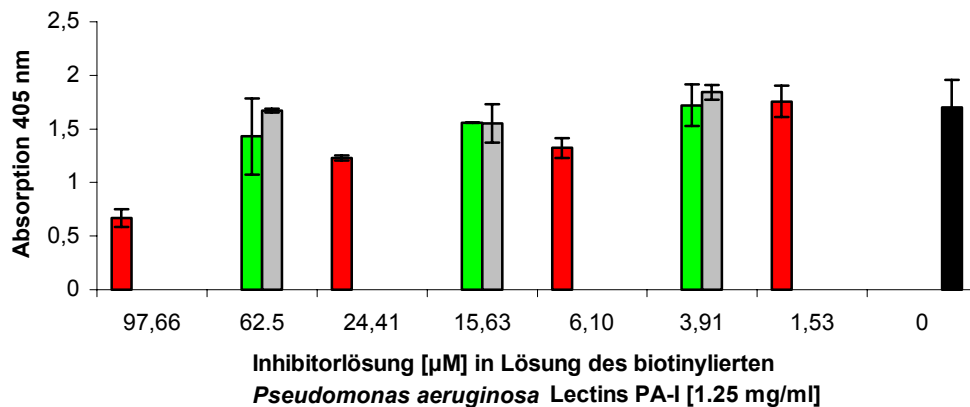
Bindung an: --◆-- *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I
 --■-- BSA
 --■-- *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I und Konkurrenz mit Phenyl-β-D-glucopyranosid-Lösung [10 mM]
 --◆-- *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I und Konkurrenz mit Phenyl-β-D-galactopyranosid -Lösung [10 mM]

Abbildung 14: Phagen-Bindung an adsorbiertes Lectin PA-I und Konkurrenz der Bindung durch Saccharide.

ELISA-Wellen wurden mit 100 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [50 µg/ml], oder zur Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] adsorbiert und mit 5%iger BSA-Lösung blockiert. Die Inkubation mit 60 µl der Verdünnungsreihe des Phagens **SHLDPTLFPLYK**, Phenyl-β-D-galactopyranosid [10 mM], Phenyl-β-D-glucopyranosid [10 mM], dem HRP-M13-Anti Körper und der ABTS-Lösung erfolgte für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 6mal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Für weitere Experimente wurde diese Peptidsequenz, eine willkürliche Reihenfolge der 12 Aminosäuren als Kontrollpeptid und die Konsensussequenz mit je einem zusätzlichen Glycinrest zur Synthese in Auftrag gegeben. Mit der Aminosäure Glycin beginnt die Phagen-Sequenz nach der Peptid-Insertionssequenz. Für die weitere Beweisführung der Spezifität sollten die inhibitorischen Eigenschaften der synthetischen Peptide anhand der Inhibition der Bindung des D-Galactose-spezifischen biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an das Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste (Gal-α1,4-Gal-β1,4-GlcNAc-β1,3-Gal-β1,4-Glc-β1-Ceramid) (Watkins und Morgan, 1976) untersucht werden. Nach Angaben von Chen et. al (1989) wird die maximale Bindung mit etwa 0,1 µg Glycoprotein P1 pro Well und 0,25 µg biotinyliertem Lectin pro Well erreicht. Die Ergebnisse von Chen et al. (1998) konnten reproduziert werden. Die Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an das auf der Polystyrol-Oberfläche adsorbierte Glycoprotein P1 konnte durch die Zugabe von Phenyl-β-D-

galactopyranosid konzentrationsabhängig inhibiert werden. Das Peptid **SHLDPTLFPLYKG** zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung, während das Kontroll-Peptid **TLLPHDYPLFKSG** mit der willkürlichen Reihenfolge der 12 Aminosäuren die Bindung nicht inhibierte (siehe **Abbildung 15**).



Bindung an
Kompetition mit

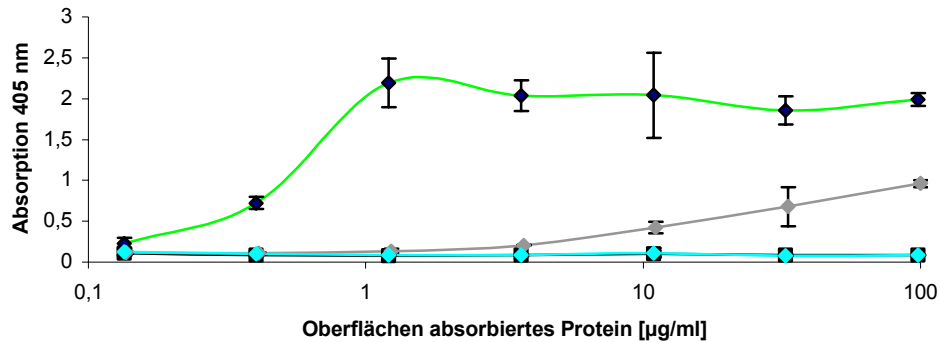
- P1 Glycoprotein
- Phenyl-β-D-galactopyranosid-Lösung
- Kompetition mit Peptid-**SHLDPTLFPLYKG**-Lösung
- Kompetition mit Peptid-**TLLPHDYPLFKSG**-Lösung mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren

Abbildung 15: Inhibition der Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an adsorbiertes Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste.

ELISA-Wells wurden mit 100 µl Glycoprotein P1 [1 µg/ml] 2 h adsorbiert, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert und 10mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. Für die Inkubation von 1 h wurden in den Wells je 50 µl der biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I Lösung [5 µg/ml] mit je 50 µl der 1:4 Phenyl-β-D-galactopyranosid-Verdünnungslösungen [Start 200 mM] oder der Peptid-Verdünnungslösungen [Start 500 µM] bzw. für die reine Lectinbindung 50 µl 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung vereinigt. Es folgten die Inkubationen mit ExtrAvidin®/alkalische Phosphatase [1:10.000], Sigma 104®-Lösung und der ABTS-Lösung für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden je 6mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Die inhibitorische Wirkung des Peptids sollte durch Kopplung an ein Träger-Molekül verstärkt werden. Deshalb wurden für weitere Untersuchungen BSA-Konjugate mit m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) über C-terminalem Cystein enthaltende Peptide im Verhältnis 20:1 dargestellt. Hierzu wurden die Peptide erneut mit einem C-terminalem Cystein synthetisiert. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Vielzahl der Peptide, annähernd dem angegebenen Verhältnis, an ein BSA-Molekül gekoppelt waren. Eine Verhältnisanalyse eines in einem anderen

Zusammenhang nach der beschriebenen Methode dargestellten 7-mer Peptid-BSA-Moleküles, mit Hilfe eines PBS II ProteinChip Reader (CIPHERGEN), ergab einen Kopplungsdurchschnitt von 6.73 (Simon-Haldi et al., 2002). Die Bestimmung der Verhältnisanalyse stand für diese Arbeit im eigenen Institut nicht zur Verfügung, so dass die Kopplungseffizienz der hier dargestellten Peptid-BSA-Konjugate nicht ermittelt werden konnte. Beim weiteren Einsatz der Peptid-BSA-Konjugate wurde deshalb von der theoretischen Kopplungseffizienz ausgegangen. Die Spezifität sollte durch Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I [2,5 µg/ml] an adsorbierte Peptid-BSA-Konjugate überprüft werden. Das biotinylierte *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I zeigte eine signifikante konzentrationsabhängige Bindung an adsorbierte Verdünnungen des ~20-mer-(SHLD**PTLFPLY**KGC)-BSA-Konjugats. Die Positiv-Kontrolle mit Verdünnungen des Glycoproteins P1 zeigte wie erwartet eine konzentrationsabhängige Bindung des biotinylierten Lectins. Das biotinylierte *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I zeigte eine deutlich höhere Affinität zum Peptid-BSA-Konjugat verglichen mit dem Glycoprotein P1. Die Affinität der Bindung an die adsorbierten Verdünnungen des ~20-mer-(TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugats mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren war identisch mit der zur Negativkontrolle nur mit BSA adsorbierten Polystyrol-Oberfläche. Eine Bindung des Lectins PA-I an das ~20-mer-(TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugat konnte nicht detektiert werden (siehe **Abbildung 16**).

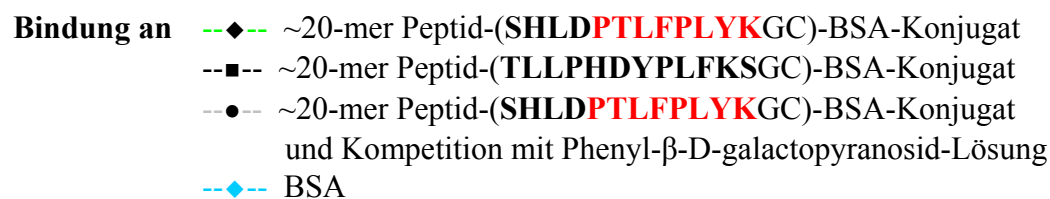


Bindung an --◆-- ~20-mer Peptid-(SHLDPTLFPLYKGC)-BSA-Konjugat
 --■-- ~20-mer Peptid-(TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugat
 --◆-- Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste
 --◆-- BSA

Abbildung 16: Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an adsorbiertes Glycoprotein P1 und ~20-mer Peptid-BSA-Konjugate.

ELISA-Wells wurden mit je 100 µl der 1:3 Verdünnungslösungen von Glycoprotein P1 [100 µg/ml], des ~20-mer-BSA-Konjugats des Peptids SHLDPTLFPLYKGC [98 µg/ml] und des ~20-mer-BSA-Konjugats des Peptids TLLPHDYPLFKSGC [98 µg/ml] mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren 2 h adsorbiert, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert und 10mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. Für die Inkubation von 1 h wurde in die Wells je 100 µl der biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I Lösung [2.5 µg/ml] pipettiert. Es folgten die Inkubationen mit ExtrAvidin®/alkalischer Phosphatase [1:10.000], Sigma 104®-Lösung und ABTS-Lösung für je 1 h. Die erforderlichen Waschschrte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 6mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Diese konzentrationsabhängige Bindung an das ~20-mer (SHLDPTLFPLYKGC)-BSA-Konjugat ließ sich mit 1 mM Phenyl-β-D-galactopyranosid inhibieren (siehe **Abbildung 17**). Es konnte keine Bindung an das Kontroll BSA-Konjugat festgestellt werden.



ELISA-Wells wurden mit je 100 µl der 1:3 Verdünnungslösungen des ~20-mer-BSA-Konjugats **SHLDP~~T~~LF~~P~~LYKGC** [417 µg/ml] und des ~20-mer-BSA-Konjugats **TLLPHDYPLFKSGC** [417 µg/ml] mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren 2 h adsorbiert, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert und 10mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung gewaschen. Für die Inkubation von 1 h wurden die Wells mit je 100 µl der biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I Lösung [1 µg/ml] oder bei noch nicht inkubierten mit **SHLDP~~T~~LF~~P~~LYKGC** Konjugat absorbierten Wells mit einem Gemisch aus der Lectin-Lösung und Phenyl-β-D-galactopyranosid-Lösung [1 mM] versetzt. Es folgten die Inkubationen mit ExtrAvidin®/alkalischer Phosphatase [1:10.000], Sigma 104®-Lösung und ABTS-Lösung für je 1 h. Die erforderlichen Waschschrte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 6mal mit 0,05%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

85

(SHLDPTLFPLYKGC)-BSA-Konjugat beobachtet werden. Die inhibitorische Fähigkeit von Phenyl- β -D-galactopyranosid lag bei der Konzentration von 97,66 μ M bei ~5 %, während bei einer Konzentration von 100 mM eine Inhibition der Bakterienbindung von 31 % erreicht wurde. Diese Inhibitionsleistung wurde vom Konjugat bei der Konzentration von 73,25 μ M mit 33%iger Hemmung erreicht. Das Konjugat mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren zeigte bei dieser Konzentration eine 27%ige Inhibition. Bei der Konjugatkonzentration von 18,31 μ M zeigten sich deutlich unterschiedliche Werte. Die Inhibition des ~10-mer-(SHLDPTLFPLYKGC)-BSA-Konjugats lag bei dieser Konzentration bei 18 %, das Konjugat mit willkürlicher Peptidsequenz hingegen nur noch bei 4 % und zeigte somit so gut wie keine Inhibition (siehe **Abbildung 18**).

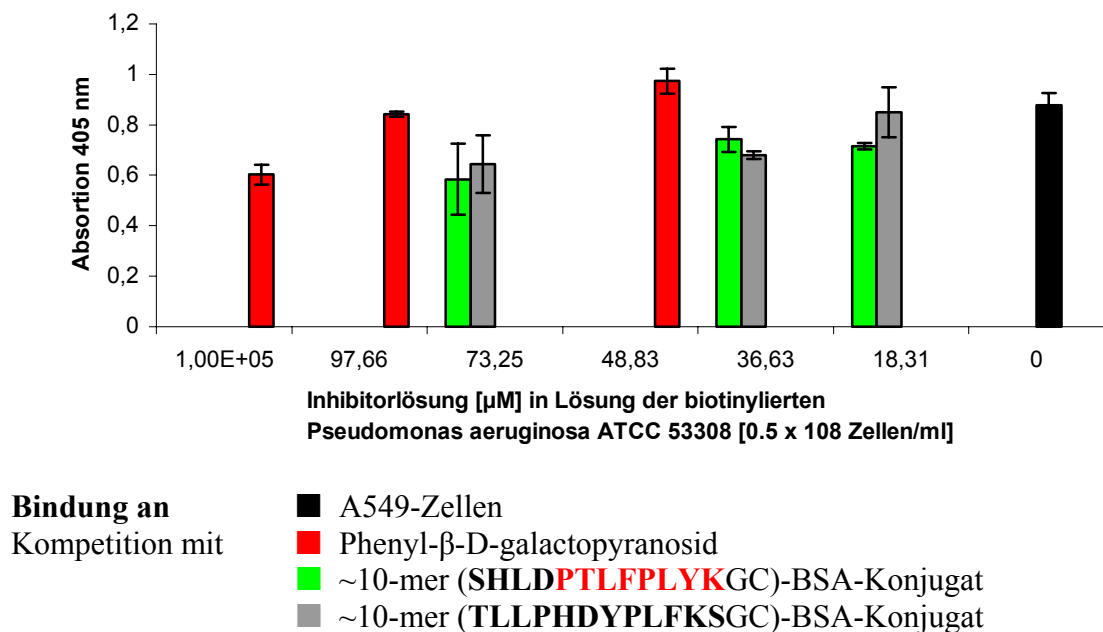


Abbildung 18: Inhibition der Bindung von biotinylierten Bakterien des *Pseudomonas aeruginosa*-Stamms ATCC 53308 an A549 menschliche Lungenkarzinomzellen.

ELISA-Wells wurden mit je 100 μ l A549-Zellen [$2,5 \times 10^5$ Zellen/ml] über Nacht bei +37 °C, 5 % CO₂ inkubiert, mit 1,25 % Glutaraldehyd für 20 min bei RT fixiert und mit 3%iger BSA PBS-Lösung für 1 h bei +37 °C blockiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde je 3mal mit PBS (pH 7,4) und nach der Blockierung 2mal gewaschen. Für die Inkubation von 3 h bei +37 °C wurden in den Wells je 50 μ l der 1:2 Phenyl- β -D-galactopyranosid –Verdünnungslösungen [Start 200 mM] bzw. Konjugat-Lösungen [Start 146,51 μ M] vorgelegt und mit 50 μ l der biotinylierten Bakterien-Lösung ATCC 53308 [1×10^8 Zellen/ml] vereinigt. Nacheinander erfolgten die Inkubationen mit je 100 μ l NeutrAvidin™ Meerrettich-Peroxidase-Konjugat [1:1.500] für 1 h bei 37 °C und ImmunoPure TMB Substrate Kit Lösung für 30 min. Durch Zugabe von 100 μ l [2 M] H₂SO₄ wurde die Reaktion gestoppt und bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgewertet. Die Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 3mal mit 1%iger BSA PBS-Lösung (pH 7,4) durchgeführt. Die Konzentrationsangaben der Konjugate beziehen sich auf die theoretische Molmasse eines 10-mer-BSA-Konjugats mit M= 81.906 g/mol.

Da sich geringe Unterschiede zwischen dem ~10-mer-Peptid-(SHLD**PTLFPLYK**GC)-BSA-Konjugat und der Kontrolle, dem ~10-mer-Peptid-(TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugat mit willkürlicher Reihenfolge der Aminosäuren, zeigten, sollte die Spezifität der Bindung mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* SPR Methode (BIAcore), deren Grundlage die Oberflächen-Plasmon-Resonanz ist, genauer untersucht werden.

Dieses optische elektronische Phänomen macht es möglich Massenänderungen durch Adhäsion und Dissoziation an adsorbierten *Targets* innerhalb der Chip-Oberflächenschicht, die zu Änderungen des Oberflächenplasmonresonanzwinkels führen, zu untersuchen. Die Änderungen des Oberflächenplasmonresonanzwinkels werden als Resonanzeinheiten gegen die Zeit im sogenannten Sensorgramm aufgetragen. Hierzu wurde biotinyliertes *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I auf einen mit Streptavidin beschichteten Sensor-CM5-BIAcore-Chip sowie auf einem Streptavidin Sensor-SA-BIAcore-Chip adsorbiert (siehe **Abbildung 20**). Die Adsorption an die Oberfläche des zweiten BIAcore-Chips wurde erforderlich, da sich die Oberfläche des CM5-BIAcore-Chip nach der Untersuchung mit den Peptid-BSA-Konjugaten nicht mehr regenerieren ließ.

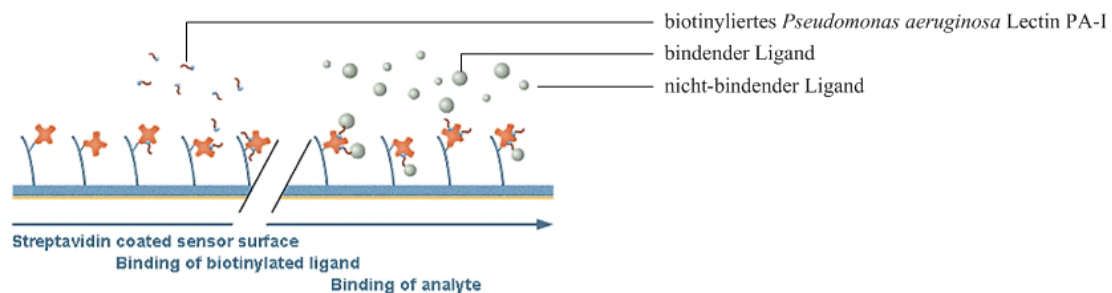


Abbildung 19: Aufbau und Funktion der BIAcore-Chip-Oberflächen.

Von links nach rechts ist die Immobilisierung einer BIAcore-Chip-Oberfläche bis zur *Target*-Ligand-Wechselwirkung wiedergegeben. An das an der Oberfläche gekoppelte Streptavidin wird der biotinylierte Ligand adsorbiert. Die so präparierte BIAcore-Chip-Oberfläche ermöglicht nun ohne weitere aufwendige Markierung der Bindungspartner die Untersuchung der Adhäsion und Dissoziation in Echtzeit. Adhäsion und Dissoziation verursachen Änderungen der Massenkonzentration innerhalb der Oberflächenschicht. Diese korrelieren mit Änderungen des Oberflächenplasmonresonanzwinkels. Diese Signaländerungen werden in einem Sensorgramm als Resonanzeinheiten (*Resonance Units*, RU) gegen die Zeit aufgetragen. Quelle der Original-Graphik: Biacore (2003).

Es konnte eine spezifische Bindung des synthetischen Peptids SHLD**PTLFPLYK**G an die *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I Oberfläche festgestellt werden. Die Bindung ließ sich eindeutig mit Phenyl-β-D-galactopyranosid kompetitieren. Phenyl-

β -D-glucopyranosid, die synthetische Konsensussequenz **PTLFPLYKG**, die willkürliche Reihenfolge der 12 Aminosäuren des Peptids **TLLPHDYPLFKSG** und ein Peptid mit der willkürlichen Konsensussequenz **SHLDYLPTFPKLG** zeigten selbst keine Bindung an das adsorbierte biotinylierte Lectin PA-I. Für das synthetisierte Peptid **SHLDPTLFPLYKG** konnte anhand der Sensorgramme der Konzentrationsreihe [100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 mM, 10 μ M, 30 mM und 100 μ M] eine Bindungskonstante von $K_D = 8,96 \mu\text{M}$ ($K_D = k_d/k_a$; $k_d = 3,485 \times 10^{-2} /s$ und $k_a = 3.890 /Ms$) mit Hilfe der Software BIAevaluation 3.0 (BIAcore) bestimmt werden. Bindungsstudien der BSA- Konjugate zeigten eine deutliche Bindung (Adhäsion auf ~ 256 RU und Dissoziation auf ~ 100 RU) für das ~ 20 -mer (**SHLDPTLFPLYKGC**)-BSA-Konjugat, während das Konjugat mit der willkürlichen Peptidsequenz **TLLPHDYPLFKSGC** keine Bindung zeigte.

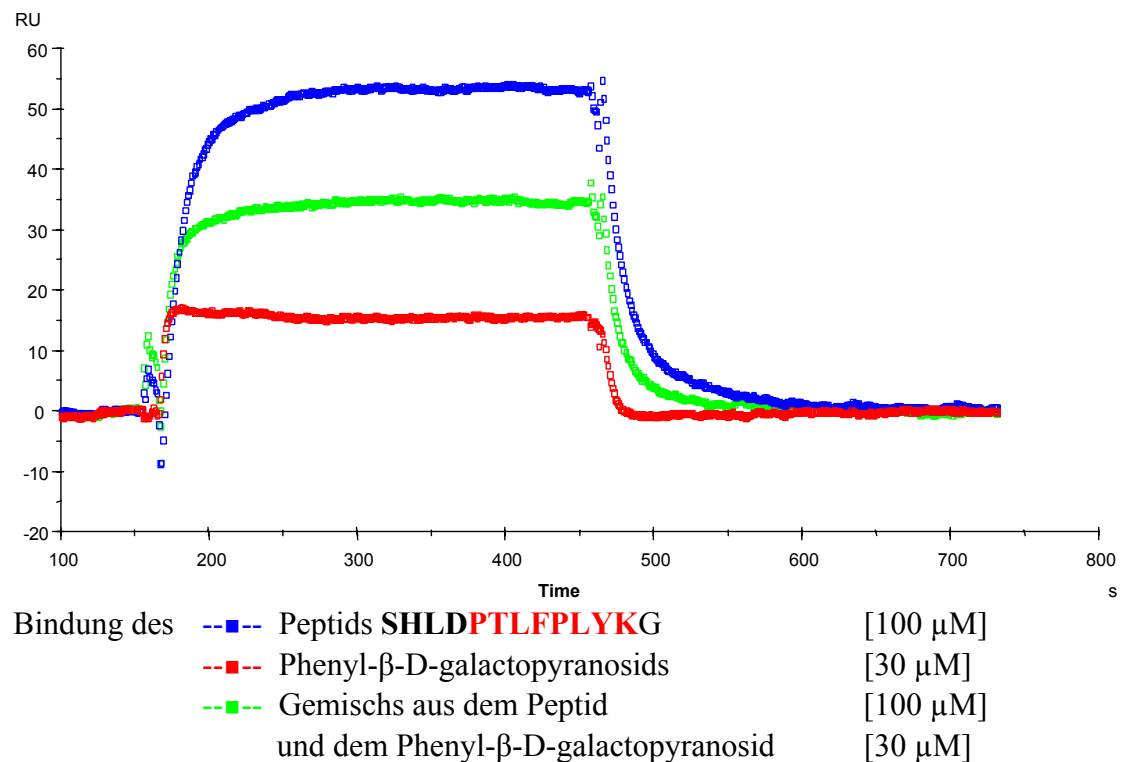
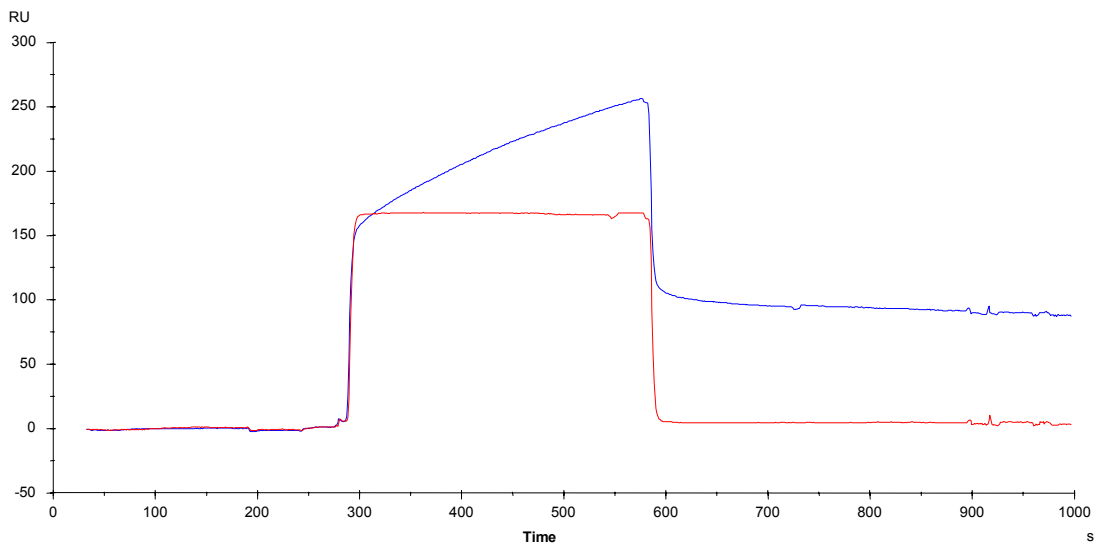


Abbildung 20: Sensorgramm der Bindung des Peptids SHLDPTLFPLYKG an adsorbiertem biotinylierten Lectin PA-I und Konkurrenz durch Phenyl- β -D-galactopyranosid.

Die Immobilisierung erfolgte durch Injektion von *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [20 μ g/ml] für 1 min auf einem SA-Chip. Restliche freie Bindungsstellen des Streptavidins wurden mit Biotin [1 mg/ml] abgesättigt. Nacheinander wurden das Peptid **SHLDPTLFPLYKG** [100 μ M], Phenyl- β -D-galactopyranosid [30 μ M] und ein Gemisch aus dem Peptid [100 μ M] und dem Pyranosid [30 μ M] bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Zwischen diesen Injektionen wurde jeweils 5 min lang Laufpuffer (0,5%ige Tween20-TBS-Lösung) bei einer Flussrate von 10 μ l/min zur Messung der Dissoziation und Regeneration der Oberfläche injiziert.



Bindung des --■-- ~20-mer Peptid-(SHLD**PTLFPLYK**GC)-BSA-Konjugats
 --■-- ~20-mer Peptid-(TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugats
 mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren

Abbildung 21: Sensorgramm der ~20-mer-BSA-Konjugat-Bindung an adsorbiertem biotinyliertem PA-I Lectin.

Streptavidin [20 mg/ml] wurde nach dem Standardprotokoll (BIAcore) auf der CM5-BIAcore-Chip-Oberfläche adsorbiert. An die Streptavidin-Oberfläche wurde biotinyliertes *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I [20 mg/ml] adsorbiert. Restliche freie Bindungsstellen des Streptavidins wurden mit Biotin [1 mg/ml] abgesättigt. Die BSA-Konjugate [1,2 µM] wurden je 5 min lang bei einer Flussrate von 10 µl/min injiziert. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die theoretische Molmasse eines 20-mer-BSA-Konjugats mit M= 97.812 g/mol (BSA M=66.000 g/mol; Peptid = 1.590,6 g/mol). Zwischen diesen Injektionen wurde jeweils 5 min lang Laufpuffer (0,5%ige Tween20-TBS-Lösung) bei einer Flussrate von 10 µl/min zur Messung der Dissoziation injiziert. Die Oberfläche konnte mit 10 mM Tris (pH 9,0) und NaCl [200 mM] nicht regeneriert werden.

Im Sensorgramm war für das Peptid-BSA-Konjugat mit willkürlicher Aminosäuresequenz nur der Puffersprung zu beobachten. Es konnte keine Adhäsion und Dissoziation detektiert werden. Das Signal brach nach der Injektion des Konjugates ab (rote Kurve). Hierdurch konnte erneut die Spezifität der Sequenz **SHLDPTLFPLYK** bestätigt werden.

7.2 L-Fucose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II

Das für die Isolierung der Fucose mimikrierenden Peptide benötigte *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II wurde von Denis Tielker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jaeger kloniert, überexprimiert und gereinigt (Tielker, 2002). Mit dem freundlicherweise zur Verfügung gestellten Lectin wurde ein *Biopanning* mit der kommerziellen 12-mer *Random Peptide Phage Display Library* durchgeführt. Zur Elution wurde 100 mM Fucose eingesetzt. Im *Biopanning*-Ansatz mit MaxiSorp Röhrchen konnten am adsorbierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II keine bindenden Phagen mit hoher Affinität zum Lectin isoliert werden. Aufgrund der unspezifischen Phagen-Bindung wurde daraufhin ein *Biopanning* mit auf paramagnetischen Epoxy Beads adsorbiertem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II durchgeführt. Das *Biopanning* an Beads bietet neben der vergrößerten Oberfläche noch den Vorteil, effizienter zu waschen und dadurch eine Reduktion von unspezifisch bindenden Phagen zu ermöglichen (McConnell et al., 1999). Die Beads wurden nach der Adsorption des Lectins mit BSA blockiert, mit einem Aliquot der *Peptide Phage Display Library* inkubiert und gewaschen. Die Elution der an das Lectin bindenden Phagen erfolgte mit einer 100 mM Fucose-Lösung. Es wurden jeweils drei Selektionsrunden durchgeführt, wobei der zweiten und dritten Runde jeweils eine Inkubation mit BSA-blockierten Beads von 10 min bzw. 30 min vorausging. Diese Vorinkubation sollte eine mögliche unspezifische Bindung der Peptid-präsentierenden Phagen reduzieren. In zwei zeitlich unabhängigen Experimenten konnten aus den an die Lectin-Oberfläche bindenden Peptid-präsentierenden Phagen folgende Peptidsequenzen identifiziert werden. Im ersten *Biopanning* wurden 19 Phagenklone isoliert, die eine deutlich höhere Affinität zur Lectin-Oberfläche gegenüber der als Kontrolle eingesetzten BSA-Oberfläche zeigten. Es wurde 7mal die Sequenz **SSAWWSYWPPVA (A)** und 5mal die Sequenz **SWPYSFWFPLEN (B)** gefunden. Beim zweiten *Biopanning* wurden 31 bindende Phagenklone isoliert. In diesem *Biopanning* wurde 15mal die Sequenz **ILANDLTAPGPR (C)** und 6mal die Sequenz **AHRHPISFLSTL (D)** gefunden.

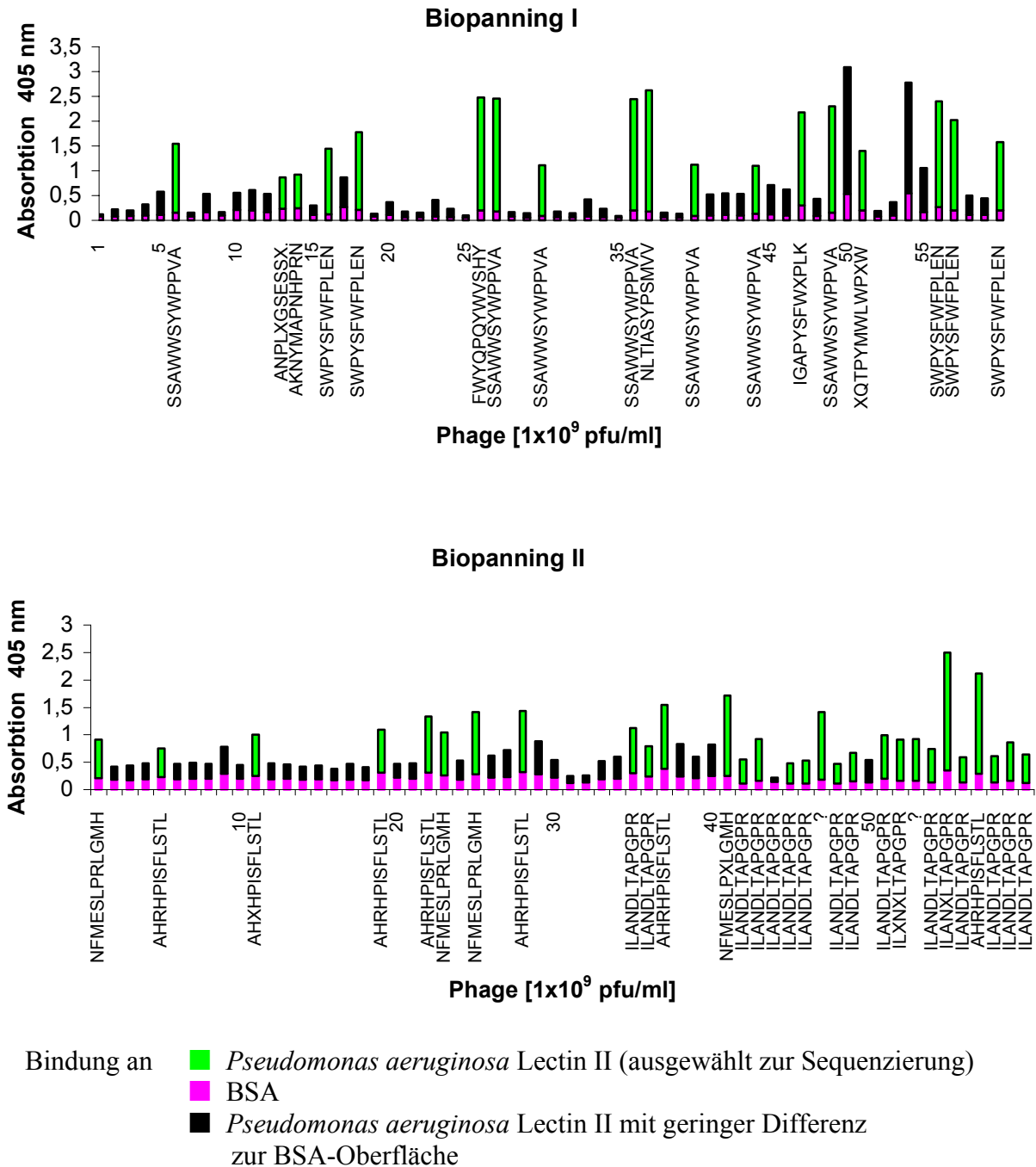


Abbildung 22: Bindung der isolierten Phagen an *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II.

ELISA- Wells wurden mit 100 μ l *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II [20 μ g/ml] oder zur Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] adsorbiert und mit 5%iger BSA-Lösung blockiert. Die Inkubation mit je 100 μ l der Phagen-Lösung [1×10^9 pfu/ml] in HBSS, dem HRP-M13-Antikörper und der ABTS-Lösung erfolgte für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 10mal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm. Das X steht für bei der Sequenzierung nicht identifizierte Aminosäuren. Die Fragezeichen stehen für bei der Sequenzierung nicht identifizierte Sequenzen.

Beim Vergleich der in beiden *Biopanning*-Experimenten gefundenen Sequenzen konnte keine Konsensussequenz identifiziert werden. Auffällig ist, dass die Sequenzen (A) und (B) einen deutlich erhöhten Anteil an den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin aufweisen, während bei den Sequenzen aus dem zweiten *Biopanning* nur bei der Sequenz (D) Phenylalanin als aromatische Aminosäure gefunden wurde. Die unspezifische Bindung von Phagen an Polystyren ist durch einen hohen Anteil von Tryptophan und Tyrosin in den vom Phagen präsentierten Peptiden gekennzeichnet (Adey et al., 1995). Bei den Sequenzen (A) und (B) kann eine unspezifische Bindung aber weitgehend ausgeschlossen werden, da die Sequenzen reproduzierbar eine deutlich höhere Affinität zur Lectin-Oberfläche aufwiesen. Bei einer unspezifischen Bindung an Polystyren dürften sich die Affinitäten zu den Oberflächen nicht deutlich unterscheiden. Das Fehlen oder Vorhandensein von Tryptophan und Tyrosin ist letztendlich kein eindeutiger Beweis für eine unspezifische Interaktion (Adey et al., 1995). Bei näherer Analyse der Eigenschaften der Peptidsequenzen zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von hydrophoben wie hydrophilen und ein hoher Anteil Hydroxylgruppen-tragender Aminosäuren. Bei der Sequenz (C) trat jedoch lediglich Threonin mit einer Hydroxylgruppe in der Seitenkette auf (siehe **Abbildung 23**).

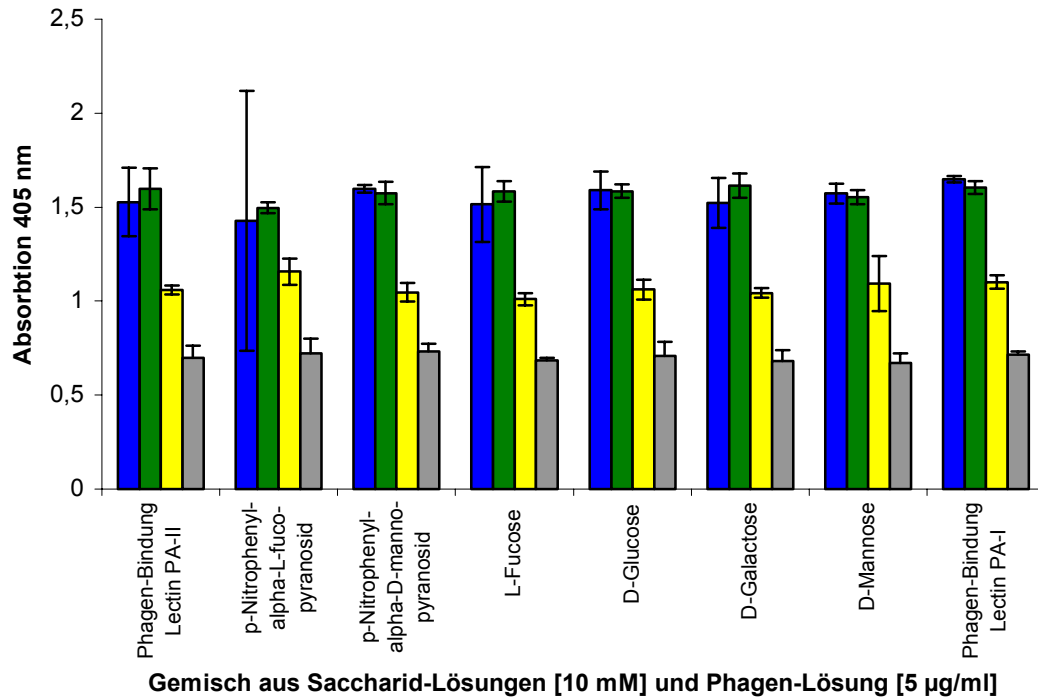
		SSAWWSYWPPVA	SWPYSFWFPLEN	ILANDLTAPGPR	AHRHPISFLSTL
		in Sequenz			
Eigenschaft	Aminosäure	(A)	(B)	(C)	(D)
Hydrophob	ALIVMW	6	3	5	4
Hydrophil	DEKNQRST	3	4	4	4
Positiv	KRH	0	0	1	3
Negativ	DE	0	1	1	0
Aromatisch	FYW	4	5	0	1
Hydroxyl	STY	4	3	1	3

Abbildung 23: Tabelle des Vergleichs der Peptid-Insertionssequenzen der an adsorbiertes Lectin PA-II bindender Peptid-präsentierender Phagen.

Diese Tabelle gibt den Anteil der jeweiligen Aminosäuren in den Insertionssequenzen der isolierten bindenden Phagen wieder.

Um die Spezifität der einzelnen Sequenzen zu charakterisieren und ihre Fähigkeit L-Fucose bzw. deren Derivate zu mimikrieren, wurde die Bindung der vier Phagen an adsorbiertes L-Fucose-spezifisches Lectin PA-II in Abhängigkeit von den in der

Literatur bekannten Saccharid-Liganden p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid, L-Fucose und D-Mannose untersucht. Zur Kontrolle wurden die nicht als Ligand in der Literatur beschriebenen Saccharide p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid, D-Glucose und D-Galactose eingesetzt. In Experimenten, bei denen erst die Phagen mit der Lectin-Oberfläche inkubiert wurden, konnten die bindenden Phagen durch den nachträglichen Einsatz der Saccharid-Liganden nicht verdrängt werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Saccharid-Liganden und den zugehörigen Kontrollen festgestellt werden. Um eine mögliche Interaktion der spezifischen Liganden und der Peptid-präsentierenden Phagen zu untersuchen, wurde ein System entwickelt, bei dem die adsorbierten Lectin- und Kontroll-Oberflächen mit den entsprechenden Saccharid-Lösungen bei +4 °C für 2 h vorinkubiert wurden. Zu diesen Saccharid-Lösungen wurde eine Phagen-Lösung mit konstanter Konzentration zugegeben und das Gemisch 1,5 h inkubiert. Die gebundenen Phagen wurden standardisiert mit Hilfe eines HRP-M13-Antikörper nachgewiesen. Um genauere Einblicke in die Spezifität der Phagen-Bindung zu bekommen, wurde als Kontrolloberfläche das D-Galactose-spezifische *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I verwendet. Zur Überprüfung des *Biopannings* mit Lectin PA-II wurden alle vier Phagen zusätzlich auf ihre Bindung an das Lectin PA-I untersucht. Bei einer Endkonzentration der eingesetzten Saccharid-Lösungen von 10 mM und einer Phagen-Lösungs-Konzentration von 5 μ g/ml wurde eine deutliche Bindung an das adsorbierte *Target* Lectin PA-II festgestellt. An das als Kontrolle adsorbierte Galactose-spezifische Lectin PA-I wurden bei einem Tween20 Gehalt von 0,1 % ebenfalls Phagen-Bindung festgestellt. Die Phagen-Bindungen an das Lectin PA-I waren in allen Fällen nahezu identisch mit der an das eigentliche *Target* Lectin PA-II. Die Inhibition der Phagen-Bindung durch Preinkubationen der Saccharid-Ligand-Lösungen war nur geringfügig möglich. Es waren kaum Unterschiede zu den Kontroll Saccharid-Lösungen zu detektieren. Die mittlere Inhibition der Phagen-Bindung durch L-Fucose lag bei ~2 %, bei Preinkubationen mit anderen Saccharid-Ligand-Lösungen bei 1 % und weit darunter. Auffällig ist weiterhin, dass die Bindung der Peptid-präsentierenden Phagen mit den Sequenzen (A) und (B) eine deutlich höhere Affinität aufwies als die der Phagen mit den Sequenzen (C) und (D).



Bindung des

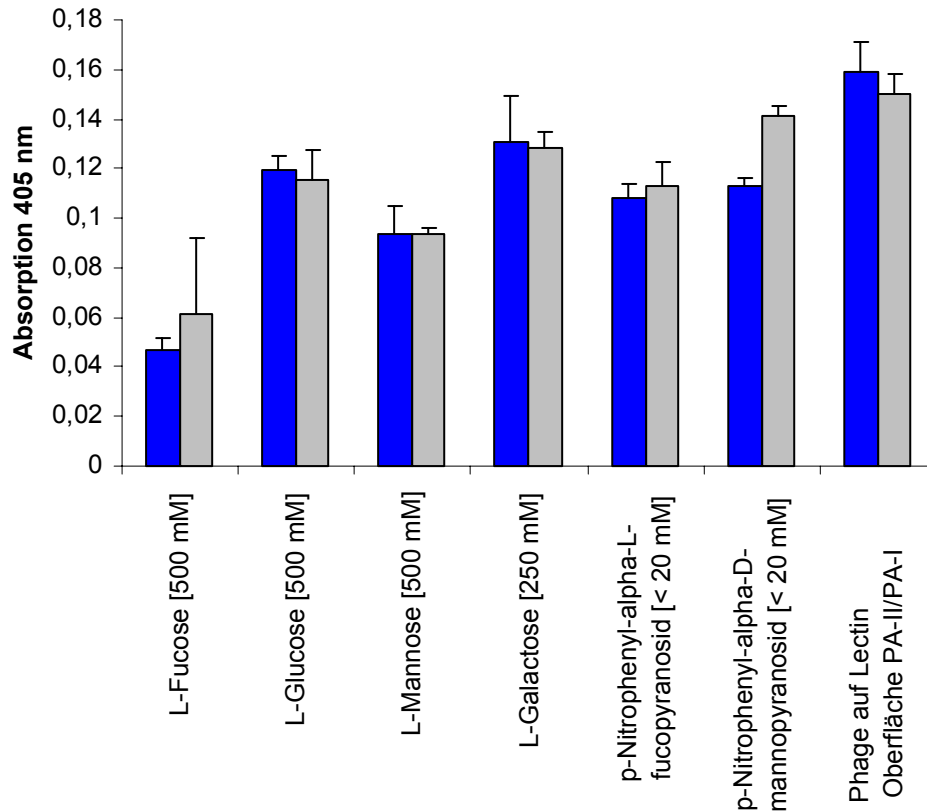
- Phagens (A) SSAWWSYWPPVA
- Phagens (B) SWPYSFWFPLEN
- Phagens (C) ILANDLTAPGPR
- Phagens (D) AHRHPISFLSTL

Abbildung 24: Bindung der Phagen an die Lectine PA-I und PA-II.

ELISA-Wells wurden mit je 100 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I und Lectin PA-II [10 µg/ml] oder zur Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] adsorbiert, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert und 3mal gewaschen. Nach der Inkubation mit je 100 µl der Saccharid-Lösungen [20 mM] in HBSS bzw. für die reine Lectinbindung nur mit HBSS für 2 h, wurden je 100 µl der entsprechenden Phagen-Lösungen [10 µg Protein/ml; BCA-Bestimmung] in 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung zugesetzt und 1,5 h bei RT inkubiert; Endkonzentrationen: Saccharid-Lösungen 10 mM; Phagen-Lösungen 5 µg Protein/ml. Die weiteren Inkubationen mit dem HRP-M13-Antikörper und der ABTS-Lösung erfolgte für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 10mal mit 0,1%iger Tween20-HBSS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Die Preinkubation der adsorbierten Lectine PA-I und PA-II mit den Saccharid-Lösungen [1 M] in HBSS für 1 h bei +4 °C gefolgt von der 10minütigen Inkubation der Phagen-SSAWWSYWPPVA-(A)-Lösung [8 µg Protein/ml; BCA-Bestimmung] in 0,5%iger BSA/Tween20-HBSS-Lösung für 10 min führte zur Inhibition der Phagen-Bindung. Die Bindung des Phagens an adsorbiertes *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II konnte durch die Preinkubation mit 500 mM L-Fucose um 70 % reduziert werden (siehe **Abbildung 25**). Bei Preinkubation mit D-Mannose konnte bei dieser Endkonzentration eine Reduktion der Bindung erreicht werden. Die Inhibition lag bei 41 % und war damit wie erwartet deutlich schwächer gegenüber der Reduktion von L-Fucose. D-Mannose ist in der Literatur als schwächerer Saccharid-Ligand des

Lectins beschrieben (Gilboa-Garber et al., 1977, 1997; Avichezer und Gilboa-Garber, 1987; Garber et al., 1987). Bei Preinkubation mit 500 mM D-Glucose, die nicht als Ligand des Lectins gilt, lag die Reduktion der Bindung bei nur 25 %. Bei p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid und p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid konnte die erforderliche Konzentration von 40 mM für die Preinkubation trotz Zugabe von DMSO nicht erreicht werden, da die Substanzen sich nicht vollständig lösten. Deshalb wurden die Überstände der gesättigten Lösungen nach dem Absetzen der ungelösten p-Nitro-phenylpyranoside für die Versuchsreihen verwendet. Die Reduktion der Phagen-Bindung an das adsorbierte Lectin PA-II war bei der Konkurrenz mit p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid nicht deutlich von der Kontrolle p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid zu unterscheiden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid wahrscheinlich ebenso als Ligand des Lectins PA-II fungiert wie D-Mannose. Dieses Experiment belegt, dass es sich bei der Bindung der Phagen über die Peptidsequenz **SSAWWSYWPPVA (A)** an das *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II um eine spezifische Bindung handelt. Die deutliche Verdrängung der Phagen durch die Preinkubation der spezifischen Lectin-Liganden L-Fucose und D-Mannose gegenüber den Kontroll-Sacchariden lieferte hierfür den Beweis. Deutlichere Unterschiede der beiden p-Nitro-phenylpyranoside zeigten sich auf dem an die Polystyrol-Oberfläche adsorbierten D-Galactose-spezifischen *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I. Die Phagen-Bindung an das adsorbierte D-Galactose-spezifische Lectin PA-I konnte weder durch erhöhten Detergenzgehalt mit 0,5 % BSA/Tween20-Lösung bei der Phagen-Inkubation und mit 0,3%iger Tween20-Lösung beim Waschen, noch durch eine drastisch reduzierte Inkubationszeit von 1,5 h auf 10 min verhindert werden. Die Preinkubation der Saccharid-Lösungen auf dem adsorbierten D-Galactose-spezifischen *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I zeigte ähnliche Werte. Die Unabhängigkeit der Phagen-Bindung an das Lectin PA-I von der Detergenzkonzentration und der Inkubationszeit, lässt sich nur durch eine spezifische Interaktion der vom Phagen präsentierten Peptide **SSAWWSYWPPVA (A)** mit dem D-Galactose-spezifischen *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I erklären.



Bindung an ■ *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I

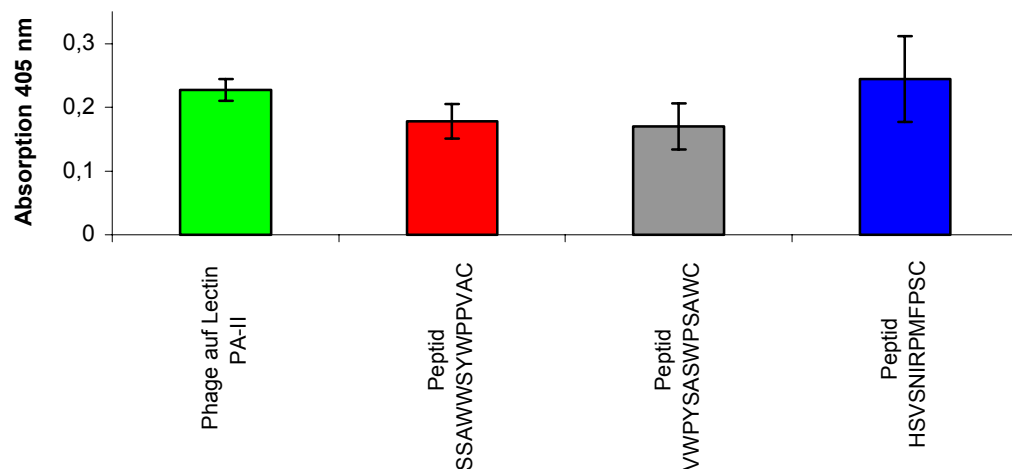
■ *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II

Abbildung 25: Inhibition der Bindung des Phagens SSAWWSYWPPVA (A) an die adsorbierten Lectine PA-I und PA-II.

ELISA-Wells wurden mit je 100 μ l *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I und Lectin PA-II [10 μ g/ml] oder zur Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] adsorbiert, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert und 3mal gewaschen. Die Inkubation erfolgte bei +4 °C für 1 h mit je 100 μ l der entsprechenden Saccharid-Lösungen in HBSS L-Fucose, [1 M], D-Glucose, [1 M], D-Galactose [0,5 M], D-Mannose, [1 M], p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid [$\sim$ 40 mM] oder p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid [$\sim$ 40 mM] bzw. für die reine Lectinbindung nur mit HBSS. Anschließend wurden je 100 μ l der entsprechenden Phagen-Lösungen [8 μ g Protein/ml; BCA-Bestimmung] in 0,5%iger BSA/Tween20-HBSS-Lösung zugesetzt und 10 min bei RT inkubiert; Endkonzentrationen: Saccharid-Lösungen [500 mM], Galactose [250 mM], p-Nitrophenylpyranoside [< 20 mM], Phagen-Lösungen [4 μ g Protein/ml]. Die weiteren Inkubationen mit dem HRP-M13-Antikörper und der ABTS-Lösung erfolgten für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 10mal mit 0,3%iger Tween20-HBSS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Für weitere Experimente wurde die Peptidsequenz SSAWWSYWPPVAC und als Kontrolle das Peptid VWPYSASWPSAWC mit einer willkürlichen Reihenfolge der 12 Aminosäuren mit je einem zusätzlichen Cysteinrest zur Synthese in Auftrag gegeben. Für die weitere Beweisführung der Spezifität wurden die inhibitorischen Eigenschaften der synthetischen Peptide, die Bindung des SSAWWSYWPPVA Peptid-präsentierenden Phagens an der mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin

PA-II [3.76 µg/ml] adsorbierten Polystyrol-Oberfläche untersucht. Die Preinkubation des Peptids **SSAWWSYWPPVAC** und der willkürlichen Kontrolle **VWPYSASWPSAWC** führten zu einer Inhibition der Bindung von ca. 23 %. Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Sequenzen festgestellt werden. Zur Kontrolle wurde hier die synthetisierte Peptidsequenz eines Phagens, **HSVSNIRPMFPSC**, aus dem *Biopanning* gegen das synthetische PAK-Pilin-Protein (128-144) verwendet. Diese Preinkubation zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die Bindung des Phagens.



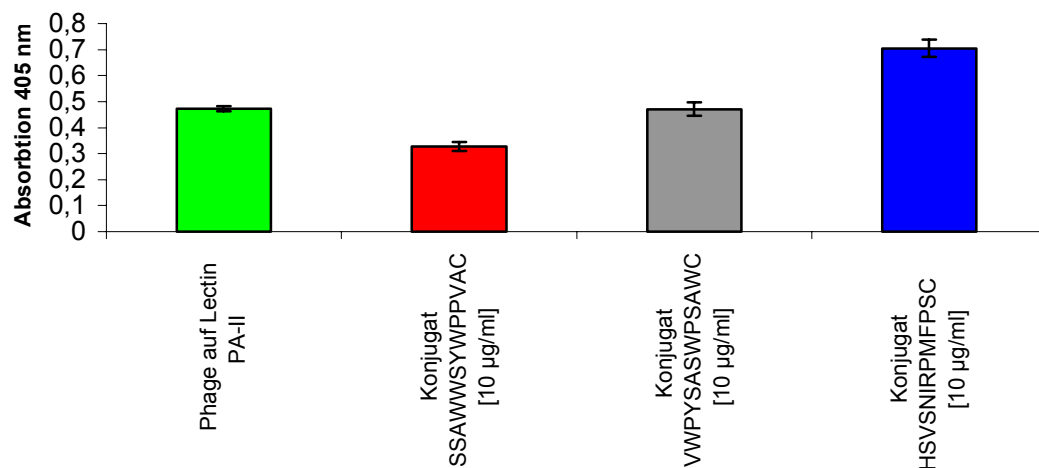
Bindung des ■ Phagens (A)

Kompetition ■ durch Peptid **SSAWWSYWPPVAC**
 ■ durch Peptid **VWPYSASWPSAWC**
 mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren
 ■ durch Kontroll-Peptid **HSVSNIRPMFPSC**

Abbildung 26: Inhibition der Phagen-(A)-Bindung an adsorbiertem Lectin PA-II durch synthetisierte Peptidsequenzen.

ELISA-Wells wurden mit je 100 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II [3.76 µg/ml] adsorbiert, mit 5%iger BSA HBSS-Lösung 1.5 bei 37 °C blockiert und 3mal gewaschen. Die Inkubation erfolgte bei +37 °C für 1,5 h mit je 100 µl der Peptid-Lösungen [100 µM] in HBSS bzw. für die reine Lectinbindung nur mit HBSS. Anschließend wurden je 100 µl der entsprechenden Phagen-Lösung [13 µg Protein/ml; BCA-Bestimmung] in 0,5%iger BSA/0,2%iger Tween20-HBSS-Lösung zugesetzt und 10 min bei +37 °C inkubiert; Endkonzentrationen: Peptid-Lösungen [50 µM]; Phagen-Lösung [7.5 µg Protein/ml]. Die weiteren Inkubationen mit dem HRP-M13-Antikörper in 0,5%iger BSA/Tween20-HBSS-Lösung und der ABTS-Lösung erfolgten für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 10mal mit 0,3%iger Tween20-HBSS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Um die Unterschiede zwischen dem Peptid und seiner Kontrolle besser untersuchen zu können, wurden BSA-Konjugate mit Hilfe des Albumin-Konjugationkits hergestellt. Das Minimum von mindestens 15 reaktiven Gruppen pro BSA-Molekül gewährleistet ein hohes Peptid:BSA Verhältnis (CALBIOCHEM). Das genaue Kopplungsverhältnis konnte nach der im Protokoll beschriebenen Methode jedoch nicht genau bestimmt werden. Durch Preinkubation des Peptid-(SSAWWSYWPPVAC)-BSA-Konjugats konnte die Bindung des Phagens um ~31 % inhibiert werden. Das Peptid-(VWPYSASWPSAWC)-BSA-Konjugat mit willkürlicher Aminosäuresequenz zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die Lectin-Phagen-Bindung. Das Kontroll Peptid-(HSVSNIRPMFPSC)-BSA-Konjugat zeigte wie bei den Experimenten mit den nicht-konjugierten Peptiden keine Inhibition.



Bindung des ■ Phagens (A)
Kompetition ■ durch Peptid-SSAWWSYWPPVAC-BSA-Konjugat [10 µg/ml]
 ■ durch Peptid-VWPYSASWPSAWC-BSA-Konjugat [10 µg/ml]
 mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren
 ■ durch Peptid-HSVSNIRPMFPSC-BSA-Konjugat [10 µg/ml]
 als Kontrolle

Abbildung 27: Inhibition der Phagen-Bindung an adsorbiertem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II durch Peptid-BSA-Konjugate.

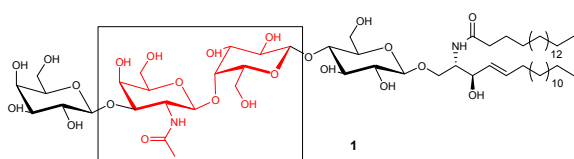
ELISA-Wells wurden mit je 100 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II [3.76 µg/ml] adsorbiert, mit 5%iger BSA HBSS-Lösung 1.5 bei 37 °C blockiert und 1mal mit HBSS gewaschen. Die Inkubation erfolgte bei +37 °C für 1,5 h mit je 100 µl der Peptid-BSA-Lösungen [20 µg/ml] in HBSS bzw. für die reine Lectinbindung nur mit HBSS. Anschließend wurden je 100 µl der entsprechenden Phagen-Lösungen [13 µg Protein/ml; BCA-Bestimmung] in 0,5%iger BSA/Tween20-HBSS-Lösung zugesetzt und 10 min bei +37 °C inkubiert; Endkonzentration: Peptid-BSA-Lösungen [10 µg/ml]; Phagen-Lösungen [7.5 µg Protein/ml]. Die weiteren Inkubationen mit dem HRP-M13-Antikörper und der ABTS-Lösung erfolgten für je 1 h. Die erforderlichen Waschschrte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 10mal mit 0,3%iger Tween20-HBSS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Durch die Inhibition der Bindung konnte die Spezifität der Sequenz **SSAWWSYWPPVAC** hier bestätigt werden.

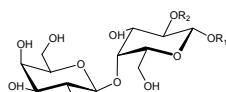
7.3 β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal mimikrierendes/de Peptid/ Peptide zur Inhibition des Pilus

Für die Identifizierung und Charakterisierung stand der Pilus nicht zur Verfügung. Für das *Biopanning* wurde deshalb das 17-mer biotinyliertes Peptid PAK-Pilin-Protein (128-144) KCTSDQDEQFIPKGCSK, das die Bindungsdomäne der Pilin-Untereinheit enthält (Wong et al., 1995), ausgewählt. Um spezifisch bindende Phagen beim *Biopanning* mit der kommerziellen 12-mer *Random Peptide Phage Display Library* zu erhalten, wurden unterschiedliche Strategien der *Target*-Präsentation verwendet. Zum einen wurde die Kopplung über den Biotinrest des biotinylierten Peptids an das auf der Polystyrol-Oberfläche der MaxiSorp Röhrchen adsorbierte Streptavidin durchgeführt. In einem anderen Ansatz erfolgte die Kopplung über Biotin an zuvor mit Streptavidin behandelte Epoxy-Dynabeads. Am Ende der Runde III des jeweils durchgeführten *Biopannings* an dem so präsentierten PAK-Pilin-Protein (128-144) konnten keine Phagen mit hoher Affinität zum *Target* isoliert werden. Um die spezifische Elution der an den Pilus bzw. an die Pilin Untereinheiten bindenden Phagen zu ermöglichen, wurde mit Kashinath S. Sadalapure aus der Arbeitsgruppe von Prof. Thisbe K. Lindhorst ein Analog der minimalen Bindungsdomäne Octyl-4-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-galacto-pyranosyl)-2-*O*-*n*-propyl- β -D-galactopyranosid, synthetisiert. Durch die hydrophobe Seitenkette an der Position 2 des Galactopyranosids wurde die inhibitorische Stärke dieses Analogons im Vergleich zum nativen Analogon β -D-GalNAc(1 $\rightarrow$ 4) β -D-Gal, *O*-D-2-Acetaminogalactopyranosyl- β -(1-4)- β -1-*O*-*n*-octyl- β -D-galactopyranosid erhöht (Schweizer et al., 1998).

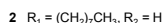
Glycosphingolipid asialo-GM1



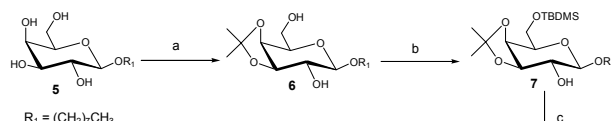
Analoga der minimalen Bindungsdomäne



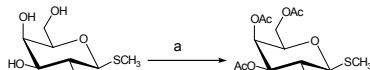
Donor



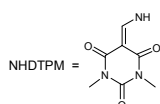
Akzeptor



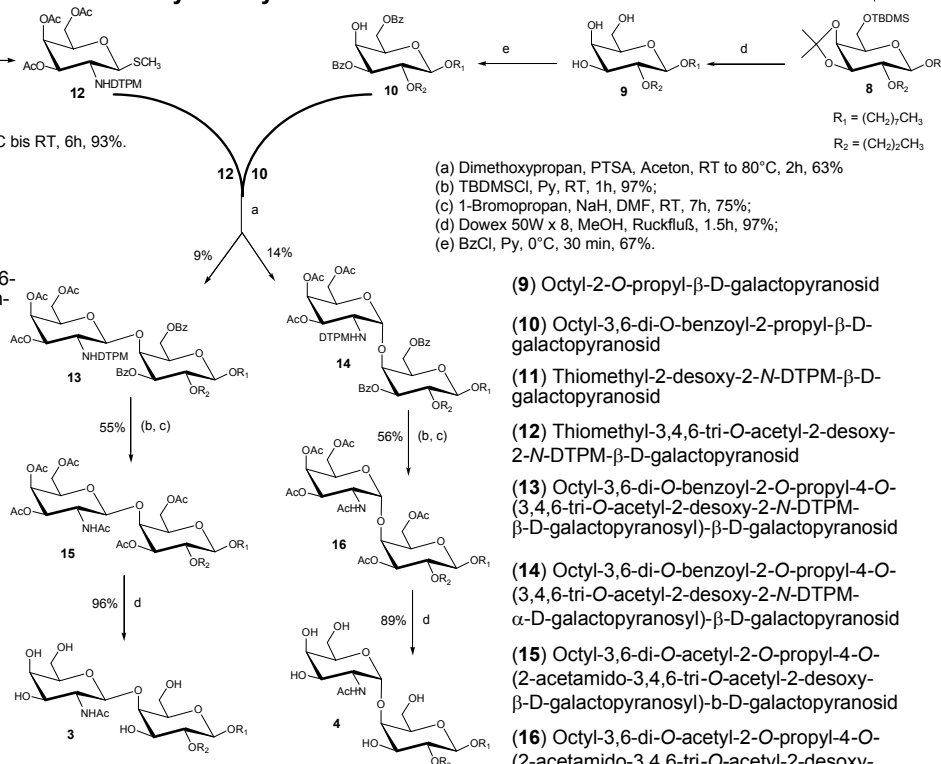
Glycosidsynthese



(a) Ac_2O , $\text{Py-CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1), 0°C bis RT, 6h, 93%.



DTPM = 1,3-Dimethyl-2,4,6-(1H,3H,5H)-trioxypyrimidin-5-yliden-methyl


$$R_1 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$$
$$R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$$

(a) NIS, TfOH, Tetramethylharnstoff, 60°C, 3h, 23%

(b) NaOH, MeOH-H₂O, (2:1), RT, 12h

(c) Ac_2O , Py, RT, 12h

(d) NaOMe, MeOH, RT, 3h

(1) Glycosphingolipid asialo-GM1

(2) Octyl-4-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid

(3) Octyl-2-O-propyl-4-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid

(4) Octyl-2-O-propyl-4-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid

(5) Octyl-β-D-galactopyranosid

(6) Octyl-3,4-O-isopropyliden- β -D-galactopyranosid

(7) Octyl-6-O-tert-butyldimethylsilyl-3,4-O-isopropyliden-β-D-galactopyranosid

(8) Octyl-6-O-tert-butyl dimethylsilyl-3,4-O-isopropyliden-2-O-propyl-β-D-galactopyranosid

(9) Octyl-2-O-propyl-β-D-galactopyranosid

(10) Octyl-3,6-di-O-benzoyl-2-propyl- β -D-galactopyranosid

(11) Thiomethyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β -D-galactopyranosid

(12) Thiomethyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β -D-galactopyranosid

(13) Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM-β-*D*-galactopyranosyl)-β-*D*-galactopyranosid

(14) Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-*O*-propyl-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid

(15) Octyl-3,6-di-O-acetyl-2-O-propyl-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-galactopyranosyl)-b-D-galactopyranosid

(16) Octyl-3,6-di-O-acetyl-2-O-propyl-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranoside

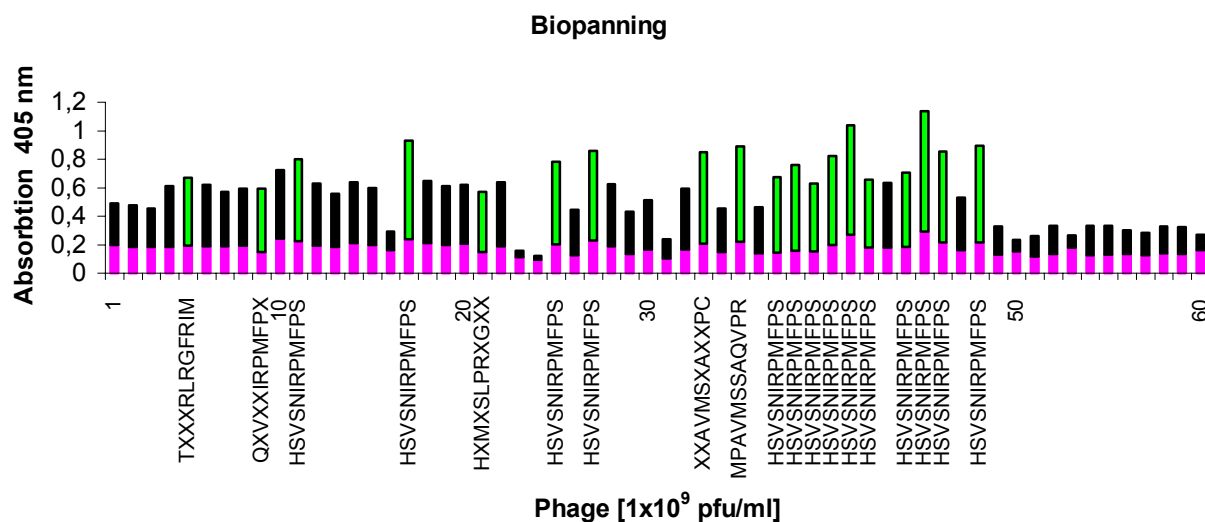
Abbildung 28: Disaccharid-Synthese des Octyl-4-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-galacto-pyranosyl)-2-*O*-*n*-propyl- β -D-galactopyranosids.

Ausgehend vom Edukt (**5**) wurde über die Syntheseschritte a,b,c,d,e der Akzeptor (**10**) dargestellt. Der Donor wurde aus Edukt (**11**) durch Peracetylierung gewonnen. Durch Abspaltung der verwendeten Schutzgruppen konnte das gesuchte β -Disaccharid (**3**) und das α -Disaccharid (**4**) als Nebenprodukt gewonnen werden.

Der Akzeptor Octyl-3,6-di-*O*-benzoyl-2-propyl- β -D-galactopyranosid (**10**) wurde ausgehend vom kommerziell erhältlichen Octyl- β -galactopyranosid in der folgenden Reihenfolge synthetisiert: Das Octyl- β -D-galactosid (**5**) wurde in trockenem Aceton mit 2,2-Dimethoxypropan und katalytischen Mengen von *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Es konnte das Derivat Octyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**6**) mit einer Ausbeute von 63 % isoliert werden. Mit Hilfe von *tert*-Butyldimethylchlorsilan (TBDMSCl) in reinem Pyridin wurde die Hydroxylgruppe an der Position 6 selektiv geschützt, um Octyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**7**) in quantitativer Ausbeute zu erhalten. Nach der Protektion der Position 6 war nun die Position 2 frei für eine Substitution mit 1-Brompropan in Anwesenheit einer Natriumhydridsuspension. Es konnte Octyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-3,4-*O*-isopropyliden-2-*O*-propyl- β -D-galactopyranosid (**8**) mit einer Ausbeute von 75 % gewonnen werden. Nun wurden die Schutzgruppen in einem Schritt unter der Verwendung des Ionenaustauschers, DOWEX[®] 50 W X 8, in Methanol unter Rückfluss abgespalten, um Octyl-2-*O*-*n*-propyl- β -D-galactopyranosid (**9**) zu erhalten. Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe von Benzoylchlorid die Positionen 3 und 6 benzoyleiert. Es konnte der gewünschte Akzeptor (**10**) mit freier Position 4 mit einer Ausbeute von 67 % isoliert werden. Die Schutzgruppen wie Phthaloyl (Lemieux et al., 1976), Tetrachlorophthaloyl (Debenham et al., 1997; Debenham et al., 1996), Trichloroethoxycarbonyl (Imoto et al., 1987) und Allyloxycarbonyl (Boulanger et al., 1987) sind empfindlich und liefern nur eine geringe Ausbeute bei der Oligosaccharid-Synthese. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein Donor mit der Schutzgruppe 1,3-Dimethyl-2,4,6-(1H, 3H, 5H)-trioxypyrimidin-5-yliden-methyl (DTPM) gesucht. Diese gilt als günstige und effiziente Schutzgruppe bei der Synthese von 2-Amino-2-desoxy-glycopyranosiden (Dekany et al., 2001; Singh und Seifert, 2001). Thiomethyl-2-desoxy-2NDTPM-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid wurde deshalb als Donor eingesetzt. Dieser ließ sich in nahezu quantitativer Ausbeute aus Thiomethyl-2-desoxy-2-*N*-DTPM- β -D-galactopyranosid (**11**) durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin gewinnen. Die Verwendung von Tetramethylharnstoff zur Stabilisierung des bei der Glycosylierung intermediär gebildeten Oxocarbeniumions wurde bei Kihlberg et al. (1990) in der Literatur dokumentiert und deshalb hier ebenfalls eingesetzt. Zusätzlich wurde noch eine Kombination von *N*-Iodsuccinimid und Trifluormethansulfonsäure

eingesetzt, um Iodid zu erzeugen. Dieses fungierte als thiophiles Agens und führte zum Oxocarbenium-Ion. Das Carbenium-Iminium-Ion, stabilisiert durch Tetramethylharnstoff, stand nun für den Angriff der Hydroxylgruppe an Position 4 des reaktionsträgen Akzeptors (**10**) zur Verfügung. Die erwarteten β -(1 $\rightarrow$ 4) und α -(1 $\rightarrow$ 4) Disaccharide konnten mit N-Iodsuccinimid, Trifluormethansulfonsäure und Tetramethylharnstoff in 1, 2-Dichlorethan bei +60 °C unter absolut wasserfreien Bedingungen gewonnen werden. Die Mischung wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel mit dem Eluent Aceton/Hexan (1:5) aufgetrennt, um das β -(1 $\rightarrow$ 4) Isomer (**13**) (8 mg, 9 %) und das α -(1 $\rightarrow$ 4) Isomer (**14**) (13 mg, 14 %) in einem Verhältnis von 1:1,6 zu erhalten. Die beiden Isomere wurden separat mit 10%iger Natriumhydroxid-Lösung in Methanol behandelt, um die Benzoyl-, Acetyl- und N-DTMP-Schutzgruppen in einem Schritt abzuspalten. Diese ungeschützten Isomere wurden dann acetyliert, um die peracetylierten Derivate (**15**) und (**16**) zu erhalten. Die Kopplungskonstanten der NMR Experimente für (**15**) ($J_{\text{cl, H1}} = 166.2$ und 162.9 Hz) und (**16**) ($J_{\text{cl, H1}} = 172.4$ und 157.65 Hz) zeigten die erwarteten Werte für die glycosidische Bindung β -(1 $\rightarrow$ 4) im Disaccharid (**15**) und α -(1 $\rightarrow$ 4) im Disaccharid (**16**). Die Acetatester wurden mit NaOMe-MeOH gespalten, um die N-acetylierten *Targets* (**3**) und (**4**) zu erhalten. Die Disaccharide wurden dann jeweils über eine Sephadex LH-20 Säule aufgereinigt, um restliche Verunreinigungen zu entfernen. Es konnte das gewünschte Disaccharid (**3**) mit β -(1 $\rightarrow$ 4) Konformation in hoher Ausbeute (11 mg, 96 %) gewonnen werden. Die Ausbeute des Disaccharids (**4**) mit α -(1 $\rightarrow$ 4) Konformation lag bei 7 mg und 89 %.

Da die vorherigen *Biopannings* mit dem biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Protein (128-144) keine spezifisch bindenden Phagen erbrachten, wurde für ein weiteres *Biopanning* als *Target* nicht biotinyliertes synthetisiertes PAK-Pilin-Protein (128-144) verwendet. Wie bei dem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA II wurde das synthetisierte Peptid an Epoxybeads M270 gebunden. Mit diesen Beads wurde dann das *Biopanning* durchgeführt. Nach drei *Biopanning* Runden mit unspezifischer Elution durch pH-Shift konnten 18 Phagenklone isoliert werden, die eine höhere Affinität zum adsorbiertem synthetisierten PAK-Pilin-Protein (128-144) zeigten (siehe **Abbildung 29**). In diesem *Biopanning* wurde 14mal die Sequenz **HSVSNIRPMFPS** gefunden.



Bindung an

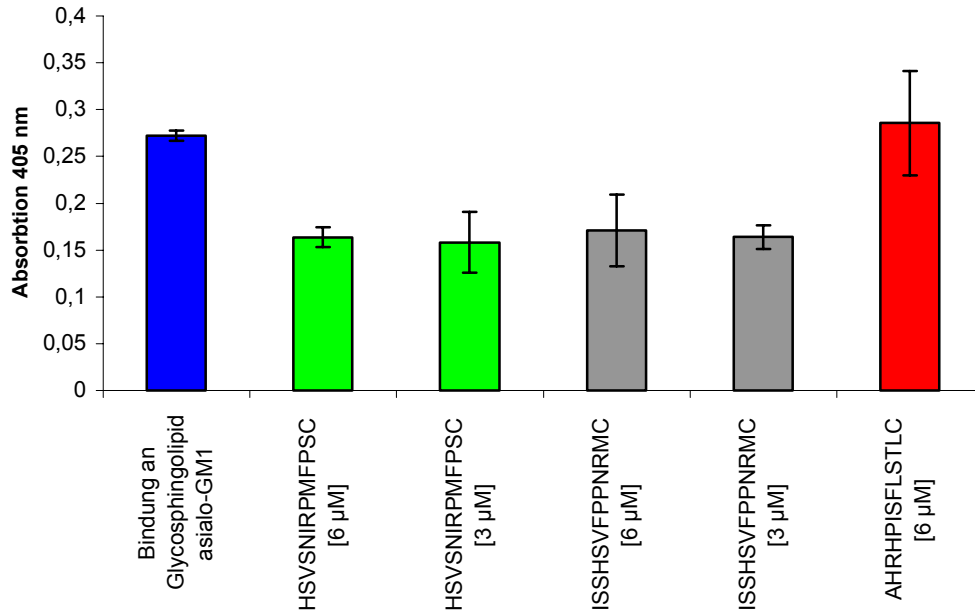
- PAK-Pilin-Protein (128-144) (ausgewählt zur Sequenzierung)
- BSA
- PAK-Pilin-Protein (128-144) mit geringer Differenz zur BSA-Oberfläche

Abbildung 29: Bindung der Phagen an adsorbiertes PAK-Pilin-Protein (128-144).

ELISA-Wells wurden mit 100 µl PAK-Pilin-Protein (128-144) [100 µg/ml] oder zur Kontrolle mit BSA [5 mg/ml] adsorbiert und mit 5%iger BSA-Lösung blockiert. Die Inkubation mit je 100 µl der Phagen-Lösung [1×10^9 pfu/ml] in HBSS, dem HRP-M13-Antikörper und der ABTS-Lösung erfolgte für je 1 h. Die erforderlichen Waschschritte zwischen den einzelnen Inkubationen wurden je 10mal mit 0,1%iger Tween20-TBS-Lösung vorgenommen. Die Detektion erfolgte bei 405 nm. Das X steht für bei der Sequenzierung nicht identifizierte Aminosäuren.

Eine spezifische Elution mit dem in Zusammenarbeit mit Prof. Lindhorst synthetisierten Disaccharid (**3**) konnte aufgrund der geringen Ausbeute nicht durchgeführt werden. Für weitere Experimente wurde diese Peptidsequenz **HSVSNIRPMFPSC** und eine willkürliche Reihenfolge der 12 Aminosäuren **ISSHSVFPPNRM**C als Kontrollpeptid mit je einem zusätzlichen Cysteinrest zur Synthese in Auftrag gegeben. Um die Spezifität der Sequenz **HSVSNIRPMFPSC** zu überprüfen, wurde die Bindung des biotinylierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1 in Anwesenheit des Peptids, des willkürlichen Peptids und eines Kontroll-Peptids aus dem Phage Display mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II untersucht. Die Peptide wurden hierzu mit dem biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144) [12,5 µM] preinkubiert und nachträglich auf der mit dem Glycosphingolipid asialo-GM1 adsorbierten Polystyrol Oberfläche inkubiert.

Ergebnisse



Bindung an
in Anwesenheit

- Glycosphingolipid asialo-GM1
- vom Peptid **HSVSNIRPMFPSC**
- vom Peptid **ISSHSVFPPNRM**
mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren
- vom Kontroll Peptid **AHRHPISFLSTLC**

Abbildung 30: Inhibition der Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1.

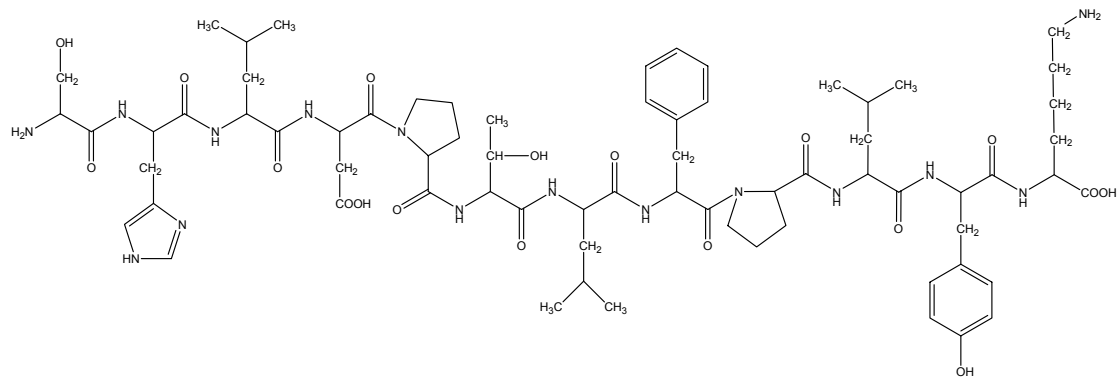
ELISA-Wells wurden mit 100 µl Glycosphingolipid asialo-GM1 [1 µg/ml] in Methanol bei +37 °C adsorbiert, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert und 3mal mit 1%iger BSA-PBS-Lösung gewaschen. Parallel wurden die Lösungen des Peptids **HSVSNIRPMFPSC** [3 und 6 µM], des willkürlichen Peptids **ISSHSVFPPNRM** und des Kontroll Peptids **AHRHPISFLSTLC** [6 µM] in PAK-Pilin-Protein (128-144)-Lösung [12,5 µM] vorinkubiert. Die Inkubation mit je 100 µl der vorinkubierten Lösungen bzw. für die reine Bindung nur mit PAK-Pilin-Protein (128-144)-Lösung [12,5 µM] erfolgte für 1,5 h bei RT. Danach wurde 3mal gewaschen und mit NeutrAvidin™ Meerrettich-Peroxidase-Konjugat [1:3.000] 1h bei RT inkubiert. Nach 6maligem Waschen wurde für 30 min mit ABTS-Lösung inkubiert. Die erforderlichen Waschschrte wurden mit 1%iger BSA/Tween20-PBS-Lösung durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 405 nm.

Das Peptid **HSVSNIRPMFPSC** zeigte eine deutliche Inhibition der Bindung. Diese lag bei den Konzentrationen von 3 µM und 6 µM bei ~41 %. Ähnliche Werte bei diesen Konzentrationen zeigte auch das Peptid mit willkürlicher Reihenfolge der Aminosäuren, während das Kontroll-Peptid bei 6 µM keine Inhibition der Bindung aufwies.

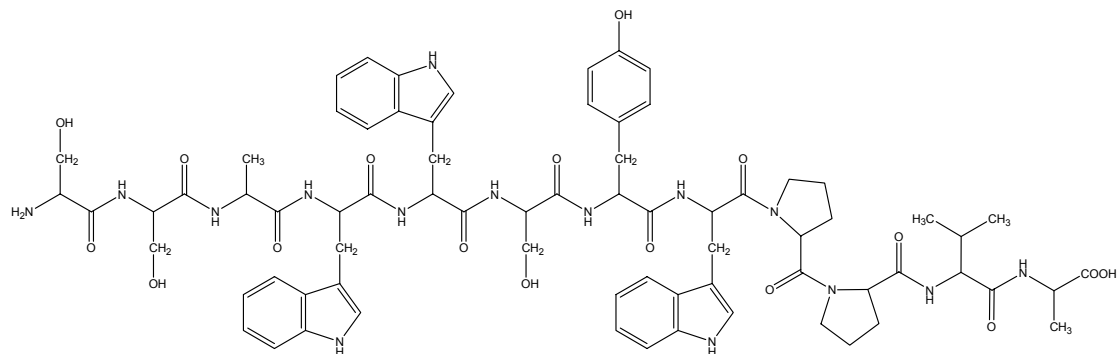
7.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Laufe dieser Arbeit konnten drei Glyco-Replika-Peptide isoliert und identifiziert werden, die die gesuchten Saccharid-Liganden zur Inhibition der Adhäsion des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* mimikrieren (siehe **Abbildung 31**).

- **S H L D P T L F P L Y K** als D-Galactose-Replika-Peptid



- **S S A W W S Y W P P V A** als L-Fucose-Replika-Peptid



- **H S V S N I R P M F P S** als β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-Replika-Peptid

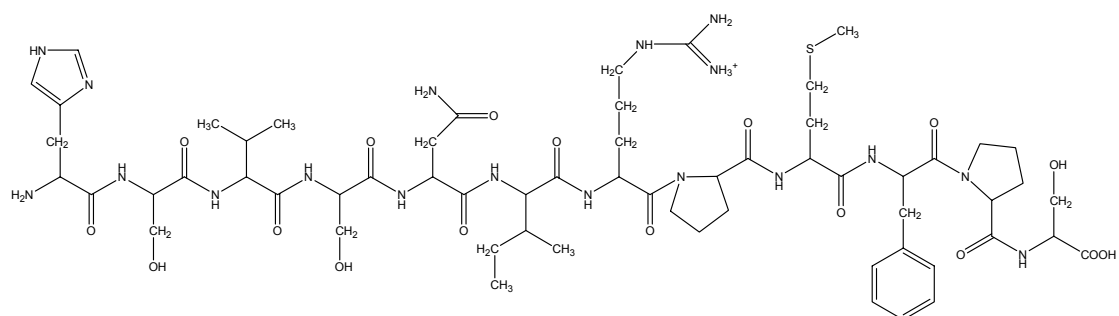


Abbildung 31: Glyco-Replika-Peptid Sequenzen.

Graphische Darstellung der Primärstruktur der gefundenen Glyco-Replika-Peptide. Die Isolierung und Identifikation wurde mit Hilfe eines 12-mer *Random Peptide Phage Display Library Kits* vorgenommen. Diese Glyco-Replika-Peptide wurden durch *Biopanning* an den *Targets* identifiziert. Die *Targets* D-Galactose-spezifischen Lectins PA-I, L-Fucose-spezifischen Lectins PA-II und β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal spezifischen PAK-Pilin-Protein (128-144) wurden hierzu ausgewählt.

Ausgehend von dem *Peptide 12-mer Phage Display Library Kit* wurden durch den *in vitro* Selektionsprozess *Biopanning* bindende Phagen isoliert. Die selektionierten Phagen wurden auf ihre Bindungs-Spezifität an die *Targets* untersucht. Es konnten für alle Ansätze Phagen mit hoher Affinität zu den entsprechenden *Targets* identifiziert werden. In Wettbewerbsstudien zeigte sich, dass die Bindungen der Phagen mit entsprechenden Saccharid-Liganden der *Targets* inhibierbar waren. Hierdurch konnte die spezifische Interaktion der Phagen über die Peptide mit den *Targets* bewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen mit den synthetisierten Peptiden und entsprechenden BSA-Konjugaten konnten die Spezifität und damit das Vorliegen von Glyco-Replika-Peptiden bestätigen (siehe **Abbildung 31**).

8 Diskussion

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Suche nach Saccharidstruktur-mimikrierenden Peptiden durch Verwendung von *Random Peptide Phage Display Libraries*. Diese mimikrierenden Peptide werden Glyco-Replika-Peptide genannt die Bezeichnung geht auf Taki & Ishikawa (1999) zurück. Die zu mimikrierenden Saccharide spielen eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion des Antibiotika-resistenten Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* an die Epithelien des Respirationstraktes. Dieser initiiierende Schritt der Bakterien-Infektion führt zu rezidivierenden Infektionen bei Mukoviszidose-Patienten. Die Infektionen und Entzündungsvorgänge resultieren in einer progressiven Zerstörung der Lunge. Die damit verbundene respiratorische Insuffizienz ist für 90 % der CF-Todesfälle verantwortlich (Leutz und Sybrecht, 2001; Paul et al., 2001). Die Entwicklung von Glyco-Replika-Peptiden stellt einen effizienteren Therapieansatz dar, ein Einsatz entsprechender Saccharid-basierter Therapeutika zur Inhibition der Adhäsion des Bakteriums ist mit Nachteilen behaftet. Neben dem meist hohen Synthesaufwand für Saccharid-Therapeutika weisen sie häufig schwache unspezifische Wechselwirkungen auf. Um spezifische Interaktionen zu ermöglichen, ist deshalb der Einsatz hoher Konzentrationen erforderlich. Der selektive Abbau der Saccharide durch Glycosidasen und Glycolyse reduziert je nach Struktur zudem die Halbwertszeit auf wenige Minuten (Dove, 2001; Maeder, 2002; Sears und Wong, 1999). Mit Hilfe eines *in vitro* Selektionsprozesses, *Biopanning*, wurden folgende Glyco-Replika-Peptide gesucht:

- Ein D-Galactose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I
- Ein L-Fucose mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-II
- Ein β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-spezifisches mimikrierendes/de Peptid/Peptide zur Inhibition des Pilus

Für das *Biopanning* wurde ein 12-mer *Random Peptide Phage Display Library Kit* verwendet. Bindende M13-Phagen wurden nach der *Biopanning*-Runde III isoliert. Spezifisch bindende Phagen wurden sequenziert und die entsprechenden Peptide synthetisiert. Die Charakterisierung dieser Peptide kann Auskunft über deren Fähigkeit geben, die gewünschten Saccharide zu mimikrieren.

8.1 D-Galactose-Replika-Peptid zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I

Bei den 12-mer Insertionssequenzen der an das Lectin PA-I bindenden Peptid-präsentierenden Phagen konnte die Konsensussequenz **PTLFPLYK** von acht Aminosäuren identifiziert werden. Die Insertionssequenz **SHLDPTLFPLYK** mit der Konsensussequenz wurde sowohl bei der spezifischen Elution mit Phenyl-β-D-galactopyranosid als auch bei der unspezifischen Elution mit pH-Shift gefunden. Der Phage, der das Peptid mit der Sequenz **SHLDPTLFPLYK** präsentierte, zeigte die höchste Affinität zum adsorbierten Lectin PA-I. Die Bindung des Phagens erreichte bei der Konzentration 7.81×10^8 pfu/ml eine Sättigung. Peptid-präsentierende Phagen, deren Insertionssequenz nur einzelne Aminosäuren der Konsensussequenz enthielten, zeigten nur eine geringe Affinität zum Lectin PA-I. Bei diesen Phagen konnte erst ab einer Konzentration von 1×10^8 pfu/ml ein Unterschied der Affinität zwischen dem an die Polystyrol-Oberfläche adsorbierten Lectin PA-I und dem als Kontrolle verwendeten BSA festgestellt werden. Bei den identifizierten Sequenzen mit Austausch der vier N-terminalen Aminosäuren und vollständiger Konsensussequenz konnten keine gravierenden Veränderungen in der Phagen-Lectin-Bindung beobachtet werden. Mit Hilfe eines Kompetition-ELISAs wurde die Spezifität des Peptid-präsentierenden Phagens **SHLDPTLFPLYK** überprüft. Die Bindung des Phagens ließ sich durch Zugabe des aus der Literatur bekannten Saccharid-Liganden Phenyl-β-D-galactopyranosid kompetitieren. Phenyl-β-D-glucopyranosid zeigte keine Kompetition. Dieses Ergebnis bewies, dass die Interaktion zwischen dem Phagen und dem Galactose-spezifischen Lectin PA-I spezifisch über die präsentierten Peptide vermittelt wurde. Die Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I [0,125 µg/ml] an adsorbiertes Glycoprotein P1 [1 µg/ml] konnte konzentrationsabhängig mit Phenyl-β-D-galactopyranosid inhibiert werden. Die Inhibition der Bindung durch Phenyl-β-D-galactopyranosid

wurde bereits von Chen et al. (1998) beschrieben und konnte hier reproduziert werden. Das synthetisierte Peptid **SHLDPTLFPLYKG** zeigte bei den Konzentrationen von 62,5, 15,63 und 1,53 μM ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition der Lectinbindung. Für das eingesetzte Kontrollpeptid **TLLPHDYPLFKSG** mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren des Peptids konnte bei diesen Konzentrationen keine Inhibition festgestellt werden. Die Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an das adsorbiertes ~20-mer (**SHLDPTLFPLYKGC**)-BSA-Konjugat mit hoher Affinität und dessen Inhibition durch Zugabe von Phenyl- β -D-galactopyranosid belegt ebenfalls die Saccharid-mimikrierende Eigenschaft des Peptids und das Vorhandensein einer Glyco-Replika-Peptid-Sequenz. Dieses wurde bestätigt durch die fehlende Bindung des Lectins PA-I an das als zur Kontrolle eingesetzte ~20-mer (**TLLPHDYPLFKSGC**)-BSA-Konjugat. In einem funktionellen *in vitro* Test sollte das Glyco-Replika-Peptid unter biologischen Bedingungen getestet werden. Hierzu wurde ein Adhäsionstest von biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* an A549 menschlichen Lungenkarzinomzellen durchgeführt. Die A549-Zellen besitzen die morphologischen und biochemischen Eigenschaften von Typ-II-Pneumozyten der intakten Lunge (Chi et al., 1991). Studien an A549-Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung von *Pseudomonas aeruginosa* (Chi et al., 1991; Di Martino et al., 2000; Hahn et al., 1997). Der biotinylierte *Pseudomonas aeruginosa* Stamm ATCC 53308 zeigte wie erwartet eine konzentrationsabhängige Bindung an die adsorbierten A549-Zellen. Bei einer Bakterienkonzentration von $0,5 \times 10^8$ Zellen/ml konnte mit einer Konzentration von 73,25 μM des ~10-mer-(**SHLDPTLFPLYKGC**)-BSA-Konjugats eine Inhibition der Bindung um 33 % beobachtet werden. Beim Einsatz der selben Konzentration des ~10-mer-Peptid-(**TLLPHDYPLFKSGC**)-BSA-Konjugats mit willkürlicher Aminosäuresequenz lag die Inhibition bei 27 %. Bei einer Konzentration von 18,31 μM Peptid-BSA-Konjugat zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Inhibition der Bindung. Die Inhibition für das ~10-mer-(**SHLDPTLFPLYKGC**)-BSA-Konjugat lag bei 18 %, während das Konjugat mit willkürlicher Aminosäuresequenz nur eine Inhibition von 4 % erreichte. Phenyl- β -D-galactopyranosid zeigte bei der Konzentration von 97,66 μM nur noch eine Inhibition der Bakterienbindung von ~5 %. Eine Inhibition von 31 % wurde durch die Inkubation mit Phenyl- β -D-galactopyranosid erst bei einer Konzentration von 100 mM erreicht. Damit konnte hier das Vorhandensein eines Glyco-Replika-Peptids erneut bewiesen werden.

Mit Hilfe der Plasmon-Resonanz-Methode (BIAcore) konnte eindeutig die Bindung des Glyco-Replika-Peptid-BSA-Konjugats an das auf der CM5-Chip-Oberfläche adsorbierte Lectin PA-I festgestellt werden. Die Injektion dieses Konjugates zeigte im Sensorgramm eine Zunahme der *Resonance Units* von ~256. Durch Injektionen des Laufpuffers (0,5%ige Tween20-TBS-Lösung) für 5 min wurde eine Dissoziation auf etwa 100 RU beobachtet. Das Peptid-BSA-Konjugat mit willkürlicher Aminosäuresequenz zeigte bei der Injektion nur einen Puffersprung und keine wirkliche Adhäsion an das adsorbierte Lectin. Die Injektion des Laufpuffers führte deshalb zum sofortigen Abfall der Kurve auf Null. Die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten des biotinylierten Lectins an die Peptid-BSA-Konjugate konnten hierdurch reproduziert werden. Weitere Bindungsstudien ließen sich mit den Peptid-BSA-Konjugaten nicht durchführen, da die Regenerierung der Chip-Oberfläche zur Zerstörung der Dextranmatrix und damit zur Ablösung des adsorbierten Lectins führte. Die Spezifität der ungekoppletten Peptide **SHLDPTLFPLYKG**, des Peptids **TLLPHDYPLFKSG** mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren und des Peptids der Konsensussequenz **PTLFPLYKG** wurde mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* (BIAcore) Methode untersucht. Es konnte keine Bindung für das Kontrollpeptid **TLLPHDYPLFKSG** und die Konsensussequenz **PTLFPLYKG** gemessen werden. Für das Peptid **SHLDPTLFPLYKG** konnte eine Bindungskonstante von $K_D = 8,96 \times 10^{-6}$ M bestimmt werden. Die Bindung ließ sich auch hier eindeutig mit Phenyl-β-D-galactopyranosid kompetitieren. Im Sensorgramm wurde bei Injektion der Peptidlösung [100 μM] eine Zunahme von ~55 RU festgestellt. Bei Phenyl-β-D-galactopyranosid [30 μM] wurde eine Zunahme von ~17 RU gemessen. Die Injektion der Mischung aus beiden Lösungen (Endkonzentration: Peptidlösung [100 μM]; Phenyl-β-D-galactopyranosid [30 μM]) erreichte einen Wert ~35 RU. Dieses Ergebnis war nur über eine spezifische Interaktion der Peptide mit der Phenyl-β-D-galactopyranosid Bindungsdomäne des Lectins PA-I zu erklären. Bei einer unspezifischen Interaktion hätten sich die Änderungen der *Resonance Units* addieren und nicht subtrahieren müssen. Nach Überprüfung der Spezifität handelt es sich folglich bei der Sequenz **SHLDPTLFPLYKG** um ein D-Galactose-Replika-Peptid.

8.2 L-Fucose-Replika-Peptid zur Inhibition des *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-II

In zwei unabhängigen *Biopannings* an adsorbiertem L-Fucose-spezifischen Lectin PA-II mit spezifischer 100 mM L-Fucose Elution konnten aus den an die Lectinoberfläche bindenden Phagen folgende Peptidsequenzen identifiziert werden: Im ersten *Biopanning* wurden 19 Phagenklone isoliert, die eine deutlich höhere Affinität zur Lectin-Oberfläche als zur Kontroll-BSA-Oberfläche zeigten. Es wurde 7mal die Sequenz **SSAWWSYWPPVA (A)** und 5mal die Sequenz **SWPYSFWFPLEN (B)** gefunden. Beim zweiten *Biopanning* wurden 31 bindende Phagenklone isoliert. Hierbei wurde 15mal die Sequenz **ILANDLTAPGPR (C)** und 6mal die Sequenz **AHRHPISFLSTL (D)** gefunden. Im Gegensatz zum *Biopanning* für ein D-Galactose-Replika-Peptid konnte keine Konsensussequenz identifiziert werden. Bei der Überprüfung der Spezifität der einzelnen Phagen zeigte sich, dass die aus der Literatur bekannten Saccharid-Liganden in einer sehr hohen Konzentration eingesetzt werden mussten, um eine Verdrängung der Phagen zu ermöglichen. Dieses lässt sich eventuell durch die Avidität des Phagens erklären, der fünf Kopien des im Genom codierten Peptids an der Spitze des Phagenpartikels präsentiert. Für die Avidität spricht auch, dass durch eine kurze Inkubation des Phagens mit der Sequenz **SSAWWSYWPPVA (A)** von 10 min deutlichere Inhibitionen durch die aus der Literatur bekannten Interaktionspartner des L-Fucose-spezifischen Lectins PA-II (Garber et al., 1987; Gilboa-Garber et al., 1997) erreicht wurden, als bei Inkubationszeiten von 1,5 h. Der Peptid-präsentierende Phage **SSAWWSYWPPVA (A)** wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt, weil diese Peptidsequenz im Vergleich die meisten hydrophoben Aminosäuren enthielt. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Lectin PA-II eine höhere Affinität für hydrophobe Liganden hat (Garber et al., 1987, 1992). Neben der Bindung an das *Target* Lectin PA-II zeigten die Phagen eine Interaktion mit dem D-Galactose-spezifischen Lectin PA-I. Die Phagen-Bindung an das als Kontrolle adsorbierte D-Galactose-spezifische Lectin PA-I war unabhängig von der Detergenzkonzentration und Phageninkubationsdauer. Weder die Verwendung einer Waschlösung mit einem Detergenzgehalt von 0,3 % Tween20 an Stelle von 0,1 % noch die Reduktion der Phagen-Inkubationsdauer von 1,5 h auf 10 min konnte diese Bindung verhindern. Es musste deshalb von einer spezifischen

Interaktion ausgegangen werden. Die Inhibition der Bindung von radioaktiv markierter D-Galactose, D-[6-³H]-Galactose, an das D-Galactose-spezifische Lectin PA-I durch L-Fucose ist jedoch auch in der Literatur beschrieben (Garber et al., 1992). Ein L-Fucose mimikrierendes Peptid wäre somit auch zu entsprechenden Wechselwirkungen mit dem D-Galactose-spezifischen Lectin PA-I fähig.

Die Spezifität des Peptid präsentierenden Phagens **SSAWWSYWPPVA (A)** wurde durch Preinkubation von 1 M Saccharid-Lösungen an adsorbiertem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II für 1 h bei +4 °C und anschließender Phagen-(A)-Inkubation [8 µg Protein/ml] für 10 min untersucht. Die Endkonzentrationen lagen für die Phagenlösungen bei 4 µg Protein/ml und für die Saccharid-Lösungen bei 500 mM. Die Preinkubation mit L-Fucose reduzierte die Phagen-Bindung um bis zu 70 %. Die Preinkubation mit D-Mannose führte erwartungsgemäß zu einer schwächeren Reduktion der Phagen-Bindung von 41 %. Die Interaktion von D-Mannose mit dem L-Fucose-spezifischen Lectins PA-II wurde in der Literatur beschrieben (Gilboa-Garber et al., 1977). Die Preinkubation mit D-Glucose führte zu einer Reduktion der Phagen-Bindung von 25% an das adsorbierte Lectin PA-II. Die prozentualen Inhibition der Phagen-Bindungen durch L-Fucose und D-Mannose unterschieden sich deutlich von der durch D-Glucose erreichten Inhibition. Dieses Experiment zeigte, dass es sich bei der Bindung der Phagen über die Peptidsequenz **SSAWWSYWPPVA** an das *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II um eine spezifische Bindung handelt. Die Verdrängung der Phagen durch Preinkubation mit spezifisch bindender L-Fucose und D-Mannose lieferte hierfür den Beweis. Ein weiterer Grund neben der Avidität für die hohe Saccharid-Konzentration könnte die Assoziationskonstante des Lectins PA-II für L-Fucose (K_a $1,5 \times 10^6$ /mol) (Garber et al., 1987, 1992) sein. Die spezifische Interaktion der vom Phagen präsentierten Peptide mit der entsprechenden Bindungsdomäne würde ähnliche Werte aufweisen und damit wie hier beobachtet hohe Konzentration an Sacchariden zur Verdrängung der Phagen-Bindung erfordern.

Weiterführende Untersuchungen wurden mit der synthetisierten Peptidsequenz **SSAWWSYWPPVAC** und dem Peptid **VWPYSASWPSAWC** mit willkürlicher Reihenfolge der 12 Aminosäuren als Kontrolle durchgeführt. Der zusätzlich eingeführte Cysteinrest wurde bei der Darstellung von Peptid-BSA-Konjugaten für die Kopplung an BSA benötigt. Die Spezifität wurde näher analysiert durch die Preinkubationen der Peptide [100 µg/ml] an adsorbiertes Lectin PA-II und

anschließender 10minütiger Inkubation mit Phagen-(A)-Lösung [13 µg Protein/ml], mit den Endkonzentrationen Peptid-Lösung [50 µM] und Phagen-Lösung [7,5 µg Protein/ml]. Die Phagen-Bindung konnte durch die Preinkubation der beiden Peptide nahezu identisch um ~23 % inhibiert werden. Die Preinkubation mit einem Kontroll-Peptid **HSVSNIRPMFPSC** zeigte keine Inhibition der Phagen-Bindung an das adsorbierte Lectin PA-II. Das Kontroll-Peptid entspricht einer Insertionssequenz eines beim *Biopanning* gegen das synthetische PAK-Pilin-Protein (128-144) isolierten Phagens. Die Spezifität der Peptidsequenz **SSAWWSYWPPVAC** konnte anhand von BSA-Konjugaten eindeutig nachgewiesen werden. Die entsprechenden Peptid-BSA-Konjugate aus den Peptiden **SSAWWSYWPPVAC**, der willkürlichen Reihenfolge der Aminosäuren **VWPYSASWPSAWC** und der Kontrolle **HSVSNIRPMFPSC** [20 µg/ml] wurden hierzu preinkubiert und wie oben beschrieben mit Phagen-(A)-Lösung inkubiert. Die Preinkubation mit dem Peptid-(**SSAWWSYWPPVAC**)-BSA-Konjugat führte zu einer Inhibition der Phagen-Bindung [7,5 µg Protein/ml] von ~31 %. Die Preinkubation der beiden anderen Peptid-BSA-Konjugate hatten keine Inhibition der Bindung zur Folge. Nach der hier beschriebenen Überprüfung der Spezifität handelt es sich bei der Sequenz **SSAWWSYWPPVA** mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein L-Fucose-Replika-Peptid. Künftige Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich bei den weiteren im *Biopanning* identifizierten Sequenzen ebenfalls um L-Fucose-Replika-Peptide handelt.

8.3 β-D-GalNAc-(1-4)- β-D-Gal-Replika-Peptid zur Inhibition des Pilus

Der durch helicale Anordnung der fünf identischen Pilin Untereinheiten gebildete Pilus wurde hier nicht isoliert und stand somit nicht zur Verfügung. Für das *Biopanning* wurde daher das synthetische 17-mer der Aminosäuren 128-144 aus der Pilin-Sequenz verwendet. Dieses PAK-Pilin-Protein (128-144) KCTSDQDEQFIPKGCSK enthält den für die Bindung an die minimale Bindungsdomäne GalNAcβ(1-4)Galβ essentiellen Disulfidloop über die beiden Cystein-Reste 129 und 142 (Wong et al., 1995). Die minimale Bindungsdomäne wird von dem bei Mukoviszidose-Patienten verstärkt exprimierten Glycosphingolipid asialo-GM1 präsentiert (Saiman und Prince, 1993).

Bei *Biopannings* mit der biotinylierten Variante des PAK-Pilin-Proteins wurde zur *Target*-Immobilisierung Streptavidin verwendet. Die biotinylierte Variante wurde verwendet, um eine gezielte Präsentation des 17-mer PAK-Pilin-Proteins (128-144) zu gewährleisten. Die hohe Biotin-Bindungskonstante von $K_D = 4 \times 10^{-14}$ M (Green, 1990) an das tetramere Streptavidin ermöglicht eine starke und zuverlässige Bindung des biotinylierten *Targets*. Unterschiedliche Strategien wie die Preadsorption von Streptavidin an die Polystyrol-Oberfläche von MaxiSorp Röhrchen oder an Epoxybeads M270 und nachträgliche Koppelung des biotinylierten 17-mer PAK-Pilin-Proteins (128-144) wurden eingesetzt. Mit unspezifischer Elution durch pH-Shift konnten nach der *Biopanning*-Runde III in keinem der Ansätze spezifisch bindende Phagen isoliert werden. Bei parallel durchgeführten *Biopannings* mit der gleichen *Phage Display Library* und anderen *Targets*, konnten hingegen durchaus *Target*-spezifische, bindende Phagen isoliert werden. Das Problem lag beim biotinylierten PAK-Pilin-Protein (128-144) an der Art der *Target*-Immobilisierung. Die vereinzelte Präsentation (vier Biotinbindungsstellen pro Streptavidinmolekül) des kleinen PAK-Pilin-Proteins (128-144) auf der adsorbierten Streptavidin-Oberfläche scheint für eine Selektion von spezifisch bindenden Phagen in diesem Fall nicht auszureichen. Deshalb wurde für ein weiteres *Biopanning* nicht biotinyliertes PAK-Pilin-Protein (128-144) als *Target* an Epoxybeads M270 adsorbiert, um eine größtmögliche Oberfläche von $1 \times 10^{-3} - 2,5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ (Spezifische Oberfläche $2\text{-}5 \text{ m}^2/\text{g}$ Beads, DYNAL) bei einem Einsatz von 0,5 mg Beads pro *Biopanning*-Runde zu erhalten. Bei diesem *Biopanning* mit unspezifischer Elution durch pH-Shift konnten aus 60 individuellen Phagenklonen 18 spezifisch bindende Phagenklone selektiert werden. Es wurde 14mal die Sequenz **HSVSNIRPMFPS** gefunden. Eine spezifische Elution der Phagen bei den *Biopanning*-Runden I, II und III mit dem hier dargestellten Octyl-2-O-propyl-4-O-(2-desoxy-2N-acetamido- β -D-galactopyranosyl)- β -D-galacto-pyranosid konnte nicht durchgeführt werden, da die Ausbeute der Disaccharid-Synthese mit 11 mg bzw. 20,47 μmol zu gering ausfiel. Der Einsatz des Disaccharids als Kontrolle in zukünftigen biologischen Experimenten wäre so nicht mehr möglich gewesen, da bei der spezifischen Elution die gesamte Menge verbraucht worden wäre. Es handelte sich bei dem synthetisierten Disaccharid um ein Analogon der minimalen Bindungsdomäne O-D-2-Acetamino-galactopyranosyl- β -(1-4)-galactopyranosid für die Bindung des Pilus bzw. die Pilin Untereinheiten

(Schweizer et al., 1998). Die Insertionssequenz **HSVSNIRPMFPS** des Peptid-präsentierenden Phagens und das Peptid **ISSHSVFPPNRM** mit der willkürlichen Reihenfolge der 12 Aminosäuren wurden mit zusätzlichem Cystein-Rest für spätere Konjugationen synthetisiert. Die Spezifität des Peptids wurde durch die Inhibition der Bindung des biotinylierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) [12,5 µM] an das Glycosphingolipid asialo-GM1 untersucht. Das Peptid mit der Sequenz **HSVSNIRPMFPSC** sowie wie das Peptid **ISSHSVFPPNRMC** mit der willkürlichen Reihenfolge der 12 Aminosäuren zeigten eine deutliche Inhibition der Bindung von ~41 % bei den Konzentration von 3 µM und 6 µM. Das Kontroll-Peptid **AHRHPISFLSTLC**, das nur bei 6 µM eingesetzt wurde, konnte die Bindung nicht inhibieren. Es konnte dadurch nachgewiesen werden, dass es sich um eine spezifische Interaktion des Peptids **HSVSNIRPMFPSC** mit dem PAK-Pilin-Protein (128-144) handelt. Die fast identische Inhibition der Bindung durch das Peptid **HSVSNIRPMFPSC** und dem Peptid **ISSHSVFPPNRMC** mit willkürlicher Reihenfolge der Aminosäuren ist eventuell auf die zufällige Homologie der drei Aminosäuren **HSV** zu erklären. So wird z. B. Biotin durch ein Tripeptid mit dem Motiv **HPQ** mimikriert, wobei flankierende Aminosäuren eine untergeordnete Rolle spielen (Giebel et al., 1995). Ob das Motiv **HSV** wirklich für die Interaktion mit dem PAK-Pilin-Protein (128-144) verantwortlich war und welche Bedeutung die flankierenden Aminosäuren haben, muss durch zukünftige Experimente geklärt werden. Die Überprüfung der Spezifität der Sequenz **HSVSNIRPMFPSC** lässt das Vorliegen eines β-D-GalNAc-(1-4)-β-D-Gal-Replika-Peptids vermuten, das die minimale Bindungsdomäne mimikriert.

Die Suche nach molekularen Mimetika von Sacchariden ist für viele Bereiche der medizinischen Chemie relevant (Sears und Wong, 1999). Es gibt eine Reihe von Beispielen von mit *Phage Display* gewonnenen Glyco-Replika-Peptiden. Eine detaillierte Übersicht ist in der Literatur zu finden (Johnson und Pinto, 2002; Sears und Wong, 1999; Zwick et al., 1998). Glyco-Replika-Peptide bzw. Saccharid mimikrierende Peptide werden u. a. effizient zur Krebstherapie in Tierversuchen eingesetzt (Cunningham und Fujinami, 2004; Johnson und Pinto, 2002; Monzavi-Karbassi et al., 2001; Monzavi-Karbassi und Kieber-Emmons, 2001).

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von drei Glyco-Replika-Peptiden. Diese Peptide mimikrieren Saccharide, die eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* spielen.

Die Interaktion der Lectine und des PAK-Pilin-Proteins (128-144) mit ihren entsprechenden Saccharid-Liganden konnten durch die synthetischen Peptide kompetitiert werden. Die Inhibition der Saccharid-Bindung deutet auf eine Bindung der Peptide an die Saccharid-Bindungsstelle oder an deren näheren Umgebung hin. Es kann sich allerdings auch um eine allosterische Inhibition, hervorgerufen durch die Bindung der Peptide, handeln. Um genauere Einblicke in die Interaktion der *Targets* mit den Peptiden zu erhalten, sind umfangreiche Röntgenkristallstrukturanalysen notwendig. Die Röntgenkristallstrukturanalysen der Interaktion von D-Galactose mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-I (Cioci et al., 2003; Karaveg et al., 2003) und von L-Fucose und D-Mannose mit dem Lectin PA-II (Loris et al., 2003; Mitchell et al., 2002) lieferten Daten über die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Monosaccharide und den Aminosäuren der Lectine. Diese Daten können zum Vergleich herangezogen werden. Ob die gefundenen Peptide genau mit den Saccharidbindungsdomänen interagieren, es sich also um funktionelle strukturähnliche Glyco-Replika-Peptide handelt, oder nur um funktionelle allosterische Glyco-Replika-Peptide, könnte durch diesen Vergleich aufgeklärt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung der Interaktion wären NMR-Studien, wie sie z. B. für die Bindung des PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1 beschrieben sind (Jones et al., 1997). Bei den beschriebenen NMR-Studien führte die Interaktion des PAK-Pilin-Proteins (128-144) mit dem Glycosphingolipid asialo-GM1 zu einer deutlichen Erhöhung der Spektralintensität. Mit diesem System könnte die Interaktion des β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-Replika-Peptids zur Inhibition der Pilus-Adhäsion des Bakteriums untersucht werden. Letztendlich steht hier aber die Inhibition des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* im Vordergrund.

Weiterführende biologische und medizinische Studien mit den gefundenen Sequenzen bzw. den synthetisierten Peptiden könnten weiteren Aufschluss über ihre inhibitorischen Fähigkeiten geben. Eine wichtige Untersuchung ist die Bestimmung der ziliären Schlagfrequenz an kultivierten, humanen Nasal- oder Respirationszellen (Parsek und Greenberg, 2000). Beide Lectine reduzieren bzw. inhibieren *in vitro* die

Zilienschlagfrequenz auf menschlichen Atemwegszellen. Studien der Reduktion der Zilienschlagfrequenz durch das Lectin PA-II zeigten, dass durch Zugabe von L-Fucose die Inhibition der Schlagfrequenz reversibel ist (Adam et al., 1997a; Adam et al., 1997b). Diese Untersuchungen werden meist mit einem *Differential Interface* Mikroskop mit Hochgeschwindigkeits-Video-System oder an Elektronenmikroskopen durchgeführt (Rautiainen et al., 1992; Rhee et al., 2001; Yoshitsugu et al., 1994). Zu berücksichtigen ist, dass die ziliäre Schlagfrequenz mit der Konzentration von intrazellulär freien Calciumionen korrelieren (Salathe und Bookman, 1995; Sanderson et al., 1992). Für chemische und physikalische Untersuchungen wird eine Zilienschlagfrequenz von mindestens 15 Hz, besser 20 Hz, empfohlen aufgrund der schnellen Degeneration der ziliären Funktion (Rautiainen et al., 1993). In einem solchen System könnten die Fähigkeiten des möglichen D-Galactose- bzw. L-Fucose-Replika-Peptids im direkten Vergleich mit den entsprechenden Sacchariden untersucht werden. *In-vitro* Adhäsionsexperimente des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* an humanen Atemwegszellen ermöglichen die Untersuchung der komplexen Adhäsion des Bakteriums. Mit Hilfe des dargestellten Disaccharids könnte das Potential des möglichen β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-Replika-Peptids bestimmt werden. Das mögliche D-Galactose-Replika-Peptid und das L-Fucose-Replika-Peptid könnten hier ebenfalls ihr Potential zeigen, die durch die freigesetzten Lectine PA-I und PA-II hervorgerufene Erhöhung der Adhäsion zu inhibieren. Die hauptsächlich zytosolisch vorkommenden Lectine werden durch Tod und Lyse der Bakterienzelle freigesetzt und fördern die Adhäsion von überlebenden Bakterien (Wentworth et al., 1991).

Das β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal-Replika-Peptid könnte darüber hinaus weitere therapeutische Anwendungen neben der Inhibition der Adhäsion des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* finden. Die für die Adhäsion erforderliche minimale Bindungsdomäne β -D-GalNAc-(1-4)- β -D-Gal (Krivan et al., 1988), vom Replika-Peptid mimikriert, wird von vielen pathogenen Organismen erkannt, wie z. B. *Candida albicans* (Yu et al., 1996) und dem uropathogene *Escherichia coli* (Khan et al., 2000).

Die Wirkungsdauer ist bei Peptiden aufgrund einer Halbwertszeit von ungefähr 25 min beschränkt (Kay et al., 1998). Ziel ist es deshalb Peptide, gegen die Wirkung proteolytischer Enzyme zu schützen. Hierdurch wird die Wirkungsdauer erhöht und ein effizienterer Einsatz der Peptide in der Therapie ermöglicht. Zur Reduktion der Proteolyse gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Die terminale Kopplung oder die Integration von D-, β - oder γ -Aminosäuren (Seebach und Rueping, 2003) zur Erhöhung der Halbwertszeit könnten ohne großen synthetischen Aufwand durchgeführt werden. Aber auch die Zyklisierung der Peptidsequenz wie auch die Kopplung an nichtpeptidische Trägerstrukturen sind möglich (Hruby, 2001; Hruby et al., 1998).

Die hier identifizierten Glyco-Replika-Peptide könnten eine wichtige Grundlage zur Inhibition der Adhäsion des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* darstellen und möglicherweise die Initiation der Infektion eingrenzen. Da es sich bei den Glyco-Replika-Peptiden nicht um Antibiotika handelt, besteht keine Gefahr der Resistenzbildung durch das Bakterium (Drenkard und Ausubel, 2002; Hancock und Speert, 2000; Livermore, 2002). Ergänzend im Kampf gegen das Bakterium ist die Störung oder Inhibition der Signalmoleküle N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserin-Lacton und N-Butyryl-L-homoserin-Lacton der Zell-Zell-Kommunikation, dem *Quorum Sensing*, von großer Bedeutung. Mit der Bakterienanzahl steigt auch die Konzentration der Signalmoleküle der Zell-Zell-Kommunikation stetig in ihrer Umgebung an. Ab einer bestimmten kritischen Bakteriendichte reguliert diese Zell-Zell-Kommunikation die koordinierte Expression von Exoprodukten und beider Lectine PA-I und PA-II in den Bakterien (Erickson et al., 2002; Hart und Winstanley, 2002; Livermore, 2002; Pesci et al., 1999; Smith et al., 2002; van Delden und Iglewski, 1998; Winzer et al., 2000). Zur Aktivierung der Transkription ist eine Konzentration der Signalmoleküle von 10 nM in der Umgebung und eine Bakteriendichte von 10^{10} bis 10^{11} Zellen in der Literatur angegeben (Coval et al., 1999). Durch die gleichgeschaltete Expression kommt es zu einem massiven Angriff auf den Wirt, wobei eine starke Immunantwort und damit Schädigung und Zerstörung des Lungengewebes hervorgerufen wird.

Glyco-Replika-Peptide und Inhibitoren der Signalmoleküle wären in der Lage, die Symptome der Cystischen Fibrose zu bekämpfen und könnten so die Lebenserwartung der betroffenen Patienten deutlich steigern. Zusammen bilden die identifizierten Glyco-Replika-Peptide und Inhibitoren der Signalmoleküle einen viel versprechenden Ansatz für eine symptombezogene Therapie. Die wirkliche Ursache der Cystischen Fibrose ist nur über eine Gentherapie zu behandeln (Griesenbach et al., 2002; Johnsen, 2001)

9 Literatur

A

Adam E. C., Mitchell B. S., Schumacher D. U., Grant G. und Schumacher U. (1997a) *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 2102-2104.

Adam E. C., Schumacher D. U. und Schumacher U. (1997b) Cilia from a cystic fibrosis patient react to the ciliotoxic *Pseudomonas aeruginosa* II lectin in a similar manner to normal control cilia-a case report. *J. Laryngol. Otol.* **111**, 760-762.

Adey N. B., Mataragnon A. H., Rider J. E., Carter J. M. und Kay B. K. (1995) Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* **156**, 27-31.

AHC Austrian Health Communication (2003) Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF). <http://www.ahc-consilium.at/daten/mukoviszidose.htm>.

Akabas M. H. (2000) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J. Biol. Chem.* **275**, 3729-3732.

al-Awqati Q. (1995) C001 : Pathophysiology of Cystic Fibrosis. <http://www.ecfsoc.org/brussels/cftr/c00195.html>.

Avichezer D. und Gilboa-Garber N. (1987) PA-II, the L-fucose and D-mannose binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates human peripheral lymphocytes and murine splenocytes. *FEBS Lett.* **216**, 62-66.

B

Bajolet-Laudinat O., Girod-de Bentzmann S., Tournier J. M., Madoulet C., Plotkowski M. C., Chippaux C. und Puchelle E. (1994) Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.* **62**, 4481-4487.

Baker N. R., Minor V., Deal C., Shahrabadi M. S., Simpson D. A. und Woods D. E. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesion. *Infect. Immun.* **59**, 2859-2863.

Barasch J. und al-Awqati Q. (1993) Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J. Cell Sci. Suppl.* **17**, 229-233.

Barbas C. F., Burton D. R., Scott J. K. und Silverman G. J. (2003) *Phage Display : A Laboratory Manual*, pp. 1-736. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Beachey E. H. (1981) Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J. Infect. Dis.* **143**, 325-345.

Benhar I. (2001) Biotechnological Applications of Phage and Cell Display. *Biotechnol. Adv.* **19**, 1-33.

Biacore (2003) <http://www.biacore.com/products/sensorchips/chipsa.lasso>.

Bos R., van der Mei H. C. und Busscher H. J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 179-230.

Boucher R. C. (1994a) Human airway ion transport. Part one. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 271-281.

Boucher R. C. (1994b) Human airway ion transport. Part two. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 581-593.

Boulanger P., Banoud J. und Descotes G. (1987) N-Allyloxycarbonyl derivatives of D-glucosamine as promoters of 1,2-trans-glucosylation in Koenigs-Knorr reaktionen and in Lewis acid catalyzed condensations *Can. J. Chem.* **65**, 1343-1346.

Bradley D. E. (1972) A study of pili on *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res. Camb.* 39-51.

Bradley S. (2003) Bacteriology 330 Lecture Topic: *Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin Department of Bacteriology. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/studentPseudomonaswww>

Bryan R., Kube D., Perez A., Davis P. und Prince A. (1998) Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 269-277.

C

Campbell A. P., Wong W. Y., Houston M., Jr., Schweizer F., Cachia P. J., Irvin R. T., Hindsgaul O., Hodges R. S. und Sykes B. D. (1997) Interaction of the receptor binding domains of *Pseudomonas aeruginosa* pili strains PAK, PAO, KB7 and P1 to a cross-reactive antibody and receptor analog: implications for synthetic vaccine design. *J. Mol. Biol.* **267**, 382-402.

Campbell A. P., Wong W. Y., Irvin R. T. und Sykes B. D. (2000) Interaction of a bacterially expressed peptide from the receptor binding domain of *Pseudomonas aeruginosa* pili strain PAK with a cross-reactive antibody: conformation of the bound peptide. *Biochemistry* **39**, 14847-14864.

Chen C. P., Song S. C., Gilboa-Garber N., Chang K. S. und Wu A. M. (1998) Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*
2. *Glycobiology* **8**, 7-16.

Cheng P. W., Boat T. F., Cranfill K., Yankaskas J. R. und Boucher R. C. (1989) Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **84**, 68-72.

Chi E., Mehl T., Nunn D. und Lory S. (1991) Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect. Immun.* **59**, 822-828.

Chmiel J. F und Davis P. B. (2003) State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir. Res.* **4**, 8-20.

Cioci G., Mitchell E. P., Gautier C., Wimmerova M., Sudakevitz D., Perez S., Gilboa-Garber N. und Imberty A. (2003) Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **555**, 297-301.

Collins J. (1997) Phage display, in *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity Volume 1* (Moos W. H., Pavia M. R., Kay B. K. und Ellington A. D., eds.), pp. 210-262. KLUWER/ESCOM, Dordrecht.

Comolli J. C., Waite L. L., Mostov K. E. und Engel J. N. (1999) Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **67**, 3207-3214.

Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T. und Lisanti M. P. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 6525-6533.

Coval K., Gayman T., Johnston J., Kinsey A., and Walsh A. S. (1999) 1999 Molecular Biology of Prokaryotes Term Paper Subjects and Teams: Quorum Sensing: Table of Contents.
<http://info.bio.cmu.edu/Courses/03441/TermPapers/99TermPapers/Quorum/>.

Crawford I., Maloney P. C., Zeitlin P. L., Guggino W. B., Hyde S. C., Turley H., Gatter K. C. und Harris A. (1991) Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 9262-9266.

Cunningham M. W und Fujinami R. S. (2004) *Molecular Mimicry, Microbes and Autoimmunity*, pp. 1-287. Amer Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.

Cystic Fibrosis Consortium (2004) Mutations listed on this CFTR mutation database. <http://genet.sickkids.on.ca/cftr/>.

D

Davidson M. W und Florida State University (2004) Bacteria Cell Structure. <http://microscopy.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>.

Davril M., Degroote S., Humbert P., Galabert C., Dumur V., Lafitte J. J., Lamblin G. und Roussel P. (1999) The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. *Glycobiology* **9**, 311-321.

Dawson K. P und Frossard P. M. (2000) A hypothesis regarding the origin and spread of the cystic fibrosis mutation deltaF508. *QJM*. **93**, 313-315.

de Bentzmann S., Plotkowski C. und Puchelle E. (1996a) Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, S155-S162.

de Bentzmann S., Roger P., Dupuit F., Bajolet-Laudinat O., Fuchey C., Plotkowski M. C. und Puchelle E. (1996b) Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 1582-1588.

de Bentzmann S., Roger P. und Puchelle E. (1996c) *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.* **9**, 2145-2150.

de Kievit T. R., Gillis R., Marx S., Brown C. und Iglewski B. H. (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1865-1873.

de Kievit T. R und Iglewski B. H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *Infect. Immun.* **68**, 4839-4849.

Debenham J., Rodebaugh R. und Fraser-Reid B. (1997) Recent Advances in N-Protection for Amino Sugar Synthesis. *Liebigs Ann. /Recueil* 791-802.

Debenham J. S., Debenham S. D. und Fraser-Reid B. (1996) N-Tetrachlorophthaloyl (TCP) for ready protection/deprotection of amino sugar glycosides. *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 1909-1918.

Dekany G., Bornaghi L., Papageorgiou J. und Taylor S. (2001) A novel amino protecting group: DTPM. *Tetrahedron Lett.* **42**, 3129-3132.

Deutsches Humangenomprojekt (2003) Fortschritte der somatischen Gentherapie am Beispiel der Mukoviszidose (Cystische Fibrose). http://www.dhgp.de/deutsch/info/FAQ/faqtext3_2_de.html.

Devlin J. J., Panganiban L. C. und Devlin P. E. (1990) Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**, 404-406.

Di Martino P., Rebiere-Huet J. und Hulen C. (2000) Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to A549 pneumocyte cells. *Chemotherapy* **46**, 129-134.

Doig P., Sastry P. A., Hodges R. S., Lee K. K., Paranchych W. und Irvin R. T. (1990) Inhibition of pilus-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells by monoclonal antibodies directed against pili. *Infect. Immun.* **58**, 124-130.

Doig P., Smith N. R., Todd T. und Irvin R. T. (1987) Characterization of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells. *Infect. Immun.* **55**, 1517-1522.

Dove A. (2001) The bittersweet promise of glycobiology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 913-917.

Drenkard E und Ausubel F. M. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**, 740-743.

E

Eckert D. M., Malashkevich V. N., Hong L. H., Carr P. A. und Kim P. S. (1999) Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **99**, 103-115.

Elkin S und Geddes D. (2003) Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **1**, 609-618.

Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B. und Gibson R. L. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **34**, 91-100.

Erickson D. L., Endersby R., Kirkham A., Stuber K., Vollman D. D., Rabin H. R., Mitchell I. und Storey D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **70**, 1783-1790.

Evans J., Lansley A. und Sanderson M. J. (2004) The regulation of airway ciliary beat frequency by calcium. http://users.umassmed.edu/michael.sanderson/mjslab/cilia_and_calcium_text.htm.

F

Fairbrother W. J., Christinger H. W., Cochran A. G., Fuh G., Keenan C. J., Quan C., Shriver S. K., Tom J. Y., Wells J. A. und Cunningham B. C. (1998) Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* **37**, 17754-17764.

Farber S. (1944) Pancreatic function and disease in early life. *Arch. Path.* **37**, 238-250.

Favre-Bonte S., Pache J. C., Robert J., Blanc D., Pechere J. C. und van Delden C. (2002) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients. *Microb. Pathog.* **32**, 143-147.

FitzGerald K. (2000) In vitro display technologies - new tools for drug discovery. *Drug Discov. Today* **5**, 253-258.

Folkhard W., Marvin D. A., Watts T. H. und Paranchych W. (1981) Structure of polar pili from *Pseudomonas aeruginosa* strains K and O. *J. Mol. Biol.* **149**, 79-93.

G

Gabriel S. E., Brigman K. N., Koller B. H., Boucher R. C. und Stutts M. J. (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* **266**, 107-109.

Gallati S. (2001) Molekulargenetische Grundlagen der Zystischen Fibrose. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **149**, 215-221.

Garber N., Guempel U., Belz A., Gilboa-Garber N. und Doyle R. J. (1992) On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**, 331-333.

- Garber N., Guempel U., Gilboa-Garber N. und Doyle R. J. (1987) Specificity of the fucose-binding lectin *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 331-334.
- Gehr P., Im Hof V., Geiser M. und Schürch S. (2000) Der mukoziliäre Apparat der Lunge- die Rolle des Surfactant. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **130**, 691-698.
- Gibson L. E und Cooke R. E. (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by electrophoresis. *Pediatrics* **23**, 545-549.
- Giebel L. B., Cass R. T., Milligan D. L., Young D. C., Arze R. und Johnson C. R. (1995) Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities. *Biochemistry* **34**, 15430-15435.
- Gilboa-Garber N., Avivhezer D. und Garber N. C. (1997) Bacterial Lectins: Properties, Structure, Effects, Functions and Applications, in *Glycosciences* (Gabius H.-J. G. S., ed.), pp. 369-394. Chapman & Hall, Weinheim.
- Gilboa-Garber N. (1988) *Pseudomonas aeruginosa* lectins as a model for lectin production, properties, applications and functions. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]* **270**, 3-15.
- Gilboa-Garber N., Katcoff D. J. und Garber N. C. (2000) Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 53-57.
- Gilboa-Garber N., Mizrahi L. und Garber N. (1977) Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Biochem.* **55**, 975-981.
- Gilboa-Garber N und Sudakevitz D. (1999) The hemagglutinating activities of *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL exhibit opposite temperature profiles due to different receptor types. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**, 365-369.
- Gilboa-Garber N., Sudakevitz D., Sheffi M., Sela R. und Levene C. (1994) PA-I and PA-II lectin interactions with the ABO(H) and P blood group glycosphingolipid antigens may contribute to the broad spectrum adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tissues in secondary infections. *Glycoconj. J.* **11**, 414-417.
- Gilligan P. H. (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 35-51.
- Glick J und Garber N. (1983) The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J. Gen. Microbiol.* **129 (Pt 10)**, 3085-3090.
- Glick M. C., Kothari V. A., Liu A., Stoykova L. I. und Scanlin T. F. (2001) Activity of fucosyltransferases and altered glycosylation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochimie* **83**, 743-747.
- Godwin T. A. (1995) Respiratory System. http://edcenter.med.cornell.edu/CUMC_PathNotes/Respiratory/Respiratory.html.
- Govan J. R und Deretic V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**, 539-574.
- Green N. M. (1990) Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* **184**, 51-67.
- Griesenbach U., Ferrari S., Geddes D. M. und Alton E. W. (2002) Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther.* **9**, 1344-1350.
- Guggino S. E. (1999) Evolution of the delta F508 CFTR mutation. *Trends Microbiol.* **7**, 55-56.

H

Hahn H., Lane-Bell P. M., Glasier L. M. G., Nomellini J. F. und Bingel W. H. (1997) Pilin-Based Anti-*Pseudomonas* Vaccines: Latest Developments and Perspectives. *Behring Inst.* **98**, 315-325.

Hahn H. P. (1997) The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**, 99-108.

Hancock R. E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **27 Suppl 1**, S93-S99.

Hancock R. E und Speert D. P. (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Updat.* **3**, 247-255.

Hart C. A und Winstanley C. (2002) Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children. *Br. Med. Bull.* **61**, 81-96.

Hassid S., Choufani G., Decaestecker C., Delbrouck C., Dawance S., Pelc P., Nagy N., Kaltner H., Salmon I., Danguy A., Gabius H. J. und Kiss R. (2000) Glycohistochemical characteristics of nasal polyps from patients with and without cystic fibrosis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **126**, 769-776.

Hazes B., Sastry P. A., Hayakawa K., Read R. J. und Irvin R. T. (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J. Mol. Biol.* **299**, 1005-1017.

Healy J. M., Murayama O., Maeda T., Yoshino K., Sekiguchi K. und Kikuchi M. (1995) Peptide ligands for integrin alpha v beta 3 selected from random phage display libraries. *Biochemistry* **34**, 3948-3955.

Helmkamp G. M. (2000) Cystic Fibrosis. www.kumc.edu/research/medicine/biochemistry/bioc800/CysticGrp/CF-2000.html 1-19.

HEXAL AG (2003) Mukoviszidose. <http://www.mukoviszidose.de>.

Hirche T. O., Smaczny C., von Mallinckrodt C., Krüger S. und Wagner T. O. F. (2003) Pulmonale Manifestation der Mukoviszidose im Erwachsenenalter. *Deutsches Ärzteblatt* **100**, A264-A270.

Hoess R., Brinkmann U., Handel T. und Pastan I. (1993) Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene* **128**, 43-49.

Homola J. (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 528-539.

Hruby V. C. (2001) Design in Topographical Space of Peptide and Peptidomimetic Ligands that Affect Behavior. A Chemist's Glimpse at the Mind-Body Problem. *Acc. Chem. Res.* **34**, 389-397.

Hruby V. J., Li G., Haskell-Luevano C. und Shenderovich M. (1998) Design of peptides, proteins, and peptidomimetics in chi space. *Biopolymers* **43**, 219-266.

I

Iglewski B. H. (1996) SECTION I BACTERIOLOGY *Pseudomonas*, in *Medical Microbiology* (The University of Texas Medical Branch at Galveston, ed.), pp. 1-8. Baron, S., Galveston.

Imoto M., Yoshimura H., Shimamoto T., Sakaguchi N., Kusumoto S. und Shiba T. (1987) Total synthesis of *Escherichia coli* lipid A, the endotoxically active principle of cell-surface lipopolysaccharide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 2205-2214.

Imundo L., Barasch J., Prince A. und al-Awqati Q. (1995) Cystic Fibrosis Epithelial Cells have a Receptor for Pathogenic Bacteria on their Apical Surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 3019-3023.

Irvin R. T. (1993) Attachment and Colonization of *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the Surface Structure, in *Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen* (Campa M. et al., eds.), pp. 19-42. Plenum Press, New York.

Ishikawa D und Taki T. (1998) [Preparation of glyco-replica peptides which mimic functional roles of carbohydrates by using phage-displayed peptide library]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **43**, 2611-2617.

J

Johnsen L. G. (2001) Retroviral Approaches to Gene Therapy of Cystic Fibrosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **953**, 43-52.

Johnson M. A und Pinto B. M. (2002) Molecular Mimicry of Carbohydrates by Peptides. *Aust. J. Chem.* **55**, 13-25.

Jones D. H., Hodges R. S., Barber K. R. und Grant C. W. (1997) Pilin C-terminal peptide binds asialo-GM1 in liposomes: a 2H-NMR study. *Protein Sci.* **6**, 2459-2461.

K

Kanthakumar K., Taylor G. W., Cundell D. R., Dowling R. B., Johnson M., Cole P. J. und Wilson R. (1996) The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. *Pulm. Pharmacol.* **9**, 223-230.

Karaveg K., Liu Z. J., Tempel W., Doyle R. J., Rose J. P. und Wang B. C. (2003) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of lectin-I from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 1241-1242.

Katz B. A. (1997) Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 27-45.

Kay B. K., Kurakin A. V. und Hyde-DeRuyscher R. (1998) From peptides to drugs via phage display. *Drug Discov. Today* **3**, 370-378.

Keizer D. W., Slupsky C. M., Kalisiak M., Campbell P., Crump M. P., Sastry P. A., Hazes B., Irvin R. T. und Sykes B. D. (2001) Structure of a Pilin Monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for the assembly of pili. *J. Biol. Chem.* **276**, 24186-24193

Kerem B. S., Rommens J. M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T. K., Chakravarti A., Buchwald M. und Tsui L. C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073-1080.

Khan A. S., Kniep B., Oelschlaeger T. A., Van D., I, Korhonen T. und Hacker J. (2000) Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**, 3541-3547.

Kihlberg J. O., Leigh D. A. und Bundle D. R. (1990) The in situ activation of thioglycosides with bromine: An improved glycosylation method. *J. Org. Chem.* **55**, 2860-2863.

Kirkeby S und Hoyer P. E. (1999) Binding properties of the galactose-detecting lectin *Pseudomonas aeruginosa* agglutinin (PA-IL) to skeletal muscle fibres. Quantitative precipitation and precipitation inhibition assays. *Histochem. J.* **31**, 485-493.

Knowles M., Stutts M. J., Yankaskas J. R., Gatz J. T. und Boucher R. C. (1996) Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Clin. Chest Med.* **7**, 285-297.

Koch C und Hoiby N. (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* **341**, 1065-1069.

Koivunen E., Arap W., Rajotte D., Lahdenranta J. und Pasqualini R. (1999) Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J. Nucl. Med.* **40**, 883-888.

Koivunen E., Gay D. A. und Ruoslahti E. (1993) Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. *J. Biol. Chem.* **268**, 20205-20210.

Krivan H. C., Roberts D. D. und Ginsburg V. (1988) Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 6157-6161.

Kube D., Adams L., Perez A. und Davis P. B. (2001) Terminal sialylation is altered in airway cells with impaired CFTR- mediated chloride transport. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **280**, L482-L492.

L

Lee K. K., Sheth H. B., Wong W. Y., Sherburne R., Paranchych W., Hodges R. S., Lingwood C. A., Krivan H. und Irvin R. T. (1994) The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol. Microbiol.* **11**, 705-713.

Lemieux R. U., Takeda T. und Chung B. Y. (1976) Synthetic methods for carbohydrates. *ACS Symp. Ser.* **39**, 90-117.

Leutz M und Sybrecht G. W. (2001) Mukoviszidose, in *Thiemes Innere Medizin (TIM)* pp. 1495-1502. Georg Thieme Verlag, Stuttgart • New York.

Lingwood C. A., Cheng M., Krivan H. C. und Woods D. (1991) Glycolipid receptor binding specificity of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 1076-1081.

Livermore D. M. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34**, 634-640.

Loris R., Tielker D., Jaeger K. E. und Wyns L. (2003) Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **331**, 861-870.

M

Maeder T. (2002) Sweet medicines. *Sci. Am.* **287**, 40-47.

McConnell S. J., Dinh T., Le M. H. und Spinella D. G. (1999) Biopanning phage display libraries using magnetic beads vs. polystyrene plates. *Biotechniques* **26**, 208-10, 214.

Mendicino J und Sangadala S. (1999) Synthesis of sulfated oligosaccharides by cystic fibrosis trachea epithelial cells. *Mol. Cell Biochem.* **201**, 141-149.

Miszkiel K. A., Wells A. U., Rubens M. B., Cole P. J. und Hansell D. M. (1997) Effects of airway infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a computed tomographic study. *Thorax* **52**, 260-264.

Mitchell E., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M., Gautier C., Perez S., Wu A. M., Gilboa-Garber N. und Imberty A. (2002) Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 918-921.

Monzavi-Karbassi B., Cunto-Amesty G., Luo P., Shamloo S., Blaszczyk-Thurin M. und Kieber-Emmons T. (2001) Immunization with a carbohydrate mimicking peptide augments tumor- specific cellular responses. *Int. Immunol.* **13**, 1361-1371.

Monzavi-Karbassi B und Kieber-Emmons T. (2001) Current Concepts in Cancer Vaccine Strategies. *Biotechniques* **30**, 170-189.

Morales M. M., Capella M. A. und Lopes A. G. (1999) Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 1021-1028.

N

Nieuw Amerongen A. V., Bolscher J. G., Bloemena E. und Veerman E. C. (1998) Sulfomucins in the human body. *Biol. Chem.* **379**, 1-18.

O

O I., Kieber-Emmons T., Otvos L. und Blaszczyk-Thurin M. (2000) Peptide mimicking sialyl-Lewis(a) with anti-inflammatory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 106-111.

Oldenburg K. R., Loganathan D., Goldstein I. J., Schultz P. G. und Gallop M. A. (1992) Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5393-5397.

P

Parachych W. P., Palsoke B. L. und Sastry P. A. (1990) Expression and Assembly of *Pseudomonas aeruginosa* N-Methylphenylalanine Pilin, in *Pseudomonas Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology* (Silver S., Chakrabarty A. M., Iglewski B., and Kaplan S., eds.), pp. 343-351. American Society for Microbiology, Washington DC 20005.

Paranchych W., Sastry P. A., Frost L. S., Carpenter M., Armstrong G. D. und Watts T. H. (1979) Biochemical studies on pili isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *Can. J. Microbiol.* **25**, 1175-1181.

Paranchych W., Sastry P. A., Volpel K., Loh B. A. und Speert D. P. (1986) Fimbriae (pili): molecular basis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence. *Clin. Invest. Med.* **9**, 113-118.

Parge H. E., Forest K. T., Hickey M. J., Christensen D. A., Getzoff E. D. und Tainer J. A. (1995) Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**, 32-38.

Parmley S. F und Smith G. P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318.

Parsek M. R und Greenberg E. P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8789-8793.

Pasqualini R., Arap W., Rajotte D. und Ruoslahti E. (2003) In Vivo Selection of Phage-display Libraries, in *Phage Display : A Laboratory Manual* (Barbas C. F., Burton D. R., Scott J. K. und Silverman G. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Paul K., Ratjen F. und Schuster A. (2001) Pulmonale Manifestation der Zystischen Fibrose. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **149**, 222-238.

Pearson J. P., Feldman M., Iglewski B. H. und Prince A. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* **68**, 4331-4334.

Pesci E. C., Milbank J. B., Pearson J. P., McKnight S., Kende A. S., Greenberg E. P. und Iglewski B. H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11229-11234.

Pier G. B. (1985) Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* **151**, 575-580.

Pier G. B. (1999) Evolution of the delta F508 CFTR mutation: Response. *Trends Microbiol.* **7**, 56-58.

Pier G. B., Grout M., Zaidi T., Meluleni G., Mueschenborn S. S., Banting G., Ratcliff R., Evans M. J. und Colledge W. H. (1998) Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393:79-82**, 79-82.

Pilewski J. M und Frizzell R. A. (1999) Role of CFTR in airway disease. *Physiol. Rev.* **79**, S215-S255.

Q/R

Ramanujam P., Tan W. S., Nathan S. und Yusoff K. (2002) Novel peptides that inhibit the propagation of Newcastle disease virus. *Arch. Virol.* **147**, 981-983.

Ramphal R und Pier G. B. (1985) Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect. Immun.* **47**, 1-4.

Ramphal R und Vishwanath S. (1987) Why is *Pseudomonas* the colonizer and why does it persist? *Infection* **15**, 281-287.

Rautiainen M., Matsune S., Shima S., Sakamoto K., Hanamura Y. und Ohyama M. (1992) Ciliary beat of cultured human respiratory cells studied with differential interference microscope and high speed video system. *Acta Otolaryngol.* **112**, 845-851.

Rautiainen M., Matsune S., Yoshitsugu M. und Ohyama M. (1993) Degeneration of human respiratory cell ciliary beat in monolayer cell cultures. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **250**, 97-100.

Rhee C. S., Min Y. G., Lee C. H., Kwon T. Y., Lee C. H., Yi W. J. und Park K. S. (2001) Ciliary beat frequency in cultured human nasal epithelial cells. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **110**, 1011-1016.

Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N. und Chou J. L. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.

Rodi D. J und Makowski L. (1999) Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 87-93.

Rommens J. M., Iannuzzi M. C., Kerem B., Drumm M. L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J. L., Kennedy D., Hidaka N. und et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059-1065.

Rubin B. K. (1999) Emerging Therapies for Cystic Fibrosis Lung Disease. *Chest* **115**, 1120-1126.

Rückes-Nilges C., Weber U., Popp C., Fryen A., Klimek T., Glanz H. und Lindemann H. (1999) Ionentransporte über die Nasen- und Nasennebenhöhlenschleimhaut bei Mukoviszidose und chronischer Sinusitis. *HNO* **47**, 157-166.

Ryu D. D und Nam D. H. (2000) Recent progress in biomolecular engineering. *Biotechnol. Prog.* **16**, 2-16.

S

Saiman L und Prince A. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest* **92**, 1875-1880.

Salathe M und Bookman R. J. (1995) Coupling of $[Ca^{2+}]_i$ and ciliary beating in cultured tracheal epithelial cells. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 2)**, 431-440.

Salvatore F., Scudierom O. und Castaldo G. (2002) Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am. J. Med. Genet.* **111**, 88-95.

Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sanderson M. J., Lansley A. B. und Dirksen E. R. (1992) Regulation of ciliary beat frequency in respiratory tract cells. *Chest* **101**, 69S-71S.
- Scanlin T. F und Glick M. C. (1999) Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**, 241-253.
- Scharfman A., Arora S. K., Delmotte P., Van Brussel E., Mazurier J., Ramphal R. und Roussel P. (2001) Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **69**, 5243-5248.
- Scharfman A., Van Brussel E., Houdret N., Lamblin G. und Roussel P. (1996) Interactions between glycoconjugates from human respiratory airways and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, S163-S169.
- Schneider E. (2000) ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chem. unserer Zeit* **34**, 90-98.
- Schroeder T. H., Zaidi T. und Pier G. B. (2001) Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infect. Immun.* **69**, 719-729.
- Schulze C. (2000) Analysing biomolecular interaktions: The surface plasmon resonance technique. *Recent Res. Devel. Comparative Biochem. & Physiol.* **1**, 77-90.
- Schumacher T. N. M., Mayr L. M., Minor D. L., Jr., Milhollen M. A., Burgess M. W. und Kim P. S. (1996) Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science* **271**, 1854-1857.
- Schweizer F., Jiao H., Hindsgaul O., Wong W. Y. und Irvin R. T. (1998) Interaction between the pili of *Pseudomonas aeruginosa* PAK and its carbohydrate receptor beta-D-GalNAc(1-->4)beta-D-Gal analogs. *Can. J. Microbiol.* **44**, 307-311.
- Schwiebert E. M., Benos D. J., Egan M. E., Stutts M. J. und Guggino W. B. (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, 145-166.
- Scott J. K., Loganathan D., Easley R. B., Gong X. und Goldstein I. J. (1992) A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5398-5402.
- Sears P und Wong C. H. (1999) Carbohydrate Mimetics: A New Strategy for Tackling the Problem of Carbohydrate-Mediated Biological Recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2300-2324.
- Seebach D und Rueping M. (2003) Neue Molekül-Welten mit beta-PEPTIDEN. *Bulletin Der Eidgenössische Technische Hochschule Zürich* **282**, 18-21.
- Sheppard D. N und Welsh M. J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23-S45.
- Sheth H. B., Lee K. K., Wong W. Y., Srivastava G., Hindsgaul O., Hodges R. S., Paranchych W. und Irvin R. T. (1994) The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Mol. Microbiol.* **11**, 715-723.
- Simon-Haldi M., Mantei N., Franke J., Voshol H. und Schachner M. (2002) Identification of a peptide mimic of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope. *J. Neurochem.* **83**, 1380-1388.
- Singh L und Seifert J. (2001) Application of novel, N-DTPM protected D-glucosamine building blocks in oligosaccharides synthesis. *Tetrahedron Lett.* **42**, 3133-3136.
- Smith G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1217.

- Smith G. P und Petrenko V. A. (1997) Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391-410.
- Smith G. P und Scott J. K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217**, 228-257.
- Smith H. (1984) The biochemical challenge of microbial pathogenicity. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 395-404.
- Smith R. S., Harris S. G., Phipps R. und Iglewski B. (2002) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J. Bacteriol.* **184**, 1132-1139.
- Soto G. E und Hultgren S. J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* **181**, 1059-1071.
- Steuer M. K., Herbst H., Beuth J., Steuer M., Pulverer G. und Matthias R. (1993) Hemmung der bakteriellen Adhäsion durch Lectinblockade bei durch *Pseudomonas aeruginosa* induzierter Otitis externa im Vergleich zur lokalen Therapie mit Antibiotika. *Otorhinolaryngol. Nova* **3**, 19-25
- Strom M. S., Nunn D. N. und Lory S. (1994) Posttranslational processing of type IV prepilin and homologs by PilD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol.* **235**, 527-540.
- Stuhrmann M., von der Hardt H. und Fabel H. (1999) Mukoviszidose Auch eine Erkrankung des Erwachsenenalters? *Der Internist* **40**, 476-485.
- Sudakevitz D und Gilboa-Garber N. (1982) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* lectins on phagocytosis of Escherichia coli strains by human polymorphonuclear leucocytes. *Microbios.* **34**, 159-166.
- Szabo A., Stolz L. und Granzow R. (1995) Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 699-705.
- T**
- Taki T und Ishikawa D. (1999) Biocombinatorial Chemistry, a Novel Approach Using Phage-Displayed Libraries in Glycobiology-Special Reference to Glyco-Replica-Peptides-. *Trends Glycosci. Glyc.* **11**, 277-285.
- Tatterson L. E., Poschet J. F., Firoved A., Skidmore J. und Deretic V. (2001) CFTR and *pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Front. Biosci.* **6**, D890-D897.
- The Cystic Fibrosis Foundation (2003) What Is CF. http://www.cff.org/about_cf/what_is_cf.cfm.
- Tielker D. (2002) Klonierung, Überexpression und Reinigung der Lectine Lec1 (PA2570) und Lec2 (PA3361) aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Thesis/Dissertation*.
- Trout L., King M., Feng W., Inglis S. K. und Ballard S. T. (1998) Inhibition of airway liquid secretion and its effect on the physical properties of airway mucus. *Am. J. Physiol.* **274**, L258-L263.
- Tsui L. C., Buchwald M., Barker D., Braman J. C., Knowlton R., Schumm J. W., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavsic N. und et al. (1985) Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* **230**, 1054-1057.
- Tsui L. C und Durie P. (1997) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp. Pract.* **32**, 115-118.
- Tummler B., Storrs T., Dziadek V., Dork T., Meitinger T., Golla A., Bertele-Harms R. M., Harms H. K., Schroder E., Claass A., Rutjes J., Schneppenheim R., Bauer I., Breuel K., Stuhrmann M., Schmidtke J., Lindner M., Eigel A., Horst J., Kaiser R., Lentze M. J., Schmidt K., von der H. H. und Estivill X. (1996) Geographic distribution and origin of CFTR mutations in Germany. *Hum. Genet.* **97**, 727-731.

Tutas E. (1998) Mukoviszidose Hausarbeit zum Seminar "Chronische Krankheiten" (PD Dr. Gerd Hansen) im Sommersemester 1998. *people.freenet.de/tutas/Mukoviszidose.pdf*.

U/V

van Delden C und Iglewski B. H. (1998) Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 551-560.

von Bismarck P., Schneppenheim R. und Schumacher U. (2001) Successful treatment of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection with a sugar solution - a case report on a lectin based therapeutic principle. *Klinische Pädiatrie* **213**, 285-287.

W

Wainwright B. J., Scambler P. J., Schmidtke J., Watson E. A., Law H. Y., Farrall M., Cooke H. J., Eiberg H. und Williamson R. (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* **318**, 384-385.

Warner J. (1992) Immunology of cystic fibrosis. *Br. Med. Bull.* **48**, 893-911.

Watkins W. M und Morgan W. T. (1976) Immunochemical observations on the human blood group P system. *J. Immunogenet.* **3**, 15-27.

Watts T. H., Sastry P. A., Hodges R. S. und Paranchych W. (1983) Mapping of the antigenic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* PAK polar pili. *Infect. Immun.* **42**, 113-121.

Welford K. (1991) Surface plasmon-polaritons and their uses. *Opt. Quant. Electronics* **23**, 1-27.

Welsh M. J und Smith A. E. (1995) Cystic fibrosis. *Sci. Am.* **273**, 52-59.

Wentworth J. S., Austin F. E., Garber N., Gilboa-Garber N., Paterson C. A. und Doyle R. J. (1991) Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* **4**, 99-104.

White R., Woodward S., Leppert M., O'Connell P., Hoff M., Herbst J., Lalouel J. M., Dean M. und Vande Woude G. (1985) A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* **318**, 382-384.

Wilson R und Dowling R. B. (1998) Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* **53**, 213-219.

Wine J. J. (1999) The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**, 309-312.

Winzer K., Falconer C., Garber N. C., Diggle S. P., Camara M. und Williams P. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**, 6401-6411.

Wong W. Y., Campbell A. P., McInnes C., Sykes B. D., Paranchych W., Irvin R. T. und Hodges R. S. (1995) Structure-function analysis of the adherence-binding domain on the pilin of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and KB7. *Biochemistry* **34**, 12963-12972.

Wood R. E., Boat T. F. und Doershuk C. F. (1976) Cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **113**, 833-878.

Woods D. E und Sokol P. A. (1986) Role of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular enzymes in lung disease. *Clin. Invest. Med.* **9**, 108-112.

X/Y

Yoshitsugu M., Hanamure Y., Furuta S., Deguchi K., Ueno K. und Rautiainen M. (1994) Ciliary motility and surface morphology of cultured human respiratory epithelial cells during ciliogenesis. *Biol. Cell.* **82**, 211-216.

Yu H., Hanes M., Chrisp C. E., Boucher J. C. und Deretic V. (1998) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: pulmonary clearance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and inflammation in a mouse model of repeated respiratory challenge. *Infect. Immun.* **66**, 280-288.

Yu L., Lee K. K., Paranchych W., Hodges R. S. und Irvin R. T. (1996) Use of synthetic peptides to confirm that the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilus adhesin and the *Candida albicans* fimbrial adhesin possess a homologous receptor-binding domain. *Mol. Microbiol.* **19**, 1107-1116.

Z

Zhan J., Xia Z., Xu L., Yan Z. und Wang K. (2003) A peptide mimetic of Gal-alpha 1,3-Gal is able to block human natural antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 19-22.

Ziebell M. R., Zhao Z. G., Luo B., Luo Y., Turley E. A. und Prestwich G. D. (2001) Peptides that mimic glycosaminoglycans: high-affinity ligands for a hyaluronan binding domain. *Chem. Biol.* **8**, 1081-1094.

Zink I. S und Zabransky S. (2000) IRT-Bestimmung in Vollblutproben getrocknet auf Filterpapier als Suchtest auf Cystische Fibrose. *Screening Journal* 1-14.

Zwick M. B., Shen J. und Scott J. K. (1998) Phage-displayed peptide libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 427-436.

10 Anhang

10.1 Tabellarischer Anhang

Daten zur Abbildung 13: Bindung der Phagen an adsorbiertes Lectin PA-I und BSA.

Abbildung (a): Bindung des Phagens SHLDPTLFPLYK an adsorbiertes Lectin PA-I und BSA.

Phage, Sequenz SHLDPTLFPLYK [pfu/ml]	1,9 E+04	7,6 E+04	3,1 E+05	1,2 E+06	4,9 E+06	2,0 E+07	7,8 E+07	3,1 E+08	1,3 E+09	5,0 E+09
Bindung der Phagen an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	0,066 0,067	0,088 0,092	0,156 0,163	0,408 0,441	0,945 0,996	1,505 1,484	1,596 1,619	1,492 1,635	1,636 1,588	1,541 1,395
Mittelwert Absorption 405 nm	0,067	0,090	0,160	0,425	0,971	1,495	1,608	1,564	1,612	1,468
Standardabweichung	0,001	0,002	0,004	0,017	0,026	0,011	0,012	0,072	0,024	0,073
Bindung der Phagen an BSA	0,078 0,068	0,071 0,067	0,073 0,066	0,077 0,069	0,074 0,074	0,074 0,07	0,085 0,077	0,099 0,094	0,14 0,137	0,378 0,429
Mittelwert Absorption 405 nm	0,073	0,069	0,070	0,073	0,074	0,072	0,081	0,097	0,139	0,404
Standardabweichung	0,005	0,002	0,003	0,004	0,000	0,002	0,004	0,002	0,001	0,026

Abbildung (b): Bindung des Phagens SHLDPLSFPRWS an adsorbiertes Lectin PA-I und BSA.

Phage, Sequenz SHLDPLSFPRWS [pfu/ml]	1,9 E+04	7,6 E+04	3,1 E+05	1,2 E+06	4,9 E+06	2,0 E+07	7,8 E+07	3,1 E+08	1,3 E+09	5,0 E+09
Bindung der Phagen an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	0,059 0,066	0,06 0,063	0,06 0,063	0,066 0,068	0,07 0,08	0,085 0,016	0,181 0,056	1,068 1,308	1,521 1,485	1,597 1,597
Mittelwert Absorption 405 nm	0,063	0,062	0,062	0,067	0,075	0,050	0,118	1,188	1,503	1,597
Standardabweichung	0,004	0,002	0,002	0,001	0,005	0,035	0,063	0,120	0,018	0,000
Bindung der Phagen an BSA	0,067 0,068	0,066 0,068	0,066 0,066	0,071 0,073	0,071 0,075	0,075 0,075	0,083 0,09	0,118 0,104	0,182 0,136	0,536 0,401
Mittelwert Absorption 405 nm	0,068	0,067	0,066	0,072	0,073	0,075	0,087	0,111	0,159	0,469
Standardabweichung	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,000	0,004	0,007	0,023	0,068

Abbildung (c): Bindung des Phagens CIWTPTLFPLYK an adsorbiertes Lectin PA-I und BSA.

Phage, Sequenz CIWTPTLFPLYK [pfu/ml]	1,9 E+04	7,6 E+04	3,1 E+05	1,2 E+06	4,9 E+06	2,0 E+07	7,8 E+07	3,1 E+08	1,3 E+09	5,0 E+09
Bindung der Phagen an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	0,067 0,070	0,078 0,083	0,131 0,145	0,331 0,386	0,841 0,895	1,366 1,398	1,563 1,569	1,577 1,513	1,560 1,571	1,498 1,337
Mittelwert Absorption 405 nm	0,069	0,081	0,138	0,359	0,868	1,382	1,566	1,545	1,566	1,418
Standardabweichung	0,001	0,003	0,007	0,027	0,027	0,016	0,003	0,032	0,005	0,081
Bindung der Phagen an BSA	0,067 0,072	0,071 0,073	0,073 0,074	0,073 0,078	0,079 0,089	0,076 0,086	0,079 0,096	0,110 0,123	0,260 0,177	0,437 0,521
Mittelwert Absorption 405 nm	0,070	0,072	0,074	0,076	0,084	0,081	0,088	0,117	0,219	0,479
Standardabweichung	0,002	0,001	0,001	0,003	0,005	0,005	0,009	0,007	0,042	0,042

**Daten zur Abbildung 14: Phagen-Bindung an adsorbiertes Lectin PA-I und
Kompetition der Bindung durch Saccharide.**

Phage, Sequenz SHLDPTLFPLYK [pfu/ml]	5,00 E+09	1,25 E+09	3,13 E+08	7,81 E+07	1,95 E+07	4,88 E+06	1,22 E+06	3,05 E+05	7,63 E+04	1,91 E+04
Phagen-Bindung an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I mit Phenyl- β - D-galactopyranosid Lösung [10 mM] Inkubation	2,188	2,6	1,856	0,872	0,301	0,123	0,084	0,072	0,076	0,075
	2,084	2,231	1,844	0,866	0,363	0,136	0,085	0,081	0,08	0,084
Mittelwert Absorption 405 nm	0,063	0,062	0,062	0,067	0,075	0,050	0,118	1,188	1,503	1,597
Standardabweichung	0,004	0,002	0,002	0,001	0,005	0,035	0,063	0,120	0,018	0,000
Bindung der Phagen an BSA	0,067	0,066	0,066	0,071	0,071	0,075	0,083	0,118	0,182	0,536
	0,068	0,068	0,066	0,073	0,075	0,075	0,09	0,104	0,136	0,401
Mittelwert Absorption 405 nm	0,068	0,067	0,066	0,072	0,073	0,075	0,087	0,111	0,159	0,469
Standardabweichung	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,000	0,004	0,007	0,023	0,068
Phage, Sequenz SHLDPTLFPLYK [pfu/ml]	5,00 E+09	1,25 E+09	3,13 E+08	7,81 E+07	1,95 E+07	4,88 E+06	1,22 E+06	3,05 E+05	7,63 E+04	1,91 E+04
Phagen-Bindung an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I mit Phenyl- β - D-glucopyranosid Lösung [10 mM] Inkubation	2,123	2,263	2,154	2,098	1,669	0,67	0,228	0,102	0,087	0,084
	2,128	2,47	2,181	2,069	1,855	0,737	0,292	0,124	0,089	0,087
Mittelwert Absorption 405 nm	2,126	2,367	2,168	2,084	1,762	0,704	0,260	0,113	0,088	0,086
Standardabweichung	0,004	0,146	0,019	0,021	0,132	0,047	0,045	0,016	0,001	0,002
Bindung der Phagen an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	2,146	2,297	2,149	2,088	1,79	0,748	0,305	0,131	0,097	0,086
	2,113	2,279	2,134	2,134	1,86	0,732	0,325	0,127	0,09	0,088
Mittelwert Absorption 405 nm	2,130	2,288	2,142	2,111	1,825	0,740	0,315	0,129	0,094	0,087
Standardabweichung	0,023	0,013	0,011	0,033	0,049	0,011	0,014	0,003	0,005	0,001
Bindung der Phagen an BSA	0,181	0,122	0,083	0,079	0,089	0,075	0,077	0,084	0,077	0,084
	0,176	0,176	0,089	0,088	0,088	0,077	0,088	0,082	0,094	0,081
Mittelwert Absorption 405 nm	0,179	0,149	0,086	0,084	0,089	0,076	0,083	0,083	0,086	0,083
Standardabweichung	0,004	0,038	0,004	0,006	0,001	0,001	0,008	0,001	0,012	0,002

Daten zur Abbildung 15: Inhibition der Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an adsorbiertes Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste.

Konzentration [μM]	97,66	24,41	6,10	1,53			
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I an das Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste mit Phenyl-β-D-galactopyranosid	0,728	1,246	1,256	1,858			
	0,61	1,21	1,388	1,652			
Mittelwert Absorption 405 nm	0,669	1,228	1,322	1,755			
Standardabweichung	0,083	0,025	0,093	0,146			
Konzentration [μM]	62.5	15,63	3,91				
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I an das Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste mit synthetischem Peptid SHLDPTLFPLYKG	1,681	1,559	1,582				
	1,178	1,557	1,859				
Mittelwert Absorption 405 nm	1,430	1,558	1,721				
Standardabweichung	0,356	0,001	0,196				
Konzentration [μM]	62.5	15,63	3,91				
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I an das Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste mit synthetischem Peptid TLLPHDYPLFKSG	1,658	1,427	1,889				
	1,684	1,679	1,793				
Mittelwert Absorption 405 nm	1,671	1,553	1,841				
Standardabweichung	0,018	0,178	0,068				
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I an das Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydatidenzyste	1,854	1,534	1,482	1,738	1,382	1,489	
	1,565	1,464	2,057	2,036	1,937	1,99	
	2,015	1,615	1,665	1,593	1,369	1,386	
	1,48	1,418	1,865	2,072	2,093	1,751	
Mittelwert Absorption 405 nm	1,702						
Standardabweichung	0.254						

Daten zur Abbildung 16: Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an adsorbiertes Glycoprotein P1 und ~20-mer Peptid-BSA-Konjugate.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	98	3,27 E+01	1,09 E+01	3,63 E+00	1,21 E+00	4,03 E-01	1,34 E-01
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0.125 $\mu\text{g/Well}$] an ~20-mer (SHLDPTLFPLYKGC)-BSA-Konjugat	1,935 2,044	1,98 1,737	1,673 2,41	1,901 2,172	1,986 2,406	0,774 0,671	0,175 0,278
Mittelwert Absorption 405 nm	1,990	1,859	2,042	2,037	2,196	0,723	0,227
Standardabweichung	0,077	0,172	0,521	0,192	0,297	0,073	0,073
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0.125 $\mu\text{g/Well}$] an ~20-mer (TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugat	0,079 0,087	0,085 0,086	0,082 0,129	0,081 0,085	0,08 0,083	0,081 0,085	0,085 0,128
Mittelwert Absorption 405 nm	0,083	0,086	0,106	0,083	0,082	0,083	0,107
Standardabweichung	0,006	0,001	0,033	0,003	0,002	0,003	0,030
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0.125 $\mu\text{g/Well}$] an Glycoprotein P1 aus Schaf-Hydaticenzyste	0,931 0,992	0,847 0,509	0,374 0,471	0,204 0,207	0,118 0,155	0,101 0,114	0,108 0,125
Mittelwert Absorption 405 nm	0,962	0,678	0,423	0,206	0,137	0,108	0,117
Standardabweichung	0,043	0,239	0,069	0,002	0,026	0,009	0,012
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0.125 $\mu\text{g/Well}$] an BSA	0,08 0,092	0,073 0,09	0,071 0,155	0,073 0,093	0,075 0,097	0,079 0,127	0,097 0,159
Mittelwert Absorption 405 nm	0,086	0,0815	0,113	0,083	0,086	0,103	0,128
Standardabweichung	0,008	0,012	0,059	0,014	0,016	0,034	0,044

Daten zur Abbildung 17: Inhibition der Bindung des biotinylierten *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-I an adsorbiertes ~20-mer-BSA-Konjugat des Peptides SHLDPTLFPLYK**GC durch Phenyl- β -D-galactopyranosid.**

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	4,17 E+02	1,39 E+02	4,63 E+01	1,54 E+01	5,15 E+00	1,72 E+00	5,72 E-01	1,91 E-01
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0,125 $\mu\text{g/Well}$] an ~20-mer (SHLD PTLFPLYK GC)-BSA-Konjugat	1,911	1,903	1,843	1,48	1,205	0,924	0,216	0,139
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0,125 $\mu\text{g/Well}$] an ~20-mer (SHLD PTLFPLYK GC)-BSA-Konjugat mit Phenyl- β -D-galactopyranosid	0,074	0,076	0,081	0,077	0,074	0,073	0,072	0,074
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0,125 $\mu\text{g/Well}$] an ~20-mer (TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugat	0,074	0,075	0,082	0,076	0,074	0,081	0,075	0,07
Bindung des biotinylierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectins PA-I [0,125 $\mu\text{g/Well}$] an BSA	0,069	0,075	0,074	0,072	0,07	0,076	0,07	0,067

Daten zur Abbildung 18: Inhibition der Bindung von biotinylierten Bakterien des *Pseudomonas aeruginosa*-Stamms ATCC 53308 an A549 menschliche Lungenkarzinomzellen.

Konzentration	100 [mM]	97,66 [μM]	73,25 [μM]	48,83 [μM]	36,63 [μM]	18,31 [μM]
Bindung der biotinylierten Bakterien an A549-Zellen mit Phenyl-β-D-galactopyranosid	0,602	0,851		1,026		
	0,594	0,844		1,004		
	0,656	0,827		0,941		
	0,562	0,847		0,923		
Mittelwert Absorption 405 nm	0,604	0,842		0,974		
Standardabweichung	0,039	0,011		0,049		
Bindung der biotinylierten Bakterien an A549-Zellen mit ~10-mer Peptid-(SHL DPTLFPLYKGC)-BSA-Konjugat-Verdünnungen			0,485		0,778	0,725
			0,684		0,707	0,707
			0,585		0,743	0,716
Mittelwert Absorption 405 nm			0,585		0,743	0,716
Standardabweichung			0,141		0,050	0,013
Bindung der biotinylierten Bakterien an A549-Zellen mit ~10-mer Peptid-(TLLPHDYPLFKSGC)-BSA-Konjugat-Verdünnungen mit willkürlicher Aminosäuresequenz			0,724		0,668	0,781
			0,563		0,69	0,92
			0,644		0,679	0,851
Mittelwert Absorption 405 nm			0,644		0,679	0,851
Standardabweichung			0,114		0,016	0,098
Bindung der biotinylierten Bakterien an A549-Zellen	0,83	0,795	0,777	0,771	0,809	0,725
	0,845	0,887	0,789	0,788	0,815	0,785
	0,786	0,748	0,674	0,754	0,796	0,836
	0,828	0,83	0,839	0,814	0,837	0,815
Mittelwert Absorption 405 nm	0,799					
Standardabweichung	0,044					

Daten zur Abbildung 22: Bindung der isolierten Phagen an *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II.

Absorption 405 nm										
Biopanning I Phagen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin II	0,041	0,151	0,11	0,22	0,459	1,389	0,083	0,365	0,066	0,345
Bindung der Phagen an BSA	0,082	0,076	0,087	0,099	0,114	0,155	0,078	0,171	0,098	0,207
Phagen Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin II	0,405	0,365	0,639	0,674	0,187	1,32	0,601	1,573	0,055	0,25
Bindung der Phagen an BSA	0,204	0,163	0,232	0,25	0,11	0,123	0,265	0,208	0,08	0,113
Phagen Nr.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin II	0,119	0,089	0,334	0,17	0,041	2,286	2,278	0,096	0,078	1,023
Bindung der Phagen an BSA	0,064	0,063	0,079	0,065	0,058	0,196	0,181	0,076	0,061	0,09
Phagen Nr.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin II	0,113	0,076	0,337	0,172	0,028	2,241	2,435	0,088	0,069	1,033
Bindung der Phagen an BSA	0,066	0,064	0,081	0,066	0,059	0,203	0,183	0,069	0,061	0,092
Phagen Nr.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin II	0,412	0,432	0,437	0,97	0,585	0,521	1,87	0,348	2,139	2,549
Bindung der Phagen an BSA	0,105	0,111	0,098	0,129	0,121	0,096	0,303	0,085	0,16	0,538
Phagen Nr.	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	1,204	0,106	0,272	2,241	0,891	2,128	1,816	0,39	0,34	1,372
Bindung der Phagen an BSA	0,201	0,08	0,099	0,54	0,167	0,269	0,205	0,112	0,108	0,203

Anhang

Biopanning II Phagen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,709	0,235	0,269	0,295	0,523	0,278	0,291	0,265	0,501	0,251
Bindung der Phagen an BSA	0,207	0,182	0,171	0,189	0,226	0,194	0,205	0,203	0,286	0,199
Phagen Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,757	0,297	0,263	0,243	0,248	0,218	0,287	0,241	0,78	0,252
Bindung der Phagen an BSA	0,246	0,186	0,199	0,179	0,192	0,166	0,184	0,172	0,31	0,222
Phagen Nr.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,284	1,032	0,783	0,343	1,138	0,408	0,491	1,114	0,598	0,322
Bindung der Phagen an BSA	0,2	0,307	0,265	0,185	0,281	0,217	0,233	0,32	0,284	0,222
Phagen Nr.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,125	0,124	0,327	0,398	0,822	0,556	1,169	0,595	0,395	0,57
Bindung der Phagen an BSA	0,125	0,132	0,192	0,201	0,299	0,237	0,377	0,24	0,21	0,255
Phagen Nr.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	1,468	0,441	0,764	0,074	0,373	0,428	1,234	0,36	0,521	0,411
Bindung der Phagen an BSA	0,249	0,114	0,161	0,145	0,113	0,108	0,184	0,107	0,148	0,131
Phagen Nr.	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,791	0,755	0,768	0,61	2,153	0,468	1,827	0,487	0,693	0,522
Bindung der Phagen an BSA	0,067	0,064	0,069	0,066	0,095	0,061	0,096	0,063	0,068	0,062

Daten zur Abbildung 24: Bindung der Phagen an die Lectine PA-I und PA-II.

Phage	(A) SSAWWSYWPPVA			(B) SWPYSFWFPLEN			(C) ILANDLTAPGPR			(D) AHRHPISFLSTL		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	1,578	1,679	1,325	1,504	1,575	1,718	0,745	0,726	0,619	1,041	1,075	
Mittelwert Absorption 405 nm	1,527			1,599			0,697			1,058		
Standard-Abweichung	0,182			0,109			0,068			0,024		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit p-Nitrophenyl- α -L-fuco-pyranosid	1,673	1,96	0,645	1,463	1,517	1,507	0,712	0,805	0,645	1,089	1,154	1,228
Mittelwert Absorption 405 nm	1,426			1,496			0,721			1,157		
Standard-Abweichung	0,691			0,029			0,080			0,070		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit p-Nitrophenyl- α -D-manno-pyranosid	1,592	1,62	1,579	1,53	1,552	1,642	0,774	0,73	0,689	1,042	1,098	1,002
Mittelwert Absorption 405 nm	1,597			1,575			0,731			1,047		
Standard-Abweichung	0,021			0,059			0,043			0,048		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit L-Fucose	1,583	1,289	1,67	1,622	1,521	1,609	0,685	0,696	0,67	0,98	1,045	1,008
Mittelwert Absorption 405 nm	1,514			1,584			0,684			1,011		
Standard-abweichung	0,200			0,055			0,013			0,033		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Glucose	1,675	1,615	1,477	1,604	1,545	1,607	0,776	0,723	0,63	1,121	1,04	1,022
Mittelwert Absorption 405 nm	1,589			1,585			0,710			1,061		
Standard-abweichung	0,102			0,035			0,074			0,053		

Anhang

Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit D-Galactose	1,371	1,591	1,61	1,55	1,617	1,679	0,743	0,672	0,627	1,03	1,073	1,027
Mittelwert Absorption 405 nm	1,524			1,615			0,681			1,043		
Standard-Abweichung	0,133			0,065			0,058			0,026		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Mannose	1,539	1,633	1,545	1,553	1,515	1,592	0,682	0,718	0,616	1,263	0,999	1,02
Mittelwert Absorption 405 nm	1,572			1,553			0,672			1,094		
Standard-Abweichung	0,053			0,039			0,052			0,147		
Bindung der Phagen an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I	1,667	1,646	1,631	1,572	1,641	1,603	0,719	0,73	0,693	1,081	1,081	1,142
Mittelwert Absorption 405 nm	1,648			1,605			0,714			1,101		
Standard-Abweichung	0,018			0,035			0,019			0,035		

Daten zur Abbildung 25: Inhibition der Bindung des Phagens SSAWWSYWPPVA (A) an die adsorbierten Lectine PA-I und PA-II.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-I		
Bindung der Phagen an das Lectin mit L-Fucose	0,049	0,042	0,050		0,046	0,097
Mittelwert Absorption 405 nm	0,047			0,061		
Standardabweichung	0,004			0,031		
Bindung der Phagen an das Lectin mit Glucose	0,126	0,114	0,118		0,104	0,127
Mittelwert Absorption 405 nm	0,119			0,116		
Standardabweichung	0,006			0,012		
Bindung der Phagen an das Lectin mit Mannose	0,106	0,084	0,092		0,092	0,096
Mittelwert Absorption 405 nm	0,094			0,094		
Standardabweichung	0,011			0,002		
Bindung der Phagen an das Lectin mit D-Galactose	0,152	0,118	0,123		0,125	0,136
Mittelwert Absorption 405 nm	0,131			0,129		
Standardabweichung	0,018			0,006		
Bindung der Phagen an das Lectin mit p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid	0,115	0,105	0,105		0,102	0,118
Mittelwert Absorption 405 nm	0,108			0,113		
Standardabweichung	0,006			0,010		
Bindung der Phagen an das Lectin mit p-Nitrophenyl- α -D-manno-pyranosid	0,111	0,110	0,117	0,137	0,140	0,146
Mittelwert Absorption 405 nm	0,113			0,141		
Standardabweichung	0,004			0,005		
Bindung der Phagen an das Lectin	0,160	0,151	0,165	0,145	0,148	0,143
				0,155	0,165	0,145
Mittelwert Absorption 405 nm	0,159			0,150		
Standardabweichung	0,007			0,008		

Daten zur Abbildung 26: Inhibition der Phagen-(A)-Bindung an adsorbiertem Lectin PA-II durch synthetisierte Peptidsequenzen.

Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,244	0,226	0,245
	0,224	0,198	0,226
Mittelwert Absorption 405 nm	0,227		
Standardabweichung	0,017		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Peptid SSAWWSYWPPVAC [50 µM]	0,198	0,152	0,151
	0,221	0,171	0,176
Mittelwert Absorption 405 nm	0,178		
Standardabweichung	0,027		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit willkürlichem Peptid VWPYSASWPSAWC [50 µM]	0,23	0,162	0,152
	0,198	0,143	0,136
Mittelwert Absorption 405 nm	0,170		
Standardabweichung	0,036		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Kontroll Peptid HSVSNIRPMFPSC [50 µM]	0,266	0,18	0,338
	0,233	0,159	0,291
Mittelwert Absorption 405 nm	0,245		
Standardabweichung	0,068		

Daten zur Abbildung 27: Inhibition der Phagen-Bindung an adsorbiertem *Pseudomonas aeruginosa* Lectin PA-II durch Peptid-BSA-Konjugate.

Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II	0,477	0,481	0,461
Mittelwert Absorption 405 nm	0,473		
Standardabweichung	0,011		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit SSAWWSYWPPVAC BSA-Konjugat [10 µg/ml]	0,339	0,316	
Mittelwert Absorption 405 nm	0,328		
Standardabweichung	0,016		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Peptid- VWPYSASWPSAWC -BSA-Konjugat [10 µg/ml] mit willkürlicher Reihenfolge der Aminosäuresequenz	0,489	0,452	
Mittelwert Absorption 405 nm	0,328		
Standardabweichung	0,016		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Peptid- VWPYSASWPSAWC BSA-Konjugat [10 µg/ml] mit willkürlicher Reihenfolge der Aminosäuresequenz	0,489	0,452	
Mittelwert Absorption 405 nm	0,471		
Standardabweichung	0,026		
Bindung des Phagen SSAWWSYWPPVA (A) an das <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lectin PA-II mit Kontroll HSVSNIRPMFPSC BSA-Konjugat [10 µg/ml]	0,682	0,728	
Mittelwert Absorption 405 nm	0,705		
Standardabweichung	0,033		

Daten zur Abbildung 29: Bindung der Phagen an adsorbiertes PAK-Pilin-Protein (128-144).

Absorption 405 nm

Phagen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bindung der Phagen an das PAK-Pilin-Protein (128-144)	0,292	0,292	0,272	0,427	0,476	0,429	0,381	0,397	0,445	0,479
Bindung der Phagen an BSA	0,196	0,186	0,184	0,185	0,193	0,191	0,188	0,195	0,149	0,244
Phagen Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bindung der Phagen an das PAK-Pilin-Protein (128-144)	0,574	0,436	0,373	0,425	0,403	0,129	0,691	0,436	0,413	0,413
Bindung der Phagen an BSA	0,226	0,193	0,184	0,211	0,197	0,161	0,238	0,209	0,197	0,158
Phagen Nr.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bindung der Phagen an das PAK-Pilin-Protein (128-144)	0,422	0,451	0,047	0,025	0,582	0,317	0,629	0,437	0,297	0,343
Bindung der Phagen an BSA	0,147	0,187	0,111	0,096	0,202	0,126	0,228	0,189	0,134	0,168
Phagen Nr.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bindung der Phagen an das PAK-Pilin-Protein (128-144)	0,135	0,427	0,643	0,309	0,671	0,327	0,526	0,603	0,478	0,625
Bindung der Phagen an BSA	0,104	0,168	0,206	0,147	0,219	0,138	0,146	0,158	0,151	0,198
Phagen Nr.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Bindung der Phagen an das PAK-Pilin-Protein (128-144)	0,768	0,473	0,451	0,521	0,846	0,637	0,37	0,681	0,199	0,083
Bindung der Phagen an BSA	0,271	0,182	0,182	0,185	0,291	0,215	0,16	0,215	0,131	0,151
Phagen Nr.	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Bindung der Phagen an das PAK-Pilin-Protein (128-144)	0,144	0,2	0,086	0,209	0,203	0,168	0,156	0,191	0,186	0,11
Bindung der Phagen an BSA	0,118	0,134	0,18	0,125	0,131	0,133	0,127	0,139	0,136	0,161

Daten zur Abbildung 30: Inhibition der Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1.

Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipids asialo-GM1	0,268	0,276		
Mittelwert Absorption 405 nm	0,272			
Standardabweichung	0,006			
Konzentration	6 µM		3 µM	
Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1 mit Peptid HSVSNIRPMFPSC	0,156	0,171	0,135	0,181
Mittelwert Absorption 405 nm	0,1635		0,158	
Standardabweichung	0,011		0,033	
Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1 mit willkürlichem Peptid ISSHSVFPPNRMC	0,144	0,198	0,155	0,173
Mittelwert Absorption 405 nm	0,171		0,164	
Standardabweichung	0,038		0,013	
Bindung des biotinylierten synthetisierten PAK-Pilin-Proteins (128-144) an das Glycosphingolipid asialo-GM1 mit Kontroll Peptid AHRHPISFLSTLC	0,246	0,325		
Mittelwert Absorption 405 nm	0,2855			
Standardabweichung	0,056			

10.2 Lebenslauf

JENS FRANKE

Persönliche Angaben:

- Geburtstag: 30.03.1972
- Geburtsort: Hamburg
- Wohnort: Schwalbenweg 3a, • 22453 Hamburg

Ausbildung

- 1978 – 1982

Grundschule Heidacker Hamburg

- 1982 – 1989

Julius-Leber-Schule Hamburg

- 1989 – 1991

Gymnasiale Oberstufe der Julius-Leber-Schule

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

- Okt. 1991 – Apr. 1998

Studium Fachbereich Chemie an der Universität Hamburg

- 27.Apr.1998

Akademischer Grad Diplom-Chemiker

- Jan. 1999 - Dez. 2001

Mitglied im Graduiertenkolleg 464 der Universität Hamburg

- Jan. 1999 – 2004

Promotion im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Universität Hamburg

10.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Die hier vorliegende Dissertation wurde weder in ihrer jetzigen noch in einer ähnlichen Form einem Fachbereich oder einer entsprechenden Institution einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht.

Hamburg, den 29. April 2004

Jens Franke