

## 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-glucoopyranosid 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 Wettbewerbsstudien 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  $\beta$ -D-GalNAc-(1-4)-  $\beta$ -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.