

Entwicklung eines DNAzyms gegen Biofilm bildende
Pseudomonaden bei Zystischer Fibrose



Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

(Fachbereich 08 – Biologie und Chemie)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Frank Gregor Höfer

aus Offenbach am Main

Gießen, Januar 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2013 bis November 2017 am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Frank Runkel in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Eugen Domann angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Frank Runkel

Prof. Dr. Eugen Domann

Prüfer:

Prof. Dr. Kai Thormann

Prof. Dr. Albrecht Bindereif

Tag der Disputation:

19.02.2018

Eidesstattliche Erklärung nach § 17 Abs. 2 Nr. 1 der Promotionsordnung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hofer, F, Marquardt, K, Schmidts, T, Domann, E, Runkel, F. HPLC based single-step kinetic assay to screen the activity of DNAzymes. *Anal. Methods* **2017**;9(4):697–704. 10.1039/C6AY03061K.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Zystische Fibrose	7
1.1.1	Medikamentöse Therapie	9
1.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.2.1	Bakterieller Biofilm	12
1.2.2	Alginate-Biosynthese	14
1.3	Posttranskriptionelles Gen-Silencing	15
1.3.1	DNAzyme	16
1.3.2	Detektionsmöglichkeiten für DNAzym Kinetiken	18
1.4	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Geräte	20
2.2	Chemikalien und Reagenzien	20
2.2.1	Oligonukleotide.....	21
2.3	Bakterienstämme	24
2.3.1	<i>P. aeruginosa</i> Kultivierung und Lagerung	25
2.4	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.5	Sequenzierung von <i>algD</i>	26
2.5.1	Sequenz Analysen.....	27
2.6	Design der DNAzyme	28
2.7	AEX-HPLC	28
2.7.1	Automatisierter HPLC Assay	29
2.8	Konventioneller Gel-Assay	30
2.9	RNA-Produktion <i>in vitro</i>	31
2.10	RP-HPLC	32
2.11	Biofilm Quantifizierung.....	32
2.12	Wachstumskurven	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Ziel-Gen	34
3.1.1	Identifizierung	34
3.1.2	Sequenzierung und Untersuchung von <i>algD</i>	35

3.2	DNAzym Untersuchungen	39
3.2.1	Design	39
3.2.2	Analytik.....	39
3.2.3	Automatisierter HPLC Assay	40
3.2.4	Kompetitiver Spaltassay	43
3.2.5	Benchmark Spaltassay	44
3.2.6	Temperaturabhängigkeit.....	45
3.2.7	Konventioneller PAGE-Assay	46
3.2.8	Einfluss von <i>algD</i> -mRNA Sekundärstruktur	46
3.2.9	Einfluss von LNA-Modifikationen auf die DNAzym-Spaltkinetik..	48
3.3	<i>P. aeruginosa</i> Untersuchungen	50
3.3.1	Biofilm Untersuchungen.....	50
3.3.2	Wachstumskurven	56
4	Diskussion	60
4.1	Ziel-Gen	60
4.1.1	Therapieoptionen für CF-Patienten.....	60
4.1.2	Strategien gegen <i>P. aeruginosa</i>	61
4.1.3	Konservierung <i>algD</i>	63
4.2	DNAzym Untersuchungen	64
4.2.1	Analytik.....	64
4.2.2	Kompetitiver und Benchmark Spaltassay.....	65
4.2.3	Einflussfaktoren der DNAzym-Kinetik	68
4.2.4	Resultat der Untersuchungen	75
4.3	<i>P. aeruginosa</i> Untersuchungen	77
4.3.1	Charakterisierung Biofilm.....	77
4.3.2	Wirkungen auf Biofilm.....	78
4.3.3	Synergie mit Antibiotika	81
4.4	Fazit und Ausblick	85
5	Zusammenfassung.....	87
5.1	Zusammenfassung	87
5.2	Abstract	88

6	Abkürzungsverzeichnis.....	89
7	Abbildungsverzeichnis.....	91
8	Tabellenverzeichnis	93
9	Anhang.....	94
10	Literaturverzeichnis	103
	Danksagung.....	123
	Veröffentlichungen	124
	Lebenslauf	125

1 Einleitung

1.1 Zystische Fibrose

Zystische Fibrose (CF; ICD-10: E84 Zystische Fibrose) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die zu einer Störung exokriner Drüsen führt. Diverse Mutationen innerhalb des CFTR-Gens (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) führen zu einer gestörten Funktion von Chlorid-Kanälen und somit einer veränderten Sekret-Zusammensetzung. Die reduzierte Sekretion von Chlorid-Ionen und die dadurch fehlende osmotische Wirkung führt zu der krankhaften Viskositätserhöhung der Sekrete. Die in Deutschland übliche Bezeichnung Mukoviszidose leitet sich von diesem Symptom ab; lateinisch *mucus* ‚Schleim‘ und *viscidus* ‚zäh‘, bzw. ‚klebrig‘. Der Schweregrad der Erkrankung korreliert mit der Funktionseinschränkung der exokrinen Drüsen und demzufolge auch mit der Art der Mutation. Die häufigste Mutation des CFTR-Gens ist die Deletion dreier Basen. Diese kodieren für die Aminosäure Phenylalanin an Position 508. Bei dieser $\Delta F508$ bzw. $F508del$ Mutation kommt es durch den Verlust einer Aminosäure zu einer fehlerhaften Prozessierung des gesamten CFTR-Proteins. Pathophysiologisch kann die Viskositätserhöhung der Sekrete im schlimmsten Fall Drüsen vollständig blockieren und über den gesamten Körper verteilt Funktionseinschränkungen verursachen. Betroffen sind vor allem Organe wie Lunge, Pankreas und Leber; es handelt sich somit um eine Multisystemerkrankung [1].

Insbesondere pulmonale Infektionen führen bei CF-Patienten zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Der zähflüssige körpereigene Mucus behindert die koordinierte Bewegung der Zilien des Flimmerepithels in den Bronchien sowie der Luftröhre [2]. Somit wird der Abtransport von Schleim, Partikeln und Keimen Richtung Pharynx verhindert, dies begünstigt eine bakterielle Besiedlung und pulmonale Infektionen (Abbildung 1, Phase 1).

Um diese bakterielle Infektion zu bekämpfen migrieren neutrophile Granulozyten in die Lunge (Abbildung 1, Phase 2) und immobilisieren die Bakterien mittels NETs („neutrophil extracellular traps“) [3]. Dadurch steigt die Belastung mit Partikeln, Zellen und Zellfragmenten in der Lunge im Vergleich zu gesunden Patienten, ähnlich wie bei COPD-Patienten oder Rauchern, weiter an [4]. Beim Gesunden werden diese Konglomerate mittels mukoziliärer Clearance in Richtung Pharynx abtransportiert. Durch die Störung der mukoziliären Clearance bei CF-Patienten begünstigt die zusätzliche Schleimbelastung mit endogenen Immunzellen eine weitere Einschränkung der Lungenfunktion und führt so zu einem *circulus vitiosus*.

Die veränderten pulmonalen Bedingungen stellen ein hervorragendes Milieu für verschiedene Pathogene dar. Oft leiden CF-Patienten unter der chronischen Besiedelung mit Biofilm bildenden Bakterien, die zu einer weiteren Schleimbelastung führen und nur schwer therapierbar sind (Abbildung 1, Phase 3). Sowohl der zähe, körpereigene Mucus als auch der bakterielle Biofilm beeinträchtigen den reibungslosen Gasaustausch in der Lunge [5].

Rezidivierende pulmonale Infekte und dadurch bedingte Strukturveränderungen führen trotz intensiver Therapie im Verlauf der Erkrankung zu einer zunehmenden Verschlechterung der Lungenfunktion, sodass im Verlauf der Erkrankung eine Lungentransplantation die einzige Therapieoption darstellt [6].

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Lebenserwartung von CF-Patienten in Deutschland stetig verbessert [7]. Sie beträgt derzeit etwa 40 Jahre und meist führt Lungenversagen zum Tod. Um die respiratorische Insuffizienz hinauszuzögern und eine Lungentransplantation zu vermeiden, bedarf es einer intensiven physiotherapeutischen und medikamentösen Therapie.

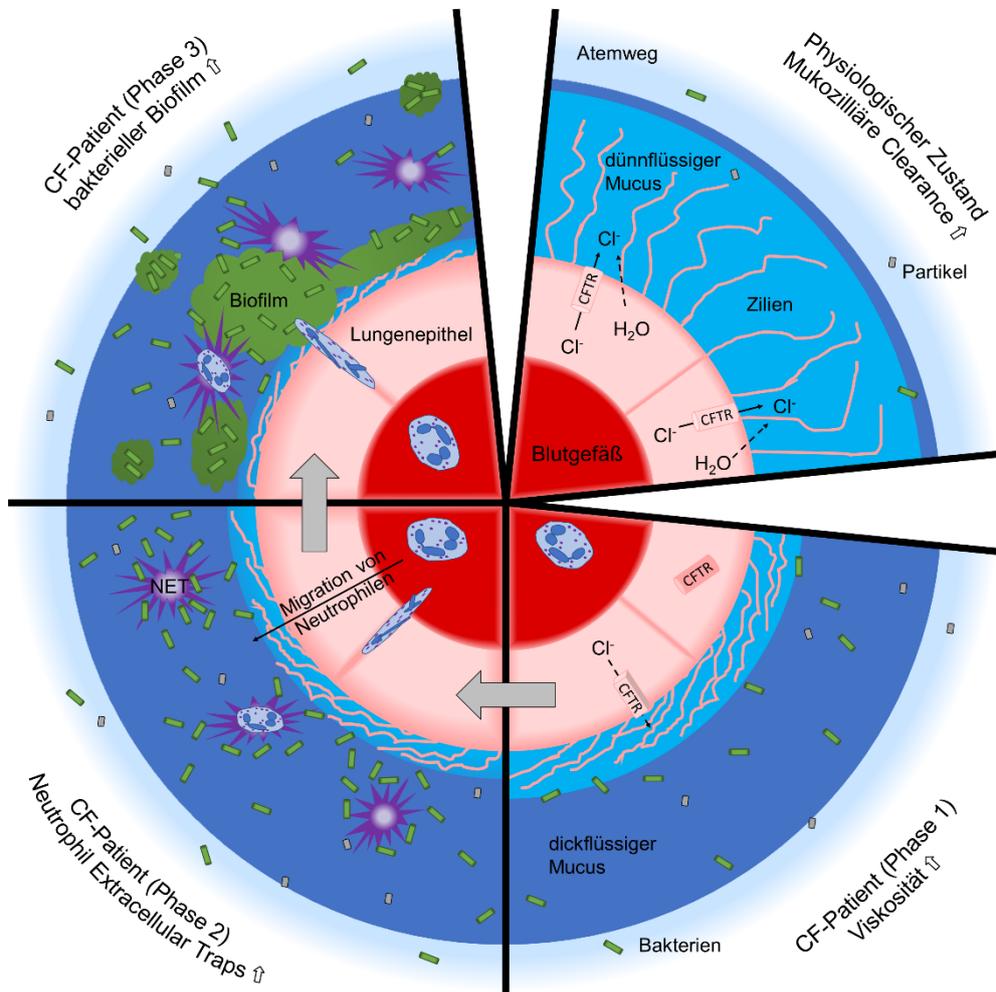


Abbildung 1 Pathologie der mukoziliären Clearance bei CF-Patienten

1.1.1 Medikamentöse Therapie

Die Pharmakotherapie für CF-Patienten ist mittlerweile mannigfaltig und hat über die letzten Jahrzehnte enorm zu der steigenden Lebenserwartung beigetragen (Abbildung 2, [7]). Neben der Substitution von Verdauungsenzymen zur Behandlung von gastrointestinalen Beschwerden, steht der Erhalt der Lungenfunktion im Fokus. Nachfolgend wird ausschließlich auf zugelassene medikamentöse Therapien eingegangen, die zu einer Verbesserung der Lungenfunktion beitragen.

Seit 2012 gibt es erste Wirkstoffe zur kausalen Therapie der CF. Kalydeco® (Ivacaftor) und Orkambi® (Kombinationspräparat Lumacaftor/Ivacaftor) werden als CFTR-Korrektor

bzw. CFTR-Potentiator bezeichnet und können bei bestimmten Mutationen die Fehlfunktion des Chloridkanals partial korrigieren. Dennoch führen diese Medikamente nicht zu einer nachhaltigen Heilung und müssen demzufolge regelmäßig eingenommen werden. Ansonsten besteht die derzeitige Pharmakotherapie aus einer symptomatischen Behandlung zur Verbesserung und zum Erhalt der Lungenfunktion. Um den zähflüssigen Schleim besser abhusten zu können, inhalieren CF-Patienten mehrmals täglich mit verschiedenen Wirkstoffen.

Mit Bronchodilatoren wie β 2-Sympathomimetika (bspw. Salbutamol) können die Atemwege geweitet werden um die Atmung zu erleichtern und die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs der darauffolgenden Inhalation zu verbessern.

Hypertone Kochsalzlösung (bspw. Nebusal™ 3% oder 7%) führt durch den osmotischen Druck zu einer Diffusion von Wasser in die Lunge, wodurch sich der Schleim verflüssigt. Dornase alfa (Pulmozyme®) ist eine rekombinant hergestellte DNase, die hochmolekulare eDNA (extrazelluläre DNA) in der Lunge fragmentiert und so durch Depolymerisation zu einer Verflüssigung des Schleims beiträgt [8,9]. Die in der Lunge befindliche eDNA stammt größtenteils von körpereigenen Zellen (>90%) [4]. Neutrophile migrieren in die Lunge und immobilisieren im Zuge der Immunantwort mit NETs verschiedenste Keime [10,11]. Durch die fehlende Eliminierung mittels mukoziliärer Clearance, residieren diese NETs länger als gewöhnlich im Lungengewebe und führen dort zu Entzündungsreaktionen [12].

Um die in der Lunge angesiedelten Bakterien zu bekämpfen werden unterschiedliche Antibiotika eingesetzt und je nach Wirkstoff parenteral oder inhalativ verabreicht. Hervorzuheben ist hierbei das Aminoglykosid Tobramycin, welches spezifisch gegen gramnegative Bakterien wirkt. Es ist besonders effektiv in der Behandlung von *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*), einem Bakterium, das bei CF-Patienten besonders häufig zu einer tödlichen Pneumonie führt [13]. Die intensive, rezidivierende und langfristige Behandlung u.a. mit Aminoglykosid-Antibiotika (Tobramycin) ist jedoch durch schwerwiegende und irreversible unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie z.B. Nephrotoxizität und Ototoxizität limitiert [14].

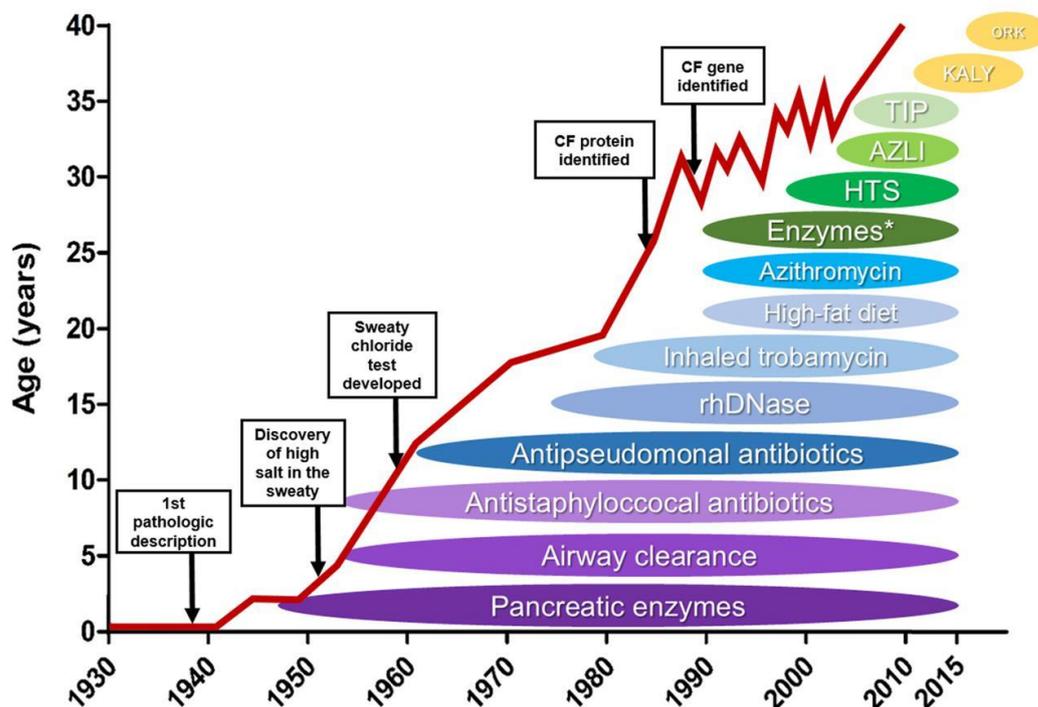


Abbildung 2: Lebenserwartung von CF-Patienten im Laufe neuer Therapiemöglichkeiten. Mit Genehmigung von M. Lopes-Pacheco [7]

1.2 Pseudomonas aeruginosa

Die Lungen von CF-Patienten sind oft chronisch mit pathogenen Erregern besiedelt [15]. Besonders schwer eradizierbar sind gramnegative Bakterien der Art *P. aeruginosa*. Die Erstinfektion mit diesem Erreger erfolgt meist bereits im Kindesalter und eine vollständige Remission gelingt nur selten [16].

Die Eradikationstherapie ist limitiert durch die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen und den unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Antibiotika [14,17]. Im Laufe der Infektion wandelt sich der Phänotyp der Pseudomonaden in eine biofilmbildende, mukoide Form. Bei dieser Chronifizierung mit *P. aeruginosa* werden physiologisch vorkommende Bakterienspezies zurückgedrängt und *P. aeruginosa* übernimmt maßgeblich das Mikrobiom der CF-Lunge [18]. Dieser Wandel kann sowohl durch verschiedene Spontanmutationen innerhalb des Genoms von *P. aeruginosa*, sowie durch die bei CF-Patienten vorherrschenden pathologischen Bedingungen begünstigt werden [19]. Manche sonst typischen Virulenzfaktoren wie bspw. die Metalloprotease Pseudolysin (LasB) werden im Fall von pulmonalen Infektionen zu Gunsten der Biofilmbildung herunterreguliert [20]. *P. aeruginosa* ist durch den mukoiden Biofilm besser an die

Pathophysiologie einer CF-Lunge adaptiert. Das Bakterium wird widerstandsfähiger gegen Austrocknung, ist geschützt vor hohen Antibiotika-Konzentrationen und auch körpereigene Immunzellen können die eingebetteten Bakterien nicht eliminieren [6,21,22]. Der Wandel in mukoide Stämme ist klinisch meist mit einer Exazerbation und einer Reduktion der Lungenfunktion verbunden [23,24].

1.2.1 Bakterieller Biofilm

Hauptbestandteil von *P. aeruginosa* Biofilmen sind verschiedene Polysaccharide [25]. Neben dem neutralen Psl („polysaccharide synthesis locus“, Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Adhäsion [26,27]) und dem kationischen Pel („pellicle“, Kahmhaut an Luft-Flüssigkeit-Grenze, [28]) kann *P. aeruginosa* auch große Mengen anionisches Alginat sekretieren [29,30]. Charakteristisch für mukoide Stämme ist, dass sie hauptsächlich in dem Sputum von CF-Patienten gefunden werden und der Hauptanteil ihres Biofilms aus Alginat besteht. Alginat ist ein Sammelbegriff für Polymere, die aus β -D-Mannuronat und α -L-Guluronat zusammengesetzt sind (Abbildung 3). Es wird ausschließlich in Braunalgen und den beiden Bakteriengattungen *Azotobacter* und *Pseudomonas* gebildet. Alginate unterscheiden sich in Polymerisierungsmuster, Molekulargewicht und durch eine nachträgliche Acetylierung, die lediglich in bakteriellem Alginat vorzufinden ist. Da die Monomere von Alginat negativ geladen sind, kann es Kationen, wie Aminoglykosid-Antibiotika, sehr gut elektrostatisch binden und so eine schützende Diffusionsbarriere darstellen ohne das Bakterium selbst gegen das Aminoglykosid zu sensibilisieren [31,32]. Alginat kann mit zweiwertigen Kationen, vornehmlich Ca^{2+} , dreidimensionale Strukturen ausbilden; diese Gel-Strukturen können sehr solide sein und sind nach ihrer Form eines Eierschachtel-Modells („eggbox-model“, Abbildung 3) benannt [33]. Acetylierungsgrad [34], Länge des Uronsäure-Polymers, sowie Anteil und Verknüpfungsschema der Monomere, führen zu unterschiedlichen physikochemischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Alginats [35].

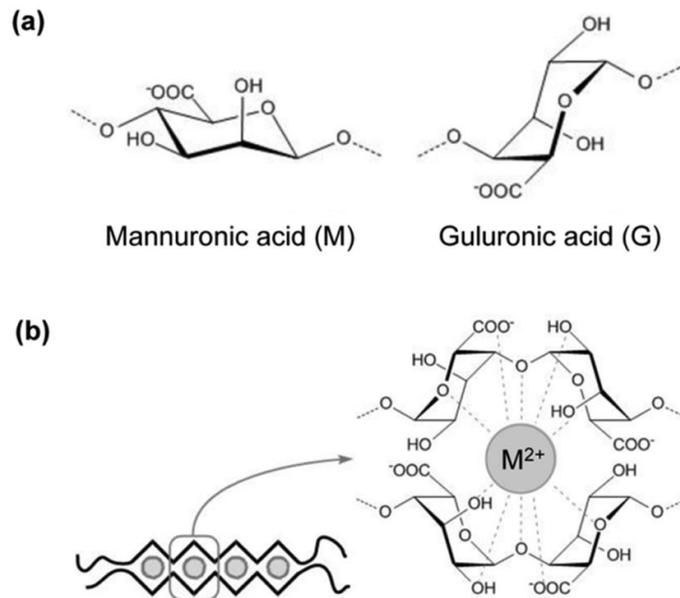


Abbildung 3: Aufbau und Struktur von Alginate. Mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry [36]

a) Strukturformeln der beiden Alginate Monomere, b) Eierschachtelmodell des Alginats

Aufgrund des spezifischen Vorkommens von Alginate in *P. aeruginosa* stellt Alginate ein interessantes Arzneistofftarget dar. Experimente mit Alginate-Antikörpern zeigten ebenfalls Wirkung gegen wenig, bzw. nicht-mukoide *P. aeruginosa* Stämme [37]. Auch die Möglichkeit einer Impfung gegen Alginate wurde untersucht [38–40]. Durch unterschiedliche Polymerisierungsmuster der Uronsäuren und deren anschließende Acetylierung unterscheiden sich jedoch viele Epitope. Die meisten Antikörper wirkten nicht opsonierend, sodass eine Impfung derzeit keine wirkungsvolle Therapieoption darstellt [40–43]. Ein weiterer Ansatz ist die enzymatische Lyse von bestehendem Alginate. Um den Biofilm aufzulösen wurde das Enzym AlgL (Alginate Lyase) aus *P. aeruginosa* untersucht [44–46]. Die lytische Aktivität von AlgL konnte molekularbiologisch erhöht werden, was zu einer leichten Verbesserung der synergistischen Wirkung mit Antibiotika führte, jedoch nicht den erhofften Durchbruch brachte [47]. Alginate selbst ist in Form von OligoG® ein Wirkstoffkandidat zu Behandlung von CF-Patienten. Das aus Braunalgen hergestellte Guluronsäure-Oligomer-Gemisch soll sowohl den endogenen Mucus normalisieren [48], als auch antimikrobielle Eigenschaften aufweisen [49]. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch unklar [50].

1.2.2 Alginat-Biosynthese

Ausgangsstoff für die Alginat-Biosynthese ist Fructose-6-phosphat. Mittels eines komplexen Systems von verschiedenen Enzymen wird das Monomer Mannuronat produziert, polymerisiert, epimerisiert, acetyliert und sekretiert (Abbildung 4) [29,51]. Zwölf der dreizehn beteiligten Proteine sind im *algD*-Operon kodiert und lediglich *algC* befindet sich in einem anderen Abschnitt des Genoms von *P. aeruginosa*. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Alginat-Biosynthese ist die Oxidierung von GDP-D-Mannose zu GDP-D-Mannuronat (Abbildung 4) [52,53]. Dieser Reaktionsschritt wird durch das Enzym AlgD (GDP-Mannose 6-dehydrogenase) katalysiert [54]. Bei einer Gegenüberstellung der Proteome eines mukoiden und eines nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Stamms stellte sich heraus, dass AlgD das am stärksten hochregulierte Biosynthese-Protein ist [55]. In Sputum von Patienten, die mit mukoiden Pseudomonaden infiziert waren, konnten dementsprechend extrem erhöhte Werte von *algD*-mRNA Transkripten nachgewiesen werden [56,57].

Ein mukoider Phänotyp entsteht, sobald das *algD*-Operon aktiviert wird. Der Transkriptionsstart (+1 Position) der *algD*-mRNA ist außergewöhnlich weit von dem Translationsstart von AlgD entfernt, was auf die ausgeprägte Regulation seiner Proteinbiosynthese hindeutet [58,59]. Die Alginat-Biosynthese kann sowohl durch Mutationen in Regulationsgenen erhöht sein, als auch durch äußere Einflüsse aktiviert werden [19,60–62]. Die Regulation ist dabei kaskadenförmig von einer Vielzahl von Aktivatoren und Repressoren abhängig [63,64].

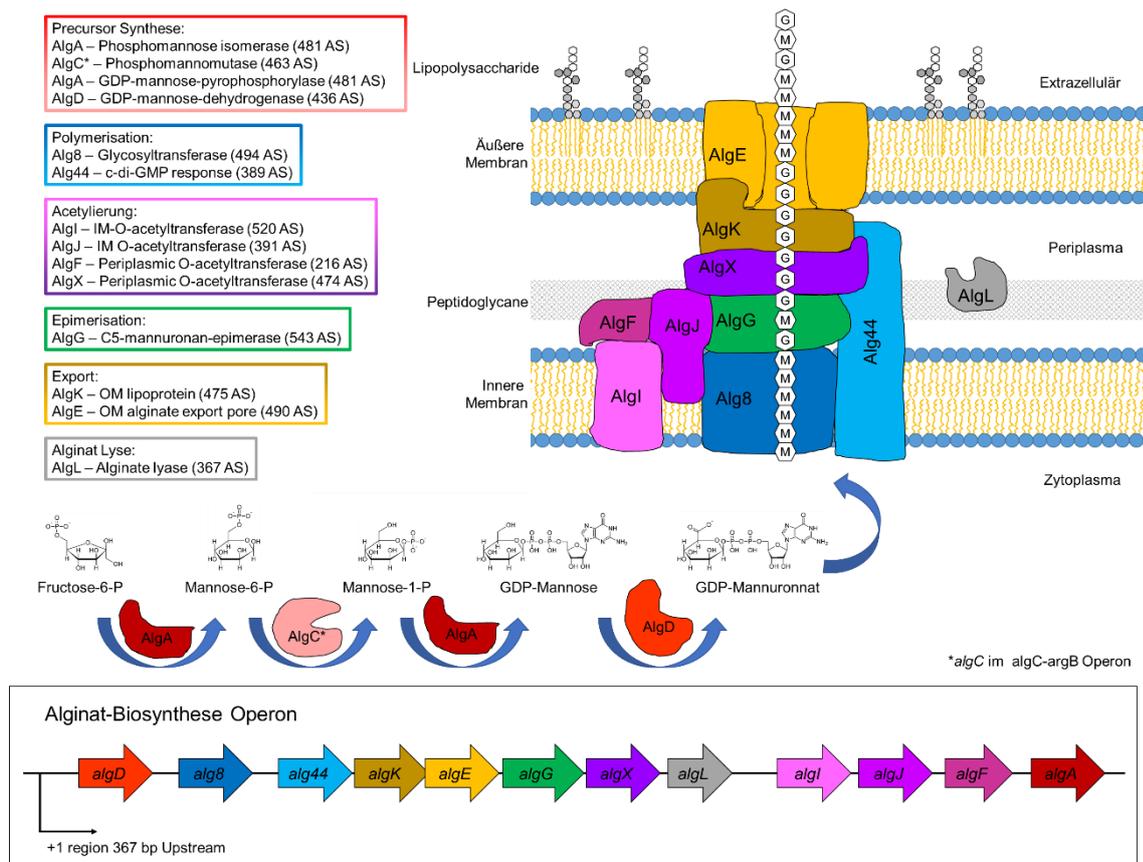


Abbildung 4: Stoffwechselweg des Alginats (oben); Anordnung des Alginat Operons (unten)

Die molekularbiologische Deletion des *algD*-Gens führt zu einem vollständigen Verlust des mukoiden Phänotyps [65]. Der voluminöse Biofilm ist maßgeblich abhängig von diesem Gen, während Biofilme, die sich an Oberflächen bilden unabhängig von *algD* entstehen können [66]. Versuche das Protein AlgD zu inhibieren führten zu einer Reduzierung der Alginat-Menge (Penicillinsäure) [67,68] und einer Resensibilisierung der Bakterien gegenüber Tobramycin (AM5'ASG) [69,70].

1.3 Posttranskriptionelles Gen-Silencing

Posttranskriptionelles Gen-Silencing stellt eine Möglichkeit dar, sehr spezifisch auf die Ausprägung bestimmter Stoffwechselprodukte von Zellen einzuwirken. Wie bei der endogenen RNA-Interferenz von Eukaryoten, kann mit Hilfe von Xenobiotika wie siRNA, Antisense-Oligonukleotiden, (Hammerhead-)Ribozymen und DNazymen Einfluss auf die mRNA und ihre Translation genommen werden [71]. Ihre Spezifität erhalten alle

posttranskriptionellen Gen-Silencing-Methoden durch selektive Basenpaarung mit dem Ziel-Transkript. Die entsprechenden Oligonukleotide zum Stilllegen der Genexpression unterscheiden sich in ihrer Länge und ihrem Aufbau, sowie in den Proteinen, die zum Abbau der mRNA benötigen.

In eukaryotischen Zellen steht der Proteinkomplex RISC („RNA-induced silencing complex“) zur Verfügung, unter dessen Zuhilfenahme siRNA an die mRNA bindet und diese anschließend hydrolysiert. RISC wird auch von der endogenen RNAi (RNA-Interferenz) verwendet und birgt durch Übersättigung die Gefahr einer erhöhten Toxizität [72].

Im Fall von ASO (Antisense-Oligonukleotide) bildet sich ein DNA/RNA-Hybridstrang, den zelleigene RNasen erkennen und daraufhin den RNA-Strang hydrolysieren [73]. Bereits die Hybridisierung kann die ribosomale Proteinbiosynthese unterbrechen. Meist ist ein Wechselspiel verschiedener Mechanismen für die Gesamtwirkung verantwortlich, von denen jedoch alle auf der komplementären Hybridisierung mit dem Ziel-Transkript beruhen [74].

Lediglich Ribozyme und DNAzyme [75] spalten RNA unabhängig von Proteinen. Als Cofaktor benötigen sie meistens mehrwertige Kationen (z.B. Mg^{2+}) um die RNA gezielt zu hydrolysieren. Wegen der Induktion von Interferonen in Menschen, sind längere (>30 Nukleotide) dsRNA (doppelsträngige RNA)-Wirkstoffe wie Ribozyme mittlerweile als Arzneimittel nicht länger im Fokus der Pharmaforschung [76,77].

Um auf das Transkriptom von prokaryotischen Zellen einzuwirken, stehen daher aufgrund des fehlenden RISCs lediglich ASO und DNAzyme zur Verfügung [78,79].

1.3.1 DNAzyme

DNAzyme (Dz) sind künstliche Oligonukleotide, die eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionen katalysieren können [80]. Im Folgenden wird ausschließlich auf die sogenannten 10-23 Dz eingegangen, da sie das größte Potential für neue Wirkstoffe bieten [81]. Sie sind einzelsträngige DNA-Oligonukleotide, die in der Lage sind RNA zu hydrolysieren [75]. Eine konstante katalytische Domäne [82], die aus den 15 Nukleotiden (nt) „GGCTAGCTACAACGA“ besteht, wird von zwei variablen Bindedomänen flankiert, die über komplementäre Basenpaarung die Ziel-RNA adressieren.

Kodiert die transkribierte RNA für ein Protein, kann dessen Translation durch vorzeitige Hydrolyse des Transkripts unterbrochen werden (Abbildung 5). Demnach besitzen Dz das Potential, Krankheiten zu behandeln, denen eine pathologische Überexpression eines Transkripts zu Grunde liegt [83]. Zwei Dz, die pathologische Überexpressionen von Transkriptionsfaktoren korrigieren (hgd40 – „GATA-3“ bei Entzündungen und Dz13 – „c-Jun“ bei malignen Erkrankungen), erreichten bereits klinische Studien [84,85]. Durch den basenspezifischen Wirkmechanismus stellen Dz eine sehr nebenwirkungsarme Wirkstoffklasse dar [86]. Derzeit sind die beiden limitierenden Faktoren von Antiinfektiva unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Resistenzen gegen sie; demnach sind Dz als neue Option für die Behandlung von Infektionen höchst interessant und erstrebenswert [87–90]. Durch die Natur ihres Aufbaus sind Dz eine äußerst anspruchsvolle Wirkstoffklasse. Durch ihre Größe und Ladung ist ihre Bioverfügbarkeit äußerst gering und sie unterliegen einem enzymatischen Abbau durch DNasen.

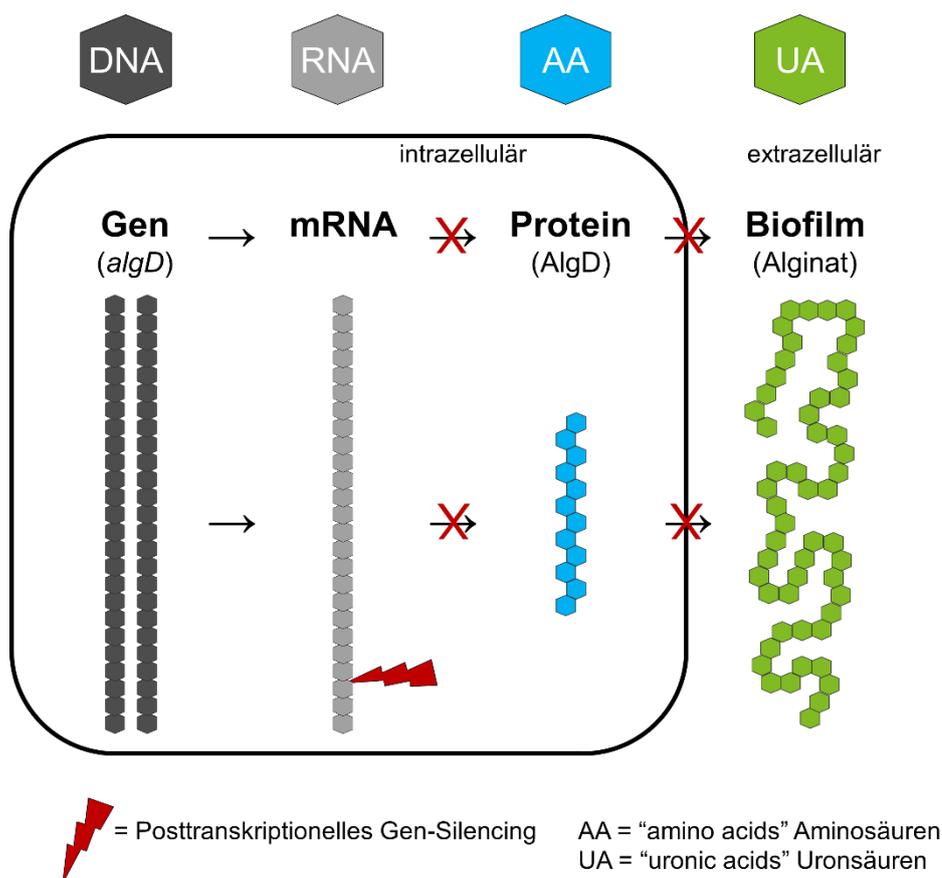


Abbildung 5: Schema zur Inhibition der Biofilmproduktion

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Dz und andere Gen-Silencing Methoden in den Zellen von *P. aeruginosa* und anderen gramnegativen Bakterien wirken können [91–94]. Seitdem Oligonukleotide an Zell-penetrierende-Peptide (CPP) gekoppelt werden können [95–97] sind große Fortschritte in Richtung wirksamer Antibiotika möglich geworden [98] → [93]. Bislang war die Anwendung von Dz auf eukaryotische Zellen beschränkt oder auf *in vitro* Technologien wie bspw. Elektroporation angewiesen [88].

Durch Modifikationen der Dz an ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat oder ihren Nukleinbasen können viele ihrer Nachteile positiv beeinflusst werden [99]. So kann die katalytische Aktivität des Dz verbessert [100], das Dz vor Abbau geschützt [101] und Sekundärstrukturen der RNA überhaupt erst zugänglich gemacht werden [102]. Auch die Bioverfügbarkeit von Oligonukleotid-Wirkstoffen kann mit Hilfe von Modifikationen beeinflusst werden. Bei der sogenannten Gymnosis können die modifizierten Oligonukleotide ohne weitere Unterstützung von Transfektionsmitteln in die Zelle gelangen [103]. Viele dieser Vorteile können durch die Modifikation mit sogenannten LNAs („locked nucleic acid“) erreicht werden.

Der Einsatz von Modifikationen birgt jedoch auch die Gefahr einer erhöhten Toxizität [104] und erhöht die Kosten ihrer Synthese. Bei Verzicht auf modifizierte Nukleotide fragmentieren Oligonukleotid-Wirkstoffe in körpereigene Bausteine und können somit rückstandslos vom Körper recycelt werden.

1.3.2 Detektionsmöglichkeiten für DNAzym Kinetiken

Die Kernfunktion von Dz ist die Hydrolyse ihrer RNA-Substrate. Somit ist es essentiell, die Spaltkinetik neuer und modifizierter Dz einfach bestimmen zu können, um ihre mögliche Potenz bei einer späteren Therapie vorherzusagen. Bislang wurden dafür zwei Methoden angewandt:

- Bei der konventionellen Gel-Assay Methode findet die Reaktion in einem Mikroreaktionsgefäß statt. Zu ausgewählten Zeitpunkten werden Proben gezogen, ebendiese abgestoppt, anschließend mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und letztendlich densitometrisch quantifiziert [102,105,106]. Dabei kann durch radioaktiv markiertes Substrats die Nachweisgrenze reduziert und Störsignale verringert werden [75,101,107]. Nachteile dieser Methode sind der hohe manuelle Aufwand, eine Auswertung von Zwischenergebnissen ist nicht

möglich und die Quantifizierung über Densitometrie unterliegt großen Schwankungen.

- Die zweite Methode beruht auf der Fluoreszenzlöschung (Quenching). Das verwendete RNA Substrat ist dabei sowohl mit einem Fluoreszenz-Farbstoff als auch mit einem Quencher versehen [108]. Sobald die RNA gespalten wird, verliert der Quencher die räumliche Nähe zu dem Fluoreszenzfarbstoff und eine Zunahme der Fluoreszenz kann detektiert werden. Die Fluoreszenz-Zunahme kann dabei in Echtzeit mit einem Plate-Reader detektiert werden [109,110]. Diese Methode detektiert die Spaltprodukte nicht spezifisch und kann daher lediglich die Spaltung des Substrats und nicht die Position der Hydrolyse bestimmen. Die Modifikation des Substrats mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher beeinflusst zusätzlich die Struktur des RNA Substrats und erhöht dessen Kosten.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es einen Oligonukleotid-Wirkstoff zu entwickeln, der der Bildung eines mukoiden Biofilms von *P. aeruginosa* vorbeugt. Dadurch sollte zum einen die Biofilmmenge reduziert werden und die Sensibilität gegenüber klinisch relevanten Antibiotika wiederhergestellt werden. Dafür wurden folgende Punkte bearbeitet:

- a) Identifizierung eines relevanten Proteins der Biofilm-Synthese
- b) Ermittlung einer geeigneten hoch konservierten Primärsequenz des Target-Gens
- c) Entwicklung eines kostengünstigen und automatisierbaren Screeningverfahrens für Dz
- d) Identifikation schnellschneidender Dz-Kandidaten, die für eine Weiterentwicklung erfolgversprechend sind

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Die folgenden Geräte wurden für das Anfertigen dieser Arbeit verwendet:

Gel-Dokumentation – Bio-Rad Gel Doc™ XR+ System

HPLC – Hitachi Elite LaChrom® HPLC System

Inkubator – Haereus instruments Kelvitron® t

Netzteil – Biometra Whatman PS 305 T

PAGE – Bio-Rad Mini-PROTEAN® II Electrophoresis

PCR – Finnzymes Piko™ Thermal Cycler

Plate-reader – Tecan Infinite® M200 oder Tecan Infinite® M200 PRO

Schüttelinkubator – IKA® KS 4000 i control

Waage – Kern 770

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tobramycin (TOB, 467,5 g/mol) und Penicillinsäure (PenA, 170,2 g/mol) wurden in einer Reinheit von >98% verwendet (Cayman Chemical, UK).

Das CPP (zellpenetrierende Peptid) mit der Aminosäure-Sequenz (RXR)₄XB (2006,5 g/mol) wurde in einer Reinheit von >95% von Eurogentec synthetisiert (X = ε-Aminocapronsäure, B = β-Alanin).

Das AMP (antimikrobielle Peptid) SMAP-29 (3256 g/mol) mit der Aminosäure-Sequenz RGLRRLGRKIAHGVKKYGPTVLRRIIRIAG wurde ebenfalls von Eurogentec in einer Reinheit >95% bezogen [111].

Der von Sauvage *et al.* [70] beschriebene Inhibitor AM5'ASG wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Schreiner am Institut für organische Chemie in Gießen synthetisiert. Die Strukturformeln des AlgD-Inhibitors (AM5'ASG), seiner beiden Edukte vor dem letzten Syntheseschritt „365“ und „372“, sowie der drei Neben- und Abbauprodukte „383“, „415“ und „444“, die nach dem letzten Syntheseschritt isoliert werden konnten, können Abbildung 6 entnommen werden. Weitere Angaben zu den Substanzen können Anhang 1 und Anhang 2 entnommen werden.

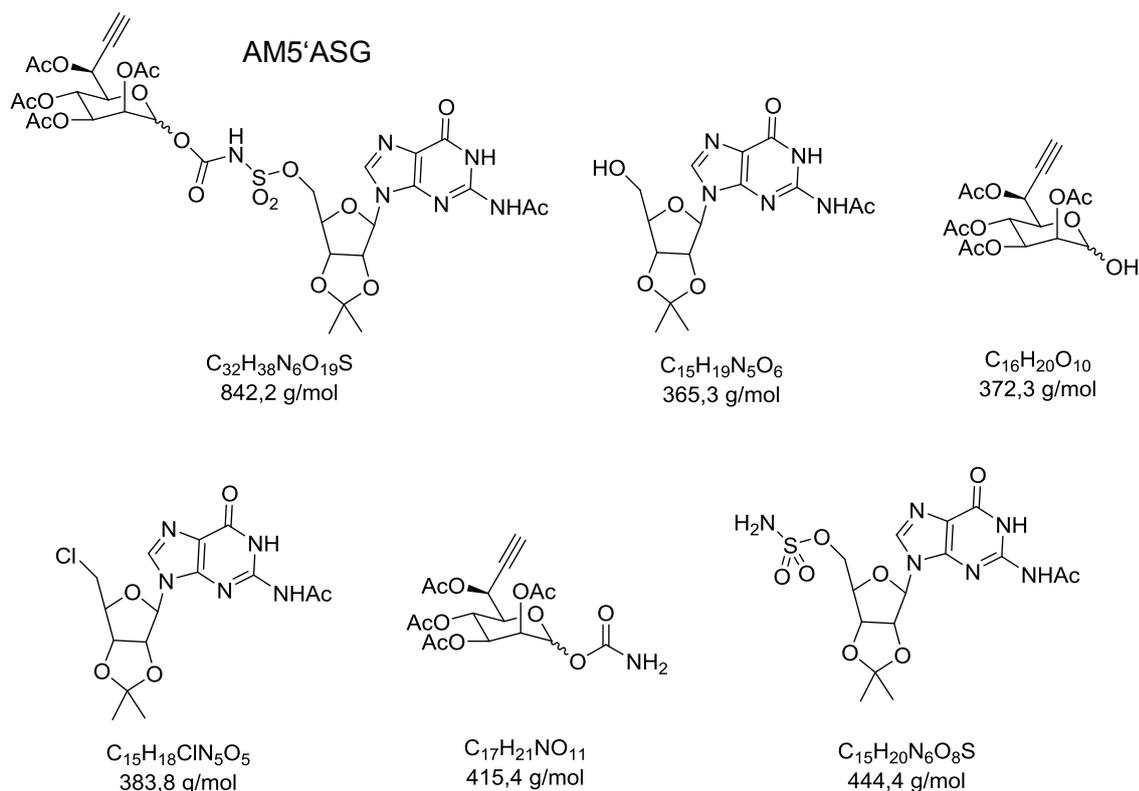


Abbildung 6: Strukturformeln AlgD-Inhibitor und verwandte Substanzen

2.2.1 Oligonukleotide

Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden getrocknet bestellt und auf 100 μ M in Reinstwasser solubilisiert. Die Lagerung erfolgte bei $-18^{\circ}C$. RNA *algD1145* und RNA *algD317* wurden von Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgien) synthetisiert und über eine Kartusche aufgereinigt. Die LNA modifizierten Dz LzTHM290a, LzTHM290b und LzTHM290c wurden von Exiqon (Vedbaek, Dänemark) synthetisiert und durch AEX-HPLC aufgereinigt. Das Dz/Peptid-Konjugat DzTHM290CPP (12655,4 g/mol) wurde von Eurogentec Deutschland GmbH (Köln, Germany) synthetisiert und durch RP-HPLC aufgereinigt. Dabei wurde das C-terminale Ende des CPP mit dem 3'-Ende des Dz über einen SMCC Linker verknüpft. Alle übrigen Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert und durch RP-HPLC aufgereinigt.

Für manche Versuche wurde DzTHMix, ein Gemisch aus 50 zu gleichen Teilen enthaltenen Dz verwendet (Sequenzen siehe Anhang 3).

Für die Vorhersage der Sekundärstruktur der verschiedenen Oligonukleotide wurde MFold benutzt [112]. Es wurde jeweils nur die Struktur mit der geringsten Gibbs-Energie (ΔG) berücksichtigt.

Tabelle 1: Verwendete DNAzyme und ihre Substrate

Name	Nukleotidsequenz	
Dz13	5'	CGGGAGGAAXGAGGCGTTG- <i>invT</i> 3'
RNA c-Jun(24)	3'	AGCCUGCCCUCCU <u>UG</u> CUCCGCAAC 5'
RNA c-Jun(10)	3'	GCUCCGCAAC 5'
RNA c-Jun(10)+3'P	3'	(P)-GCUCCGCAAC 5'
RNA c-Jun(11)	3'	UGCUCGCAAC 5'
RNA c-Jun(13)	3'	AGCCUGCCCUCCU 5'
RNA c-Jun(14)	3'	AGCCUGCCCUCCU 5'
hgd40	5'	GTGGATGGAXGTCTTGGAG 3'
RNA GATA3	3'	GGCACCACCUACCU <u>G</u> CAGAACCUC 5'
DzTHM290	5'	GCAGATGAAXGATACGTCG 3'
DzTHM290CPP	5'	GCAGATGAAXGATACGTCG-CPP 3'
LzTHM290a	5'	GCAGATGAAXGATACGTCG 3'
LzTHM290b	5'	GCAGATGAAXGATACGTCG 3'
LzTHM290c	5'	GCAGATGAAXGATACGTCG 3'
RNA <i>algD290</i>	3'	GCGUCUACU <u>UG</u> CUAUGCAGCC 5'
DzTHM95	5'	CCACACCAAXGACTTCATG 3'
RNA <i>algD95</i>	3'	AGGUGUGGU <u>U</u> ACUGAAGUACU 5'
DzTHM110	5'	GTTCGCCGAXCACGGTCAT 3'
RNA <i>algD110</i>	3'	AGGUCAAGCGGC <u>U</u> AGUGCCAGUAG 5'
DzTHM114	5'	ACTTGATCAXCTCGGCGAC 3'
DzTHM115	5'	TGTACTTGAXCATCTCGGC 3'
RNA <i>algD1145</i>	3'	ACAUGAACU <u>AGU</u> AGAGCCGCUG 5'
DzTHM272	5'	TAGCCCAAAXCAAAGATGC 3'
RNA <i>algD272</i>	3'	UAUCGGGU <u>U</u> UGUUUCUACGA 5'
DzTHM317	5'	ATCAACGAAXCGAGCATCG 3'
RNA <i>algD317</i>	3'	CGCGUAGUUGCU <u>U</u> GGCUCGUAGC 5'
DzTHM322	5'	GGCCTTGAAXGACAGGCCG 3'
RNA <i>algD322</i>	3'	GCCGGAACU <u>U</u> GUCGUCCGGCU 5'

x: 10-23 DNAzyme katalytische Sequenz 5' GGCTAGCTACAACGA 3'

Unterstrichen: Schnittstelle der entsprechenden DNAzyme

Fett: LNA-Modifikationen

CPP: Zellpenetrierendes Peptid NH₂-(RXR)₄XB-SMCC-C6-Amino

2.3 Bakterienstämme

Bei neun der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme handelt es sich um *P. aeruginosa* Isolate von CF-Patienten des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM), Standort Gießen (EDCC5485, EDCC5486, EDCC5487, EDCC5488, EDCC5489, EDCC5504, EDCC5512, EDCC5513, EDCC5514). Die Herkunft der einzelnen Isolate sowie die, falls vorliegend, routinemäßig bestimmten Tobramycin-Resistenz kann Tabelle 2 entnommen werden. Zusätzlich wurde freundlicherweise von Dr. Jost Wingender (Universität Duisburg-Essen) das mukoide Abwasserisolat SG81 zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde bereits in der Literatur beschrieben [113].



Abbildung 7: Phänotyp *P. aeruginosa* Stämme auf MacConkey-Agar

In Schreibrichtung: EDCC5512, EDCC5513, EDCC5514, SG81, EDCC5485, EDCC5486, EDCC5487, EDCC5488, EDCC5489

Tabelle 2: Ursprung und Tobramycin MIC (Routine, Agar-Diffusionstest) der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Ursprung	Tobramycin MIC
EDCC5485	w 51 Jahre, Rachenabstrich	3 µg/mL
EDCC5486	m 39 Jahre, Bronchialsekret	1,5 µg/mL
EDCC5487	m 30 Jahre, Sputum	4 µg/mL
EDCC5488	w 15 Jahre, Sputum	3 µg/mL
EDCC5489	m 22 Jahre, Sputum	1 µg/mL
SG81	Abwasserisolat [113]	n. a.
EDCC5512	m 22 Jahre, Rachenabstrich	n. a.
EDCC5513	m 53 Jahre, Bronchialsekret	n. a.
EDCC5514	m 43 Jahre, Bronchialsekret	n. a.

2.3.1 *P. aeruginosa* Kultivierung und Lagerung

Die Stämme wurden als 30%ige Glycerin-Kulturen bei -80°C gelagert und bei Bedarf frisch aufgetaut. Jeder *P. aeruginosa* Stamm wurde einmal pro Woche auf eine frische MacConkey Agarplatte (Oxoid™) überimpft, anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend im Kühlschrank bei 5°C gelagert.

Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium (Lysogeny Broth Miller; 5 g/L Hefeextrakt (BD Bacto™ Yeast Extract), 10 g/L Trypton (BD Bacto™ Tryptone), 10 g/L NaCl (Sodium Chloride, Fluka 31434)) mit 2% Glukose versetzt in einen Schüttelkolben vorgelegt und mit einer Impfschlinge des entsprechenden Stammes angeimpft. Anschließend wurde die Flüssigkultur bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. LB-Agar Platten wurden aus LB-Medium versetzt mit 1,5% Agar (BD Bacto™ Agar) selbst gegossen.

2.4 Agarose-Gelelektrophorese

10-fach TBE-Puffer wurde angesetzt (108 g Tris, 55 g Borsäure, 20 mL EDTA 0,5 M pH 8,3 ad 1000 mL VE-Wasser). 40 mL des 10-fach Puffers wurde auf 400 mL mit VE-Wasser aufgefüllt, mit 1% Agarose versetzt und anschließend in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht. Das Agarosegel wurde auf ungefähr 50°C abgekühlt und mit einem Tropfen EtBr (5 mg/mL) versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken wurde das noch

flüssige Gel in eine Form gegossen dessen Taschenvolumen 20 μL betrug. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen waren. Anschließend wurde das Gel bis zum vollständigen Erstarren abkühlen gelassen. Das Agarosegel wurde in einfachem TBE-Puffer gelagert und die Gelelektrophorese bei 150 Volt für eine Stunde durchgeführt. Der verwendete Gel-Abschnitt wurde ausgeschnitten und unter UV-Licht im Gel-Dokumentationsgerät dokumentiert.

2.5 Sequenzierung von *algD*

Genomische DNA der einzelnen Stämme wurde mit dem PureLink[®] Genomic DNA mini Kit (Invitrogen[™]) nach Angaben des Herstellers isoliert und mittels NanoDrop[®] (ThermoFisherScientific[™]) quantifiziert. Für die anschließende Sequenzierung nach Sanger wurden je Stamm drei sich überlappende PCR-Produkte hergestellt, damit das gesamte *algD*-Gen zuverlässig sequenziert werden konnte. Die dafür verwendeten Primer können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Primer zur Sequenzierung von *algD*

Primer	Sequenz (5' → 3')	PCR Produkt
Fw1	AACGGCTCGCCAGATAGG	814 bp (-74 bis +740)
Rv1	TGGCAGATCACGTCCATCAC	
Fw2	TACGACTTCCCGCCGATG	671 bp (+502 bis +1172)
Rv2	GAACTCGCCACCACTTCGTC	
Fw3	GTGATCTGCCAGGACCACAA	674 bp (+730 bis +1403)
Rv3	GTTGTTGTTATGGCGCACG	

Die PCR wurde in 50 μL Ansätzen nach dem folgenden Schema unter einer sterilen Sicherheitswerkbank angesetzt:

25 μL Phusion[®] Mix (New England Biolabs GmbH, Frankfurt), 2,5 μL Vorwärts-Primer (100 pM), 2,5 μL Rückwärts-Primer (100 pM), 2 μL Template (125 ng/ μL) und 18 μL DNase freies Wasser. In einem Thermocycler wurde die PCR anschließend nach dem folgenden Schema durchgeführt:

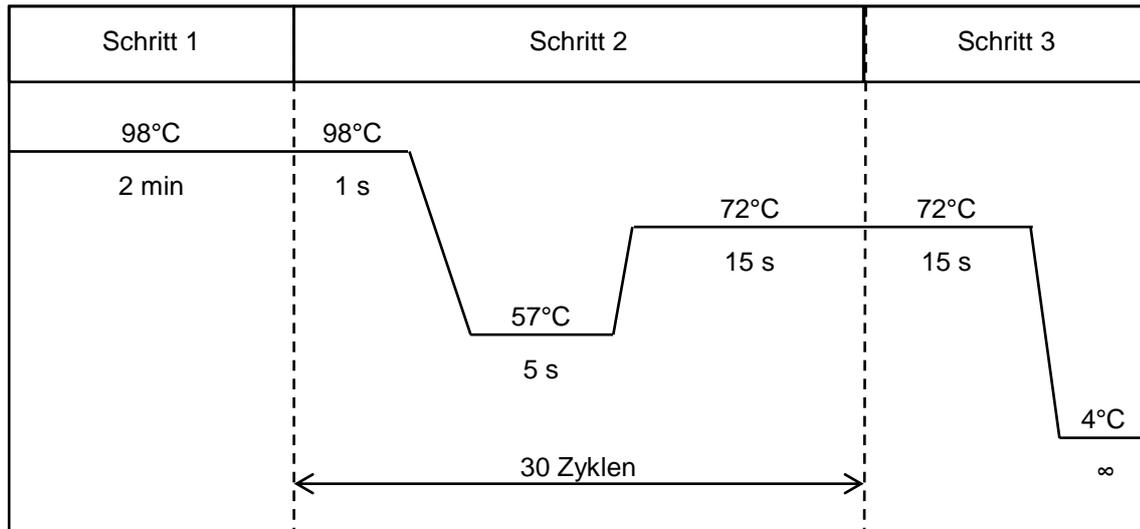


Abbildung 8: PCR für Sequenzierung

Für das PP1 (Primer-Paar 1) Fw1 und Rv1 wurde die Annealing-Temperatur von 57°C auf 62°C erhöht. Bei den PCRs der Stämme SG81 und EDCC5488 wurde das Template 10-fach verdünnt eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration mittels NanoDrop® bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Da das Agarosegel selbst EtBr enthielt, konnte direkt mit UV-Licht detektiert werden.

Jeweils 100 – 150 ng der drei PCR-Produkte wurden mit 2 µL des entsprechenden Vorwärts- oder Rückwärtsprimers (100 pM) versetzt, auf 10 µL mit Reinstwasser aufgefüllt und anschließend zur Sequenzierung nach Sanger den Kollegen am Institut für Pathologie übergeben.

2.5.1 Sequenz Analysen

Die Rohdaten der Sequenzierung nach Sanger wurden mit DNA Baser Version 4.36.0.2 (Heracle BioSoft) ausgewertet und die jeweils sechs überlappenden Sequenzen zu je einer *algD*-Sequenz zusammengeführt. Die darauffolgenden Sequenzalignments wurden mit CLC Sequence Viewer 7.61 durchgeführt.

Zusätzlich zu den neun sequenzierten Stämmen wurde auch ein Alignment mit *algD*-Sequenzen aus der Literatur durchgeführt. Es wurden 341 in der NCBI-Datenbank hinterlegte *algD*-Sequenzen gefunden. Sequenzen von Stämmen die nicht eindeutig aus

menschlichen pulmonalen Infektionen zugeordnet waren, wurden exkludiert. Aus den 122 verbleibenden Sequenzen wurde ein Alignment erstellt. Für eine Liste der 122 verwendeten Stämme siehe Anhang 4.

2.6 Design der DNAzyme

Da Bakterien keine Introns besitzen und die mRNA vom codogenen Strang (engl. „noncoding strand“ oder „antisense strand“) abgelesen wird, entspricht die mRNA Sequenz bis auf Thymin, dass im Fall von RNA durch Uridin ersetzt ist, der Sequenz des codierenden Strangs (engl. „coding strand“ oder „sense strand“).

Dz besitzen eine konstante katalytische Domäne, die von zwei Bindedomänen flankiert wird. Die Bindedomänen der Dz sind komplementär zur mRNA und besitzen somit dieselbe Sequenz wie der codogene Strang.

Prinzipiell können Dz zwischen jeder Purin-Pyrimidin-Basenabfolge schneiden. Über die entsprechende Purin-Base erstreckt sich das zentrale katalytische Motiv, sodass keine der flankierenden Bindedomänen mit ihr paart.

<i>algD</i> coding	3'	...ACATGAACTAGTAGAGCCGCTG...	5'
<i>algD</i> noncoding	5'	...TGTA CTT GATCATCTCGGCGAC...	3'
<i>algD</i> -mRNA	3'	...ACAUGAACU <u>AGU</u> AGAGCCGUG...	5'
DzTHM114	5'	ACTT <u>GAT</u> CAXCTCGGCGAC	3'
DzTHM115	5'	TGTACTTGAXCATCTCGGC	3'

Abbildung 9: Design zweier benachbarter 10-23 DNAzyme gegen den selben RNA-Abschnitt

x: 10-23 DNAzyme katalytische Sequenz 5' GGCTAGCTACAACGA 3'

Grün: Überschneidungen der beiden DNAzyme

Rot: Unterschiede der beiden DNAzyme

Unterstrichen: Schnittstelle der entsprechenden DNAzyme

2.7 AEX-HPLC

Die Anionenaustauscher-Methode zum Analysieren der Dz-Spaltkinetik entspricht der bereits veröffentlichten Methode [114]. Die Auftrennung des Nukleinsäure-Gemisches erfolgte über eine DNAPac™ PA200 4 × 250 mm (ThermoFisherScientific™) die auf 60°C temperiert wurde. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL und ein Gradient zwischen

Laufmittel A (4% TEAA, 10% ACN, 0,2 M NaClO₄ in Milli-Q® Wasser) und Laufmittel B (4% TEAA, 10% ACN in Milli-Q® Wasser) wurde nach Tabelle 4 durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen DAD, der die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm aufzeichnete.

Tabelle 4: AEX-HPLC Laufmittelgradient – Hoefler *et. al* [114]

Minute	Laufmittel A	Laufmittel B
0	39%	61%
2,5	47%	53%
5	54%	46%
7,5	60%	40%
10	65%	35%
12,5	69%	31%
15	72%	28%
15,1	100%	0%
18	100%	0%
18,1	0%	100%
20	0%	100%

2.7.1 Automatisierter HPLC Assay

Soweit nicht anders beschrieben, wurde zur Bestimmung der Kinetik Substrat-RNA (10 µM) in einem Reaktionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl in VE-Wasser, pH 5) gelöst und im Autosampler auf 35°C temperiert.

Durch Zugabe des Dz (2 µM) wurde die enzymatische Katalyse gestartet und die Substrat-RNA in ihre Produkte gespalten. Die Reaktion wurde durch die Injektion in die HPLC gestoppt und durch aufeinanderfolgende Injektionen konnte die Kinetik dargestellt werden. Für jede Kinetik wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte über Integration der Peakflächen mit der EZChrome Elite™ Software. Als Reaktionsgeschwindigkeit (v) wurde die Geschwindigkeit gewählt, die die beste lineare Regression ergab und dabei folgende Kriterien erfüllte:

- mindestens vier Messpunkte
- mindestens 10% Abbau
- maximal 50% Abbau

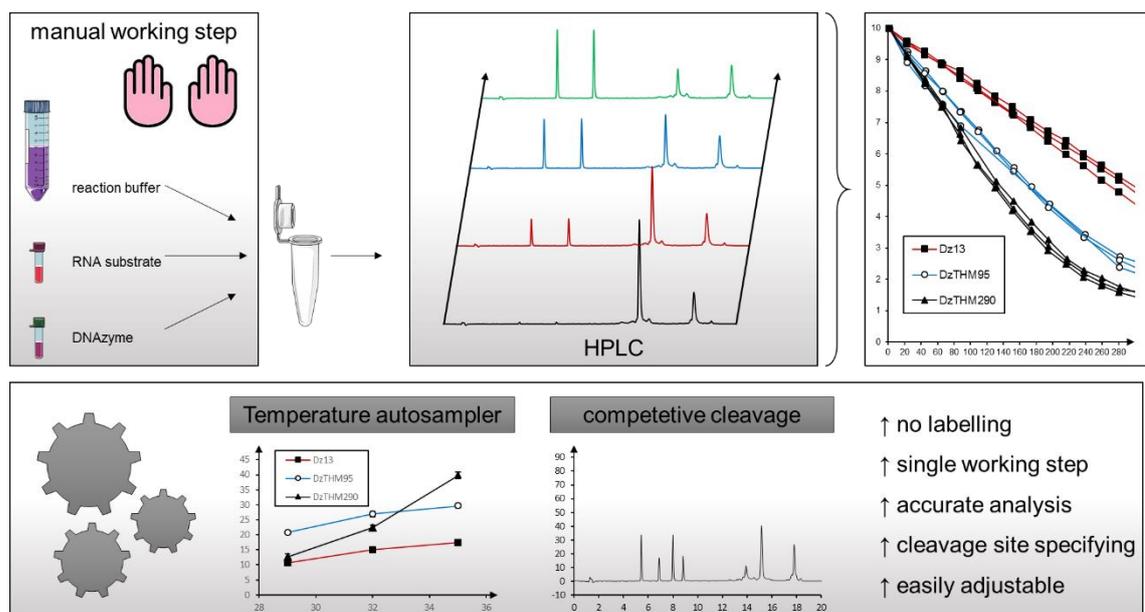


Abbildung 10: Arbeitsablauf des automatisierten HPLC Assay – Hoefer et. al [114]

2.8 Konventioneller Gel-Assay

Ein konventioneller Gel-Assay wurde mit DzTHM290 und RNA *algD290* dreifach durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem Thermoblock auf 35°C temperiert und alle 20 min wurden Proben gezogen. Diese wurden mit Ladepuffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 12 mM EDTA pH 8, 12% Ficoll, 0,01% Bromphenolblau und 7 M Harnstoff) abgestoppt und bis zum Auftragen in das Gel auf Eis gekühlt. Die Proben wurden auf ein 15%iges TBE-Urea PAGE-Gel (10 Well, 30 μ l #4566053) von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) aufgetragen und 1 h bei 200 V in TBE-Puffer laufen gelassen. Die Gele wurden im Anschluss für 5 min in einem EtBr-Bad gefärbt, bevor sie mit dem Gel-Dokumentationsgerät detektiert und anschließend mit

ImageJ 1.48v densitometrisch ausgewertet wurden. Die Intensitäten der Banden wurden auf die Intensität der jeweiligen Dz-Bande normiert.

2.9 RNA-Produktion *in vitro*

Nach dem folgenden Schema wurde die *algD*-mRNA *in vitro* hergestellt:

4240 bp circular Plasmid → PCR: 1970 bp dsDNA → T7-Transkription: 1678 nt ssRNA

Für die RNA-Produktion wurde ein Standardvektor (pEX-K4) von Invitrogen mit der Sequenz von +1 Position bis zum *algD*-Stopcodon versehen und zusätzlich mit einem T7-Promotor und T7-Terminator flankiert (vollständige Sequenz siehe Anhang 5).

Mit den beiden Primern pEX-K4-F „GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG“ und pEX-K4-R „CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC“ wurde *via* PCR (Abbildung 11) ein lineares Template (1970 bp dsDNA) hergestellt und anschließend mit QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt.

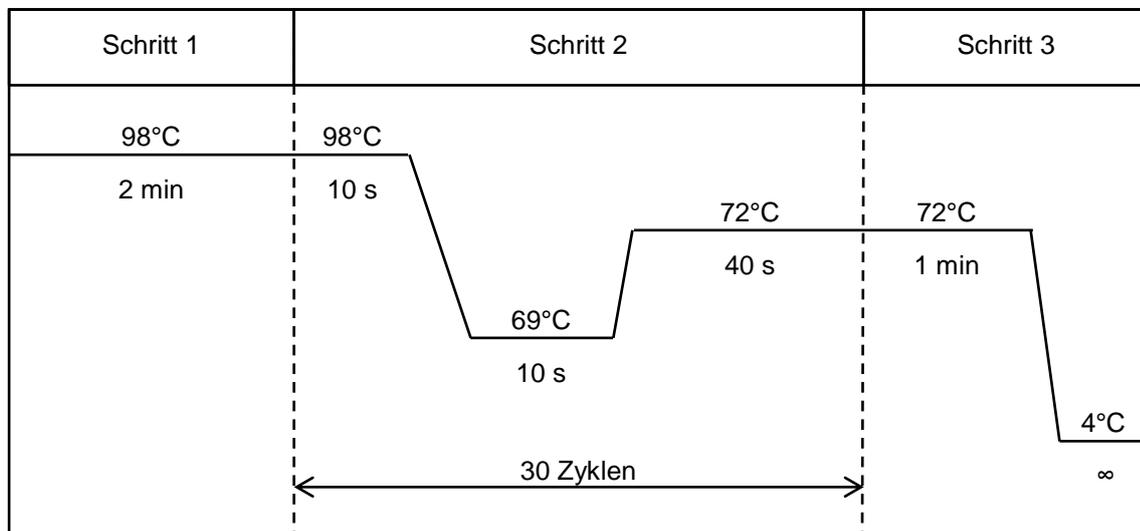


Abbildung 11: PCR Template für RNA-Transkription

Mit dem T7-Ribomax™ Kit von Promega wurde das Template bei 36°C für 35 min in 50 µL Ansätzen in RNA transkribiert. Nach DNA-Verdau bei 37°C für 30 min wurde die RNA mit RNeasy® Plus Mini Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen (Venlo,

Niederlande) aufgereinigt. Anschließend wurden Reinheit und Menge der RNA mittels Nanodrop® bestimmt.

2.10 RP-HPLC

Für die Versuche der mRNA-Spaltkinetik wurde eine DNAPac™ RP, Analytical, 4 µm, 2,1 x 100 mm von ThermoFisherScientific™ inklusive Vorsäule verwendet. Der Reaktionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl in Milli-Q® Wasser, pH 7) wurde mit der *in vitro* transkribierten mRNA im Autosampler temperiert und die Reaktion wurde durch Hinzupipettieren des entsprechenden Dz gestartet.

Das Injektionsvolumen betrug 5 µL und die Elution erfolgte mittels eines ACN-Gradienten (Tabelle 5) zwischen Laufmittel A (10% TEAA, 50% ACN in Milli-Q® Wasser) und Laufmittel B (10% TEAA, 50% ACN in Milli-Q® Wasser). Die Detektion erfolgte über einen DAD, der eine Wellenlänge von 260 nm detektierte. Die Auswertung wurde mit der EZChrome Elite™ Software durchgeführt.

Tabelle 5: Laufmittelgradient RP-HPLC Analytik

Minute	Laufmittel A	Laufmittel B	Gesamt %ACN
0	98%	2%	5,9
5	87%	13%	10,85
31	83%	17%	12,65
32	60%	40%	23
34	60%	40%	23
35	98%	2%	5,9
40	98%	2%	5,9

2.11 Biofilm Quantifizierung

Für die gravimetrische Bestimmung des Biofilms wurde zunächst das absolute Gewicht jedes Steril-Filters (Sigma Aldrich, Filter membrane 0,45 µm #Z355534, 69,398 cm²) in einer separaten Petrischale ausgewogen. Anschließend wurde der Filter auf eine Agarplatte überführt und eine Bakterienlösung mit einem Drigalski-Spatel darauf ausgestrichen. Nach 24 h oder 48 h Biofilmwachstum bei 37°C wurde der Biofilm

inklusive Sterilfilter mit einer Pinzette von der Agarplatte zurück in die entsprechende Petrischale überführt und die Differenz ermittelt.

2.12 Wachstumskurven

Um den Einfluss auf das Bakterienwachstum zu bestimmen wurden ÜNK mit frischem LB-Medium verdünnt und anschließend im Plate-reader bei 37°C inkubiert. Alle 20 min wurden dabei in einem 9 × 9 kreisgefülltem Abschnitt des Wells die OD₆₀₀ gemessen und gemittelt. Dafür wurden sterile Nunc™ 96-Well Mikrotiterplatten verwendet die transparent sind und einen flachen Boden haben. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Mikrotiterplatte 10 min lang geschüttelt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden sind im nachfolgenden in drei Teile gegliedert. Im ersten Teil wird dargestellt, wie das Ziel-Gen identifiziert und untersucht wurde. Im zweiten Teil wird auf das *in vitro* Screening der Dz eingegangen und verschiedene Aspekte der dafür neu entwickelten Methode aufgezeigt. Im dritten Teil werden die verschiedenen Untersuchungen mit *P. aeruginosa* dargestellt.

3.1 Ziel-Gen

Ziel war die Entwicklung eines neuen Oligonukleotid-Wirkstoffs, der die Ausbildung des mukoiden Biofilms von *P. aeruginosa* unterbindet und aufgrund geringer Nebenwirkungen prophylaktisch gegeben werden kann. Hierfür musste zunächst ein bakterielles Gen gefunden werden, welches maßgeblich für die Biofilmbildung verantwortlich ist und keine Homologie zu menschlichen Genen aufweist, sodass keine sequenzspezifischen Off-Target-Effekte zu erwarten sind.

3.1.1 Identifizierung

Maßgeblicher Bestandteil des Biofilms in Lungen von CF-Patienten ist Alginat. Dieses wurde als ein schützender Bestandteil des Biofilms gegenüber Tobramycin (Aminoglykosid-Antibiotikum) identifiziert [69], da es durch elektrostatische Wechselwirkungen die Antibiotikakonzentration reduziert, die das Bakterium erreichen [31]. Auch Tobramycin-sensitive Bakterien werden so durch den Alginat-Biofilm geschützt. Den Engpass der Alginat-Biosynthese bildet AlgD [52,53]. Das entsprechende Gen *algD* wird bei einem Shift zu mukoiden Stämmen aktiviert [57]. Bei Mutanten, in denen das Gen künstlich entfernt wurde ($\Delta algD$), konnte der vollständige Verlust des mukoiden Phänotyps beobachtet werden [65]. Bei nachträglicher Induktion von *algD* war dieser Effekt reversibel. Die Inhibition des darin kodierten Proteins AlgD zeigte, dass so sowohl die Alginat-Menge reduziert [67], als auch die Antibiotika-Sensitivität verbessert werden konnte [69].

Um die bakterielle Expression von *algD* zu verhindern, entschieden wir uns für die Entwicklung eines Dz. Diese sind pulmonal gut verträglich [86] und die Gefahr einer Übersättigung von körpereigenen RNA-Stoffwechselwegen wird vermieden [72].

Da lediglich zwei Bakteriengattungen (*Azotobacter*, *Pseudomonas*) und Braunalgen Alginat produzieren können, ist eine Homologie mit menschlichen Proteinen unwahrscheinlich. Eine Blastn®-Analyse der *algD*-Sequenz mit dem menschlichen Genom und Transkriptom ergab lediglich zwei homologe Sequenzabschnitte von einer Länge mit jeweils 20 nt (Position 792 – 811 mit NC_018913.2; Position 1277 – 1296 mit NC_018929.2 und NC_000018.10). In beiden Abschnitten schneidet jedoch kein Dz, dessen Bindedomänen nur innerhalb des 20 nt homologen Gen-Abschnitts paaren. Daher können Sequenzspezifische Nebenwirkungen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

3.1.2 Sequenzierung und Untersuchung von *algD*

Eine Punktmutation innerhalb der Zielsequenz kann zu einer fehlerhaften Basenpaarung (engl. „Mismatch“) mit dem Dz führen und einen Wirkverlust zur Folge haben. Demnach ist es wichtig eine hoch konservierte Region zu adressieren. Deshalb wurden die *algD*-Sequenzen von neun zur Verfügung stehenden Stämmen bestimmt. Für Stamm EDCC5485 sind die drei sich überlappenden PCR-Produkte, die für die Sequenzierung nach Sanger benutzt wurden, in Abbildung 12 abgebildet.

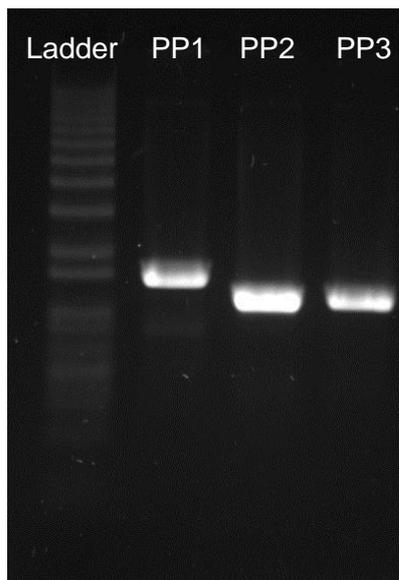


Abbildung 12: Überlappende PCR Produkte für *algD* Sequenzierung

PP1: 814 bp (-74 bis +740)

PP2: 671 bp (+502 bis +1172)

PP3: 674 bp (+730 bis +1403)

Alle sequenzierten Stämme enthielten dieselbe AlgD-Proteinsequenz. Es wurden nur vereinzelt stille Mutationen im *algD*-Gen gefunden. Abweichungen zur Sequenz des Referenzstamms PAO1 (Tabelle 6) traten in sechs der neun Stämme auf (siehe Tabelle 7). Sowohl das Protein AlgD, als auch sein zu Grunde liegendes Gen *algD* sind hochkonserviert.

Tabelle 6: PAO1 *algD*-Sequenz

1	ATGCGAATCA	GCATCTTTGG	TTTGGGCTAT	GTCTGGTGAG	TATGTGCTGG	CTGCCTGTCC
61	GCACGCGGTC	ATGAAGTCAT	TGGTGTGGAT	GTCTCCAGCA	CCAAGATCGA	CCTGATCAAC
121	CAGGGCAAGT	CGCCCATCGT	CGAACCGGGC	CTGGAAGCGT	TGTTGCAGCA	AGGCCGGCAG
181	ACCGGACGGC	TGTCGGGCAC	CACCGACTTC	AAGAAGGCCG	TGCTGGACTC	CGACGTATCG
241	TTCATCTGCG	TCGGCACGCC	GAGCAAGAAG	AACGGCGACC	TGGACCTGGG	CTACATCGAG
301	ACCGTCTGCC	GCGAGATCGG	CTTCGCCATC	CGCGAGAAGT	CCGAACGCCA	CACCGTGGTG
361	GTGCGCAGCA	CCGTACTGCC	GGGCACCGTC	AACAACGTGG	TGATCCCGCT	CATCGAGGAC
421	TGCTCGGGCA	AGAAGGCCGG	GGTCGACTTC	GGCGTCGGCA	CCAACCCCGA	ATTCCTCCGC
481	GAGAGCACCG	CGATCAAGGA	CTACGACTTC	CCGCCGATGA	CCGTGATCGG	CGAACTGGAC
541	AAGCAGACCG	GCGACCTTCT	CGAGGAAATC	TACCGCGAGC	TGGACGCGCC	GATCATCCGC
601	AAGACCGTCG	AGGTCGCCGA	GATGATCAAG	TACACCTGCA	ACGTCTGGCA	CGCCGCCAAG
661	GTCACCTTCG	CCAACGAGAT	CGGCAACATC	GCCAAGGCCG	TCGGCGTCTGA	CGGCCGCGAG
721	GTGATGGACG	TGATCTGCCA	GGACCACAAG	CTCAACCTGT	CGCGCTACTA	CATGCGTCCC
781	GGCTTCGCTT	TCGGCGGCTC	CTGCCTGCCC	AAGGATGTAC	GCGCCCTCAC	CTATCGCGCC
841	AGCCAGCTGG	ACGTCGAGCA	CCCAGTGCTC	GGTTCGTTGA	TGCGCAGCAA	CTCCAACCAG
901	GTGCAGAAGG	CCTTCGATCT	CATCACCAGC	CACGACACCC	GCAAGGTCGG	CCTGCTCGGC
961	CTGTCGTTCA	AGGCCGGCAC	CGACGATTTG	CGCGAAAGCC	CGCTGGTGGA	GCTGGCCGAG
1021	ATGCTCATCG	GCAAGGGCTA	CGAGTTGCGC	ATCTTCGACC	GCAACGTCGA	ATACGCGCGT
1081	GTCCACGGGG	CCAACAAGGA	ATACATCGAG	TCCGAAGATCC	CGCACGTCTC	CTCACTGTG
1141	GTCTCCGACC	TCGACGAAGT	GGTGGCGAGT	TCCGATGTGC	TGGTGCTGGG	CAATGGCGAC
1201	GAGCTGTTTCG	TCGACCTGGT	GAACAAGACC	CCGAGCGGCA	AGAAGCTGGT	CGACCTGGTG
1261	GGCTTCATGC	CGCACACCAC	CACTGCCAG	GCCGAGGGCA	TCTGCTGGTA	G

Tabelle 7: Unterschiede der sequenzierten Bakterienstämme in *algD*-Sequenz

Stamm	Ursprung	Unterschiede zu Stamm PAO1
EDCC5485	W 51 Jahre, Rachenabstrich	unveränderte Sequenz
EDCC5486	M 39 Jahre, Bronchialsekret	G630A, T877C, T918C, T987C, T988C, T1045C, A1134G
EDCC5487	M 30 Jahre, Sputum	G492C
EDCC5488	W 15 Jahre, Sputum	G492C
EDCC5489	M 22 Jahre, Sputum	unveränderte Sequenz
SG81	Abwasserisolat [113]	unveränderte Sequenz
EDCC5512	M 22 Jahre, Rachenabstrich	G288A, A1134G
EDCC5513	M 53 Jahre, Bronchialsekret	G492C
EDCC5514	M 43 Jahre, Bronchialsekret	G492C

Um eine aussagekräftigere Konsensussequenz von *algD* zu erhalten und so Überschneidungen mit variablen Basen bei dem Design der Dz zu vermeiden, wurden 122 *algD*-Sequenzen von Stämmen, die bei NCBI hinterlegt waren, in die Analyse eingeschlossen. Bei den so zusätzlich analysierten Stämmen (Anhang 4) konnte ebenfalls eine hohe Konservierung der Proteinsequenz festgestellt werden (100% Übereinstimmung bei 118 von 122 Stämmen). Exakt die Hälfte der 122 Stämme besaß keine Mutationen im Vergleich zur *algD*-Sequenz von PAO1. Zwei Stämme enthielten

eine einzelne ausgetauschte Aminosäure (NZ_CP008871.1, NZ_CP008860.1), ein Stamm enthielt zwei ausgetauschte Aminosäuren (NZ_KI519271.1) und ein weiterer Stamm verlor durch eine Deletion an Position 1232 sein Leseraster (NZ_CP008862.1). Die anderen 57 Stämme enthielten an 33 der 1311 Nukleinbasen stille Mutationen (Tabelle 8).

In den im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten *P. aeruginosa* Stämmen konnte im Vergleich zur Konsensussequenz aus der Literatur (Tabelle 8) eine zusätzliche Mutation G288A des *algD*-Gens identifiziert werden.

Tabelle 8: Konsensussequenz von 122 in der Literatur beschriebenen klinisch bedeutsamen *P. aeruginosa* Stämmen – Hoefler *et al.* [114]

1	ATGCGAATCA	GCATCTTTGG	TTTGGGCTAT	GTCGGTGCAG	TATGTGCTGG	CTGCCTGTCTG
61	GCACGCGGTC	ATGAAGTCAT	TGGTGTGGAT	GTCTCCAGCA	CCAAGATCGA	CCTGATCAAC
121	CAGGGCAART	CGCCCATCGT	CGAACCAGGC	CTGGAAGYGT	TGTTGCAGCA	AGGCCGGCAG
181	ACCGGACGGC	TKTCGGGCAC	CACCGAYTTC	AAGAAGGCY	TGCTGGACTC	CGACGTATCG
241	TTCATCTGCG	TCGGCACGCC	GAGCAAGAAG	AACGGCGACC	TGGACCTGGG	CTACATCGAG
301	ACYGTCTGCC	GCGAGATCGG	CTTCGCCATC	CGCGAGAAGT	CCGAACGCCA	CACCGTRGTG
361	GTGCGCAGCA	CYGT RCTGCC	GGGCACCGTC	AACAACGTGG	TGATCCCGCT	RATCGAGGAC
421	TGCTCGGGCA	AGAAGGCCGG	GGTCGACTTC	GGCGTCGGCA	CCAACCCCGA	RITTCCTCCGC
481	GAGAGCACCG	CSATCAAGGA	CTACGACTTC	CCGCCGATGA	CCGTGATCGG	CGAACTGGAC
541	AAGCAGACCG	GCGACCTKCT	CGAGGAAATC	TACCGCGAGC	TGGACGCGCC	GATCRITCCGC
601	AAGACCGTCG	AGGTCGCCGA	GATGATCAAR	TACACCTGCA	ACGTCTGGCA	CGCCGCCAAG
661	GTCACCTTCG	CCAACGAGAT	CGGCAACATC	GCCAAGGCGG	TCGGCGTCGA	CGGCCGCGAG
721	GTGATGGACG	TGATCTGCCA	GGACCACAAG	CTYAACTGT	CGCGCTACTA	CATGCGTCCC
781	GGCTTCGCCT	TCGGCGGCTC	CTGCCTGCCC	AAGGATGTAC	GCGCCCTCAC	CTATCGCGCC
841	AGCCAGYTGG	ACGTCGAGCA	CCCGATGCTC	GGTTCGYTGA	TGCGCAGCAA	CTCCAACCAG
901	GTGCAGAAGG	CCTTCGAYCT	CATCACCAGC	CACGACACCC	GCAAGGTCGG	YCTGCTCGGC
961	CTGTCGTTCA	AGGCCGGCAC	CGACGAYYTG	CGCGAAAGYC	CGCTGGTGGA	GCTGGCCGAG
1021	ATGCTCATCG	GCAAGGGCTA	CGAGYTGC	ATCTTCGACC	GCAAYGTCGA	ATACGR RCGT
1081	GTCCACGGGG	CCAACAAGGA	ATACATCGAG	TCGAAGATCC	CGCR RCGTCTC	CTCR YTGCTG
1141	GTCTCCGACC	TCGACGAAGT	GGTGCCGAGT	TCCGAYGTGC	TGGTGCTGGG	CAATGG YGAC
1201	GAGCTRITTCG	TCGACCTGGT	GARCAAGACC	CCGAGCGGCA	AGAAGCTGGT	CGACCTGGTG
1261	GGCTTCATGC	CGCACACCAC	CACTGCCAG	GCCGAGGGCA	TCTGCTGGTA	G

K \triangleq G oder T

R \triangleq A oder G

S \triangleq G oder C

Y \triangleq C oder T

3.2 DNAzym Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gegen das zuvor beschriebene Gen *algD* Dz entworfen und die erfolgversprechendsten Dz untersucht. Für die *in vitro* Untersuchung der Dz wurde eine neue Methode entwickelt, mit der verschiedene Aspekte beleuchtet wurden.

3.2.1 Design

Es wurden zunächst 341 mögliche Dz-Schnittstellen identifiziert die im *algD*-Gen von PAO1 liegen. Diese wurden nach der Position ihrer Spaltstellen (AC, AU, GC, GU) innerhalb des *algD*-Gens aufsteigend durchnummeriert: AC(88): DzTHM1 – DzTHM88, AU(50): DzTHM89 – DzTHM138, GC(133): DzTHM139 – DzTHM(271) und GU(70): DzTHM272 – DzTHM341. In der Literatur wurden Schnittstellen bei denen einer Purin-Base zwei Uridin folgen als besonders effizient identifiziert [75,115–117] und somit wurden insbesondere die Dz DzTHM95 (AUU-Schnittstelle) sowie die DzTHM272, DzTHM290, DzTHM317 und DzTHM322 (GUU-Schnittstelle) weiter untersucht.

3.2.2 Analytik

Um effektive Dz zu identifizieren wurde ein neues Screening-Verfahren entwickelt. Die Reaktion findet dabei in einem temperierten HPLC-Autosampler statt. Nach jedem Probenzug wird durch denaturierende Bedingungen in der HPLC die Reaktion abgestoppt und die einzelnen Bestandteile durch ihre unterschiedlichen Verweilzeiten auf der Säule aufgetrennt und am Detektor quantifiziert.

Das Verfahren wurde mit dem bekannten Dz Dz13, das bereits klinische Studien erreichte, und seinem Substrat verifiziert [84]. Ein 24 nt langer Abschnitt des Substrats RNA c-Jun(24) wurde gewählt, der von Dz13 in zwei bekannte CP („Cleavage Products“ – Spaltprodukte) der Länge 10 nt und 14 nt geschnitten wird. Die Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide können Tabelle 1 entnommen werden. Die neue HPLC-Methode ermöglicht es das Dz, das Substrat und seine Reaktionsprodukte aufzutrennen und gleichzeitig deren Peakflächen zu quantifizieren (Abbildung 13, A). Verschiedene Standards, die unterschiedlichen Spaltstellen entsprechen, wurden in einem separaten Chromatogramm (Abbildung 13, B) gemessen. Da es sich bei der chromatographischen Trennung um eine Anionen-Austauscher-Chromatographie handelt, beeinflusst ein

zusätzliches Phosphat maßgeblich die Retentionszeit (siehe „RNA c-Jun(10)“ im Vergleich zu „RNA c-Jun(10)+3'P“, Abbildung 13, B). Bei der Hydrolyse von RNA durch Dz entsteht ein intramolekularer 2',3'-Phosphatester am neu entstandenen 3'-Ende des CP, der nicht standardmäßig synthetisiert werden kann. Die Methode bietet also eine exakte Analyse der Schnittstelle durch die Bestimmung der beiden CP[Dz13]. Mit synthetisch hergestellten Standards können sowohl Edukte, als auch Produkte genau über die Peakflächen quantifiziert werden.

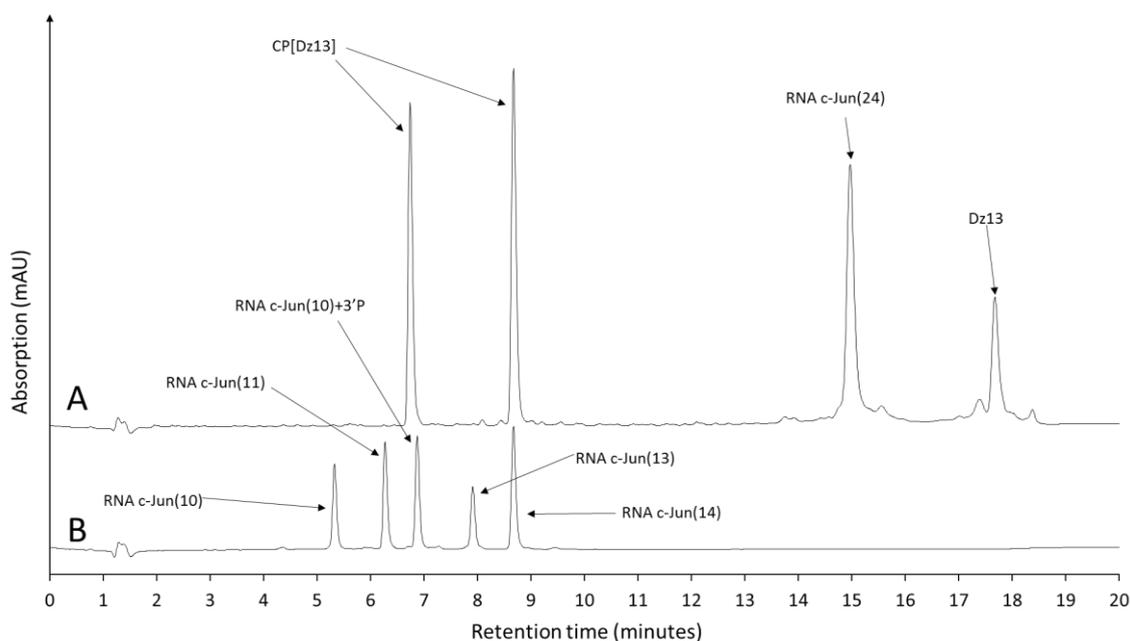


Abbildung 13: (A) Spaltmuster von Dz13 und RNA c-Jun(24); (B) Verschiedene Längenstandard Teilstücke von RNA c-Jun(24) – Hoefler *et. al* [114]

3.2.3 Automatisierter HPLC Assay

Die Besonderheit der HPLC-Methode ist seine automatisierte Durchführung. Die bislang manuell durchgeführten Arbeitsschritte (Probenzug, Abstoppen der Reaktion und anschließende Analyse mittels Gelelektrophorese) können mit dieser Methode eingespart werden. Der Autosampler muss temperiert sein, damit die Reaktion unter kontrollierten Bedingungen in ihm stattfinden kann. Die darauffolgende Analyse wurde nach dem Schema von Abbildung 10 durchgeführt. Lediglich Substrat, Puffer und Dz müssen in ein HPLC-Vial zusammen pipettiert werden und die HPLC stets aus demselben Vial injizieren, um eine vollständige Kinetik zu erhalten. Die erste Injektion wird sofort nach der Hinzugabe des Dz in das im Autosampler vortemperierte

Reaktionspuffer-Substrat-Gemisch gestartet. Das erste Chromatogramm (Abbildung 14, A) zeigt je einen Peak für das verwendete Substrat und das entsprechende Dz. Hier können bereits Substrat und Dz quantifiziert und ihre jeweiligen Konzentrationen überprüft werden. Durch aufeinanderfolgende Injektionen aus demselben HPLC-Vial kann die entsprechende Kinetik der Reaktion nachverfolgt werden (Abbildung 14, B → C → D). Der Substrat Peak nimmt im Laufe der Reaktion ab und die beiden CP-Peaks nehmen dementsprechend zu.

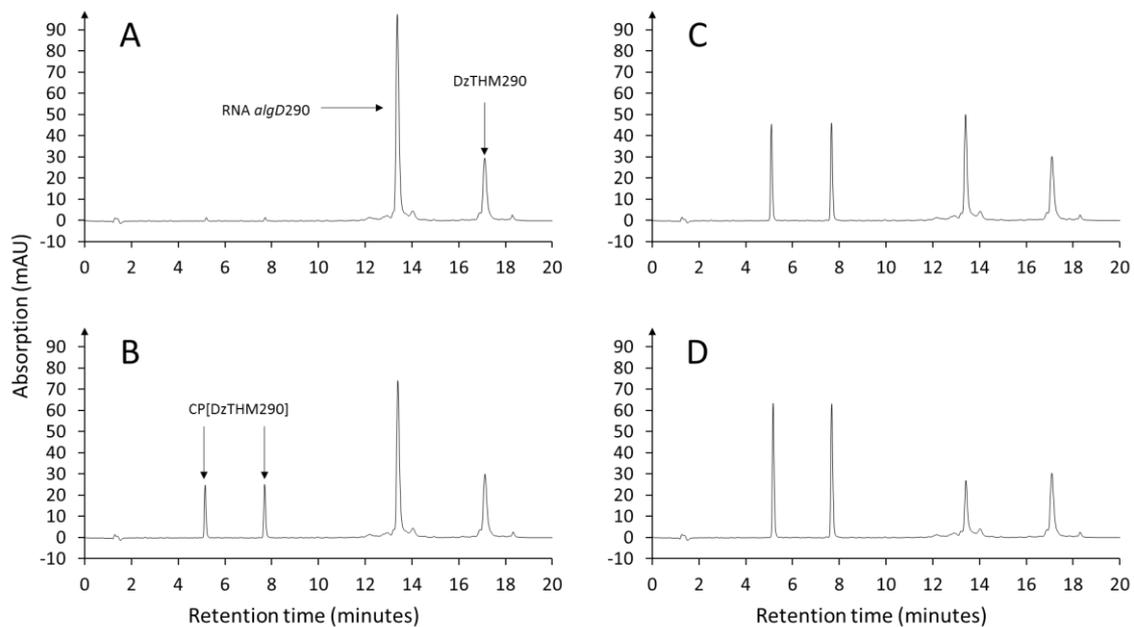


Abbildung 14: Exemplarische DNAzym Spaltkinetik von DzTHM290 und dem synthetischen Substrat RNA *algD290* – Hofer *et. al* [114]

A → B → C → D: Verlauf der Spaltkinetik von DzTHM290 vs. RNA *algD290*

Durch das Auftragen der Änderung der Peakflächen gegenüber der Zeit, die seit Beginn der Reaktion vergangen ist, kann eine sehr präzise Abbaukinetik dargestellt werden (Abbildung 15). Nach den ersten beiden Analysen kann bereits die Spaltgeschwindigkeit eingeschätzt werden und diverse Fehler (falsche Konzentrationen, falsches Dz, falscher Puffer) werden sichtbar.

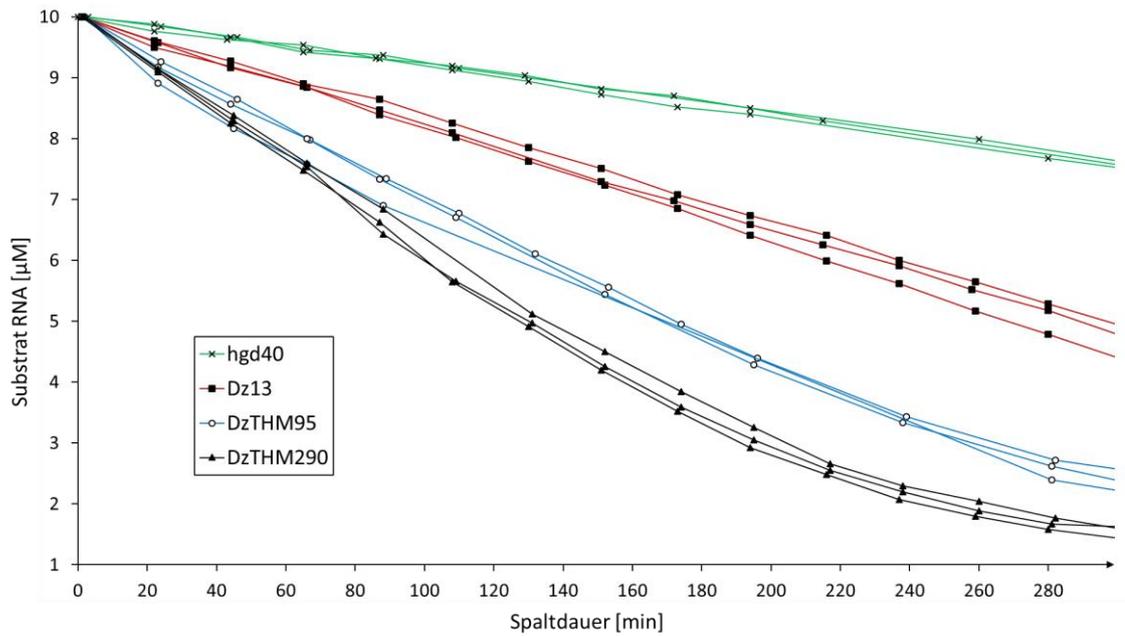


Abbildung 15: Spaltkinetik verschiedener DNAzyme – Modifiziert nach Hoefler *et. al* [114]

Folgende Spaltgeschwindigkeiten konnten mit dieser Methode für die entsprechenden Dz bestimmt werden (Tabelle 9). Jeder Spaltgeschwindigkeit liegen drei Einzelmessungen zugrunde. Die Durchschnittswerte der Bestimmtheitsmaße (ØR^2) geben an, wie linear die jeweiligen Abbaugeschwindigkeiten der einzelnen Messungen sind. Der Standardfehler der Geschwindigkeiten gibt an, wie groß die Schwankungen der drei Messungen untereinander sind.

Tabelle 9: DNAzym Spaltgeschwindigkeiten bei 35°C – Modifiziert nach Hoefler *et. al* [114]

Name	v in nM/min	Relativ zu Dz13	ØR ²	ΔG _{min(Substrat)} in kcal/mol
DzTHM317	0,28 ± 0.06	0,02	0,8106	-2,5
DzTHM110	0,49 ± 0,08	0,03	0,8171	-3,2
DzTHM114	0,76 ± 0,02	0,04	0,9634	-0,6
DzTHM322	2,08 ± 0,14	0,12	0,9879	-10,4
DzTHM272	7,39 ± 0,94	0,42	0,9987	-1,9
hgd40	8,16 ± 0,02	0,47	0,9984	-0,1
DzTHM115	11,34 ± 1,12	0,65	0,9992	-0,6
Dz13	17,51 ± 0,85	1	0,9879	0,1
DzTHM95	29,63 ± 0,75	1,69	0,9992	-1,0
DzTHM290	39,79 ± 1,12	2,27	0.9999	-0,4

3.2.4 Kompetitiver Spaltassay

Um die weiteren Möglichkeiten der Screening-Methode darzustellen wurden zwei Dz konzipiert, die denselben RNA-Abschnitt an benachbarten Schnittstellen hydrolysieren (Abbildung 9 und Tabelle 1; DzTHM114, DzTHM115, RNA *algD1145*). Aus den separat durchgeführten Spaltversuchen war bereits bekannt, dass DzTHM115 ungefähr 15-fach schneller schneidet als DzTHM114 (Tabelle 9). Wenn beide Dz gleichzeitig dasselbe Substrat schneiden, ergeben sich vier Abbauprodukte (Abbildung 16, A und B). Das Verhältnis der Summen der Peakflächen entspricht dabei ungefähr dem Verhältnis der separat ermittelten Geschwindigkeiten.

Anhand der Position der Dz-Schnittstellen und der Retentionszeit der CP lassen sich die CP ihren entsprechenden Dz zuordnen. Das Substrat RNA *algD1145* besitzt 22 Nukleoside und 21 Phosphatgruppen (22N/21P). Die dem 5'-Ende zugewandten CP besitzen dabei den zuvor beschriebenen intramolekularen 2',3'-Phosphatester an ihrem neu entstandenen 3'-Ende. DzTHM115 spaltet das Substrat in das CP[DzTHM115] vom 5'-Ende des Substrats mit 13N/13P und in das die CP[DzTHM115] vom 3'-Ende des Substrats mit 9N/8P. DzTHM114 spaltet näher am 5'-Ende und produziert demnach ein kürzeres CP[DzTHM114] vom 5'-Ende des Substrats mit 10N/10P und ein längeres CP[DzTHM114] vom 3'-Ende des Substrats mit 12N/11P. Da die Anzahl der Phosphatgruppen hauptauschlaggebend für die Retentionszeit bei der AEX-HPLC sind,

ist eine Zuordnung der beiden inneren CP zu DzTHM114 auch ohne Hinzunahme von Längenstandards möglich.

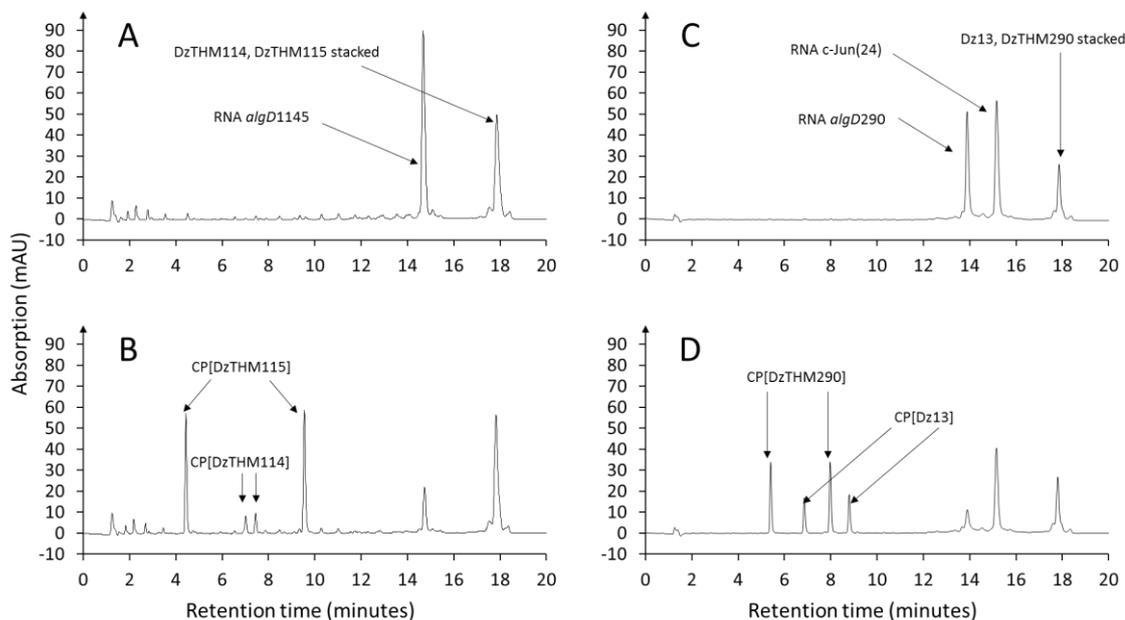


Abbildung 16: Kompetitiver und Benchmark Spaltassay – Hoefler et. al [114]

A → B: Kompetitiver Spaltassay: DzTHM114 + DzTHM115 vs. RNA *algD1145*

C → D: Benchmark Spaltassay Dz13 vs. RNA *c-Jun(24)*, DzTHM290 vs. RNA *algD290*

3.2.5 Benchmark Spaltassay

Wie bei dem kompetitiven Spaltassay können mit dem Benchmark Spaltassay zwei Dz-Kinetiken zeitgleich bestimmt werden (Abbildung 16, C → D). Hierbei spalten Dz13 und DzTHM290 ihre beiden separaten Substrate RNA *algD290* und RNA *c-Jun(24)*. Auch bei diesem Benchmark Spaltassay war DzTHM290 über doppelt so schnell wie Dz13, was auch bei den unabhängig voneinander ermittelten Analysen der Fall war. Die Peaks konnten ebenfalls über die Anzahl der Phosphatgruppen zugeordnet werden. Lediglich die Peaks von Dz13 (34N/32P) und DzTHM290 (33N/32P) können nicht unterschieden werden. Das zusätzliche Nukleosid von Dz13 (3'-invertiertes Thymidin) beeinflusst die Retentionszeit nicht genügend um die beiden Dz-Peaks voneinander zu trennen. Die beiden Substrate RNA *c-Jun(24)* (24N/23P) und RNA *algD290* (22N/21P) sowie die beide CP[Dz13] mit 14N/13P bzw. 10N/10P und die beiden CP[DzTHM290] mit 11N/11P bzw. 10N/9P können eindeutig zugeordnet werden.

3.2.6 Temperaturabhängigkeit

Um den Einfluss der Temperatur auf die Spaltgeschwindigkeit der Dz zu bestimmen, wurde der Autosampler auf verschiedene Temperaturen temperiert. So kann untersucht werden, ob die Temperatur verschiedener Applikationsorte (pulmonal, kutan) oder äußere Bedingungen (Temperatur der Einatemluft) Einfluss auf die Aktivität der Dz generell als Wirkstoffe haben kann. Die beiden aktivsten Dz des vorhergegangenen Screenings und die beiden Kontroll-Dz Dz13 und hgd40 wurden dafür auf ihre Temperaturempfindlichkeit untersucht. Es wurden neben 35°C auch 32°C und 29°C untersucht. Höhere Temperaturen als 35°C konnten aufgrund der technischen Limitierung des Autosamplers nicht zuverlässig konstant gehalten werden. Der Temperatureinfluss kann Abbildung 17 entnommen werden. Die Spaltgeschwindigkeit nimmt bei allen untersuchten Dz von 29°C nach 35° zu. DzTHM290 zeigte dabei die größte Zunahme der Spaltgeschwindigkeit von $12,71 \pm 1,00$ nM/min bei 29°C, auf $22,48 \pm 0,74$ nM/min bei 32°C, bis hin zu $39,79 \pm 1,12$ nM/min bei 35°C. Die Spaltgeschwindigkeit von hgd40 stieg von 29°C ($3,01 \pm 0,13$ nM/min) auf 35°C ($8,16 \pm 0,02$ nM/min) um das 2,7-fache an.

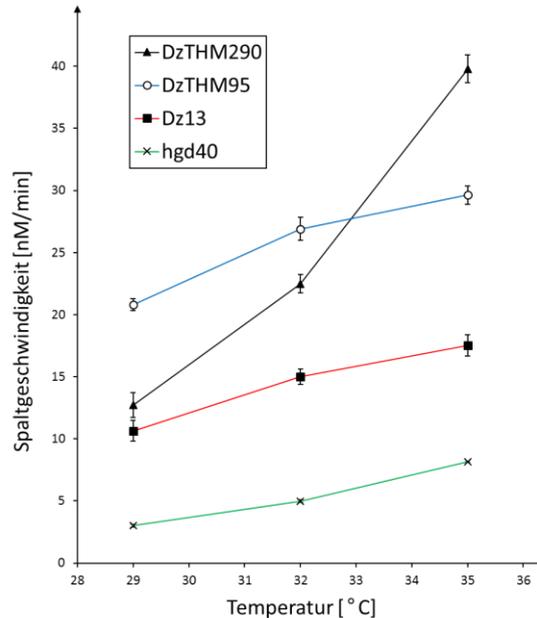


Abbildung 17: Temperaturabhängigkeit von DNAzym Spaltkinetik – Modifiziert nach Hoefler *et. al* [114]

3.2.7 Konventioneller PAGE-Assay

Ein konventioneller PAGE-Assay wurde für DzTHM290 durchgeführt, um die beiden Methoden miteinander zu vergleichen. Es wurde eine Spaltgeschwindigkeit von $15,64 \pm 1,42$ nM/min bei 35°C mit einem R^2 von $0,8621 \pm 0,1154$ gemessen [114]. Der Vorteil des konventionellen Gel-Assays ist die Flexibilität bei der Wahl der Probenzeitpunkte, sodass auch in kürzester Zeit mehrere Proben gezogen werden können. Nachteile sind neben den vielen manuellen Arbeitsschritten (Pipettieren, Gelelektrophorese, Färben, Dokumentieren), dass keine Zwischenergebnisse über den Verlauf der Reaktion erhoben werden können.

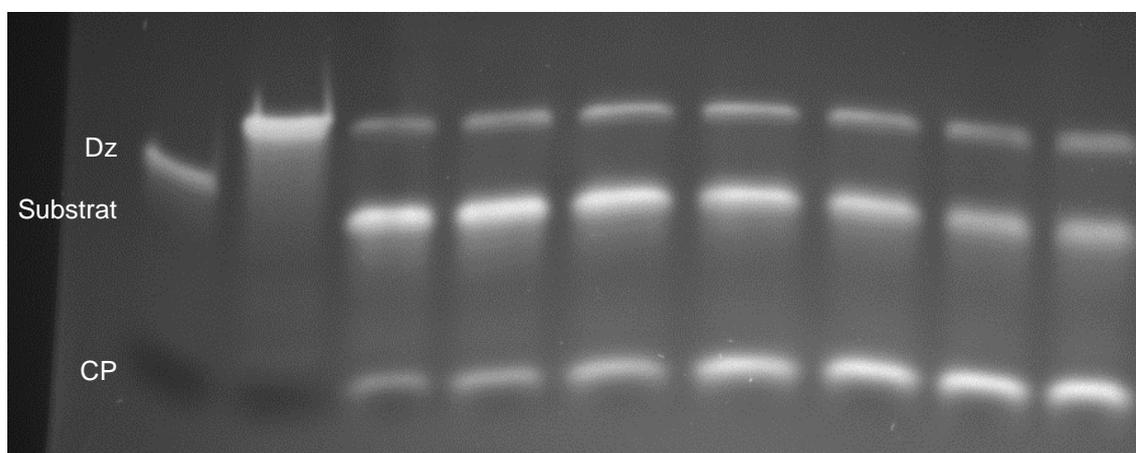


Abbildung 18: Exemplarischer DNazym PAGE-Assay

Von links nach rechts: RNA *algD290*, DzTHM290, 0 min, 20 min, 40 min, 60 min, 80 min, 100 min, 120 min

3.2.8 Einfluss von *algD*-mRNA Sekundärstruktur

Die *algD*-mRNA ist in der Lage umfangreiche Sekundärstrukturen auszubilden (siehe Abbildung 19), die einen Einfluss auf die Aktivität von Dz haben können. Die freie Enthalpie ΔG_{\min} für die Ausbildung dieser Sekundärstruktur beträgt $-645,41$ kcal/mol.

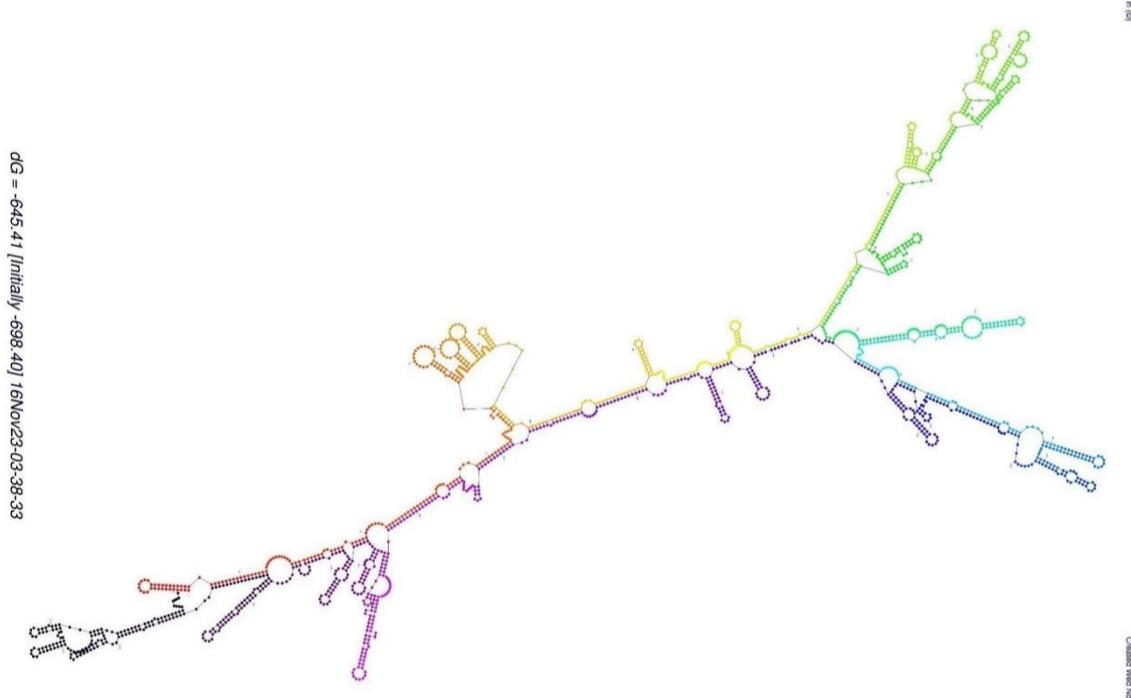


Abbildung 19: Eine von MFold [112] prognostizierte Sekundärstruktur der *algD*-mRNA von PAO1

Um den Einfluss dieser Sekundärstrukturen auf die Spaltgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde nach dem Schema in Abbildung 20 *algD*-mRNA *in vitro* transkribiert und aufgereinigt.

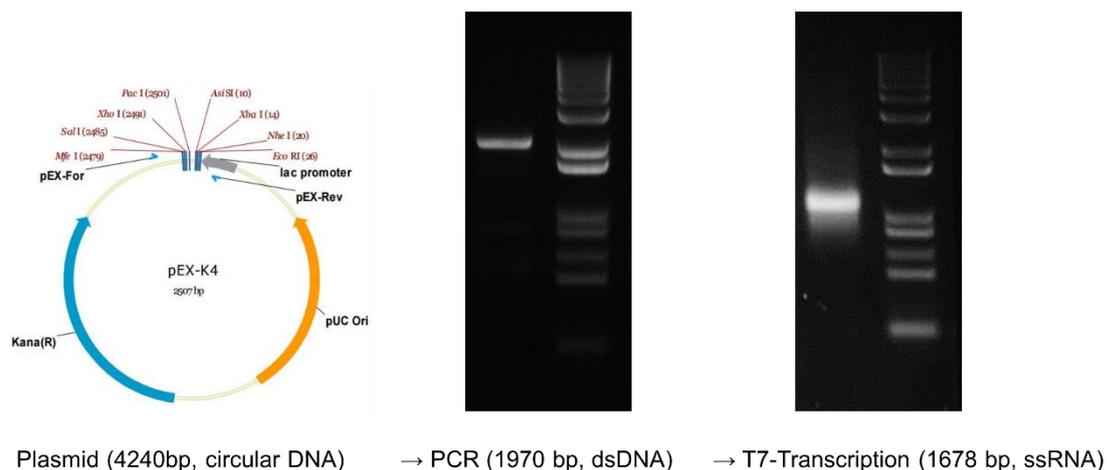


Abbildung 20: Schema der *in vitro* *algD*-mRNA Produktion

Mit dieser *algD*-mRNA wurden Spaltassays durchgeführt, doch die zuvor als besonders aktiv identifizierten Dz (DzTHM290, DzTHM95, DzTHM115) bauten diese nur unzureichend ab (<1% Degradation über >24 h). Auch ein Gemisch aus 50 Dz

(Anhang 3) zeigte lediglich eine vernachlässigbare Aktivität gegenüber der 1678 nt *algD*-mRNA. Über eine Reaktionsdauer von vier Tagen konnte hier ein dynamisches Abbaumuster der *algD*-mRNA beobachtet werden, bei dem sich der Hauptpeak wie eine Wanderdüne in Richtung kürzer werdender Fragmente bewegte. Einzelne Abbaupeaks, die auf ein einzelnes Dz schließen ließen, konnten dabei nicht identifiziert werden. Eine basengenaue Auftrennung war lediglich bei den kurzen Oligonukleotiden (bis 35 nt) möglich. Besonders bei Gemischen mit längeren RNA- und DNA-Molekülen ist eine exakte Auflösung nicht möglich gewesen.

3.2.9 Einfluss von LNA-Modifikationen auf die DNAzym-Spaltkinetik

Um die Aktivität der Dz gegenüber der mRNA zu verbessern, wurden LNA-Modifikationen untersucht. Die Modifikation mit LNAs führte bei LzTHM290a, LzTHM290b und LzTHM290c gegenüber der kleinen synthetischen RNA *algD290* zu einer Reduktion der Spaltgeschwindigkeit (Abbildung 21). Dabei war nicht die Anzahl, sondern vielmehr die Position der Modifikation entscheidend. LzTHM290a besitzt jeweils drei LNA-Bausteine an seinen Enden anstelle von DNA und zeigte noch einen Großteil seiner katalytischen Funktion, während LzTHM290b und LzTHM290c, mit insgesamt vier LNA-Modifikationen pro Dz in der Mitte ihrer Bindearme, einen Großteil ihrer Wirkung einbüßten.

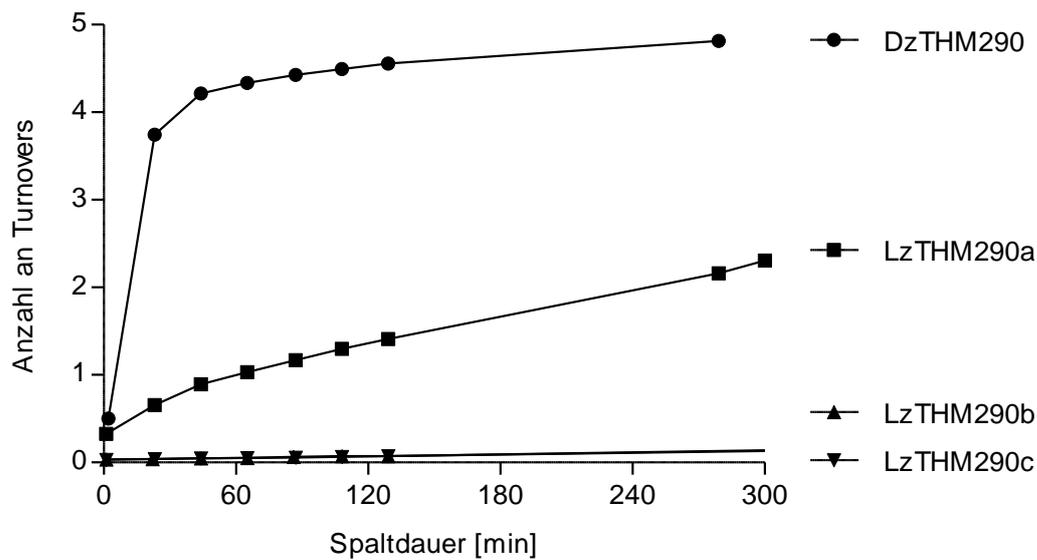


Abbildung 21: LNAzym Spaltkinetiken gegenüber kurzem Substrat

Spaltung von RNA *algD290* durch entsprechende DNAsen; Reaktion mit Puffer pH 7

Obwohl die modifizierten Dz einen Teil ihrer Aktivität gegenüber dem kurzen Substrat verloren, wurde durch die Modifikationen die Zugänglichkeit gegenüber der 1678 nt langen *algD*-mRNA verbessert und so ihre Spaltgeschwindigkeit erhöht. So konnte LzTHM290a die *algD*-mRNA in absehbarer Zeit degradieren (Abbildung 22).

Nach der Spaltung von *algD*-mRNA durch LzTHM290a entstehen theoretisch zwei CP mit einer Länge von 607 nt und 1071 nt. Das kleinere der beiden CP ist dem 5'-Ende des Substrats zugewandt und besitzt eine einheitliche Länge (Abbildung 22, t_{4h+} bei *b*). Das CP, das dem 3'-Ende des Substrats zugewandt ist, besitzt mehrere Längen (Abbildung 22, t_{4h+} bei *c*). Der Doppelpeak in Abbildung 22 (t_0 bei *d*) ist somit auf unterschiedliche Längen des 3'-Endes der *algD*-mRNA zurückzuführen.

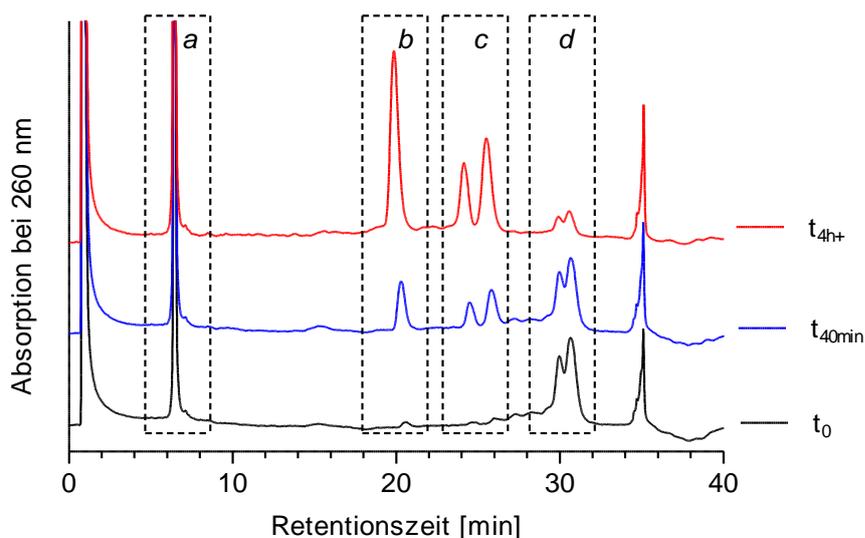


Abbildung 22: LzTHM290a spaltet *algD*-mRNA

RP-HPLC Chromatogramme von (d) *algD*-mRNA durch (a) LzTHM290a in die beiden Spaltprodukte (b) und (c)

3.3 *P. aeruginosa* Untersuchungen

In dieser Arbeit sollte durch Gen-Silencing der Phänotyp von mukoiden Pseudomonaden in den nicht-mukoiden Phänotyp beeinflusst werden. Dafür wurden zunächst die Biofilme charakterisiert, um im anschließenden Schritt die Wirkung einschätzen zu können. Zusätzlich wurde das Wachstumsverhalten in Kombination mit dem Antibiotikum Tobramycin untersucht.

3.3.1 Biofilm Untersuchungen

Der Phänotyp von Pseudomonaden entscheidet, ob der Stamm zu den mukoiden oder den nicht-mukoiden Stämmen gezählt wird. Um diesen Phänotyp quantitativ zu charakterisieren wurde das Gewicht des auf einem Sterilfilter gewachsenen Biofilms herangezogen.

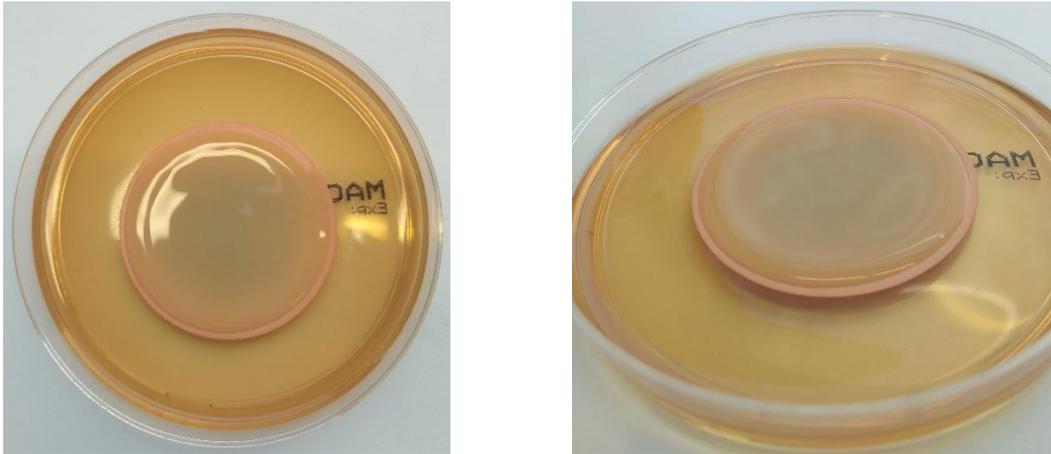


Abbildung 23: Mukoider Biofilm von *P. aeruginosa* auf einer MacConkey Agarplatte nach 24 h

Unabhängig von dem Wachstum eines Biofilms auf dem Sterilfilter, nahm dieser Wasser aus der Agarplatte auf. Die Menge an Wasser, die ein Filter aufnahm, entsprach $205,9 \text{ mg} \pm 0,54 \text{ mg}$ ($n = 5$). Diese Gewichtszunahme wurde stets von den gemessenen Biofilmgewichten subtrahiert.

Stämme mit einem mukoiden Phänotyp produzierten zwischen 251 mg und 1755 mg Biofilm pro Filter (Abbildung 24). Die durchschnittliche Standardabweichung der jeweiligen Replikate bei mukoiden Biofilmen betrug 32 mg. Der von nicht-mukoiden Stämmen produzierte Biofilm wog pro Filter zwischen 55 mg bis 119 mg und hatte eine durchschnittliche Standardabweichung von 4 mg.

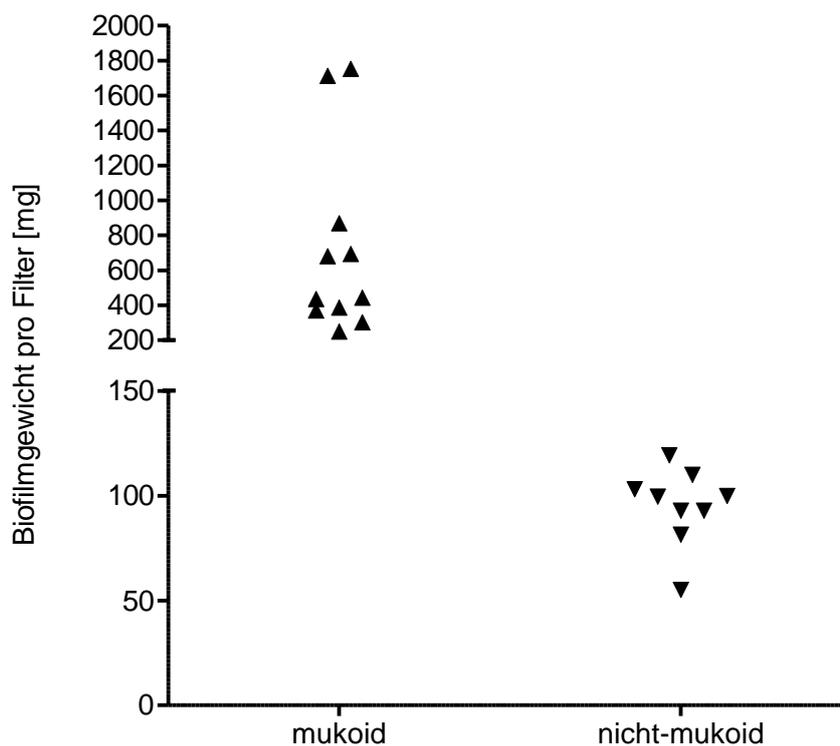


Abbildung 24: Vergleich von unbehandelten Biofilmen von *P. aeruginosa*
Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung des Biofilmgewichts

Sobald ein homogener Biofilm gebildet war, hatte auch eine mehrtägige Inkubation keinen signifikanten Einfluss mehr auf das Biofilmgewicht, da das Nährstoffangebot auf den Nährwert einer Agarplatte limitiert war. Maßgebend für die Menge des Biofilms war hauptsächlich die jeweilige Biofilm-Performance der verwendeten Stämme (Abbildung 25).

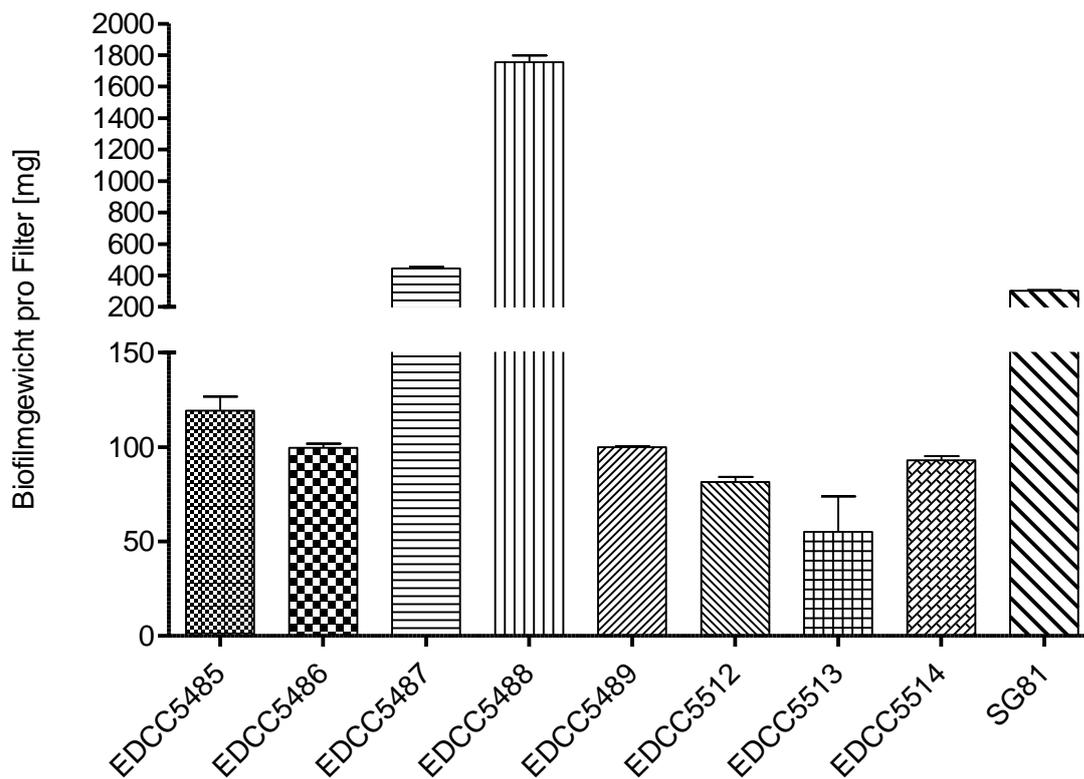


Abbildung 25: Unterschiede der Biofilmbildung verschiedener Stämme, n = 3

Diese Biofilm-Performance können mukoide Stämme ohne Selektionsdruck bei steigender Bakteriengeneration verlieren. Dies kann sowohl abrupt, als auch stufenweise passieren (Abbildung 26). Die Dauer bis zum Verlust der Biofilm-Performance ist ebenfalls variabel. Der Unterschied zwischen MacConkey-Agarplatten und der selbst gegossenen LB-Agarplatten war vernachlässigbar.

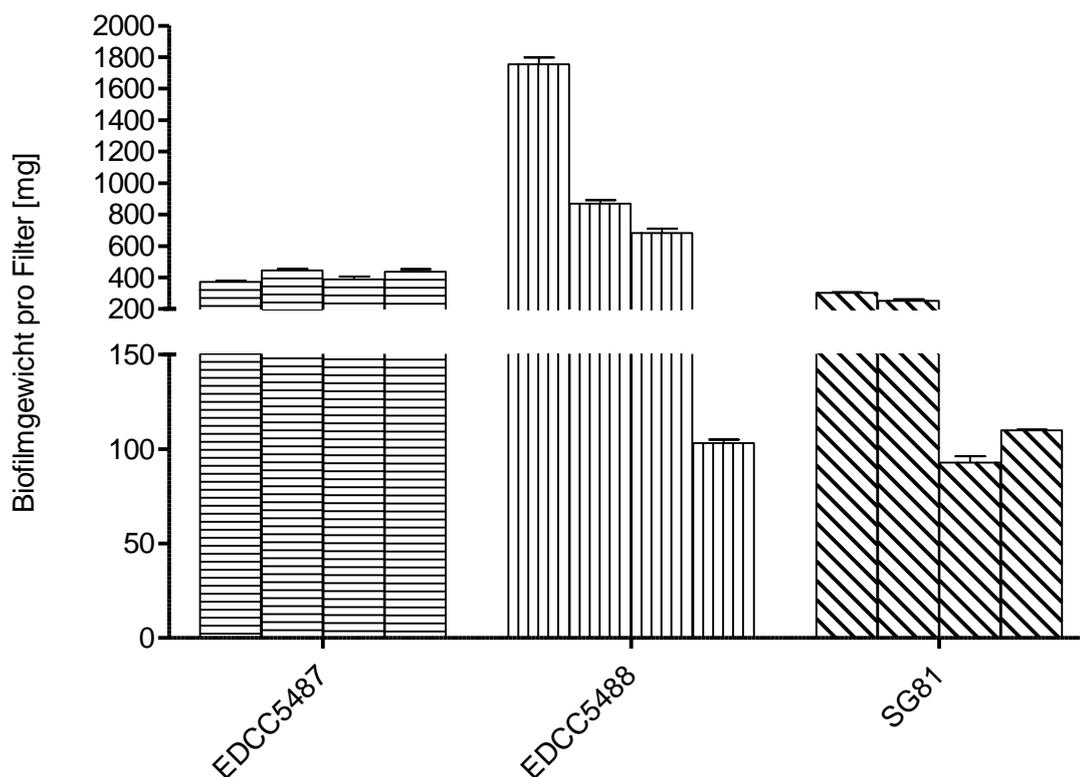


Abbildung 26: Gradueller Verlust der Biofilm-Performance

Ziel war es den mukoiden Biofilm in seiner Entstehung zu unterdrücken und diesen Effekt zu quantifizieren. Durch die unterschiedlichen Biofilm-Performances der verschiedenen Stämme und ihrer Variabilität im Verlauf der Zeit, wurde die Reduktion des Biofilms durch verschiedene Substanzen immer in das Verhältnis zu parallel durchgeführten Kontrollproben ($n = 3$) gesetzt. Durch die zuvor ermittelten Unterschiede von mukoiden und nicht-mukoiden Biofilmen ist eine Reduktion $>50\%$ Biofilmgewicht als Erfolg anzusehen. Abbildung 27 zeigt die relative Veränderung der Biofilmmenge bei verschiedenen Behandlungen. Keine der getesteten Substanzen konnte die Bildung eines mukoiden Phänotyps unterdrücken.

Die Balken (1) – (10) geben Experimente mit EDCC5487, die Balken (11) – (16) Experimente mit EDCC5488 und die Balken (17) – (22) Experimente mit SG81 wieder. Somit wurde sichergestellt, dass es keinen stammspezifischen Bias gibt. Als Kontroll-Dz wurden die nicht gegen *algD* gerichteten Dz hgd40 und Dz13 verwendet.

Die größte Reduktion des Biofilmgewichts lässt sich bei der Behandlung mit DzTHM290CPP erkennen. Eine konzentrationsabhängige Reduktion des Biofilms (6) → (10) konnte zwar gezeigt werden, jedoch zeigte auch das ungekoppelte

DzTHM290 mit dem CPP diese Wirkung (6) ↔ (7). Die nächstbeste Biofilmmreduktion wurde gegenüber EDCC5488 durch das Dz-Gemisch DzTHMix (siehe Anhang 3) erzielt (16). Diese leichte Reduktion wurde jedoch bei einer weiteren Wiederholung mit dem Stamm SG81 nicht bestätigt (21).

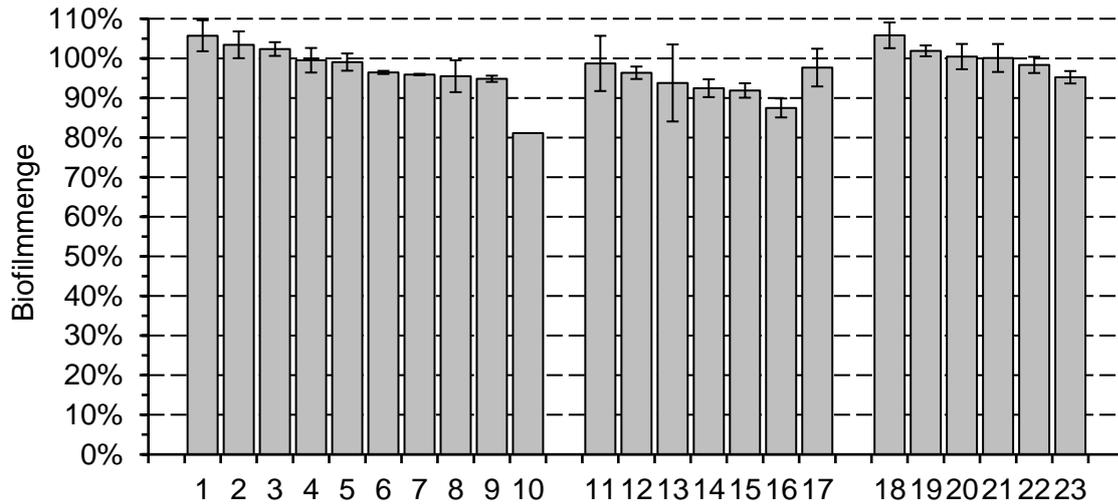


Abbildung 27: Prozentuale Biofilmmenge bei verschiedenen Behandlungen in Relation zu unbehandeltem Biofilmwachstum

- | | |
|---|-------------------------------|
| (1) AM5'ASG-Inhibitor, 315 nmol/Filter | (13) PenA, 5 µg/Filter |
| (2) „383“-Inhibitor, 58,5 nmol/Filter | (14) PenA, 0,1 µg/Filter |
| (3) „415“-Inhibitor, 58,5 nmol/Filter | (15) Dz13, 2,5 nmol/Filter |
| (4) „444“-Inhibitor, 58,5 nmol/Filter | (16) DzTHMix, 2,5 nmol/Filter |
| (5) AM5'ASG-Inhibitor, 94,5 nmol/Filter | (17) 10% weniger Bakterien |
| (6) DzTHM290CPP, 9 nmol/Filter | (18) hgd40, 25 nmol/Filter |
| (7) DzTHM290 + CPP, 2,25 nmol/Filter | (19) PenA, 0,1 µg/Filter |
| (8) „365“-Inhibitor, 130,5 nmol/Filter | (20) PenA, 1 µg/Filter |
| (9) „372“-Inhibitor, 58,5 nmol/Filter | (21) DzTHMix, 2,5 nmol/Filter |
| (10) DzTHM290CPP, 30 nmol/Filter | (22) Dz13, 2,5 nmol/Filter |
| (11) hgd40, 25 nmol/Filter | (23) PenA, 5 µg/Filter |
| (12) PenA, 1 µg/Filter | |

3.3.2 Wachstumskurven

Die Inhibition von AlgD zeigte Synergien mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Tobramycin [69]. Um diese Synergie zu bestimmen, wurde zunächst die Sensitivität der Bakterien gegenüber Tobramycin bestimmt. Dafür wurden Wachstumskurven von sechs *P. aeruginosa* Stämmen in Gegenwart unterschiedlicher Tobramycin-Konzentrationen aufgezeichnet (Abbildung 28). Die optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}) dient als Indikator für das Zellwachstum der Bakterien [118]. Die Resistenz gegenüber Tobramycin ist stammspezifisch und reicht von sensitiv (SG81) bis zu resistent (EDCC5487).

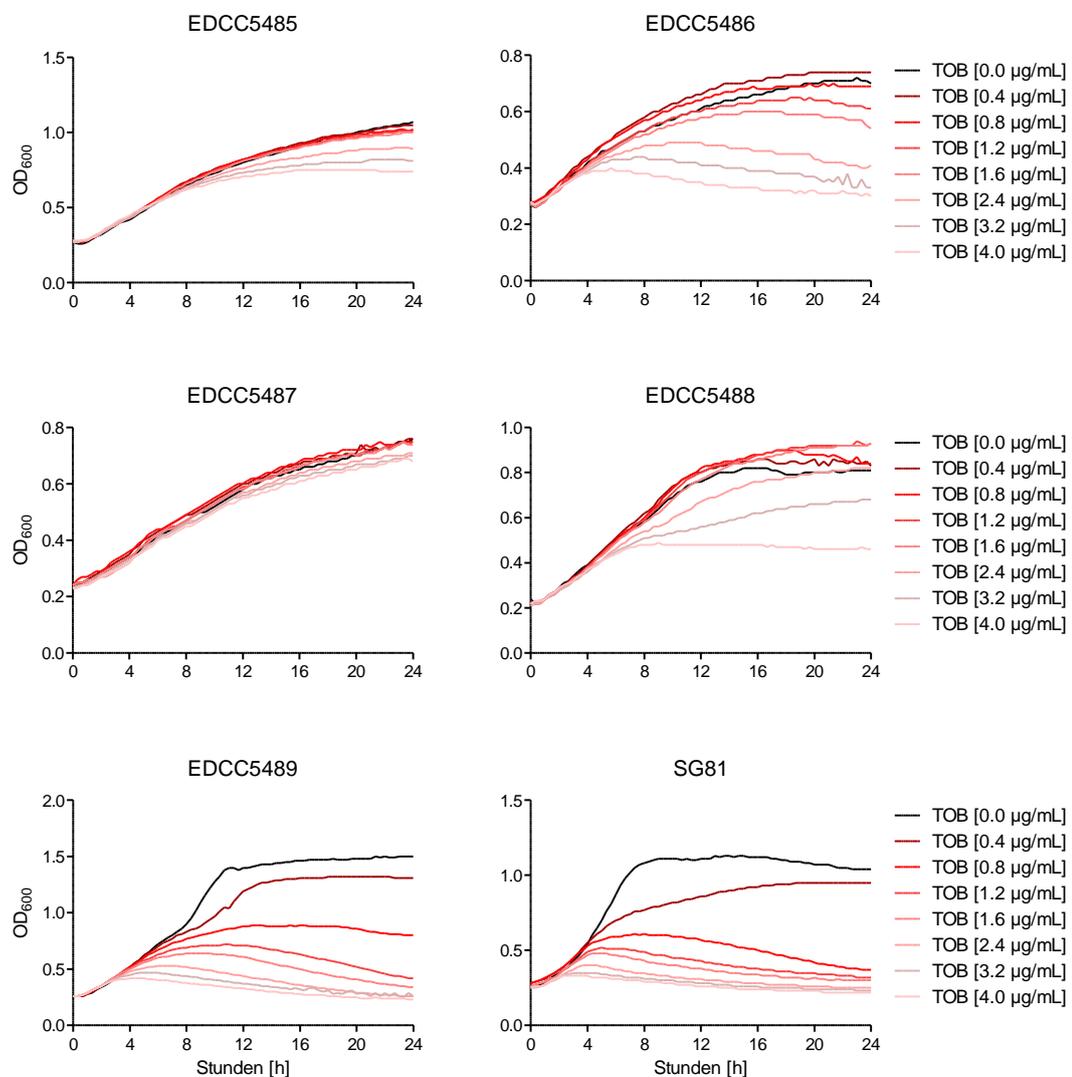


Abbildung 28: Wachstumskurven Tobramycin

In einem weiteren Schritt wurden Experimente mit verschiedenen Konzentrationen Tobramycin in Kombination mit dem chemischen Inhibitor (AM5'ASG) gegen AlgD sowie den davon abgeleiteten Substanzen „365“, „372“, „383“, „415“ und „444“ durchgeführt. Die Ergebnisse der Publikation von 1991 [69] konnten nicht reproduziert werden und auch die Gen-Silencing-Kandidaten DzTHM290, DzTHMix, LzTHM290a und DzTHM290CPP zeigten keine Synergien (exemplarisch siehe Abbildung 29, oben).

Es konnte allerdings eine konzentrationsabhängige Synergie des CPP mit Tobramycin gegen EDCC5487 beobachtet werden (Abbildung 29, mittig und unten). Bereits geringe Konzentrationen Tobramycin (1 µg/mL) genügten dabei für eine Inhibition des Wachstums über ~12 h mit 0,1 mM CPP. Bei niedrigeren Konzentrationen CPP (20 µM) reichte nicht einmal 4 µg/mL Tobramycin für eine entsprechende Inhibition des Wachstums. Charakteristisch ist die unterschiedliche Inhibition des Wachstums im Vergleich zur Inhibition, die durch höhere Konzentrationen Tobramycin erreicht wurden.

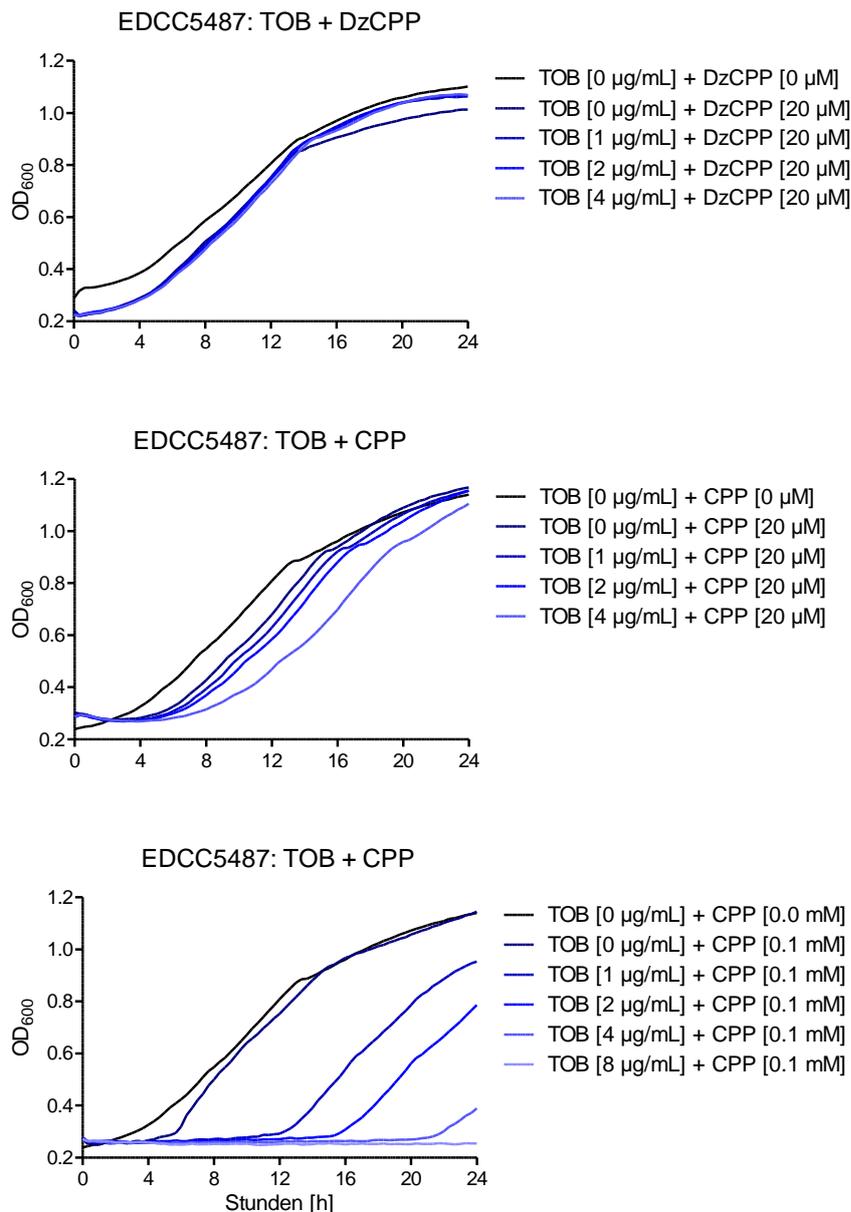


Abbildung 29: Synergie Tobramycin und DzCPP/CPP

Da es sich bei dem CPP um ein kurzes kationisches Peptidderivat handelt und diese Strukturen oft an sich antimikrobielle Eigenschaften aufweisen, wurde das *Pseudomonas*-spezifische AMP SMAP-29 als Vergleichspeptid untersucht. Die entsprechende Wachstumsinhibition der sechs Stämme in Gegenwart des AMPs SMAP-29 kann Abbildung 30 entnommen werden. Auffällig ist, dass sich die Wachstumskurven von TOB/CPP und SMAP-29 ähneln und das Bakterienwachstum lediglich einen zeitlich versetzten Startpunkt besitzen. Die Inhibition mit SMAP-29 ist jedoch im Vergleich zu TOB/CPP stärker, da bereits bei geringeren Konzentrationen des

Peptids das Wachstum gehemmt wird und es keines zusätzlichen Tobramycin für die inhibierende Wirkung bedarf (Abbildung 30).

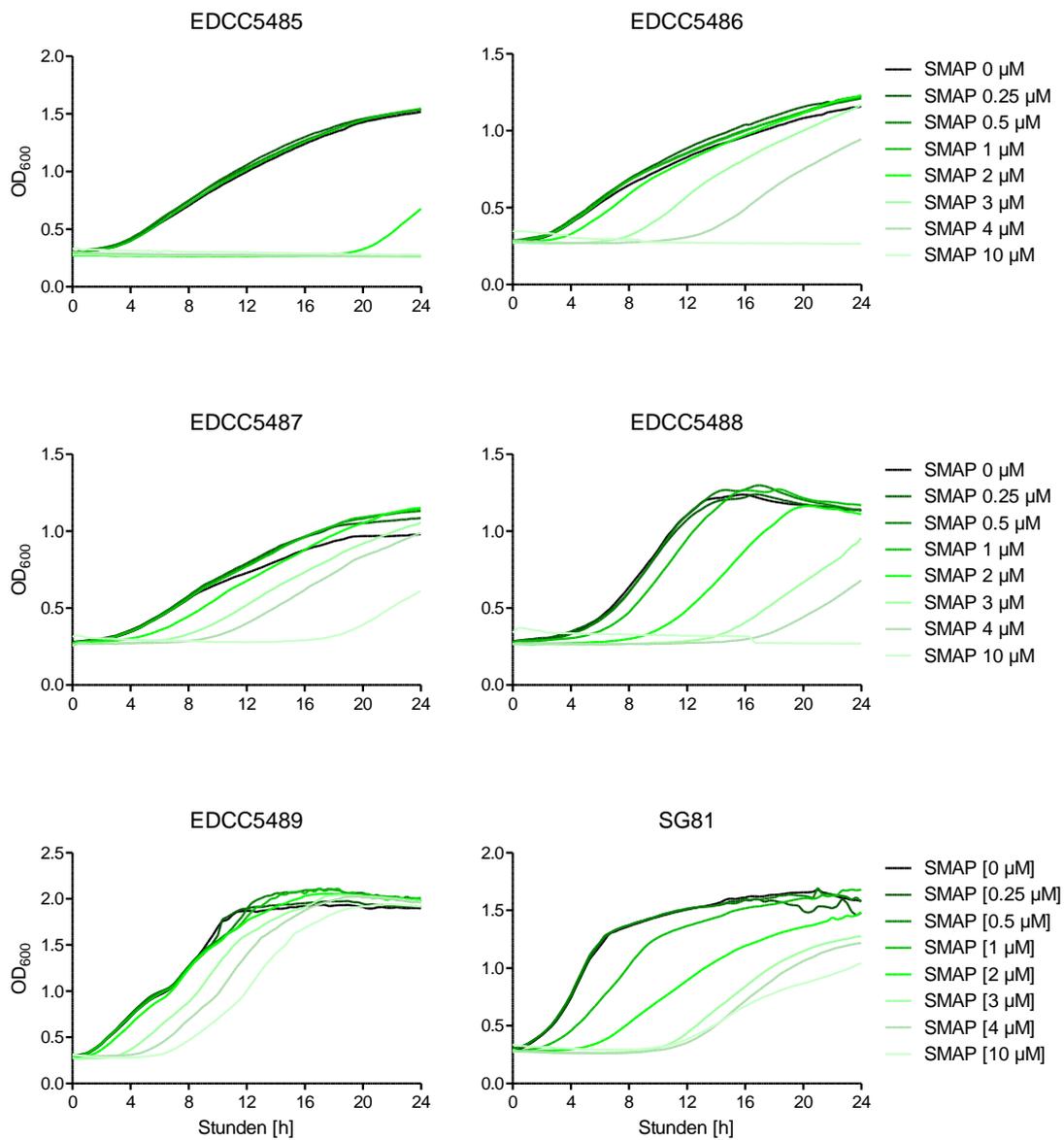


Abbildung 30: Wachstumskurven mit AMP „SMAP-29“

4 Diskussion

Lungenversagen ist die Haupttodesursache von CF-Patienten. Besonders chronische Infektionen mit *P. aeruginosa* verschlechtern den Krankheitsverlauf. Ihr einzigartiger Alginate-Biofilm erschwert die Atmung, schützt Erreger vor Antibiotika und führt zu Entzündungen des Lungengewebes. Eine zielgerichtete Therapie mit geringen Nebenwirkungen gegen diesen Biofilm ist besonders erstrebenswert. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Dz, das durch Posttranskriptionelles Gen-Silencing diese Biofilmbildung unterbindet. Bislang mussten antimikrobielle Dz jedoch durch spezielle *in vitro* Behandlung in die Bakterienzelle transportiert werden. Seit der Koppelung von Oligonukleotiden an CPP ist jedoch auch ihr Transport in die Bakterienzelle möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Ziel-Gen identifiziert und charakterisiert. Eine neue Methode zur Untersuchung von Dz wurde entwickelt und ihre Flexibilität anhand eines exemplarischen Screenings für Dz durchgeführt. Anschließend wurden sowohl Biofilm-Untersuchungen als auch Wachstumsverhalten untersucht. Da lediglich geringfügige Wirkungen beobachtet wurden konnten, wurden mögliche Gründe für das Ausbleiben der Wirkung erforscht.

4.1 Ziel-Gen

4.1.1 Therapieoptionen für CF-Patienten

Von Geburt an leiden CF-Patienten an erhöhten Konzentrationen makromolekularer Substanzen wie bspw. Mucinen in der Lunge. Durch den Verlust der Funktion des CFTR-Ionenkanals sinkt die Salzkonzentration innerhalb der Schleimschicht, was zu einer Viskositätserhöhung des Schleims und einem Funktionsverlust der mukoziliären Clearance führt. Die Inhalation verschiedener Medikamente kann nur bedingt Linderung verschaffen und auch CFTR-Regulatoren stellen lediglich bei bestimmten Mutationen die Funktion des Chloridkanals wieder her. Der ursächliche Gendefekt von CF kann nicht durch die Stilllegung eines Gens (Gen-Silencing) erfolgen, da der Erkrankung keine pathologische Hochregulierung eines Gens, sondern eine falsche Proteinsequenz zugrunde liegt. Aus ebendiesem Grund war es notwendig ein hochreguliertes Gen zu finden, das für den tödlichen Gesundheitsverlauf bei CF-Patienten maßgeblich verantwortlich ist. Eine ursächliche Therapie der CF wäre durch die Korrektur des

Patienten-Genoms möglich. Solche Korrekturen innerhalb des menschlichen CFTR-Gens sind mittels „Genome Editing“ denkbar, stellen jedoch einen dauerhaften Eingriff in das menschliche Genom dar und müssen im Zellkern der körpereigenen Zellen stattfinden [119,120].

Bereits im Kindesalter sind die Lungen von CF-Patienten meist chronisch besiedelt und rezidivierende Infektionen führen zu einer zunehmenden Schädigung der Lunge. Zurzeit kann selbst eine prophylaktische, regelmäßige intravenöse antibiotische Therapie diesen *circulus vitiosus* nur bedingt verlangsamen, aber nicht aufhalten. Bei zunehmenden Resistenzen und aufgrund drohender Nebenwirkungen ist die Therapie mit Antibiotika nicht unbegrenzt ausweitbar. Letzten Endes entwickelt sich eine respiratorische Insuffizienz und eine Lungentransplantation ist die letzte Therapieoption. Zuvor haben die Patienten oftmals mehrere Kilogramm Antibiotika eingenommen [6]. Besonders ab der Phase bei der es zu einer chronischen Besiedlung mit Pseudomonaden kommt, die den Gasaustausch durch ihren Biofilm zusätzlich blockieren und bei denen eine Antibiotika kaum noch Wirkung zeigt, gibt es bislang nur wenige Therapieoptionen (Abbildung 1, Phase 3 oben links).

4.1.2 Strategien gegen *P. aeruginosa*

Die Anzahl von Antibiotikaresistenzen steigt stetig und es ist eine Frage der Zeit, wann die letzten Reserveantibiotika wirkungslos werden. Bereits seit längerem wird deshalb nach alternativen Strategien zur Behandlung von Infektionen geforscht [121]. Dabei zielen die neuen Strategien nicht mehr auf die Hemmung oder Abtötung des Keims ab, sondern auf eine Reduktion seiner pathologischen Wirkung gegenüber dem Wirt. Dadurch soll den Bakterien der evolutionärer Vorteil einer Resistenz genommen werden [122]. Die dafür verantwortlichen Virulenzfaktoren bieten sowohl unter den verschiedenen Spezies, als auch innerhalb einer Klasse, ein breites Spektrum an Möglichkeiten [123].

Da Alginat als hauptverantwortliches Exopolysaccharid von Pseudomonaden für den voluminösen Biofilm identifiziert wurde und es ebenfalls zur Antibiotikaresistenz gegen Tobramycin und anderer Aminoglykoside beitragen kann, ist eine Beeinflussung dieses Stoffwechselweges mit posttranskriptionellem Gen-Silencing therapeutisch interessant. Unter den verschiedenen Möglichkeiten Gene zu inaktivieren war eine siRNA keine Option, da diese eukaryotische Peptide benötigen und es sich bei dem Ziel-Organismus

um einen Prokaryot handelt. Die Vorteile von Gen-Silencing innerhalb eines Prokaryoten ist, dass es keinerlei Kompartimente im Zellinneren gibt und die mRNA theoretisch bereits während ihrer Transkription für ein Gen-Silencing zur Verfügung steht, noch bevor sich ihre endgültige Sekundärstruktur ausgebildet hat.

Um eine effektive Therapie durch Gen-Silencing zu gewährleisten muss ein Schlüssel-Stoffwechselweg durch das Unbrauchbarmachen einer mRNA blockiert werden. Demnach wurde ein Schlüssel-Gen gesucht, dessen mRNA kausal für den mukoiden Phänotyp verantwortlich ist. Das Gen *algD* mit seinem darin kodierten Protein AlgD wurde als Ziel identifiziert. AlgD ist für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Alginat-Biosynthese verantwortlich [52,53], liegt in mukoiden Kolonien besonders hochreguliert vor [55] und seine *algD*-Transkripte sind in Sputum von CF-Patienten extrem hochreguliert, wenn mukoide Stämme zugegen sind [56]. Der Verlust des gesamten Gens führt zu einem Verlust des mukoiden Phänotyps [65]. Verschiedene Mutationen innerhalb des Genoms von *P. aeruginosa* können die Transkription des *algD*-Operons aktivieren [63,124]. Besonders Mutationen in der Promotorregion des *algD*-Operons [125,126] und des dort bindenden Repressors *mucA* führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Transkription [127]. Gewisse Mutationen bringen den Vorteil mit sich, dass sie zwar die Alginat-Produktion erhöhen, dafür aber andere Virulenzfaktoren (Elastase, Quorum Sensing) in ihrer Ausprägung reduzieren [20,128]. Durch Gen-Silencing von *algD* könnte so zunächst die herunterregulierende Wirkung anderer Virulenzfaktoren ausgenutzt werden [129].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gen-Silencing Methode mit Dz hat den Vorteil, dass sie (auch pulmonal verabreicht) besonders nebenwirkungsarm sind und somit prophylaktisch angewendet werden könnte, sobald ein CF-Patient mit *P. aeruginosa* besiedelt ist, aber noch bevor sich der mukoider Phänotyp etabliert hat [85,86]. Durch den polyanionischen Charakter der Dz können sie ebenfalls besser durch einen bereits existierenden Biofilm diffundieren als positiv geladene Aminoglykoside [31]. Allein durch die mehrfach negative Ladung der Dz ist eine positive Wirkung auf die Sekrete von CF-Patienten denkbar. So lässt sich auch der positive Effekt von Pulmozyme® auf die Sekrete von CF-Patienten erklären. Neben der Verringerung hochmolekularer eDNA im Biofilm entstehen ebenso kurzkettige DNA-Fragmente, die für den positiven Einfluss auf die Sekrete verantwortlich sein können. Der Einsatz kurzkettiger Dz könnte demnach, abseits ihrer enzymatischen Aktivität, bereits eine positive physikalische Wirkung auf den zähen Schleim der CF-Patienten haben. Ebenso kommt die Hauptwirkung des

Wirkstoffs OligoG[®] vermutlich durch seinen kleinen mehrfach negativ geladenen Charakter zustande. OligoG[®] zeigt vielversprechende Wirkung in der Behandlung von CF-Patienten, obwohl es aus denselben Bausteinen besteht wie das pathogene Alginat [49]. Darüberhinaus wird postuliert, dass durch die physikochemischen Eigenschaften von OligoG[®] Ca²⁺ gebunden und so die Viskosität erniedrigt wird [48,50].

4.1.3 Konservierung *algD*

Auch stille Punktmutation können die Therapie mit Dz gefährden, da sie einen Mismatch zwischen Dz und Transkript des Gens erzeugen und so eine mögliche Wirkung des Dz reduzieren. Deshalb wurden lediglich Dz, die keine Überschneidung mit den variablen Stellen von *algD* haben, weiter berücksichtigt. Die durchgeführte Sequenzierung der neun *P. aeruginosa* Stämme hat ergeben, dass das Protein AlgD hochkonserviert ist und auch auf Gen-Ebene nur sehr vereinzelt stille Mutationen auftreten. Zusammen mit der Analyse von 122 *algD*-Sequenzen aus der Literatur konnten variable Nukleinbasen innerhalb von *algD* identifiziert werden. Bis auf die Mutation G288A waren bereits alle Mutationen die in den neun sequenzierten Stämmen gefunden wurden bekannt.

Durch die Therapie mit einer Kombination aus mehreren Dz, könnte zusätzlich die Gefahr eines Wirkverlusts minimiert werden. Auch der Angriff an mehreren Positionen der mRNA, die an der Alginat-Biosynthese beteiligt sind, ist denkbar [130]. Dies wäre analog einer HAART (Hochaktive antiretrovirale Therapie), bei der drei bis vier antiretrovirale Arzneimittel simultan genommen werden, um Resistenzen vorzubeugen.

Grundlegende Prämisse für diese Arbeit war jedoch zunächst eine Suppression des Virulenzfaktors „mukoider Biofilm“, damit kein Selektionsdruck eine gerichtete Resistenzbildung bewirkt. Die Einzigartigkeit des *algD*-Gens, seine hohe Konservierung und seine entscheidende Funktion bei der Alginat-Biosynthese machen es zu einem hervorragenden Arzneistofftarget. Durch die Analyse der Überschneidungen mit dem menschlichen Genom und Transkriptom können sequenzspezifische Nebenwirkungen ausgeschlossen werden.

Neben AlgD sind also auch weitere Angriffspunkte innerhalb der Alginat-Biosynthese interessant. Besonders geeignet wäre dafür das Gen *algC*, das als einziges Alginat-Gen außerhalb des *algD*-Operons liegt und für mehrere Stoffwechselwege (Alginat, Pel, Psl, LPS) Precursor bereitstellt [131]. Das Ausschalten von AlgD verhindert zwar die Bildung eines mukoiden Biofilms, jedoch können die Bakterien weiterhin einen nicht-mukoiden

Biofilm ausbilden [66]. Daher wäre es erstrebenswert, zusätzlich zu AlgD auch das neutrale Polysaccharid Psl auszuschalten. Psl ist für umfangreiche Resistenzen verantwortlich und erhöht die Dichte mukoider Biofilme [26,132,133]. Als Checkpoint-Protein für alle *P. aeruginosa* typischen Polysaccharide Alginate, Psl und Pel wäre AlgC daher ein gutes Target [131].

4.2 DNAzym Untersuchungen

4.2.1 Analytik

Auch abseits von pharmazeutischen Anwendungen haben Dz allerlei Anwendungsmöglichkeiten. Sie werden bspw. zur Detektion von Schwermetallen benutzt [134] oder für einen Ethanol-Schnelltest entwickelt [135] und auch bei der molekularbiologischen Probenaufarbeitung kommen Dz zum Einsatz [136,137]. Die Bestimmung der Spaltkinetik von Dz ist somit nicht nur im Hinblick auf potentielle Arzneimittel ein wichtiger Parameter. Das Screening ihrer Aktivität beruht dabei oftmals noch auf radioaktiver Markierung und anschließender Gelelektrophorese [138].

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HPLC-Methode zur Bestimmung der Spaltkinetik hat demnach eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten [114]. Sie kann als automatisiertes Screening nach neuen Dz, zur Optimierung bereits bestehender Dz, sowie auch als routinemäßige Analyse im Rahmen der Qualitätskontrolle in der Industrie angewandt werden.

Im Vergleich zur herkömmlichen Methode, bei der zu jedem Zeitpunkt eine Probe gezogen und abgestoppt wird und im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt wird, kann mit der HPLC-Methode ein Großteil an Arbeitsschritten eingespart und die Genauigkeit der Analyse verbessert werden. So sank bspw. bei der Bestimmung der Kinetik von DzTHM290 mit 7 Messpunkten die Anzahl der Pipettierschritte von 24 Schritten mit dem Gel-Assay auf lediglich 3 Schritte mit der automatisierten HPLC-Methode [114]. Gleichzeitig verbesserte sich die lineare Regression der einzelnen Messung von $\text{ØR}^2 = 0,8621$ mit dem Gel-Assay auf $\text{ØR}^2 = 0,9999$ mit der HPLC-Methode und die Schwankungen der einzelnen Wiederholungen untereinander sank von $\pm 9,09\%$ auf $\pm 2,81\%$ [114]. Die enorme Verbesserung der Reproduzierbarkeit ist zurückzuführen auf die Reduktion manueller Fehler, die sich bei der hohen Anzahl von

Arbeitsschritten des Gel-Assays aufsummieren und die exakte Detektionsmöglichkeit im Gegensatz zur Bildauswertung mittels Densitometrie.

Die Laufzeit der HPLC-Methode bestimmt den Zeitabstand der einzelnen Messpunkte und die Reaktion kann zeitnah nachvollzogen werden. Dies erhöht die Flexibilität in der Versuchsplanung und ermöglicht es bereits vor Ablauf der angestrebten Versuchsdauer Zwischenergebnisse auszuwerten, die beim nächsten Versuch angepasst werden können. Im Gegensatz zur Plate-reader-Methode wird nicht nur die Abnahme des Edukts gemessen, sondern es wird simultan die Zunahme der einzelnen Spaltprodukte und der Gehalt des Dz exakt bestimmt. Damit kann nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch die Position der enzymatischen Spaltung bestimmt werden, wie es bei dem kompetitiven Spaltassay mit DzTHM114 und DzTHM115 gezeigt wurde (Abbildung 16). Anhand der aufeinanderfolgenden Injektionen ist eine Kinetik leicht auszuwerten und zu automatisieren.

Im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle kann mithilfe dieses Verfahrens eine einfache Überprüfung der Funktionalität des Dz durchgeführt werden. Verwechslungen innerhalb der Sequenz oder fehlerhafte Modifikationen, die von einer Bestimmung der Masse unerkannt bleiben würden, könnten so einfach ausgeschlossen werden. Durch die Synthese von kurzen RNA-Substraten ist die Bestimmung der Aktivität äußerst präzise und standardisierbar. Da das Spaltprodukt, welches dem 3'-Ende des Substrats zugewandt ist, keine freien Phosphatgruppen besitzt, ist es einfach und kostengünstig synthetisch herzustellen und eine Verifizierung der Schnittposition kann darüber exakt erfolgen (Abbildung 13, RNA c-Jun14).

4.2.2 Kompetitiver und Benchmark Spaltassay

Neben der Bestimmung von separaten Dz-Kinetiken und deren Vergleich (Tabelle 9), wurde die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode auch auf Tauglichkeit überprüft, die Aktivität mehrerer Dz gleichzeitig zu bestimmen. Dafür wurden im Fall des kompetitiven Spaltassays mehrere Dz entworfen, die dieselbe RNA an unterschiedlichen Positionen hydrolysieren (Abbildung 9). Bei der Verwendung von kurzen Substraten ohne maßgebende Sekundärstruktur erbrachte eine simultane, qualitative und quantitative Bestimmung der einzelnen Fragmente sehr gute Ergebnisse (Abbildung 16, A → B). Dafür müssen die Schnittstellen so nah beieinander liegen, dass entweder das erste oder das zweite Dz schneiden kann. Ansonsten kann ein Spaltprodukt des ersten

Dz von dem zweiten Dz als alternatives Substrat wiederverwendet werden. Die Spaltgeschwindigkeit dieses Sekundärsubstrats kann sich wiederum von der Spaltgeschwindigkeit gegenüber dem ursprünglichen Substrat unterscheiden. Desweiteren steigt durch die sequenzielle Spaltung mehrerer Dz die Anzahl an möglichen (Zwischen-)Spaltprodukten. Für eine RNA, die von n Dz nacheinander gespalten wird, entstehen zusätzlich jeweils $n + 1$ neue Spaltprodukte (Abbildung 31, Dz1 +2(=2); Dz2 +3(=5); Dz3 +4(=9); Dz4 +5(=14); ...). Die maximale Gesamtanzahl der unterschiedlichen Spaltprodukte ($N_{CP_{max}}$) für eine RNA die von n Dz sequenziell geschnitten wird beträgt demnach $N_{CP_{max}} = \frac{n^2+3n}{2}$.

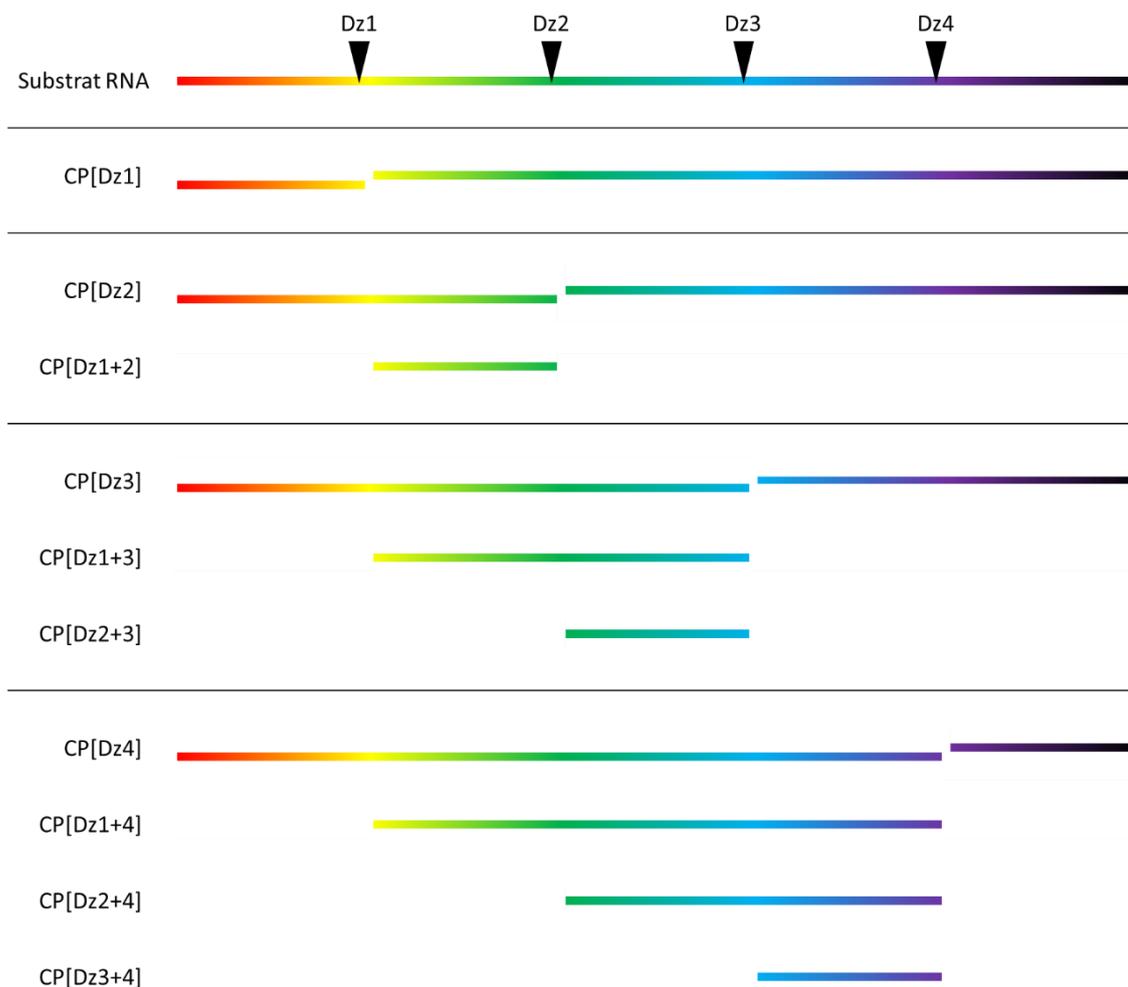


Abbildung 31: Schema der Spaltung einer RNA durch bis zu vier Dz und die jeweils neu entstehenden (Zwischen-)Produkte

Der Benchmark-Spaltassay ist in der Lage zwei unabhängig voneinander ablaufende Dz-Reaktionen zu bestimmen (Abbildung 16, C → D). Neben der Funktion einer internen

Kontrolle könnte beispielsweise ein Dz, das durch (micro-)RNA aktiviert wird *in vitro* untersucht werden, indem die (micro-)RNA durch ein zweites Dz *in situ* produziert wird [139]. Sowohl der kompetitive als auch der Benchmark Spaltassay sind besonders geeignet für die Untersuchung von Modifikationen innerhalb von Dz, bei der die Spaltgeschwindigkeit im Verhältnis zu einem bereits bekannten Dz verbessert werden soll [140,141].

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss von Sekundärstrukturen vernachlässigt, da es sich bei der Ziel-Zelle um eine Bakterienzelle handelt. Die prokaryotische mRNA wird im Gegensatz zu eukaryotischer direkt im Zytosol gebildet und ein Gen-Silencing müsste bereits während der Transkription möglich sein, bevor sich die endgültige Sekundärstruktur ausgebildet hat. Weiterhin besteht die Möglichkeit in Prokaryoten, dass sich Polysomen entlang der mRNA bilden, die ebenfalls eine Linearisierung der mRNA und somit eine bessere Zugänglichkeit für Dz zur Folge hätten. Dies stellte sich jedoch als Trugschluss heraus und ein Sekundärstruktur basiertes Screening sollte analog der bisherigen Vorgehensweise mit dem kompetitiven Spaltassay durchgeführt werden.

Eine Multiplex-Reaktion, bei der mehrere Dz ein längeres Substrat schneiden, um das effektivste Dz zu identifizieren, wurden bereits zuvor untersucht [142,143]. Hierbei wurde durch anschließende Sequenzierung der Bruchstücke das effektivste Dz identifiziert. Analog dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Gemisch aus 50 zu gleichen Teilen enthaltenen Dz (DzTHMix, Anhang 3) mit der *in vitro* transkribierten *algD*-mRNA (1678 nt, Abbildung 20) inkubiert, um über das Peakmuster besonders effektive Dz identifizieren zu können. Bei dieser Multiplex-Reaktion konnte nur eine vernachlässigbare Degradation zu Beginn der Reaktion beobachtet werden, obwohl die 50 Schnittstellen über den gesamten RNA Abschnitt verteilt lagen (siehe Anhang 6). Aufgrund der 50 verschiedenen Schnittstellen können bis zu $\frac{50^2+3 \times 50}{2} = 1325$ unterschiedliche RNA-Fragmente entstehen. Durch die unterschiedlichen Spaltgeschwindigkeiten gegenüber den sich ständig ändernden Sekundärsubstraten entsteht ein dynamisches Abbauverhalten bei dem sich der Peak wanderdünenartig in Richtung kleinerer Fragmente verschiebt. Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass zunächst aufgrund sterischer Behinderung inaktive Dz zu einem späteren Zeitpunkt ein von einem anderen Dz produziertes Spaltprodukt weiterverwenden konnte. Die Abbaudynamik durch DzTHMix ähnelte dabei dem Abbau durch eine Exonuklease

[144]. Durch diesen kompetitiven Spaltassay (1678 nt Substrat *algD*-mRNA vs. DzTHMix) konnte somit nicht das zuerst schneidende Dz ermittelt werden. Die RP-HPLC Analyse war in ihrer Auflösung zusätzlich noch durch den Säulenofen limitiert, der Temperaturen $>60^{\circ}\text{C}$ nicht erreichen konnte. Durch eine höhere Temperatur während der Chromatographie hätte die Auflösung der Auftrennung einzelner Produkte verbessert werden können [145].

4.2.3 Einflussfaktoren der DNAzym-Kinetik

Die Hydrolysegeschwindigkeit von Dz hängt von vielen Einflussgrößen ab, die sich zum Teil untereinander beeinflussen. Auf Einflussgrößen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wird nachfolgend im Einzelnen eingegangen. Bisherige Untersuchungen zur Bindearmlängen [146], verschiedener Metallionen [147], sowie der Einfluss verschiedener Cofaktoren [135,148] wurde nicht weiter untersucht.

a) pH-Wert

Der pH-Wert hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Hydrolyse-Geschwindigkeit von Dz. Die Katalyse wird durch hohe Hydroxidionen-Konzentration begünstigt [81], sodass die Reaktion bei niedrigem pH-Wert langsamer (DzTHM290 bei pH 5: 50% Abbau ~ 130 min, Abbildung 15) und bei alkalischerem pH-Wert schneller abläuft (DzTHM290 bei pH 7: 50% Abbau ~ 10 min, Abbildung 21). Durch die Homöostase innerhalb Zellen stellt der pH-Wert bei der Therapie eine unbeeinflussbare Größe dar. Ebenso ist die Mg^{2+} -Konzentration durch die physiologischen Eigenschaften der Ziel-Zelle vorgegeben. Beide Konzentrationen können jedoch bei Bedarf für *in vitro* Versuche angepasst werden um bspw. die Geschwindigkeit zu drosseln und so eine geeignete Darstellung und Auswertung zu ermöglichen. So wurde bei DzTHM290 bei pH 7 bereits nach der zweiten Messung die lineare Anfangskinetik verlassen und die Dz-typische Produktinhibition erkennbar (Abbildung 21). Zum Bewerten der Geschwindigkeiten wurde der pH-Wert auf 5 abgesenkt um eine geeignete Auswertung der linearen Startphase zu ermöglichen. Um die so ermittelte Geschwindigkeit zu bewerten wurden die beiden etablierten Dz Dz13 und hgd40 als Vergleichs herangezogen (Tabelle 9).

b) Konzentrationen

Die Geschwindigkeit der Hydrolyse eines Dz ist von vielen Konzentrationen abhängig. Neben den Konzentrationen des divalenten Kations und der OH⁻-Ionen haben auch die Konzentration von Substrat und Dz Einfluss auf die Schnittgeschwindigkeit. Daher wurden in den durchgeführten Experimenten stets 10 µM Substrat-RNA und 2 µM Dz verwendet. Trotz eines konstanten Verhältnisses von 5:1 (RNA:Dz) wurden bei 5 µM Substrat-RNA und 1 µM Dz unterschiedliche Geschwindigkeiten ermittelt. Dieses Phänomen ist vermutlich zurückzuführen auf „molecular crowding“ der Oligonukleotide [149,150]. Damit ein 10-23 Dz schneidet, bedarf es einer Konformationsänderung [151]. Molecular crowding, dass Einfluss auf die Konformation hat, kann durch viele Cofaktoren begünstigt werden [134,135,148,152,153].

c) Sekundärstruktur

Sekundärstrukturen können einen großen Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit von Dz haben [102]. Bei den Dz die im Rahmen dieser Arbeit mit kurzen RNA-Substraten (<25 nt) untersucht wurden, konnte keine Korrelation zwischen Spaltgeschwindigkeit und der Substratsekundärstruktur bzw. ΔG beobachtet werden (Tabelle 9). Trotz der ausgeprägten Sekundärstruktur des Substrats RNA *algD95* (Abbildung 32) zeigte DzTHM95 die zweitschnellste Spaltgeschwindigkeit der untersuchten Dz.

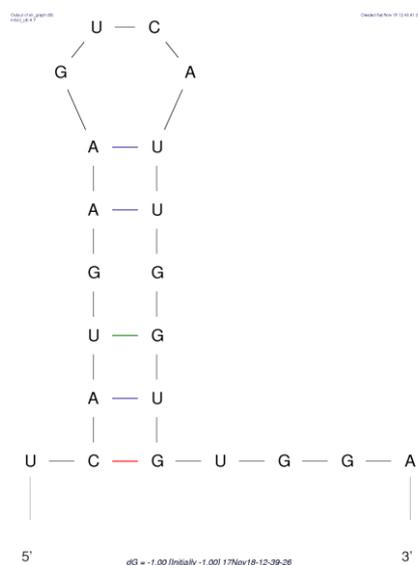


Abbildung 32: Sekundärstruktur RNA *algD95* via MFold [112]

Der sequenzspezifische Einfluss auf die Geschwindigkeiten wurde insbesondere bei DzTHM114 und DzTHM115 gezeigt. Beide Aktivitäten wurden mit demselben Substrat bestimmt (Abbildung 33, RNA *algD1145* = 22 nt) und beide Dz besitzen die gleiche Art von Schnittstelle (AU). Ihre Schmelztemperaturen sind ebenfalls bis auf 1°C identisch. Dennoch schneidet DzTHM115 fast 15-fach schneller als DzTHM114 (Tabelle 9). Somit beeinflusst die gesamte Sequenz eines Dz seine Aktivität und ein sequenzspezifisches Screening ist notwendig, um *a priori* ungeeignete Dz frühzeitig zu erkennen.

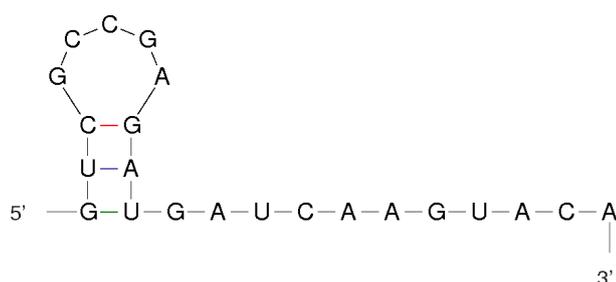


Abbildung 33: Sekundärstruktur RNA *algD1145* via MFold [112]

Intramolekulare Basenpaarungen des Substrats können allerdings auch zu Sekundärstrukturen führen, die eine Bindung des Dz an entsprechenden Positionen verhindern [143,154]. Diese Konstrukte sind meist mehrere hundert Nucleotide lang und nur idealisiert darstellbar. Selbst bei hoch konservierten Genen kann die mRNA-Faltung durch einzelne, stille Punktmutationen voneinander abweichen und der Einfluss von Polysomen, microRNA u.A. wird bei *in vitro* Untersuchungen ebenfalls nicht berücksichtigt. Spaltkinetiken können daher zwar *in vitro* optimiert werden, es bedarf jedoch stets einer Verifizierung *in vivo*.

d) Modifikationen

Dz und andere Oligonucleotid-Therapeutika können mittlerweile am Computer designt und anschließend synthetisch hergestellt werden. Dabei ist man nicht mehr nur auf natürlich vorkommende Nucleotide beschränkt. Modifikationen am Zucker-Phosphat-Rückgrat wie z.B. Phosphorothioat, 2'-O-Methyl, PMO, BNA, PNA und LNA sind besonders frequentiert und finden in bislang allen auf dem Markt erschienenen Oligonucleotid-Therapeutika Anwendung (Fomivirsin, Mipomersen, Alicaforsen, Eteplirsin, Nusinersen). Auch die Palette an verfügbaren Nucleinbasen wurde durch Modifikationen erweitert [155]. Bei den meisten Modifikationen steht die Verbesserung

der Stabilität des Oligonukleotids im Vordergrund, aber auch dessen Spaltaktivität gegenüber der zu hydrolysierenden RNA kann positiv beeinflusst werden [140,156,157]. Sekundärstrukturen der Ziel mRNA können ebenfalls durch Modifikationen zugänglich gemacht werden [102,105]. Kompliziert wird die Entwicklung eines modifizierten Dz dadurch, dass Modifikationen gleich mehrere kritische Eigenschaften sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können [152,158].

Im Rahmen dieser Arbeit beschränkten sich die genutzten Modifikationen innerhalb des Oligonukleotids auf die Modifikation mit LNA, da diese in der Lage sind Sekundärstrukturen aufzubrechen. Die Halbwertszeit der *algD*-mRNA *in vivo* beträgt mit 19 min überdurchschnittlich lange [159]. Dies deutet auf eine ausgeprägte Sekundärstruktur hin, die die mRNA vor enzymatischen Abbau durch zytosolische RNasen schützt. Dieser Schutz durch die Sekundärstruktur der mRNA ist ebenfalls hinderlich für ein Gen-Silencing durch Dz, weshalb eine Optimierung der Spaltgeschwindigkeit gegenüber der mRNA erfolgen muss. Die Modifikation mit LNA verringerte zwar die Spaltgeschwindigkeit der Dz gegenüber dem kurzen Substrat RNA *algD290* (Abbildung 21), aber dafür sind sie in der Lage die komplexe mRNA zu spalten (Abbildung 22, Tabelle 10). Die Anordnung der LNA-Modifikationen erfolgte nach drei bereits in der Literatur beschriebenen Mustern [102,160].

Tabelle 10: Einfluss von Modifikation auf Spalteffizienz

vs.	RNA <i>algD290</i> (21 nt)	<i>algD</i> -mRNA (1678 nt)
DzTHM290	+++	-
LzTHM290a	++	++
LzTHM290b	(+)	(+)
LzTHM290c	(+)	(+)

Untersuchungen zur Optimierung der Schnittkinetik sollten zunächst mit der kurzkettigen RNA durchgeführt werden, um nur mit den effektivsten Dz das aufwendigere Screening mit der langkettigen *algD*-mRNA durchzuführen.

Modifikationen innerhalb der Oligonukleotide führen dazu, dass der Körper diese nicht mehr rückstandslos recyceln kann. Die Metabolisierung und Eliminierung modifizierter

Nukleotide ist bei Langzeittherapie ebenfalls schlecht erforscht. Denkbar ist jedoch, dass die Nebenwirkungen denen von Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) ähneln könnten. Bei NRTI handelt es sich ebenfalls um modifizierte Nukleoside. Diese werden jedoch als Monomere verabreicht, damit die virale Reverse-Transkriptase falsche Transkripte erzeugt bzw. die Polymerisation abbricht. Der Wirkort dieser Nukleosid-Analoga ist in körpereigenen Zellen und ihre Distribution erfolgt über das Blut. Dadurch ist das Gefahrenpotential für unerwünschte Arzneimittelwirkungen höher als bei einer Inhalation.

Abgesehen von Modifikationen innerhalb des Oligonukleotids, können diese auch an andere Moleküle wie bspw. Peptide und Zuckerderivate gekoppelt werden, um sich deren Eigenschaften zu Nutzen zu machen. Im Fall von CPP oder Siderophoren kann eine verbesserte Bioverfügbarkeit in bestimmte Bakterienzellen erreicht werden [91,161,162]. Analog zur Koppelung mit Aminosäuren und Signalmolekülen bietet z.B. GalNAc (N-Acetylgalactosamine) eine zielgerichtete Aufnahme in humane Hepatozyten [163]. Die Wirkweise der gekoppelten Moleküle ist dabei vergleichbar mit dem der Antikörper bei Immunokonjugaten bei der die Selektivität des Antikörpers genutzt wird, um Radionukleotide oder Wirkstoffe zielgerichtet zu applizieren [164]. In der Bakterienzelle ist aufgrund der fehlenden Kompartimente kein gesondertes intrazelluläres Drug Delivery nötig. Im Gegensatz dazu verbleiben Dz nach der Aufnahme in eukaryotischen Zellen oftmals in Endosomen und werden dort abgebaut. Deshalb sind bei eukaryotischen Anwendungen zusätzliche Bemühungen von Nöten, um dem Wirkstoff ein „endosomal escape“ zu ermöglichen [165–167].

Durch die Koppelung eines CPP an das 3'-Ende kann noch ein weiterer Zusatznutzen entstehen. Durch kovalente Bindung mit dem CPP besitzt DzTHM290CPP kein freies 3'-OH mehr, welches sonst üblicherweise von Exonukleasen rasch abgebaut werden kann. Aus demselben Grund wurden hgd40 und Dz13 mit einem invertierten Thymidin an ihrem 3'-Ende versehen [101]. Da die Synthese dieser gekoppelten Oligonukleotide derzeit noch mit sehr hohen Kosten verbunden ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Degradationsexperimente durchgeführt.

Nicht nur aus Kostengründen sollten Modifikationen so gering wie möglich gehalten werden. Manche CPP können Mutationen in Bakterien fördern und die Wahrscheinlichkeit von Off-Target Effekten ist ebenfalls erhöht [168]. Im Hinblick auf *P. aeruginosa* ist der Einsatz von CPP-gekoppelten Dz sinnvoll. *P. aeruginosa* sekretiert keinerlei DNasen und im Fall von biofilmproduzierenden *P. aeruginosa* ist die Sekretion ihrer Peptidase LasB in der Lunge herunterreguliert [20,56]. Die Abstinenz der Peptidase

LasB in der Lunge geht darauf zurück, dass *P. aeruginosa* die Lunge besser besiedeln kann, wenn der LasB-Regulator LasR herunterreguliert ist, was wiederum die Transkription von *algD* fördert [20,169]. Sowohl Oligonukleotide als auch Oligopeptide werden demnach vom Zielorganismus nicht oder kaum enzymatisch abgebaut und so zeigten CPP-gekoppelte Oligonukleotide bereits vielversprechende antimikrobielle Wirkung gegen *P. aeruginosa* [92].

Durch die Koppelung der Oligonukleotide an CPPs erreichen Gen-Silencing Kandidaten, die bislang lediglich *in vitro* Wirkung zeigten, neuen Aufschwung und entwickeln sich zu therapeutisch vielversprechenden Arzneistoffkandidaten [93,98]. Die Koppelung von Oligonukleotiden mit einem CPP eröffnen ein nahezu unendlich großes Potential für neue Antibiotika, für das der bestimmende Faktor derzeit die Forschungskosten sind. Da die Modifikationen und Koppelung derzeit durch die enormen Kosten limitiert werden, ist es sinnvoll ein Screening so kostengünstig wie möglich zu halten. Dies ist vor allem durch schnelles Aussortieren ineffektiver Dz-Kandidaten zu erreichen.

e) Temperatur

Die Temperatur spielt für die Spaltgeschwindigkeit von Dz ebenfalls eine wichtige Rolle. Das Substrat muss zunächst mit beiden Bindearmen an das Substrat hybridisieren. Nun kann das Dz sein Substrat hydrolysieren, woraufhin die beiden Spaltprodukte nur noch zu jeweils der Hälfte mit den Basen des Dz paaren und sich die T_m (Schmelztemperatur) verringert. Als Konsequenz werden die einzelnen noch gepaarten Spaltprodukte wieder frei gegeben. Daraus ergibt sich, dass das Temperaturoptimum, bei dem Dz die beste multiple-turnover Kinetik zeigen und somit mehrere Substrate hintereinander schneiden können, unterhalb der T_m mit dem Substrat und überhalb der T_m mit den jeweiligen Spaltprodukten liegen muss.

Nachfolgend sind in Tabelle 10 die prognostizierten T_m von Dz-Bindearmen zu Substrat bzw. zu den einzelnen Spaltprodukten aufgelistet:

Tabelle 11: Schmelztemperaturen (T_m) Dz-Substrat und Dz-Spaltprodukte

Name	Bindearmsequenz (5' → 3')	Substrat T_m	Spaltprodukte T_m
DzTHM95	CCACACCAAxGACTTCATG	47°C	28°C / 25°C
DzTHM290	GCAGATGAAXGATACGTCG	55°C	29°C / 33°C
LzTHM290a	gcaGATGAAXGATACGtCG	61°C	31°C / 42°C
LzTHM290b	GCAGaTGaAXGAtACGTCG	73°C	40°C / 64°C
LzTHM290c	GCAGaTGaAXGATaCgTCG	73°C	39°C / 64°C
Dz13	CGGGAGGAAXGAGGCGTTG	64°C	35°C / 45°C
hgd40	GTGGATGGAxGTCTTGAG	61°C	42°C / 33°C
Dz[152]	TGCCCAGGGAXGAGGAAACCTT	67°C	47°C / 39°C
DzOMe[152]	uGcCcAGGGAXGAGGAAaCcTu	51°C	17°C / 20°C
DzLNA[152]	tGcCcAGGGAXGAGGAAaCcTt	75°C	58°C / 42°C

x: 10-23 DNAzyme katalytische Sequenz 5' GGCTAGCTACAACGA 3'

Fett: 5'-Produkt(- T_m)

Unterstrichen: 3'-Produkt(- T_m)

Kleinbuchstaben: Modifikationen (LNA, außer bei DzOMe[152] 2'-O-Me Modifikation)

In dieser Arbeit wurden die Spaltgeschwindigkeiten von vier Dz (DzTHM290, DzTHM95, Dz13 und hgd40) bei jeweils drei Temperaturen (29°C, 32°C, 35°C) bestimmt (Abbildung 17). Wie vermutet konnte die schnellste Enzymkinetik bei 35°C ermittelt werden, was dem Temperaturoptimum aller gemessenen Dz am nächsten kommt. Im Fall von DzTHM290 lagen die Bindearm-Schmelztemperaturen kurz unter 35°C, was den steilen Anstieg der Spaltgeschwindigkeit erklären kann. Die Daten untermauern die Hypothese, dass für eine Optimierung der Spaltkinetik die Reaktionstemperatur unterhalb von Dz-Substrat- T_m und überhalb der Dz-Spaltprodukt- T_m liegen muss. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass Dz[152], DzOMe[152] und DzLNA[152] knapp oberhalb der höheren Spaltprodukt- T_m von 47°C sein Optimum besitzt (50°C [152]).

So lässt sich auch zum Teil die unterschiedlich starke Reduktion der Enzymgeschwindigkeit von LNA-Modifizierten Dz erklären (Abbildung 21). Die Modifikationen haben jedoch noch weitergehenden Einfluss als nur auf die Schmelztemperatur und somit die multiple-turnover Kinetik, da ansonsten für LzTHM290b und LzTHM290c eine vergleichbar schnelle Hydrolyse für zumindest äquivalente Mengen Substrat detektiert hätten werden müssen (Abbildung 21).

DzTHM290 >> LzTHM290a >> LzTHM290b ≥ LzTHM290c

Die Reaktionstemperatur beeinflusst also maßgeblich die Aktivität von Dz. Die Spaltgeschwindigkeit wird nicht nur *in vitro* temperaturabhängig sein, sondern auch *in vivo*. Dz die als Arzneimittel verabreicht werden, könnten so einen Teil ihrer Wirksamkeit einbüßen. Die Reduktion der Aktivität von pulmonal angewendeten Dz bei kalter Atemluft oder dermal applizierten Dz auf schlecht durchbluteten Körperregionen ist daher wahrscheinlich. Besonders relevant ist dies für das Dz hgd40, das für mehrere Applikationsorte in Frage kommt. Die mRNA des Transkriptionsfaktors GATA3 wird von hgd40 geschnitten und reduziert so Entzündungsreaktionen. Seine Applikation ist daher lokal sowohl auf der Haut (Atopisches Ekzem \triangleq Neurodermitis), pulmonal (Asthma), sowie intestinal/rektal (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) beabsichtigt. Bei der topischen Anwendung von hgd40 bei Neurodermitis auf schlecht durchbluteten Hautpartien (Knie und Ellenbogen) ist eine gleichzeitige Temperaturregulation des Applikationsortes anzuraten um die Aktivität des Dz zu gewährleisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine Anhebung von 29°C auf 35°C die Aktivität von hgd40 um das 2,7-fache gesteigert werden kann (Abbildung 17).

4.2.4 Resultat der Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue automatisierbare Methode zum Screening von Dz-Geschwindigkeiten entwickelt (Abbildung 10). Diese Methode ist insbesondere für kurze synthetische Substrate geeignet, kann jedoch unkompliziert auch für langkettige mRNA adaptiert werden. Die durchgeführten Untersuchungen resultierten in der Entwicklung einer neuen Methodik für die kostensparende *in vitro* Entwicklung eines Dz-Kandidaten (Abbildung 34).

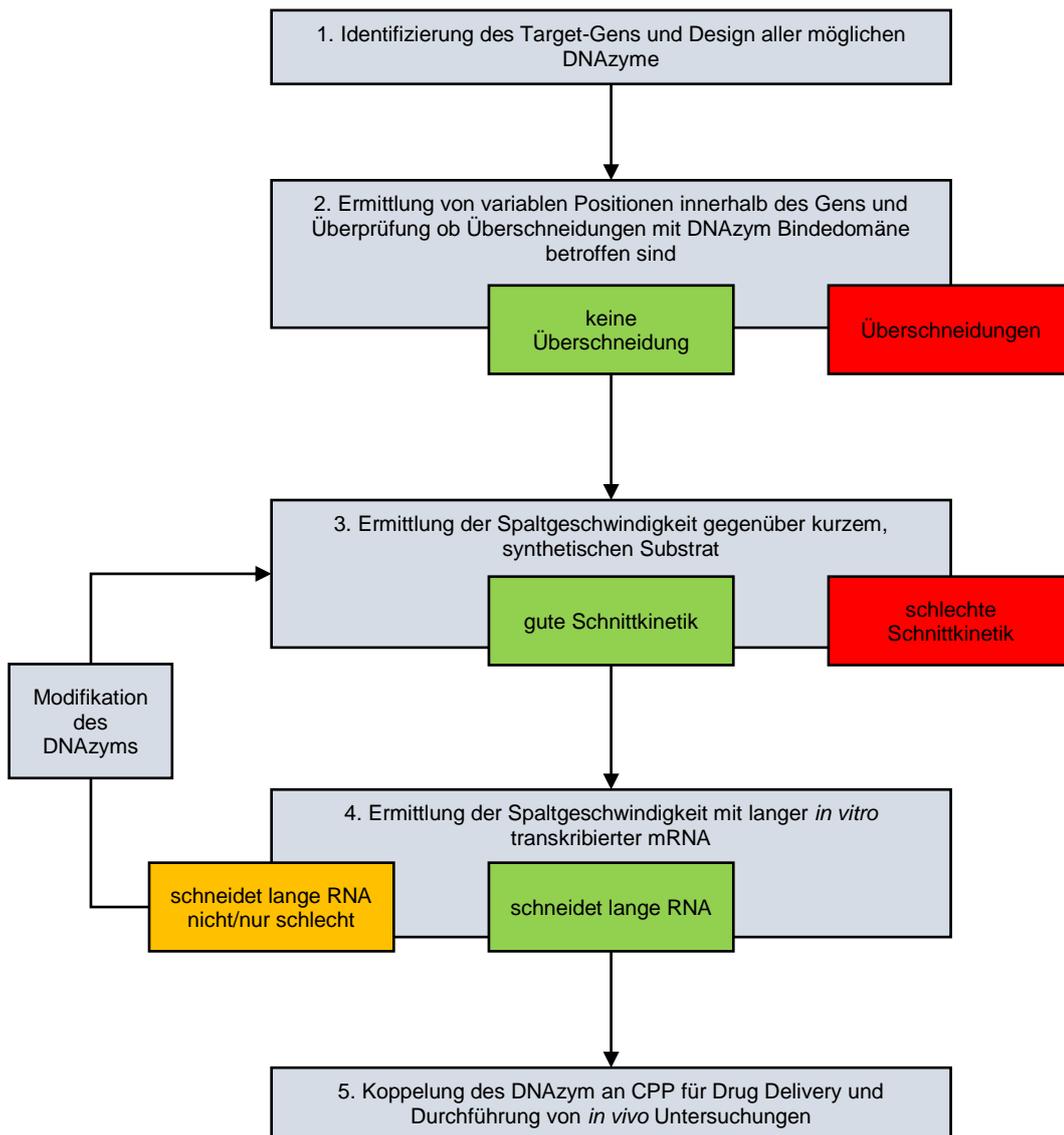


Abbildung 34: Methodik zum Entwickeln eines Dz

4.3 *P. aeruginosa* Untersuchungen

Der Unterschied zwischen mukoiden und nicht-mukoiden Biofilmen von *P. aeruginosa* wurde untersucht und der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Biofilmbildung. Neben der Wirkung auf den Biofilm wurden Synergien mit dem Aminoglykosid-Antibiotika Tobramycin untersucht.

4.3.1 Charakterisierung Biofilm

Biofilme sind komplexe Systeme, die unterschiedliche Strukturen und Beschaffenheiten aufweisen und diverse Mikroorganismen enthalten können. Durch Quorum sensing, Chemotaxis und hostspezifische oder pathologische Eigenschaften kann sich der Biofilm in seiner Zusammensetzung besonders gut verschiedenen Bedingungen anpassen. Im Fall von mukoiden *P. aeruginosa*-Biofilmen handelt es sich um eine spezielle Art von Biofilm, die hauptsächlich in Lungen von CF-Patienten nachweisbar ist. Daher wurden Pseudomonaden, die aus Patientenproben isoliert wurden und eine besonders ausgeprägte Biofilmbildung aufwiesen, für die nachfolgenden Biofilm-Untersuchungen verwendet.

Um die Bildung eines Biofilms zu untersuchen, sind vielfältige Untersuchungen möglich und nötig, die meist in ihrer Komplexität stark reduziert und auf Monokulturen beschränkt sind. Oftmals wird der Mikrotiterplatten-Assay mit Kristallviolett aus Flüssigkulturen nach O'Toole verwendet, um eine Quantifizierung von Biofilmen vorzunehmen [170]. Der Assay weist dabei hauptsächlich die Adhäsion von Bakterien an Oberflächen nach [171]. Im Fall von *P. aeruginosa* Biofilmen ist für die Adhäsion an Oberflächen das Polysaccharid Pel hauptverantwortlich [170,172]. Bei einem mukoiden Biofilm wird ein Großteil des Alginats beim ersten Waschschrift des Mikrotiterplatten-Assays verworfen und die Produktion von Alginat hat somit kaum Einfluss auf den so quantifizierten Biofilm [173]. Somit musste eine Alternative zum Quantifizieren des Biofilms gefunden werden. Die quantitative Fällung von kommerziell erhältlichem Alginat aus der Braunalge mittels Ca^{2+} suggerierte in Experimenten, dass eine Quantifizierung des bakteriellen Alginats ebenso möglich sei. Die Gel-Bildung von Alginat mit Ca^{2+} -Ionen fällt je nach Herkunft und Reinheit des Alginats unterschiedlich stark aus. Im Fall unserer Patientenisolate konnte zwar mit dem Sterilfiltrat einer EDCC5487 Biofilm-Dilution ein solides Gel gebildet werden, jedoch stieg die Zeit bis zur Ausbildung des soliden Gels im Vergleich zum Braunalgen-Alginat enorm an (Sekunden → Stunden). Das Gel des Sterilfiltrats einer

EDCC5488 Biofilm-Dilution ergab lediglich eine schleimartige Konsistenz und auch die Reinheit und Homogenität des bakteriellen Alginate-Biofilms schloss letztendlich eine reproduzierbare Alginate-Quantifizierung mittels Gelbildung mit Ca^{2+} aus.

Durch den ausgeprägten Phänotyp mukoider Stämme bietet sich das große Volumen ihrer Biofilme zum Quantifizieren an (Abbildung 23). Zurückzuführen ist das große Volumen des mukoiden Biofilms auf die Quellwirkung von Alginate. Dank ebendieser Eigenschaft wird Alginate auch in der Wundversorgung häufig als Wundsekret-Absorber verwendet, da es im Stande ist große Mengen Wasser zu binden. Wegen des großen Unterschieds des Biofilmgewichts zwischen mukoiden (>200 mg / Filter) und nicht-mukoiden (<150 mg / Filter) Stämmen wurde diese Quantifizierung zum Bestimmen einer biofilminhibierenden Wirkung angewendet (Abbildung 25).

Da im Rahmen dieser Arbeit mit nativen Patientenisolaten gearbeitet wurde und kein äußerer Selektionsdruck während der Kultivierung ausgeübt wurde, verloren instabile mukoiden *P. aeruginosa* Kulturen im Laufe der Zeit ihre Biofilm-Performance bis hin zu ihrem mukoiden Phänotyp (Abbildung 26). Vorherige Studien zeigten, dass durch geringe Antibiotikakonzentrationen während der Kultivierung ein künstlicher Selektionsdruck ausgeübt werden kann, der den mukoiden Phänotyp fördert [174]. Der Stamm EDCC5487 zeigte in unserer Untersuchung den stabilsten mukoiden Phänotyp. Im Fall von EDCC5488 schien es einen zweistufigen Verlust der biofilmbildenden Eigenschaften zu geben, was durch zwei unabhängige Mutationen, die die Alginate-Produktion begünstigt hatten und nacheinander zurück mutierten, zu erklären wäre. Selbst der als stabil klassifizierte Stamm SG81 verlor im Laufe der Kultivierung seinen mukoiden Phänotyp [113].

4.3.2 Wirkungen auf Biofilm

Keine der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen (AM5'ASG, PenA, Dz) konnte den mukoiden Phänotyp des Biofilms in einen nicht-mukoiden Phänotyp umwandeln. Nachfolgend wird auf die untersuchten Substanzen im Einzelnen eingegangen:

Der bereits in der Literatur beschriebene hochpotente AlgD-Inhibitor AM5'ASG zeigte keine Reduktion des Biofilms, obwohl seine selektive AlgD-Inhibition die Alginate-Biosynthese umfassend blockieren müsste. In den 1989 durchgeführten Studien zeigte

AM5'ASG eine ausgeprägte Synergie mit Tobramycin, die auf die Inhibition von AlgD zurückgeführt wurde. Der in der Publikation beschriebene Effekt [69] war jedoch maßgeblich von den vorherrschenden Wachstumsbedingungen (2% Glukose) abhängig. Dies wurde in der Promotion von Frau Sauvage ausführlicher beschrieben [70]. Um diesen Bedingungen zu entsprechen wurden die Versuche mit selbstgegossenen Agarplatten, die mit 2% Glukose supplementiert waren, durchgeführt. Dennoch wurde kein Effekt auf die Biofilmmenge festgestellt. Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten klinischen Stämmen, wurde für die damaligen Untersuchungen ein mukoider Stamm durch Selektionsdruck künstlich erzeugt und die Experimente in Flüssigkultur durchgeführt. Da bereits die Synthese des Inhibitors AM5'ASG problematisch war und die Stabilität des Inhibitors nicht ohne Zweifel gewährleistet werden konnte, wurden auch verschiedene Neben- und Abbauprodukte des Inhibitors untersucht. Es war nicht auszuschließen, dass die 1989 gemessenen Ergebnisse auf ein anderes Molekül zurückzuführen waren. Doch auch die quantitativ am stärksten auftretenden Neben- und Abbauprodukte („365“, „372“, „383“, „415“ und „444“) bewirkten keine Biofilmreduktion. Da die Reinheit des damals verwendeten Inhibitors nicht angegeben wurde, kann die damals beschriebene Wirkung auch auf Verunreinigungen oder Kontaminationen zurückzuführen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem der Einfluss von PenA, einem unselektiven AlgD-Inhibitor [67,68], untersucht. Dieser Inhibitor erwies sich ebenfalls als ungeeignet einen mukoiden Phänotyp zu verhindern (Abbildung 27). In vorherigen Experimenten reduzierte er bei <10 µg/mL die Alginate-Menge um >80%. [67]. Dabei wurde jedoch ein anderer Agar (Müller-Hinton) verwendet und PenA direkt in den Agar eingearbeitet. Durch die Diffusion von PenA in den Agar kann die Konzentration im Rahmen dieser durchgeführten Experimente leicht abnehmen. Typische Hemmhof-Experimente suggerieren jedoch, dass das Ausmaß von Wirkstoffdiffusion nicht allzu umfangreich ist. Da PenA unselektiv für *algD* und toxisch für den Menschen ist, kommt es als Wirkstoff nicht in Frage, vielleicht aber in höheren Konzentrationen als Positivkontrolle. Die gewählten Mengen PenA von 0,1 µg/Filter, 1 µg/Filter und 5 µg/Filter könnten im Rahmen weiterer Untersuchungen zumindest noch weiter gesteigert werden. Problematisch kann dabei lediglich die in höheren Dosen eintretende Wachstumshemmung von PenA sein, die die Biofilmbildung allein durch die reduzierte Anzahl an Bakterien beeinflussen könnte. Das geringe Abweichungen (-10%) der

Bakterienanzahl keinen Einfluss auf die gebildete Biofilmmenge haben, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit sichergestellt (Abbildung 27, 17).

Das Ziel dieser Arbeit war es durch Gen-Silencing eine Reduktion des Biofilms zu bewirken. Die beste Tendenz einer biofilminhibierenden Wirkung wurde mit dem an ein CPP gekoppelten DzTHM290 (DzTHM290CPP) erreicht. Es zeigte sich eine leichte, konzentrationsabhängige Verringerung des Biofilmgewichts (Abbildung 27, 6 und 10). Auf eine selektive Inhibition der Biofilmbildung ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht zurückzuführen, da das CPP in höheren Konzentrationen vermutlich wie ein AMP (z.B. SMAP-29) wirkt (siehe 4.3.3). Das Ausbleiben einer selektiven Wirkung gegen den Biofilm kann durch die komplexe Sekundärstruktur der *algD*-mRNA erklärt werden, die ein effektives Silencing durch das unmodifizierte Dz unterbindet (Tabelle 10). Mit Hilfe von Modifikationen wurde die Schnitteffizienz gegenüber der langkettigen *algD*-mRNA optimiert. In der Literatur wurde gezeigt, dass schon sehr niedrige Konzentrationen eines CPP-gekoppelten Oligonukleotids einen Gen-Silencing-Effekt bewirken können (Tabelle 12). Im Fall der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten modifizierten Dz besteht weiterhin Verbesserungspotential um die Aktivität gegenüber der langkettigen *algD*-mRNA zu optimieren. Daher wurde auf eine kostspielige Koppelung des als bislang erfolgsversprechenden modifizierten Dz (LzTHM290a) verzichtet.

Tabelle 12: Gen-Silencing Antibiotika

Wirt	Zielgen	Typ	Konzentration	Quelle
<i>A. baumannii</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	Antisense, BNA-CPP	0,5 µM	[93,98]
<i>E. coli</i>	<i>acpP</i>	Antisense, PNA-CPP	2 µM	[162]
<i>P. aeruginosa</i>	<i>acpP, lpxC, rpsJ</i>	Antisense, PPMO-CPP	20 µM	[92]
<i>S. aureus</i>	<i>ftsZ</i>	Antisense, LNA-CPP	1-10 µM	[94]
<i>E. coli</i>	β -Lactamase TEM	di-DNAzyme + Elektroporation	~1 µM	[87]
<i>P. aeruginosa</i>	PA4461	DNAzyme + Elektroporation	n. a.	[88]

n. a.: nicht angegeben

4.3.3 Synergie mit Antibiotika

Tobramycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese der Bakterien durch Bindung an die 30S-Untereinheit ihrer Ribosome blockiert. *P. aeruginosa* kann sich gegenüber Tobramycin über mehrere Mechanismen schützen [175]. Der Alginat-Biofilm selbst macht das Bakterium nicht resistent, verringert aber die Diffusion von Tobramycin in Richtung des Bakteriums [31,32]. Demnach sollte ein Arzneistoffkandidat, der die Alginat-Biosynthese blockiert nicht nur die Biofilm-Last verringern, sondern auch die Antibiotikasensitivität des Bakteriums gegenüber Tobramycin wiederherstellen. Um dies zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Wachstumsversuche ausschließlich mit dem resistenten Stamm EDCC5487 durchgeführt, der unempfindlich gegenüber Tobramycin ist und einen mukoiden Phänotyp besitzt.

Eine solche Synergie wurde 1989 erstmals in der Doktorarbeit von Frau Dr. Sauvage beschrieben [69]. Die Synthese des Inhibitors für die vorliegende Untersuchung erfolgte am Institut für organische Chemie, Universität Gießen entsprechend der Angaben in o.g. Arbeit. Dies stellte sich als problematisch dar und musste abgewandelt werden. Auch

die Analytik *via* MS und NMR des finalen Produkts AM5'ASG warfen Zweifel an der Stabilität des Inhibitors auf. Letztendlich zeigten, wie bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben, auch die Experimente in Flüssigkulturen keine Synergie mit Tobramycin und somit keine reproduzierbaren Ergebnisse der Promotion von Frau Dr. Sauvage.

Auch die Versuche mit verschiedenen Dz (DzTHMix, DzTHM290CPP, LzTHM290a) zeigten keine Synergie mit Tobramycin (exemplarisch DzTHM290CPP, Abbildung 29, oben). Die eingesetzten Konzentrationen hätten entsprechend vergleichbarer Experimente aus der Literatur ausreichen müssen (Tabelle 12). Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, ist das Ausbleiben einer Gen-Silencing Wirkung von DzTHM290CPP durch die *in vivo* Sekundärstruktur der *algD*-mRNA wahrscheinlich. Die anderen Dz waren aus Kostengründen nicht an CPP gekoppelt verfügbar und erreichten daher keine ausreichenden intrazellulären Konzentrationen. Für LNA-Modifikationen wurde eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit mittels Gymnosis in eukaryotische Zellen gezeigt [160] und auch eine verbesserte Internalisation in *E. coli* wurde beschrieben [158]. In Studien mit *S. aureus* zeigte sowohl das ungekoppelte LNA-Oligonukleotid, als auch das hierbei verwendete, ungekoppelte CPP (KFF)₃K keinerlei Effekt, während nach der Koppelung *in vitro* und *in vivo* (Mausmodell) außerordentlich vielversprechende Ergebnisse erreicht wurden [94].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei höheren Konzentrationen (20 µM) des hier verwendeten CPPs (RXR)₄XB eine schwache Synergie mit Tobramycin beobachtet (Abbildung 29, mittig). CPP-Konzentrationen ab 0,1 mM zeigten bereits ohne Tobramycin eine sehr kurze bakterio-statische Wirkung (Abbildung 29, unten, TOB [0,0 µg/mL] + CPP [0,1 mM]). In Kombination mit verschiedenen Tobramycin-Konzentrationen wurde diese ursprünglich sehr kurze bakterio-statische Wirkung konzentrationsabhängig verlängert, bevor die bakterio-statische Wirkung schlagartig verloren ging und das Bakterienwachstum ungehemmt begann (Abbildung 29, unten). Um die antimikrobielle Wirkung des CPP zu charakterisieren wurden Wachstumskurven mit dem gegen *P. aeruginosa* spezifischen AMP SMAP-29 durchgeführt (Abbildung 30). SMAP-29 ist ein 29 Aminosäure umfassender Peptidabschnitt eines aus dem Schaf stammenden Defensins. Es wirkt wie ein Cathelicidin, indem es die Zellmembran der Bakterien beeinflusst. Die unterschiedlichen Wirkmechanismen von SMAP-29 (Störung der Zellmembran) und Tobramycin (Hemmung der Proteinbiosynthese) werden durch die unterschiedlichen Verläufe ihrer Wachstumskurven deutlich. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Wachstumskurven mit SMAP-29 ähnelten denen von CPP in

Kombination mit Tobramycin. Ein Wachstum der Bakterienstämme setzte ebenso konzentrationsabhängig von SMAP-29 erst zu einem späteren Zeitpunkt ein. Durch Aminosäuremodifikation von SMAP-29 konnte der Abbau durch Peptidasen verringert werden, was zu einer wesentlichen Steigerung der Wirkdauer führte [111]. Da AMPs extern wirken und *P. aeruginosa* Peptidasen sekretieren kann, deuten die Verläufe der Wachstumskurven mit CPP ebenfalls auf eine Degradation des Peptids hin. Nachdem die Konzentration von CPP bzw. SMAP-29 einen gewissen Schwellenwert unterschritten haben, beginnt das Bakterium in seiner ursprünglichen Geschwindigkeit zu wachsen. Die Synergie mit Tobramycin lässt sich durch die Inhibition der Proteinbiosynthese erklären, die die Bakterien benötigen, um Peptidasen zu translatieren und zu sekretieren, damit diese wiederum extrazellulär die AMPs degradieren. Der Abbau könnte ebenso durch eine Kombinationstherapie mit Protease-Inhibitoren unterbunden werden [176]. Demnach könnten auch AMPs an sich bei pulmonalen Infektionen einen geeigneten Lösungsansatz darstellen. Ihre pulmonale Bioverfügbarkeit ins Blut ist gering und unerwünschte Wirkungen treten meist bei systemischer Applikation auf. AMPs sind allerdings meistens positiv geladen und hätten Schwierigkeiten einen Alginate-Biofilm zu durchdringen, ähnlich wie bei die positiv geladenen Aminoglykoside [31,32]. Die Kopplung eines positiv geladenen Peptids an ein mehrfach negativ geladenes Oligonukleotid bietet großen Spielraum um die Ladungsverhältnisse zu optimieren.

Im Vergleich zu reinem CPP wurde seine antimikrobielle Wirkung durch die Koppelung von DzTHM290 an das CPP reduziert (Abbildung 29, mittig zu oben). Dieser Effekt lässt sich durch einen Verlust der Flexibilität des CPPs erklären, die notwendig ist um Poren zu formen [177]. Für den Ansatz des gezielten antimikrobiellen Gen-Silencing ist dieser Sachverhalt jedoch irrelevant, da das CPP lediglich für die Aufgabe der Drug Delivery in die Bakterienzelle gekoppelt wird [178]. Da Peptidasen bei pulmonalen Infektionen mit *P. aeruginosa* herunterreguliert werden [159,169], stellt die gezielte Dz-Delivery mit CPP eine valide Option dar. Körpereigene AMPs können Zellwandstress auslösen und so die Produktion von Alginate induzieren [64], was die Prävalenz mukoider Pseudomonaden in den Lungen von CF-Patienten erklärt [168].

Die in diesem Abschnitt diskutierten Wachstumskurven wurden in Flüssigkulturen bestimmt, was das Wachstumsverhalten der Bakterien in der Lunge nur ungenügend widerspiegelt. Zu erkennen ist dies daran, dass in den Versuchen mit CPP und AMP von den Pseudomonaden vermutlich Peptidasen exprimiert wurden. Chronische Lungeninfektionen mit biofilmbildenden *P. aeruginosa* zeichnen sich jedoch durch

geringere Expression von Peptidasen aus [56,159,179]. Für aussagekräftige Ergebnisse sind komplexere Modelle notwendig, wie bspw. ein Co-Kultur-Infektionsmodell [180] oder ein CF-Modell [181].

Die pathophysiologischen Begebenheiten innerhalb der Lunge von CF-Patienten fördert die Expression von AlgD [56]. Erst *in vivo* Versuche können daher Aufschluss auf eine protektive Wirkung geben, da auch Pseudomonaden die *in vitro* keinen Biofilm bilden, sich *in vivo* sehr schnell auf die lokalen Begebenheiten umstellen und Biofilm produzieren [125,182]. Im Rahmen der (Routine-)Diagnostik werden pulmonal mukoide Kolonien mit hoher Wahrscheinlichkeit als nicht-mukoide klassifiziert, da ihre Kultivierung und Charakterisierung *in vitro* stattfindet. Lediglich konstitutiv mukoide Pseudomonaden werden zuverlässig *in vitro* diagnostisch als mukoide identifiziert [127]. Fakultativ mukoide Stämme, die im Milieu einer CF-Lunge noch mukoide waren, können sich innerhalb von kürzester Zeit den Voraussetzungen *in vitro* adaptieren und so zu falsch-negativ evaluierten Biofilm-Performances führen.

4.4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Bestimmung von Dz-Kinetiken entwickelt. Die entwickelte Methode ist bisherigen Methoden überlegen, da sowohl Arbeitsschritte gespart, die Genauigkeit verbessert und der daraus gewonnene Informationsgehalt erhöht wird. Mit dieser Methode wurde ein Dz-Screening durchgeführt und der Einfluss unterschiedlicher Parameter bestimmt (pH, Sequenz, Sekundärstruktur, Temperatur, Modifikationen).

Derzeit gibt es noch keine spezifische Anti-Biofilm-Therapie, diese würde die bereits intensive Pharmakotherapie für CF-Patienten ergänzen (Abbildung 35). Bisherige Versuche die Biofilmmenge durch Posttranskriptionelles Gen-Silencing zu reduzieren zeigten noch keinen Erfolg, was vermutlich auf die komplexe Sekundärstruktur der Ziel-mRNA zurückzuführen ist. Erste Lösungsansätze wurden exemplarisch aufgezeigt und benötigen weitere Optimierung (Abbildung 34). Als nächster Schritt steht eine Optimierung der Dz-Spaltgeschwindigkeit gegenüber der *algD*-mRNA an. Vorzugsweise sollten dabei durch Modifikationen die Bindearm- T_m so niedrig wie möglich und die Substrat- T_m so hoch wie möglich beeinflusst werden. Dieses optimierte Dz sollte dann an ein CPP gekoppelt und seine Wirkung auf den Biofilm untersucht werden. Eine RT-qPCR eignet sich, um den direkten Einfluss auf die Menge der intrazellulären *algD*-mRNA im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen zu messen. So können gleichzeitig die Bioverfügbarkeit und Effektivität des Oligonukleotid-CPP Konstruktes gegen sein *in vivo* vorliegendes Ziel bewiesen werden. Im Anschluss sollte der Abbau des Konjugats durch DNasen, vor allem der als Arzneistoff angewendeten Dornase alfa, untersucht werden.

Durch eine umfangreichere Sequenzierung des *algD*-Operons von klinischen Isolaten, in Kombination mit der Evaluation ihrer Biofilm-Performances und ihrer Antibiotikaresistenz könnten wichtige Zusammenhänge hergestellt werden und so neue Ansatzpunkte für ein Gen-Silencing gefunden werden. Besonders interessant ist die Tatsache, dass auf das *algD*-Operon das *arnBCADTEF-ugd*-Operon (\triangleq *pmrHFIJKLM-ugd*-Operon) folgt, welches maßgeblich zu verschiedenen Antibiotikaresistenzen beiträgt [183] und sich dabei nicht nur auf *P. aeruginosa* beschränkt [184].

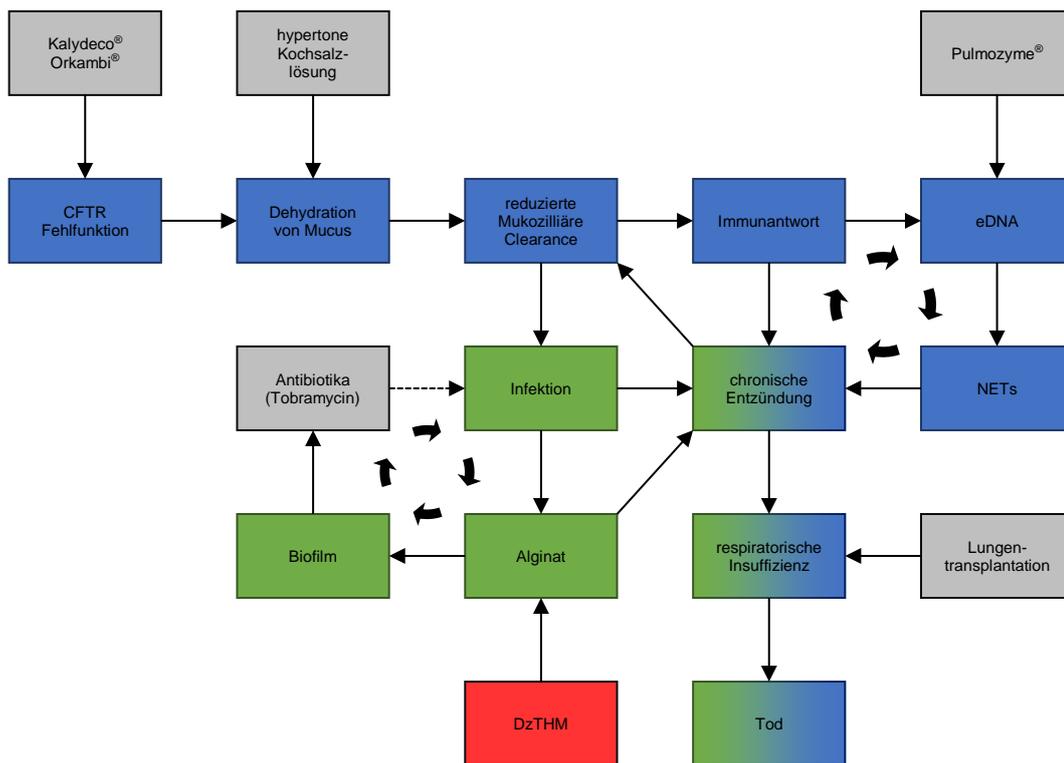


Abbildung 35: Pathogenese und Interventionsmöglichkeiten bei CF

Blau: endogene Faktoren

Grün: bakterielle Faktoren

Grau: Interventionsmöglichkeiten

Rot: Angriffspunkt des Ziel DNAzyms

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Zystische Fibrose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung die mit chronischen Infektionen der Atemwege einhergeht. Besonders Infektionen mit Biofilm bildenden Pseudomonaden führen zu einem Verlust der Lungenfunktion und reduzieren die Wirksamkeit von Antibiotika. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen bisheriger Antibiotika machen ihre Therapien problematisch und es gibt bislang keine zielgerichtete Behandlung gegen Biofilm bildende Bakterien. In dieser Arbeit sollte ein DNAzym entwickelt werden, dass durch Posttranskriptionelles Gen-Silencing ein biofilmrelevantes Gen ausschaltet. Für den mukoiden Biofilm ist das Exopolysaccharid Alginate von *P. aeruginosa* verantwortlich. Die mRNA des Gens *algD* wurde als Ziel identifiziert, da sein Protein AlgD die Monomere für die Alginate-Synthese bereitstellt. Um häufig vorkommende Punktmutationen innerhalb des bakteriellen Gens mit den DNAzymen zu umgehen, wurden zunächst klinische Stämme sequenziert und eine Konsensussequenz erstellt. Für vielversprechende DNAzym-Kandidaten wurde ein Screening durchgeführt. Dafür wurde ein neues Verfahren entwickelt, dass auf HPLC basiert und mit dem die Geschwindigkeit von DNAzymen ohne aufwendige Bearbeitung der Proben dargestellt werden kann. Das neue Verfahren wurde charakterisiert und mit dem bekannten DNAzym Dz13 validiert. Die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens wurden aufgezeigt und dabei verschiedene Aspekte der Wirkstoffklasse der DNAzyme untersucht. Das schnellste gegen *algD* gerichtete DNAzym wurde modifiziert und seine Biofilmwirkung untersucht. Dafür wurden zunächst die Biofilme von nicht-mukoiden und mukoiden *P. aeruginosa* Patientenisolaten charakterisiert. Es konnte nur eine geringe Biofilminhibition gemessen werden. Als Problematik wurde die Sekundärstruktur von *algD*-mRNA identifiziert und Lösungsansätze für diese Problematik wurden mit Modifikationen des DNAzyms exemplarisch aufgezeigt. Die geringfügige Änderung der Biofilmmenge wurden auf off-target Effekten des für das Drug Delivery verwendeten zellpenetrierenden Peptids zurückgeführt. Dafür wurde das Wachstumsverhalten mit Tobramycin und dem Vergleichspeptid SMAP-29 aufgezeichnet, das für seine antimikrobielle Wirkung bekannt ist.

5.2 Abstract

Cystic Fibrosis is an autosomal-recessive inherited metabolic disorder that is accompanied by chronic infections of the lung. Especially infections with biofilm forming *Pseudomonads* lead to a loss of lung function and reduce the efficacy of antibiotics. Undesirable side effects of recent antibiotics make their therapy problematic and until now there is no targeted treatment against biofilm forming bacteria. In this work a DNAzyme should be developed that post transcriptionally silences a biofilm relevant gene. The mucoid biofilm derives from the exopolysaccharide alginate of *P. aeruginosa*. The mRNA of the gene *algD* was identified as target gene, because its protein AlgD provides the monomers of the alginate biosynthesis. To evade frequently occurring point mutations within the bacterial gene with the DNAzyme, *algD* of several clinical strains were sequenced and a consensus sequence was compiled. For promising DNAzyme candidates a screening was carried out. For that a new HPLC based method was developed that determines the cleavage speed of DNAzymes without complex sample processing. The new method was characterized and validated with the established DNAzym Dz13. The versatile possible applications of the method were demonstrated by investigating various aspects of the class of DNAzymes. The fastest cleaving DNAzyme designed against *algD* was modified and its impact on biofilm formation was investigated. Therefore, biofilms of non-mucoid and mucoid *P. aeruginosa* patient isolates were characterized in advance. Only a minor reduction of biofilm was measured. Addressing the secondary structure of *algD*-mRNA with the DNAzyme was identified to be a difficulty and a problem-solving approach with modified DNAzymes was shown. The minor reduction of the biofilm-quantity was led back to off-target effects that were most likely caused by the cell-penetrating-peptide, which was coupled to the DNAzyme for drug delivery reasons. Therefore, the growth behavior in presence of tobramycin and the comparison peptide SMAP-29 was determined, which is known for its antibacterial activity.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AEX	anion exchange
AlgD	GDP Mannose 6 dehydrogenase
AlgL	Alginat Lyase
AM5'ASG	alcylnyl-6-mannosyl-5'aminosulfonylguanosine
AMP	antimikrobielles Peptid
ASO	Antisense Oligonukleotide
BNA	"bridged nucleic acid"
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CP	"Cleavage Products" - Spaltprodukte
CPP	" cell-penetrating peptide" - zellpenetrierendes Peptid
DAD	Diodenarray-Detektor
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
Dz	DNAzyme
EDCC	Eugen Doman Culture Collection
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
extrazelluläre DNA	extrazelluläre DNA
GalNAc	N-Acetylgalactosamine
h	Stunde(n)
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HPLC	high performance liquid chromatography
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
LasB	<i>P. aeruginosa</i> elastase - Pseudolysin
LB	Lysogeny Broth
LNA	locked nucleic acid
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n. a.	nicht angegeben
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	neutrophil extrazellular traps
NMR	"nuclear magnetic resonance" – Kernspinresonanzspektroskopie
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
nt	Nukleotide
Nukleinbasen A, C, G, T / U	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uridin
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
Pel.	pellicle
PenA	"Penicillic acid" - Penicillinsäure
PMO	"phosphorodiamidate morpholino oligo"

PNA	<i>"Peptide Nucleic Acid"</i>
PP	<i>Primer-Paar</i>
Psl.....	<i>polysaccharide synthesis locus</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	<i>RNA Interferenz</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
siRNA.....	<i>small interfering RNA</i>
SMAP-29.....	<i>Sheep Myeloid Antimicrobial Peptide 29</i>
SMCC	<i>succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate</i>
ssRNA.....	<i>single-stranded RNA</i>
TBE-Puffer	<i>TRIS-Borat-EDTA-Puffer</i>
TEAA.....	<i>Triethylammonium acetate</i>
T _m	<i>Schmelztemperatur</i>
TOB	<i>Tobramycin</i>
Tris.....	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
u.a.....	<i>unter anderem</i>
ÜNK	<i>Übernachtkultur</i>
VE-Wasser.....	<i>vollentsalztes Wasser</i>
vs.	<i>versus</i>
z.B.....	<i>zum Beispiel</i>

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pathologie der mukoziliären Clearance bei CF-Patienten	9
Abbildung 2: Lebenserwartung von CF-Patienten im Laufe neuer Therapiemöglichkeiten. Mit Genehmigung von M. Lopes-Pacheco [7].....	11
Abbildung 3: Aufbau und Struktur von Alginat. Mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry [36].....	13
Abbildung 4: Stoffwechselweg des Algins (oben);	15
Abbildung 5: Schema zur Inhibition der Biofilmproduktion	17
Abbildung 6: Strukturformeln AlgD-Inhibitor und verwandte Substanzen	21
Abbildung 7: Phänotyp <i>P. aeruginosa</i> Stämme auf MacConkey-Agar	24
Abbildung 8: PCR für Sequenzierung	27
Abbildung 9: Design zweier benachbarter 10-23 DNAzyme gegen den selben RNA-Abschnitt	28
Abbildung 10: Arbeitsablauf des automatisierten HPLC Assay – Hoefler <i>et. al</i> [114]...	30
Abbildung 11: PCR Template für RNA-Transkription	31
Abbildung 12: Überlappende PCR Produkte für <i>algD</i> Sequenzierung.....	36
Abbildung 13: (A) Spaltmuster von Dz13 und RNA c-Jun(24); (B) Verschiedene Längenstandard Teilstücke von RNA c-Jun(24) – Hoefler <i>et. al</i> [114].....	40
Abbildung 14: Exemplarische DNAzym Spaltkinetik von DzTHM290 und dem synthetischen Substrat RNA <i>algD290</i> – Hoefler <i>et. al</i> [114].....	41
Abbildung 15: Spaltkinetik verschiedener DNAzyme – Modifiziert nach Hoefler <i>et. al</i> [114]	42
Abbildung 16: Kompetitiver und Benchmark Spaltassay – Hoefler <i>et. al</i> [114].....	44
Abbildung 17: Temperaturabhängigkeit von DNAzym Spaltkinetik – Modifiziert nach Hoefler <i>et. al</i> [114]	45
Abbildung 18: Exemplarischer DNAzym PAGE-Assay.....	46
Abbildung 19: Eine von Mfold [112] prognostizierte Sekundärstruktur der <i>algD</i> -mRNA von PAO1	47
Abbildung 20: Schema der <i>in vitro algD</i> -mRNA Produktion	47
Abbildung 21: LNAzym Spaltkinetiken gegenüber kurzem Substrat.....	49
Abbildung 22: LzTHM290a spaltet <i>algD</i> -mRNA.....	50

Abbildung 23: Mukoider Biofilm von <i>P. aeruginosa</i> auf einer MacConkey Agarplatte nach 24 h	51
Abbildung 24: Vergleich von unbehandelten Biofilmen von <i>P. aeruginosa</i>	52
Abbildung 25: Unterschiede der Biofilmbildung verschiedener Stämme, n = 3	53
Abbildung 26: Gradueller Verlust der Biofilm-Performance.....	54
Abbildung 27: Prozentuale Biofilmmenge bei verschiedenen Behandlungen in Relation zu unbehandeltem Biofilmwachstum.....	55
Abbildung 28: Wachstumskurven Tobramycin.....	56
Abbildung 29: Synergie Tobramycin und DzCPP/ CPP	58
Abbildung 30: Wachstumskurven mit AMP „SMAP-29“	59
Abbildung 31: Schema der Spaltung einer RNA durch bis zu vier Dz und die jeweils neu entstehenden (Zwischen-)Produkte	66
Abbildung 32: Sekundärstruktur RNA <i>algD95</i> via MFold [112].....	69
Abbildung 33: Sekundärstruktur RNA <i>algD1145</i> via MFold [112].....	70
Abbildung 34: Methodik zum Entwickeln eines Dz.....	76
Abbildung 35: Pathogenese und Interventionsmöglichkeiten bei CF	86

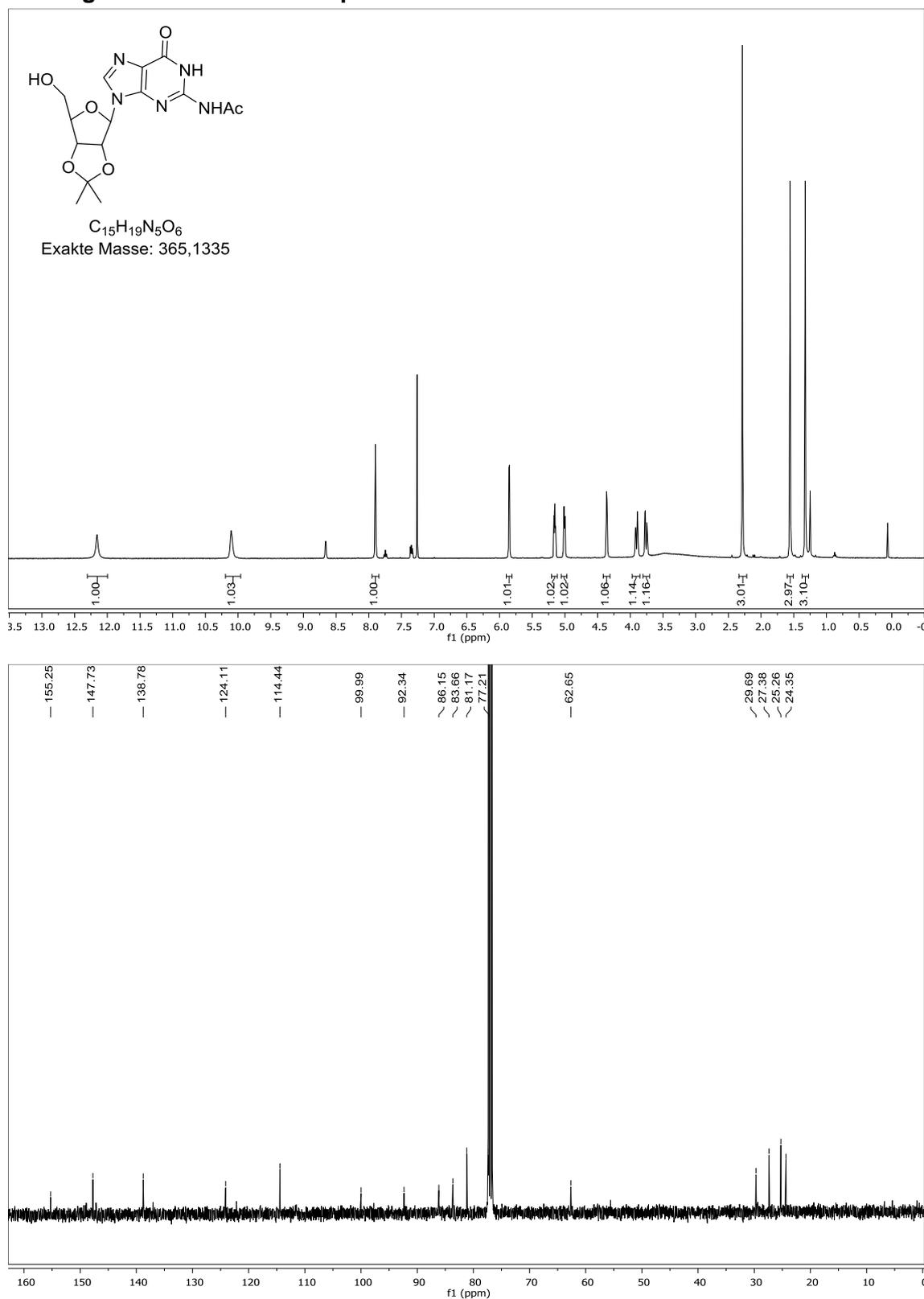
8 Tabellenverzeichnis

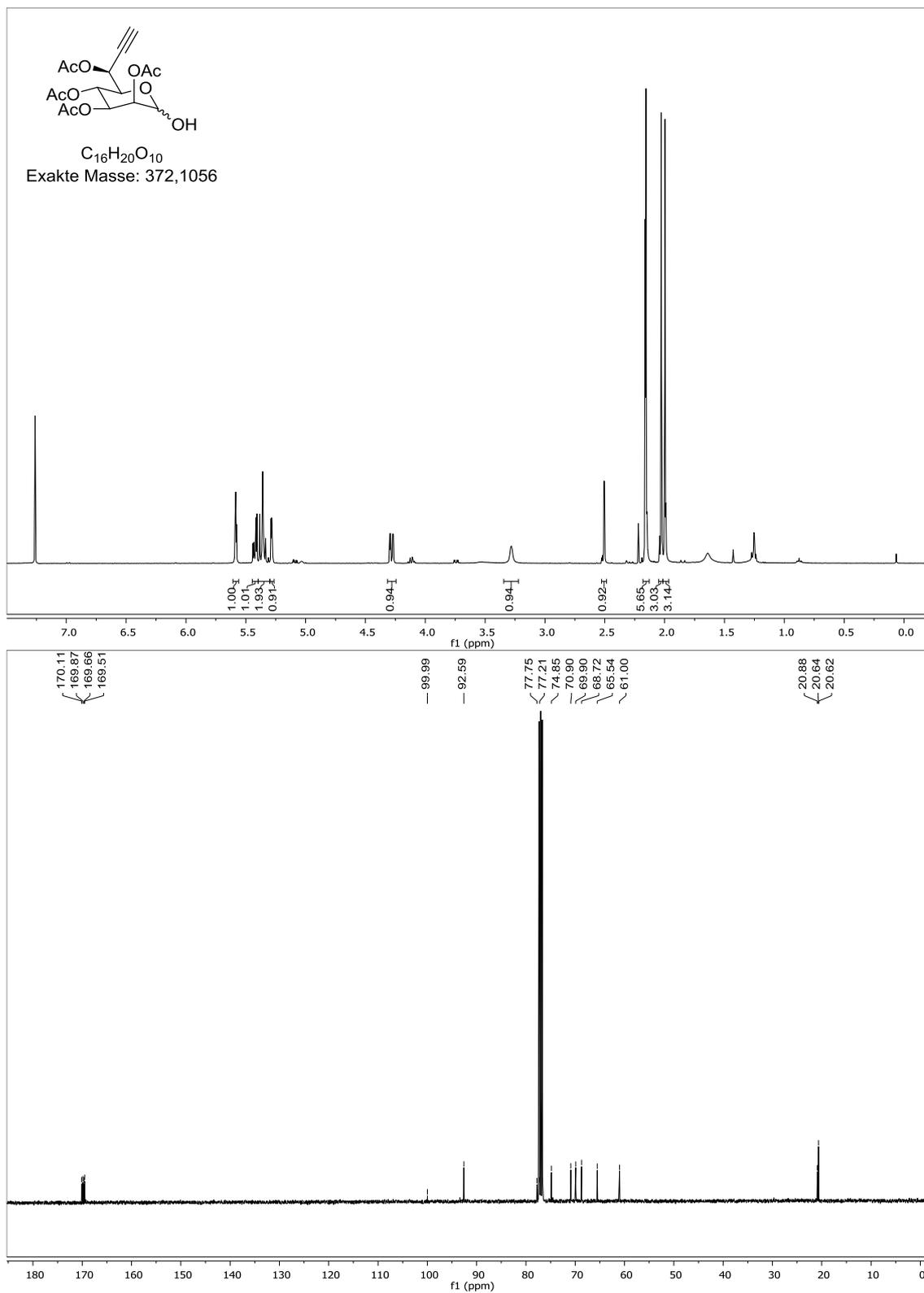
Tabelle 1: Verwendete DNAzyme und ihre Substrate.....	23
Tabelle 2: Ursprung und Tobramycin MIC (Routine, Agar-Diffusionstest) der verwendeten Bakterienstämme	25
Tabelle 3: Primer zur Sequenzierung von <i>algD</i>	26
Tabelle 4: AEX-HPLC Laufmittelgradient – Hoefler <i>et. al</i> [114].....	29
Tabelle 5: Laufmittelgradient RP-HPLC Analytik.....	32
Tabelle 6: PAO1 <i>algD</i> -Sequenz.....	37
Tabelle 7: Unterschiede der sequenzierten Bakterienstämme in <i>algD</i> -Sequenz.....	37
Tabelle 8: Konsensussequenz von 122 in der Literatur beschriebenen klinisch bedeutsamen <i>P. aeruginosa</i> Stämmen – Hoefler <i>et. al</i> [114].....	38
Tabelle 9: DNAzym Spaltgeschwindigkeiten bei 35°C – Modifiziert nach Hoefler <i>et. al</i> [114].....	43
Tabelle 10: Einfluss von Modifikation auf Spalteffizienz.....	71
Tabelle 11: Schmelztemperaturen (T_m) Dz-Substrat und Dz-Spaltprodukte.....	74
Tabelle 12: Gen-Silencing Antibiotika	81

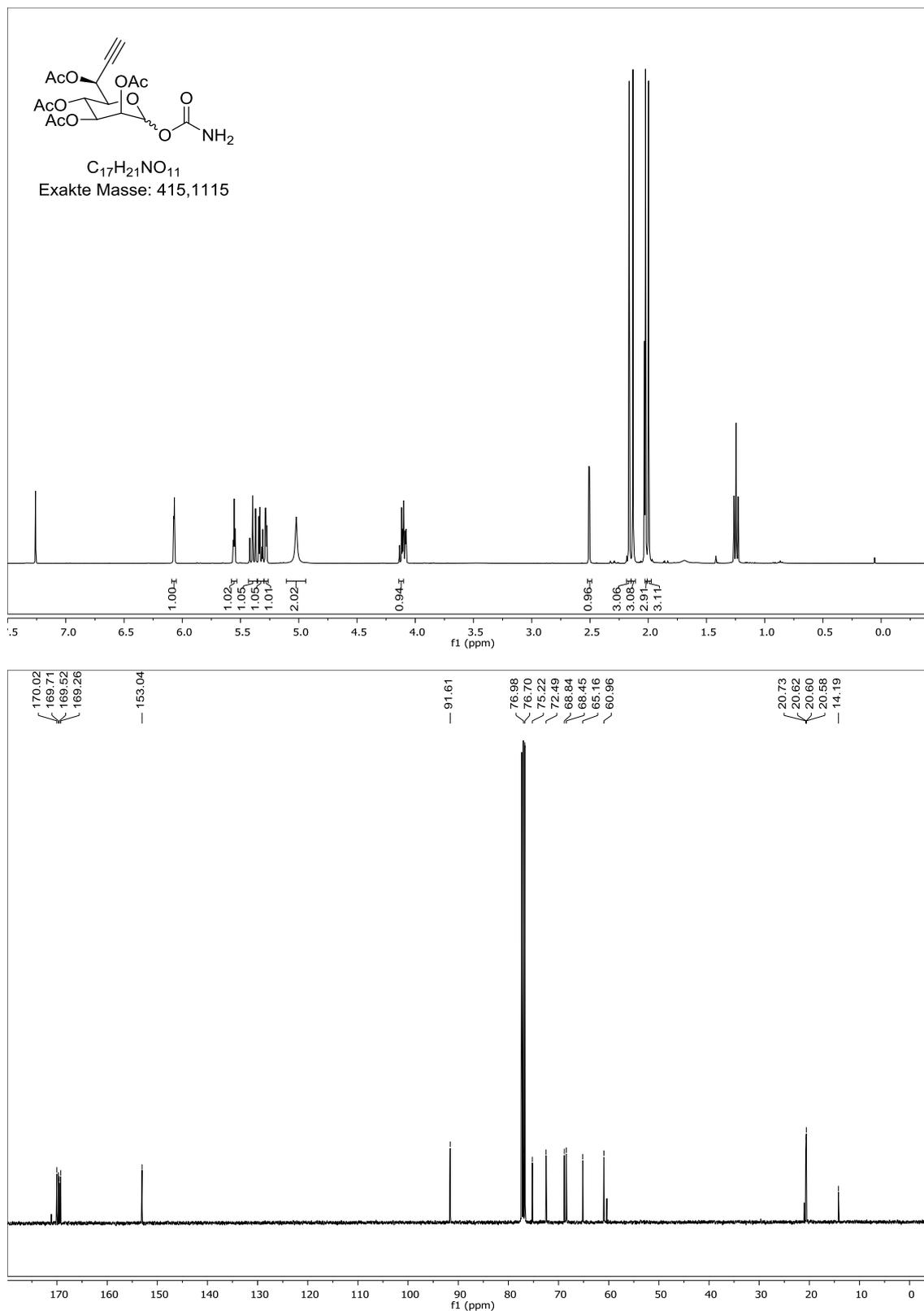
9 Anhang

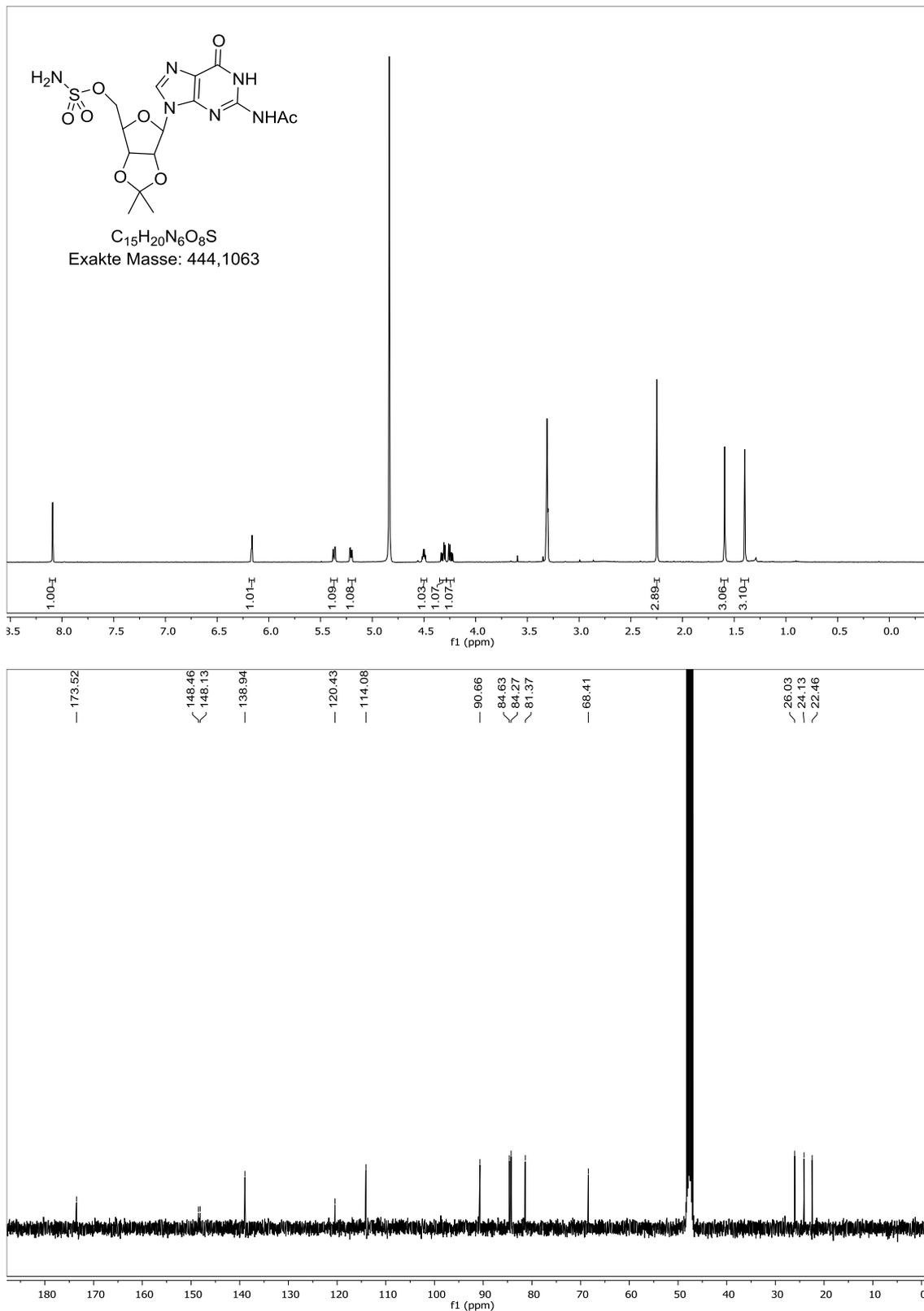
Anhang 1: Namen und Massen der verwendeten Substanzen

Name	IUPAC Name	Massen (ESI-TOF-MS)
AM5'ASG	(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-((((6-(2-acetamido-6-oxo-1,6-dihydro-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4- <i>d</i>][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)sulfonyl)carbamoxyloxy)-6-((<i>S</i>)-1-acetoxyprop-2-yn-1-yl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triyl triacetate	gefunden: 841,1928 [M-H] ⁻ berechnet: 841,1840 [M-H] ⁻
„365“	<i>N</i> -(9-(6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4- <i>d</i>][1,3]dioxol-4-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1 <i>H</i> -purin-2-yl)acetamide	gefunden: 388,1250 [M+Na] ⁺ 753,2587 [2M+Na] ⁺ berechnet: 388,1228 [M+Na] ⁺ 753,2563 [2M+Na] ⁺
„372“	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2-((<i>S</i>)-1-acetoxyprop-2-yn-1-yl)-6-hydroxytetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triyl triacetate	gefunden: 395,0963 [M+Na] ⁺ berechnet: 395,0949 [M+Na] ⁺
„383“	<i>N</i> -(9-(6-(chloromethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4- <i>d</i>][1,3]dioxol-4-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1 <i>H</i> -purin-2-yl)acetamide	gefunden: 406,0906 [M+Na] ⁺ berechnet: 406,0889 [M+Na] ⁺
„415“	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2-((<i>S</i>)-1-acetoxyprop-2-yn-1-yl)-6-(carbamoxyloxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triyl triacetate	gefunden: 438,1031 [M+Na] ⁺ 853,2102 [2M+Na] ⁺ berechnet: 438,1007 [M+Na] ⁺ 853,2121 [2M+Na] ⁺
„444“	(6-(2-acetamido-6-oxo-1,6-dihydro-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4- <i>d</i>][1,3]dioxol-4-yl)methyl sulfamate	gefunden: 467,1003 [M+Na] ⁺ 911,1994 [2M+Na] ⁺ berechnet: 467,0956 [M+Na] ⁺ 911,2091 [2M+Na] ⁺

Anhang 2: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der verwendeten Substanzen







Anhang 3: Liste DzTHM mit AU Schnittstelle (DzTHMix)

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
DzTHM 89	TGATTTCGAGGCTAGCTACAACGACGCATTAC
DzTHM 90	AGATGCTGAGGCTAGCTACAACGATCGCATCGC
DzTHM 91	AACCAAAGAGGCTAGCTACAACGAGCTGATTTCG
DzTHM 92	GCACCGACAGGCTAGCTACAACGAAGCCCAAAC
DzTHM 93	GCCAGCACAGGCTAGCTACAACGAACTGCACCG
DzTHM 94	ATGACTTCAGGCTAGCTACAACGAGACCGCGTG
DzTHM 95	CCACACCAAGGCTAGCTACAACGAGACTTCATG
DzTHM 96	CTGGAGACAGGCTAGCTACAACGACCACACCAA
DzTHM 97	TCAGGTCGAGGCTAGCTACAACGACTTGGTGCT
DzTHM 98	CCTGGTTGAGGCTAGCTACAACGACAGGTCGAT
DzTHM 99	GTTTCGACGAGGCTAGCTACAACGAGGGCGACTT
DzTHM 100	GATGAACGAGGCTAGCTACAACGAACGTCGGAG
DzTHM 101	CGACGCAGAGGCTAGCTACAACGAGAACGATAC
DzTHM 102	CGGTCTCGAGGCTAGCTACAACGAGTAGCCCAG
DzTHM 103	CGAAGCCGAGGCTAGCTACAACGACTCGCGGCA
DzTHM 104	TCTCGCGGAGGCTAGCTACAACGAGGCGAAGCC
DzTHM 105	TCAGCGGGAGGCTAGCTACAACGACACCACGTT
DzTHM 106	AGTCCTCGAGGCTAGCTACAACGACAGCGGGAT
DzTHM 107	GCGGAGGAAGGCTAGCTACAACGATCGGGGTTG
DzTHM 108	AGTCCTTGAGGCTAGCTACAACGACGCGGTGCT
DzTHM 109	TCACGGTCAGGCTAGCTACAACGACGGCGGGAA
DzTHM 110	GTTCCGCCGAGGCTAGCTACAACGACACGGTCAT
DzTHM 111	CGCGGTAGAGGCTAGCTACAACGATTCCTCGAG
DzTHM 112	TGCGGATGAGGCTAGCTACAACGACGGCGCGTC
DzTHM 113	TCTTGCGGAGGCTAGCTACAACGAGATCGGCGC
DzTHM 114	ACTTGATCAGGCTAGCTACAACGACTCGGCGAC
DzTHM 115	TGTACTTGAGGCTAGCTACAACGACATCTCGGC
DzTHM 116	TGTTGCCGAGGCTAGCTACAACGACTCGTTGGC
DzTHM 117	CCTTGCGGAGGCTAGCTACAACGAGTTGCCGAT
DzTHM 118	TCACGTCCAGGCTAGCTACAACGACACCTCGCG
DzTHM 119	CCTGGCAGAGGCTAGCTACAACGACACGTCCAT
DzTHM 120	CGGGACGCAGGCTAGCTACAACGAGTAGTAGCG
DzTHM 121	GCGCGTACAGGCTAGCTACAACGACCTTGGGCA
DzTHM 122	CTGGCGCGAGGCTAGCTACAACGAAGGTGAGGG
DzTHM 123	AACCGAGCAGGCTAGCTACAACGACGGGTGCTC
DzTHM 124	TGCTGCGCAGGCTAGCTACAACGACAACGAACC
DzTHM 125	GTGATGAGAGGCTAGCTACAACGACGAAGGCCT
DzTHM 126	GGCTGGTGAGGCTAGCTACAACGAGAGATCGAA
DzTHM 127	TCGCGCAAAGGCTAGCTACAACGACGTCGGTGC
DzTHM 128	CGATGAGCAGGCTAGCTACAACGACTCGGCCAG
DzTHM 129	CCTTGCCGAGGCTAGCTACAACGAGAGCATCTC
DzTHM 130	GGTCGAAGAGGCTAGCTACAACGAGCGCAACTC
DzTHM 131	ACGCGCGTAGGCTAGCTACAACGATCGACGTTG
DzTHM 132	CTCGATGTAGGCTAGCTACAACGATCCTTGTTG
DzTHM 133	TCGACTCGAGGCTAGCTACAACGAGTATTCCTT
DzTHM 134	CGTGCGGGAGGCTAGCTACAACGACTTCGACTC
DzTHM 135	ACCAGCACAGGCTAGCTACAACGACGGAACCTCG
DzTHM 136	TCGTGCGCAGGCTAGCTACAACGATGCCAGCA
DzTHM 137	TGTGCGGCAGGCTAGCTACAACGAGAAGCCCAC
DzTHM 138	ACCAGCAGAGGCTAGCTACAACGAGCCCTCGGC

Anhang 4: NCBI *P. aeruginosa* Stämme

NC_002516.2	NZ_CP008868.1	NZ_KK213155.1
NC_008463.1	NZ_CP008869.1	NZ_KK213160.1
NC_011770.1	NZ_CP008870.1	NZ_KK213168.1
NC_018080.1	NZ_CP008871.1	NZ_KK213173.1
NC_020912.1	NZ_CP008872.1	NZ_KK213183.1
NC_021577.1	NZ_CP008873.1	NZ_KK213188.1
NC_022360.1	NZ_CP010555.1	NZ_KK213202.1
NC_022361.1	NZ_CP012001.1	NZ_KK213219.1
NC_022591.1	NZ_CP013680.1	NZ_KK213223.1
NC_022594.1	NZ_DF126593.1	NZ_KK213237.1
NC_022806.1	NZ_JGZZ01000001.1	NZ_KK213250.1
NC_022808.2	NZ_JYGB02000001.1	NZ_KK213259.1
NC_023066.1	NZ_JYGC02000001.1	NZ_KK213272.1
NC_023149.1	NZ_JYJZ01000003.1	NZ_KK213281.1
NZ_AAQW01000001.1	NZ_KE136335.1	NZ_KN050641.1
NZ_AEVV03000001.1	NZ_KE137323.1	NZ_LFMN01000010.1
NZ_AEVW03000001.1	NZ_KE138672.1	NZ_LFMO01000007.1
NZ_AFXI01000001.1	NZ_KI518656.1	NZ_LFMP01000001.1
NZ_AFXJ01000001.1	NZ_KI518663.1	NZ_LFMR01000001.1
NZ_AFXK01000001.1	NZ_KI518959.1	NZ_LFMS01000015.1
NZ_ALOF01000013.1	NZ_KI518973.1	NZ_LFMT01000001.1
NZ_CH482383.1	NZ_KI518981.1	NZ_LFMU01000010.1
NZ_CH482384.1	NZ_KI518992.1	NZ_LFMV01000012.1
NZ_CP006980.1	NZ_KI519017.1	NZ_LKPS01000012.1
NZ_CP006981.1	NZ_KI519023.1	NZ_LKPT01000011.1
NZ_CP006982.1	NZ_KI519078.1	NZ_LKPU01000016.1
NZ_CP006983.1	NZ_KI519080.1	NZ_LKPV01000009.1
NZ_CP006984.1	NZ_KI519145.1	NZ_LKPW01000010.1
NZ_CP006985.1	NZ_KI519160.1	NZ_LLKW01000001.1
NZ_CP007224.1	NZ_KI519173.1	NZ_LLLJ01000001.1
NZ_CP008856.1	NZ_KI519271.1	NZ_LLOX01000001.1
NZ_CP008857.1	NZ_KI519276.1	NZ_LLPB01000001.1
NZ_CP008859.1	NZ_KI519281.1	NZ_LLPP01000001.1
NZ_CP008860.1	NZ_KI519287.1	NZ_LLQG01000001.1
NZ_CP008861.1	NZ_KI914456.1	NZ_LLQM01000001.1
NZ_CP008862.1	NZ_KI914463.1	NZ_LLRA01000001.1
NZ_CP008863.1	NZ_KI914468.1	NZ_LLUV01000001.1
NZ_CP008864.1	NZ_KI914477.1	NZ_LLVD01000001.1
NZ_CP008865.1	NZ_KI914512.1	NZ_LN831024.1
NZ_CP008866.1	NZ_KI914527.1	NZ_LN871187.1
NZ_CP008867.1	NZ_KK037225.1	

Anhang 6: AU Schnittstellen (schwarz hinterlegt) innerhalb von *algD*

ATGCGAATCAGCATCTTTGGTTTGGGCTATGTCGGTGCAGTATGTGCTGGCTGCCTGTCGGCAC
GCGGTCATGAAGTCAATTGGTGTGGATGTCTCCAGCACCAAGATCGACCTGATCAACCAGGGCAA
GTCGCCCATCGTCGAACCGGGCCTGGAAGCGTTGTTGCAGCAAGGCCGGCAGACCGGACGGCTG
TCGGGCACCACCGACTTCAAGAAGGCCGTGCTGGACTCCGACGTATCGTTCACTGCGTCGGCA
CGCCGAGCAAGAAGAACGGCGACCTGGACCTGGGCTACATCGAGACCGTCTGCCGCGAGATCGG
CTTCGCCATCCGCGAGAAGTCCGAACGCCACACCGTGGTGGTGCAGCAGCACCGTACTGCCGGG
ACCGTCAACAACGTGGTGTATCCCGCTGATCGAGGACTGCTCGGGCAAGAAGGCCGGGGTCGACT
TCGGCGTCGGCACCAACCCCGAATTCCTCCGCGAGAGCACCGGATCAAGGACTACGACTTCCC
GCCGATGACCGTATCGGCGAACTGGACAAGCAGACCGGGCAGCTTCTCGAGGAAATCTACCGC
GAGCTGGACGCGCCGATCATCCGCAAGACCGTCGAGGTCGCCGAGATGATCAAGTACACCTGCA
ACGTCTGGCAGCGCCGCAAGGTACCTTCGCCAACGAGATCGGCAACATCGCCAAGGCGGTCCG
CGTCGAGCGCCGCGAGGTATGGACGTGATCTGCCAGGACCACAAGCTCAACCTGTGCGCTAC
TACATGCGTCCC GGCTTCGCCTTCGGCGGCTCCTGCCTGCCCAAGGATGTACGCGCCCTCACCT
ATCGCGCCAGCCAGCTGGACGTGAGCACCCGATGCTCGTTTCGTTGATGCGCAGCAACTCCAA
CCAGGTGCAGAAGGCCTTCGATCTCATCACCAGCCACGACACCCGCAAGGTCGGCCTGCTCGGC
CTGTCGTTCAAGGCCGGCACCGACGATTTGCGCGAAAGCCCGCTGGTGGAGCTGGCCGAGATGC
TCATCGGCAAGGGCTACGAGTTGCGCATCTTCGACCGCAACGTCGAATACGCGCGTGTCCACGG
GGCCAACAAGGATACATCGAGTCGAAGATCCCGCACGTCTCCTCACTGCTGGTCTCCGACCTC
GACGAAGTGGTGGCGAGTTCCGATGTGCTGGTGTGGGCAATGGCGACGAGCTGTTGTCGACCC
TGGTGAACAAGACCCCGAGCGGCAAGAAGCTGGTCGACCTGGTGGGCTTATGCCGCACACCAC
CACTGCCAGGCCGAGGGCATCTGCTGGTAG

10 Literaturverzeichnis

- [1] Cutting, GR. Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. *Nature reviews. Genetics* 2015;16(1):45–56. 10.1038/nrg3849.
- [2] Button, B, Cai, L-H, Ehre, C, Kesimer, M, Hill, DB, Sheehan, JK et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (New York, N.Y.)* 2012;337(6097):937–941. 10.1126/science.1223012.
- [3] Rada, B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Pathogens* 2017;6(1). 10.3390/pathogens6010010.
- [4] Feigelman, R, Kahlert, CR, Baty, F, Rassouli, F, Kleiner, RL, Kohler, P et al. Sputum DNA sequencing in cystic fibrosis: non-invasive access to the lung microbiome and to pathogen details. *Microbiome* 2017;5(1):20. 10.1186/s40168-017-0234-1.
- [5] Parad, RB, Gerard, CJ, Zurakowski, D, Nichols, DP, Pier, GB. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infection and immunity* 1999;67(9):4744–4750.
- [6] Bjarnsholt, T, Jensen, PØ, Fiandaca, MJ, Pedersen, J, Hansen, CR, Andersen, CB et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 2009;44(6):547–558. 10.1002/ppul.21011.
- [7] Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology* 2016;7:275. 10.3389/fphar.2016.00275.
- [8] Brandt, T, Breitenstein, S, Hardt, H von der, Tümmler, B. DNA concentration and length in sputum of patients with cystic fibrosis during inhalation with recombinant human DNase. *Thorax* 1995;50(8):880–882.
- [9] Riethmueller, J, Vonthein, R, Borth-Bruhns, T, Grassmé, Heike, Eyrich, M et al. DNA Quantification and Fragmentation in Sputum after Inhalation of Recombinant Human Deoxyribonuclease. *Cell Physiol Biochem* 2008;22(1-4):347–352. 10.1159/000149813.
- [10] Brinkmann, V, Zychlinsky, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Micro* 2007;5(8):577–582. 10.1038/nrmicro1710.
- [11] Dwyer, M, Shan, Q, D'Ortona, S, Maurer, R, Mitchell, R, Olesen, H et al. Cystic Fibrosis Sputum DNA Has NETosis Characteristics and Neutrophil Extracellular

-
- Trap Release Is Regulated by Macrophage Migration-Inhibitory Factor. *J Innate Immun* 2014;6(6):765–779. 10.1159/000363242.
- [12] Liu, S, Su, X, Pan, P, Zhang, L, Hu, Y, Tan, H et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Scientific reports* 2016;6:37252. 10.1038/srep37252.
- [13] Somayaji, R, Lam, JC, Surette, MG, Waddell, B, Rabin, HR, Sibley, CD et al. Long-term clinical outcomes of 'Prairie Epidemic Strain' *Pseudomonas aeruginosa* infection in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 2017;72(4):333–339. 10.1136/thoraxjnl-2015-208083.
- [14] Prayle, A, Watson, A, Fortnum, H, Smyth, A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax* 2010;65(7):654–658. 10.1136/thx.2009.131532.
- [15] Filkins, LM, O'Toole, GA. Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat. *PLoS pathogens* 2015;11(12):e1005258. 10.1371/journal.ppat.1005258.
- [16] Burns, JL, Gibson, RL, McNamara, S, Yim, D, Emerson, J, Rosenfeld, M et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *The Journal of infectious diseases* 2001;183(3):444–452. 10.1086/318075.
- [17] López-Causapé, C, Rojo-Molinero, E, Macià, MD, Oliver, A. The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. *Expert review of respiratory medicine* 2015;9(1):73–88. 10.1586/17476348.2015.995640.
- [18] Boutin, S, Graeber, SY, Stahl, M, Dittrich, AS, Mall, MA, Dalpke, AH. Chronic but not intermittent infection with *Pseudomonas aeruginosa* is associated with global changes of the lung microbiome in cystic fibrosis. *The European respiratory journal* 2017;50(4). 10.1183/13993003.01086-2017.
- [19] Winstanley, C, O'Brien, S, Brockhurst, MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology* 2016. 10.1016/j.tim.2016.01.008.
- [20] Mohr, CD, Rust, L, Albus, AM, Iglewski, BH, Deretic, V. Expression patterns of genes encoding elastase and controlling mucoidy: Co-ordinate regulation of two virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Molecular microbiology* 1990;4(12):2103–2110. 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00571.x.
-

- [21] Ciofu, O, Tolker-Nielsen, T, Jensen, PØ, Wang, H, Høiby, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced drug delivery reviews* 2015;85:7–23. 10.1016/j.addr.2014.11.017.
- [22] McCaslin, CA, Petrusca, DN, Poirier, C, Serban, KA, Anderson, GG, Petrache, I. Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance. *Journal of cystic fibrosis official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2015;14(1):70–77. 10.1016/j.jcf.2014.06.009.
- [23] Farrell, PM, Collins, J, Broderick, LS, Rock, MJ, Li, Z, Kosorok, MR et al. Association between mucoid *Pseudomonas* infection and bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *Radiology* 2009;252(2):534–543. 10.1148/radiol.2522081882.
- [24] Ballmann, M, Rabsch, P, Hardt, H von der. Long-term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1998;53(9):732–737.
- [25] Mann, EE, Wozniak, DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS microbiology reviews* 2012;36(4):893–916. 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.
- [26] Jones, CJ, Wozniak, DJ. Psl Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to the Establishment of Biofilms and Immune Evasion. *mBio* 2017;8(3). 10.1128/mBio.00864-17.
- [27] Byrd, MS, Sadovskaya, I, Vinogradov, E, Lu, H, Sprinkle, AB, Richardson, SH et al. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular microbiology* 2009;73(4):622–638. 10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x.
- [28] Jennings, LK, Storek, KM, Ledvina, HE, Coulon, C, Marmont, LS, Sadovskaya, I et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015;112(36):11353–11358. 10.1073/pnas.1503058112.
- [29] Franklin, MJ, Nivens, DE, Weadge, JT, Howell, PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in microbiology* 2011;2:167. 10.3389/fmicb.2011.00167.

-
- [30] Ryder, C, Byrd, M, Wozniak, DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology* 2007;10(6):644–648. 10.1016/j.mib.2007.09.010.
- [31] Nichols, WW, Dorrington, SM, Slack, MP, Walmsley, HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1988;32(4):518–523.
- [32] Tseng, BS, Zhang, W, Harrison, JJ, Quach, TP, Song, JL, Penterman, J et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environmental microbiology* 2013;15(10):2865–2878. 10.1111/1462-2920.12155.
- [33] Lee, KY, Mooney, DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science* 2012;37(1):106–126. 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- [34] Nivens, DE, Ohman, DE, Williams, J, Franklin, MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of bacteriology* 2001;183(3):1047–1057. 10.1128/JB.183.3.1047-1057.2001.
- [35] Morch, YA, Sandvig, I, Olsen, O, Donati, I, Thuen, M, Skjak-Braek, G et al. Mn-alginate gels as a novel system for controlled release of Mn²⁺ in manganese-enhanced MRI. *Contrast media & molecular imaging* 2012;7(2):265–275. 10.1002/cmml.493.
- [36] Pistone, S, Qoragllu, D, Smistad, G, Hiorth, M. Formulation and preparation of stable cross-linked alginate-zinc nanoparticles in the presence of a monovalent salt. *Soft matter* 2015;11(28):5765–5774. 10.1039/c5sm00700c.
- [37] Pier, GB, Boyer, D, Preston, M, Coleman, FT, Llosa, N, Mueschenborn-Koglin, S et al. Human monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate that protect against infection by both mucoid and nonmucoid strains. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2004;173(9):5671–5678.
- [38] Cryz, SJ, Fürer, E, Que, JU. Synthesis and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* alginate-toxin A conjugate vaccine. *Infection and immunity* 1991;59(1):45–50.
- [39] Theilacker, C, Coleman, FT, Mueschenborn, S, Llosa, N, Grout, M, Pier, GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infection and immunity* 2003;71(7):3875–3884.
-

- [40] Priebe, GP, Goldberg, JB. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *Expert review of vaccines* 2014;13(4):507–519. 10.1586/14760584.2014.890053.
- [41] Campodónico, VL, Llosa, NJ, Bentancor, LV, Maira-Litran, T, Pier, GB. Efficacy of a conjugate vaccine containing polymannuronic acid and flagellin against experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Infection and immunity* 2011;79(8):3455–3464. 10.1128/IAI.00157-11.
- [42] Farjah, A, Owlia, P, Siadat, SD, Mousavi, SF, Ardestani, MS, Mohammadpour, HK. Immunological evaluation of an alginate-based conjugate as a vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2015;123(2):175–183. 10.1111/apm.12337.
- [43] Johansen, HK, Gøtzsche, PC. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews* 2015(8):CD001399. 10.1002/14651858.CD001399.pub4.
- [44] Alkawash, MA, Soothill, JS, Schiller, NL. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2006;114(2):131–138. 10.1111/j.1600-0463.2006.apm_356.x.
- [45] Wang, Y, Moradali, MF, Goudarztalejerdi, A, Sims, IM, Rehm, BHA. Biological function of a polysaccharide degrading enzyme in the periplasm. *Scientific reports* 2016;6:31249. 10.1038/srep31249.
- [46] Bayer, AS, Park, S, Ramos, MC, Nast, CC, Eftekhari, F, Schiller, NL. Effects of alginate lyase on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 1992;60(10):3979–3985.
- [47] Cho, H, Huang, X, Lan Piao, Y, Eun Kim, D, Yeon Lee, S, Jeong Yoon, E et al. Molecular modeling and redesign of alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* for accelerating CRPA biofilm degradation. *Proteins* 2016;84(12):1875–1887. 10.1002/prot.25171.
- [48] Ermund, A, Recktenwald, CV, Skjåk-Braek, G, Meiss, LN, Onsøyen, E, Rye, PD et al. OligoG CF-5/20 normalizes cystic fibrosis mucus by chelating calcium. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2017;44(6):639–647. 10.1111/1440-1681.12744.

-
- [49] Hengzhuang, W, Song, Z, Ciofu, O, Onsøyen, E, Rye, PD, Høiby, N. OligoG CF-5/20 Disruption of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm in a Murine Lung Infection Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2016;60(5):2620–2626. 10.1128/AAC.01721-15.
- [50] Pritchard, MF, Powell, LC, Khan, S, Griffiths, PC, Mansour, OT, Schweins, R et al. The antimicrobial effects of the alginate oligomer OligoG CF-5/20 are independent of direct bacterial cell membrane disruption. *Scientific reports* 2017;7:44731. 10.1038/srep44731.
- [51] Fata Moradali, M, Donati, I, Sims, IM, Ghods, S, Rehm, Bernd H A. Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 2015;6(3):15. 10.1128/mBio.00453-15.
- [52] TATNELL, PJ, RUSSELL, NJ, GACESA, P. A metabolic study of the activity of GDP-mannose dehydrogenase and concentrations of activated intermediates of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* 1993;139(1):119–127. 10.1099/00221287-139-1-119.
- [53] TATNELL, PJ, RUSSELL, NJ, GACESA, P. GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence from metabolite studies. *Microbiology* 1994;140(7):1745–1754. 10.1099/13500872-140-7-1745.
- [54] Snook, CF, Tipton, PA, Beamer, LJ. Crystal structure of GDP-mannose dehydrogenase: a key enzyme of alginate biosynthesis in *P. aeruginosa*. *Biochemistry* 2003;42(16):4658–4668. 10.1021/bi027328k.
- [55] Rao, J, Damron, FH, Basler, M, Digiandomenico, A, Sherman, NE, Fox, JW et al. Comparisons of Two Proteomic Analyses of Non-Mucoïd and Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Cystic Fibrosis Patient. *Frontiers in microbiology* 2011;2:162. 10.3389/fmicb.2011.00162.
- [56] Barthe, C, Nandakumar, S, Derlich, L, Macey, J, Bui, S, Fayon, M et al. Exploring the expression of *Pseudomonas aeruginosa* genes directly from sputa of cystic fibrosis patients. *Letters in applied microbiology* 2015;61(5):423–428. 10.1111/lam.12465.
- [57] Deretic, V, Gill, JF, Chakrabarty, AM. Gene *algD* coding for GDPmannose dehydrogenase is transcriptionally activated in mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 1987;169(1):351–358.
-

- [58] Mohr, CD, Hibler, NS, Deretic, V. AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the algD promoter located unusually far upstream from the mRNA start site. *Journal of bacteriology* 1991;173(16):5136–5143.
- [59] Deretic, V, Gill, JF, Chakrabarty, AM. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the algD gene. *Nucleic acids research* 1987;15(11):4567–4581.
- [60] Damron, FH, Davis, MR, Withers, TR, Ernst, RK, Goldberg, JB, Yu, G, Yu, HD. Vanadate and triclosan synergistically induce alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Molecular microbiology* 2011;81(2):554–570. 10.1111/j.1365-2958.2011.07715.x.
- [61] Chotirmall, SH, Smith, SG, Gunaratnam, C, Cosgrove, S, Dimitrov, BD, O'Neill, SJ et al. Effect of Estrogen on *Pseudomonas* Mucoidy and Exacerbations in Cystic Fibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(21):1978–1986. 10.1056/NEJMoa1106126.
- [62] Mathee, K, Ciofu, O, Sternberg, C, Lindum, PW, Campbell, JI, Jensen, P et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading, England)* 1999;145 (Pt 6):1349–1357. 10.1099/13500872-145-6-1349.
- [63] Flemming H-C, Neu TR, Wingender J, eds. *The perfect slime: Microbial extracellular polymeric substances (EPS)*. London: IWA Publishing, 2017.
- [64] Wood, LF, Ohman, DE. Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 2009;72(1):183–201. 10.1111/j.1365-2958.2009.06635.x.
- [65] Jain, S, Ohman, DE. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 2005;73(10):6429–6436. 10.1128/IAI.73.10.6429-6436.2005.
- [66] Wozniak, DJ, Wyckoff, TJO, Starkey, M, Keyser, R, Azadi, P, O'Toole, GA, Parsek, MR. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(13):7907–7912. 10.1073/pnas.1231792100.
- [67] NAKAGAWA, A, HOSOYAMA, T, CHUBACHI, K, TAKAHASHI, S, OHKUBO, T, IYOBE, S. A Search for *Pseudomonas* Alginate Biosynthesis Inhibitors from Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* 1997;50(3):286–288. 10.7164/antibiotics.50.286.

-
- [68] Kimmel, JL, Tipton, PA. Inactivation of GDP-mannose dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* by penicillic acid identifies a critical active site loop. *Archives of biochemistry and biophysics* 2005;441(2):132–140. 10.1016/j.abb.2005.06.028.
- [69] Sauvage, M, Eloumi, N, Capmau, ML, Hulen, C. Inhibition de la biosynthèse des alginates chez des souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathologie-biologie* 1991;39(6):606–612.
- [70] Michèle Pennacino-Sauvage. Inhibition de la biosynthèse des alginates des souches mucoïdes de *pseudomonas aeruginosa* purification et mise en évidence du caractère particulier de la gdp mannose deshydrogenase. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie. Paris, 1989.
- [71] Rasmussen, LCV, Sperling-Petersen, HU, Mortensen, KK. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microbial cell factories* 2007;6:24. 10.1186/1475-2859-6-24.
- [72] Grimm, D, Streetz, KL, Jopling, CL, Storm, TA, Pandey, K, Davis, CR et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441(7092):537–541. 10.1038/nature04791.
- [73] Chery, J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc journal a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs* 2016;4(7):35–50.
- [74] Crooke, ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic acid therapeutics* 2017;27(2):70–77. 10.1089/nat.2016.0656.
- [75] Santoro, SW, Joyce, GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(9):4262–4266.
- [76] Zhang, YC, Taylor, MM, Samson, WK, Phillips, MI. Antisense inhibition: oligonucleotides, ribozymes, and siRNAs. *Methods in molecular medicine* 2005;106:11–34.
- [77] Sledz, CA, Holko, M, Veer, MJ de, Silverman, RH, Williams, BRG. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature cell biology* 2003;5(9):834–839. 10.1038/ncb1038.
- [78] Sully, EK, Geller, BL. Antisense antimicrobial therapeutics. *Current opinion in microbiology* 2016;33:47–55. 10.1016/j.mib.2016.05.017.
-

- [79] Geller, BL, Marshall-Batty, K, Schnell, FJ, McKnight, MM, Iversen, PL, Greenberg, DE. Gene-silencing antisense oligomers inhibit acinetobacter growth in vitro and in vivo. *The Journal of infectious diseases* 2013;208(10):1553–1560. 10.1093/infdis/jit460.
- [80] Schlosser, K, Li, Y. Biologically inspired synthetic enzymes made from DNA. *Chemistry & biology* 2009;16(3):311–322. 10.1016/j.chembiol.2009.01.008.
- [81] Santoro, SW, Joyce, GF. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 1998;37(38):13330–13342. 10.1021/bi9812221.
- [82] Zaborowska, Z, Fürste, JP, Erdmann, VA, Kurreck, J. Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(43):40617–40622. 10.1074/jbc.M207094200.
- [83] Dass, CR. Deoxyribozymes: cleaving a path to clinical trials. *Trends in pharmacological sciences* 2004;25(8):395–397. 10.1016/j.tips.2004.06.001.
- [84] Cho, E-A, Moloney, FJ, Cai, H, Au-Yeung, A, China, C, Scolyer, RA et al. Safety and tolerability of an intratumorally injected DNAzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: A phase 1 first-in-human trial (DISCOVER). *The Lancet* 2013;381(9880):1835–1843. 10.1016/S0140-6736(12)62166-7.
- [85] Fuhst, R, Runge, F, Buschmann, J, Ernst, H, Praechter, C, Hansen, T et al. Toxicity profile of the GATA-3-specific DNAzyme hgd40 after inhalation exposure. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2013;26(2):281–289. 10.1016/j.pupt.2012.12.005.
- [86] Homburg, U, Renz, H, Timmer, W, Hohlfeld, JM, Seitz, F, Lüer, K et al. Safety and tolerability of a novel inhaled GATA3 mRNA targeting DNAzyme in patients with TH2-driven asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015;136(3):797–800. 10.1016/j.jaci.2015.02.018.
- [87] Chen, F, Li, Z, Wang, R, Liu, B, Zeng, Z, Zhang, H, Zhang, J. Inhibition of ampicillin-resistant bacteria by novel mono-DNAzymes and di-DNAzyme targeted to beta-lactamase mRNA. *Oligonucleotides* 2004;14(2):80–89. 10.1089/1545457041526308.
- [88] Zhou, J, Hao, D, Wang, X, Liu, T, He, C, Xie, F et al. An important role of a "probable ATP-binding component of ABC transporter" during the process of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to fluoroquinolone. *Proteomics* 2006;6(8):2495–2503. 10.1002/pmic.200501354.

-
- [89] Hou, Z, Meng, J-r, Zhao, J-r, Hu, B-q, Liu, J, Yan, X-j et al. Inhibition of beta-lactamase-mediated oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a deoxyribozyme. *Acta pharmacologica Sinica* 2007;28(11):1775–1782. 10.1111/j.1745-7254.2007.00646.x.
- [90] Hou, Z, Meng, J-r, Niu, C, Wang, H-F, Liu, J, Hu, B-q et al. Restoration of antibiotic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by targeting *mecR1* with a phosphorothioate deoxyribozyme. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2007;34(11):1160–1164. 10.1111/j.1440-1681.2007.04705.x.
- [91] Ghosal, A, Nielsen, PE. Potent antibacterial antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic acid therapeutics* 2012;22(5):323–334. 10.1089/nat.2012.0370.
- [92] Howard, JJ, Sturge, CR, Moustafa, DA, Daly, SM, Marshall-Batty, KR, Felder, CF et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2017;61(4). 10.1128/AAC.01938-16.
- [93] Lopez, C, Arivett, BA, Actis, LA, Tolmasky, ME. Inhibition of AAC(6')-Ib-mediated resistance to amikacin in *Acinetobacter baumannii* by an antisense peptide-conjugated 2',4'-bridged nucleic acid-NC-DNA hybrid oligomer. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015;59(9):5798–5803. 10.1128/AAC.01304-15.
- [94] Meng, J, Da, F, Ma, X, Wang, N, Wang, Y, Zhang, H et al. Antisense growth inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by locked nucleic acid conjugated with cell-penetrating peptide as a novel FtsZ inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015;59(2):914–922. 10.1128/AAC.03781-14.
- [95] Abushahba, MFN, Mohammad, H, Thangamani, S, Hussein, AAA, Seleem, MN. Impact of different cell penetrating peptides on the efficacy of antisense therapeutics for targeting intracellular pathogens. *Scientific reports* 2016;6:20832. 10.1038/srep20832.
- [96] Palm, C, Netzereab, S, Hallbrink, M. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides* 2006;27(7):1710–1716. 10.1016/j.peptides.2006.01.006.
- [97] Williams, BAR, Chaput, JC. Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates using a heterobifunctional crosslinker. *Current protocols in nucleic acid chemistry* 2010;Chapter 4:Unit4.41. 10.1002/0471142700.nc0441s42.
-

- [98] Sarno, R, Ha, H, Weinsetel, N, Tolmasky, ME. Inhibition of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance by antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003;47(10):3296–3304.
- [99] Sharma, VK, Watts, JK. Oligonucleotide therapeutics: Chemistry, delivery and clinical progress. *Future medicinal chemistry* 2015;7(16):2221–2242. 10.4155/fmc.15.144.
- [100] Yang, X, Xiao, Z, Zhu, J, Li, Z, He, J, Zhang, L, Yang, Z. Spatial conservation studies of nucleobases in 10-23 DNAzyme by 2'-positioned isonucleotides and enantiomers for increased activity. *Organic & biomolecular chemistry* 2016;14(17):4032–4038. 10.1039/C6OB00390G.
- [101] Schubert, S, Gül, DC, Grunert, H-P, Zeichhardt, H, Erdmann, VA, Kurreck, J. RNA cleaving '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity. *Nucleic acids research* 2003;31(20):5982–5992.
- [102] Vester, B, Hansen, LH, Lundberg, LB, Babu, BR, Sorensen, MD, Wengel, J, Douthwaite, S. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNAzymes to cleave structured RNA targets. *BMC molecular biology* 2006;7:19. 10.1186/1471-2199-7-19.
- [103] González-Barriga, A, Nillessen, B, Kranzen, J, van Kessel, IDG, Croes, HJE, Aguilera, B et al. Intracellular Distribution and Nuclear Activity of Antisense Oligonucleotides After Unassisted Uptake in Myoblasts and Differentiated Myotubes In Vitro. *Nucleic acid therapeutics* 2017;27(3):144–158. 10.1089/nat.2016.0641.
- [104] Burdick, AD, Sciabola, S, Mantena, SR, Hollingshead, BD, Stanton, R, Warneke, JA et al. Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides. *Nucleic acids research* 2014;42(8):4882–4891. 10.1093/nar/gku142.
- [105] Vester, B, Lundberg, LB, Sørensen, MD, Babu, BR, Douthwaite, S, Wengel, J. LNAzymes: Incorporation of LNA-Type Monomers into DNAzymes Markedly Increases RNA Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124(46):13682–13683. 10.1021/ja0276220.
- [106] Vester, B, Lundberg, LB, Sørensen, MD, Babu, BR, Douthwaite, S, Wengel, J. Improved RNA cleavage by LNAzyme derivatives of DNAzymes. *Biochemical Society transactions* 2004;32(Pt 1):37–40.

-
- [107] Chakravarthy, M, Aung-Htut, MT, Le, BT, Veedu, RN. Novel Chemically-modified DNAzyme targeting Integrin alpha-4 RNA transcript as a potential molecule to reduce inflammation in multiple sclerosis. *Scientific reports* 2017;7(1):1613. 10.1038/s41598-017-01559-w.
- [108] Meng, XX, Yang, XH, Wang, KM, Tan, WH, Guo, QP. Real-time monitoring of DNAzyme cleavage process using fluorescent assay. *Chinese Chemical Letters* 2009;20(8):990–994. 10.1016/j.ccllet.2009.03.028.
- [109] Eriksson, J, Helmfors, H, Langel, Ü. A High-Throughput Kinetic Assay for RNA-Cleaving Deoxyribozymes. *PloS one* 2015;10(8):e0135984. 10.1371/journal.pone.0135984.
- [110] Ferrari, D, Peracchi, A. A continuous kinetic assay for RNA-cleaving deoxyribozymes, exploiting ethidium bromide as an extrinsic fluorescent probe. *Nucleic acids research* 2002;30(20):e112.
- [111] Jacob, B, Rajasekaran, G, Kim, EY, Park, I-S, Bang, J-K, Shin, SY. The stereochemical effect of SMAP-29 and SMAP-18 on bacterial selectivity, membrane interaction and anti-inflammatory activity. *Amino acids* 2016;48(5):1241–1251. 10.1007/s00726-016-2170-y.
- [112] Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 2003;31(13):3406–3415.
- [113] Grobe, S, Wingender, J, Trüper, HG. Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *The Journal of applied bacteriology* 1995;79(1):94–102.
- [114] Hoefer, F, Marquardt, K, Schmidts, T, Domann, E, Runkel, F. HPLC based single-step kinetic assay to screen the activity of DNAzymes. *Anal. Methods* 2017;9(4):697–704. 10.1039/C6AY03061K.
- [115] Khachigian, LM, Fahmy, RG, Zhang, G, Bobryshev, YV, Kaniaros, A. c-Jun regulates vascular smooth muscle cell growth and neointima formation after arterial injury. Inhibition by a novel DNA enzyme targeting c-Jun. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(25):22985–22991. 10.1074/jbc.M200977200.
- [116] Cao, Y, Yang, L, Jiang, W, Wang, X, Liao, W, Tan, G et al. Therapeutic Evaluation of Epstein-Barr Virus-encoded Latent Membrane Protein-1 Targeted DNAzyme for Treating of Nasopharyngeal Carcinomas. *Mol Ther* 2013;22(2):371–377. 10.1038/mt.2013.257.
-

- [117] Cairns, MJ, King, A, Sun, L-Q. Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucleic acids research* 2003;31(11):2883–2889.
- [118] Kim, D-j. Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012;6(21). 10.5897/AJMR10.902.
- [119] Harrison, PT, Sanz, DJ, Hollywood, JA. Impact of gene editing on the study of cystic fibrosis. *Human genetics* 2016;135(9):983–992. 10.1007/s00439-016-1693-3.
- [120] Alton, EFWF, Armstrong, DK, Ashby, D, Bayfield, KJ, Bilton, D, Bloomfield, EV et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015;3(9):684–691. 10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- [121] Clatworthy, AE, Pierson, E, Hung, DT. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology* 2007;3(9):541–548. 10.1038/nchembio.2007.24.
- [122] Allen, RC, Papat, R, Diggle, SP, Brown, SP. Targeting virulence: Can we make evolution-proof drugs? *Nature reviews. Microbiology* 2014;12(4):300–308. 10.1038/nrmicro3232.
- [123] François, B, Luyt, C-E, Stover, CK, Brubaker, JO, Chastre, J, Jafri, HS. New Strategies Targeting Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2017;38(3):346–358. 10.1055/s-0037-1602715.
- [124] Qiu, D, Eisinger, VM, Head, NE, Pier, GB, Yu, HD. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* 2008;154(Pt 7):2119–2130. 10.1099/mic.0.2008/017368-0.
- [125] Deretic, V, Govan, JR, Konyecsni, WM, Martin, DW. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the muc loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Molecular microbiology* 1990;4(2):189–196.
- [126] Mohr, CD, Martin, DW, Konyecsni, WM, Govan, JR, Lory, S, Deretic, V. Role of the far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 1990;172(11):6576–6580. 10.1128/jb.172.11.6576-6580.1990.

-
- [127] Yin, Y, Withers, TR, Govan, JRW, Johnson, SL, Yu, HD. Draft Genome Sequence of a Stable Mucoïd Strain of *Pseudomonas aeruginosa* PAO581 with a mucA25 Mutation. *Genome announcements* 2013;1(5). 10.1128/genomeA.00834-13.
- [128] Ryall, B, Carrara, M, Zlosnik, JEA, Behrends, V, Lee, X, Wong, Z et al. The mucoïd switch in *Pseudomonas aeruginosa* represses quorum sensing systems and leads to complex changes to stationary phase virulence factor regulation. *PLoS one* 2014;9(5):e96166. 10.1371/journal.pone.0096166.
- [129] Jones, AK, Fulcher, NB, Balzer, GJ, Urbanowski, ML, Pritchett, CL, Schurr, MJ et al. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through mucA mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. *Journal of bacteriology* 2010;192(21):5709–5717. 10.1128/JB.00526-10.
- [130] Sautter, R, Ramos, D, Schneper, L, Ciofu, O, Wassermann, T, Koh, C-L et al. A complex multilevel attack on *Pseudomonas aeruginosa* algT/U expression and algT/U activity results in the loss of alginate production. *Gene* 2012;498(2):242–253. 10.1016/j.gene.2011.11.005.
- [131] Ma, L, Wang, J, Wang, S, Anderson, EM, Lam, JS, Parsek, MR, Wozniak, DJ. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental microbiology* 2012;14(8):1995–2005. 10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x.
- [132] Billings, N, Millan, M, Caldara, M, Rusconi, R, Tarasova, Y, Stocker, R, Ribbeck, K. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens* 2013;9(8):e1003526. 10.1371/journal.ppat.1003526.
- [133] Ma, L, Wang, S, Di Wang, Parsek, MR, Wozniak, DJ. The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS immunology and medical microbiology* 2012;65(2):377–380. 10.1111/j.1574-695X.2012.00934.x.
- [134] Zhou, Y, Tang, L, Zeng, G, Zhang, C, Zhang, Y, Xie, X. Current progress in biosensors for heavy metal ions based on DNazymes/DNA molecules functionalized nanostructures: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2016;223:280–294. 10.1016/j.snb.2015.09.090.
- [135] Zhou, W, Saran, R, Chen, Q, Ding, J, Liu, J. A New Na(+)-Dependent RNA-Cleaving DNazyme with over 1000-fold Rate Acceleration by Ethanol.
-

- Chembiochem a European journal of chemical biology 2016;17(2):159–163.
10.1002/cbic.201500603.
- [136] Dolinsek, J, Dorninger, C, Lagkouvardos, I, Wagner, M, Daims, H. Depletion of unwanted nucleic acid templates by selective cleavage: LNAzymes, catalytically active oligonucleotides containing locked nucleic acids, open a new window for detecting rare microbial community members. *Applied and environmental microbiology* 2013;79(5):1534–1544. 10.1128/AEM.03392-12.
- [137] Cairns, MJ, Sun, L-Q. Nucleic acid sequence analysis using DNAzymes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2004;252:291–302. 10.1385/1-59259-746-7:291.
- [138] Zhu, J, Li, Z, Wang, Q, Liu, Y, He, J. The contribution of adenines in the catalytic core of 10-23 DNAzyme improved by the 6-amino group modifications. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2016;26(18):4462–4465. 10.1016/j.bmcl.2016.07.076.
- [139] Peng, H, Li, X-F, Zhang, H, Le, XC. A microRNA-initiated DNAzyme motor operating in living cells. *Nature communications* 2017;8:14378. 10.1038/ncomms14378.
- [140] He, J, Di Zhang, Wang, Q, Wei, X, Cheng, M, Liu, K. A novel strategy of chemical modification for rate enhancement of 10–23 DNAzyme: A combination of A9 position and 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine analogs. *Org. Biomol. Chem.* 2011;9(16):5728. 10.1039/c1ob05065f.
- [141] Zhu, J, Li, Z, Yang, Z, He, J. Studies on the preferred uracil–adenine base pair at the cleavage site of 10–23 DNAzyme by functional group modifications on adenine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015;23(15):4256–4263. 10.1016/j.bmc.2015.06.041.
- [142] Cairns, MJ, Sun, L-Q. Target-site selection for the 10-23 DNAzyme. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2004;252:267–277. 10.1385/1-59259-746-7:267.
- [143] Cairns, MJ, Hopkins, TM, Witherington, C, Wang, L, Sun, LQ. Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nature biotechnology* 1999;17(5):480–486. 10.1038/8658.
- [144] Marquardt, K, Eicher, A-C, Dobler, D, Hofer, F, Schmidts, T, Schafer, J et al. Degradation and protection of DNAzymes on human skin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals official journal of Arbeitsgemeinschaft fur*

- Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V 2016;107:80–87.
10.1016/j.ejpb.2016.07.001.
- [145] Azarani, A. RNA analysis by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Nucleic acids research* 2001;29(2):7e-7. 10.1093/nar/29.2.e7.
- [146] Cairns, MJ, Hopkins, TM, Witherington, C, Sun, LQ. The influence of arm length asymmetry and base substitution on the activity of the 10-23 DNA enzyme. *Antisense & nucleic acid drug development* 2000;10(5):323–332.
- [147] Lan, T, Lu, Y. Metal ion-dependent DNazymes and their applications as biosensors. *Metal ions in life sciences* 2012;10:217–248. 10.1007/978-94-007-2172-2_8.
- [148] Gao, J, Shimada, N, Maruyama, A. Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers. *Biomaterials science* 2015;3(2):308–316.
10.1039/c4bm00256c.
- [149] Nakano, S-i, Miyoshi, D, Sugimoto, N. Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids. *Chemical reviews* 2014;114(5):2733–2758. 10.1021/cr400113m.
- [150] Nakano, S-i, Sugimoto, N. The structural stability and catalytic activity of DNA and RNA oligonucleotides in the presence of organic solvents. *Biophysical reviews* 2016;8(1):11–23. 10.1007/s12551-015-0188-0.
- [151] Kenward, M, Dorfman, KD. Coarse-Grained Brownian Dynamics Simulations of the 10-23 DNAzyme. *Biophysical Journal* 2009;97(10):2785–2793.
10.1016/j.bpj.2009.09.003.
- [152] Saito, K, Shimada, N, Maruyama, A. Cooperative enhancement of deoxyribozyme activity by chemical modification and added cationic copolymer. *Science and technology of advanced materials* 2016;17(1):437–442.
10.1080/14686996.2016.1208627.
- [153] Nagraj, N, Liu, J, Sterling, S, Wu, J, Lu, Y. DNAzyme catalytic beacon sensors that resist temperature-dependent variations. *Chem. Commun.* 2009(27):4103.
10.1039/b903059j.
- [154] Schubert, S, Fürste, JP, Werk, D, Grunert, H-P, Zeichhardt, H, Erdmann, VA, Kurreck, J. Gaining target access for deoxyribozymes. *Journal of molecular biology* 2004;339(2):355–363. 10.1016/j.jmb.2004.03.064.
- [155] Liu, Y, Li, Z, Liu, G, Wang, Q, Chen, W, Di Zhang et al. Breaking the conservation of guanine residues in the catalytic loop of 10-23 DNAzyme by

- position-specific nucleobase modifications for rate enhancement. *Chemical communications (Cambridge, England)* 2013;49(44):5037–5039.
10.1039/c3cc42067a.
- [156] Asanuma, H, Hayashi, H, Zhao, J, Liang, X, Yamazawa, A, Kuramochi, T et al. Enhancement of RNA cleavage activity of 10-23 DNAzyme by covalently introduced intercalator. *Chemical communications (Cambridge, England)* 2006(48):5062–5064.
10.1039/b611078a.
- [157] Youngblood, DS, Hatlevig, SA, Hassinger, JN, Iversen, PL, Moulton, HM. Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells. *Bioconjugate chemistry* 2007;18(1):50–60. 10.1021/bc060138s.
- [158] Traglia, GM, Sala, CD, Fuxman Bass, JI, Soler-Bistue, AJC, Zorreguieta, A, Ramirez, MS, Tolmasky, ME. Internalization of Locked Nucleic Acids/DNA Hybrid Oligomers into *Escherichia coli*. *BioResearch open access* 2012;1(5):260–263.
10.1089/biores.2012.0257.
- [159] Storey, DG, Ujack, EE, Mitchell, I, Rabin, HR. Positive correlation of algD transcription to lasB and lasA transcription by populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infection and immunity* 1997;65(10):4061–4067.
- [160] Stein, CA, Hansen, JB, Lai, J, Wu, S, Voskresenskiy, A, Høg, A et al. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic acids research* 2010;38(1):e3.
10.1093/nar/gkp841.
- [161] Patenge, N, Pappesch, R, Krawack, F, Walda, C, Mraheil, MA, Jacob, A et al. Inhibition of Growth and Gene Expression by PNA-peptide Conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2013;2:e132.
10.1038/mtna.2013.62.
- [162] Good, L, Awasthi, SK, Dryselius, R, Larsson, O, Nielsen, PE. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nat Biotechnol* 2001;19(4):360–364.
10.1038/86753.
- [163] Huang, Y. Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2017;6:116–132.
10.1016/j.omtn.2016.12.003.

-
- [164] Smaglo, BG, Aldeghaither, D, Weiner, LM. The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology* 2014;11(11):637–648. 10.1038/nrclinonc.2014.159.
- [165] Varkouhi, AK, Scholte, M, Storm, G, Haisma, HJ. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of controlled release official journal of the Controlled Release Society* 2011;151(3):220–228. 10.1016/j.jconrel.2010.11.004.
- [166] Shete, HK, Prabhu, RH, Patravale, VB. Endosomal escape: a bottleneck in intracellular delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 2014;14(1):460–474.
- [167] Lönn, P, Kacsinta, AD, Cui, X-S, Hamil, AS, Kaulich, M, Gogoi, K, Dowdy, SF. Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Scientific reports* 2016;6:32301. 10.1038/srep32301.
- [168] Limoli, DH, Rockel, AB, Host, KM, Jha, A, Kopp, BT, Hollis, T, Wozniak, DJ. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS pathogens* 2014;10(4):e1004083. 10.1371/journal.ppat.1004083.
- [169] Hoffman, LR, Kulasekara, HD, Emerson, J, Houston, LS, Burns, JL, Ramsey, BW, Miller, SI. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *Journal of cystic fibrosis official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2009;8(1):66–70. 10.1016/j.jcf.2008.09.006.
- [170] O'Toole, GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments JoVE* 2011(47). 10.3791/2437.
- [171] Friedman, L, Kolter, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular microbiology* 2004;51(3):675–690.
- [172] Colvin, KM, Irie, Y, Tart, CS, Urbano, R, Whitney, JC, Ryder, C et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology* 2012;14(8):1913–1928. 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x.
- [173] Hentzer, M, Teitzel, GM, Balzer, GJ, Heydorn, A, Molin, S, Givskov, M, Parsek, MR. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *Journal of bacteriology* 2001;183(18):5395–5401.
- [174] Damron, FH, Barbier, M, McKenney, ES, Schurr, MJ, Goldberg, JB. Genes required for and effects of alginate overproduction induced by growth of
-

- Pseudomonas aeruginosa* on *Pseudomonas* isolation agar supplemented with ammonium metavanadate. *Journal of bacteriology* 2013;195(18):4020–4036. 10.1128/JB.00534-13.
- [175] Garneau-Tsodikova, S, Labby, KJ. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *MedChemComm* 2016;7(1):11–27. 10.1039/C5MD00344J.
- [176] Eisenhardt M. The Insect-Metalloproteinase-Inhibitor IMPI for the treatment of wound infections - Preclinical investigations and formulation design: Philipps-Universität Marburg, 2016.
- [177] Galdiero, S, Falanga, A, Cantisani, M, Vitiello, M, Morelli, G, Galdiero, M. Peptide-lipid interactions: Experiments and applications. *International journal of molecular sciences* 2013;14(9):18758–18789. 10.3390/ijms140918758.
- [178] Kurreck J, Lilley DMJ, Campbell S, Clore M, Stein CA, Gait MJ et al. *Therapeutic Oligonucleotides*, 2008.
- [179] Harmer, C, Alnassafi, K, Hu, H, Elkins, M, Bye, P, Rose, B et al. Modulation of gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* during chronic infection in the adult cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading, England)* 2013;159(Pt 11):2354–2363. 10.1099/mic.0.066985-0.
- [180] Limoli, DH, Whitfield, GB, Kitao, T, Ivey, ML, Davis, MR, Grahl, N et al. *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection. *mBio* 2017;8(2). 10.1128/mBio.00186-17.
- [181] Hoffmann, N, Rasmussen, TB, Jensen, PØ, Stub, C, Hentzer, M, Molin, S et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infection and immunity* 2005;73(4):2504–2514. 10.1128/IAI.73.4.2504-2514.2005.
- [182] Bragonzi, A, Worlitzsch, D, Pier, GB, Timpert, P, Ulrich, M, Hentzer, M et al. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *The Journal of infectious diseases* 2005;192(3):410–419. 10.1086/431516.
- [183] Muller, C, Plésiat, P, Jeannot, K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(3):1211–1221. 10.1128/AAC.01252-10.

- [184] Olaitan, AO, Morand, S, Rolain, J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology* 2014;5:643. 10.3389/fmicb.2014.00643.

Danksagung

Für die Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion danke ich Prof. Frank Runkel, der mich in seine Arbeitsgruppe am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie aufgenommen hat und mir stets alle nötigen Freiheiten und das Vertrauen einräumte, die letztendlich zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Eugen Domann bedanken, dass er mich nach dem Wechsel meines Promotionsthemas in seinen Laboren am Institut für Medizinischen Mikrobiologie beheimatete.

Ein besonderer Dank geht an alle Kolleginnen und Kollegen der beiden Institute, die ich während meiner Zeit in Gießen kennen und schätzen gelernt habe.

Ganz besonders möchte ich mich bei Kay bedanken, der mir nicht nur in Büro und Labor lange Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch noch nach dem Abschluss seiner eigenen Promotion immer für eine wissenschaftliche Diskussion bei einem gemeinsamen Abendessen zur Verfügung stand.

Mein Dank gilt weiterhin Gopala, Stefan und Tim, mit denen lange Abende im Labor durch Themen wie Masala, Kabaddi und Endodontie aufgelockert wurden.

Ebenso vielen Dank an Michaela mit der ich genauso gut über Pseudomonaden wie auch über asiatisches Essen philosophieren konnte.

Für die technische Einweisung beim Umgang mit Bakterien und den abwechslungsreichen Kaffeepausen danke ich Silke.

Den Chemikern meines Vertrauens Alexander und Raffael möchte ich für die organische Synthese des Inhibitors danken. Ich hoffe, ihr könnt mir die grauen Haare verzeihen.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Grieb und Frau Dr. Isberner für die unproblematische Koordination meines Stipendiums, der Finanzierung meiner Teilnahmen an Konferenzen und der Organisation verschiedener sehr lehrreicher Weiterbildungsmöglichkeiten.

Dorota und Vera danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich noch bei all jenen bedanken, die mich vor dem Wechsel meines Promotionsthemas unterstützt haben.

Veröffentlichungen

Publikationen

“The therapeutic potential of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI against infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*”

M. Eisenhardt, P. Schlupp, **F. Höfer**, *et al.* **2018** submitted

“HPLC based single-step kinetic assay to screen the activity of DNAzymes.”

Hofer, F, Marquardt, K, Schmidts, T, Domann, E, Runkel, F. *Anal. Methods* **2017**;9(4):697–704. 10.1039/C6AY03061K.

„Degradation and protection of DNAzymes on human skin.”

Marquardt, K, Eicher, A-C, Dobler, D, **Hofer, F**, Schmidts, T, Schafer, J *et al.* *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2016**;107:80–87. 10.1016/j.ejpb.2016.07.001.

„Abstracts. 20 Porcine small intestine to study drug transport.”

Höfer, F, Dahlke M, Schlupp P, Schmidts T, Runkel, F. *Acta Physiol* **2015**;214:9. 10.1111/apha.12498.

Konferenzposter

“DNAzymes cleaving *Pseudomonas aeruginosa* *algD*-mRNA”

7th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology 2017, Cambridge England

“DNAzymes combatting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation”

The Oligo Meeting 2016, Montreal Kanada

“Porcine small intestine to study drug transport”

European Intestinal Transport Group 2014, Marstrand Schweden

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.