

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Universitätsmedizin Rostock
Universität Rostock

Charakterisierung der Arginin Deiminase von
***Streptococcus pyogenes* M49**
und deren potentielle Anwendung in der
Tumorthherapie

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium

vorgelegt von
Diplom-Biologe Silvio Hering
geboren am 25.06.1983
in Weißenfels

Rostock, den 20.03.2014

Erstgutachter:

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene,
Universitätsklinikum Rostock (AöR), Universität Rostock

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Institut für Biowissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche
Fakultät, Universität Rostock

Tag der Einreichung: 20. März 2014

Tag der öffentlichen Verteidigung: 11. Juli 2014

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hering, S., Sieg, A., Kreikemeyer, B. and Fiedler, T. (2013). Kinetic characterization of arginine deiminase and carbamate kinase from *Streptococcus pyogenes* M49. *Protein expression and purification* **91**, 61–68.

Weitere Publikationen:

Feldman-Salit, A., Hering, S., Messiha, H., Veith, N., Cojocaru, V., Sieg, A., Westerhoff, H., Kreikemeyer, B., Wade, R. C. and Fiedler, T. (2013). Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. **288**, 21295-306.

Tu, W., Pohl, S., Summpunn, P., Hering, S., Kerstan, S., Harwood, C., (2012). Comparative analysis of the responses of related pathogenic and environmental bacteria to oxidative stress. *Microbiology*. **158**, 636-47.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Taxonomie und Typisierung von <i>Streptococcus pyogenes</i>	1
1.2 Klinische Relevanz von <i>Streptococcus pyogenes</i>	3
1.3 Virulenzfaktoren von <i>Streptococcus pyogenes</i>	5
1.4 Metabolismus von <i>Streptococcus pyogenes</i>	6
1.5 Arginin Deiminase System (ADS)	8
1.5.1 Arginin Deiminase System von <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
1.6 Einsatz der Arginin Deiminase in der Tumorbehandlung	12
1.7 Zielstellung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Organismen und Plasmide	15
2.1.1 Bakterienstämme	15
2.1.2 Eukaryote Zelllinien	15
2.1.3 Plasmide	15
2.2 Nährmedien und Zellanzucht für Bakterien	16
2.2.1 <i>Lysogeny broth</i> (LB) Medium	16
2.2.2 <i>Todd Hewitt Yeast</i> (THY) Medium	16
2.2.3 CDM-LAB	16
2.2.4 Medienzusätze	17
2.2.5 Anzucht der <i>E. coli</i> Stämme	17
2.2.6 Anzucht der <i>S. pyogenes</i> Stämme	17
2.2.7 Kultivierung im Chemostaten	18
2.2.8 Stammhaltung	19
2.3 Nährmedien und Anzucht eukaryotischer Zelllinien	19
2.4 Bestimmung physiologischer Parameter	19
2.4.1 Messung des Bakterienwachstums	19
2.4.2 Bestimmung der Zellvitalität	19
2.4.3 Bestimmung des Zelltrockengewichtes	20
2.4.4 Überprüfung der Reinheit von <i>S. pyogenes</i> Kulturen	20

2.4.5	Bestimmung der Glukosekonzentration.....	21
2.4.6	Quantifizierung von Fermentationsprodukten	21
2.4.7	Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen.....	22
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.5.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
2.5.2	Enzymatische Modifikation von DNA	23
2.5.3	Primer-Design	25
2.5.4	Plasmidschnellnachweis durch „ <i>Colony Fast Screen</i> “	26
2.5.5	Kolonie-PCR.....	27
2.5.6	Standard-Agarosegelelektrophorese	27
2.5.7	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	27
2.5.8	<i>Northern</i> Hybridisierung.....	28
2.6	Zellaufschluss und DNA-Transfer	30
2.6.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	30
2.6.2	DNA-Transfer in <i>E. coli</i> DH5α.....	30
2.6.3	Herstellung kompetenter <i>S. pyogenes</i> Zellen.....	31
2.6.4	DNA-Transfer in <i>S. pyogenes</i>	31
2.6.5	Zellaufschluss.....	31
2.7	Proteinbiochemische Methoden	32
2.7.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> DH5α.....	32
2.7.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.7.3	<i>Colloidal Coomassie</i> Färbung.....	34
2.7.4	<i>Western Blot</i>	34
2.7.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	35
2.7.6	Entsalzen und Einengen von Proteinen.....	35
2.8	Messung von Enzymaktivitäten	36
2.8.1	Bestimmung der Arginin Deiminase Aktivität	36
2.8.2	Bestimmung der Carbat Kinase Aktivität	37
2.9	<i>In vitro</i> -Zytotoxizitätstest mittels Kristallviolett-Assay	38
2.10	Versuche zum bakteriellen Überleben	39
2.10.1	Bakterielles Überleben in saurer Umgebung	39
2.10.2	Bakterielles Wachstum in humanem Vollblut	39
2.10.3	Phagozytose-Assay mit J774 Zellen.....	40
2.11	Chemikalien	41
2.12	Statistische Analysen.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Herstellung einer <i>arcA</i> -Deletionsmutante von <i>S. pyogenes</i> M49	42
3.1.1	Konstruktion des <i>arcA</i> -Deletionsplasmides.....	42
3.1.2	Deletion von <i>arcA</i> in <i>S. pyogenes</i> M49.....	43
3.2	Wachstumsanalysen der Δ <i>arcA</i> -Mutante	46

3.2.1	Wachstum von <i>S. pyogenes</i> M49 $\Delta arcA$ in THY-Medium.....	46
3.2.2	Wachstum von <i>S. pyogenes</i> M49 $\Delta arcA$ in CDM-LAB-Medium ...	47
3.3	Rolle des ADS von <i>S. pyogenes</i> unter Säurestress.....	49
3.3.1	Überleben von <i>S. pyogenes</i> M49 Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante unter sauren Bedingungen.....	49
3.3.2	Wachstum der $\Delta arcA$ -Mutante bei niedrigem pH-Wert	52
3.4	Einfluss der <i>arcA</i> -Deletion auf das Überleben von <i>S. pyogenes</i> in humanem Vollblut.....	54
3.4.1	Charakterisierung der Phagozytose von <i>S. pyogenes</i> M49 und $\Delta arcA$ -Mutante durch Makrophagen.....	55
3.5	Untersuchungen zur Auswirkung der <i>arcA</i> -Deletion auf den Zentralstoffwechsel von <i>S. pyogenes</i> M49.....	56
3.5.1	Untersuchung der Fermentationsprodukte in Glukose-limitierten Chemostaten.....	56
3.5.2	Untersuchung des Aminosäureverbrauches in Glukose-limitierten Chemostatkulturen	61
3.6	Kinetische Charakterisierung von Enzymen des ADS.....	63
3.6.1	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	64
3.6.2	Affinitätschromatographische Reinigung der heterolog exprimierten Proteine	65
3.7	Enzymkinetische Untersuchung von Arginin Deiminase und Carbamat Kinase.....	67
3.7.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivitäten.....	68
3.7.2	Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivitäten.....	69
3.7.3	Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max}	70
3.7.4	Regulation der Aktivität von Arginin Deiminase und Carbamat Kinase	72
3.8	Inhibition des Wachstums von Tumorzellen durch den Einsatz der rekombinanten AD von <i>S. pyogenes</i>	73
3.8.1	Nachweis des ASS1-Expression	73
3.8.2	Einfluss der AD auf die Proliferation von Tumorzellen	74
3.8.3	Zusammenspiel zwischen Zytostatika und Arginin Deiminase	77
4	Diskussion	80
4.1	Die Rolle der AD von <i>S. pyogenes</i> M49	80
4.1.1	Einfluss der AD auf Wachstum, Vitalität und Persistenz	80
4.1.2	Einfluss der AD auf den Primärmetabolismus und den Aminosäurestoffwechsel	84
4.2	Kinetische Parameter und allosterische Regulation der AD und CK von <i>S. pyogenes</i> M49	88
4.2.1	Biochemische Charakterisierung der AD von <i>S. pyogenes</i> M49	88
4.2.2	Biochemische Charakterisierung der CK von <i>S. pyogenes</i> M49	91
4.3	Bedeutung der AD von <i>S. pyogenes</i> in der Tumorbehandlung	93

4.3.1	Steigerung der zellproliferationshemmenden Effekte der AD durch Kombination mit Zytostatika	95
5	Zusammenfassung.....	98
6	Literaturverzeichnis.....	99
	Anhang.....	115
	Erklärung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen:

Å	Ångström
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
GB	Großbritannien
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
konz.	konzentriert(e)
min	Minute
mind.	mindestens
MOI	Molekulare Onkologie und Immuntherapie
n. d.	nicht definierbar
Ω	Ohm
s	Sekunde
sog.	sogenannte
SysMO-LAB	<i>systems biology of microorganisms – lactic acid bacteria</i>
Temp.	Temperatur
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt
WHO	<i>world health organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZAP	Zentralapotheke der Universitätsklinik Rostock

Biologische und technologische Abkürzungen:

<i>aad9</i>	Gen für Spectinomycin Adenyltransferase
Adh	Alkoholdehydrogenase
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
AD	Arginin Deiminase

ADS	Arginin Deiminase System
AK	anorganischen Kohlenstoffverbindungen
AP	alkalische Phosphatase
<i>arcA</i>	Gen für die Arginin Deiminase
<i>arcB</i>	Gen für die Ornithin Carbamoyltransferase
<i>arcC</i>	Gen für die Carbamat Kinase
ArgR	Arginin Repressor
ASL	Argininosuccinat Lyase
ASS1	Argininosuccinat Synthetase I
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CcpA	<i>catabolite control protein A</i>
CCR	<i>carbon catabolite repression</i>
CodY	<i>GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor</i>
Crp	<i>cAMP receptor protein</i>
CDM-LAB	<i>chemically defined medium – lactic acid bacteria</i>
cre	<i>catabolite recognizing elements</i>
CK	Carbamat Kinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>emm</i>	Gen für das M-Protein
GAS	Gruppe A Streptokokken
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamat Dehydrogenase
GOD	Glukose Oxidase
E.C.	<i>enzyme code</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
IC	<i>inhibitory concentration</i>
iNOs	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
LDH	Laktatdehydrogenase

MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MTIC	Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid
Nra	<i>negagtive regulator of group A streptococci</i>
PAM	<i>plasminogenbinding group A streptococcal M protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFL	Pyruvat Formiat Lyase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
POD	Peroxidase
Prp	<i>PAM-related protein</i>
PrtF2	Protein F2
OCT	Ornithin Carbamoyltransferase
Ralp	<i>RofA like proteins</i>
RobP	<i>regulator of protease B</i>
SDH	Serin Dehydratase
<i>sdh</i>	Gen für die Serin Dehydratase
SEN	<i>streptococcal surface enolase</i>
SfbI	<i>streptococcal fibronectin binding protein 1</i>
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
<i>speB</i>	Gen für die Cysteinprotease
SpeB	<i>streptococcal pyogenic exotoxin B</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SysMO-LAB	<i>systems biology of microorganisms – lactic acid bacteria</i>
Tet	Tetrazyklin
U	Unit
VBNC	<i>viable but nonculturable</i>
WT	Wildtyp

Chemikalien und Medien:

ADP Adenosindiphosphat

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARG	Argenin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Carbamoylphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HIS	Histidin
ILE	Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEU	Leucin
LYS	Lysin
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
MET	Methionin
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NADP ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NH ₃	Ammonium
N ₂	Stickstoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PHE	Phenylalanin
SER	Serin
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THR	Threonin
THY	<i>Todd Hewitt Yeast</i>
TYR	Tyrosin
VAL	Valin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rasterelektronische Aufnahme von <i>S. pyogenes</i> Serotyp M49 und mesenchymalen Stammzellen.....	1
Abbildung 2: Modell der Kristallstruktur der Arginin Deiminase von <i>S. pyogenes</i>	4
Abbildung 3: Überblick über den Glukosestoffwechsels in <i>S. pyogenes</i>	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktionen des ADS.....	9
Abbildung 5: Genetische Darstellung des <i>arc</i> -Operons von <i>S. pyogenes</i> M49.....	11
Abbildung 6: Aufbau des Fermenters Biostat B plus.....	18
Abbildung 7: Reaktion der Glutamat Dehydrogenase	36
Abbildung 8: Kontrollrestriktion von pASK_IBA3C_ArcA.	43
Abbildung 9: Schema der homologen Rekombination zwischen dem <i>S. pyogenes</i> Chromosom und dem Plasmid pASK_IBA3C_ArcA.	44
Abbildung 10: Bestätigung der $\Delta arcA$ -Mutante mittels PCR.....	45
Abbildung 11: Northern Blot-Analyse von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante.	46
Abbildung 12: Wachstumskurve (A) und Wachstumsrate (B) von <i>S. pyogenes</i> M49 Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante in THY-Medium.	47
Abbildung 13: Wachstumskurve (A) und Wachstumsrate (B) von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) in CDM-LAB-Medium.	48
Abbildung 14: Ammoniumproduktion von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) nach 24 h Kultivierung in CDM-LAB-Medium.....	49
Abbildung 15: Einfluss von Säurestress auf <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$).	51
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante.	52
Abbildung 17: Wachstumsanalyse von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante in angesäuertem THY-Medium.	53
Abbildung 18: Wachstumsanalyse von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante in heparinisiertem Vollblut.....	55
Abbildung 19: Abtötung von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante durch Makrophagen (J774-Zellen).	56
Abbildung 20: Darstellung der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) und der Trockenmasse [mg/ml] einer Chemostatkultur von <i>S. pyogenes</i> M49.....	57
Abbildung 21: Stoffwechselflüsse der Fermentationsprodukte von <i>S. pyogenes</i> Wildtyp M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante bei pH 7,5.....	59
Abbildung 22: Stoffwechselflüsse der Fermentationsprodukte von <i>S. pyogenes</i> Wildtyp M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante bei pH 6,5.....	60
Abbildung 23: Aminosäure-Stoffwechselflüsse von <i>S. pyogenes</i> Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 7,5.....	62

Abbildung 24: Aminosäure-Stoffwechselflüsse von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 6,5. 63

Abbildung 25: Plasmidkarte der Expressionsplasmide für die AD (A) und CK (B) von *S. pyogenes* M49. 64

Abbildung 26: Kontrollrestriktion von pASK_IBA2_ArcA und pASK_IBA2_ArcC.. 65

Abbildung 27: Affinitätschromatographische Reinigung der heterolog exprimierten *S. pyogenes* M49 AD und CK. 66

Abbildung 28: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der AD (A) und CK (B). 68

Abbildung 29: Einfluss der Temperatur auf die Aktivitäten der AD (A) und CK (B).. 69

Abbildung 30: Kinetische Analyse der AD. 70

Abbildung 31: Kinetische Analyse der CK. 71

Abbildung 32: Einfluss von potentiellen allosterischen Regulatoren auf die Aktivität aufgereinigter AD (A) und CK (B) von *S. pyogenes* M49 (591). 72

Abbildung 33: Nachweis des ASS1- und GAPDH-Expression mittels PCR. 74

Abbildung 34: Auswirkungen der AD von *S. pyogenes* auf die Proliferation von Glioblastomzellen. 75

Abbildung 35: Auswirkungen der AD von *S. pyogenes* auf die Proliferation von hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen. 76

Abbildung 36: Auswirkung von Temozolomid in Kombination mit der AD von *S. pyogenes* auf die Glioblastom-Zelllinie HROG05. 77

Abbildung 37: Auswirkung von Irinotecan in Kombination mit der AD von *S. pyogenes* auf die kolorektale Karzinomzelllinie HHC6548. 79

Abbildung 38: Vergleich der Kristallstruktur der AD von *P. aeruginosa* (A) und *M. arginini* (B). 91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die essentiellen Aminosäuren und Vitamine für das Wachstum von <i>S. pyogenes</i>	8
Tabelle 2: Verwendete eukaryotische Zelllinien	15
Tabelle 3: Übersicht über verwendete Plasmide	16
Tabelle 4: Modifiziertes CDM-LAB-Medium	17
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Medienzusätze	17
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	26
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele	33
Tabelle 8: Wachstumsrate von <i>S. pyogenes</i> M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante in Komplexmedium THY.	54
Tabelle 9: Fermentationsprodukte von <i>S. pyogenes</i> Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 7,5.	58
Tabelle 10: Fermentationsprodukte von <i>S. pyogenes</i> Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 6,5.	60
Tabelle 11: Expression und Reinigung der AD und CK von <i>S. pyogenes</i> M49 in <i>E. coli</i> DH5 α	67
Tabelle 12: Vergleich der kinetischen Parameter der AD von bekannten Spezies	89
Tabelle 13: Vergleich der kinetischen Parameter der CK von bekannten Spezies.....	92

1 Einleitung

1.1 Taxonomie und Typisierung von *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes ist ein Gram-positives, nicht zur Sporulation befähigtes, kokkoides Bakterium. Die paarweise angeordneten oder kettenbildenden, unbeweglichen Kokken sind nicht in der Lage Katalase zu bilden und führen eine aerotolerante Lebensweise.

Aufgrund des homofermentativen Kohlenhydratstoffwechsels zählt *S. pyogenes* zu den Milchsäurebakterien der Ordnung *Lactobacillales*, die ihre Energie aus der Fermentation von Glukose zu Laktat beziehen. Innerhalb der *Lactobacillales* gehören die Streptokokken zu der Familie der *Streptococcaceae*. Dabei steht „*streptós*“ im griechischen für Kette und „*kókkos*“ für Beere. Die Gattung *Streptococcaceae* ist aktuell in die drei Genera *Lactococcus*, *Lactovum* und *Streptococcus* eingeteilt (<http://www.bacterio.net/>). Zu der Gattung *Streptococcus* werden momentan 60 Spezies gezählt (Reinert, 2007). Abbildung 1 zeigt eine rasterelektronische Aufnahme von *S. pyogenes* Serotyp M49.

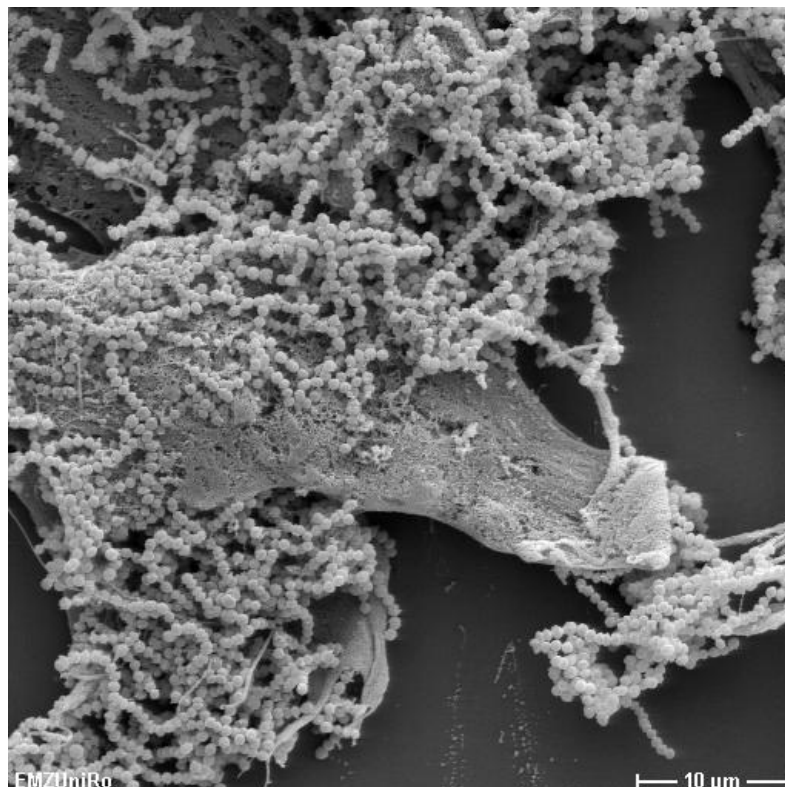


Abbildung 1: Rasterelektronische Aufnahme von *S. pyogenes* Serotyp M49 und mesenchymalen Stammzellen. Aufnahme im Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) des Universitätsklinikums Rostock (Fiedler *et al.*, 2013).

Ein für Streptokokken charakteristisches Merkmal ist die Hämolyse. Bereits im Jahre 1903 klassifizierte der deutsche Bakteriologe Hugo Schottmüller die Streptokokken-Arten aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf Blutagarplatten zwischen hämolysierend und nichthämolyzierend (Schottmüller, 1903). Darauf aufbauend führte der amerikanische Bakteriologe James H. Brown 1919 die Begriffe Alpha- (α -), Beta- (β -) und Gamma- (γ -) Hämolyse ein (Brown, 1919). Nach der Kultivierung von Streptokokken auf Blutagarplatten können folgende Szenarien auftreten:

1. Es bilden sich grün-verfärbte Höfe um die Bakterienkolonie. Aufgrund der Bildung von H_2O_2 durch die Streptokokken kommt es bei der **α -Hämolyse** zur Reduzierung von Hämoglobin zu Sulfhämoglobin und Methämoglobin, welches den Nährboden grün verfärbt. (Bsp.: *Streptococcus pneumoniae*).
2. Es bilden sich klare Höfe um die Bakterienkolonie. In diesem Fall der **β -Hämolyse** kommt es durch die Bildung von Hämolsinen zur Zerstörung der Zellmembran der Erythrozyten und das freiwerdende Hämoglobin wird vollständig abgebaut (Bsp.: *Streptococcus agalactiae*).
3. Es bilden sich keine Höfe um die Bakterienkolonie. Diese nichthämolyzierenden Streptokokken (**γ -Hämolyse**) verursachen während der Kultivierung keine morphologische Veränderung des Nährbodens (Bsp.: *Streptococcus bovis*).

S. pyogenes besitzt die Fähigkeit, durch die Produktion der extrazellulären Toxine Streptolysin O (sauerstofflabil) und S (sauerstoffstabil) Erythrozyten vollständig zu lysieren und ist somit der Gruppe der β -hämolysierenden Streptokokken zuzuordnen.

Zur weiteren Typisierung der β -hämolysierenden Streptokokken nutzte die amerikanische Mikrobiologin Rebecca C. Lancefield die spezifischen **Polysaccharid-Antigene** (C-Substanz) in den Zellwänden der Streptokokken. Basierend auf dem Nachweis der spezifischen Oberflächenantigene mittels Lancefield-Extraktion erfolgte die serologische Einteilung in die Gruppen „A“ bis „V“. *S. pyogenes* ist aufgrund des Antigens der Gruppe „A“ zuzuordnen und wird somit auch synonym als Gruppe „A“ Streptokokkus (GAS) bezeichnet (Lancefield, 1933). Die α -hämolysierenden Streptokokken können über diese Methode nicht differenziert werden, da sie über eine solche Antigenstruktur nicht verfügen.

Neben der C-Substanz können die Gruppe „A“ Streptokokken weiter über das **M-Protein** serologisch differenziert werden (Lancefield, 1928). Das in der Zellwand verankerte Protein wird von allen GAS-Stämmen exprimiert und besteht aus vier konservierten Domänen. Das C-terminale Ende des M-Proteins ist mit der Zellwand verankert und das N-terminale Ende ragt in den extrazellulären Raum. Das M-Protein zählt zu den wichtigen GAS-Virulenzfaktoren (Lancefield, 1962). Bisher konnte basierend auf der hohen Sequenzvarianz im N-terminalen Bereich des M-Proteins mindestens 80 M-Serotypen

unterschieden werden (Facklam und Elliott, 1995). Aufgrund der kostenintensiven Produktion der M-Typisierungsseren und der geringen Immunogenität der M-Proteine mancher GAS-Stämme werden zur Komplementierung der serologischen M-Typisierungen verstärkt molekularbiologische Methoden eingesetzt. Mit der Sequenzierung des *emm*-Gens, welches für das M-Protein kodiert, oder der *emm*-Typ-spezifischen PCR können mehr als 200 GAS-*emm*-Typen unterschieden werden (Beall *et al.*, 1996; Kaufhold *et al.*, 1994; Podbielski *et al.*, 1991 und 1992; McMillan *et al.*, 2013).

Zusätzlich zu dem M-Protein dienen als **T-Antigen** bezeichnete, zellwandverankerte Pilusproteine zur weiteren serologischen Differenzierung von GAS-Stämmen (Mora *et al.*, 2005; Nakata *et al.*, 2009b). Momentan sind mehr als 25 unterscheidbare T-Antigene bekannt. Ein einzelnes T-Antigen kann mit mehreren M-Typen assoziiert sein.

1.2 Klinische Relevanz von *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes ist ein ausschließlich humanpathogener, ubiquitär verbreiteter Erreger. Als typische Reservoirs gelten die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes sowie die Haut. Die Übertragung erfolgt in den meisten Fällen durch Tröpfchen- oder Schmierinfektionen. Die Zahl der jährlich durch GAS-Stämme verursachten Infektionen weltweit wird auf ca. 700 Millionen geschätzt. Über 500.000 der Infektionen verlaufen tödlich (Carapetis *et al.*, 2005).

S. pyogenes ist in der Lage verschiedene Krankheitsformen auszulösen, die von lokalen, eitrigen, nicht-invasiven Infekten der Haut (**Impetigo, Erysipel**) und den Schleimhäuten (**Pharyngitis, Tonsillitis**) bis hin zu schweren, invasiven und lebensbedrohlichen Krankheiten wie **Sepsis** und **nekrotisierender Faszitis** reichen können. Nach einer Infektion mit *S. pyogenes* kann es des Weiteren zu schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen wie **rheumatisches Fieber, rheumatische Endokarditis** und akute **Glomerulonephritis** kommen (Cunningham, 2000; Stollerman, 1997). Im Allgemeinen lassen sich GAS-Infektionen in drei Verlaufsformen unterteilen (Podbielski und Kreikemeyer, 2004):

1. Lokale, Oberflächen-assoziierte Infekte der Haut und der Schleimhäute wie Impetigo und Tonsillitis. Diese Erscheinungsformen können ohne bleibende Schäden ausheilen, sollten jedoch mit Antibiotika (Bsp. Penicillin) behandelt werden, um weitere Folgeerkrankungen zu vermeiden.
2. Systemisch-invasive Infektionen wie nekrotisierende Faszitis, Septikämien und das sogenannte *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS). Diese Erscheinungsformen, insbesondere das STSS, sind mit hohen Mortalitätsraten von 30 – 60 % verbunden, weil es für diese Erkrankungen keine wirkungsvolle Therapie gibt (Stevens *et al.*, 1995). Das Krankheitsbild entwickelt sich schnell von Schockzuständen über multiple Organversagen bis zu schnell fortschreitenden Nekrosen der Haut und der inneren

Organe (Bisno und Stevens, 1996). Bei diesen schweren Infektionen gelten chirurgische Eingriffe als letzte Therapiemöglichkeit zur Aufrechterhaltung der Organfunktion.

3. Asymptomatische Besiedlung in Verknüpfung mit wiederkehrenden lokalen oder systemischen Infektionen. Diese Erscheinungsform kann unabhängig von einer Antibiotikatherapie als Folge einer lokalen Infektion eintreten (Adam *et al.*, 2000; Markowitz *et al.*, 1993; Pichichero *et al.*, 1999; Podbielski und Kreikemeyer, 2001).

Streptokokkeninfektionen werden in den meisten Fällen konsequent mit dem Antibiotikum Penicillin behandelt. Überraschenderweise wurden bis heute keine Penicillin-resistenten GAS-Stämme gefunden (Horn *et al.*, 1998; Macris *et al.*, 1998; Brown und Rybak, 2004). Liegt eine Penicillinallergie vor, werden die Infektionen mit Makrolid-Antibiotika behandelt (Huovinen, 1999).

Für präventive Immunisierungen sind aktuell noch keine Impfstoffe gegen GAS verfügbar. Das M-Protein sowie einige zellwandverankerte und sekretierte Antigene wie C5a-Peptidase, das SpeB (*streptococcal pyogenic exotoxin B*) oder Streptolysin O wurden als Impfstoffe getestet. Die Testungen der Impfstoffkandidaten kamen jedoch nicht über Tierstudien hinaus. Ein neuer potentieller Impfstoff könnte das an der Zelloberfläche lokalisierte Enzym **Arginin Deiminase** (Abbildung 2) sein (Henningham *et al.*, 2013a und 2013b).

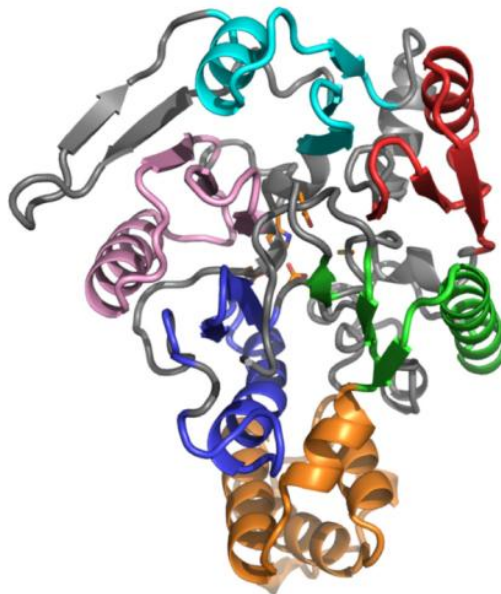


Abbildung 2: Modell der Kristallstruktur der Arginin Deiminase von *S. pyogenes*. Dargestellt ist die Pseudo-5-Faltachse mit den katalytischen Domänen in grün, blau, zyan, pink und rot und den jeweils spiralförmigen orthogonalen Bündeln in orange. Die verbleibende Strukturelemente sind grau markiert (Henningham *et al.*, 2013b).

1.3 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes ist in der Lage ein breites Spektrum von Virulenzfaktoren zu bilden. Anhand ihrer Funktionsweise werden diese in **Adhäsine/Invasine**, **Aggressine** und **Immunmoduline** unterteilt. Ihre Expression und ihr Vorkommen sind spezifisch für jeden GAS-Serotyp. Eine detaillierte Übersicht der charakterisierten Virulenzfaktoren ist der Arbeit von Cunningham (2000) zu finden.

Um eine Infektion auszulösen, durchläuft das Pathogen nach dem Kontakt mit dem Wirt mehrere Prozesse. Der erste Schritt der Kolonisierung besteht in der Anheftung an das Wirtsgewebe (Adhärenz). Durch die Bildung von **Adhäsinen** sind GAS in der Lage an wirtseigene Matrixproteinen wie Fibronectin oder Kollagen zu binden, da diese Moleküle im menschlichen Körper ubiquitär vorkommen (Patti *et al.*, 1994). Zu den am besten charakterisiertesten Fibronectin-bindenden Proteinen zählen das Protein F1 (SfbI; *streptococcal fibronectin binding protein 1*) und das Protein F2 (PrtF2) (Talay *et al.*, 1992, Kreikemeyer *et al.*, 2004d). Neben Matrixproteinen sind GAS auch in der Lage an Plasmaproteine wie Plasmin und Plasminogen zu binden (Lahteenmaki *et al.*, 2001). Die direkte Bindung an die Plasmaproteine erfolgt über Oberflächen-assoziierte Proteine wie zum Beispiel PAM (*plasminogenbinding group A streptococcal M protein*) und Prp (*PAM-related protein*) (Berge und Sjobring, 1993; Sanderson-Smith *et al.*, 2007). Des Weiteren können auch zellwandlokalisierte Stoffwechsellzyme wie die Enolase (SEN; *streptococcal surface enolase*) und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) an die Plasmaproteine binden (Pancholi und Fischetti, 1992 und 1998). Es wird daher auch von einer Bifunktionalität der zelloberflächenlokalisierten Enzyme ausgegangen.

Abgesehen von den für die Adhärenz wichtigen Virulenzfaktoren besitzen GAS noch eine Vielzahl von Faktoren, die für die Ausbreitung und die Umgehung der Immunabwehr des Wirtes essentiell sind. M-Proteine, C5a-Peptidasen und Streptolysine O (SLO) und S (SLS) verfügen über **antiphagozytische Eigenschaften**, indem sie die Granulozytenaggregation, das Komplementsystem und die T-Zell-Antwort inhibieren (Kwinn und Nizet, 2007; Medina *et al.*, 2003). Neben den pyrogenen Exotoxinen SLO und SLS, die verantwortlich für die Hämolyse sind, spielt die Cysteinprotease SpeB (*streptococcal pyogenic exotoxin B*) eine wichtige Rolle in der Pathogenese von GAS. SpeB ist in der Lage eine Vielzahl von Wirtsproteinen wie Fibrin, Immunglobuline, das antibakterielle Peptid LL-37 und das hochmolekulare Kininogen zu spalten (Elliott, 1945; Collin und Olsen, 2001; Schmidtchen *et al.*, 2002; Herwald *et al.*, 1996). Durch die Bildung von Hyaluronidase kann der invasive Prozess im Gewebe weiter fortgesetzt werden.

Die Regulation der Virulenzfaktoren erfolgt über verschiedene Regulatorproteine. Neben Ralp1 (*RofA like proteins*) und Nra (*negative regulator of group A streptococci*; Ralp2), die eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *S. pyogenes* einnehmen, zählen die Trans-

kriptionsregulatoren der Rgg-Familie und CodY (*GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor*) mit zu den wichtigsten transkriptionellen Regulationssystem in GAS (Beckert *et al.*, 2001; Chaussee *et al.*, 2003; Fogg *et al.*, 1994 und 1997, Granok *et al.*, 2000; Kreikemeyer *et al.*, 2002; Malke und Ferretti, 2007; Podbielski *et al.*, 1999).

In den Arbeiten von Chaussee (2002 und 2003) konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von Rgg nicht nur einen Einfluss auf die Expression bestimmte Gene für Virulenzfaktoren wie zum Beispiel M-Protein, SpeB und SLO hat, sondern auch auf die wachstumsabhängige Synthese von Proteinen des Arginin- und Serinstoffwechsel einwirkt (Chaussee *et al.*, 2002 und 2003). Damit scheint der Metabolismus von *S. pyogenes* ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese zu spielen. Welche metabolischen Anpassungsprozesse jedoch in der Pathogenese von Gruppe „A“ Streptokokken genau ablaufen, ist bisher kaum untersucht.

1.4 Metabolismus von *Streptococcus pyogenes*

Gruppe „A“ Streptokokken fehlen aufgrund ihres kleinen Genoms (1,8 Mbp) bestimmte Gene für metabolische Enzyme. Sie sind daher auf Substrate vom Wirt für die eigenen katabolen und anabolen Stoffwechselprozesse angewiesen. Beispielsweise verfügt *S. pyogenes* nur über Teile des Zitronensäurezyklus, d. h. der Organismus kann weder Succinat noch Succinyl-CoA bilden (Beres *et al.*, 2002; Ferretti *et al.*, 2001; Smoot *et al.*, 2002). Daher erfolgt die Energiegewinnung des Pathogens hauptsächlich über die **Glykolyse** und den **Pyruvat-Stoffwechsel**. Die Abbildung 3 zeigt einen Überblick über den fermentativen Glukoseabbau und dessen Regulation in *S. pyogenes* (Levering *et al.*, 2012).

Durch den homofermentativen Glukoseabbau zu Laktat werden **zwei Mol ATP** pro Mol Glukose gebildet (Thompson; 1988). Unter bestimmten Bedingungen wie Glukose-limitation kommt es zum Wechsel von der Milchsäuregärung zu gemischten Säuregärung und es werden verstärkt Formiat, Acetat und Ethanol gebildet. Bei der gemischten Säuregärung werden pro Mol Glukose **drei Mol ATP** generiert (Thomas *et al.*, 1979; Fiedler *et al.*, 2011).

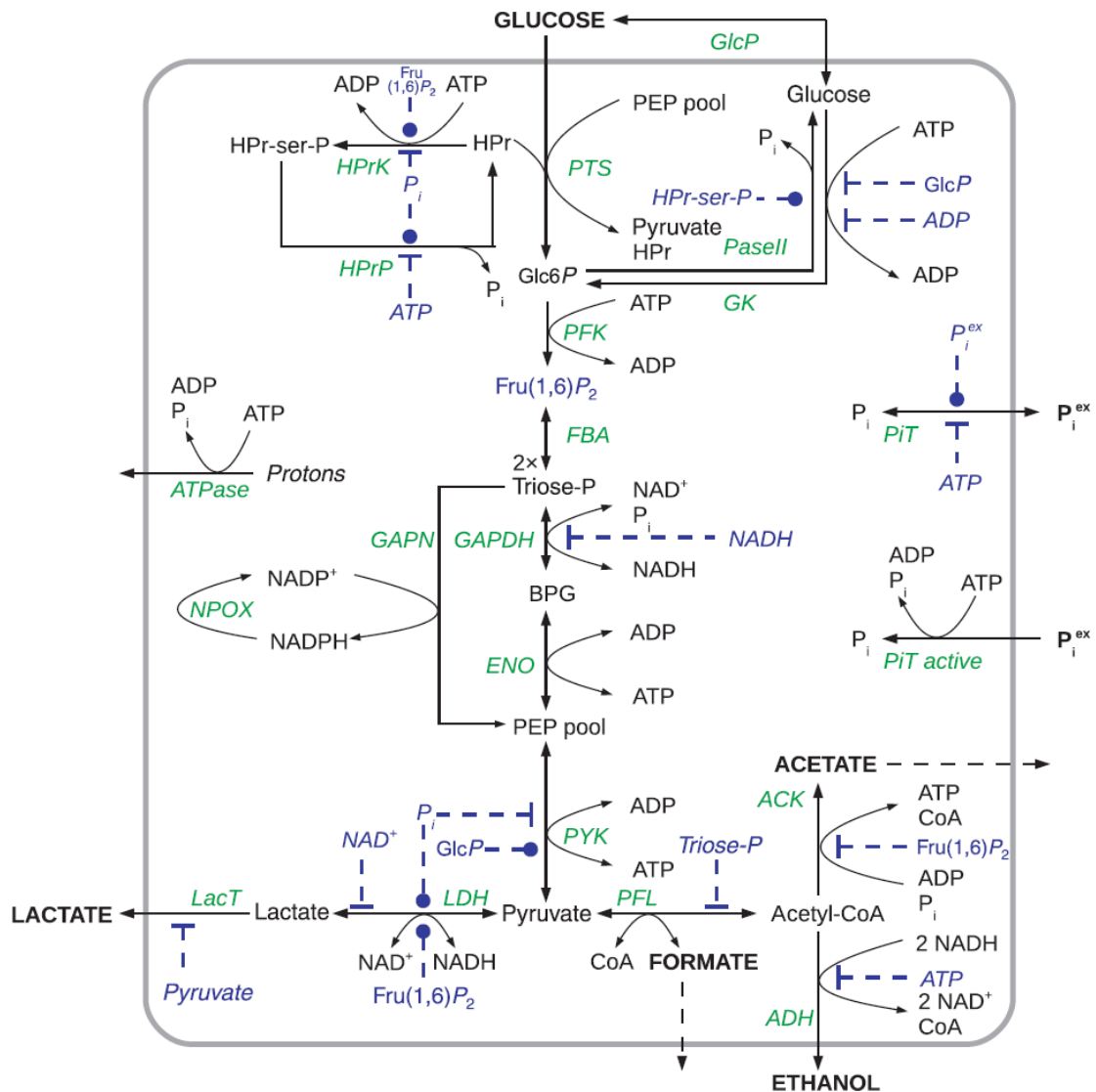


Abbildung 3: Überblick über den Glukosestoffwechsels in *S. pyogenes* (Levering *et al.*, 2012). Grün symbolisiert die glykolytischen und für die Fermentation benötigten Enzyme. Blau zeigt die Regulation, das Rechteck steht für Inhibition und der Kreis für die Aktivierung durch intrazelluläre Metabolite. ACK: Acetat Kinase; ADH: Alkohol Dehydrogenase; BPG: 1,3-Bisphosphoglycerat; CoA: Coenzym A; ENO: Enolase; FBA: Fructose-1,6-bisphosphatase; Fru(1,6)P₂: Fructose-1,6-bisphosphat GAPDH/ GAPN: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; GlcP: Glukose Permease; Glc6P: Glucose-6-phosphat; HPr: Histidinprotein; HPrK: HPr Kinase; HPrP: HPr Phosphatase; LacT: Laktattransporter; LDH: Laktatdehydrogenase; NPOX: NADPH Oxidase; PEP: Phosphoenolpyruvat; PFL: Pyruvat Formiat Lyase; PFK: Phosphofruktokinase; PiT: Phosphattransporter; PTS: Phosphotransferasesystem; PYK : Pyruvat Kinase.

Aufgrund der Auxotrophie für einige Aminosäuren und Wachstumsfaktoren zählt *S. pyogenes* zu den anspruchsvollen Keimen. Ein Überblick über die essentiellen Aminosäuren und Vitaminen für die Kultivierung von *S. pyogenes* sind in der Tabelle 1 zusammengefasst (nicht veröffentlichte Daten). Für *in vitro* Wachstumsanalysen werden daher vorwiegend Komplexmedien und Nährböden verwendet, die mit Hefeextrakt beziehungsweise mit But oder Blutbestandteile supplementiert sind.

Bei der Besiedlung des Menschen exprimiert *S. pyogenes* verschiedene Exoproteine wie DNasen, Proteasen oder Hylauronidasen, die die nährstoffreichen Wirtsmakromoleküle hydrolysieren und somit den Nährstoffmangel ausgleichen (McDowell *et al.*, 2012).

Tabelle 1: Übersicht über die essentiellen Aminosäuren und Vitamine für das Wachstum von *S. pyogenes*. Die Aminosäuren sind anhand ihrer Seitenketten eingeteilt.

Aliphatische AS	Basische AS	Aromatische AS	Schwefelhaltige AS	Vitamine
Alanin	Arginin	Histidin	Methionin	p-Aminobenzoensäure
Isoleucin	Lysin	Phenylalanin		Biotin
Leucin		Threonin		Riboflavin
Valin		Tryptophan		Thiamin
		Tyrosin		Pyridoxalphosphat
				Cobalamin

Neben dem primären Metabolismus besitzen *S. pyogenes* und andere Mikroorganismen, die Fähigkeit, über den katabolen Abbau von Arginin zusätzlich Energie in Form von ATP zu generieren. Dieser Stoffwechselweg wird als **Arginin Deiminase System (ADS)** bezeichnet (Zuniga *et al.*, 2002b; Knodler *et al.*, 1998).

1.5 Arginin Deiminase System (ADS)

Das ADS ist der meist verbreitete anaerobe Stoffwechselweg für die Arginindegradation innerhalb der Prokaryoten (Zuniga *et al.*, 2002b). Dieser Stoffwechselweg konnte für zahlreiche Spezies der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* und *Streptococcus* nachgewiesen werden (Luthi *et al.*, 1990; Gamper *et al.*, 1991; Maghnouj *et al.*, 2000; Barcelona-Andres *et al.*, 2002; Zuniga *et al.*, 1998 und 2002b; Griswold *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004).

Das ADS umfasst im Wesentlichen drei Enzyme, die für den Argininabbau verantwortlich sind: die **Arginin Deiminase (AD)**, die **Ornithin Carbamoyltransferase (OCT)** sowie die **Carbamat Kinase (CK)**. Die Arginin Deiminase (E.C.: 3.5.3.6) ist eine Hydrolase, welche die Aufspaltung der Guanidinogruppe von Arginin katalysiert. Dabei wird das Arginin zu Citrullin und Ammoniak abgebaut (Abbildung 4 A). Das entstandene Citrullin wird durch die Ornithin Carbamoyltransferase (E.C.: 2.1.3.3) zu Ornithin und Carbamoylphosphat umgewandelt (Abbildung 4 B). Die Rückreaktion der OCT von Ornithin und Carbamoylphosphat zu Citrullin ist die Schlüsselreaktion für die Argininbiosynthese und ein wesentlicher Bestandteil des Harnstoffzyklus. Im letzten Schritt überträgt die Carbamat Kinase (E.C.: 2.7.2.2) die Phosphatgruppe vom Carbamoylphosphat auf ADP (Abbildung 4 C). Das dabei gebildete Carbamat zerfällt spontan zu Kohlenstoffdioxid und Ammoniak. Zusammenfassend generiert das ADS pro

Mol Arginin ein Mol Ornithin, zwei Mol Ammoniak, ein Mol Kohlendioxid und ein Mol ATP.

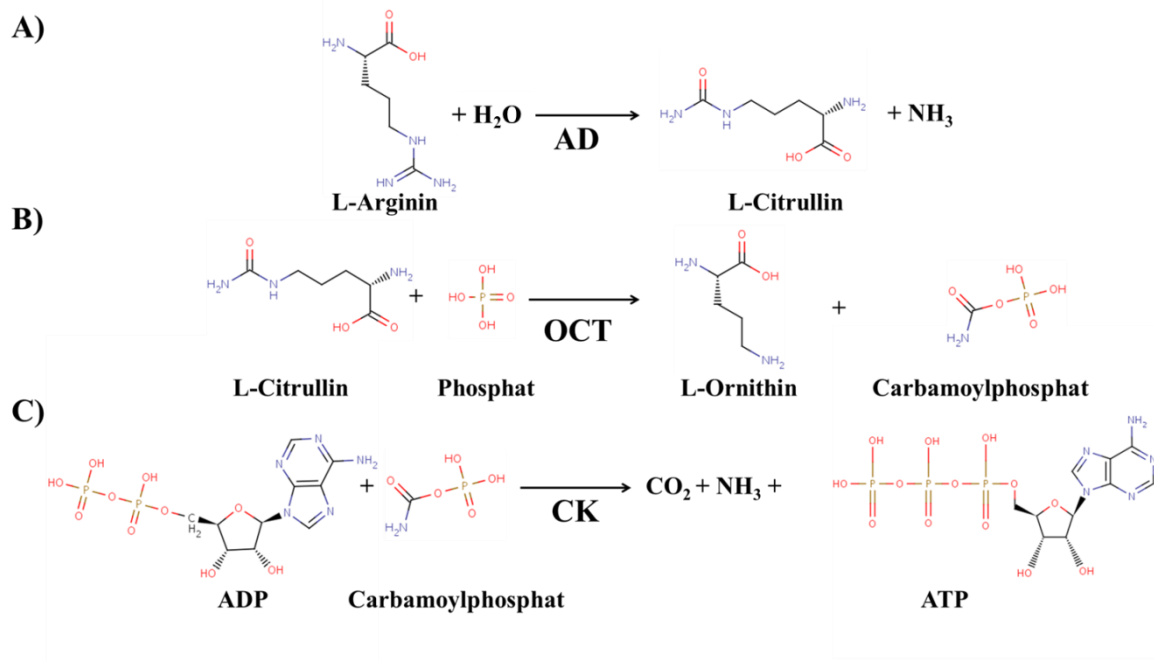


Abbildung 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktionen des ADS. A) Hydrolytische Spaltung des Arginins durch die Arginin Deiminase (AD). B.) Abspaltung der Carbaminogruppe des Citrullins und dessen Verknüpfung mit einem Phosphatrest durch die Ornithin Carbamoyltransferase (OCT). C) Übertragung der Phosphatgruppe vom Carbamoylphosphat auf ADP durch die Carbamat Kinase (CK). (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

Die Gene *arcA*, *arcB* und *arcC*, welche für die drei Enzyme kodieren, sind hochkonserviert und werden polycistronisch als *arc*-Operon transkribiert. Dieser Gencluster konnte in einer Reihe von Milchsäurebakterien nachgewiesen werden (Zuniga *et al.*, 1998 und 2002a; Luthi *et al.*, 1990; Griswold *et al.*, 2004; Barcelona-Andres *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2002). Mit dem *arc*-Operon können weitere zusätzliche Gene assoziiert sein, die für Transportproteine und putative Aminotransferasen kodieren sowie Gene für regulatorische Proteine, die zu der ArgR- und Crp/Fnr-Familie gehören. Dennoch unterscheiden sich die Bakterienarten hinsichtlich der Genanordnung des *arc*-Operons und dessen Regulierung (Fernandez und Zuniga, 2006).

Die Unterschiede in der Regulation des ADS korrelieren zum Teil mit der Anpassung an den Lebensraum der Organismen. Bei den meisten Bakterien gilt Energiemangel als grundlegender Faktor für die Induktion des ADS (Cunin *et al.*, 1986). Für die Organismen *Bacillus licheniformis* und *Pseudomonasa aeruginosa* ist die Regulation des ADS bereits ausführlich beschrieben. Hier erfolgt die Induktion des alternativen, ATP generierenden Stoffwechselweges durch Arginin und in Abwesenheit von Sauerstoff. Dabei wird die Aktivierung des Systems ebenfalls durch die beiden transkriptionellen Regulatorproteine ArgR (Arginin Repressor) und Crp (cAMP receptor protein) vermittelt (Gamper *et al.*,

1991; Lu *et al.*, 1998; Maghnouj *et al.*, 2000). Für *Lactobacillus sakei* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Arginin und das Regulatorprotein ArgR essentiell für die Expression des *arc*-Operons sind. In Anwesenheit von Glukose wird das Operon reprimiert. Andere Zucker wie Galaktose oder Ribose zeigten hingegen keine repressiven Effekte (Zuniga *et al.*, 1998 und 2002a; Montel und Champomier, 1987; Champomier Verges *et al.*, 1999). Diese Regulationsmechanismen legen nahe, dass die Expression des *arc*-Operons von *Lb. sakei* durch CcpA (*catabolite control protein A*) vermittelt wird. Es konnten zwei *CRE*-sites (*catabolite responsive elements*) in der Promotorregion nachgewiesen werden, an denen CcpA binden kann (Zuniga *et al.*, 1998). Die Basis für CCR (*carbon catabolite repression*) ist die Unterdrückung der alternativen ATP-generierenden Stoffwechselwege in Anwesenheit von Glukose (Fernandez und Zuniga, 2006).

In anderen *Lactobacillus*-Spezies wie *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus sanfranciscensis* steht die Expression des ADS nicht unter der CCR-vermittelten Kontrolle. Hier erfolgt die Induktion durch Arginin und einen niedrigen externen pH-Wert (Arena *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2004; Angelis *et al.*, 2002b). In *Lactococcus lactis*, dem Modellorganismus der Milchsäurebakterien, führt eine Erniedrigung des pH-Wertes von 7,0 auf 5,0 ebenfalls zu einer Induktion der Expression des ADS (Budin-Verneuil *et al.*, 2006). Die Expression von AD, OCT und CK des *arc*-Operons wird zudem durch Arginin induziert und durch Glukose reprimiert (Crow und Thomas, 1982). Jedoch befindet sich ein zusätzliches *arcC*-Gen in dem Operon des Agmatin Deiminase Systems (AgDS), welches nicht durch Glukose reprimiert wird (Bolotin *et al.*, 2001; Naumoff *et al.*, 2004).

Die physiologische Bedeutung des argininabbauenden Stoffwechselweges ist eingehend beschrieben. Allerdings variiert die Rolle als Energiequelle oder als ein Schutzsystem gegen Säurestress zwischen den Milchsäurebakterien. Für *Lb. sakei* konnte gezeigt werden, dass sich die Vitalität der Bakterien in der stationären Phase durch Argininabbau verlängert (Champomier Verges *et al.*, 1999). Des Weiteren führt die Arginolyse in einigen Milchsäurebakterien wie *E. faecalis*, *Lc. lactis* und *Lb. plantarum* zu einem erhöhten Wachstum (Bauchop und Elsdon 1960; Deibel 1964; Moustafa und Collins; 1968; Crow und Thomas, 1982; Jonsson *et al.*, 1983). Ebenso können auch Säure-sensitive Bakterien wie *Streptococcus sanguinis* von ADS-positiven Organismen profitieren. Besonders in heterologen Biofilmen können sich die Bakterien durch Ammoniak, gebildet durch das ADS, vor glykolytisch bedingter Ansäuerung der Umgebung schützen, indem das Ammoniak den lokalen pH-Wert neutralisiert (Casiano-Colon und Marquis, 1988; Curran *et al.*, 1995). Sogar eine Reduzierung der Kariogenität durch ADS-bedingte Anhebung des pH-Wertes in oralen Biofilmen konnte in den neuesten Studien bewiesen werden (Nascimento *et al.*, 2013).

1.5.1 Arginin Deiminase System von *Streptococcus pyogenes*

Wie schon für andere Milchsäurebakterien beschrieben, ist das ADS von *S. pyogenes* eng mit dem Glutamat/Glutamin-Metabolismus sowie mit dem Pyrimidin Biosynthesstoffwechsel verknüpft. Jedoch verfügt *S. pyogenes* nur über den katabolen Argininmetabolismus, während zum Beispiel *Lc. lactis* über den anabolen und katabolen Arginin Stoffwechselweg verfügt (Fernandez und Zuniga, 2006).

Die genetische Anordnung des *arc*-Operons in *S. pyogenes* M49 NZ131 ist in der Abbildung 5 dargestellt. Hier sind zusätzlich Gene für eine Histon Acetyltransferase, eine Xaa-His-Dipeptidase sowie ein Transportprotein integriert (Degnan *et al.*, 1998). Die Regulation des Systems wird über die transkriptionellen Regulatorproteine ArgR und Crp vermittelt. In der Promotorregion des *arc*-Clusters wurden ebenfalls *CRE*-sites nachgewiesen. Somit steht die Expression unter der Kontrolle von CcpA (Caldelari *et al.*, 2000).

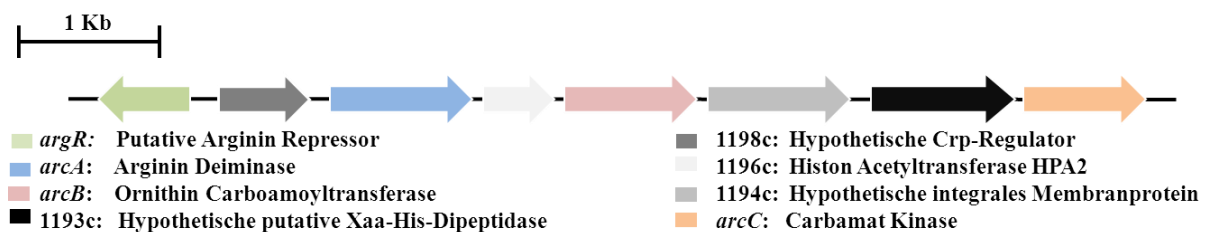


Abbildung 5: Genetische Darstellung des *arc*-Operons von *S. pyogenes* M49. (modifiziert nach Hering *et al.*, 2013).

Neben den Funktionen (I) der Generierung von ATP durch Metabolisierung von Arginin, (II) der Biosynthese von Citrullin und der Verknüpfung zur Pyrimidin-Biosynthese und (III) dem Schutz vor Säurestress durch Ammoniakproduktion konnte für die Arginin Deiminase von *S. pyogenes* eine Beteiligung an der Internalisierung in Epithelzellen nachgewiesen werden (Cunin *et al.*, 1986; Degnan *et al.*, 2000; Marouni *et al.*, 2003). Alternativ wird die AD auch als *streptococcal acid glycoprotein* (SAGP) bezeichnet. Es wird von einer Bifunktionalität des zelloberflächenlokalisierten Enzyms ausgegangen (Degnan *et al.*, 2000). Die AD ist nicht das einzige Stoffwechsellenzym, welches an der Pathogenese von *S. pyogenes* beteiligt ist. Interessanterweise fehlen sowohl der Arginin Deiminase als auch der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und der Plasmin-(ogen)-bindenden *alpha*-Enolase die typischen Strukturmerkmale für Oberflächenproteine (Pancholi und Fischetti, 1992 und 1998). Somit könnte spekuliert werden, dass diese Proteine eine alternative Translokationsroute durchlaufen (Winterhoff *et al.*, 2002). Gegenwärtig wird allerdings davon ausgegangen, dass es sich bei der AD im Regelfall um ein zytoplasmatisches Protein handelt, wie es für *Lc. lactis* beschrieben wurde (Kim *et al.*, 2009). Jedoch können Organismen wie zum Beispiel *Mycoplasma hominis* sowohl über eine zytoplasmatische als auch über eine Zellwand-gebundene AD verfügen (Lin, 1986).

In weiteren Untersuchungen konnte für die aus dem Zellextrakt gewonnene AD eine Inhibierung der Proliferation menschlicher T-Lymphozyten gezeigt werden (Degnan *et al.*, 1998). In AD-defizienten Mutanten konnte sowohl eine verminderte Wachstumsrate als auch eine verringerte Überlebensrate der Streptokokken in saurer Umgebung nachgewiesen werden (Marouni *et al.*, 2003; Degnan *et al.*, 2000). Diese ersten Ergebnisse lieferten den Ausgangspunkt für diese Arbeit.

1.6 Einsatz der Arginin Deiminase in der Tumorbehandlung

Neben der bereits beschriebenen Rolle des Arginin Deiminase Systems in Bakterien, erwiesen sich bakterielle Arginin Deiminasen als vielversprechende Behandlungsmöglichkeit von **Argininosuccinat Synthetase 1 (ASS1) negativen Tumoren** (Gonzalez *et al.*, 1991; Dillon *et al.*, 2004). Es konnte für zahlreiche Krebsarten wie Blutkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostatakrebs und Nierenkrebs gezeigt werden, dass im Tumorgewebe keine ASS1-Expression erfolgt (Gong *et al.*, 2000; Ensor *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2007; Bowles *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009b). Die ASS1 (E.C.: 6.3.4.5) ist ein wesentlicher Bestandteil des Harnstoffzyklus und katalysiert die Synthese von Argininosuccinat aus Citrullin und Aspartat. Das Argininosuccinat wird durch die Argininosuccinat Lyase (E.C.: 4.3.2.1) zu Fumarat und Arginin gespalten. Als in der Literatur beschriebene Hypothese für den Verlust der ASS1-Expression in bestimmten Tumoren gilt die epigenetische Inaktivierung des *ASS1*-Gens durch eine Hypermethylierung im Promotor, welche zu einer beständigen Inhibition der Genexpression führt. Dies konnte jedoch nicht in allen ASS1-defizienten Tumoren beobachtet werden (Szlosarek *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2009). Ebenso könnten posttranslationale Modifikationen oder Mutationen zu dem **Verlust der ASS1-Expression** beitragen.

Arginin ist für den Menschen eine **nichtessentielle Aminosäure** und spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen. Zum Beispiel fördert Arginin die Wundheilung und stimuliert die Ausschüttung von Wachstumshormonen. Des Weiteren ist die Aminosäure an verschiedenen immunmodulatorischen Effekten beteiligt, wie beispielsweise der Stimulation der Aktivitäten von T-Killerzellen und der Beeinflussung des proinflammatorischen Zytokin-Niveaus (Lind, 2004). Für bestimmte Tumorarten (z. B. ASS1-defiziente Tumore) ist Arginin jedoch eine **essentielle Aminosäure**. Da diese Tumorzellen nicht in der Lage sind, Arginin selber zu synthetisieren, müssen diese die Aminosäure grundsätzlich aus ihrer Umgebung aufnehmen.

Neben der Proteinbiosynthese ist Arginin in verschiedene Aspekte des Stoffwechsels der Tumorzellen involviert, wie zum Beispiel die Synthese von Stickstoffmonoxid, Polyaminen, Nukleotiden, Prolin und Glutamat (Delage *et al.*, 2010). Die durch den Argininabbau gebildeten Polyamine sind bedeutend für Wachstum, Invasion und Metastasierung von Tumoren (Gerner und Meyskens, 2004). Daneben spielt das

Stickstoffmonoxid, welches durch die Stickstoffmonoxid Synthase (E.C.: 1.14.13.39) aus Arginin gebildet wird, eine besondere Rolle bei diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen: Der bioaktive Botenstoff, mit einer Halbwertszeit von 2 -3 s in biologischen Systemen, entfaltet eine Vielzahl von Wirkungen im menschlichen Körper (Hakim *et al.*, 2006). Beschrieben sind vor allem Signalfunktionen im Gefäß- und Nervensystem bis hin zur Rolle als reaktive Stickstoffspezies der Immunabwehr. Es ist ebenso bekannt, dass in pathophysiologischen Prozessen die meisten Krebszellen vermehrt Stickstoffmonoxid herstellen und sich dadurch einen Überlebensvorteil sichern. In menschlichen Melanomzellen übt das Stickstoffmonoxid beispielsweise eine antiapoptotische Wirkung aus. Ein Nachweis der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) kann daher als prognostisch ungünstig für das Überleben von Patienten mit Melanom im Stadium III gewertet werden (Ekmekcioglu *et al.*, 2006).

Durch den Einsatz von Arginin-abbauenden Enzymen, wie AD oder Arginase, könnten Patienten mit Arginin-auxotrophen Tumoren therapiert werden. Durch die Arginin-degradation unterliegen die Tumorzellen einem **Nährstoffmangel** und sind in ihrem Wachstum gehemmt (Terayama *et al* 1982; Miyazaki *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1991; Philip *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2002 und 2004). Für Patienten mit hepatozellulären Karzinomen und Metastasen von malignen Melanomen konnte eine positive Auswirkung auf die **Inhibition des Tumorwachstums** durch Therapie mit AD beobachtet werden (Izzo *et al.*, 2004; Ascierto *et al.*, 2005).

In der Arbeit von Yoshido (1998) wurde erstmalig der Einfluss von SAGP (*streptococcal acid glycoprotein*) auf verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Das, aus einem Rohextrakt gewonnene, SAGP zeigte ebenfalls antiproliferative Auswirkungen auf Tumorzellen (Yoshida *et al* 1998). Diese Vorkenntnisse dienten als Grundlage für diese Arbeit und sollten in weiteren Testungen verschiedener Tumorzelllinien und Kombinationsversuchen mit Chemotherapeutika fortgeführt werden.

1.7 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen des Verbundprojektes SysMO-LAB2 (*Systems Biology of Microorganisms – Lactic Acid Bacteria*) das Arginin Deiminase System (ADS) in dem humanpathogenen Bakterium *Streptococcus pyogenes* Serotyp M49 zu charakterisieren. In den genom-basierten und systembiologisch orientierten Analysen aus der ersten Periode des Verbundprojektes konnte ein Einfluss des ADS auf die Regulation des Primärmetabolismus von verwandten pathogenen/apathogenen Spezies der Ordnung *Lactobaccillales* nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun zum einen die Rolle im Metabolismus von Gruppe „A“ Streptokokken und zum anderen die Beteiligung des ADS an der Pathogenese näher untersucht werden. Hierfür sollte das erste Enzym des *arc*-Operons, die Arginin Deiminase (AD), deletiert und das Verhalten der Deletionsmutante in verschiedenen Virulenz-Assays experimentell überprüft werden. Damit könnte diese Studie zur weiteren Aufklärung der biologischen Relevanz der AD in der Pathogenese von *S. pyogenes* beitragen.

Weiterhin liegt ein besonderes Augenmerk auf dem metabolischen Einfluss der AD. Für *Lc. lactis* konnte gezeigt werden, dass es durch die ATP-Generierung über das ADS zur Verschiebung des Kohlenhydratmetabolismus von Milchsäuregärung zu gemischten Säuregärung kommt. Dieses Phänomen sollte auch in *S. pyogenes* experimentell überprüft werden. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Wachstumsuntersuchungen und kontinuierlichen Kulturführungen im Chemostaten mit der Arginin Deiminase Deletionsmutante und dem parentalen Wildtypstamm durchgeführt werden, um das Spektrum der Fermentationsprodukte mittels HPLC-Analysen sowohl identifizieren als auch quantifizieren zu können.

Als zweiter Aspekt diene diese Studie der kinetischen Charakterisierung der ammonium-produzierenden Enzyme Arginin Deiminase (AD) und Carbamat Kinase (CK). Hierfür sollten die Streptokokken-Enzyme heterolog in *E. coli* DH5 α exprimiert und die kinetischen Parameter sowie die Regulation der Enzyme untersucht werden.

Weiterhin gilt die AD neben der Arginase als potentieller Kandidat für die Behandlung von Arginin-auxotrophen Tumorzellen. In diesem Nebenprojekt sollten die antiproliferativen Effekte der AD von *S. pyogenes* M49 auf verschiedene Tumorzelllinien untersucht werden. Sollten positive Effekte auftreten, stellt sich die Frage, ob sich in Kombinationsversuchen mit Chemotherapeutika diese Effekte verstärken lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

Die Untersuchung des Arginine Deiminase Systems in Gruppe A Streptokokken erfolgte an *Streptococcus pyogenes* Serotyp M49 Stamm 591, welcher von R. Lütticken (Aachen) zur Verfügung gestellt wurde.

Der *Escherichia coli* Stamm DH5 α der Firma Invitrogen (Darmstadt) wurde für Klonierungen und die Vermehrung von Plasmiden verwendet.

2.1.2 Eukaryote Zelllinien

Für die Untersuchungen zur Phagozytose und für die Versuche zur antiproliferativen Wirkung der AD wurden die in der Tabelle 2 aufgelisteten Zelllinien verwendet.

Tabelle 2: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Name	Zelltyp	Ursprungsorganismus	Herkunft
HROHep03	Hepatokarzinom	Mensch	MOI; Rostock
HROG02	Glioblastom	Mensch	MOI; Rostock
HROCG04	Glioblastom	Mensch	MOI; Rostock
HROCG05	Glioblastom	Mensch	MOI; Rostock
HROCG07	Glioblastom	Mensch	MOI; Rostock
HROCG10	Glioblastom	Mensch	MOI; Rostock
HROCG17	Glioblastom	Mensch	MOI; Rostock
HHC6548	Kolorektales Karzinom	Mensch	MOI; Rostock
J774	Makrophagen-Zelllinie	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

2.1.3 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Größe (kb)	Referenz/ Herkunft
pFW5	Spectinomycin	2,7	Podbielski <i>et al.</i> , 1996
pASK_IBA2	Ampicillin	3,3	IBA GmbH, Göttingen
pASK_IBA3C	Chloramphenicol	3,0	IBA GmbH, Göttingen
pASK_IBA2_ArcA	Ampicillin	4,5	Diese Arbeit
pASK_IBA2_ArcC	Ampicillin	4,2	Diese Arbeit
pASK_IBA3C_ArcA	Chloramphenicol	5,4	Diese Arbeit
	Spectinomycin		

2.2 Nährmedien und Zellanzucht für Bakterien

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte, sofern nicht anders angegeben, im Autoklaven für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck.

2.2.1 *Lysogeny broth* (LB) Medium (Bertani *et al.*, 1951)

LB-Medium wurde zur Anzucht aller verwendeten *E. coli* Stämme eingesetzt.

LB-Broth-Base	20,0 g
NaCl	4,5 g
H ₂ O dest.	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Festmedien erfolgte die Zugabe von 1,5 % Agar.

2.2.2 *Todd Hewitt Yeast* (THY) Medium (Todd and Hewitt, 1932)

THY-Medium wurde zur Anzucht aller *S. pyogenes* Stämme eingesetzt.

Todd-Hewitt-Broth	36,4 g
Hefeextrakt	5,0 g
H ₂ O dest.	ad 1000 ml

Für die Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % Agar hinzugefügt.

2.2.3 CDM-LAB – *chemically defined medium* – *lactic acid bacteria*

CDM-LAB wurde vorwiegend für Wachstumsversuche und Chemostatexperimente mit *S. pyogenes* Stämmen eingesetzt. Die Herstellung des Mediums erfolgte nach Fiedler *et al.*, 2011 mit den in der Tabelle 4 zusammengefassten Modifikationen. Aufgrund der

Verwendung hitzeempfindlicher Komponenten wurde das Medium sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße; B. Braun Melsungen AG).

Tabelle 4: Modifiziertes CDM-LAB-Medium

Komponente	Fiedler <i>et al.</i> , 2011	CDM-LAB
L-Arginin	0,125 g/l	0,5 g/l
Natriumbicarbonat	-	2,5 g/l

2.2.4 Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden nach dem Autoklavieren den abgekühlten Medien zugegeben. Die Stammlösungen der Medienzusätze wurden sterilfiltriert und konnten bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Medienzusätze

Zusätze	Stammlösung	<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i>
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml in EtOH	0,2 µg/ml	-
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	-
Chloramphenicol	20 mg/ml in EtOH	20 µg/ml	5 µg/ml
Spectinomycin	10 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	60 µg/ml

2.2.5 Anzucht der *E. coli* Stämme

Die Anzucht der *E. coli* Stämme erfolgte aerob in Submers- oder Emerskulturen bei 37 °C in LB-Medium. Die Submerskulturen wurden in 10 ml Plastikröhrchen (Greiner Bio One) oder in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (Shaking Inkubator NB205L, N-Biotec) bei 180 UpM kultiviert. Je nach Bedarf wurden Antibiotika in entsprechender Konzentration (siehe 2.2.4) zugesetzt.

2.2.6 Anzucht der *S. pyogenes* Stämme

Die Kultivierung der *S. pyogenes* Stämme erfolgte in Flüssig- oder Festmedien bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre. Für die Flüssigkulturen kamen 10 ml und 50 ml Plastikröhrchen (Greiner Bio One) und THY- bzw. CDM-LAB-Medium zum Einsatz (2.2.2 und 2.2.3). Je nach Bedarf wurden Antibiotika in entsprechender Konzentration (siehe 2.2.4) zugesetzt.

2.2.7 Kultivierung im Chemostaten

Für kontinuierliche Glukose-limitierte Kulturen von *S. pyogenes* kam der in Abbildung 6 schematisch dargestellte Fermenter Biostat B plus (Sartorius AG) zum Einsatz.

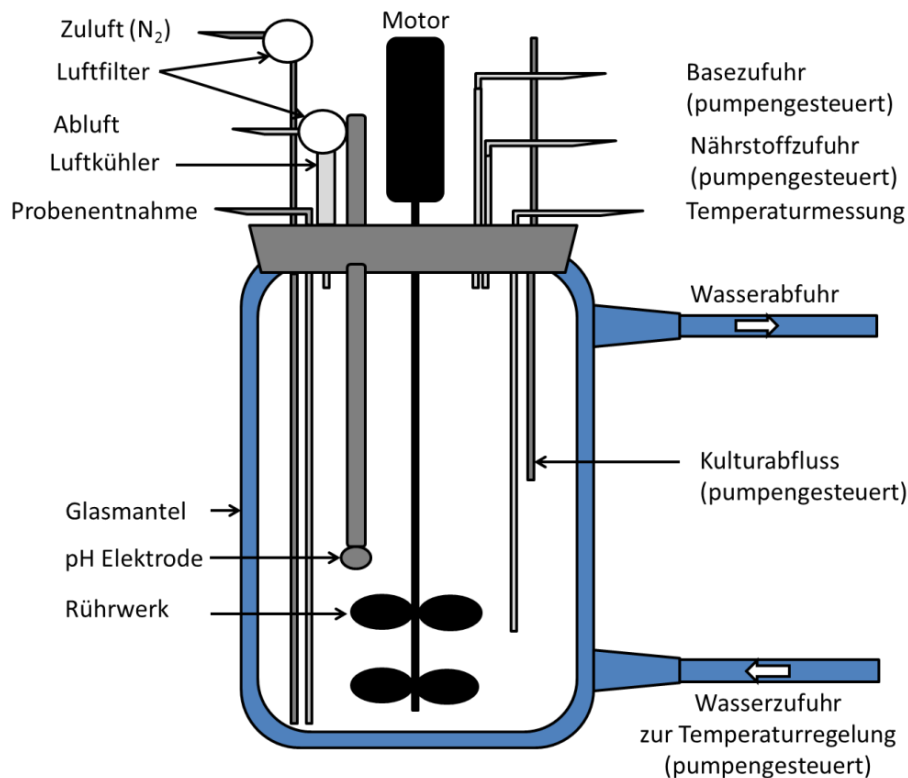


Abbildung 6: Aufbau des Fermenters Biostat B plus.

Hierfür wurde eine Vorkultur von 50 ml THY mit dem entsprechenden *S. pyogenes* Stamm beimpft. Nach 16 h Kultivierung (siehe 2.2.6) wurde diese Vorkultur mit 1x PBS gewachsen und diente als Inokulum für den Fermenter. Die Anzucht im Chemostaten erfolgte anaerob in CDM-LAB-Medium in einem Arbeitsvolumen von 0,75 l. Die Begasungsrate betrug 0,05 l N₂/min bei einer Rührerdrehzahl von 150 UpM. Die Temperaturregelung auf 37 °C wurde durch Heiz- und Kühlkreisläufe im Glasmantel realisiert. Für einen konstanten pH-Wert (6,5 bzw. 7,5) wurde über die Steuereinheit automatisch 3 M Kaliumhydroxid über die Basezufuhr in das Kulturgefäß geleitet. Sechs Stunden nach Inokulation wurde die Medienzufuhr mit einer Flussrate von 0,05/h eingeschaltet. Mittels der Levelpumpe wurde das Kulturvolumen auf konstant 0,75 l gehalten und so eine konstante Durchflussrate gewährleistet. Nach dem Erreichen eines Nährstofflimitierten Fließgleichgewichtes (*steady state*-Status) wurden Proben für weitere Analysen entnommen und es konnten neue Parameter für weitere Versuche eingestellt werden.

Der *steady state*-Status war erreicht, wenn an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen keine Veränderung der optischen Dichte (siehe 2.4.1) und Trockenmasse (siehe 2.4.3) vorlag sowie im Kulturüberstand keine Glukose (siehe 2.4.5) nachweisbar war.

2.2.8 Stammhaltung

E. coli und *S. pyogenes* Stämme wurden auf den entsprechenden Festmedien maximal drei Monate bei 4 °C gelagert und als Inokulum für neue Kulturen verwendet. Für eine längerfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 10 ml Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei Standardbedingungen kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in der Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R (Heraeus) 5 min bei 4.000 UpM sedimentiert und das Zellpellet in 800 µl Medium suspendiert. Der Zellsuspension wurden 200 µl steriles Glycerin zugesetzt. Das Gemisch (Endkonzentration Glycerin: 20 %) wurde bei -80 °C eingefroren.

2.3 Nährmedien und Anzucht eukaryotischer Zelllinien

Die Anzucht der eukaryotischen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm², Greiner Bio-One) in 25 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) + 10 % Fetales Kälberserum (FKS) bei 37 °C und 5 % CO₂. Für weitere Kultivierungen bzw. für das Passagieren wurden die Zellen mit Trypsin von dem Flaschenboden abgelöst. Die Zellzahl wurde mittels Bürker-Zählkammer bestimmt und auf eine für den jeweiligen Versuch relevante Zellzahl (1 x 10⁵ bzw. 1 x 10⁷ Zellen/ml) eingestellt.

2.4 Bestimmung physiologischer Parameter

2.4.1 Messung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde als Änderung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) direkt in Plastikkuvetten (Sarstedt) mit dem Spektralphotometer (SmartSpecTM Plus, BioRad-Laboratories) bestimmt. Beim Überschreiten der OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Probe entsprechend mit Nährmedium verdünnt.

2.4.2 Bestimmung der Zellvitalität

2.4.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die zu analysierende Zellsuspension mit 1x PBS in entsprechenden Stufen verdünnt, je 100 µl der entsprechenden Verdünnungen mittels Glasperlen auf den Festmedien ausplattiert und nach Kultivierung über Nacht die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Lebendkeimzahl in der Ausgangssuspension

konnte so unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren als Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter berechnet werden.

2.4.2.2 Lebend/Tot-Bestimmung mit *Baclight*TM *Bacterial Viability Kit*

Der Vitalitätsnachweis mit dem *Baclight*TM *Bacterial Viability Kit* der Firma Invitrogen beruht auf der Integrität der Membran. Der grün fluoreszierende Nukleinsäure-Farbstoff SYTO 9 (Anregungsmaximum = 480 nm, Emissionsmaximum = 500 nm) kann sowohl durch intakte als auch beschädigte Membranen perfundieren und an doppelsträngige RNA und DNA binden, was Zellen grün fluoreszieren lässt. Im Gegensatz dazu kann Propidium-Iodid (Anregungsmaximum = 490 nm, Emissionsmaximum = 635 nm) nur durch beschädigte Membranen in die Zellen gelangen und an doppelsträngige RNA und DNA binden. Sind beide Farbstoffe in der Zelle vorhanden, reduziert Propidium-Iodid das SYTO 9 und die Zellen fluoreszieren rot. Anhand der Fluoreszenzfärbung kann somit zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

Für die Lebend/Tot-Bestimmung wurden die Zellsuspensionen entsprechend mit 1x PBS verdünnt. Die Farbstoffreagenzien SYTO 9 und Propidium-Iodid wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Zu 1 ml verdünnter Zellsuspension erfolgte die Zugabe von 1 µl des Farbstoffgemisches. Nach 5 min Inkubation konnte die Vitalität der Zellen am Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus) durch Auszählen in einem markierten Sichtfeld bestimmt und dokumentiert werden.

2.4.3 **Bestimmung des Zelltrockengewichtes**

Für die Bestimmung des Trockengewichtes wurden zwei Proben a 25 ml (Duplikate) einer Fermenterkultur in der Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R (Heraeus) 10 min bei 4.000 UpM sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet über Nacht bei -20 °C gelagert. Mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage Christ LOC-1m alpha 1-4 (Martin Christ GmbH) erfolgte die Lyophilisation der gefrorenen Zellpellets unter Vakuum. Unter diesen Bedingungen wurde das Wasser im gefrorenen Zustand aus den Proben entzogen. Nach 8 h wurden das Gewicht der gefriergetrockneten Proben auf der Feinwaage Adventure Pro AV53 (Ohaus) bestimmt und das Trockengewicht in mg/ml berechnet.

2.4.4 **Überprüfung der Reinheit von *S. pyogenes* Kulturen**

Damit eine Kontamination in Chemostat- und Wachstumsexperimenten ausgeschlossen werden konnten, wurde die Reinheit der Kultur mit den folgenden drei Verfahren überprüft:

1. Durch die klassischen lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellmorphologie. Hierfür wurde die zu analysierende Probe auf einem Objektträger verteilt

und bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop CKX41 (Olympus) betrachtet und bewertet (siehe 1.1).

2. Durch die Untersuchung des Hämolyseverhaltens. Hierfür wurden die entnommenen Proben mittels 3-Ösen-Technik auf dem Columbia-Blutagar (Oxoid Ltd.; GB) ausgestrichen. Nach 16 h Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte anhand des Hämolyseverhaltens eine Zuordnung des Organismus zu Alpha- (α -), Beta- (β -) und Gamma- (γ -) Hämolyse erfolgen (siehe 1.1).
3. Durch enzymatische Bestimmung mit Wasserstoffperoxid. In diesem Fall wurden einige Tropfen einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) auf die ausgestrichenen Kolonien gegeben. Bei einer raschen Blasenbildung handelte es sich um Katalase-positive Stämme, die das Wasserstoffperoxid zu Wasserstoff und Sauerstoff abbauen konnten. Wurde jedoch keine Schaumbildung beobachtet, konnte der Organismus den Katalase-negativen Stämmen zugeordnet werden (siehe 1.1).

2.4.5 Bestimmung der Glukosekonzentration

Die schnelle Quantifizierung von Glukose in Lösungen erfolgte mittels Diabur-Test 5000 Teststreifen (Roche). Die Wirkungsweise beruht auf einer gekoppelten enzymatischen Reaktion aus Glukose Oxidase (GOD) und Peroxidase (POD). Durch die Oxidation der Glukose (GOD) kommt es in der nachgeschalteten Reduzierung (POD) des entstandenen Wasserstoffperoxids zu einer Verfärbung des Teststreifens.

Ein Tropfen der zu analysierenden Probe wurde auf den Teststreifen gegeben. Die Färbezeit betrug 2 min. Eine grüne Verfärbung des Teststreifens deutete darauf hin, dass noch Glukose in der Probe vorhanden war. Blieb ein Farbreaktion aus, war die Glukosekonzentration unter der Nachweisgrenze von 5,6 mmol/l. Die exakte Bestimmung von Glukosekonzentrationen erfolgte mittels HPLC (siehe 2.4.6)

2.4.6 Quantifizierung von Fermentationsprodukten

Die Quantifizierung von Zuckern und Fermentationsprodukten in Medien und Kulturüberständen erfolgte mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*). Dazu war eine Vorreinigung der Proben nötig. Zur Fällung von Proteinen wurde zu je 1 ml Kulturüberstand einer Fermenterkultur 100 μ l 35%ige Perchloressigsäure gegeben und gut durchmischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 55 μ l 7 M Kaliumhydroxid und mehrfaches Invertieren. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 2 min bei 13.000 UpM in der Kühlzentrifuge Kendro (Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und konnte für die HPLC-Analysen verwendet werden.

Die Bestimmung der Fermentationsprodukte erfolgte nach Fiedler *et al.*, 2011. Die verwendete HPLC-Anlage (LBK) wurde mit einer Rezex Analysensäule für organische Säuren (Phenomenex) bei einer Temperatur von 45 °C betrieben. Als Elutionsmittel diente 7,2 mM Schwefelsäure. Die eluierten Substanzen konnten mit dem Refraktions-Index-Detektor durch ihre Lichtbrechung verfolgt werden. Für die Auswertung der Spektren wurde die AZUR Chromatographie Software verwendet. Die Fermentationsprodukte konnten durch Vergleich ihrer Absorptionsspektren und ihrer Elutionspositionen mit Vergleichssubstanzen in parallel vermessenen Eichläufen identifiziert werden. Die Zuordnung der Peakflächen zu den korrespondierenden Konzentrationen der Komponenten erfolgte dabei über Kalibriergeraden, die aus den Messwerten von Eichlösungen in verschiedenen Konzentrationen erstellt wurden. Sowohl die Konzentration von Glukose als auch die Konzentrationen der Abbauprodukte Pyruvat, Laktat, Formiat, Acetat und Ethanol konnten mittels Phenomenex-Säule bestimmt werden.

Die Messungen an der HPLC erfolgten durch Dr. Koen van Grinsven an der Universität von Amsterdam.

2.4.7 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen

Die Messungen zur Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen wurden ebenfalls durch Dr. Koen van Grinsven an der Universität von Amsterdam durchgeführt. Die Proben wurden nach der Waters AccQ Tag-Methode aufbereitet und mittels HPLC (Agilent) gemessen. Anhand der Fluoreszenzmessung (Anregungsmaximum = 250 nm, Emissionsmaximum = 395 nm) konnten durch den Hitachi F-1080 Fluoreszenzdetektor die Konzentrationen für Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Prolin, Phenylalanin, Serin, Tyrosin und Valin bestimmt werden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für Klonierungen oder Sequenzierungen kam das *QIAprep Spin® Miniprep Kit* (Qiagen) zum Einsatz. Die Präparation von Plasmiden erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pyogenes*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. pyogenes* wurden 10 ml THY-Medium mit den entsprechenden *S. pyogenes* Stämmen beimpft und über Nacht kultiviert (siehe 2.2.6). Anschließend wurde die Kultur in der Megafuge 1.0 R (Heraeus) 10 min bei 4.000 UpM sedimentiert und der Überstand verworfen. Für die darauffolgende DNA-Isolierung aus dem Zellpellet wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* von Qiagen verwendet. Zellyse und Isolierung der DNA wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.5.1.3 Isolierung von RNA aus *S. pyogenes*

Für die Isolierung von RNA aus *S. pyogenes* wurde das *Fast RNA Blue Kit* der Firma MP Biomedicals verwendet. Dazu wurden 30 ml der entsprechenden Kultur in der logarithmischen Phase durch Zentrifugation (Megafuge 1.0 R; Heraeus) 10 min bei 4.000 UpM sedimentiert und der Überstand verworfen. Die anschließende RNA-Präparation aus dem Zellpellet erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die RNA in 100 µl DEPC-(Diethylpyrocarbonat) H₂O eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm (Picodrop 2v.08, Biozym). Die Reinheit von Nukleinsäuren konnte ebenfalls photometrisch bestimmt werden. Bei proteinfreien, nukleinsäurehaltigen Lösungen sollte das Verhältnis von OD_{260 nm} und OD_{280 nm} zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.5.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.2.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktion der zu spaltenden DNA wurden die *FastDigest Enzymes* und die entsprechenden Puffer der Firma Thermo Scientific (USA) verwendet. Je nach DNA-Menge wurden die von dem Hersteller empfohlenen Units der Restriktionsenzyme eingesetzt sowie die optimale Temperatur für den Verdau ausgewählt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Hitze nach Angaben des Herstellers bzw. mittels *PCR-Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden).

2.5.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten und mit dem *PCR-Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, USA) in einem 20 µl

Reaktionsvolumen. Die einzusetzende DNA-Menge des linearisierten Vektors und des verdauten DNA-Fragments wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} \times \text{Insertgröße [Kb]}}{\text{Vektorgöße [Kb]}} \times 3 [\text{Verhältnis 1:3}] = \text{ng Insert}$$

Zu den zu ligierenden DNA-Fragmenten wurden 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (0,5 U pro 10 µl) gegeben und mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.5.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit *Taq*-DNA Polymerase (Mullis *et al.*; 1992)

Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) konnten spezifische Genabschnitte bzw. Gene direkt aus dem *S. pyogenes* Chromosom oder von Plasmiden amplifiziert werden.

Diese Methode diente zur Herstellung spezifischer DNA-Sonden für die Hybridisierung im *Northern Blot* (siehe 2.5.8). Durch die Zugabe von Digoxigenin-markierten Nukleotiden (DIG-ddUTP) wurde der neu synthetisierte DNA-Strang markiert. Alle für die PCR benötigten Reagenzien wurden von Qiagen (Hilden) bzw. von Promega (Madison; USA) bezogen. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in einem T3 Thermocycler von Biometra (Göttingen).

PCR-Ansatz:

DNA-Template	50 – 100 ng
Primer <i>forward</i> (10 µM)	2 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	2 µl
5x Q-Solution	10 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
DIG-ddUTP (250µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O dest	ad 50 µl

Der PCR-Ansatz inkubierte zunächst 5 min bei 98 °C im PCR-Thermoblock und anschließend erfolgten 30 Zyklen mit folgenden Schritten:

Denaturierung	98 °C	60 s
Primerhybridisierung	45-60 °C	15 s
Elongation	72 °C	30 s

Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgte eine zusätzlich Inkubation für 3 min bei 72 °C. Die Elongationszeit wurde je nach Größe der zu amplifizierenden Fragmente gewählt (1000 bp/min). Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde so ausgewählt, dass sie 4 °C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer lag. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde die *Toolbox* von *Primerfox* (<http://www.primerfox.com/>) verwendet. Die Ergebnisse der PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.5.6) überprüft.

2.5.2.4 PCR mit Phusion-*Taq* Polymerase

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Herstellung von Deletions- und Expressionsplasmiden wurde die Phusion-*Taq* Polymerase (Thermo Scientific, USA) aufgrund ihrer *proof-reading*-Funktion verwendet.

Die Zeiten und Temperaturen für Primerhybridisierung und Elongation wurden, wie unter 2.5.2.3 beschrieben, gewählt.

PCR-Ansatz:

DNA-Template	50 – 100 ng
Primer <i>forward</i> (10 µM)	2 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	2 µl
5x PCR-Puffer	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Phusion- <i>Taq</i> Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O dest	ad 50 µl

2.5.2.5 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Für die Überprüfung von RNA mittels PCR wurde an der einzelsträngigen RNA mittels einer retroviralen reversen Transkriptase (RT) eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA diente bei der anschließenden PCR als Matrize. Für die cDNA-Synthese wurde das *Synthesis Kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA* der Firma Fermentas verwendet. Die Herstellung der cDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.3 **Primer-Design**

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten oder die Herstellung von RNA-Sonden wurden entsprechende Primer benötigt. Das Primer-Design erfolgte mit der online verfügbare Software Primerfox (<http://www.primerfox.com/>).

Die in den Experimenten verwendeten Primer wurden von der Firma Eurogentec (Köln) bezogen. Die Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name	Orientierung	Sequenz 5` - 3` (<u>Restriktionsschnittstelle</u>)
<i>arcA_KO_F1</i>	<i>forward</i>	GTTA <u>AAGCTT</u> GTTGAGGGTCC
<i>arcA_KO_R1</i>	<i>reverse</i>	AAGAGATATCTCTTTCTAATTGG
<i>arcA_KO_F2</i>	<i>forward</i>	TAAGATATCGTAAAGGTGGTTAT
<i>arcA_KO_R2</i>	<i>reverse</i>	AAGGATCCATGAGGCACACC
<i>aad9_KO_F1</i>	<i>forward</i>	GCTT <u>GATATCC</u> GTTTCGTGAA
<i>aad9_KO_R1</i>	<i>reverse</i>	CCGATATCGATGAATATTTC
<i>arcA_EX_F</i>	<i>forward</i>	GTAATTGGATCCACTGCTCAAACACC
<i>arcA_EX_R</i>	<i>reverse</i>	CATAGCGTCGACAATATCTTCACGTT
<i>arcC_EX_F</i>	<i>forward</i>	GAGTAGGATCCACGAAACAAAAATCGTAG
<i>arcC_EX_R</i>	<i>reverse</i>	CCTCTGTCGACTCCTGCGATAATTTGTG
<i>crp_RNAs_F</i>	<i>forward</i>	TGTAGGGCAGATGGAATTCC
<i>crp_RNAs_R</i>	<i>reverse</i>	CCCTCAACTCATGTAACCTCG
<i>arcA_RNAs_F</i>	<i>forward</i>	TCTGAACTTCCAGAGATCCC
<i>arcA_RNAs_R</i>	<i>reverse</i>	CGTTGAGAAATACCAACCGC
<i>arcB_RNAs_F</i>	<i>forward</i>	TACAACAGCAGCCATTGACC
<i>arcB_RNAs_R</i>	<i>reverse</i>	GTCACAAGAAGGGAATTGGC
<i>arcC_RNAs_F</i>	<i>forward</i>	TGTGTTGCCATGACAGAAGG
<i>arcC_RNAs_R</i>	<i>reverse</i>	TGAAACTTGCACCAGACTCC
<i>aad9_RNAs_F</i>	<i>forward</i>	ATTCAGCAAGAAATGGTACC
<i>aad9_RNAs_R</i>	<i>reverse</i>	TCTAATGGAGAAGATTCAGC

KO: Knockout

EX: Expression

RNAs: RNA-Sonden

2.5.4 Plasmidschnellnachweis durch „Colony Fast Screen“

Mit Hilfe des „Colony-Fast-Screen“ Systems von Biozym (Oldendorf) konnten Plasmide in *E. coli* schnell nachgewiesen werden. Hierzu wurde Zellmaterial der zu untersuchenden *E. coli* Klone in 6 µl Epi-Blue suspendiert. Nach Zugabe von 16 µl Lysispuffer inkubierten die Ansätze im T3 Thermocycler (Biometra) für 10 min bei

70 °C. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.5.6).

2.5.5 Kolonie-PCR

Mit dieser Methode konnten Plasmide mit korrektem Insert in *E. coli* nachgewiesen werden. Hierfür wurde Zellmaterial einer Kolonie in 50 µl *A. dest* gelöst und 10 min bei 99 °C erhitzt. Anschließend wurde 1 µl der Suspension als Template für die PCR verwendet (siehe 2.5.2.3). Zur Überprüfung der Kolonie-PCR wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.5.6) durchgeführt.

2.5.6 Standard-Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese konnte eine präparative Auftrennung von negativ geladenen DNA-Fragmenten (durch die Phosphatreste in wässriger Lösung) vom negativen zum positiven Pol erfolgen. Je nach Größe der Fragmente variierte die Agarosekonzentration (LE GP Agarose, Biozym) in Elektrophorese-Puffer (1x TAE-Puffer) zwischen 0,8 und 1,5 % (w/v). Die DNA wurde mit 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und 40 min bei einer Spannung von 90 V in der Elektrophoresekammer von BioRad-Laboratories (München) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE-Puffer verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt. Die Färbezeit betrug 10 - 15 min. Anschließend wurde das Agarosegel mit der Geldokumentation von Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen) und der dazugehörigen Software (Intas GDS Application, Göttingen) unter UV-Licht bei 254 nm betrachtet und dokumentiert.

<u>TAE-Puffer (50x):</u>	Tris-Base (pH 7,5)	2 M
	Eisesssig	1 M
	EDTA	50 mM
<u>DNA-Probenpuffer (5x):</u>	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	D (+)-Saccharose	40 % (w/v)

2.5.7 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Für die Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen wurde eine Elektrophorese in einem Formaldehyd-haltigen (0,5 % w/v) Agarosegel durchgeführt. Zur Herstellung des 1%igen Gels wurden 1,1 g Agarose (LE GP Agarose, Biozym) in 106,4 ml Wasser und 12 ml 10x Laufpuffer durch Kochen gelöst. Nach dem Abkühlen

auf ca. 45 °C erfolgte eine Zugabe von 2,16 ml einer 37%igen Formaldehydlösung (J.T.Baker, Deventer). Zur Probenvorbereitung wurden 0,5 – 10 µg RNA mit 2 µl Auftragspuffer versetzt, der Ansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer für 90 min bei 80 V. Die Elektrophoresekammer der Firma BioRad-Laboratories (München) wurde vor Benutzung mit 70%igem Ethanol dekontaminiert. Die Färbung und Dokumentation wurde wie in Abschnitt 2.5.6. beschrieben durchgeführt.

<u>Laufpuffer (10x):</u>	MOPS	41,8 g
	Natriumacetat	4,1 g
	EDTA	307 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml

<u>Auftragspuffer:</u>	Bromphenolblau	0,2 g
	10x Laufpuffer	25 ml
	Glycerin (87 %)	25 ml
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	10 µl

frisch zu 600 µl Auftragspuffer geben:

Formaldehyd (37 %)	72 µl
Formamid	328 µl

2.5.8 Northern Hybridisierung

2.5.8.1 Northern Blot

Die Auftrennung der RNA von *S. pyogenes* wurde wie unter 2.5.7 beschrieben durchgeführt. Anschließend inkubierten die Gele zur partiellen Hydrolyse der RNA für 5 min in 50 mM NaOH unter leichtem Schütteln. Nach 5 min Neutralisation mit 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) wurde die RNA durch einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran Biodyn der Firma Pall Corporation (USA) übertragen. Der Transfer erfolgte mittels Whatman Chromatographiepapier (BioRad-Laboratories) und 10x SSC (1,5 M NaCl; 0,5 M Na-Citrat; pH 7,0) für ca. 16 h bei RT. Anschließend wurde die RNA durch einminütige Bestrahlung mit UV-Licht (120 Jules; 245nm) durch den Transilluminator GS Gene Linker (BioRad-Laboratories) mit der Nylonmembran vernetzt.

Alle für den Kapillarblot benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt) bzw. von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.5.8.2 Hybridisierung

Die Prähybridisierung der Nylonmembran mit fixierter RNA erfolgte unter Verwendung von 20 ml des Hybridisierungspuffers Dig Easy Hyb (Roche Diagnostics GmbH) bei

42 °C unter leichtem Rotieren der Hybridisierungsröhrchen. Anschließend wurden ca. 30 ng/ml der denaturierten DIG-markierten Sonden (siehe Abschnitt 2.5.2.3) zusammen mit 20 ml Hybridisierungspuffer auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter leichtem Rotieren im Hybridisierungsofen OV3 (Biometra) bei einer Temperatur, die 4 °C unter den entsprechenden Schmelztemperaturen der Sonden lag.

2.5.8.3 Detektion

Die Detektion beruhte auf der Bindung von an Alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpern (Roche, Mannheim) an die DIG-markierten Sonden. Die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star von Roche (Mannheim). Das dabei emittierende Licht kann durch einen Röntgenfilm nachgewiesen werden.

Nach der Hybridisierung inkubierte die Membran zweimal für 5 min bei RT in Puffer 1 und anschließend zweimal 5 min bei 68 °C in Puffer 2. Nach einminütigem Äquilibrieren in Puffer 3 wurde die Membran für 30 min in Puffer 4 (Blockierungsreagenz) geschwenkt, um unspezifische Bindungen der Antikörperkonjugate zu vermindern. Danach erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit der Antikörperlösung (4 µl Anti-Dig-Ap-Konjugat in 20 ml Puffer 3). Nach zweimaligem Waschen (je 15 min) der Membran mit Puffer 5 und kurzer Äquilibrierung in Puffer 6 erfolgte die Inkubation in der Substratlösung CDP-Star in Puffer 6 für 5 min. Anschließend wurde die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt und für 60 min auf einen Röntgenfilm (Agfa, Belgien) aufgelegt. Das Chemilumineszenzsignal wurde mittels Filmentwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa, Belgien) detektiert.

<u>Puffer 1:</u>	SSC	2x
	Natriumlaurylsulfat	0,1 %
<u>Puffer 2:</u>	SSC	0,1x
	Natriumlaurylsulfat	0,1 %
<u>Puffer 3:</u>	Puffer 5	
	Tween 20	0,3 %
<u>Puffer 4:</u>	Puffer 5	
	Blockingreagenz	10 %
<u>Puffer 5 (5 pH 7,5):</u>	Maleinsäure	0,1 M
	Natriumchlorid	0,15 M

<u>Puffer 6 (pH 9,5):</u>	Natriumchlorid	0,1 M
	Magnesiumchlorid	0,05 M
	Tris-HCl	0,1 M

2.6 Zellaufschluss und DNA-Transfer

2.6.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983, modifiziert)

Um bei *E. coli* DH5 α die Fähigkeit zu erzeugen, Plasmid-DNA aufzunehmen, wurden die Zellen einer CaCl₂-Behandlung unterzogen. Dafür wurde eine 5 ml Übernachtskultur aerob bei 37 °C und 180 UpM angezogen. Von dieser Kultur wurde eine 100 ml LB-Medium Flüssigkultur mit einer OD_{540 nm} von 0,05 angesetzt und bis zu einer OD_{540 nm} von 0,8 bei 37 °C und 180 UpM aerob kultiviert. Anschließend erfolgte ein 5-minütiges Abkühlen der Kultur auf Eis und ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 10 min und 4.000 UpM. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20 ml Lösung 1 suspendiert und erneut zentrifugiert (4.000 UpM; 10 min; 4 °C). Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 20 ml Lösung 2 gelöst und auf Eis gelagert. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.000 UpM; 10 min; 4 °C) geerntet und das Pellet in 5 ml Lösung 2 und 1,3 ml 87%igem Glycerin (Merck KgaA, Darmstadt) suspendiert. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt für die Transformation (siehe 2.6.2) eingesetzt oder in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>Lösung 1:</u>	MOPS (pH 7,0)	10 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM

<u>Lösung 2:</u>	MOPS (pH 7,0)	100 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Calciumchlorid	50 mM

Beide Lösungen wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.6.2 DNA-Transfer in *E. coli* DH5 α

Die Transformation von *E. coli* DH5 α mit rekombinanten Plasmiden erfolgte durch Hitzeschock. Dazu wurden 100 μ l der kompetenten *E. coli* Zellen (siehe 2.6.1) auf Eis aufgetaut und mit 0,25 – 1 μ g Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 30-minütigen Lagerung auf Eis wurden die Zellen für 45 s bei 42,5 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 300 μ l LB-Medium erfolgte die Regeneration der transformierten Zellen für 60 min bei 37 °C und 300 UpM

(Thermomixer Comfort; Eppendorf; Hamburg). Von den Ansätzen wurden 50 bis 150 µl auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus, Hamburg) inkubiert.

2.6.3 Herstellung kompetenter *S. pyogenes* Zellen (Caparon and Scott, 1991)

S. pyogenes wurde aus einem Glyzerinstock mit einer sterilen Impföse auf einer THY-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine Einzelkolonie diente als Inokulum für eine weitere Übernachtskultur (37 °C; 5 % CO₂) in 5 ml THY-Medium mit 10 mM Glycin. Anschließend wurden 2 ml der Übernachtskultur in 40 ml THY-Medium mit 10 mM Glycin, 0,125 M Saccharose und Mutanolysin (40 U/ml) überführt und für 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation (4.000 UpM; 10 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 5 ml 0,625 M Saccharose und anschließend zweimal mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml 0,625 M Saccharose aufgenommen, in 200 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.4 DNA-Transfer in *S. pyogenes*

200 µl kompetente *S. pyogenes* Zellen (siehe 2.6.3) und 0,2 - 1,0 µg Plasmid-DNA wurden in Elektroporationsküvetten (2-mm Gap; peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) überführt und bei 1,75 kV, 481 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstante von 12 ms im EasyjecT-plus (peqLab Biotechnologie GmbH) elektroporiert. Direkt nach dem Impuls wurde 1 ml THY-Medium zugegeben und die Zellen inkubierten 3 – 5 h bei 37 °C. Anschließend wurden 50 – 200 µl des Ansatzes auf THY-Platten mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen (siehe 2.2.4) ausplattiert. Die darauffolgende Kultivierung erfolgte anaerob in Anaerocult Gefäßen von Merck (Darmstadt) bei 37 °C für 3 – 5 Tage.

2.6.5 Zellaufschluss

Die mechanische Zerstörung sowohl der *E. coli* Zellen als auch der *S. pyogenes* Zellen wurde mit dem Homogenisator Ribolyser precellys 24 (PEQLAB Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Für die Zellyse wurden die Kulturen durch einen Zentrifugationsschritt (4.000 UpM; 10 min; 4 °C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Je nach Experiment (RNA-Isolierung oder heterologe Proteinexpression) wurde das Zellpellet in dem entsprechenden Puffer suspendiert und in Ribolyser Tubes von Hybaid (England) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei maximaler Beschleunigung (6,0 m/s²) zweimal 30 s mechanisch lysiert. Zwischen den zellaufschließenden Vorgängen wurden die Ribolyser Tubes für 2 min auf Eis gekühlt. Die

Lysate wurden entweder für die RNA-Isolierung (siehe 2.5.1.3) oder für die Aufreinigung von rekombinantem Protein (siehe 2.7.1.3) verwendet.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* DH5 α

2.7.1.1 Anzucht und Induktion in *E. coli* DH5 α

Der rekombinante *E. coli* Stamm wurde in 25 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 UpM aerob kultiviert. Die Übernachtskultur diente zur Einstellung von 500 ml Zellsuspension in LB-Medium auf eine OD_{540 nm} von 0,05. Diese Kultur wurde bis zu einer OD_{540 nm} von 0,4 - 0,6 angezogen. Ein 1 ml Aliquot der Kultur wurde entnommen und sedimentiert (13.000 UpM; 1 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5x SDS-PAGE Probenpuffer (siehe 2.7.2) gelöst. Anschließend erfolgte die Induktion der Kultur durch Zusatz von Anhydrotetracyclin (0,2 µg/ml). Die Kultivierung wurde bei 180 UpM und 22 °C über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurde wiederum ein 1 ml Aliquot entnommen, zentrifugiert (13.000 UpM; 1 min) und das Zellpellet in 5x SDS-PAGE Probenpuffer suspendiert. Der Rest der Kultur wurde ebenfalls komplett zentrifugiert (4.000 UpM; 10 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet und die entnommenen Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.1.2 Expressionskontrolle

Die eingefrorenen 1 ml Aliquots (siehe 2.7.1.1) vor und nach Anhydrotetracyclin Induktion wurden für 10 min bei 99 °C in dem Thermomixer Comfort (Eppendorf; Hamburg) erhitzt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (siehe 2.7.2) kontrolliert. Konnte eine induzierte Proteinexpression nachgewiesen werden, wurde das Protein aus den eingefrorenen Zellpellets (siehe 2.7.1.1) gewonnen.

2.7.1.3 Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Streptactin-Sepharose

Für die Reinigung von rekombinanten *Strep-tagII*-Fusionsproteinen wurde die *Strep-tag II* Technologie der Firma IBA GmbH (Göttingen) verwendet. Die für die heterologe Proteinexpression konstruierten Plasmide der pASK-IBA Serie sind im Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Die Reinigung erfolgte mittels *Streptactin*-Sepharose und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden 10 %ige SDS-Gele angefertigt. Die Komponenten für das Sammel- und Trenngel sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele (Angaben für 2 Gele)

Komponenten	SDS-Trenngel (10 %)	SDS-Sammelgel (4 %)
Lösung 1	2,5 ml	-
Lösung 2	-	630 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
Rotiphorese Gel30 (Roth)	3,3 ml	1 ml
Glycerin	1,0 ml	-
TEMED*	10 µl	10 µl
10 % APS*	100 µl	40 µl
H₂O dest.	ad 10 ml	ad 5 ml

* Diese Bestandteile wurden zuletzt hinzugegeben.

<u>Lösung 1 (pH 8,8):</u>	Tris-HCl	1,5 M
	Natriumlaurylsulfat	0,4 %

<u>Lösung 2 (pH 6,8):</u>	Tris-HCl	0,5 M
	Natriumlaurylsulfat	0,4 %

Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt und vor dem Auftragen für 10 min bei 99 °C im Thermomixer Comfort (Eppendorf; Hamburg) erhitzt. Die SDS-PAGE wurde in den Gelelektrophoresekammern von Bio-Rad (München) in 1x SDS-Laufpuffer bei RT durchgeführt. Zunächst erfolgte die Auftrennung im Sammelgel für 30 min bei 80 V und dann die Auftrennung im Trenngel bei 100 V. Die SDS-PAGE wurde beendet, wenn die Lauffront das Gelende erreicht hatte. Anschließend wurden die SDS-Gele mit Coomassieblau (2.7.3) gefärbt (siehe 2.7.4) oder für einen *Western Blot* (2.7.4) weitergenutzt.

<u>1x SDS-Laufpuffer :</u>	Trizma (pH 8,3)	50 mM
	Natriumlaurylsulfat	0,2 %
	Glycin	500 mM

<u>5x SDS-Probenpuffer:</u>	Glyzerin	40 %
	Natriumlaurylsulfat	20 %
	Tris-HCl (pH 6,8)	0,25 M
	Bromphenolblau	0,05 %
	Beta-Mercaptoethanol	2,0 %

2.7.3 Colloidal Coomassie Färbung

Die Polyacrylamidgele wurden zunächst für 60 min in der Fixierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung gegen die *Colloidal Coomassie*-Färbelösung ausgetauscht und die SDS-Gele wurden unter leichtem Schwenken gefärbt. Nach 16 h erfolgte die Entfernung des unspezifisch gebundenen Farbstoffes durch Inkubation in H₂O dest. und die Proteinbanden wurden sichtbar.

<u>Fixierlösung:</u>	Eisesssig	10 %
	Ethanol	50 %
	H ₂ O dest.	40 %
<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	Lösung A	800 ml
	Methanol	200 ml
<u>Lösung A:</u>	konz. Phosphorsäure	20 g
	Ammoniumsulfat	100 g
	Coomassie Blue R-250	1 g
	H ₂ O dest	ad 1000 ml

2.7.4 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurde das Polyacrylamidgel mittels *Western Blot* auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dazu erfolgte zunächst eine Äquilibration des Geles für 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol). Das Whatman Chromatographiepapier wurde ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet. Zeitgleich wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und zur Aktivierung der Membran für 1 min in Methanol inkubiert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte unter Verwendung der Transferkammer Trans-Blot SD von BioRad-Laboratories (München). Von der Kathode zur Anode wurden folgende Schichten luftblasenfrei aufgebaut:

<u>Kathode:</u>	2 x Whatman Chromatographiepapier
	Polyacrylamidgel
	PVDF-Membran
<u>Anode:</u>	2 x Whatman Chromatographiepapier

Der Transfer erfolgte bei RT für 35 min bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA.

2.7.4.1 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran nach dem Transfer (siehe 2.7.4) für 1 h in Blockierungslösung (1:10 verdünnte Magermilch in 1x PBS) inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran in einer 1:4.000 in 1x PBS verdünnten *Strep-Tactin* AP Konjugat-Lösung (IBA GmbH; Göttingen) unter leichtem Schwenken bei RT. Die *Strep-Tactin* AP Konjugate konnten nur an die auf die Membran transferierten *Strep-tagII*-Fusionsproteine binden. Zur Entfernung der ungebundenen AP Konjugate wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 10 ml NBT/BCIP-Fertiglösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) und 10 min Inkubation im Dunkeln konnten die Proteine durch die blaue Farbe des durch die alkalische Phosphatase umgesetzten NBT/BCIP direkt auf der Membran nachgewiesen werden.

<u>1x PBS (pH 7,4):</u>	NaCl	187 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	NaH ₂ PO ₄	8,1 mM

2.7.5 **Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration kam der *Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit* von Thermo Scientific (USA) zum Einsatz. Zu 25 µl der Probe wurde 1 ml Bradford-Reagenz gegeben und nach einem Zeitraum von 10 min wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert (Puffer der Probe) an einem SmartSpecTM Plus Spektralphotometer (BioRad-Laboratories) gemessen. Betrug die OD_{595nm} > 0,5 wurde die Probe entsprechend verdünnt. Die Proteinkonzentration konnte anhand einer mit BSA (0 – 1,0 mg) erstellten Eichgerade berechnet werden.

2.7.6 **Entsalzen und Einengen von Proteinen**

2.7.6.1 Dialyse

Zum Entsalzen von Proteinlösungen wurden Visking-Dialysierschläuche (Serva) mit mittlerem Porenradius von 24 Å verwendet. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren und zweimaligem Wechsel des Puffers (PBS). Die niedermolekularen Verbindungen und Ionen konnten durch die Membran diffundieren, während die Proteine zurückgehalten wurden. Für das Entsalzen von ca. 2,5 ml Proteinlösung wurden zweimal 400 ml PBS verwendet.

2.7.6.2 Centricon-Konzentratoren

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen kamen Centricon-Ultrazentrifugationseinheiten der Firma Amicon (USA) mit der Ausschlussgröße 50.000 Da zum Einsatz. Das Einengen der Proteine wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8 Messung von Enzymaktivitäten

Die photometrischen Messungen wurden an dem SmartSpecTM Plus Spektralphotometer der Firma BioRad-Laboratories in 1 cm Küvetten (Sarstedt) durchgeführt. Die Bestimmung der Arginin Deiminase – und der Carbamat Kinase Aktivität erfolgte mit Hilfe des *Ammonia Assay Kit* der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim). Das durch die Arginin Deiminase bzw. durch die Carbamat Kinase gebildete Ammonium reagierte mit α -Ketoglutarat und reduziertem NADPH in Anwesenheit der Glutamat Dehydrogenase (GDH) zu Glutamat und oxidiertem NADP⁺ (Abbildung 7). Die Abnahme der Absorption bei 340 nm, durch die Oxidation des NADPHs, war proportional zu dem gebildeten Ammonium.

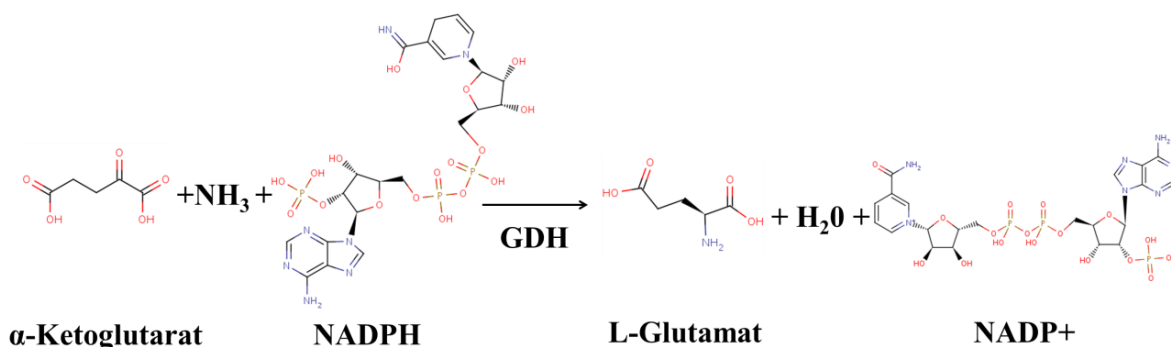


Abbildung 7: Reaktion der Glutamat Dehydrogenase (E.C.:1.4.1.3)

(<http://www.brenda-enzymes.org/>)

2.8.1 Bestimmung der Arginin Deiminase Aktivität (Hering *et al.*, 2013)

Die Bestimmung der Aktivität der rekombinanten Arginin Deiminase erfolgte in einem Gesamtvolumen von 250 μl bei 37 °C in einem Zeitraum von 30 min. Anschließend wurden 100 μl des Reaktionsansatzes zu 1 ml des *Ammonia Assay Kits* gegeben. Die nachgeschaltete Reaktion (siehe 2.8) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Gemessen wurde die Abnahme von NADPH bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) über einen Zeitraum von 5 min. Als Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Arginin mitgeführt. Alle für die Reaktionen benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bzw. Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Reaktionsansatz

Substanz	Stocklösung	Volumen	Endkonzentration
MES/KOH (pH 6,5)	0,5 M	50 µl	100 mM
MgCl ₂	25 mM	50 µl	5 mM
L-Arginin	10 mM	50 µl	2 mM
H ₂ O dest		50 µl	
rekombinantes Enzym		50 µl	
Gesamtvolumen		250 µl	

2.8.2 Bestimmung der Carbamat Kinase Aktivität (Hering *et al.*, 2013)

Das Prinzip der Aktivitätsmessung beruht ebenfalls auf der Bildung von Ammonium. Die enzymatische Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 250 µl bei 37 °C. Nach 30 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 ml des *Ammonia Assay Kits* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zu 100 µl des Reaktionsansatzes. In der gekoppelten Reaktion mit der Glutamat Dehydrogenase erfolgte die Oxidation von NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) und damit verbundene Abnahme der Absorption bei 340 nm (siehe 2.8). Die photometrische Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5 min.

Reaktionsansatz

Substanz	Stocklösung	Volumen	Endkonzentration
MES/KOH (pH 6,5)	0,5 M	50 µl	100 mM
MgCl ₂	25 mM	50 µl	5 mM
Carbamoylphosphat	5 mM	50 µl	1 mM
ADP	5 mM	50 µl	1 mM
rekombinantes Enzym		50 µl	
Gesamtvolumen		250 µl	

Als Kontrolle wurden Reaktionsansätze ohne Carbamoylphosphat bzw. ADP mitgeführt. Die Chemikalien für die Reaktionen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bzw. Carl Roth GmbH (Karlsruhe) erworben.

2.9 *In vitro*-Zytotoxizitätstest mittels Kristallviolett-Assay

Für die schnelle und kostengünstige Untersuchung der antiproliferativen Wirkung der rekombinanten Arginine Deiminase auf Arginin-auxotrophe Tumorzellen wurde der *In vitro*-Zytotoxizitätstest Kristallviolett-Assay verwendet.

Dieser Test beruht auf einem kolorimetrischen Verfahren, welches erstmals in Gillies *et al.* (1986) beschrieben wurde. Bei diesem Nachweis handelt es sich um einen Zellkulturtest, bei dem die antiproliferative Wirkung über die veränderte Zellmasse bestimmt wird. Lebensfähige Zellen nehmen den Kristallviolettfarbstoff auf, Proteine innerhalb der Zellen werden angefärbt und die Anzahl gefärbter Zellen einer Monolayerschicht kann mittels Spektralphotometer bestimmt werden.

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurden 1×10^5 Zellen in 200 μ l Medium in einer 96-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät und anschließend in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Für jede der zu untersuchenden Zelllinien wurden drei technische Replikate angefertigt. Für die Untersuchung der antiproliferationshemmenden Wirkung der AD wurden verschiedene AD-Konzentrationen zugegeben. Die Endkonzentration an AD pro *well* betrug zwischen 0,415 und 41,5 mU/ml. Als Kontrolle wurden mit PBS behandelte Zellen mitgeführt. Die Messungen erfolgten nach 72 h bzw. nach 144 h in den Kombinationsversuchen von Zytostatika und AD. Nach den oben genannten Inkubationszeiten wurden die Überstände abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Vitalfärbung mit einer 0,1%igen Kristallviolettlösung. Im Anschluss wurde der Überstand entnommen und die Zellen dreimal mit *A. dest* gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 1 % SDS und eine 15-minütige Inkubation. Anschließend wurde der Überstand entnommen, entsprechend verdünnt und mittels Spektralphotometer bei 570 nm analysiert.

Mit Hilfe des Kristallviolett-Assays kann nun eine semi-quantitative Aussage über die Vitalität einer *in vitro* Kultur getroffen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Tumorzelllinien sind in Abschnitt 2.1.2 zusammengefasst. Die Messungen wurden durch Dr. Ulrike Klier am Institut für Allgemeine Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie in der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie (Universitätsmedizin Rostock) durchgeführt.

<u>Kristallviolettlösung:</u>	Kristallviolett	2 g
	Formalin (37 %)	100 ml
	Ethanol (96 %)	200 ml
	2 M Tris-Base	5 ml
	CaCl ₂	10 g
	H ₂ O dest	ad 2000 ml

2.10 Versuche zum bakteriellen Überleben

2.10.1 Bakteriellcs Überleben in saurer Umgebung

Zur Untersuchung der Fähigkeit der *S. pyogenes* Stämme unter sauren Umgebungsbedingungen zu überdauern, wurde die Methode nach Degnan *et al.*, 2000 durchgeführt. Dafür wurden 10 ml THY-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (4.000 UpM; 10 min; 4 °C) und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in Puffer S (20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; 25 mM Arginin-HCl; pH 4,0) suspendiert und erneut zentrifugiert (4.000 UpM; 10 min; 4 °C). Nach dem Waschen wurde die Bakteriensuspension auf eine OD_{600 nm} von 0,1 mit Puffer S eingestellt.

100 µl wurden aus dem Bakteriengemisch entnommen und zur Bestimmung des Lebendkeimzahl in geeigneten Verdünnungsstufen auf THY-Agarplatten ausplattiert. Die restliche Zellsuspension inkubierte bis zu vier Stunden bei 37 °C in dem sauren Puffer. Nach zwei bzw. vier Stunden wurden erneut Proben entnommen und in einer Verdünnungsreihe auf THY-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 16 Stunden konnten die Kolonien ausgezählt werden und das bakterielle Überleben nach zwei bzw. vier Stunden wurde als prozentuale Angabe im Vergleich zur Ausgangszellzahl bestimmt.

2.10.2 Bakteriellcs Wachstum in humanem Vollblut (Nakata *et al.*, 2009b, mod.)

Zur Untersuchung des Wachstums von *S. pyogenes* in humanem Vollblut wurden zunächst die zu testenden *S. pyogenes* Stämme in 10 ml THY-Medium über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Übernackkultur diente zur Einstellung der OD_{600 nm} auf 0,05 einer frischen Hauptkultur. Nach dem Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600 nm} = 0,25) wurden 100 µl der Kultur entnommen und 1:10.000 in 1x PBS verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl der eingestellten Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und auf THY-Agarplatten ausplattiert. 20 µl der Bakteriensuspension wurden zu 480 µl heparinisiertem Blut gegeben und für 3 h bei 37 °C unter Rotation im Thermomixer Comfort (Eppendorf; Hamburg) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Blut/Bakterien-Gemisch entsprechend verdünnt und auf THY-Agarplatten ausplattiert. Nach der Kultivierung der Agarplatten (16 h; 37 °C; 5 % CO₂) wurden die Kolonien ausgezählt und anhand des Verhältnisses zwischen den Koloniebildenden Einheiten (KbE) der Kontrollplatten und den KbE nach der Blutinkubation konnte der Multiplikationsfaktor als Maß für das bakterielle Wachstum bestimmt werden.

2.10.3 Phagozytose-Assay mit J774 Zellen (Hampton *et al.*, 1999, mod.)

J774-Zellen, eine murine Makrophagen-Zelllinie, wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm², Greiner Bio-Zone) in 25 ml Medium (DMEM, 10 % (v/v) FKS) bei 37 °C und 5 % CO₂. Für weitere Kultivierungen bzw. für das Passagieren wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und somit von dem Flaschenboden abgelöst. Die Zellzahl wurde mittels Bürker-Zählkammer bestimmt und auf eine für den Versuch relevante Zellzahl (1 x 10⁷ Zellen/ml) eingestellt.

Für den Phagozytose-Assay wurden zunächst die zu untersuchenden *S. pyogenes* Stämme in 10 ml THY-Medium über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurden 0,5 ml der Übernachtskulturen zu 9,5 ml frischem THY-Medium gegeben und die Kultivierung (37 °C; 5 % CO₂) wurde bis zum Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600 nm} = 0,3) fortgesetzt. Nach der darauffolgenden Zentrifugation (4.000 UpM; 10 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 5 ml HBSS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in HBSS gelöst und auf eine OD_{600 nm} von 1,0 eingestellt. 54 µl dieser Bakteriensuspension wurden zu 846 µl HBSS (*hanks balanced salt solution*) gegeben (Endkonzentration 10⁷ Bakterien/ml). Als nächster Schritt erfolgte eine 20-minütige Oponierung der Bakteriensuspension durch Zugabe von 100 µl Serum bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Thermomixer Comfort (Eppendorf; Hamburg). Zu 250 µl opsonierten Bakterien wurden 25 µl Serum und 225 µl J774-Zellen (10⁷ Zellen/ml) gegeben. Für den Kontrollwert wurde anstatt der J774-Zellen 225 µl DMEM hinzugegeben. Die beiden Ansätze inkubierten für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Thermomixer Comfort.

Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 500 µl eiskaltem 1x PBS und die Ansätze wurden für fünf min bei 4 °C und 2.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand des J774-Zellen/Bakterienansatzes wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach zweimaligem Wiederholen des Waschvorganges (2.000 UpM; 5 min; 4 °C) mit je 1 ml PBS wurde der Überstand des J774-Zellen/Bakterienansatzes in dem gleichen Eppendorf-Gefäß gesammelt (extrazelluläre Bakterien). Für die eukaryotische Zelllyse wurde das Zellpellet anschließend in 1 ml PBS suspendiert und 20 µl Saponin einer 25 µl/ml Stocklösung dazugegeben (intrazelluläre Bakterien). Das Eppendorf-Gefäß mit den gesammelten extrazellulären Bakterien und der Kontrollansatz wurden in der Kühlzentrifuge Kendro (Heraeus) sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets jeweils in 1 ml PBS gelöst. Sowohl für die Kontrolle als auch für die intrazellulären und extrazellulären Bakterien wurden entsprechende Verdünnungsreihen angefertigt und auf THY-Agarplatten ausplattiert. Nach der Kultivierung über Nacht (37 °C; 5 % CO₂) wurden die Kolonien ausgezählt und die Absterberate berechnet.

<u>HBSS:</u>	Lösung 1	10,0 ml
	Lösung 2	1,0 ml
	130 mM MgCl ₂	1,0 ml
	230 mM MgSO ₄	1,0 ml
	80 mM NaHCO ₃	5,0 ml
	H ₂ O dest	ad 100 ml
<u>Lösung 1:</u>	NaCl	8,0 g
	KCl	0,4 g
	Glukose	1,0 g
	H ₂ O dest	ad 100 ml
<u>Lösung 2:</u>	Na ₂ HPO ₄	0,358 g
	KH ₂ PO ₄	0,6 g
	H ₂ O dest	ad 100 ml

2.11 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Carl-Roth GmbH (Karlsruhe), Oxoid Ltd. (Basingstoke, GB), Merck KgaA (Darmstadt), Fluka Chemie AG (Buchs), J.T.Baker (Deventer, NL), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA) bezogen.

2.12 Statistische Analysen

Für die Berechnungen von Signifikanzen mittels Mann-Whitney U Test wurde die freiverfügbare Onlinesoftware (<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung einer *arcA*-Deletionsmutante von *S. pyogenes* M49

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine *arcA*-Deletionsmutante von *S. pyogenes* M49 zu konstruieren und zu charakterisieren. Dafür wurde das entsprechende *arcA*-Gen auf dem *S. pyogenes*-Chromosom durch homologe Rekombination mit Hilfe eines zuvor konstruierten Plasmides (siehe 3.1.1) ausgeschaltet.

3.1.1 Konstruktion des *arcA*-Deletionsplasmides pASK_IBA3C_ArcA

Für die Konstruktion von pASK_IBA3C_ArcA wurden die 5'- und 3'- flankierenden Regionen von *arcA* unter Verwendung der spezifischen Primer (siehe 2.5.3) mittels PCR aus der chromosomalen DNA von *S. pyogenes* amplifiziert, gereinigt und mit EcoRV endonukleolytisch gespalten. Die verdauten flankierenden Regionen wurden ligiert und das Ligationsprodukt diente als Template für eine PCR mit dem *forward* Primer der 5'-flankierenden Region und dem *reverse* Primer der 3'-flankierenden Region (siehe 2.5.3). Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit BamHI und HindIII verdaut und in den mit gleichen Enzymen verdauten pASK_IBA3C Vektor ligiert. Der konstruierte Vektor wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und der Transformationsansatz auf Selektivagar mit Chloramphenicol ausplattiert. Aus den positiven Transformanten wurde das Plasmid isoliert und mit EcoRV gespalten. Zuletzt wurde der lineare Vektor mit einer Spectinomycinkassette (*aad9*) ligiert, welche durch eine PCR mit *aad9*-spezifischen Primern (siehe 2.5.3) von dem Plasmid pFW5 amplifiziert, gereinigt und mit EcoRV gespalten wurde. Das fertige Konstrukt wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Selektivagar mit Chloramphenicol und Spectinomycin ausplattiert. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR getestet. Aus den positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und eine Testrestriktion durchgeführt.

In Abbildung 8 ist die Kontrollrestriktion von pASK_IBA3C_ArcA dargestellt. Durch die Spaltung mit BamHI (Spur 2) und HindIII (Spur 3) wurde der Vektor linearisiert und lief auf einer Höhe von 5,4 kb. In Spur 4 wurde mit BamHI und HindIII das komplette einligierte Deletionsfragment, bestehend aus den flankierenden Regionen des *arcA*-Gens und der Spectinomycinkassette, herausgeschnitten. Die obere Bande zeigt den linearisierten Vektor pASK_IBA3C bei 3,2 kb und die untere Bande das Deletionsfragment bei 2,4 kb. Spur 5 zeigt die Kontrollrestriktion mit EcoRV. Die obere Bande bei 4,2 kb stellt den linearisierten Vektor pASK_IBA3C mit den beiden flankierenden Regionen dar, und die untere Bande das inklonierte PCR-Produkt von *aad9* bei 1,1 kb.

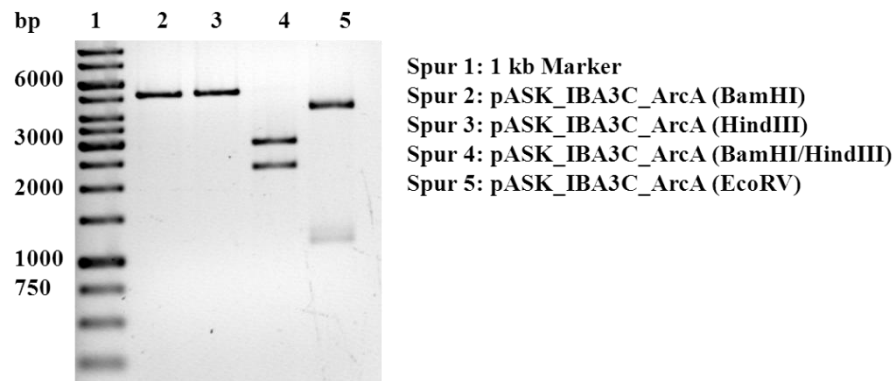


Abbildung 8: Kontrollrestriktion von pASK_IBA3C_ArcA. (1%iges Agarosegel)

3.1.2 Deletion von *arcA* in *S. pyogenes* M49

Das Deletionsplasmid pASK_IBA3C_ArcA war die Grundlage für die Herstellung der *arcA*-Deletionsmutante ($\Delta arcA$). Dafür wurde 1 mg des Plasmides in kompetente *S. pyogenes* Zellen elektroporiert (siehe Abschnitt 2.6.4) und der Elektroporationsansatz auf Selektivagar mit Spectinomycin ausplattiert. Das Plasmid pASK_IBA3C_ArcA wird in *S. pyogenes* nicht repliziert (*suicide*-Vektor), da der Vektor nur einen Replikationsursprung für *E. coli* besitzt. Somit konnten nur diejenigen Zellen unter Spectinomycin-Selektion überleben, in denen die *aad9*-Resistenzkassette über *single-cross-over* oder *double-cross-over* Ereignisse ins Chromosom integriert wurde. In Abbildung 9 ist der Austausch des *arcA*-Genes gegen das *aad9*-Resistenzgen durch homologe Rekombination schematisch dargestellt.

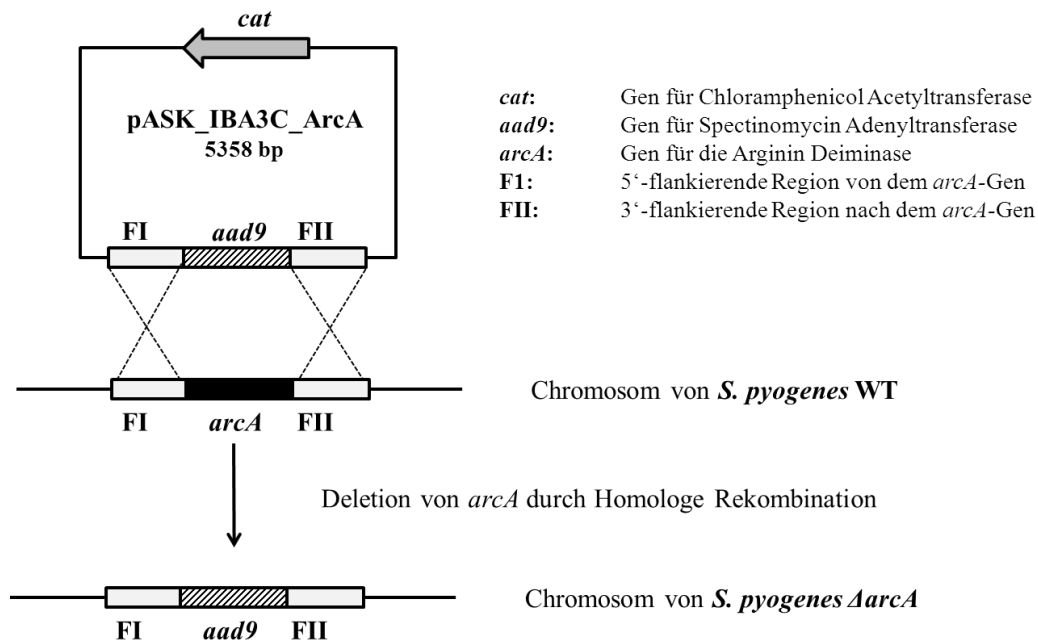


Abbildung 9: Schema der homologen Rekombination zwischen dem *S. pyogenes* Chromosom und dem Plasmid pASK_IBA3C_ArcA. Durch gezielte Mutagenese wurde das *arcA*-Gen gegen das *aad9*-Resistenzgen ausgetauscht.

Die Überprüfung der auf THYspec gewachsenen Kolonien auf Deletion von *arcA* erfolgte auf DNA- und Transkriptionsebene.

3.1.2.1 Nachweis der *arcA*-Deletion auf chromosomaler Ebene

Zur Bestätigung der *arcA*-Deletion auf chromosomaler Ebene wurde die DNA der potentiellen Mutante und als Kontrolle die DNA des Wildtyps isoliert und mit verschiedenen Primerkombinationen (siehe Abschnitt 2.5.3) mittels PCR getestet.

In Abbildung 10 A ist zu erkennen, dass mit den *aad9*-spezifischen Primern nur ein PCR-Produkt von 1,1 kb in der Δ *arcA*-Mutante (Spur 3) amplifiziert wurde. Dieses Fragment wurde im Wildtyp nicht nachgewiesen (Spur 2). Folglich wurde das Spectinomycinresistenzgen in das Chromosom der Mutante integriert. Abbildung 10 B zeigt, dass das *arcA*-Gen in der Mutante deletiert wurde, da mit den *arcA*-spezifischen Primern nur für den Wildtyp (Spur 2) ein PCR-Produkt von 1,2 kb nachgewiesen werden konnte. Bei der Mutante konnten die Primer aufgrund des fehlenden *arcA*-Gens nicht binden (Spur 3). In Abbildung 10 C wurden die PCR-Produkte aufgetragen, die mit den Primern außerhalb der flankierenden Regionen amplifiziert wurden. Da das *aad9*-Gen ca. 0,1 kb kleiner ist als das *arcA*-Gen, konnte der Unterschied der PCR-Produkte von Wildtyp (2,4 kb, Spur 2) und Mutante (2,3 kb, Spur 3) im Gelbild nachgewiesen werden. In Abbildung 10 D wurde die Integration des *aad9*-Gens ins Chromosom der Mutante ebenfalls bestätigt. Mit der Kombination aus dem *aad9*-spezifischen *forward* Primer und den *reverse* Primer der 5'-flankierenden Region

des *arcA*-Gens konnte nur bei der Mutante (Spur 3) ein 1,7 kb PCR-Fragment amplifiziert werden. Beim Wildtyp in Spur 2 konnten die Primer wegen des fehlenden *aad9*-Gens nicht binden.

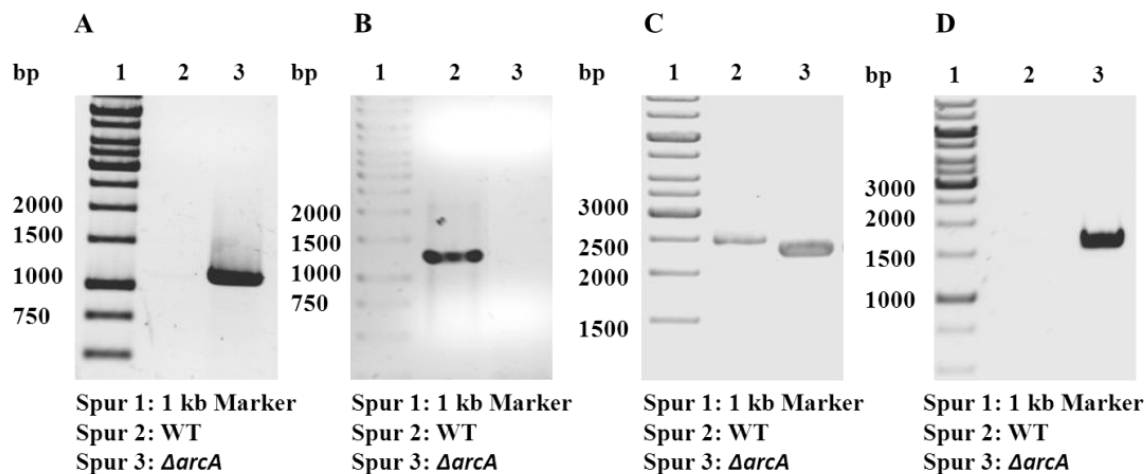


Abbildung 10: Bestätigung der $\Delta arcA$ -Mutante mittels PCR. A) Amplifikation des *aad9*-Gens. B) Amplifikation des *arcA*-Gens. C) Amplifikation mit Primern außerhalb der flankierenden Regionen. D) Amplifikation mit den *aad9*-spezifischen *forward* Primer und den *reverse* Primer der 5'-flankierenden Region des *arcA*-Gens.

3.1.2.2 Nachweis der *arcA*-Deletions auf Transkriptionsebene

Für die Bestätigung, dass das *arcA*-Gen in der Mutante nicht exprimiert wird, wurde zunächst die Gesamt-RNA aus in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Zellen von Wildtyp und Mutante nach Kultivierung in THY-Medium isoliert. Die darauffolgenden *Northern Blot*-Analysen wurden wie in Abschnitt 2.5.8 beschrieben durchgeführt. Nach Auftrennung im denaturierenden Agarosegel und dem Transfer der RNA mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran wurde diese mit verschiedenen für die RNA-Sequenzen des *arc*-Operons und des *aad9*-Gens spezifischen DIG-markierten Sonden (siehe Abschnitt 2.5.8) hybridisiert.

Die Ergebnisse der *Northern Blot*-Analysen sind in Abbildung 11 dargestellt. In der Mutante konnten keine Transkripte des *arcA*-Gens detektiert werden. Hingegen war das Chemilumineszenzsignal für die *arcA*-Sonde bei dem Wildtyp deutlich nachweisbar. Die Transkripte für die benachbarten ORFs *arcB* und 1198c konnten sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante mit den entsprechenden Sonden nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass die *arcA*-Deletion und der Einbau des *aad9*-Gens keinen Einfluss auf die Transkription der Gene des *arc*-Operons haben. Die *aad9*-Sonde ergab nur ein Hybridisierungssignal in der Mutante und nicht im Wildtyp.

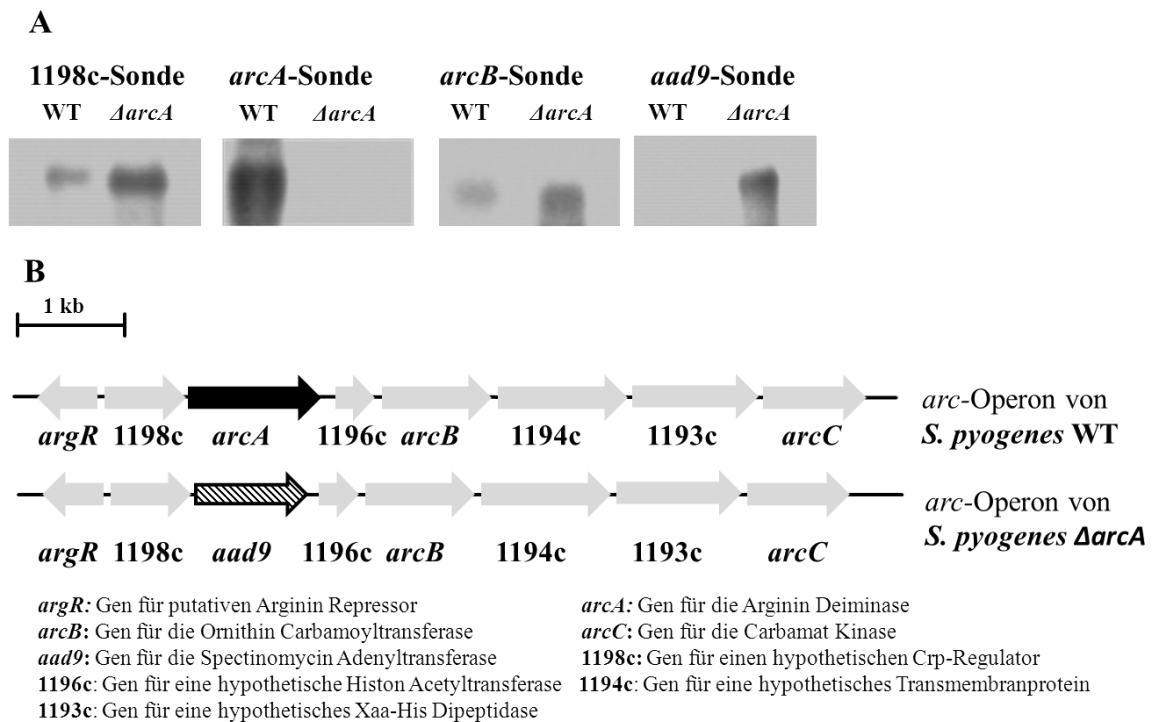


Abbildung 11: Northern Blot-Analyse von *S. pyogenes* M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante. A) Aufgetragen wurden je 2 μ g Gesamt-RNA pro Spur. Es wurde mit *arcA*, *arcB*, *aad9* und 1198c spezifischen DIG-markierten Sonden hybridisiert. B) Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Anordnung des *arc*-Operons in Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante.

3.2 Wachstumsanalysen der $\Delta arcA$ -Mutante

In den nachfolgenden Experimenten wurde die konstruierte Mutante in ihrem Wachstumsverhalten in Komplexmedium THY, chemisch-definiertem CDM-LAB-Medium sowie in heparinisiertem Vollblut untersucht. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsanalysen wurden mindestens dreimal reproduziert.

3.2.1 Wachstum von *S. pyogenes* M49 $\Delta arcA$ in THY-Medium

Zur Analyse eines möglichen Einflusses der Deletion des *arcA*-Gens auf das Wachstum der Streptokokken wurde das Wachstumsverhalten der $\Delta arcA$ -Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm im Komplexmedium THY untersucht (Abbildung 12). Hierfür wurden die beiden Stämme über Nacht in THY-Medium kultiviert. Die Übernachtskulturen dienten als Inokulum für die nachfolgenden Wachstumsversuche bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Wachstum wurde photometrisch durch stündliche Messung der OD bei 600 nm überwacht.

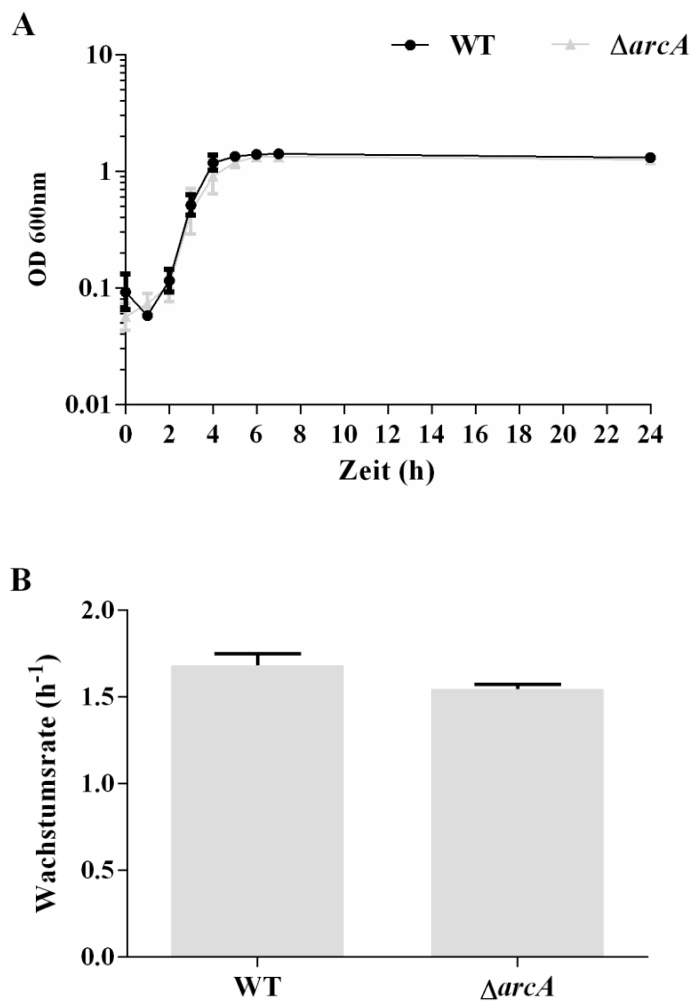


Abbildung 12: Wachstumskurve (A) und Wachstumsrate (B) von *S. pyogenes* M49 Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante in THY-Medium. Die Kultivierung erfolgte in 30 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂.

n=3

Im Vergleich zum Kontrollstamm M49 (591) zeigte die $\Delta arcA$ -Mutante weder hinsichtlich des Wachstumsverlaufs (Abbildung 12 A) noch in der Wachstumsrate (Abbildung 12 B) phänotypische Unterschiede bei Wachstum in THY-Medium.

3.2.2 Wachstum von *S. pyogenes* M49 $\Delta arcA$ in CDM-LAB-Medium

Der *S. pyogenes* M49 Wildtypstamm und die $\Delta arcA$ -Mutante wurden über Nacht in THY-Medium kultiviert, zentrifugiert und die Zellsedimente zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die anschließende Wachstumsanalyse erfolgte in CDM-LAB-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂.

In Abbildung 13 A ist die Wachstumskurve der $\Delta arcA$ -Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm dargestellt. Der Wachstumsverlauf und die Wachstumsrate machen deutlich, dass die Deletion von *arcA* keine signifikante Auswirkung auf das Wachstum von *S. pyogenes* M49 hat (Abbildung 13 B).

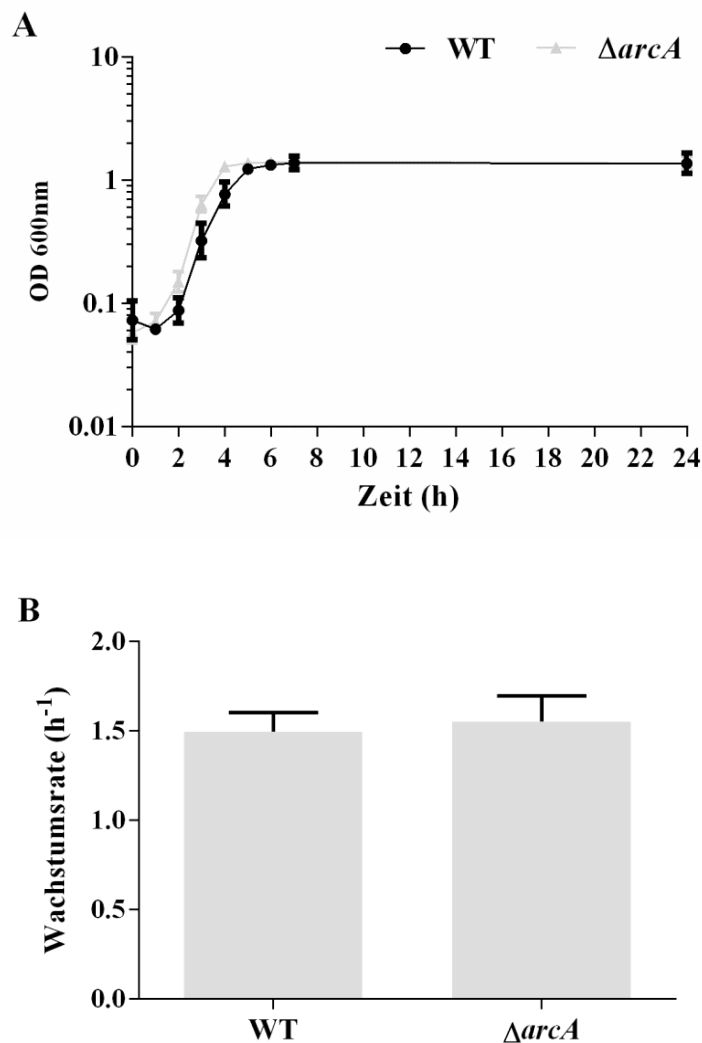


Abbildung 13: Wachstumskurve (A) und Wachstumsrate (B) von *S. pyogenes* M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) in CDM-LAB-Medium. Die Kultivierung erfolgte in 30 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂. n=3

Zusätzlich wurde die Ammoniumproduktion nach 24-stündigem Wachstum im CDM-LAB-Medium analysiert. Hierfür wurden zu Beginn (0 h) und am Ende (24 h) der Kultivierung Proben entnommen und in den sterilfiltrierten Überständen die Ammoniumkonzentration mittels *Ammonia Assay Kit* (Sigma-Aldrich GmbH) bestimmt. Die sich daraus ergebende Differenz spiegelte die Ammoniakproduktion der Streptokokken nach 24 h wider.

Es konnte eine 50 % geringere Ammoniumkonzentration in den Überständen der Mutante im Vergleich zum WT nachgewiesen werden. Dieser signifikante Unterschied ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) ist in Abbildung 14 dargestellt. Der Wildtyp zeigte mit 14,8 μg Ammonium/ml eine deutlich höhere Ammoniumproduktion nach 24 h als die Mutante mit 7,4 μg Ammonium/ml.

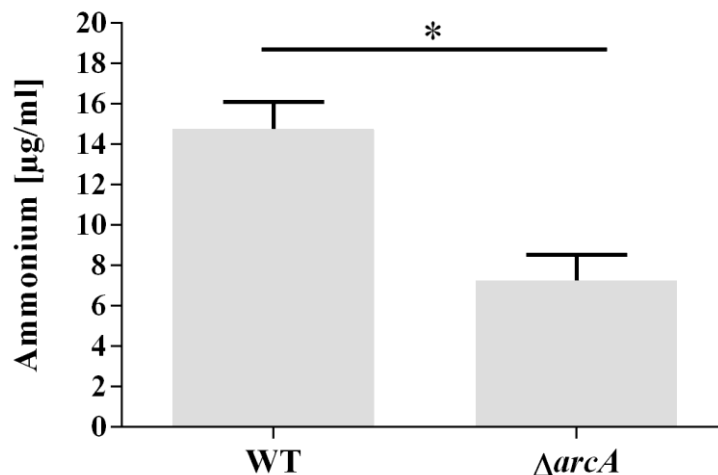


Abbildung 14: Ammoniumproduktion von *S. pyogenes* M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) nach 24 h Kultivierung in CDM-LAB-Medium. Dargestellt ist die Ammoniumkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) in den Überständen vom Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante nach 24-stündiger Kultivierung in CDM-LAB-Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 . Das Sternchen markiert den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). n=4

Damit konnte gezeigt werden, dass die AD eine entscheidende Rolle bei der Ammoniumproduktion von *S. pyogenes* spielt.

3.3 Rolle des ADS von *S. pyogenes* unter Säurestress

Da die Deletion des *arcA*-Gens keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. pyogenes* unter Standardbedingungen hatte, jedoch zu einer verringerten Ammoniumproduktion führte, wurde die Bedeutung der AD für das Überleben bei niedrigen pH-Werten untersucht.

3.3.1 Überleben von *S. pyogenes* M49 Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante unter sauren Bedingungen

In den folgenden Versuchen sollte experimentell überprüft werden, inwiefern das ADS in der Lage ist, unter sauren Bedingungen den extrazellulären pH-Wert anzuheben, damit die Zellen den Säurestress überdauern können.

Dafür wurden die $\Delta arcA$ -Mutante und der Wildtypstamm über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, mit Puffer S (pH 4,0; 20 mM $\text{Na}_2\text{P}_3\text{O}_4$; 25 mM L-Arginin) gewaschen und auf eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1,0 eingestellt. Die eingestellte Zellsuspension wurde 1:10 mit Puffer S verdünnt und diente als Ausgangsinokulum für die Versuche. Die Ansätze inkubierten bei 37 °C und das Überleben der Bakterien wurde nach zwei bzw. vier Stunden durch Ausplattieren und Zählen der Kolonien

bestimmt (siehe Abschnitt 2.10.1). Die Ergebnisse wurden als prozentuale Angaben, bezogen auf das Ausgangsinokulum, in Abbildung 15 A dargestellt.

Abbildung 15 A ist zu entnehmen, dass die $\Delta arcA$ -Mutante dem Säurestress nicht entgegenwirken konnte. Bereits nach zwei Stunden waren nur noch wenige koloniebildende Einheiten nachweisbar. Der Wildtyp zeigte nahezu keine Veränderung hinsichtlich der Überlebensrate, nach vier Stunden reduzierte sich die Lebendkeimzahl nur um etwa 7 %. Die pH-Messungen der Überstände (Abbildung 15 B) zeigten, dass der Wildtyp in der Lage war, den extrazellulären pH-Wert nach vier Stunden von 4,2 auf 6,7 anzuheben. Dagegen konnte bei der Mutante nur ein geringer Anstieg des extrazellulären pH-Wertes auf 4,7 gemessen werden (Mann-Whitney-U-Test; ** $p < 0,01$);).

Der Anstieg des pH-Wertes beruhte auf der zunehmenden Konzentration an Ammonium, welches durch den Abbau des im Puffer S enthaltenen Arginins durch das ADS gebildet wurde. In Abbildung 15 C ist zu erkennen, dass die Mutante, aufgrund der Deletion von *arcA*, nur geringe Mengen Ammonium bilden konnte. Im Überstand des Wildtypansatzes konnte ein Ammoniumgehalt von 2,34 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden.

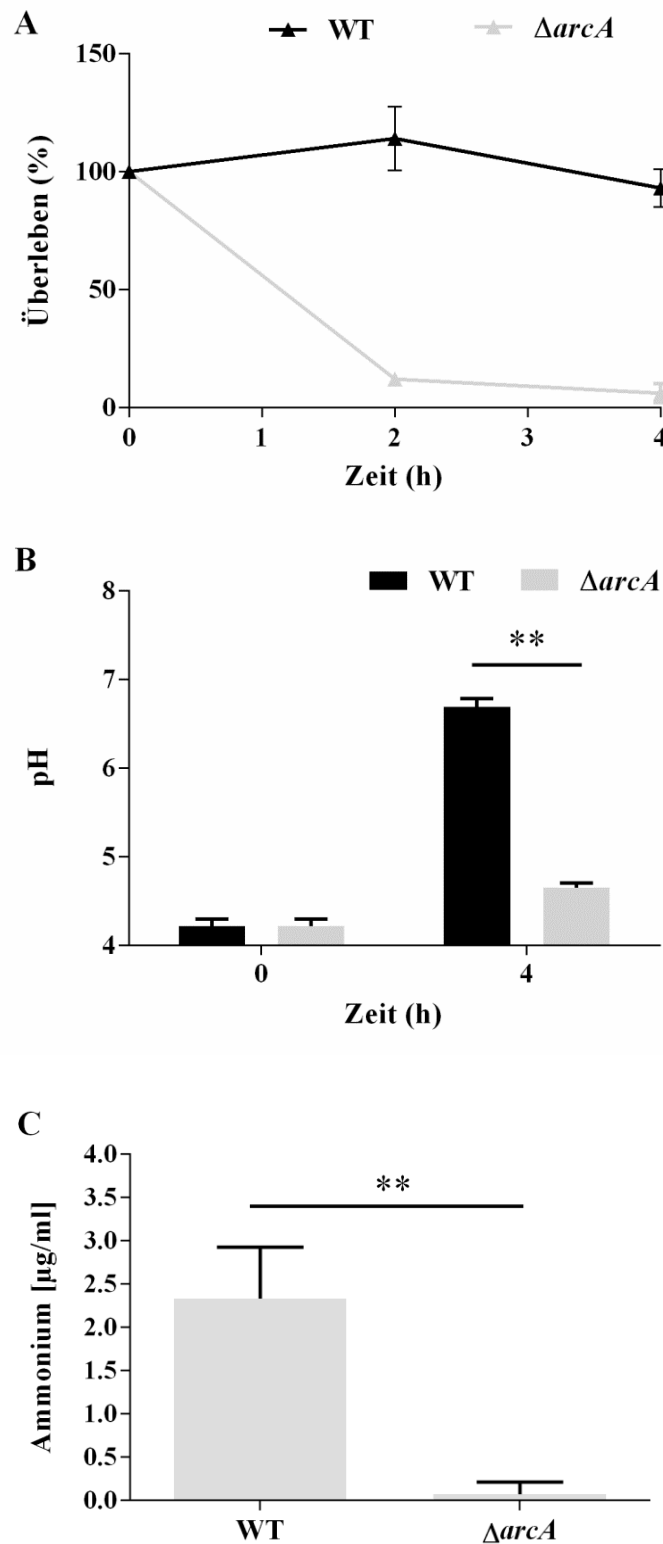


Abbildung 15: Einfluss von Säurestress auf *S. pyogenes* M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$). Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante inkubierten für 4 h in Puffer S (pH 4,0; 20 mM $\text{Na}_2\text{P}_3\text{O}_4$; 25 mM L-Arginin) bei 37 °C. A) Darstellung der Überlebensrate von Wildtyp und Mutante als prozentuale Angabe bezogen auf das Ausgangsinokulum. B) pH-Messungen im Überstand zu Beginn und nach 4 h der Inkubation. C) Messung des Ammoniumgehaltes in den Überständen nach 4 h. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt (Mann-Whitney-U-Test; ** $p < 0,01$).

Um im Anschluss daran die Frage zu beantworten, ob die Mutanten-Zellen lysieren oder die Zellen im VBNC (*viable but nonculturable*)-Status verharren, wurde eine Lebend/Tot-Färbung der Zellen, wie in Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben, durchgeführt. Dafür wurden 1 ml der Zellsuspension nach vierstündiger Inkubation in Puffer S (siehe Abschnitt 3.3.1) entnommen und 1:10 mit 1x PBS verdünnt. Durch die Zugabe von 1 μ l des Farbstoffgemisches aus SYTO 9 und Propidium-Iodid (Verhältnis 1:1) konnte mittels Fluoreszenzmikroskop anhand der Fluoreszenzfärbung zwischen lebenden (grün) und toten (rot) Zellen unterschieden werden. In Abbildung 16 sind die Fluoreszenzfärbungen von Wildtyp (A) und $\Delta arcA$ -Mutante (B) gegenübergestellt.

Die Lebend/Tot-Bestimmung in einem markierten Sichtfeld ergab, dass die Wildtypzellen lebensfähig waren, denn 90 % der beobachteten Wildtypzellen fluoreszierten grün. Dieses stimmt mit dem in Abbildung 15 A dargestellten Ergebnis der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten überein. Hingegen ist in der Abbildung 16 B deutlich zu erkennen, dass der Großteil der Zellen der $\Delta arcA$ -Mutante überwiegend rot fluoreszierte, womit die Lyse der Mutante nachgewiesen werden konnte.

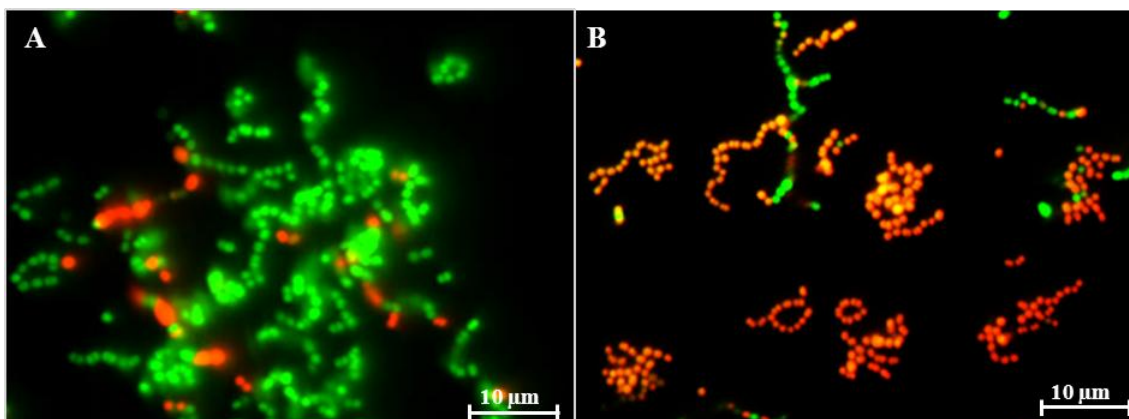


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. pyogenes* M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante. Wildtypstamm (A) und $\Delta arcA$ -Mutante (B) inkubierten für 4 h in Puffer S (pH 4,0; 20 mM $\text{Na}_2\text{P}_3\text{O}_4$ 25 mM L-Arginin) bei 37 °C. Die Zellsuspension wurde anschließend mit *Baclight*TM *Bacterial Viability Kit* analysiert: grün = lebend, rot= tot.

Neben dem ADS wurden weitere ammoniumproduzierende Stoffwechselwege untersucht, welche *S. pyogenes* nutzen könnte, um den Säurestress überdauern können. Durch den Abbau von Asparagin, Serin oder Glutamin konnte jedoch nicht genügend Ammonium produziert werden, um das Überleben der Bakterien zu ermöglichen.

3.3.2 Wachstum der $\Delta arcA$ -Mutante bei niedrigem pH-Wert

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von WT und $\Delta arcA$ -Mutante bei niedrigem pH-Wert wurden zunächst Vorkulturen beider Stämme über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 in THY-Medium angezogen und als Inokulum für die Hauptkulturen

verwendet. Die nachfolgenden Wachstumsanalysen erfolgten in 300 μ l Volumen in einer 96-*well*-Mikrotiterplatte bei 37 °C in THY-Medium bei pH 7,5 und pH 5,0 sowie bei pH 5,0 in Gegenwart von 100 mM L-Arginin. Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente sind in der Abbildung 17 zusammengefasst.

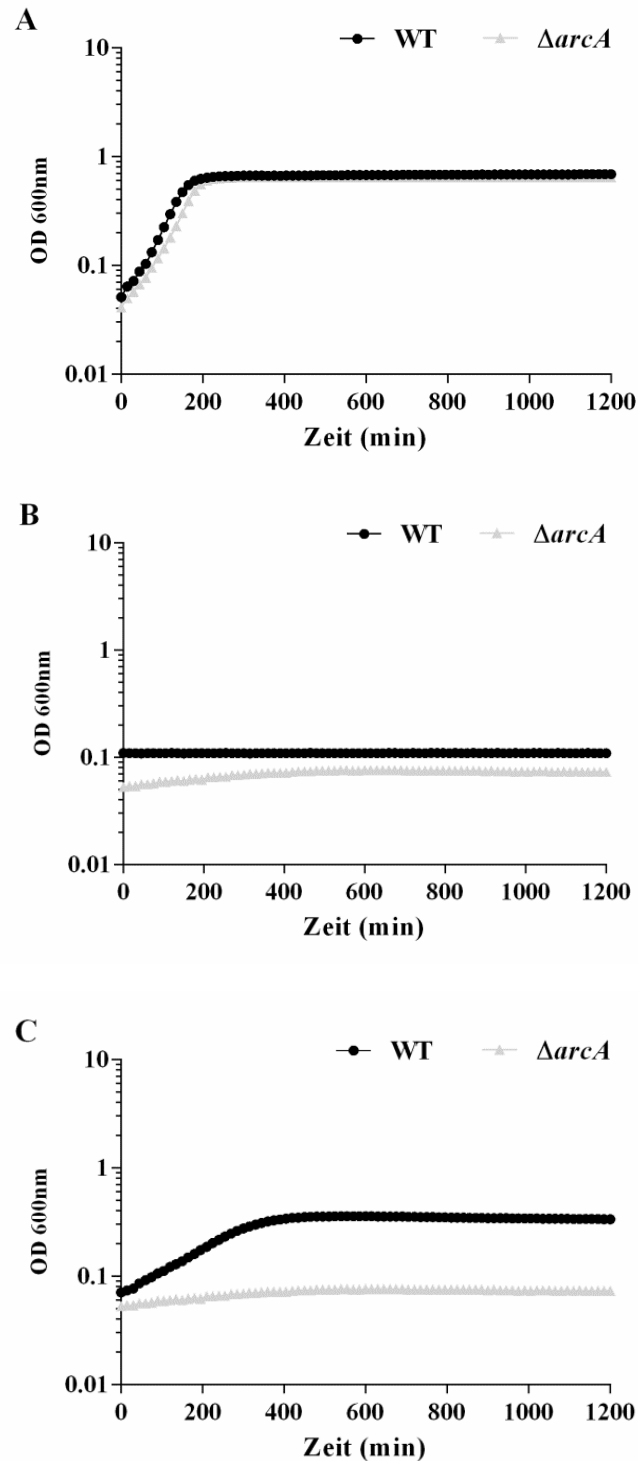


Abbildung 17: Wachstumsanalyse von *S. pyogenes* M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante in angesäuertem THY-Medium. Der Wildtypstamm sowie die $\Delta arcA$ -Mutante wurden in THY-Medium mit pH 7,5 (A), THY-Medium mit pH 5,0 (B) und THY-Medium plus 100 mM L-Arginin mit pH 5,0 bei 37°C kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

Unter Standardkulturbedingungen (THY-Medium; pH 7,5) konnte kein Unterschied in den Wachstumskurven und Wachstumsraten zwischen Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante beobachtet werden (Abbildung 17 A; Tabelle 8). Abbildung 17 B zeigt, dass unter sauren Bedingungen (THY-Medium; pH 5,0) weder Wildtyp noch Mutante zum Wachstum fähig sind. Durch die Supplementation des angesäuerten Mediums mit 100 mM L-Arginin war der Wildtyp jedoch wieder in der Lage zu wachsen, während die Mutante dem Säurestress weiterhin nicht entgegenwirken konnte (Abbildung 17 C). Die hohe Azidität bewirkte allerdings auch bei dem Wildtyp eine Verringerung der Wachstumsrate im Vergleich zu den Standardbedingungen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Wachstumsrate von *S. pyogenes* M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante in Komplexmedium THY.

<i>S. pyogenes</i> Stämme	Wachstumsrate (h ⁻¹) in THY-Medium		
	pH 7,5	pH 5,0	pH 5,0 + 100 mM L-Arginin
WT	1,34±0,11	- ^a	0,42±0,0,2
$\Delta arcA$	1,47±0,12	- ^a	- ^a

^a „kein Wachstum“

3.4 Einfluss der *arcA*-Deletion auf das Überleben von *S. pyogenes* in humanem Vollblut

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte experimentell überprüft werden, welche Rolle die AD für die Überlebensfähigkeit von Streptokokken in humanem Vollblut spielt. Hierzu wurden der M49 Wildtypstamm und die $\Delta arcA$ -Mutante wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben, drei Stunden in heparinisiertem Vollblut inkubiert und im Anschluss die Lebendkeimzahl bestimmt. Anhand der Lebendkeimzahl im Ausgangsinokulum wurde der Multiplikationsfaktor als Maß für das Wachstum beider Stämme berechnet. Das heparinisierte Vollblut wurde von verschiedenen Spendern bezogen, um Individuen-spezifische Effekte zu minimieren.

In den vorangegangenen Wachstumsanalysen in THY-Medium (siehe 3.2.1) und CDM-LAB-Medium (siehe 3.2.2) wiesen der Wildtyp und die Deletionsmutante keine Unterschiede hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens auf. Es konnte jedoch ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich des Wachstums und der Überlebensfähigkeit in humanem Vollblut beobachtet werden (Abbildung 18).

Die Keimzahl des Wildtyps stieg nach dreistündiger Inkubation in humanem Vollblut um den Faktor 65. Die Deletionsmutante vermehrte sich wesentlich langsamer und wies gegenüber dem Wildtypstamm ein um 87 % verringertes Wachstum auf ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test). Der Multiplikationsfaktor für die $\Delta arcA$ -Mutante lag bei acht.

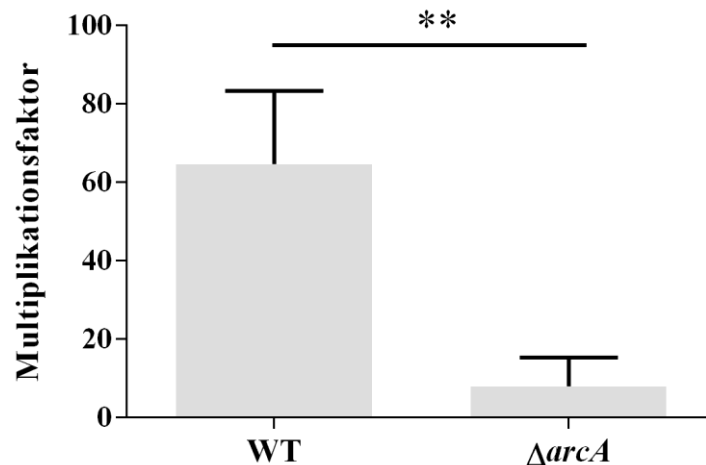


Abbildung 18: Wachstumsanalyse von *S. pyogenes* M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante in heparinisiertem Vollblut. Dargestellt ist der Multiplikationsfaktor als Maß für das Wachstum von Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante nach einer Inkubation von drei Stunden in heparinisiertem Vollblut bei 37 °C. Die Sternchen zeigen den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante (** $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test). n=5

3.4.1 Charakterisierung der Phagozytose von *S. pyogenes* M49 und $\Delta arcA$ -Mutante durch Makrophagen

Für die körpereigene Abwehr spielt die Phagozytose durch Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Mikroorganismen. Während des Prozesses der Phagozytose wird ein Phagosom um die Bakterien gebildet. Die Vereinigung von Phagosom und Lysosom zum Phagolysosom führt zur Lyse der Bakterien. Die Ursache für die Zelllyse sind die in dem Phagolysosom befindlichen Enzyme sowie reaktive Sauerstoffverbindungen und die sauren pH-Bedingungen.

In den folgenden Phagozytose-Assays sollte untersucht werden, ob die Deletion von *arcA* einen Einfluss auf das Überleben der Streptokokken in Makrophagen hat. Die Versuche wurden wie in Abschnitt 2.10.3 beschrieben durchgeführt. Nachfolgend ist die Sterberate (in %) der $\Delta arcA$ -Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm M49 dargestellt, welche nach einer 30-minütigen Kokultivierung von opsonierten Bakterien und J774-Zellen anhand der koloniebildenden Einheiten berechnet werden konnte.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, hatte die Deletion von *arcA* eine effizientere Abtötung der Bakterien durch die Makrophagen zufolge (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$). Die *arcA*-defiziente Mutante zeigte eine geringere Überlebensfähigkeit gegenüber dem Wildtypstamm M49. Die Sterberate der Mutante entsprach 31 %. Hingegen wurden nur 22 % der Wildtyp-Zellen abgetötet. Das bedeutete eine 12 % verringerte Überlebensfähigkeit der Mutante gegenüber dem Wildtyp in Phagolysosomen.

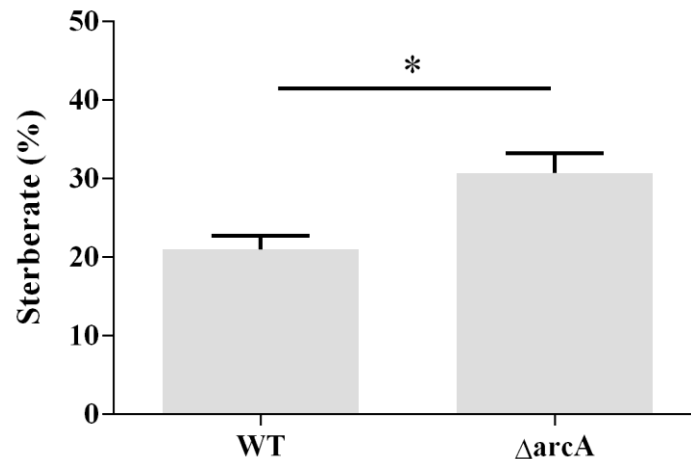


Abbildung 19: Abtötung von *S. pyogenes* M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante durch Makrophagen (J774-Zellen). Dargestellt ist die Sterberate vom Wildtyp M49 und $\Delta arcA$ -Mutante nach 30-minütiger Inkubation mit J774-Zellen bei 37 °C. Das Sternchen zeigt den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). n=5

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche in heparinisiertem Vollblut (siehe 3.4) und des Phagozytose-Assays mit J774-Zellen (siehe 3.4.1) legen eine Beteiligung der AD in der Pathogenese von *S. pyogenes* nahe.

3.5 Untersuchungen zur Auswirkung der *arcA*-Deletion auf den Zentralstoffwechsel von *S. pyogenes* M49

Zur weiteren physiologischen Charakterisierung wurden Wildtyp und *arcA*-Mutante in Chemostatkulturen angezogen, in denen das Wachstum der Kulturen über die Zufuhr von Glukose kontrolliert wurde. Hierzu wurde während der kontinuierlichen Kulturführung fortlaufend CDM-LAB-Medium zugeführt und gleichermaßen überschüssige Zellsuspension abgezogen. Die Kulturen befanden sich im *steady state*, wenn die $OD_{600\text{ nm}}$ und das Trockengewicht innerhalb von 24 h unverändert blieben sowie im Kulturüberstand keine Glucose mehr nachweisbar war. Nach Erreichen des *steady state* wurden in den Kulturüberständen mittels HPLC die Konzentrationen der möglichen *S. pyogenes* Fermentationsprodukte sowie der Aminosäuren bestimmt.

3.5.1 Untersuchung der Fermentationsprodukte in Glukose-limitierten Chemostaten

Um einen möglichen Einfluss der *arcA*-Deletion auf den Zentralstoffwechsel von *S. pyogenes* zu untersuchen, wurde zunächst die Bildung von Fermentationsprodukten untersucht. Mit Hilfe kontinuierlicher, Glukose-limitierter Kulturen (siehe 2.2.7) und

anschließenden Analysen der Kulturüberständen mittels HPLC (siehe 2.4.7) sollte der Einfluss der *arcA*-Deletion experimentell überprüft werden.

Die Anzucht der beiden *S. pyogenes* Stämme im Chemostaten erfolgte anaerob in CDM-LAB-Medium bei 37 °C. Zunächst wurden parallellaufende, kontinuierliche Kultivierungen vom Wildtyp und *arcA*-Mutante bei der Flussrate von 0,05/h und pH 7,5 durchgeführt. Nach dem Erreichen des *steady state*-Status wurden die Proben entnommen und entsprechend für die HPLC vorbereitet. Ggf. wurde anschließend der pH abgesenkt und die kontinuierliche Kulturführung wurde bis zur Probenahme nach erneutem Erreichen des nährstofflimitierten Fließgleichgewichtes fortgesetzt.

In der Abbildung 20 ist ein Beispiel für den Verlauf der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) und der Trockenmasse während einer kontinuierlichen Kultivierung des Wildtyps dargestellt. Der *steady state*-Status einer Chemostatkultur lag vor, wenn nach mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen keine Veränderung der optischen Dichte und Trockenmasse vorlag sowie im Kulturüberstand keine Glukose nachweisbar war.

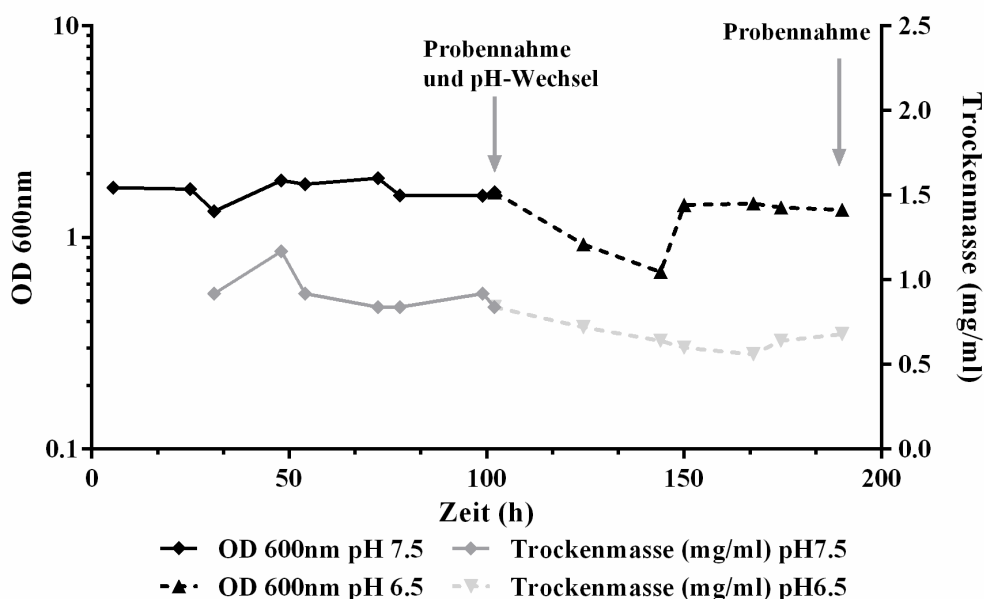


Abbildung 20: Darstellung der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) und der Trockenmasse [mg/ml] einer Chemostatkultur von *S. pyogenes* M49. Der Wildtyp wurde anaerob in kontinuierlicher Kulturführung ($D = 0,05/h$; 37 °C; pH 7,5) im Chemostaten kultiviert. Nach dem Erreichen des *steady state*-Status wurde die Probe (103 h) entnommen und der pH auf 6,5 abgesenkt. Die Kultivierung ($D = 0,05/h$; 37 °C; pH 6,5) wurde bis zum erneuten Erreichen des *steady state*-Status fortgesetzt.

Wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, konnten nach 103 h kontinuierlicher Kulturführung ($D = 0,05/h$; 37 °C; pH 7,5) Proben für die HPLC-Analysen entnommen werden. Da sich weder die $OD_{600\text{ nm}}$ und noch die Trockenmasse (mg/ml) innerhalb von 48 h verändert hatte. Nach der Probenahme wurde der pH auf 6,5 abgesenkt und die

Kultivierung ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 6,5$) wurde bis zum erneuten Erreichen des nährstofflimitierten Fließgleichgewichtes fortgesetzt. Nach 190 h Kultivierung konnten weitere Proben entnommen werden.

Die mittels HPLC bestimmten Konzentrationen der Fermentationsprodukte in den Kulturüberständen aus den Chemostaten von *S. pyogenes* M49 Wildtyp und der $\Delta arcA$ -Mutante sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Es sind jeweils die *steady-state*-Konzentrationen der Fermentationsprodukte sowie die Konzentrationsabnahme von Glukose angegeben. Es ist zu erkennen, dass sich der fermentative Abbau der Glukose zwischen dem Wildtyp und der Mutante unterscheidet. Der Wildtyp zeigte bei einer Durchflussrate von $0,05/h$ und einem pH von $7,5$ eine gemischte Säuregärung. Neben Laktat ($67,8\text{ mM}$) produzierte der Wildtyp hohe Mengen an Formiat ($34,8\text{ mM}$) und Acetat ($34,2\text{ mM}$). Hingegen zeigte die Mutante einen im Vergleich zum Wildtyp eher homofermentativen Glukosestoffwechsel. Mit 104 mM war die Laktatproduktion deutlich höher als beim Wildtyp, während die Konzentrationen an Formiat ($14,7\text{ mM}$) und Acetat ($18,4\text{ mM}$) unter den für den Wildtyp gemessenen Werten lagen. Sowohl der Wildtyp also auch die Mutante bildeten nur geringe Mengen an Acetoin.

Tabelle 9: Fermentationsprodukte von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei $\text{pH } 7,5$. Die Stämme wurden anaerob in kontinuierlicher Kulturführung ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 7,5$) kultiviert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Stämme	Trocken- masse [mg/ml]	Glukose- verbrauch [mM]	Gebildete Fermentationsprodukte [mM]					
			Pyruvat	Laktat	Acetat	Formiat	Ethanol	Acetoin
WT	0,79	57,2	1,7	67,8	34,8	34,2	10,1	0,5
$\Delta arcA$	1,05	57,4	2,5	104,0	14,7	18,4	6,7	0,0

Für einen optimalen Vergleich der gebildeten Fermentationsprodukte untereinander wurde durch Einbeziehen der Durchflussrate und der Trockenmasse die Konzentration der Fermentationsprodukte normalisiert, indem die Stoffwechselflüsse (Flux) in $\text{mmol/h}\cdot\text{g}$ berechnet wurden (Abbildung 21). Die Werte bestätigten den signifikanten Unterschied im Glukosestoffwechsel zwischen Wildtyp und Mutante.

Die Deletion des *arcA*-Genes hatte somit einen Einfluss auf die gemischte Säuregärung, denn unter diesen Bedingungen ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 7,5$) verstoffwechselte der Wildtyp die Glukose in Richtung Formiat und Acetat. Dies spiegelte sich in den signifikant erhöhten Stoffwechselflüssen von Formiat und Acetat und den signifikant verringerten Stoffwechselfluss in Richtung Laktat des Wildtyps gegenüber der Mutante wider. Die Mutante zeigte einen homofermentativen Glukosestoffwechsel und baute die Glukose vorwiegend zu Laktat ab. Für die Stoffwechselflüsse von Acetoin und Pyruvat

konnte zwischen den beiden *S. pyogenes* Stämmen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

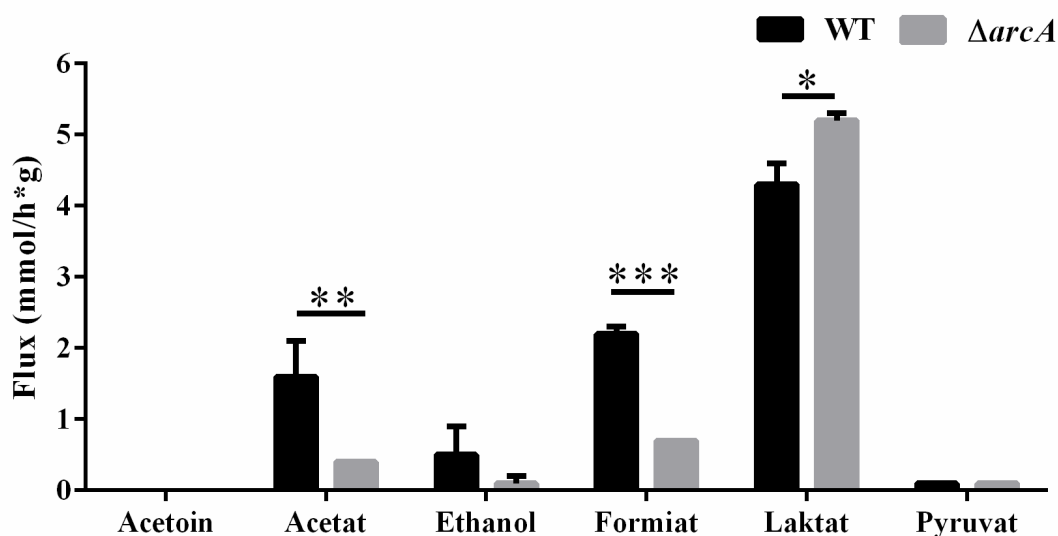


Abbildung 21: Stoffwechselflüsse der Fermentationsprodukte von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante bei pH 7,5. Dargestellt ist der Flux (mmol/h*g) der Stoffwechselprodukte in Glukose-limitierten Chemostatkulturen ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 7,5). Die Sternchen zeigen den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ungepaarter t-Test). n=3

Somit konnte bei den kontinuierlichen Kulturführungen ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 7,5), anhand der gebildeten Fermentationsprodukte und der berechneten Stoffwechselflüsse gezeigt werden, dass die Deletion von *arcA* einen Wechsel im Zentralmetabolismus von gemischter Säuregärung zu eher homofermentativer Milchsäuregärung zu Folge hatte.

Für die weiteren Untersuchungen des *arcA*-Einflusses auf den Metabolismus wurden die Fermentationsbedingungen durch die Absenkung des pH-Wertes auf pH 6,5 verändert. Durch die kontinuierlichen Kulturführungen ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 6,5) bei niedrigem pH-Wert kommt es zur Verschiebung im Metabolismus von *S. pyogenes* M49 von gemischter Säuregärung zur Milchsäuregärung.

Wie der Tabelle 10 zu entnehmen ist, zeigten sowohl der Wildtypstamm als auch die $\Delta arcA$ -Mutante einen homofermentativen Glukosestoffwechsel. Beide Stämme produzierten mit 107,3 mM (WT) bzw. 103,5 mM ($\Delta arcA$) hohe Mengen an Laktat. Der homofermentative Stoffwechsel von Wildtyp und Mutante spiegelte sich auch in der geringen Ausbeute der Abbauprodukte der gemischten Säuregärung wider. Die für die gemischte Säuregärung charakteristischen Fermentationsprodukte Formiat und Acetat lagen jedoch bei dem Wildtypen mit 23,3 mM und 27,7 mM deutlich höher als bei der Mutante mit 5,8 mM und 9,6 mM. Die Ethanolproduktion war bei der Mutante mit

1,4 mM ebenfalls reduziert gegenüber dem Wildtyp mit 8,2 mM. Sowohl bei der Pyruvat- als auch bei der Acetoinproduktion konnten keine Unterschiede zwischen den beiden *S. pyogenes* Stämmen festgestellt werden.

Tabelle 10: Fermentationsprodukte von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 6,5. Die kontinuierliche Kulturführung erfolgte anaerob bei 37 °C und einer Durchflussrate von 0,05/h sowie einem konstanten pH-Wert von 6,5. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Stämme	Trocken- masse [mg/ml]	Glukose- verbrauch [mM]	Gebildete Fermentationsprodukte [mM]					
			Pyruvat	Laktat	Acetat	Formiat	Ethanol	Acetoin
WT	0,83	55,4	1,9	107,3	23,3	27,7	8,2	0,2
$\Delta arcA$	0,89	56,9	0,9	103,5	5,8	9,6	1,4	0,2

Diese Chemostatexperimente bestätigen nochmals einen Einfluss der AD auf die gemischte Säuregärung von *S. pyogenes*. Obwohl beide *S. pyogenes* Stämme bei niedrigem pH die Glukose homofermentativ verstoffwechseln, verzeichnete die *arcA*-Mutante eine signifikante Reduzierung der Abbauprodukte Ethanol, Acetat und Formiat. Diese Unterschiede sind in Abbildung 22 dargestellt. Für den besseren Vergleich wurden für die Fermentationsprodukte die Stoffwechselflüsse in mmol/h*g (Flux) berechnet.

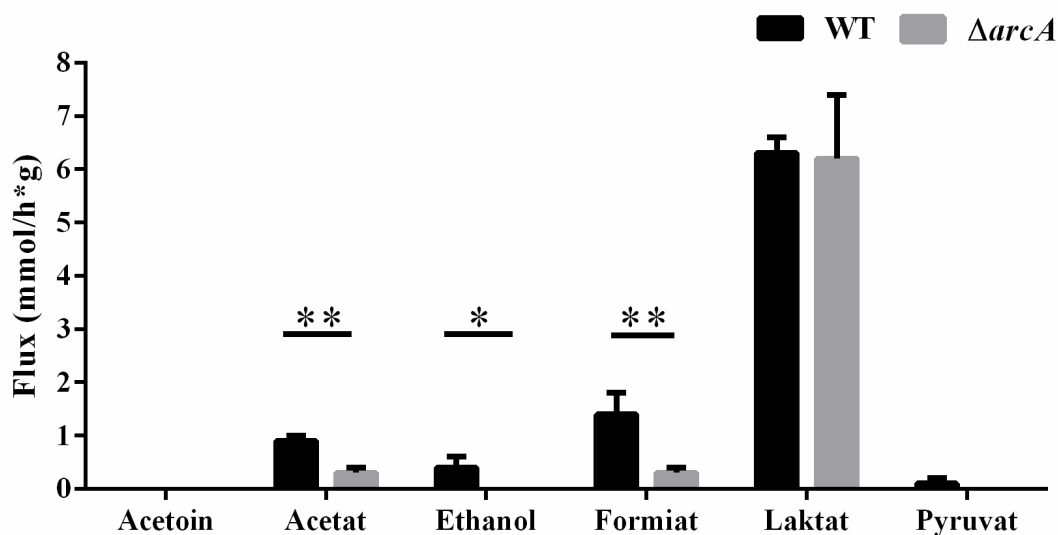


Abbildung 22: Stoffwechselflüsse der Fermentationsprodukte von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und $\Delta arcA$ -Mutante bei pH 6,5. Dargestellt ist der Flux (mmol/h*g) der Stoffwechselprodukte in Glukose-limitierten Chemostaten (D = 0,05/h; 37 °C; pH 6,5). Die Sternchen zeigen den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ungepaarter t-Test). n=3

Die Mutante zeigte gegenüber dem Wildtypstamm signifikant verringerte Stoffwechselflüsse in Richtung Formiat, Acetat und Ethanol, während der Laktat-Fluss zwischen Wildtyp und Mutante annähernd äquivalent war.

Anhand der Fermentationsanalysen konnte ein Einfluss des pH-Wertes auf den Glukosestoffwechsel im Wildtyp beobachtet werden. Bei einem hohen pH-Wert von 7,5 wurde die Glukose vorwiegend über die gemischte Säuregärung verstoffwechselt und bei einem niedrigen pH-Wert von 6,5 homofermentativ. Hingegen zeigte die Mutante in beiden Fällen einen homofermentativen Glukosestoffwechsel und einen deutlichen Rückgang der Abbauprodukte der gemischten Säuregärung.

3.5.2 Untersuchung des Aminosäureverbrauches in Glukose-limitierten Chemostatkulturen

Um eine Übersicht des Aminosäureverbrauches von *S. pyogenes* zu bekommen, müssen die Aminosäure-Auxotrophien berücksichtigt werden. Von den 20 proteinogenen Aminosäuren sind 12 essentiell für *S. pyogenes*, darunter auch Arginin, das nicht nur für die Proteinbiosynthese sondern auch für die Energiegewinnung und pH-Regulierung verwendet wird. Für die Bestimmung des Aminosäureverbrauches wurden die Aminosäurekonzentrationen in den Kulturüberständen der unter 2.2.7 beschriebenen Glukose-limitierten Chemostatkulturen mittels HPLC quantifiziert.

Um eine mögliche Beteiligung der AD am Aminosäuremetabolismus von *S. pyogenes* zu untersuchen, wurden zunächst wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben Glukose-limitierte Chemostatkulturen ($D = 0,05/h$; 37 °C) bei pH 7,5 durchgeführt. Die Ergebnisse der HPLC-Messungen sind als Stoffwechselflüsse (Flux) in der Abbildung 23 zusammengefasst.

Grundsätzlich unterschieden sich die Stoffwechselflüsse der aromatischen, basischen sowie verzweigtkettigen Aminosäuren zwischen Wildtypen und Mutante kaum, da diese zum größten Teil zur Proteinbiosynthese benötigt werden. Einzig die nicht-essentielle Aminosäure Serin zeigte geringfügige Unterschiede zwischen Wildtyp ($-0,2\text{ mmol/h}\cdot\text{g}$) und Mutante ($-0,04\text{ mmol/h}\cdot\text{g}$). Die Ammoniumkonzentration wurde ebenfalls bestimmt, da der Abbau von Arginin durch das ADS zur Freisetzung von Ammonium führt. Die Deletion der AD führte zu einem geringeren Ammonium-Fluss der Mutante mit $-0,05\text{ mmol/h}\cdot\text{g}$ gegenüber dem Wildtyp mit $-0,45\text{ mmol/h}\cdot\text{g}$.

Da nur zwei unabhängige Datensätze vorlagen, konnten keine Signifikanzen berechnet werden. Aber anhand der Daten konnten dennoch einige Rückschlüsse über den Verbrauch bestimmter Aminosäuren gezogen werden.

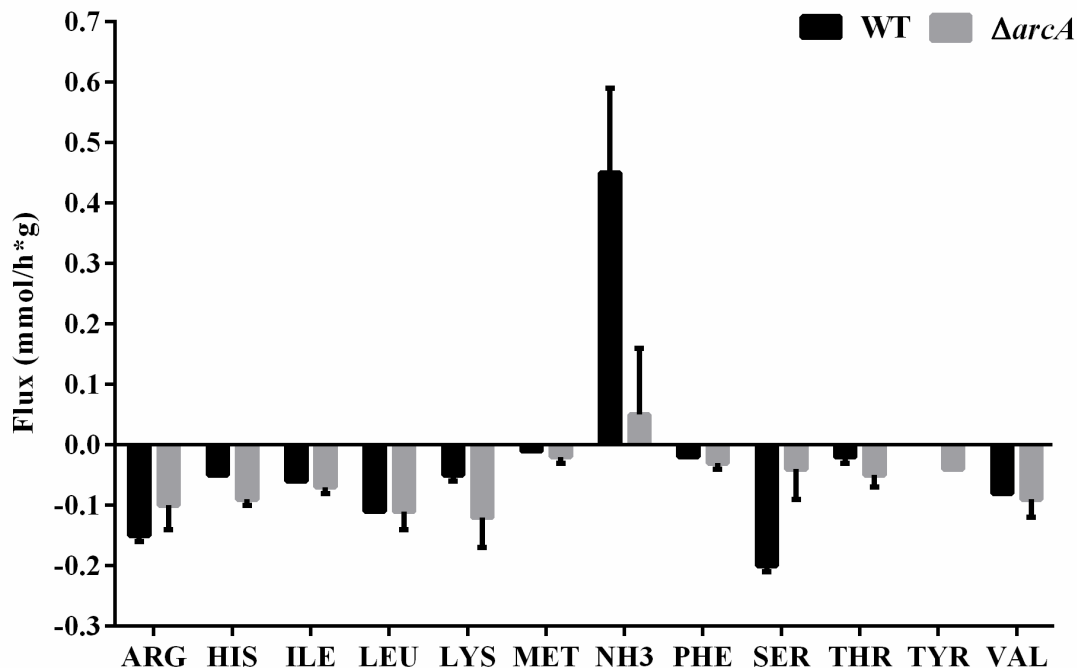


Abbildung 23: Aminosäure-Stoffwechselflüsse von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 7,5. Dargestellt ist der Flux (mmol/h*g) der Aminosäuren bei kontinuierlicher Kulturführung ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 7,5) im Chemostaten. ARG: Arginin; HIS: Histidin; ILE: Isoleucin; LEU: Leucin; LYS: Lysin; MET: Methionin; NH3: Ammonium; PHE: Phenylalanin; SER: Serin; THR: Threonin; TYR: Tyrosin; VAL: Valin. n=2

Ausgehend von den theoretischen Überlegungen, dass bei niedrigen pH-Werten die Regelung des extrazellulären pH-Wertes über den Argininabbau gesteuert wird, wurden Glukose-limitierten Chemostatkulturen bei pH 6,5 durchgeführt.

Die Abbildung 24 gibt einen Überblick über die berechneten Stoffwechselflüsse. Durch die pH-Absenkung konnte ein geringerer Argininverbrauch der $\Delta arcA$ -Mutante festgestellt werden. Der Arginin-Fluss der Mutante (-0,05 mmol/h*g) lag etwa viermal niedriger als der Arginin-Fluss vom Wildtyp (-0,21 mmol/h*g). Dies spiegelte sich ebenfalls in der Ammoniumproduktion wider. Durch den verminderten Argininabbau der Mutante konnte ebenfalls ein reduzierter Amminoum-Fluss mit 0,33 mmol/h*g gegenüber dem Wildtyp mit 0,68 mmol/h*g beobachtet werden. Des Weiteren zeigten sich Unterschiede in dem Verbrauch der nicht-essentiellen Aminosäure Serin. Während der Wildtyp die Aminosäure in hoher Menge verstoffwechselte (-0,36 mmol/h*g), konnte bei der Mutante eine geringe Serin-Produktion (0,06 mmol/h*g) beobachtet werden. Für die restlichen analysierten Aminosäuren konnten keine Auffälligkeiten in den Stoffwechselflüssen festgestellt werden.

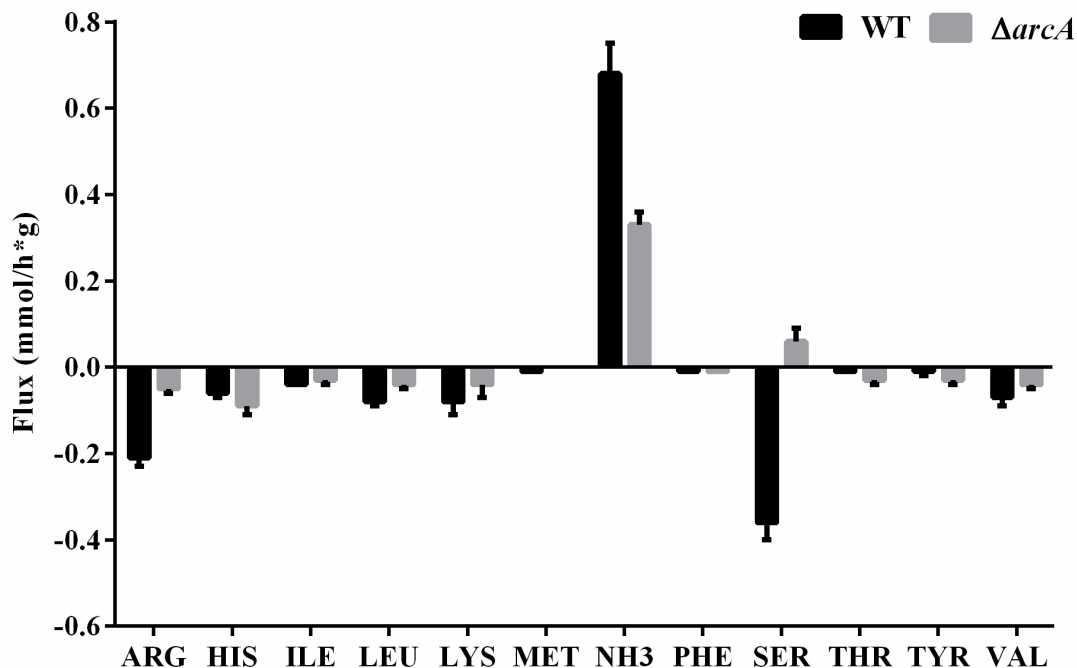


Abbildung 24: Aminosäure-Stoffwechselflüsse von *S. pyogenes* Wildtyp M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$) bei pH 6,5. Dargestellt ist der Flux (mmol/h*g) der Aminosäuren bei kontinuierlicher Kultivierung ($D = 0,05/h$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 6,5) im Chemostaten. ARG: Arginin; HIS: Histidin; ILE: Isoleucin; LEU: Leucin; LYS: Lysin; MET: Methionin; NH3: Ammonium; PHE: Phenylalanin; SER: Serin; THR: Threonin; TYR: Tyrosin; VAL: Valin. n=2

Die HPLC-Analysen der Kulturüberstände legen nahe, dass die AD in *S. pyogenes* nicht nur auf die Verwertung bestimmter Aminosäuren einen Einfluss hatte, sondern auch auf die Ammoniumproduktion. Die reduzierte Ammoniumproduktion der $\Delta arcA$ -Mutante im Chemostaten bestätigte die Ergebnisse der Ammoniummessungen während der Wachstumsversuche in statischen Kulturen (siehe Abschnitt 3.2.2). Durch die pH-Absenkung von 7,5 auf 6,5 wurde dieser Effekt zwischen Wildtyp und Mutante deutlich verstärkt. Zudem zeigte der Wildtyp gegenüber der Mutante einen erhöhten Argininkonsum bei pH 6,5.

3.6 Kinetische Charakterisierung von Enzymen des ADS

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung der Enzyme des ADS von *S. pyogenes* M49. Für die Untersuchungen der kinetischen Eigenschaften sollten die Arginin Deiminase, Ornithin Carbamoyltransferase und Carbamat Kinase heterolog in *E. coli* DH5 α exprimiert werden.

Bei der Überexpression der rekombinanten Ornithin Carbamoyltransferase im Periplasma kam es zur Aggregation des Zielproteins und zur Bildung von Einschlusskörper (*inclusion bodies*). Die native Aufreinigung via *Strep-Tactin*-Affinitäts-

chromatographie war daher nicht möglich und eine enzymatische Charakterisierung der Ornithin Carbamoyltransferase konnte nicht durchgeführt werden.

In den nachfolgenden Kapiteln sind die Gewinnung und die kinetische Charakterisierung der rekombinanten Arginin Deiminase und Carbamat Kinase näher beschrieben.

3.6.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Für die enzymatische Charakterisierung der Arginin Deiminase und Carbamat Kinase von *S. pyogenes* M49 (591) wurden die Expressionsplasmide pASK_IBA2_ArcA und pASK_IBA2_ArcC konstruiert (Abbildung 25).

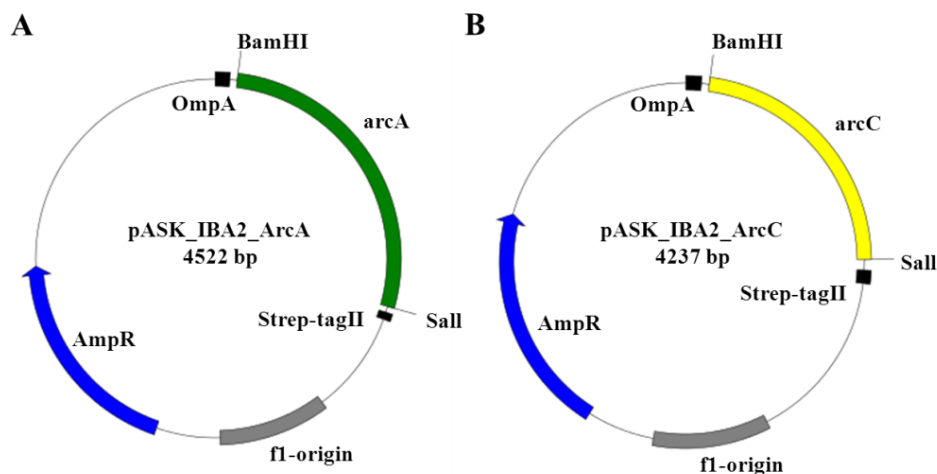


Abbildung 25: Plasmidkarte der Expressionsplasmide für die AD (A) und CK (B) von *S. pyogenes* M49.

<i>OmpA</i> :	Signalsequenz für die Proteinsekretion in den periplasmatischen Raum
<i>AmpR</i> :	Ampicillinresistenzgen
<i>f1-origin</i> :	Replikationsursprung für <i>E. coli</i>
<i>Strep-tagII</i> :	C-terminaler <i>Strep-Tactin</i> Affinitätstag
BamHI/ Sall:	Restriktionsschnittstelle
<i>arcA</i> :	Gen für die Arginin Deiminase
<i>arcC</i> :	Gen für die Carbamat Kinase

Für die Konstruktion der Expressionsplasmide wurde der Vektor pASK_IBA2 verwendet. Dieser enthält einen Replikationsursprung (*f1-origin*) für *E. coli* sowie ein Ampicillinresistenzgen (*AmpR*). Der 3,2 kb große Vektor trägt einen induzierbaren *tet*-Promotor für die heterologe Proteinexpression und eine *OmpA*-Signalsequenz für die Sekretion der produzierten Proteine in den periplasmatischen Raum. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über den an den C-Terminus fusionierten *Strep-Tactin* Affinitätstag (*Strep-tagII*).

Die Gene für die Arginin Deiminase (*arcA*) und für die Carbamat Kinase (*arcC*) wurden unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide (siehe 2.5.3) mittels PCR aus der chromosomalen DNA von *S. pyogenes* amplifiziert, gereinigt und mit BamHI und SalI endonukleolytisch gespalten. Die PCR-Fragmente wurden mit dem genauso geschnittenen pASK_IBA2 Vektor ligiert. Die ligierten DNA-Fragmente wurden in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Selektivagar mit Ampicillin ausplattiert. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR bzw. *Colony Fast Screen* getestet. Von den positiven Transformanten wurden die Plasmide isoliert und Testrestriktionen im 10 μ l Ansatz mit BamHI und SalI durchgeführt (Abbildung 26).

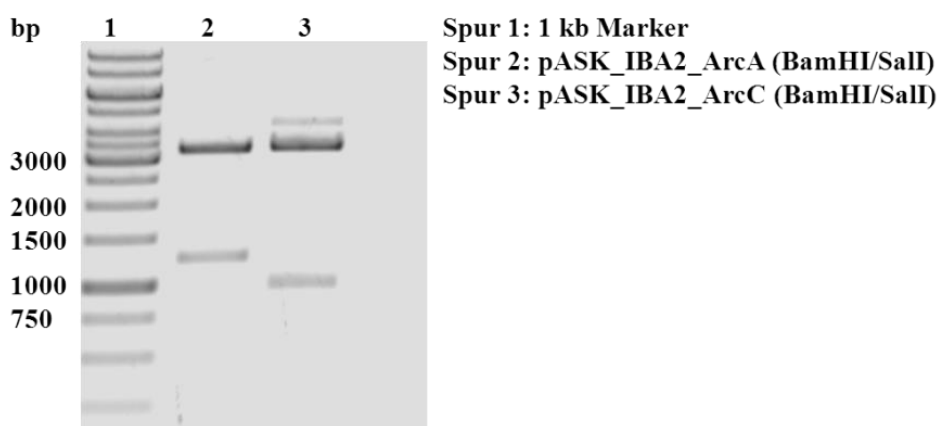


Abbildung 26: Kontrollrestriktion von pASK_IBA2_ArcA und pASK_IBA2_ArcC. (1%iges Agarosegel).

Die Abbildung 26 zeigt die erwarteten zwei Banden für die entsprechende Kontrollrestriktion. Die obere Bande bei 3,2 kb in beiden Spuren stellt den linearisierten Vektor pASK_IBA2 dar. Die untere Bande in Spur 2 zeigt das inklonierte PCR-Produkt von *arcA* bei 1,2 kb und in Spur 3 von *arcC* bei 0,9 kb. In Spur 3 ist zusätzlich eine schwache Bande bei 4,1 kb zu erkennen. Diese entsprach dem linearisierten Vektor, bei dem das Insert nicht vollständig herausgeschnitten wurde.

3.6.2 Affinitätschromatographische Reinigung der heterolog exprimierten Proteine

Für die Gewinnung rekombinanter AD und CK wurden Expressionsversuche mit den entsprechenden *E. coli* Stämmen durchgeführt. Die Anzucht der Stämme erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben. Die Proteinproduktion erfolgte nach Zusatz von Anhydrotetracyclin (0,2 μ g/ml) zur Kultur für 16 Stunden bei 22 °C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für mindestens 24 h bei -20 °C gelagert.

Nach der Lagerung wurden die Zellen (siehe 2.6.5) mechanisch aufgeschlossen und die rekombinanten Proteine konnten über den am C-Terminus befindlichen *Strep-tagII* aus

dem Lysat via *Strep-Tactin*-Affinitätschromatographie gewonnen werden. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 2.7.2) und *Western Blot* Analyse (siehe 2.7.4) überprüft.

In der Abbildung 27 sind die einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung dargestellt. In den *Colloidal Coomassie* gefärbten SDS-PAGE Gelen (Abbildung 27 A) ist zu erkennen, dass die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus dem Lysat erfolgreich war. Bei dieser unspezifischen Proteinfärbung waren keine Nebenbanden weiterer Proteine in den Elutionsfraktionen zu sehen. Es wurden nur Banden in den zu erwartenden Größenordnungen von 47,2 kDa für die AD und 34,2 kDa für die CK detektiert.

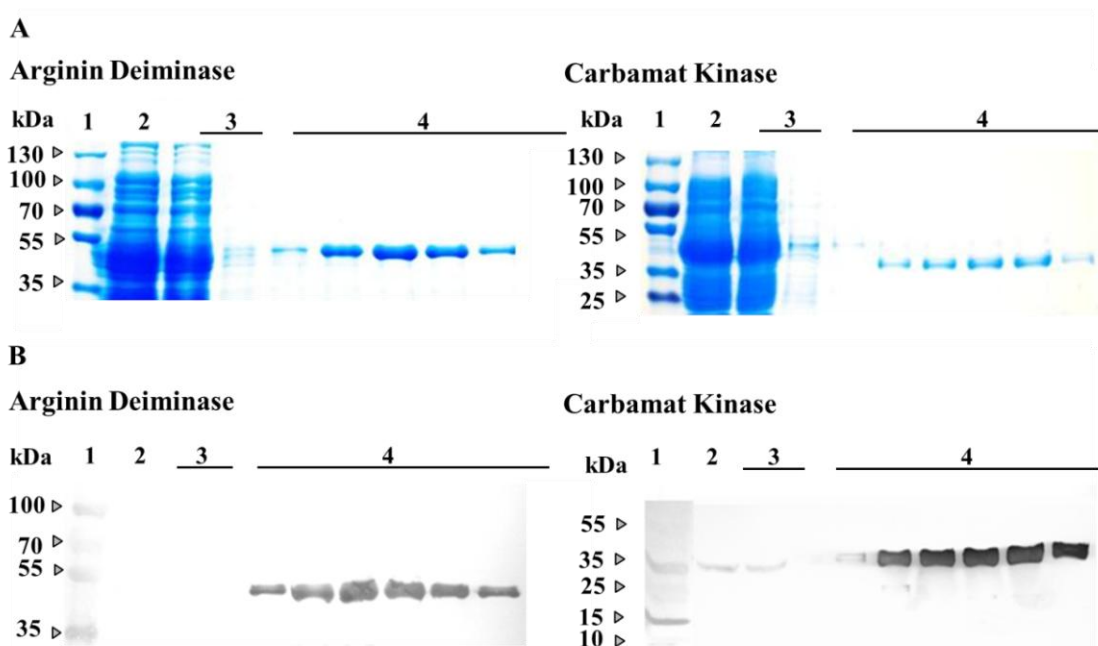


Abbildung 27: Affinitätschromatographische Reinigung der heterolog exprimierten *S. pyogenes* M49 AD und CK. Die rekombinanten Proteine AD und CK wurden bei 22 °C heterolog exprimiert und bei 4 °C gereinigt. Die Analyse erfolgte durch eine *Colloidal Coomassie* gefärbte SDS-PAGE (A) und durch einen *Western Blot* (B). Die Proteine mit dem C-terminalen *Strep-tagII* laufen im Polyacrylamidgel bei 47,2 kDa (AD) bzw. 34,2 kDa (CK). 1: Marker; 2: Durchfluss; 3: Waschschritt; 4: Eluat.

Anhand der *Western Blot*-Analyse (Abbildung 27 B) konnte ebenfalls die Aufreinigung der *Strep-tagII*-Fusionsproteine mittels NBT/BCIP und *Strep-Tactin* Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugaten bestätigt werden. Die AP-Konjugate konnten an den am C-Terminus der Proteine befindlichen *Strep-tagII* binden und durch die Zugabe des Substrates (NBT/BCIP) kam es zur Verfärbung der PVDF-Membran auf der entsprechenden Höhe der transferierten Proteine.

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine aus dem Rohextrakt und die spezifischen Aktivitäten von AD und CK. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden vereinigt. Aus je 500 ml Kultur konnten insgesamt 3,54 mg AD bzw. 2,42 mg CK isoliert werden, was ca. 1 % bzw. 0,8 % des Gesamtproteins im *E. coli* Rohextrakt entspricht. Aufgrund der hohen Hintergrundaktivitäten konnte keine spezifische Aktivität für die beiden Enzyme in Rohextrakten gemessen werden. In den Elutionsfraktionen konnte eine spezifische Aktivität von 1,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ für die AD und 1,1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ für die CK ermittelt werden. In den Waschfraktionen konnten nur geringe Aktivitäten der beiden Enzyme nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Expression und Reinigung der AD und CK von *S. pyogenes* M49 in *E. coli* DH5a. (Hering *et al.*, 2013).

Arginin Deiminase

Reinigungsschritte	Proteingehalt (mg)	Spezifische Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Rohextrakt ^a	309,5	n.d ^b
Waschfraktionen	0,02	0,0
Elutionsfraktionen	3,54	1,5

Carbamat Kinase

Reinigungsschritte	Proteingehalt (mg)	Spezifische Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Rohextrakt ^a	296,8	n.d ^b
Waschfraktionen	0,04	0,0
Elutionsfraktionen	2,42	1,1

^a von 500 ml induzierter *E. coli* Kultur

^b „nicht definierbar“ aufgrund zu hoher Hintergrundaktivitäten

Für weitere Untersuchungen wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und über Nacht bei 4 °C in 1x PBS dialysiert (siehe 2.7.6.1).

3.7 Enzymkinetische Untersuchung von Arginin Deiminase und Carbamat Kinase

Die biochemische Charakterisierung von Enzymen liefert detaillierte Aussagen über die jeweiligen katalytischen Eigenschaften der untersuchten Proteine. Die bei definierten Bedingungen für Enzyme charakteristischen Größen wie Temperaturoptimum und pH-Optimum sind in den folgenden Kapiteln für Arginin Deiminase und Carbamat Kinase dargelegt.

3.7.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivitäten

Die pH-Abhängigkeit der Aktivität von AD und CK wurde in einem Spektrum von pH 5,0 - 9,0 getestet. Die Aktivitätsmessungen wurden wie unter 2.8.1 für AD bzw. 2.8.2 für CK beschrieben durchgeführt.

In der Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die Umsatzgeschwindigkeiten der AD (A) und CK (B) stark pH-abhängig sind. Bei niedrigen und hohen pH-Werten konnte nur eine geringe Aktivität der beiden Enzyme ermittelt werden. Das pH-Optimum lag sowohl für die AD als auch für die CK bei pH 6,5.

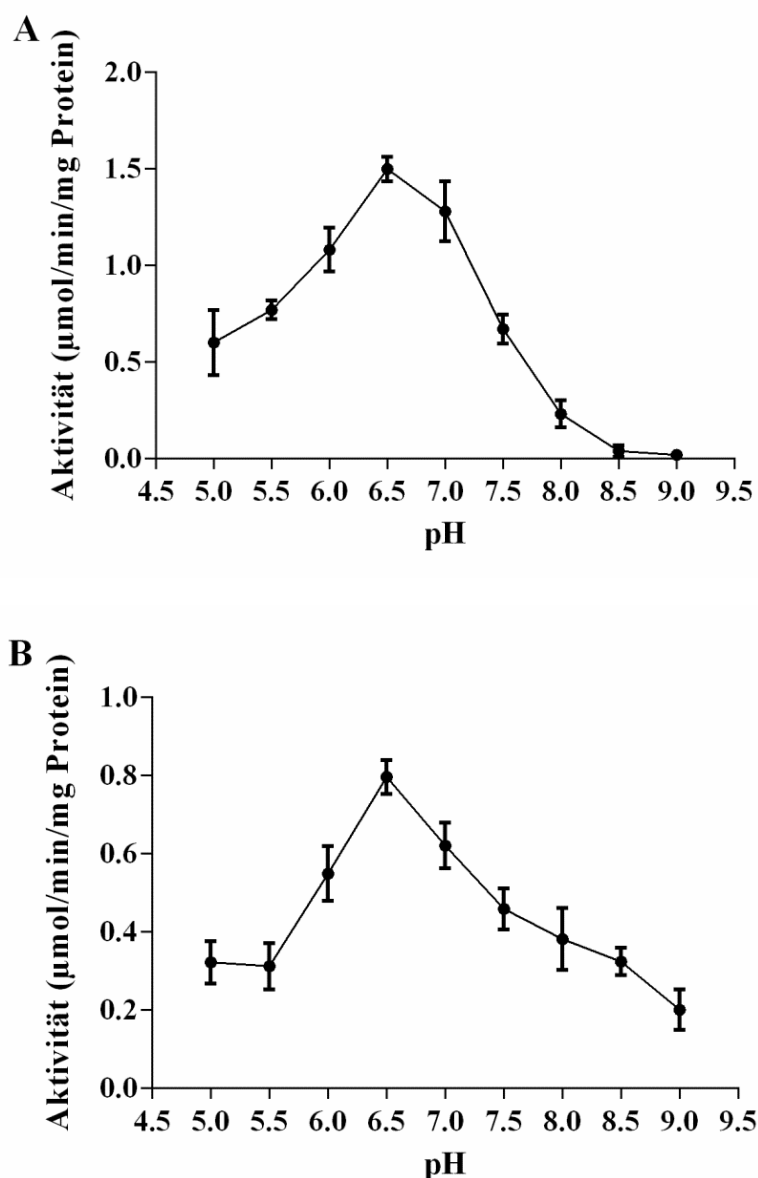


Abbildung 28: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der AD (A) und CK (B). Die Aktivitäten ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) sind als Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.7.2 Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivitäten

Um den Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivitäten von AD und CK zu charakterisieren, wurden die Aktivitätsmessungen (siehe 2.8.1 und 2.8.2) in einem Temperaturspektrum von 25 °C – 47 °C durchgeführt.

Die Ergebnisse der Messungen in diesem Temperaturbereich sind in Abbildung 29 dargestellt. Beide Enzyme zeigten eine zunehmende Aktivität mit steigender Temperatur. Das Temperaturoptimum für die AD und die CK lag bei 37 °C. Sowohl bei 25 °C als auch bei 47 °C konnte nur eine geringe Aktivität der beiden Enzyme beobachtet werden.

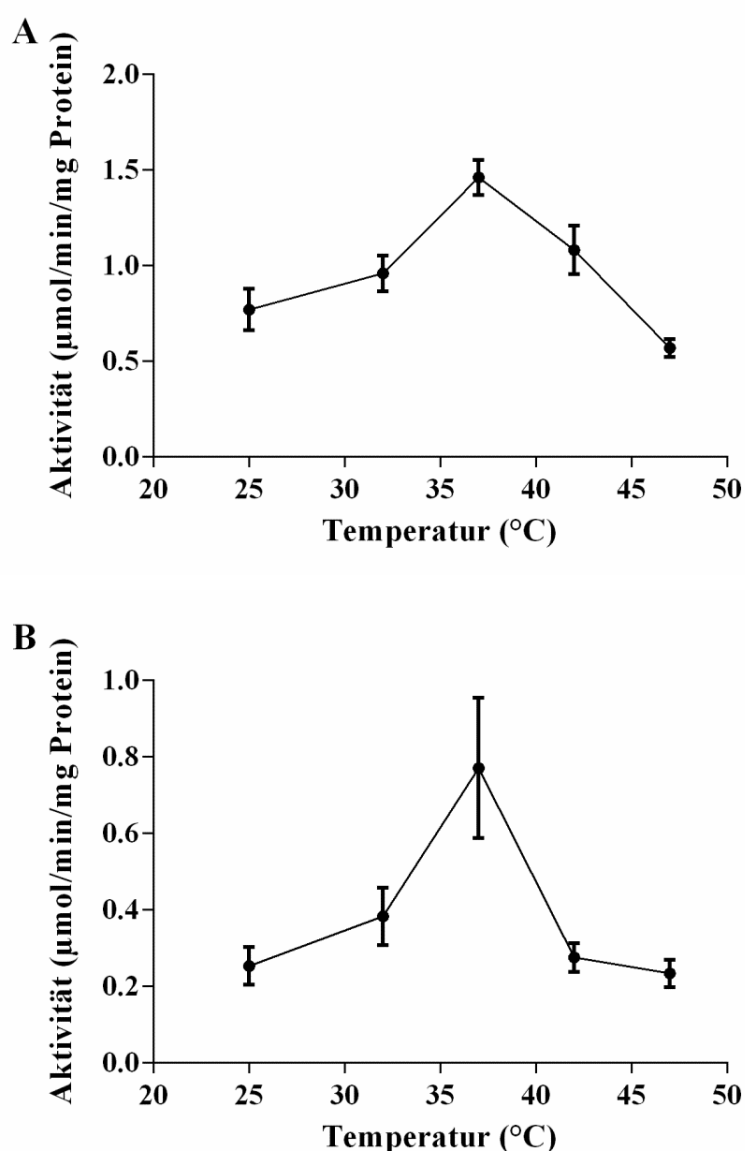


Abbildung 29: Einfluss der Temperatur auf die Aktivitäten der AD (A) und CK (B). Darstellung der Aktivitäten (µmol/min/mg Protein) in Abhängigkeit von der Temperatur (°C). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.7.3 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max}

Im weiteren Verlauf der biochemischen Charakterisierung von Arginin Deiminase und Carbamat Kinase wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} unter optimalen Reaktionsbedingungen (siehe 3.7.1 und 3.7.2) ermittelt. Anhand der unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden die jeweiligen Enzymaktivitäten bestimmt und die kinetischen Konstanten durch Anpassung an die Funktion für eine enzymatisch katalysierte Reaktion nach Michaelis-Menten berechnet.

3.7.3.1 Arginin Deiminase

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante für L-Arginin wurde die Substratkonzentration von 0 - 20 mM variiert und die Aktivitätsmessung ansonsten wie unter 2.8.1 beschrieben mit 40 μg dialysiertem Enzym durchgeführt. Die kinetischen Parameter K_m und V_{max} wurden aus dem Verlauf der V/S-Charakteristiken eines Michaelis-Menten-Plots berechnet.

Die kinetische Analyse für die AD ergab einen K_m -Wert von 1,13 mM für L-Arginin und einen V_{max} -Wert von 1,51 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein. Der K_m -Wert spiegelt die Affinität des Enzyms für das Substrat wider. In der Abbildung 30 sind der hyperbolische Verlauf des Michaelis-Menten-Plots und die berechneten kinetischen Parameter als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

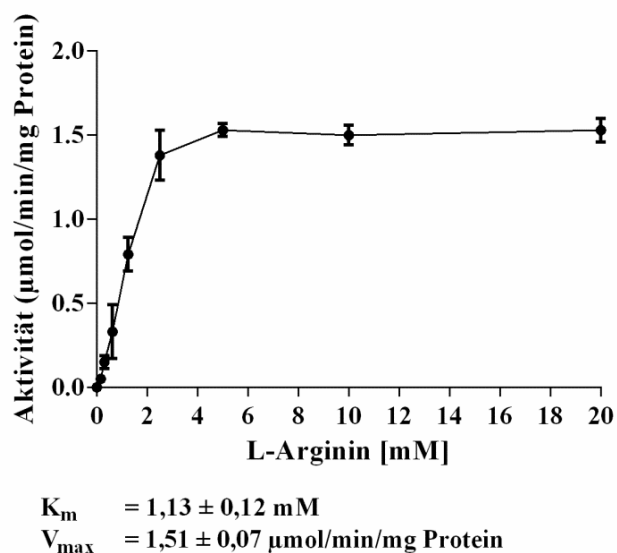


Abbildung 30: Kinetische Analyse der AD. Darstellung der Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration. n=3

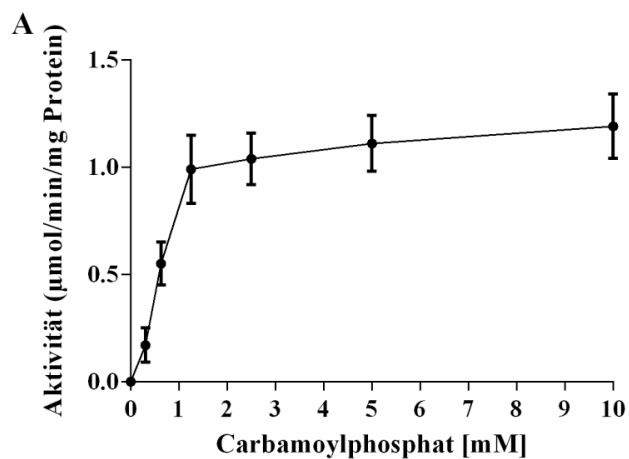
3.7.3.2 Carbamat Kinase

Für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten der Carbamat Kinase für die beiden Substrate Carbamoylphosphat und ADP wurde die Konzentration jeweils eines

Substrates von 0 - 10 mM variiert, während die andere Komponente bei 1 mM konstant blieb. Der Aktivitätstest wurde wie unter 2.8.2 beschrieben durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 30 μg Protein in einem Puffer aus 5 mM MgCl_2 und 100 mM MES/KOH (pH 6,5).

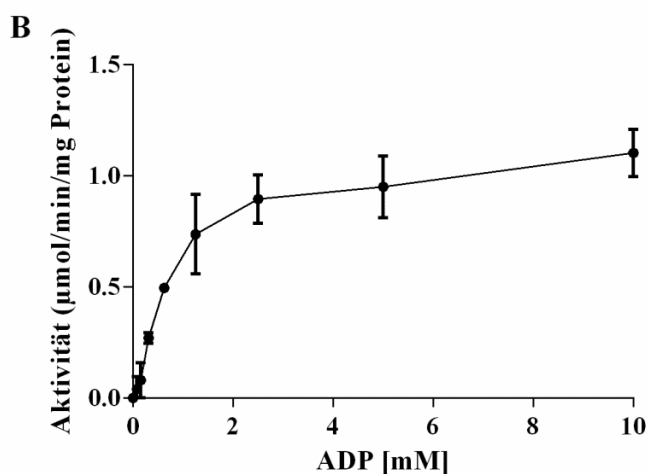
Die kinetische Charakterisierung der CK ergab einen K_m -Wert von 0,65 mM für Carbamoylphosphat und einen K_m -Wert von 0,72 mM für ADP sowie eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} von 1,1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein.

In der Abbildung 31 ist der Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen (mM) von Carbamoylphosphat (A) bzw. ADP (B) und die dazugehörigen K_m -Werte bzw. V_{max} -Werte als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.



$$K_m = 0,65 \pm 0,07 \text{ mM}$$

$$V_{\text{max}} = 1,11 \pm 0,13 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein}$$



$$K_m = 0,72 \pm 0,08 \text{ mM}$$

$$V_{\text{max}} = 1,10 \pm 0,10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein}$$

Abbildung 31: Kinetische Analyse der CK. Darstellung der Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) in Abhängigkeit der Konzentration [mM] von Carbamoylphosphat (A) und ADP (B). n=3

3.7.4 Regulation der Aktivität von Arginin Deiminase und Carbamat Kinase

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, welchen regulatorischen Einfluss die Stoffwechselprodukte des ADS auf die Enzymaktivitäten von AD und CK haben. Zu den in den Abschnitten 2.8.1 und 2.8.2 beschriebenen Aktivitätsmessungen wurden zusätzlich 10 mM potentielle allosterische Regulatoren zum Reaktionsansatz hinzugegeben, um eventuelle regulatorische Effekte nachzuweisen.

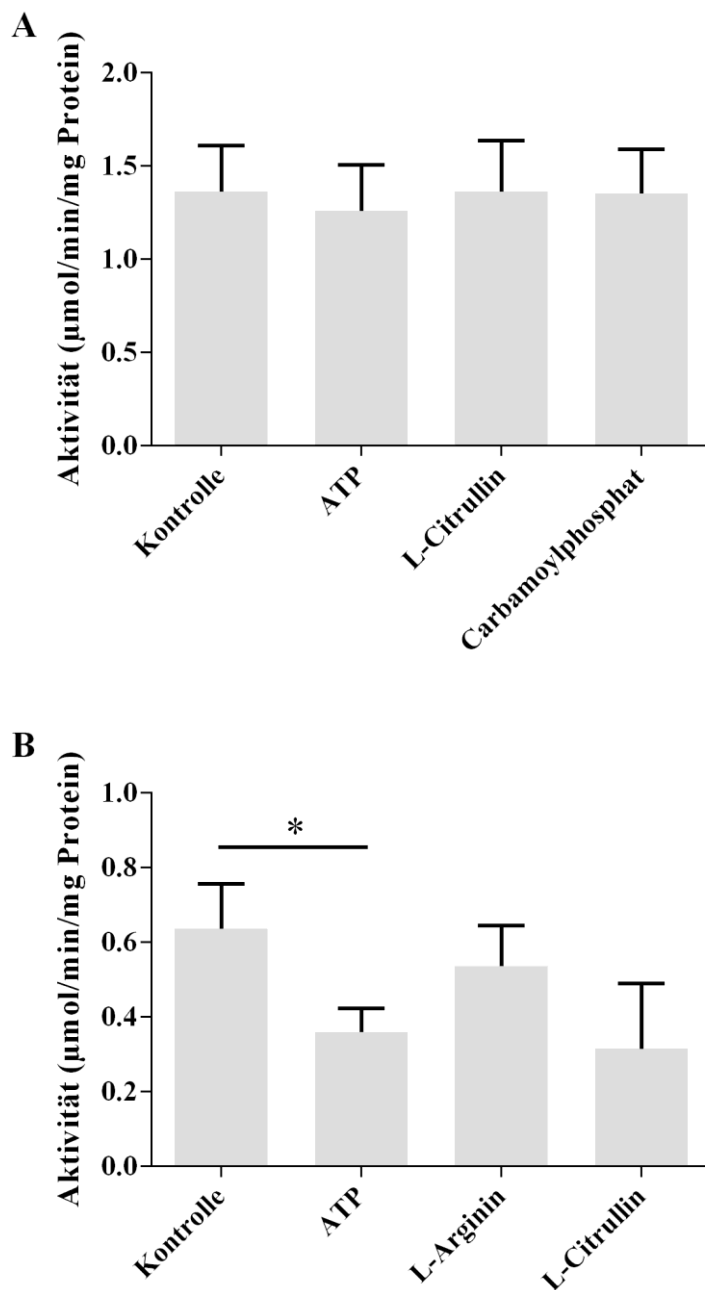


Abbildung 32: Einfluss von potentiellen allosterischen Regulatoren auf die Aktivität aufgereinigter AD (A) und CK (B) von *S. pyogenes* M49 (591). 10 mM der potentiellen Regulatoren wurden zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben. Die Aktivitäten ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein}$) sind als Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt (* statistisch signifikant, $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Intermediate ATP, L-Citrullin oder Carbamoylphosphat auf die AD Aktivität festgestellt werden (Abbildung 32 A). Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne die genannten Substanzen. Die CK Aktivität hingegen wurde durch Zugabe von 10 mM ATP um 50 % reduziert (Abbildung 32 B). L-Arginin und L-Citrullin hatten auch hier keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.

3.8 Inhibition des Wachstums von Tumorzellen durch den Einsatz der rekombinanten AD von *S. pyogenes*

Tumorzellen zeichnen sich durch eine vermehrte, unkontrollierte Zellproliferation aus. Durch den Einsatz von AD kann Arginin-auxotrophen Tumorzellen durch Abbau des im umgebenden Medium enthaltenen Arginins die Nährstoffgrundlage entzogen werden, was zu einer verminderten Zellteilung führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Tumorzelllinien auf antiproliferative Effekte durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnene AD aus *S. pyogenes* getestet. Hierfür wurden die Zelllinien (siehe 2.1.2) in den entsprechenden Kulturmedien in 96-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät und in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Für jede Zelllinie wurde eine definierte Zelldichte ausgesät (1 x 10⁵ Zellen). Zu den angewachsenen Zellen wurden je 0,41 U/ml, 4,15 U/ml und 41,5 U/ml AD zugesetzt und nach 72 h die Zellmenge mittels Kristallviolett-*Assay* bestimmt. Als Kontrolle wurden mit PBS behandelte Zellen mitgeführt.

3.8.1 Nachweis des ASS1-Expression

Eine erfolgsversprechende AD-Behandlung von Tumorzellen setzt voraus, dass die Krebszellen für die Aminosäure Arginin auxotroph sind. Daher wurde mittels PCR experimentell überprüft, ob die ausgewählten Zelllinien die Argininosuccinat Synthetase 1 exprimieren. ASS1 katalysiert die Synthesereaktion von Argininosuccinat aus Citrullin und Aspartat, und ist dementsprechend essentiell für die Argininbiosynthese.

Zur Überprüfung der ASS1-Expression wurde zunächst die RNA der verschiedenen Zelllinien isoliert und mittels reverse Transkriptase eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die cDNA diente als Matrize für die nachfolgende PCR mit ASS1-spezifischen Primern (Abbildung 33). Als Kontrolle wurde eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern mitgeführt, um ein Fehler in der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese ausschließen zu können.

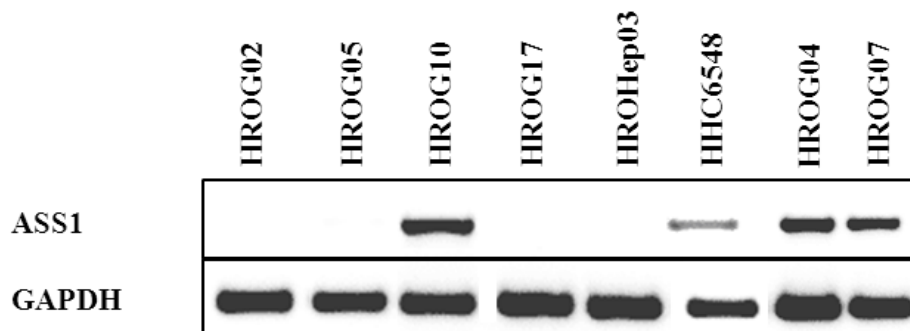


Abbildung 33: Nachweis des ASS1- und GAPDH-Expression mittels PCR. Dargestellt ist ein 1%iges Agarosegel mit den Amplifikationsprodukte von *ASS1* und *GAPDH* für die Zelllinien HROG02, HROG05; HROG10, HROG17, HROG04, HROG07 (Glioblastom), HROHep03 (Hepatokarzinom) und HHC6548 (Kolonkarzinom).

Für die Glioblastom-Linien HROG04, HROG07, HROG10 und für die Karzinom-Linie HHC6548 konnte mit den *AAS1*-spezifischen Primern ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Demzufolge wird die *ASS1* in diesen Zelllinien exprimiert. Für alle anderen getesteten Zelllinien (HROG02; HROG05; HROG017 und HROHep03) konnten keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden. Folglich wird in diesen Zelllinien die *ASS1* nicht exprimiert. Sie sind somit auxotroph für Arginin. Anhand der Amplifikationsprodukte mit den *GAPDH*-spezifischen Primer konnte ein Fehler in der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese ausgeschlossen werden.

3.8.2 Einfluss der AD auf die Proliferation von Tumorzellen

Zunächst wurden die Auswirkungen der AD auf die Proliferation von Glioblastomzellen untersucht. Bei vier von den sechs untersuchten Glioblastom-Linien (HROG02; HROG05; HROG010 und HROG017) konnten bereits bei einer AD-Konzentration von 0,415 mU/ml anitproliferative Effekte beobachtet werden (Abbildung 34). Eine Erhöhung der AD-Konzentration um das zehnfache auf 4,15 mU/ml verstärkte diesen Effekt. Die Unterschiede in der Zellmenge zwischen AD-behandelten und PBS-behandelten Zellen lagen zwischen 40 und 50 %. Eine weitere Erhöhung der AD-Konzentration auf 41,5 mU/ml führte zu keiner Verstärkung der zellproliferationshemmenden Effekte.

Für die Glioblastom-Linien HROG04 und HROG07 zeigten sich keine antiproliferativen Effekte während der Inkubation mit der AD. Beide Zelllinien wurden für die weiteren Kombinationsversuche nicht berücksichtigt.

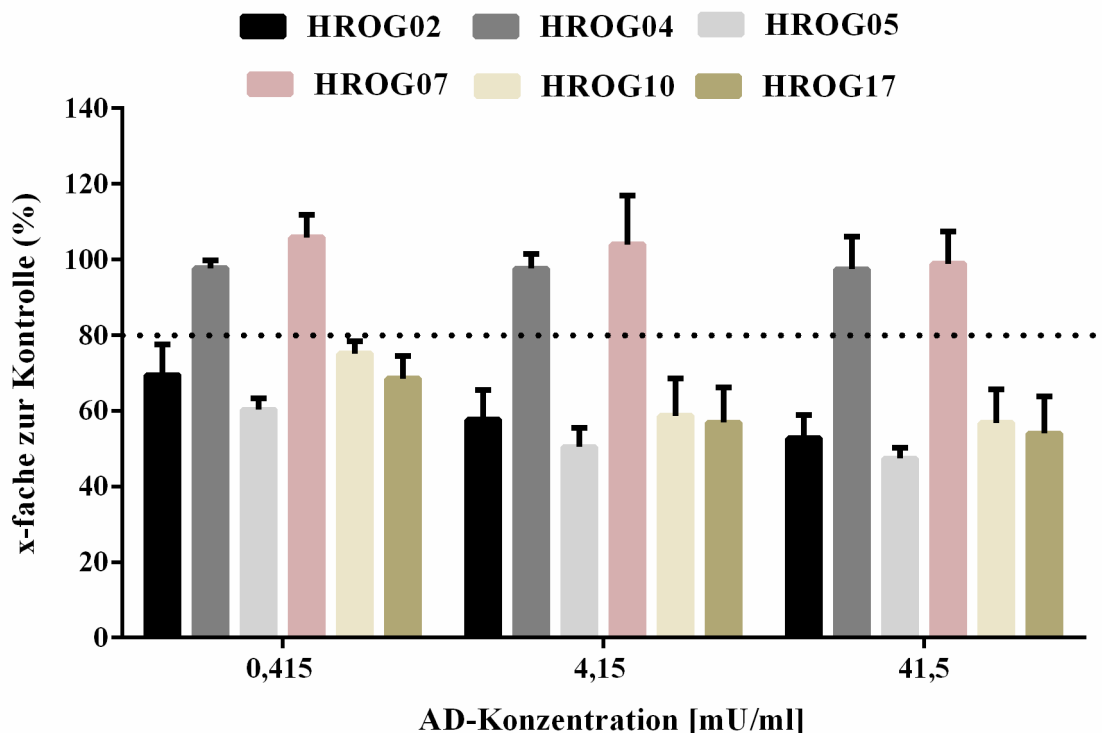


Abbildung 34: Auswirkungen der AD von *S. pyogenes* auf die Proliferation von Glioblastomzellen. Die Glioblastomzellen wurden für 72 h mit verschiedenen AD-Konzentrationen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, anschließend mit Kristallviolett gefärbt und die Absorption bei 570 nm gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (in %) mit Standardabweichung der AD-behandelten Zellen bezogen auf die PBS-behandelten Zellen von vier unabhängigen Versuchen. Balken unter der gestrichelten Linie zeigen eine mindestens 20%ige Hemmung der Zellproliferation.

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob eine Behandlungsmöglichkeit von Hepato- und Kolonkarzinomen durch die AD besteht. Hierfür wurden die hepatozelluläre Karzinomzelllinie (HROHep03) und die kolorektale Karzinomzelllinie (HHC6548) mit verschiedenen AD-Konzentration für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend erfolgte die Vitalfärbung der Zellen mit Kristallviolett und mittels Spektralphotometer wurde die Absorption bei 570 nm bestimmt. Nachfolgend sind die Ergebnisse in % Zellmasse der AD-behandelten Zellen bezogen auf die PBS-behandelten Zellen abgebildet (Abbildung 35).

Wie schon bei den Untersuchungen mit Glioblastomzellen führte die Behandlung mit der AD von *S. pyogenes* ebenfalls zu einer Reduzierung der Proliferation der hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen. Mit steigender AD-Konzentration konnte eine abnehmende Proliferation für beide Zelllinien beobachtet werden, wobei die AD-Behandlung eine effizientere Wirkung bei hepatozellulären Karzinomzelllinie (HROHep03) erzielte. Bei der AD-Behandlung der kolorektalen Karzinomzelllinie

(HHC6548) mit 4,15 mU/ml war durch die Hemmung der Proliferation eine 35%ige Verminderung der Zellmenge gegenüber den PBS-behandelten Zellen zu verzeichnen, während bei der hepatozellulären Karzinomzelllinie (HROHep03) ein 50%iger Unterschied zwischen den Zellmassen der AD- und PBS-behandelten Zellen beobachtet werden konnte.

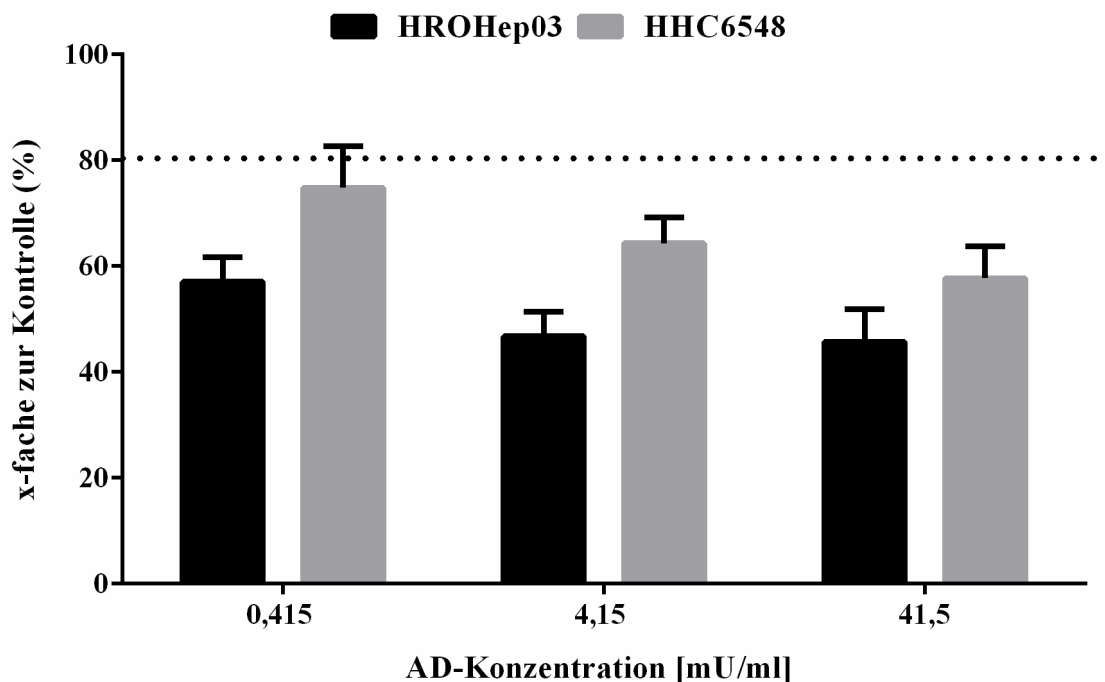


Abbildung 35: Auswirkungen der AD von *S. pyogenes* auf die Proliferation von hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen. Nach 72 h Kultivierung der Tumorzellen mit der AD bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mittels Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm gemessen. Als Kontrolle dienten mit PBS behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (in %) mit Standardabweichung der AD-behandelten Zellen bezogen auf die PBS-behandelten Zellen von vier unabhängigen Versuchen. Balken unter der gestrichelten Linie zeigen eine mindestens 20%ige Hemmung der Zellproliferation.

Die Untersuchungen sowohl an Glioblastomzellen als auch an hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen belegen eine zellproliferationshemmende Wirkung der AD von *S. pyogenes*. Für die nachfolgenden Kombinationsversuche mit Chemotherapeutika wurde eine AD-Konzentration von 4,15 mU/ml ausgewählt.

3.8.3 Zusammenspiel zwischen Zytostatika und Arginin Deiminase

3.8.3.1 Untersuchung der Auswirkung von Temozolomid und AD auf die Glioblastom-Linie HROG05

Eine Alternative bzw. Ergänzung zur Strahlentherapie ist die Behandlung von Tumorzellen mit Zytostatika. Für die Therapie von *Glioblastoma multiforme* wird häufig auf das alkylierende Zytostatikum Temozolomid zurückgegriffen (Stupp *et al.*, 2005). Um eventuelle additive Effekte zu prüfen, wurden Kombinationsexperimente mit Temozolomid und AD durchgeführt. Hierzu wurden die Glioblastomzellen mit 4,15 mU/ml AD in Kombination mit Temozolomid in Konzentrationen zwischen 0,375 - 1,5 μM inkubiert und die Zellmassen bestimmt wie im Abschnitt 2.9 beschrieben. Als Kontrollen dienten die mit PBS-behandelten HROG05-Zellen.

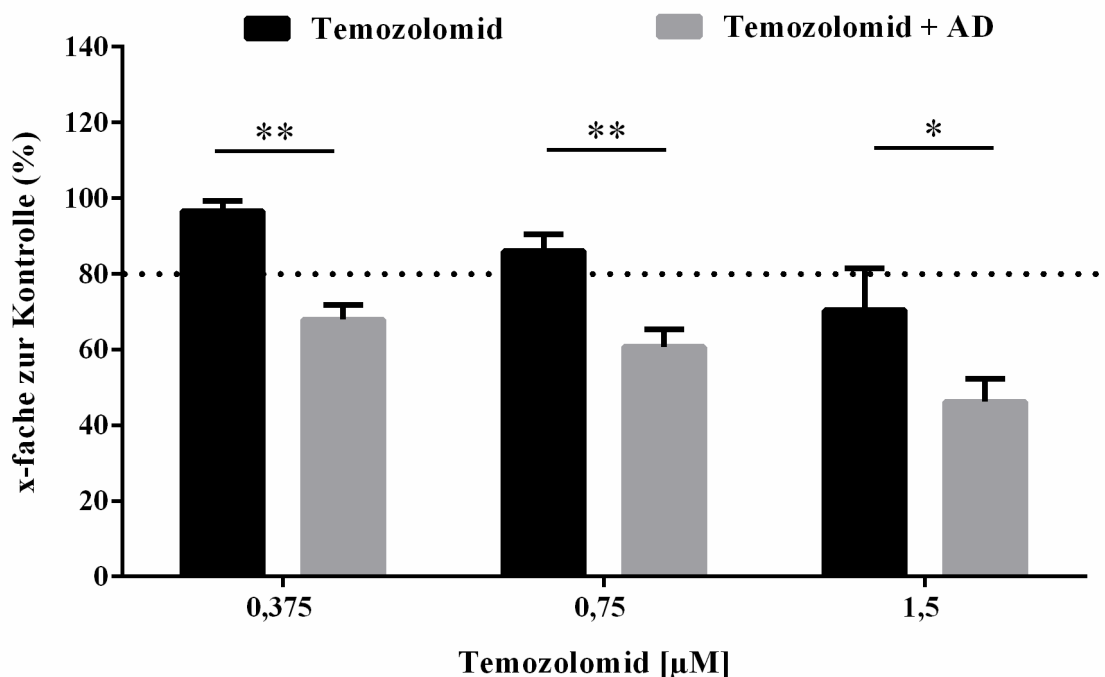


Abbildung 36: Auswirkung von Temozolomid in Kombination mit der AD von *S. pyogenes* auf die Glioblastom-Zelllinie HROG05. Die Zelllinie HROG05 inkubiert mit dem Zytostatikum Temozolomid allein und in Kombination mit 4,15 mU/ml AD für 6 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kontrolle dienen mit PBS-behandelte Zellen. Nach der Inkubation wurden die Zellmenge mittels Kristallviolett-Assay quantifiziert. Dargestellt sind die behandelten Zellen in Prozent bezogen auf die PBS-behandelten Zellen. Die Sternchen zeigen den signifikanten Unterschied zwischen den Temozolomid-behandelten und in Kombination behandelten Zellen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ungepaarter t-Test). Balken unter der gestrichelten Linie zeigen eine mindestens 20%ige Hemmung der Zellproliferation. n=3

Wie in der Abbildung 36 dargestellt ist, konnte mit steigender Temozolomidkonzentration eine sukzessive Abnahme der Proliferation der HROG05-Zellen

nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration des Zytostatikums (1,5 μM) bewirkte eine um 30 % verminderte Zellmassenproduktion. In Kombination mit AD konnte bereits bei der geringsten Temozolomidkonzentration (0,375 μM) ein signifikanter Unterschied zu den nur mit Temozolomid behandelten Zellen ($p < 0,01$; ungepaarter t-Test) beobachtet werden. Dieser antiproliferative Wirkungsgrad wurde durch Erhöhung der Temozolomidkonzentration auf 1,5 μM in Kombination mit der AD verstärkt. Die Vitalität der in Kombination behandelten Zellen fiel somit unter 50 %.

3.8.3.2 Untersuchung der Auswirkung von Irinotecan und AD auf die kolorektale Karzinomzelllinie HHC6548

Ein vielversprechendes Chemotherapeutikum zur Behandlung eines kolorektalen Karzinoms ist Irinotecan (Fuchs *et al.*, 2006). In den nachfolgenden Untersuchungen sollte experimentell überprüft werden, welche Auswirkungen eine Kombination von Irinotecan und AD auf die Darmkrebszelllinie HHC6548 hat. Hierfür inkubierten die Zellen zusammen mit dem Zytostatikum und dem Enzym für sechs Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 . Wie schon in Abschnitt 3.8.3.1 beschrieben ist, wurde auch in diesen Experimenten eine AD-Konzentration von 4,15 mU/ml verwendet. Die Konzentration von Irinotecan variierte von 0,1 – 2,5 μM . Als Kontrolle wurden PBS-behandelte Zellen mitgeführt. Die Analyse der Zellproliferation mittels Kristallviolett-Assay ist in der Abbildung 37 als Zellmenge in Prozent der Kontrolle dargestellt.

Ähnlich zur Untersuchung des Zytostatikums Temozolomid (Abschnitt 3.8.3.1) konnten auch in diesem Fall durch eine Kombination von Zytostatikum und Enzym signifikante Unterschiede beobachtet werden. Durch die Erhöhung der Irinotecankonzentration konnte eine sukzessive Abnahme der Zellproliferation nachgewiesen werden. Es zeigte sich ebenfalls, dass der zellproliferationshemmende Effekt durch die Zugabe der AD verstärkt wurde. Bei einer Konzentration von 0,5 μM Irinotecan konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; ungepaarter t-Test) zwischen den nur mit Zytostatikum behandelten und in Kombination behandelten Zellen beobachtet werden. Auch bei einer höheren Konzentration von Zytostatikum (2,5 μM) konnten diese Effekte beobachtet werden. Hierfür führte die Kombination aus Zytostatikum und Enzym führte zu einer um 70 % reduzierten Zellmenge gegenüber der Kontrolle.

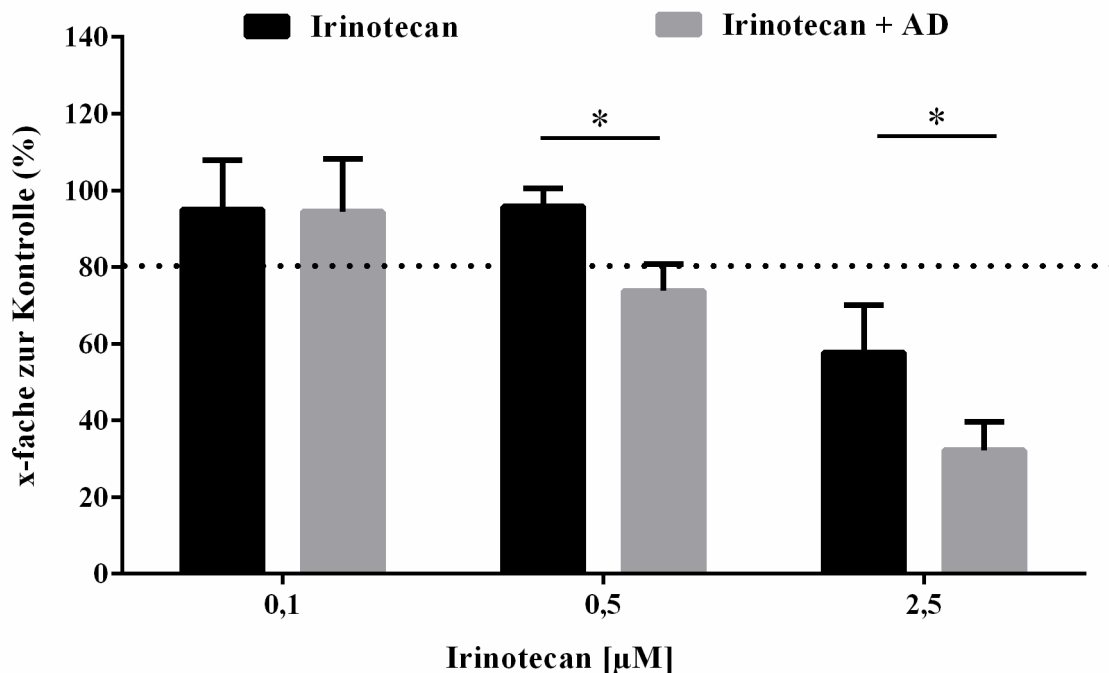


Abbildung 37: Auswirkung von Irinotecan in Kombination mit der AD von *S. pyogenes* auf die kolorektale Karzinomzelllinie HHC6548. Die Zelllinie HHC6548 inkubierten mit dem Zytostatikum Irinotecan allein und in Kombination mit 4,15 mU/ml AD für 6 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. PBS-behandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mittels Kristallviolett-Assay quantifiziert. Dargestellt sind die prozentualen Angaben der Massen der Irinotecan-behandelten Zellen und der in Kombination behandelten Zellen bezogen auf die PBS behandelte Kontrolle (statistisch signifikant, ungepaarter t-Test, * p < 0,05). Balken unter der gestrichelten Linie zeigen eine mindestens 20%ige Hemmung der Zellproliferation. n=3

Anhand der vorliegenden Resultate (siehe 3.8.3.1 und 3.8.3.2) könnte die *S. pyogenes* AD in Kombination mit Zytostatika (z.B. Temozolomid oder Irinotecan) als mögliche Therapieform zur Behandlung von verschiedenen Tumorarten zum Einsatz kommen.

4 Diskussion

Streptococcus pyogenes ist ein strikt humanpathogenes Bakterium, welches beim Menschen zu milden Infekten der Haut (z.B. Impetigo) sowie von Schleimhäuten (z.B. Pharyngitis), aber auch zu lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie Sepsis und nekrotisierender Fasziiitis, führen kann (Cunningham, 2000; Carapetis *et al.*, 2005). An der Ausprägung der zahlreichen Krankheitsformen sind, neben den verschiedenen Virulenzfaktoren, auch Oberflächen-assoziierte Stoffwechsellzyme wie die Enolase, die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase oder auch die Arginin Deiminase beteiligt, die das Pathogen zu einer erfolgreichen Kolonisierung des Wirtes befähigen und seine intrazelluläre Persistenz ermöglichen (Pancholi und Fischetti, 1992 und 1998; Degnan *et al.*, 2000). Es wird daher von einer Bifunktionalität der zelloberflächen-lokalisierten Stoffwechsellzyme ausgegangen.

Die Arginin Deiminase von *S. pyogenes*, auch als *streptococcal acid glycoprotein* (SAGP) bezeichnet, katalysiert die initiale Reaktion des Argininabbaus und ist Bestandteil des Arginin Deiminase Systems (ADS). Bestehend aus Arginin Deiminase (AD), Ornithin Carbamoyltransferase (OCT) und Carbamate Kinase (CK) katalysiert dieses System die Umwandlung von Arginin zu Ornithin. Dabei werden zwei Mol Ammoniak, ein Mol Kohlenstoffdioxid und ein Mol ATP pro Mol umgesetztes Arginin produziert. In Bezug auf die mögliche Beteiligung der AD an der Pathogenese ist indes von Serotyp M3 und M5 bekannt, dass die AD eine wesentliche Rolle bei der Internalisierung durch Epithelzellen sowie bei der intrazellulären Persistenz spielt (Degnan *et al.*, 2000; Marouni *et al.*, 2003).

In ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der AD vom Serotyp M49 in Bezug auf das Wachstum und die intrazelluläre Persistenz sowie ihr Einfluss auf Aminosäure- und Primärmetabolismus untersucht.

4.1 Die Rolle der AD von *S. pyogenes* M49

4.1.1 Einfluss der AD auf Wachstum, Vitalität und Persistenz

Das ADS gilt als eines der wichtigsten argininabbauenden Systeme innerhalb der Prokaryoten (Zuniga *et al.*, 2002b). Beispielsweise sind Mycoplasmen in der Lage mit Arginin als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen (Cunin *et al.*, 1986; Schimke *et al.*, 1966). Solch ein wachstumsfördernder Effekt durch die ATP-Produktion über das ADS scheint für GAS nicht zuzutreffen. Diese Theorie konnte in dieser Arbeit anhand von Wachstumsanalysen des Stamms M49 (591) und einer $\Delta arcA$ -Mutante in

Komplexmedium THY und in chemisch-definiertem CDM-LAB-Medium bestätigt werden.

Unter Standardbedingungen zeigten sich keine Unterschiede im Verlauf der Wachstumskurven und damit kann ein signifikanter wachstumsfördernder Effekt durch die zusätzliche ATP-Produktion unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden. In den Arbeit von Marouni (2003) konnte jedoch ein Einfluss der AD auf das Wachstum eines GAS Serotyp M3 Stammes gezeigt werden (Marouni *et al.*, 2003). In diesem Fall wies die $\Delta arcA$ -Mutante in der logarithmischen Wachstumsphase eine geringere Wachstumsrate auf als der Wildtyp. Die auftretenden Unterschiede im Wachstum der $\Delta arcA$ -Mutanten der Serotypen M3 und M49 könnte anhand der unterschiedlichen Genotypen und damit verbunden, dem veränderten Muster der Genexpression erklärt werden (Marouni *et al.*, 2003; Lembke *et al.*, 2006).

In weiterführenden Wachstumsanalysen der vorliegenden Arbeit, zeigten sich unter Säurestress ebenfalls Unterschiede zwischen dem Wachstumsverhalten von Wildtypstamm M49 und $\Delta arcA$ -Mutante. Dies lässt vermuten, dass das ADS eine wesentliche Rolle in der Säure-Base-Physiologie von *S. pyogenes* spielt. Sowohl Wildtyp als auch Mutante ließen sich im angesäuerten THY-Medium (pH 5,0) nicht kultivieren. Nach Supplementation von Arginin war nur der Wildtyp wieder in Lage zu wachsen. Der Grund hierfür ist ein Überschuss an frei verfügbarem Arginin, welches sofort zur pH-Regulierung verstoffwechselt wird. Im Vergleich dazu stagnierte das Wachstum der Bakterien ohne Arginin-Supplementation in der *lag*-Phase. Ausschlaggebend ist die Limitierung des freiverfügbaren Arginins im Medium. In diesem Fall verfügen die Bakterien erst durch den Abbau von Peptonen mit Hilfe von sekretierten GAS-Proteasen und GAS-Peptidasen über Arginin, welches direkt für die pH-Regulierung genutzt werden kann. Die Zeit für die Expression der zusätzlichen Enzyme bzw. die Menge an Arginin ist offensichtlich nicht ausreichend, um den pH-Wert zu stabilisieren, bevor die Zellyse eintritt.

Bei der Untersuchung der bakteriellen Überlebensfähigkeit unter sauren Bedingungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Überleben an die Funktionalität des ADS und an die Verfügbarkeit von Arginin geknüpft ist. Nur mit der Supplementation von Arginin kann der Wildtyp durch die Ammoniumproduktion dem Säurestress entgegenwirken, während die $\Delta arcA$ -Mutante dazu nicht in der Lage war. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass weitere ammoniumproduzierende Stoffwechselwege, wie zum Beispiel der Abbau von Serin durch die Serin Dehydratase (E.C.: 4.3.1.17) oder der Abbau von Glutamin bzw. Asparagin durch die Asparaginase (E.C.: 3.5.1.1), nicht für die pH-Regulierung von *S. pyogenes* verwendet werden (LaSarre und Federle; 2011; McShan *et al.*, 2008).

Damit ist bewiesen, dass *S. pyogenes* das ADS und Arginin für die Regulierung des pH-Wertes nutzt, um die säuresensitiven Strukturen der Zelle zu schützen. Dies geschieht zum einen durch die Produktion von Ammonium, das den intrazellulären und extrazellulären pH ansteigen lässt. Zum anderen geschieht es durch die Generierung von ATP, welches für die H⁺-ATPase genutzt werden kann. Mit Hilfe der H⁺-ATPase können zusätzliche H⁺ gegen Konzentrationsgradienten auf Kosten von ATP aus der Zelle in die extrazelluläre Umgebung transportiert werden (Poolman *et al.*, 1987; Degnan *et al.*, 2000; Gruening *et al.*, 2006; Levering *et al.*, 2012). Diese Art der pH-Regulierung zum Schutz vor Säurestress wurde bereits in Arbeiten für orale Streptokokken wie *S. sanguis* und *S. milleri*, für das Milchsäurebakterium *L. lactis* und das humanpathogene Bakterium *L. monocytogenes* ausführlich beschrieben (Poolman *et al.*, 1987; Curran *et al.*, 1995; Degnan *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, welche Rolle die AD für die bakterielle Überlebensfähigkeit von *S. pyogenes* M49 in humanem Vollblut spielt. Die $\Delta arcA$ -Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp unter diesen Bedingungen nach drei Stunden eine 87%ige Wachstumsreduktion. Dies deutet darauf hin, dass durch die Deletion der AD die Bakterien die Fähigkeit der Bakterien mindert, sich vor der Immunabwehr des Wirtes zu schützen.

Die aus den Blutmonozyten gebildeten Makrophagen sind ein Teil der angeborenen Immunantwort und spielen eine entscheidende Rolle für die Kontrolle und die Bekämpfung einer bakteriellen Infektion (Cusumano *et al.*, 2013). Die bakteriostatischen und bakteriziden Wirkungen von Makrophagen beruhen auf dem Zusammenspiel von im Phagolysosom befindlichen Enzymen, reaktiven Sauerstoff/Stickstoffverbindungen und sauren pH-Bedingungen (Haas 1998; Goldmann *et al.*, 2007, Goldmann *et al.*, 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die AD der Bakterien in der frühen Phase der intraphagolysosomalen Persistenz einen entscheidenden Einfluss hat.

Während die Bakterien in den Phagolysosomen persistieren, kommt es bei der Phagolysosomenreifung zu einer starken Ansäuerung (pH 4,5 - 5,0) des Kompartiments durch die vakuolären V-ATPasen (Myers *et al.*, 1995; Haas 1998). Die Ansäuerung der Phagolysosomen hat im Wesentlichen zwei Funktionen: 1. Die Verringerung der enzymatischen Aktivitäten der bakteriellen Glykolyse und 2. Die Aktivitätssteigerung von im Phagolysosomen befindlichen Hydrolasen, welche ein Aktivitätsmaximum in saurem Milieu aufweisen (Casiano-Colon und Marquis, 1988; Haas 1998).

In der Literatur wird daher vermutet, dass das ADS der Bakterien zur Neutralisierung des intraphagolysosomalen pH-Wertes verwendet wird und die zusätzliche ATP-Synthese zur Aufrechterhaltung des energetischen Statuts dient (Casiano-Colon und Marquis, 1988; Degnan *et al.*, 2000). Um diese näher zu untersuchen, wurden Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante mit Mausmakrophagen der Zelllinie J774 kokultiviert.

In den Versuchen zur Kokultivierung wurde festgestellt, dass die Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Sterberate aufwies. Grund dafür war vermutlich die arginolytische Ammoniumproduktion, die den intraphagolysosomalen pH-Wert an hob, und somit dem Wildtyp eine verbesserte Überlebenschance im Phagolysosom ermöglichte. Im Vergleich dazu konnte die Mutante der Ansäuerung des Phagolysosoms nicht entgegensteuern und zeigte eine signifikant verringerte Überlebensfähigkeit (11 %) gegenüber dem Wildtyp. Fraglich bleibt jedoch, ob das verfügbare Arginin von ca. 1 mM in den Phagolysosomen ausreicht, um den pH-Wert zu stabilisieren, da die vakuolären V-ATPasen weiterhin H^+ in die Phagolysosomen pumpen (MacAllister *et al.*, 2000). Neben der Hydrolyse von Peptiden zur zusätzlichen Gewinnung von Arginin konnte für orale Streptokokken gezeigt werden, dass Sialinsäure, ein Derivat der Neuraminsäure, als eine weitere Argininquelle verstoffwechselt wird (Casiano-Colon und Marquis, 1988; Degnan *et al.*, 2000). Dies wäre ein alternativer Weg zur pH-Regulierung.

In diesem Zusammenhang spielt der intrazelluläre Argininspiegel in den Makrophagen für die Virulenz von *S. pyogenes* eine weitere wesentliche Rolle, da Arginin ebenfalls für die Bildung von reaktiven Stickstoffverbindungen durch die Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) benötigt wird. Während einer bakteriellen Infektion wird die iNOS hochreguliert und dient als initialer Abwehrmechanismus (Goldmann *et al.*, 2004; Mishalian *et al.*, 2011). In einer parallel laufenden Studie von Cusumano (2013) konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Arginkonzentration und die damit verbundene NO-Produktion einen entscheidenden Einfluss auf die Eindämmung einer Infektion durch die angeborene Immunantwort hatte (Cusumano *et al.*, 2013). Durch den bakteriellen Argininabbau steht der wirtseigenen iNOS weniger Arginin zur Verfügung. Aufgrund des niedrigen Argininspiegels können weniger radikale Stickstoffmonoxide durch iNOS gebildet werden, dies führt zu einer reduzierten bakteriziden Wirkung der Makrophagen (Cusumano *et al.*, 2013). Damit kommt der AD auch eine immunmodulatorische Bedeutung zu.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zur Vitalität und Persistenz zum einen, dass die Deletion der AD keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. pyogenes* M49 in Labormedien hat, und zum anderen, dass das ADS der entscheidende Stoffwechselweg zur Bewältigung des Säurestresses ist. Damit ist eine Beteiligung des ADS an der Pathogenese von *S. pyogenes* M49 wahrscheinlich, denn sowohl ein niedriger Multiplikationsfaktor im humanen Vollblut als auch eine höhere Sterberate im Phagolysosom der $\Delta arcA$ -Mutante deuteten auf eine verringerte Virulenz hin. Zusammen mit den Ergebnissen der Arbeit von Cusumano (2013) konnten damit entscheidende Erkenntnisse zur Rolle des AD in der Pathogenese von *S. pyogenes*-Infektionen gewonnen werden (Cusumano *et al.*, 2013).

4.1.2 Einfluss der AD auf den Primärmetabolismus und den Aminosäurestoffwechsel

GAS verfügen nur über Teile des Zitronensäurezyklus, d. h. die Energiegewinnung erfolgt hauptsächlich über die Glykolyse und den Pyruvat-Stoffwechsel (Beres *et al.*, 2002; Ferretti *et al.*, 2001; Smoot *et al.*, 2002). Bereits in der Veröffentlichung von Fiedler (2011) wurde in Glukose-limitierten Chemostatkulturen der Zentralstoffwechsel von *S. pyogenes* M49 untersucht und mit weiteren Milchsäurebakterien verglichen (Fiedler *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass *S. pyogenes* die Glukose vorwiegend zu Laktat abbaut. Neben dem Hauptprodukt Laktat unterschied sich jedoch die Menge an Produkten der gemischten Säuregärung wie Formiat, Acetat und Ethanol. Bei langsamer Durchflussrate (0,05/h), unabhängig vom pH-Wert, wurden höhere Mengen an Formiat, Acetat und Ethanol produziert, während bei hoher Durchflussrate (0,15/h) nur geringe Mengen an Produkten der gemischten Säuregärung gebildet wurden und die Laktat-Produktion anstieg. Es wird daher davon ausgegangen, dass bei langsamem Wachstum, unabhängig vom pH-Wert, GAS die Glukose zusätzlich über die gemischte Säuregärung abbauen und bei schnellem Wachstum zum größten Teil über die Homolaktatgärung (Fiedler *et al.*, 2011).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fermentationsanalysen zeigten jedoch Abweichungen mit der in der Literatur beschriebenen Datenlage. Bei langsamer Durchflussrate (0,05/h) und pH 6,5 wurde die Glukose vorwiegend zu Laktat abgebaut und, im Vergleich zu publizierten Daten, nur geringe Menge an Produkten der gemischten Säuregärung. Eine mögliche Ursache wäre das gegenüber Fiedler *et al.*, (2011) modifizierte CDM-LAB-Medium mit erhöhter Arginin- und Bicarbonatkonzentration. Denn sowohl die Aminosäure als auch die anorganische Kohlenstoffverbindung sind wichtige Schlüsselmoleküle im Metabolismus von GAS.

In der Literatur beschrieben Asanuma und Hino (2000) einen analogen Glukosestoffwechsel von *Streptococcus bovis* (Asanuma und Hino, 2000). Sie begründeten die Ergebnisse durch die pH-abhängigen Expressionen und Enzymaktivitäten von Pyruvat Formiat Lyase (E.C.: 2.3.1.54) und Laktatdehydrogenase (E.C.: 1.1.1.27). Bei einem niedrigen pH wird sowohl die Expression als auch die Aktivität der Pyruvat Formiat Lyase (PFL) verringert. Im Gegensatz dazu bewirkt ein niedriger pH-Wert eine verstärkte Expression und eine erhöhte Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH). Folglich wird bei niedrigem pH die Glukose vorwiegend zu Laktat abgebaut (Asanuma und Hino, 2000). Ein ähnlicher regulativer Effekt könnte auch die hier gemachten Beobachtungen an *S. pyogenes* erklären.

Trotz der pH-abhängigen Regulation von PFL und LDH könnten weitere Faktoren eine Rolle für den Wechsel im Primärmetabolismus von GAS spielen. Zum Beispiel könnten die erhöhte intrazelluläre Argininkonzentration und der niedrige pH-Wert eine

Aktivierung des ADS bewirken, welches zur Regulierung des extra- und intrazellulären pH-Wertes und zur ATP-Generierung genutzt wird. Diese Theorie wird durch die biochemische Charakterisierung der AD und CK von *S. pyogenes* M49 unterstützt, da das pH-Optimum beider Enzyme bei pH 6,5 liegt (Hering *et al.*, 2013). Zudem konnte für einige Clostridien-Spezies sowie für *S. pyogenes* und *Lc. lactis* gezeigt werden, dass der intrazelluläre ADP/ATP-Spiegel ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die gemischte Säuregärung hat. Beispielsweise inhibiert ein erhöhter ATP-Spiegel die in der gemischten Säuregärung involvierten Enzyme Pyruvat Formiat Lyase und Alkoholdehydrogenase (Thauer *et al.*, 1972; Palmfeldt *et al.*, 2004; Levering *et al.*, 2012). Trotz der Inhibition der gemischten Säuregärung werden über den Argininabbau und den homofermentativen Glukosestoffwechsel ebenso drei Mol ATP generiert.

Für *Lc. lactis* ist zudem beschrieben, dass die intrazelluläre Konzentration von Triosephosphaten wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) sowie das NADH/NAD⁺-Verhältnis eine wesentliche Rolle im Wechsel von Homolaktat- zu gemischter Säuregärung spielen (Garrigues *et al.*, 1997; Neves *et al.*, 1997). Ein erhöhtes NADH/NAD⁺-Verhältnis hat zum Beispiel einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der GAPDH. Der damit verbundene Anstieg der Konzentrationen von GAP und DHAP hat eine hemmende Auswirkung auf die PFL-Aktivität zufolge. Unter diesen Bedingungen erfolgt der Pyruvat-Stoffwechsel in Richtung Homolaktat. Zudem begünstigt ein erhöhtes NADH/NAD⁺-Verhältnisses die LDH-Aktivität und damit die Homolaktatgärung (Garrigues *et al.*, 1997). Eine analoge Regulation wurde ebenso für *S. pyogenes* in der Literatur beschrieben (Levering *et al.*, 2012).

Die Deletion von *arcA* hatte ebenfalls einen Einfluss sowohl auf die Fermentation von Glukose als auch auf den Aminosäurestoffwechsel von *S. pyogenes*. In den Glukose-limitierten Kulturen (D = 0,05/h) erfolgte die Energiegewinnung der Mutante, unabhängig vom pH-Wert, hauptsächlich über den homofermentativen Glukosestoffwechsel. Dabei könnte die Akkumulation von Arginin als Stickstoff- und Energiequelle eine entscheidende Rolle spielen und somit eine Modifizierung des Zentralstoffwechsels auf Homolaktatgärung bewirken

Darüber hinaus ist die Mutante durch die Deletion des *arcA*-Genes nicht in der Lage Carbamoylphosphat (CP) über das ADS zu bilden, welches für die Pyrimidin Biosynthese benötigt wird. Um das fehlende Carbamoylphosphat zu kompensieren, könnte die Mutante die Carbamoylphosphat Synthetase (E.C.: 6.3.4.16) nutzen und synthetisiert somit das Carbamoylphosphat über den Glutaminabbau. Dies bedeutet jedoch einen Nettoverlust von einem Mol ATP, da für diesen Syntheseweg zwei Mol ATP benötigt werden. Um ein energetisches Defizit zu umgehen, verwertet die Mutante vermutlich nur das Uracil im Medium und hemmt die Expression der

Carbamoylphosphat Synthetase. Dies bedeutet jedoch, dass aus dem Carbamoylphosphat durch die CK kein CO₂ gebildet wird, und gerade die anorganischen Kohlenstoffverbindungen (AK) wie CO₂ und Bicarbonat gelten in der Literatur als wichtige Regulatoren für die Genexpression in Mikroorganismen (Stretton und Goodman, 1998). Sie können die pH-Homöostase und Protonenbewegung durch Carboxylierung/Decarboxylierungsreaktionen beeinträchtigen oder sie verändern die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Enzymen, wie Löslichkeit oder Struktur (Konings *et al.*, 1997; Konings 2002; Stretton und Goodman, 1998). Für Milchsäurebakterien spielen AK eine wichtige Rolle als Zwischenprodukte bei der Biosynthese von Aminosäuren oder Nukleotiden (Arsene-Ploetze und Bringel, 2004). Somit könnte die intrazelluläre Konzentration an AK nicht nur den Primärstoffwechsel der *ΔarcA*-Mutante sondern auch den des Wildtyps beeinflussen.

Weiterhin wurde der Einfluss der AD auf den Aminosäurestoffwechsel von GAS näher untersucht. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Chemostatanalysen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *arcA*-Gens einen Einfluss auf den Ammonium- und Serinstoffwechsel hatte. In den kontinuierlichen Kulturführungen bei pH 7,5 wurde die Ammoniumproduktion von GAS nicht über den Arginin- sondern über den Serinkatabolismus gesteuert. Die *ΔarcA*-Mutante verstoffwechselte weniger Serin im Vergleich zum Wildtyp und produzierte dadurch auch weniger Ammonium. Der Argininverbrauch von Wildtyp und *ΔarcA*-Mutante war annähernd ausgeglichen. Somit konnte die Ammoniumbildung zum größten Teil nur über den Serinkatabolismus erfolgen. Der Serinabbau erfolgt in GAS und anderen Organismen über die Serin Dehydratase (E.C.: 4.3.1.17) zu Ammonium und Pyruvat, welches direkt über die gemischte Säuregärung bzw. über die Milchsäuregärung weiter abgebaut wird. Die Art der nachfolgenden Säuregärung hängt dabei von dem jeweiligen Organismus ab. Während *Lb. plantarum* aus Serin vorwiegend Formiat, Acetat und Ammonium produziert, reduziert *Lc. lactis* das aus dem Serinabbau entstandene Pyruvat zu Laktat (Liu *et al.*, 2003b; Kristoffersen und Nelson, 1955; Novak und Loubiere 2000). Das gebildete Ammonium kann wiederum für Transaminierungen verwendet werden bzw. um die Säureproduktion aus dem Glukoseabbau auszugleichen (Fernandez und Zuniga, 2006; LaSarre und Federle; 2011).

In der Literatur sind unterschiedliche Auffassungen zur Bedeutung des Serinstoffwechsels zu finden. Für *Lc. lactis* ist beschrieben, dass durch Supplementation von Serin die Biomasseproduktion erhöht wird, jedoch hatte die Supplementation für *Lb. plantarum* keine Effekte auf die Wachstumsausbeute (Benthin und Villadsen 1996; Liu *et al.*, 2003b). Für GAS wird hingegen spekuliert, dass der Serinstoffwechsel ebenfalls zur pH-Regulierung genutzt wird (LaSarre und Federle; 2011).

Diese Theorie konnte für *S. pyogenes* M49 in den Versuchen zum bakteriellen Überleben unter sauren Bedingungen widerlegt werden, da GAS den pH-Wert allein durch den Serinabbau nicht regulieren konnten. Mit Hilfe der Serin Dehydratase (SDH) wird zwar Ammonium produziert aber auch Pyruvat, welches weiter zu Laktat oder zu Formiat und Acetat abgebaut wird, dadurch wird die Ansäuerung durch den Serinabbau wiederum gefördert. Dazu kommt, dass der optimale pH-Wert der SDH für die meisten Organismen im Bereich von neutral bis schwach alkalisch liegt (Gannon *et al.*, 1977; Farias *et al.*, 1991; Laroche *et al.*, 2003). Damit wird wiederum verdeutlicht, dass das ADS der entscheidende Stoffwechselweg zur pH-Regulierung in GAS ist.

Dies bestätigten die Chemostatanalysen bei pH 6,5. Der Wildtyp produzierte mehr Ammonium bei pH 6,5 im Vergleich zu pH 7,5. Wie oben bereits erwähnt, führte die pH-Absenkung vermutlich zur Aktivierung des ADS. Dies könnte den verstärkten Argininabbau bei pH 6,5 erklären, der einen Großteil der Ammoniumproduktion ausmachte. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass der Serinstoffwechsel ebenfalls zur Ammoniumproduktion beitrug, da ein verstärkter Serinabbau bei pH 6,5 beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu verwertete die $\Delta arcA$ -Mutante, unabhängig vom pH-Wert; geringere Mengen an Serin und zeigte zudem eine verminderte Ammoniumproduktion. Dies hängt vermutlich mit dem Rgg-Regulatorprotein zusammen, das in GAS auch als RopB (*regulator of protease B*) bekannt ist (Dmitriev *et al.*, 2006).

Der Transregulator RopB hat nicht nur einen Einfluss auf die Expression von Virulenz- und Transkriptionsfaktoren sondern auch auf die Expression von Stoffwechsellzymen, die für die Anpassung an die Umgebung und die damit verbundene Verwertung von Substraten entscheidend sein können (Kapur *et al.*, 1993; Chaussee *et al.*, 1999 und 2003). In der Literatur ist zudem beschrieben, dass Rgg eine wichtige Rolle in der Regulation von AD und SDH hat und damit einen entscheidenden Einfluss auf Ammoniumproduktion und pH-Regulierung in GAS (Chaussee *et al.*, 2003). Durch die Deletion des *arcA*-Gens wird das ADS unterbrochen und steht somit nicht mehr für die pH-Regulierung zur Verfügung. Aus diesem Grund reprimiert vermutlich Rgg den Serinkatabolismus, um eine weitere Ansäuerung durch den Serinabbau zu vermeiden, da die Zellen über das ADS der Ansäuerung nicht entgegenwirken können. Damit konnte gezeigt werden, dass der Serin- und der Argininstoffwechsel in GAS eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig regulieren. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Annahme zu verifizieren.

Zusammenfassend konnten durch die Auswertung der Stoffwechselflüsse wichtige Erkenntnisse zu Gärungs- und Aminosäurestoffwechsel von *S. pyogenes* gewonnen werden. Jedoch sollten für die vollständige Aufklärung weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wie beispielsweise die Bestimmung der intrazellulären

Konzentration von Metaboliten, Messung von Enzymaktivitäten oder die Interaktionen der Stoffwechselwege untereinander. Zur vollständigen Aufklärung der Ursache für die Unterdrückung der gemischten Säuregärung in der $\Delta arcA$ -Mutante sollten Transkriptom- und Proteomanalysen vom Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante durchgeführt werden.

4.2 Kinetische Parameter und allosterische Regulation der AD und CK von *S. pyogenes* M49

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das ADS eine wichtige Rolle in der Pathogenese und im Metabolismus in GAS spielt. Für das bessere Verständnis des ADS auf enzymatischer Ebene wurden die ammoniumproduzierenden Enzyme AD und CK heterolog in *E. coli* DH5 α exprimiert und enzymkinetisch untersucht.

Ein zentraler Teil der biochemischen Charakterisierung von AD und CK bestand in der Bestimmung kinetischer Parameter. Darin inbegriffen war die Bestimmung der Michaelis-Konstanten, der pH- und Temperaturoptima sowie der allosterischen Regulatoren der Enzyme.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden zunächst das prokaryotische Expressions- und Reinigungssystem für die heterologe Expression etabliert. Dadurch war es möglich, ausreichend große Mengen rekombinanter und aktiver AD und CK zu gewinnen und die entsprechenden kinetischen Analysen durchzuführen.

4.2.1 Biochemische Charakterisierung der AD von *S. pyogenes* M49

Die Arginin Deiminase (E.C.: 3.5.3.6) aus *S. pyogenes* M49 gehört zu der Superfamilie der Guanidingruppen-modifizierenden Enzyme. Diese zeichnen sich durch die charakteristischen vier konservierten Motive FTRD, EGGDV, MHLDT und CMSxP und der katalytischen Triade C-H-[G, D] aus (Shirai *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2013). Die *S. pyogenes* AD, eine aus 411 Aminosäuren bestehende Hydrolase, setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Die erste Domäne enthält das aktive Zentrum und fünf $\beta\beta\alpha\beta$ -Motive, die sich um eine Pseudo-5-Faltachse wiederholen. Die zweite besteht aus vier orthogonalen Helix-Bündeln (Henningham *et al.*, 2013b).

Im Vergleich der Aminosäuren konnten hohe Sequenzidentitäten der AD von *S. pyogenes* zu anderen Spezies wie *Lc. lactis* (67 %), *E. faecalis* (46 %) und *M. arginini* (41,3 %) festgestellt werden (Hering *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2004). Trotz der hohen Homologien zeigten sich eine deutliche Abweichung in den K_m -Werten für das Substrat Arginin zu den anderen Spezies sowie eine auffällige Varianz in Temperatur- und pH-Optimum (siehe Tabelle 12). Eine mögliche Ursache dafür könnte

das unterschiedliche Nährstoffangebot in der natürlichen Umgebung und die resultierende Adaption an den Lebensraum sein.

Bei dem Vergleich des Temperaturoptimums der AD mit der optimalen Wachstumsrate der Organismen zeigte sich bei einigen Spezies eine deutliche Diskrepanz. Für *S. pyogenes* stimmt das ermittelte Temperaturoptimum der AD mit 37 °C mit der für das Wachstum optimalen Temperatur überein. Dies entspricht ebenfalls der Temperatur im menschlichen Körper, dem natürlichen Lebensraum von *S. pyogenes*. Jedoch scheint es nicht zwingend notwendig zu sein, dass das Temperaturoptimum der AD mit der Temperatur des natürlichen Lebensraums der Organismen korreliert. Das Temperaturoptimum der AD liegt für *Lactobacillus buchneri* und *Pseudomonas putida* bei 50 °C (Manca de Nadra *et al.*, 1984; Shibatani *et al.*, 1975), obwohl zum Beispiel das saprotrophe Bakterium *P. putida*, dessen natürlicher Lebensraum feuchte, warme Böden sind, eine optimale Wachstumsrate bei 20 – 30 °C hat (Moreno *et al.*, 2013). Eine deutliche Abweichung zeigt ebenfalls *Lc. lactis*, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 30 °C liegt. Die höchste Aktivität der AD wurde jedoch bei 60 °C gemessen (Hofvendahl *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu stimmt bei *B. cereus* die optimale Wachstumstemperatur, die zwischen 20 - 40 °C liegt, mit dem Temperaturoptimum der AD von 25 °C annähernd überein (Vilain *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der kinetischen Parameter der AD von bekannten Spezies

Stämme	K _m L-Arginin (mM)	Optimum pH	Optimum Temp. (°C)	Referenz
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,33	6,5	37	Diese Arbeit
<i>Lactococcus lactis</i>	8,67	7,2	60	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0,83	6,0	50	Manca de Nadra <i>et al.</i> , 1984
<i>Pseudomonas putida</i>	0,20	6,0	50	Shibatani <i>et al.</i> , 1975
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,14	5,6	25	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus cereus</i>	0,06	7,0	25	Li <i>et al.</i> , 2008

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der AD konnten im Gegensatz zu den Messungen des Temperaturoptimums keine großen Schwankungen in dem pH-Optimum gegenüber dem anderer Organismen beobachtet werden. Die optimalen pH-Werte für die in der Tabelle 12 beschriebenen Enzyme liegen vorwiegend im Bereich von neutral bis schwach sauer. Für einige *Lactobacillus*-Species erwies sich ein niedriger pH-Wert als besonders wichtig für die Induktion der ADS-Expression um dem Säurestress entgegen zu wirken (Arena *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2004; Angelis *et al.*, 2002b), wohingegen das schwach azide pH-Optimum der AD von *S. pyogenes* noch eine weitere physiologische Bedeutung hat. Das Pathogen nutzt das ADS um den sauren

pH-Wert der Hautoberfläche zu neutralisieren und diese besiedeln. Somit könnte es eine entscheidende Rolle in den ersten Schritten einer Infektion spielen (Lambers *et al.*, 2006).

In der Gesamtbetrachtung der Michaelis-Konstanten der in der Tabelle 12 aufgelisteten AD stellt sich ebenfalls die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Affinitäten zu dem Substrat Arginin und dessen Verfügbarkeit in der natürlichen Umgebung gibt. Der K_m -Wert der AD von *S. pyogenes* für Arginin beträgt 1,33 mM, während die AD von *Lc. lactis* einen sechsmal höheren K_m -Wert für Arginin aufweist. Dies korreliert mit der verfügbaren Menge an Arginin im menschlichen Plasma, welche mit etwa 0,075 mM relativ gering ist, und der Arginin Konzentration in Rohmilch, die im Vergleich mit 6 mM deutlich höher liegt (Armengou *et al.*, 2003; Payne-Botha und Bigwood, 1959).

Bei Untersuchungen der potentiellen allosterischen Regulatoren konnte gezeigt werden, dass die AD von *S. pyogenes* nicht durch die Zwischen- und Endprodukte des Argininabbaus reguliert wird. Während Citrullin und Carbamoylphosphat ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivitäten der AD verschiedener anderer Organismen haben, zeigte sich eine inhibierende Wirkung durch ATP auf die AD von *Lb. buchneri* (Manca de Nadra *et al.*, 1984). Für alle bisher in der Literatur untersuchten AD wurde diese Art der Regulation nur für *Lb. buchneri* beschrieben. Die Ursache der unterschiedlichen Regulation könnte dabei in der Struktur der AD liegen. In den meisten Fällen setzt sich die AD aus identischen Untereinheiten zusammen, die ein Homodimer bilden, beispielweise in *P. putida*, *M. arginini* und *S. pyogenes* (Shibatani *et al.*, 1975; Das *et al.*, 2004; Degnan *et al.*, 2000). Das Enzym in *Lc. lactis* ist hingegen als Homotrimer organisiert und in *P. aeruginosa* sogar als Homotetramer (Kim *et al.*, 2007; Galkin *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006). In der Abbildung 38 sind die Kristallstrukturen der AD von *P. aeruginosa* und *M. arginini* dargestellt. Trotz der unterschiedlichen Anzahl der Untereinheiten ist die katalytische Triade identisch, diese stimmt ebenfalls mit der katalytischen Triade von *S. pyogenes* überein (Ni *et al.*, 2008; Henningham *et al.*, 2013b). Für *Lb. buchneri* ist aktuell noch keine Kristallstruktur in der Literatur beschrieben. Anhand eines Vergleiches der Kristallstrukturen mit den anderen AD könnte somit die inhibierende Wirkung durch ATP auf die AD von *Lb. buchneri* aufgeklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung der Regulation der Aktivität von AD ist die computerunterstützte Berechnung der elektrostatischen Potentiale und der sich daraus ergebenden Bindungsaffinitäten in den katalytischen und allosterischen Bindestellen, wie es beispielsweise für Laktat-Dehydrogenasen verschiedener LAB beschrieben ist (Feldman-Salit *et al.*, 2013).

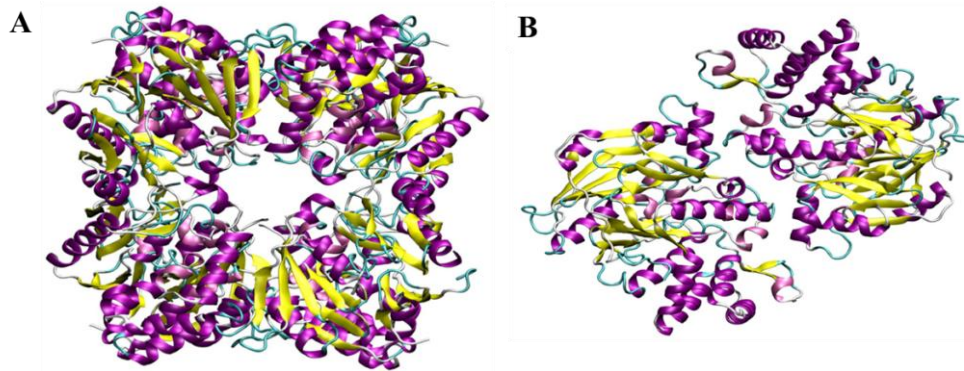


Abbildung 38: Vergleich der Kristallstruktur der AD von *P. aeruginosa* (A) und *M. arginini* (B). A) Die AD von *P. aeruginosa* setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen und bildet ein katalytisch aktives Homotetramer. B) Die AD von *M. arginini* besteht aus zwei identischen Untereinheiten und bildet ein Homodimer (Ni *et al.*, 2008).

Die gewonnenen Erkenntnisse tragen somit nicht nur zur Aufklärung der Funktionsweise der AD auf enzymatischer Ebene bei, sondern zeigen ebenfalls, dass die AD von *S. pyogenes* offensichtlich optimal bei 37 °C arbeitet.

Dieses Enzym könnte somit auch ein vielversprechender Kandidat für die Anwendung in der Behandlung von ASS-negativen Tumoren sein. Eine solche Behandlungsstrategie ist in der Literatur bereits beschrieben. Allerdings stellt die Immunogenität von mikrobiellen Proteinen wie der AD ein Problem dar. Um dies im menschlichen Körper zu umgehen, können pharmakologisch-interessanten Proteine mit dem Wirkstoffträger Polyethylenglykol verknüpft werden (Holtsberg *et al.*, 2002).

4.2.2 Biochemische Charakterisierung der CK von *S. pyogenes* M49

Die Carbamat Kinase (E.C.: 2.7.2.2) von *S. pyogenes* gehört zu der Enzymfamilie der Aminosäure Kinasen (Ramon-Maiques, 2010). Im Gegensatz zu der AD konnte für alle in der Literatur beschriebenen Carbamat Kinasen ein einheitlicher Aufbau aus zwei identischen Untereinheiten beobachtet werden. Demzufolge ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die CK von *S. pyogenes* ebenfalls wie die CK von *E. faecalis*, *E. faecium*, oder *P. aeruginosa* ein Homodimer bildet (Marina *et al.*, 1998; Abdelal *et al.*, 1982).

Zudem zeigte sich bei der Analyse der Aminosäuresequenzen eine zu 66,8 % identische Aminosäureabfolge zwischen der CK von *S. pyogenes* und von *E. faecalis* (Hering *et al.*, 2013). Ebenso korrelieren die Positionen der Aminosäurereste, die für die Bindungen der Substrate verantwortlich sind, zwischen den beiden Organismen. In *S. pyogenes* sind es die positiven Ladungen von Lys131 und Lys217, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Carbamoylphosphates interagieren, und die Reste der Aminosäure Thr238, Val240 und Met277, die die Bindung von ADP ermöglichen. (Ramon-Maiques 2010; Hering *et al.*, 2013).

In den Untersuchungen des pH- und Temperaturoptimums konnten die höchsten Enzymaktivitäten der CK bei pH 6,5 und 37 °C bestimmt werden (siehe Tabelle 13). Dies steht in Übereinstimmung mit den Aktivitätsmessungen der AD (siehe 4.2.1), daher liegt die Vermutung nahe, dass das gesamte ADS in *S. pyogenes* die höchste Aktivität bei 37 °C und pH 6,5 besitzt. Im Gegensatz zu der Bestimmung der kinetischen Parameter für die AD-Aktivität in *Lb. buchneri* korreliert das Temperaturoptimum der CK bei 30 °C mit der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus (Manca de Nadra *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 2008).

Sowohl für die CK von *S. pyogenes* als auch von *Lb. buchneri* liegt das pH-Optimum im neutralen bis schwach sauren Bereich (Manca de Nadra *et al.*, 1986). Ein niedriger optimaler pH-Wert ist charakteristisch für CK, denn bei leicht aziden pH-Werten sind die katalytischen Zentren positiv geladen. In diesem Fall sind es die positiven Amino- gruppen des Lysins, die das katalytische Zentrum bilden und mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Carbamoylphosphats interagieren. Zudem ist bekannt, dass ATP eine inhibierende Wirkung auf die CK-Aktivität verschiedener Organismen wie *Lb. buchneri* und *P. aeruginosa* hat (Manca de Nadra *et al.*, 1986; Abdelal *et al.*, 1982).

Tabelle 13: Vergleich der kinetischen Parameter der CK von bekannten Spezies.

Stämme	K _m ADP (mM)	K _m CP* (mM)	Optimum pH	Optimum Temp. (°C)	Referenz
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,72	0,65	6,5	37	Diese Arbeit
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0,71	1,53	5,4	30	Manca de Nadra <i>et al.</i> , 1986
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,04	1,40	-	-	Marina <i>et al.</i> , 1998

*Carbamoylphosphat

In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Hemmung der CK-Aktivität von *S. pyogenes* durch ATP nachgewiesen werden, während die Aminosäuren Arginin und Citrullin keine signifikanten Einflüsse auf die Aktivität zeigten. Dies hängt vermutlich mit dem intrazellulären Carbamoylphosphat-Pool zusammen. Carbamoylphosphat kann auch über den Glutaminabbau durch die Carbamoylphosphat Synthetase (CS) gebildet werden, jedoch verbraucht dieser Stoffwechselweg zwei ATP. Sind sowohl CK als auch CS aktiv, tritt dementsprechend ein Nettoverlust von einem ATP auf. Bei einem hohen intrazellulären ATP-Spiegel ist für *P. aeruginosa* in der Literatur beschrieben, dass sowohl die OCT als auch die CK des ADS unterdrückt werden und das Carbamoylphosphat über den ATP-verbrauchenden Glutaminabbau gebildet wird (Abdelal *et al.*, 1982). Haas (1977) konnte sogar zeigen, dass der Argininabbau alleine die Anforderungen an Carbamoylphosphat in einer CS-Deletionsmutante für ein optimales Wachstum nicht erfüllen konnte. Zusätzliches Arginin und Uracil konnten jedoch das

Wachstumsdefizit ausgleichen (Haas *et al.*, 1977). Ein solcher Regulationsmechanismus ist aktuell in der Literatur für *S. pyogenes* noch nicht beschrieben.

Aufgrund der Inhibition der CK durch ATP und die Carbamoylphosphatsynthese über den Glutaminabbau könnte diese Art der Regulation möglich sein. Durch Vergleiche der kinetischen Konstanten für die CK (siehe Tabelle 13) von *Lb. buchneri*, *E. faecalis* und *S. pyogenes* könnte diese Theorie gestützt werden (Manca de Nadra *et al.*, 1986; Marina *et al.*, 1998), denn mit einem K_m -Wert von 0,65 mM für Carbamoylphosphat hat die CK von *S. pyogenes* eine höhere Affinität zu Carbamoylphosphat als die CK der anderen Spezies. Hingegen stimmt der für das Substrat ADP ermittelte K_m -Wert dieser Arbeit mit 0,72 mM vergleichsweise gut mit den veröffentlichten Daten von Manca de Nadra *et al.* (1986) zu der CK von *Lb. buchneri* mit 0,71 mM überein. Allerdings konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt keine detaillierte Aussage getroffen werden und es existieren bisher in der Literatur wenige Berichte, welche Rolle die intrazelluläre Konzentration an Carbamoylphosphat sowie die Kohlenstoffdioxidbedürfnisse für die Wachstumsphysiologie von Milchsäurebakterien genau spielen (Bringel *et al.*, 2008). Jedoch konnte in dieser Arbeit basierend auf der kinetischen Charakterisierung der Enzyme AD und CK eine Adaption von *S. pyogenes* an den humanen Lebensraum nachgewiesen werden.

4.3 Bedeutung der AD von *S. pyogenes* in der Tumorbehandlung

Arginin, eine für den Menschen nichtessentielle Aminosäure, ist von entscheidender Bedeutung für das Wachstum von einigen Krebsarten. Die Tumorzellen, die aufgrund der fehlenden ASS1-Expression Arginin-auxotroph sind, müssen die Aminosäure generell aus ihrer Umgebung aufnehmen, um verschiedene Stoffwechselprozesse aufrechtzuerhalten.

In einigen vorklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Überleben von Tumorzellen und die Ausbildung von Metastasen durch systematisches Absenken der Arginin-Konzentration, beispielsweise durch diätische Ernährung oder enzymatischen Abbau, reduziert werden kann (Gilroy 1930; Bach und Swaine 1965). In der Literatur werden die Arginin abbauenden Enzyme Arginase und AD als ein potentielle krebstherapeutische Mittel für Arginin-auxotrophe Tumore, wie hepatozelluläre Karzinome und maligne Melanome, eingestuft (Izzo *et al.*, 2004; Ascierto *et al.*, 2005). Basierend auf der Anti-Tumor-Anwendung von AD auf verschiedene Tumorzellen wurde die AD von *S. pyogenes* an verschiedenen Zelllinien des Glioblastoms und des kolorektalen Karzinoms getestet. In der aktuellen Literatur ist die Anwendung von AD bei Darmkrebs aufgrund der ASS1-Expression in Darmkrebszellen noch nicht beschrieben (Delage *et al.*, 2010). Um den Einsatz der AD in der Pharmakologie in

Betracht ziehen zu können, sollte mindestens eine 20%ige Wachstumshemmung (IC_{20}) nachweisbar sein (Hunter *et al.*, 2013).

Eine wirkungsvolle Behandlung von Tumoren mit AD setzt eine Arginin-Auxotrophie voraus. Für die in dieser Arbeit untersuchten Glioblastom-Zelllinien HROG04 und HROG07 konnte eine Arginin-Auxotrophie ausgeschlossen werden, da in beiden Fällen eine ASS1-Expression nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigte die AD-Behandlung keine antiproliferative Wirkung auf diese Glioblastomzellen.

Für die weiteren getesteten Glioblastom-Linien HROG02, HROG05 und HROG17 sowie für die hepatozelluläre Karzinomzelllinie HROHep03 konnte eine bis zu 50%ige zellproliferationshemmende Wirkung der AD von *S. pyogenes* gezeigt werden, was durch die fehlende ASS1-Expression begründet werden kann. Die 40%ige Reduzierung der Zellproliferation der kolorektalen Karzinomzelllinie HHC6548 und der Glioblastom-Zelllinie HROG10 kann jedoch nicht anhand einer fehlenden ASS1-Expression erklärt werden, da hier die Expression der ASS1 eindeutig nachgewiesen wurde. In diesem Fall könnten posttranslationale Modifikationen zum Verlust der ASS1-Aktivität beitragen. Alternativ zur ASS1-Expression könnte in diesen Zelllinien eine fehlende ASL-Expression für die Hemmwirkung verantwortlich sein. Damit wäre die Argininbiosynthese an dieser Stelle unterbrochen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass diese Zelllinien nicht über eine OCT verfügen, die das Citrullin aus Ornithin recycelt, und somit das Substrat für die ASS1 für die Argininbiosynthese nicht zur Verfügung steht (Delage *et al.*, 2010).

Um letztlich die zellproliferationshemmende Wirkung der AD von *S. pyogenes* auf die ASS1-positiven Zelllinien HHC6548 und HROG10 aufklären zu können, müssen *Western Blot*-Analysen mit ASS1-spezifischen Antikörpern durchgeführt werden, um aufzuklären, ob das Enzym tatsächlich gebildet wird. Im Falle von positiven *Western Blot*-Analysen sollte des Weiteren mittels *Western Blot* die Anwesenheit von ASL und OCT um den Grund für die zellproliferationshemmende Effekte der AD von *S. pyogenes* auf die beiden Zelllinien aufklären zu können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die AD von *S. pyogenes* eine inhibierende Wirkung auf die Zellproliferation von verschiedenen Tumorarten ausübt. Besonders interessante Ergebnisse konnten bei der Behandlung von mehreren Glioblastom-Zelllinien und einer kolorektale Karzinom-Zelllinie erzielt werden, da für diese Tumorarten aktuell nur wenige AD-Behandlungen in der Literatur beschrieben sind (Syed *et al.*, 2013). Um solch eine Behandlung bei Krebspatienten durchführen zu können, sollte jedoch eine Pegylierung der AD von *S. pyogenes* erfolgen, damit die Antigenität des mikrobiellen Enzyms *in vivo* ausgeschlossen werden kann (Holtsberg *et al.*, 2002). Dies verbessert ebenso die Effektivität der AD als klinisches Arzneimittel. Bevor die AD von *S. pyogenes* für die therapeutische Anwendung in Frage kommt,

muss vorher geklärt werden, ob die AD von *S. pyogenes* effizienter gegenüber der zurzeit verwendeten AD von *Mycoplasma hominis* (ADI-PEG20) wirkt (Feun und Savaraj, 2006).

4.3.1 Steigerung der zellproliferationshemmenden Effekte der AD durch Kombination mit Zytostatika

Trotz guter Behandlungsstrategien durch Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie erweist sich die Therapie von einzelnen Krebserkrankungen als problematisch. Daher werden in vielen Fällen die bestehenden Behandlungsmöglichkeiten kombiniert. Besonderes Augenmerk gilt dem *Glioblastoma multiforme*, dessen Malignität von der World Health Organisation (WHO) aufgrund des schnellen Tumorwachstums und der schlechten Behandlungsmöglichkeiten mit den höchsten WHO-Grad (4) eingestuft wird. Der WHO-Grad von Tumoren korreliert zudem mit der Aggressivität des Tumors und lässt Aussagen über die Prognose zu.

In der Regel sterben die meisten Patienten an diesem bösartigen Hirntumor innerhalb von zwei Jahren nach dem Zeitpunkt der Diagnose (Curran *et al.*, 1993; DeAngelis 2001; Buckner 2003). Für alle bisher untersuchten Behandlungen von *Glioblastoma multiforme* erwies sich die operative Tumormassenreduktion mit einer sich anschließenden simultanen, adjuvanten und gleichsamen palliativen Kombinationstherapie mit dem lipophilen und alkylierenden Pharmakon Temozolomid und Strahlentherapie für am besten geeignet (Stupp *et al.*, 2005; DeAngelis 2005).

In der vorliegenden Arbeit war es von besonderem Interesse, die zellproliferationshemmende Wirkung des Zytostatikums Temozolomid durch die Kombination mit der AD von *S. pyogenes* zu verstärken. Bei der Testung des alkylierenden Zytostatikums konnte gezeigt werden, dass in Kombination mit der AD die Inhibition auf die Zellproliferation der Glioblastom-Zelllinie HROG05 verstärkt wurde. Verantwortlich hierfür sind die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Substanzen. Während die AD den Argininspiegel senkt und somit wichtige Syntheseschritte in den Tumorzellen nicht ablaufen können, entfaltet das Temozolomid seine Wirkung gegen bösartige Tumore, indem es die DNA-Replikation stört (Stupp *et al.*, 2005).

Hinsichtlich der Anwendung von Temozolomid ist entscheidend, dass die MGMT (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) inaktiv ist. MGMT bewirkt u.a. die Entfernung von Alkylgruppen von der O6-Position des Guanins. Dadurch wirkt es als DNA-Reparaturenzym für Schäden, die durch Alkylierung entstehen (Ramirez *et al.*, 2013). Durch Hypermethylierung wird das MGMT-Gen inaktiviert und die an der DNA verursachten Schäden lassen sich schlechter reparieren. In der Arbeit von Hegi (2005) konnte gezeigt werden, dass Tumoren von Patienten mit methylierter MGMT-Promotorregion sensibler auf das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid reagieren, als

solche mit unmethylierter Sequenz (Hegi *et al.*, 2005). Somit gelten sowohl die MGMT-Methylierung als auch die fehlende ASS1-Expression als mögliche Biomarker, um therapeutische Entscheidungen bei *Glioblastoma multiforme* treffen zu können (Tolcher *et al.*, 2003, Wick *et al.*, 2012; Syed *et al.*, 2013).

Die Applikation von Temozolomid erfolgt oral in der inaktiven Form und wird erst *in vivo* durch verschiedene Stoffwechselfvorgänge in die aktive Wirksubstanz Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid überführt, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Ramirez *et al.*, 2013). Die AD hingegen muss direkt in das Tumorgewebe injiziert werden, um eine Inhibition der Zellteilung von Glioblastomzellen ausüben zu können, was als problematisch einzustufen ist. Aus diesem Grund sollte die Behandlung von Patienten mit *Glioblastoma multiforme* mit rekombinanter AD unter Abwägung der Vor- und Nachteile für den Patienten überdacht werden. Jedoch sollte jeder Ansatz berücksichtigt werden, denn eine einfache Lösung zur Bekämpfung von hochgradigen malignen *Glioblastoma multiforme* wird es wohl in absehbarer Zeit nicht geben.

Neben *Glioblastoma multiforme* gewinnt das kolorektale Karzinom in den westlichen Industrienationen zunehmend an Bedeutung. Beispielsweise erkranken in Deutschland jährlich ca. 73.000 Menschen neu an diesem malignen Tumor und ca. 27.000 sterben jedes Jahr daran. Schaut man über die Landesgrenzen hinweg, ist das kolorektale Karzinom weltweit die dritthäufigste Tumorerkrankung und die vierthäufigste Todesursache (Hagggar und Boushey 2009). Primär beginnt die Therapie mit der chirurgischen Entnahme des befallenen Gewebes und wird mit einer adjuvante Chemotherapie z. B. mit Irinotecan fortgesetzt.

Das Zytostatikum Irinotecan ist ein halbsynthetisches Derivat des pflanzlichen Alkaloids Camptothecin, welches aus der Rinde und den Blätter von *Camptotheca acuminata* isoliert werden kann (Wall *et al.*, 1966; Kunimoto *et al.*, 1987). Pharmakologisch gehört Irinotecan zu der Gruppe der Topoisomerasehemmstoffe. Irinotecan wird *in vivo* in den meisten Geweben durch die Carboxylesterase zu SN-38 metabolisiert (Kawato *et al.*, 1999). Das aktive Metabolit bindet an die Topoisomerase I und stört somit die Verdrillung der DNA-Stränge, was zu Strangbrüchen und schließlich zur Apoptose der Zellen führt (Fuchs *et al.*, 2006). Im Gegensatz zur Irinotecan wirkt die AD, wie bereits erwähnt, nicht auf der genetischen (Beeinflussung der DNA-Replikation) sondern auf der metabolischen Ebene, indem die AD das freiverfügbare Arginin abbaut. Auf diese Weise kommt es zu einer Nährstofflimitation für die Tumorzellen. In dieser Untersuchung sind es ebenfalls die unterschiedlichen Wirkmechanismen, die zur Verstärkung der Effekte beider Präparaten führt.

Die klinische Relevanz dieser potentiellen Kombination könnte zunehmend an Bedeutung in der Behandlung von kolorektalen Karzinomen gewinnen. Aufgrund der

immer häufiger auftretenden primären oder erworbenen Resistenzen von Darmkrebszellen gegenüber der Platin-basierten Chemotherapie mit Cisplatin und Derivaten bzw. wegen der Unverträglichkeit und der starken Nebenwirkungen des Zytostatikums, müssen entweder neue strukturelle Weiterentwicklung verfolgt werden oder es könnte auf solch eine Therapieform aus Irinotecan und AD zurückgegriffen werden (Giaccone, 2000).

Auch andere Studien haben sich mit den Resistenzen gegenüber einer Platin-basierten Chemotherapie auseinandergesetzt und konnten unter anderem für Ovarialkarzinome zeigen, dass der Verlust der ASS1-Expression als Biomarker für die Resistenz gegenüber einer Platinbasierten Behandlung herangezogen werden kann. (Nicholson *et al.*, 2009; Delage *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2010). Welche Rolle genau die verminderte ASS1-Expression für die Platinresistenz bei Ovarialkarzinom spielt, ist nicht eindeutig geklärt. Allerdings es wird vermutet, dass der niedrige zelluläre Argininspiegel bzw. die niedrige NO-Konzentration die DNA-Platin-Anlagerung verringert (Bubley *et al.*, 1996; Tang und Grimm 2004). Somit könnte im Falle einer Platinresistenz alternativ mit AD behandelt werden, und je nach Krebserkrankung eine Kombination mit dem entsprechenden Zytostatikum verwendet werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in den *in vitro* durchgeführten Kombinationsversuchen von ausgewählten Zytostatika und der AD zu einer Verstärkung der antiproliferativen Effekte kommt. Aus diesem Grund wird es immer wichtiger, diese Therapiewege *in vivo* zu testen, um der zweithäufigsten Todesursache in Deutschland, dem Krebs, entgegenwirken zu können.

5 Zusammenfassung

Rolle der AD im Metabolismus von *S. pyogenes* M49

1. Die Deletion des *arcA*-Genes hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten in Komplexmedien und chemisch-definiertem Medium.
2. Arginin und das ADS sichern das Überleben der Streptokokken in saurem Milieu.
3. Die Δ *arcA*-Mutante zeigt eine verminderte Ammoniumproduktion.
4. Arginin- und Serinstoffwechsel werden durch die AD in GAS beeinflusst.
5. Die Δ *arcA*-Mutante verstoffwechselt die Glukose vorwiegend zu Laktat und die gemischte Säuregärung wird im Vergleich zum Wildtyp unterdrückt.

Rolle der AD in der Pathogenese von *S. pyogenes* M49

1. Die Δ *arcA*-Mutante zeigt ein vermindertes Wachstum in humanem Vollblut.
2. Die *arcA*-Deletion führt zu einem erhöhten Absterben in Makrophagen.

Enzymkinetische Untersuchung von AD und CK von *S. pyogenes* M49

1. Für die biochemische Charakterisierung wurden Arginin Deiminase und Carbamat Kinase von *S. pyogenes* M49 heterolog in *E. coli* DH5 α exprimiert und gereinigt.
2. Das pH-Optimum von AD und CK liegt bei pH 6,5 und das Temperaturoptimum bei 37 °C.
3. Die kinetische Analyse der AD ergab einen K_m -Wert von 1,13 mM für L-Arginin sowie einen V_{max} -Wert von 1,51 μ mol/min/mg Protein.
4. Die kinetische Analyse der CK ergab einen K_m -Wert von 0,65 mM für Carbamoylphosphat bzw. 0,72 mM für ADP. Der V_{max} -Wert lag bei 1,1 μ mol/min/mg Protein.
5. ATP, L-Citrullin und Carbamoylphosphat haben keinen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität der AD.
6. ATP reguliert die Aktivität der CK. 10 mM ATP bewirkten eine 50%ige Aktivitätsminderung.

Einfluss der AD von *S. pyogenes* M49 auf die Zellproliferation von Arginin-auxotrophen Tumoren

1. Die AD zeigt eine antiproliferative Wirkung auf Glioblastom-Zelllinien sowie auf hepatozelluläre und kolorektale Karzinomzelllinien.
2. Der Wirkung der Chemotherapeutika Irinotecan und Temozolomid wird durch Kombination mit der AD signifikant verstärkt.

6 Literaturverzeichnis

- Abdelal, A. T., Bibb, W. F. and Nainan, O.** (1982). Carbamate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: purification, characterization, physiological role, and regulation. *Journal of bacteriology* **151**, 1411–1419.
- Adam, D., Scholz, H. and Helmerking, M.** (2000). Short-course antibiotic treatment of 4782 culture-proven cases of group A streptococcal tonsillopharyngitis and incidence of poststreptococcal sequelae. *Journal of Infectious Diseases* **182**, 509–516.
- Angelis, M. De., Mariotti, L., Rossi, J., Servili, M., Fox, P. F., Rollan, G. and Gobbetti, M.** (2002b). Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Applied and environmental microbiology* **68**, 6193–6201.
- Arena, M. E., Saguir, F. M. and Manca de Nadra, M. C.** (1999). Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *International journal of food microbiology* **47**, 203–209.
- Armengou, A., Hurtado, O., Leira, R., Obon, M. A., Lizasoain, I., Castillo, J. and Davalos, A.** (2003). L-arginine levels in blood as a marker of nitric oxide-mediated brain damage in acute stroke & colon; a clinical and experimental study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **23**, 978–984.
- Arsene-Ploetze, F. and Bringel, F.** (2004). Role of inorganic carbon in lactic acid bacteria metabolism. *Le Lait* **84**, 49–59.
- Asanuma, N. and Hino, T.** (2000). Effects of pH and energy supply on activity and amount of pyruvate formate lyase in *Streptococcus bovis*. *Applied and environmental microbiology* **66**, 3773–3777.
- Ascierto, P. A., Scala, S., Castello, G., Daponte, A., Simeone, E., Ottaiano, A., Beneduce, G., Rosa, V. de, Izzo, F., Melucci, M. T. et al.** (2005). Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *Journal of clinical oncology* **23**, 7660–7668.
- Bach, S. J. and Swaine, D.** (1965). The effect of arginase on the retardation of tumour growth. *British journal of cancer* **19**, 379–386.
- Barcelona-Andres, B., Marina, A. and Rubio, V.** (2002). Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **184**, 6289–6300.
- Bauchop, T. and Elsdén, S. R.** (1960). The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *Journal of General Microbiology* **23**, 457–469.
- Beall, B., Facklam, R. and Thompson, T.** (1996). Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *Journal of clinical microbiology* **34**, 953–958.

- Beckert, S., Kreikemeyer, B. and Podbielski, A.** (2001). Group A streptococcal rofA gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization. *Infection and immunity* **69**, 534–537.
- Benthin, S. and Villadsen, J.** (1996). Amino acid utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 during growth on yeast extract or casein peptone. *Journal of Applied Microbiology* **80**, 65–72.
- Beres, S. B., Sylva, G. L., Barbian, K. D., Lei, B., Hoff, J. S., Mammarella, N. D., Liu, M.-Y., Smoot, J. C., Porcella, S. F., Parkins, L. D. et al.** (2002). Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 10078–10083.
- Berge, A. and Sjobring, U.** (1993). PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 25417–25424.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* 1. *Journal of bacteriology* **62**, 293–300.
- Bisno, A. L. and Stevens, D. L.** (1996). Streptococcal infections of skin and soft tissues. *New England Journal of Medicine* **334**, 240–246.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A.** (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* **11**, 731–753.
- Bowles, T. L., Kim, R., Galante, J., Parsons, C. M., Virudachalam, S., Kung, H. J. and Bold, R. J.** (2008). Pancreatic cancer cell lines deficient in argininosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase. *International Journal of Cancer* **123**, 1950–1955.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Bringel, F., Vuilleumier, S. and Arsene-Plotze, F.** (2008). Low carbamoyl phosphate pools may drive *Lactobacillus plantarum* CO₂-dependent growth phenotype. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **14**, 22–30.
- Brown, J. H.** (1919). *The use of blood agar for the study of streptococci*: The Rockefeller Institute for Medical Research.
- Brown, S. D. and Rybak, M. J.** (2004). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001–2002, as part of the PROTEKT US study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 7–15.
- Bubley, G. J., Xu, J., Kupiec, N., Sanders, D., Foss, F., O'Brien, M., Emi, Y., Teicher, B. A. and Patierno, S. R.** (1996). Effect of DNA conformation on cisplatin adduct formation. *Biochemical pharmacology* **51**, 717–721.
- Buckner, J. C.** (2003). Factors influencing survival in high-grade gliomas. In *Seminars in oncology*, pp. 10–14.
- Budin-Verneuil, A., Maguin, E., Auffray, Y., Ehrlich, D. S. and Pichereau, V.** (2006). Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase

- (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Canadian journal of microbiology* **52**, 617–622.
- Caldelari, I., Loeliger, B., Langen, H., Glauser, M. P. and Moreillon, P.** (2000). Deregulation of the arginine deiminase (*arc*) operon in penicillin-tolerant mutants of *Streptococcus gordonii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 2802–2810.
- Caparon, M. G. and Scott, J. R.** (1991). Genetic manipulation of pathogenic streptococci. *Methods in enzymology* **204**, 556–586.
- Carapetis, J. R., Steer, A. C., Mulholland, E. K. and Weber, M.** (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet infectious diseases* **5**, 685–694.
- Casiano-Colon, A. and Marquis, R. E.** (1988). Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and environmental microbiology* **54**, 1318–1324.
- Champomier Verges, M.-C., Zuniga, M., Morel-Deville, F., Perez-Martinez, G., Zagorec, M. and Ehrlich, S. D.** (1999). Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS microbiology letters* **180**, 297–304.
- Chaussee, M. S., Ajdic, D. and Ferretti, J. J.** 1999. The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SpeB production. *Infection and immunity* **67**, 1715–1722.
- Chaussee, M. S., Somerville, G. A., Reitzer, L. and Musser, J. M.** (2003) Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *Journal of bacteriology* **185**, 6016–6024.
- Chaussee, M. S., Sylva, G. L., Sturdevant, D. E., Smoot, L. M., Graham, M. R., Watson, R. O. and Musser, J. M.** (2002). Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity* **70**, 762-770.
- Collin, M. and Olsen, A.** (2001). Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infection and immunity* **69**, 7187–7189.
- Crow, V. L. and Thomas, T. D.** (1982). Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of bacteriology* **150**, 1024–1032.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A. and Stalon, V.** (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological reviews* **50**, 314-352.
- Cunningham, M. W.** (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 470–511.
- Curran, T. M., Lieou, J. and Marquis, R. E.** (1995). Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Applied and environmental microbiology* **61**, 4494–4496.
- Curran, W. J., Scott, C. B., Horton, J., Nelson, J. S., Weinstein, A. S., Fischbach, A. J., Chang, C. H., Rotman, M., Asbell, S. O., Krisch, R. E. et al.** (1993). Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three radiation therapy oncology group malignant glioma trials. *Journal of the National Cancer Institute* **85**, 704–710.

- Cusumano, Z. T., Watson, M. E. and Caparon, M. G.** (2014). *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infection and immunity* **82**, 233–242.
- Das, K., Butler, G. H., Kwiatkowski, V., Clark Jr, Arthur D, Yadav, P. and Arnold, E.** (2004). Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates: implications for catalytic mechanism. *Structure* **12**, 657–667.
- DeAngelis, L. M.** (2001). Brain tumors. *New England Journal of Medicine* **344**, 114–123.
- DeAngelis, L. M.** (2005). Chemotherapy for brain tumors—a new beginning. *New England Journal of Medicine* **352**, 1036–1038
- Degnan, B. A., Fontaine, M. C., Doebereiner, A. H., Lee, J. J., Mastroeni, P., Dougan, G., Goodacre, J. A. and Kehoe, M. A.** (2000). Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infection and immunity* **68**, 2441–2448.
- Degnan, B. A., Palmer, J. M., Robson, T., Jones, C. E., Fischer, M., Glanville, M., Mellor, G. D., Diamond, A. G., Kehoe, M. A. and Goodacre, J. A.** (1998). Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. *Infection and immunity* **66**, 3050–3058.
- Deibel, R. H.** (1964). Utilization of arginine as an energy source for the growth of *Streptococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **87**, 988–992.
- Delage, B., Fennell, D. A., Nicholson, L., McNeish, I., Lemoine, N. R., Crook, T. and Szlosarek, P. W.** (2010). Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *International Journal of Cancer* **126**, 2762–2772.
- Dillon, B. J., Holtsberg, F. W., Ensor, C. M., Bomalaski, J. S. and Clark, M. A.** (2002). Biochemical characterization of the arginine degrading enzymes arginase and arginine deiminase and their effect on nitric oxide production. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* **8**, BR248–253.
- Dillon, B. J., Prieto, V. G., Curley, S. A., Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S. and Clark, M. A.** (2004). Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers. *Cancer* **100**, 826–833.
- Dmitriev, A. V., McDowell, E. J., Kappeler, K. V., Rieck, L. D. and Chaussee, M. S.** (2006). The Rgg regulator of *Streptococcus pyogenes* influences utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glycohydrolase virulence operon. *Journal of bacteriology* **188**, 7230–7241.
- Dong, Y., Chen, Y.-Y. M. and Burne, R. A.** (2004). Control of expression of the arginine deiminase operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. *Journal of bacteriology* **186**, 2511–2514.

- Dong, Y., Chen, Y.-Y. M., Snyder, J. A. and Burne, R. A.** (2002). Isolation and molecular analysis of the gene cluster for the arginine deiminase system from *Streptococcus gordonii* DL1. *Applied and environmental microbiology* **68**, 5549–5553.
- Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J. A., Prieto, V. G., Johnson, M. M., Broemeling, L. D. and Grimm, E. A.** (2006). Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients. *International Journal of Cancer* **119**, 861–866.
- Elliott, S. D.** (1945). A proteolytic enzyme produced by group A streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen. *The Journal of experimental medicine* **81**, 573–592.
- Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S. and Clark, M. A.** (2002). Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG 20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer research* **62**, 5443–5450.
- Facklam, R. and Elliott, J. A.** (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **8**, 479–495.
- Farias, M. E., Strasser de Saad A. M., Pesce de Ruiz Holgado, A. A. and Oliver, G.** (1991). Purification and properties of l-serine dehydratase from *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931. *Current microbiology* **22**, 205–211.
- Feldman-Salit, A., Hering, S., Messiha, H., Veith, N., Cojocar, V., Sieg, A., Westerhoff, H., Kreikemeyer, B., Wade, R. C. and Fiedler, T.** (2013). Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. **288**, 21295–306.
- Fernandez, M. and Zuniga, M.** (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical reviews in microbiology* **32**, 155–183.
- Ferretti, J. J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A. N., Kenton, S. et al.** (2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 4658–4663.
- Feun, L. and Savaraj, N.** (2006). Pegylated arginine deiminase: a novel anticancer enzyme agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **7**, 815–822.
- Fiedler, T., Bekker, M., Jonsson, M., Mehmeti, I., Pritschke, A., Siemens, N., Nes, I., Hugenholtz, J. and Kreikemeyer, B.** (2011). Characterization of three lactic acid bacteria and their isogenic ldh deletion mutants shows optimization for YATP (cell mass produced per mole of ATP) at their physiological pHs. *Applied and environmental microbiology* **77**, 612–617.
- Fiedler, T., Salamon, A., Adam, S., Herzmann, N., Taubenheim, J. and Peters, K.** (2013). Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* **319**, 2883–2892.
- Fogg, G. C. and Caparon, M. G.** (1997). Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of rofA. *Journal of bacteriology* **179**, 6172–6180.

- Fogg, G. C., Gibson, C. M. and Caparon, M. G.** (1994). The identification of *rofA*, a positive-acting regulatory component of *prtF* expression: use of an γ delta-based shuttle mutagenesis strategy in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology* **11**, 671–684.
- Fuchs, C., Mitchell, E. P. and Hoff, P. M.** (2006). Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer treatment reviews* **32**, 491–503.
- Galkin, A., Kulakova, L., Sarikaya, E., Lim, K., Howard, A. and Herzberg, O.** (2004). Structural insight into arginine degradation by arginine deiminase, an antibacterial and parasite drug target. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14001–14008.
- Gamper, M., Zimmermann, A. and Haas, D.** (1991). Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **173**, 4742–4750.
- Gannon, F., Bridgeland, E. S. and Jones, K. M.** (1977). L-serine dehydratase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochemical Journal* **161**, 345–355.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N. D. and Cocaign-Bousquet, M.** (1997). Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *Journal of bacteriology* **179**, 5282–5287.
- Gerner, E. W. and Meyskens, F. L.** (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer* **4**, 781–792.
- Giaccone, G.** (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* **59**, 9–17.
- Gillies, R. J., Didier, N. and Denton, M.** (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry* **159**, 109–113.
- Gilroy, E.** (1930). The influence of arginine upon the growth rate of a transplantable tumour in the mouse. *Biochemical Journal* **24**, 589–595.
- Goldmann, O., Kockritz-Blickwede, M. von, Holtje, C., Chhatwal, G. S., Geffers, R. and Medina, E.** (2007). Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program. *Infection and immunity* **75**, 4148–4157.
- Goldmann, O., Rohde, M., Chhatwal, G. S. and Medina, E.** (2004). Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infection and immunity* **72**, 2956–2963.
- Goldmann, O., Sastalla, I., Wos-Oxley, M., Rohde, M. and Medina, E.** (2009). *Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway. *Cellular microbiology* **11**, 138–155.
- Gong, H., Zolzer, F., Recklinghausen, G. von, Havers, W. and Schweigerer, L.** (2000). Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia* **14**, 826–829.
- Gonzalez, G. G. and Byus, C. V.** (1991). Effect of dietary arginine restriction upon ornithine and polyamine metabolism during two-stage epidermal carcinogenesis in the mouse. *Cancer research* **51**, 2932–2939.

- Griswold, A., Chen, Y.-Y. M., Snyder, J. A. and Burne, R. A.** (2004). Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. *Applied and environmental microbiology* **70**, 1321–1327.
- Gruening, P., Fulde, M., Valentin-Weigand, P. and Goethe, R.** (2006). Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology* **188**, 361–369.
- Haas, A.** (1998). Reprogramming the phagocytic pathway-intracellular pathogens and their vacuoles (Review). *Molecular membrane biology* **15**, 103–121.
- Haas, D., Holloway, B. W., Schambock, A. and Leisinger, T.** (1977). The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics MGG* **154**, 7–22.
- Haggar, F. A. and Boushey, R. P.** (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery* **22**, 191–197.
- Hakim, T. S., Sugimori, K., Camporesi, E. M. and Anderson, G.** (1996). Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiological measurement* **17**, 267–277.
- Hampton, M. B. and Winterbourn, C. C.** (1999). Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *Journal of immunological methods* **232**, 15–22.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557–580.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Godard, S., Dietrich, P.-Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., van Melle, G., Tribolet, N. de and Stupp, R.** (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical Cancer Research* **10**, 1871–1874.
- Henningham, A., Ericsson, D. J., Langer, K., Casey, L. W., Jovcevski, B., Chhatwal, G. S., Aquilina, J. A., Batzloff, M. R., Kobe, B. and Walker, M. J.** (2013b). Structure-informed design of an enzymatically inactive vaccine component for group A *Streptococcus*. *mBio* **4**, e00509-00513.
- Henningham, A., Gillen, C. M. and Walker, M. J.** (2013a). Group A Streptococcal Vaccine Candidates: Potential for the Development of a Human Vaccine. In *Host-Pathogen Interactions in Streptococcal Diseases*, pp. 207–242: Springer.
- Hering, S., Sieg, A., Kreikemeyer, B. and Fiedler, T.** (2013). Kinetic characterization of arginine deiminase and carbamate kinase from *Streptococcus pyogenes* M49. *Protein expression and purification* **91**, 61–68.
- Herwald, H., Collin, M., Müller-Esterl, W. and Björck, L.** (1996). Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. *The Journal of experimental medicine* **184**, 665–673.
- Hofvendahl, K., van Niel, E. W. and Hahn-Hägerdal, B.** (1999). Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Applied microbiology and biotechnology* **51**, 669–672.

- Holtsberg, F. W., Ensor, C. M., Steiner, M. R., Bomalaski, J. S. and Clark, M. A.** (2002). Poly (ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *Journal of controlled release* **80**, 259–271.
- Horn, D. L., Zabriskie, J. B., Austrian, R., Cleary, P. P., Ferretti, J. J., Fischetti, V. A., Gotschlich, E., Kaplan, E. L., McCarty, M., Opal, S. M. et al.** (1998). Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clinical infectious diseases* **26**, 1341–1345.
- Hunter, R. J., Fujii, H., Wakame, K., Gaikwad, A., Wolf, J. K. and Smith, J. A.** (2011). Evaluation of active hexose correlated compound (AHCC) in combination with pegylated liposomal doxorubicin for treatment of ovarian cancer. *International Journal of Applied Research in Natural Products* **4**, 6–11.
- Huovinen, P.** (1999). Causes, diagnosis and treatment of pharyngitis. *Comprehensive therapy* **25**, 326–329.
- Izzo, F., Marra, P., Beneduce, G., Castello, G., Vallone, P., Rosa, V. de, Cremona, F., Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S. et al.** (2004). Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *Journal of clinical oncology* **22**, 1815–1822.
- Jonsson, S., Clausen, E. and Raa, J.** (1983). Amino acid degradation by a *Lactobacillus plantarum* strain from fish. *Systematic and applied microbiology* **4**, 148–154.
- Kapur, V., Topouzis, S., Majesky, M. W., Li, L.-L., Hamrick, M. R., Hamill, R. J., Patti, J. M. and Musser, J. M.** (1993). A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microbial pathogenesis* **15**, 327–346.
- Kaufhold, A., Podbielski, A., Baumgarten, G., Blokpoel, M., Top, J. and Schouls, L.** (1994). Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS microbiology letters* **119**, 19–25.
- Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H. and Sato, K.** (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer research* **51**, 4187–4191.
- Kim, J.-E., Jeong, D.-W. and Lee, H. J.** (2007). Expression, purification, and characterization of arginine deiminase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 in *Escherichia coli* BL21. *Protein expression and purification* **53**, 9–15.
- Kim, J.-E., Kim, S. Y., Lee, K. W. and Lee, H. J.** (2009). Arginine deiminase originating from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* American Type Culture Collection (ATCC) 7962 induces G1-phase cell-cycle arrest and apoptosis in SNU-1 stomach adenocarcinoma cells. *British Journal of Nutrition* **102**, 1469–1476.
- Kim, R. H., Coates, J. M., Bowles, T. L., McNerney, G. P., Sutcliffe, J., Jung, J. U., Gandour-Edwards, R., Chuang, F. Y. S., Bold, R. J. and Kung, H.-J.**

- (2009b). Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer research* **69**, 700–708.
- Knodler, L. A., Sekyere, E. O., Stewart, T. S., Schofield, P. J. and Edwards, M. R.** (1998). Cloning and expression of a prokaryotic enzyme, arginine deiminase, from a primitive eukaryote *Giardia intestinalis*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 4470–4477.
- Kobayashi, E., Masuda, M., Nakayama, R., Ichikawa, H., Satow, R., Shitashige, M., Honda, K., Yamaguchi, U., Shoji, A., Tochigi, N. et al.** (2010). Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma. *Molecular cancer therapeutics* **9**, 535–544.
- Konings, W. N.** (2002). The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 3–27.
- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., van Veen, H. W., Poolman, B. and Driessen, A. J.** (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 117–128.
- Kreikemeyer, B., Beckert, S., Braun-Kiewnick, A. and Podbielski, A.** (2002). Group A streptococcal RofA-type global regulators exhibit a strain-specific genomic presence and regulation pattern. *Microbiology* **148**, 1501–1511.
- Kreikemeyer, B., Oehmcke, S., Nakata, M., Hoffrogge, R. and Podbielski, A.** (2004d). *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding Protein F2 expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 15850–15859.
- Kristoffersen, T. and Nelson, F. E.** (1955). Degradation of amino acids by *Lactobacillus casei* and some factors influencing deamination of serine. *Applied microbiology* **3**, 268–273.
- Kunimoto, T., Nitta, K., Tanaka, T., Uehara, N., Baba, H., Takeuchi, M., Yokokura, T., Sawada, S., Miyasaka, T. and Mutai, M.** (1987). Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer research* **47**, 5944–5947.
- Kwinn, L. A. and Nizet, V.** (2007). How group A *Streptococcus* circumvents host phagocyte defenses. *Future microbiology* **2**, 75–84.
- Laemmli, U. K. and others** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680–685.
- Lahteenmaki, K., Kuusela, P. and Korhonen, T. K.** (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS microbiology reviews* **25**, 531–552.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H. and Finkel, P.** (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science* **28**, 359–370.
- Lancefield, R. C.** (1928). The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *The Journal of experimental medicine* **47**, 91–103.

- Lancefield, R. C.** (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of experimental medicine* **57**, 571–595.
- Lancefield, R. C.** (1962). Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *The Journal of Immunology* **89**, 307–313.
- Laroche, M., Pukall, R. and Ulber, R.** (2003). Recovery and characterization of a l-serine dehydratase from the marine bacterium *Paracoccus seriniphilus* for the construction of bioanalytical systems. *Chemie Ingenieur Technik* **75**, 146-149.
- LaSarre, B. and Federle, M. J.** (2011). Regulation and consequence of serine catabolism in *Streptococcus pyogenes*. *Journal of bacteriology* **193**, 2002-2012.
- Lembke, C., Podbielski, A., Hidalgo-Grass, C., Jonas, L., Hanski, E. and Kreikemeyer, B.** (2006). Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Applied and environmental microbiology* **72**, 2864–2875.
- Levering, J., Musters, M. W., Bekker, M., Bellomo, D., Fiedler, T., de Vos, Willem M, Hugenholtz, J., Kreikemeyer, B., Kummer, U. and Teusink, B.** (2012). Role of phosphate in the central metabolism of two lactic acid bacteria - a comparative systems biology approach. *FEBS Journal* **279**, 1274–1290.
- Li, L., Li, Z., Wang, C., Xu, D., Mariano, P. S., Guo, H. and Dunaway-Mariano, D.** (2008). The electrostatic driving force for nucleophilic catalysis in l-arginine deiminase: a combined experimental and theoretical study. *Biochemistry* **47**, 4721–4732.
- Lin, J.-S. L.** (1986). Arginine deiminase of *Mycoplasma hominis*: cytoplasmic and membrane-associated forms. *Journal of General Microbiology* **132**, 1467-1474.
- Lind, D. S.** (2004). Arginine and cancer. *The Journal of nutrition* **134**, 2837S-2841S.
- Liu, S.-Q., Holland, R., McJarrow, P. and Crow, V. L.** (2003b). Serine metabolism in *Lactobacillus plantarum*. *International journal of food microbiology* **89**, 265–273.
- Liu, S., Skinner-Nemec, K. A. and Leathers, T. D.** (2008). *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **35**, 75–81.
- Lu, X., Li, L., Wu, R., Feng, X., Li, Z., Yang, H., Wang, C., Guo, H., Galkin, A., Herzberg, O. et al.** (2006). Kinetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* arginine deiminase mutants and alternate substrates provides insight into structural determinants of function. *Biochemistry* **45**, 1162–1172.
- Lu, C.-D., Winteler, H., Abdelal, A. and Haas, D.** (1999). The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **181**, 2459–2464.
- Luthi, E., Baur, H., Gamper, M., Brunner, F., Villeval, D., Mercemier, A. and Haas, D.** (1990). The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in

- Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* **87**, 37–43.
- MacAllister, R. J., Calver, A. L., Collier, J., Edwards, C. M., Herreros, B., Nussey, S. S. and Vallance, P.** (1995). Vascular and hormonal responses to arginine: provision of substrate for nitric oxide or non-specific effect? *Clinical Science* **89**, 183–190.
- Macris, M. H., Hartman, N., Murray, B., Klein, R. F., Roberts, R. B., Kaplan, E. L., Horn, D. and Zabriskie, J. B.** (1998). Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. *The Pediatric infectious disease journal* **17**, 377–381.
- Maghnoij, A., Abu-Bakr, A. A. W., Baumberg, S., Stalon, V. and Wauven, C.** (2000). Regulation of anaerobic arginine catabolism in *Bacillus licheniformis* by a protein of the Crp/Fnr family. *FEMS microbiology letters* **191**, 227–234.
- Malke, H. and Ferretti, J. J.** (2007). CodY-affected transcriptional gene expression of *Streptococcus pyogenes* during growth in human blood. *Journal of medical microbiology* **56**, 707–714.
- Manca, de Nadra M. C., Nadra, C. C. A., Pesce, de Ruiz Holgado, A. A. and Oliver, G.** (1986). Carbamate kinase of *Lactobacillus buchneri* NCDO110. I. Purification and properties. *Biotechnology and applied biochemistry* **8**, 46–52.
- Manca de Nadra, M. C., Pesce de Ruiz Holgado, A. A. and Oliver, G.** (1984). Isolation and properties of arginine deiminase in *Lactobacillus buchneri* NCDO110. *Journal of Applied Biochemistry* **6**, 184–187.
- Marina, A., Uriarte, M., Barcelona, B., Fresquet, V., Cervera, J. and Rubio, V.** (1998). Carbamate kinase from *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *European Journal of Biochemistry* **253**, 280–291.
- Markowitz, M., Gerber, M. A. and Kaplan, E. L.** (1993). Treatment of streptococcal pharyngotonsillitis: reports of penicillin's demise are premature. *The Journal of pediatrics* **123**, 679–685.
- Marouni, M. J., Ziomek, E. and Sela, S.** (2003). Influence of group A streptococcal acid glycoprotein on expression of major virulence factors and internalization by epithelial cells. *Microbial pathogenesis* **35**, 63–72.
- McDowell, E., Callegari, E., Malke, H. and Chaussee, M. S.** (2012). CodY-mediated regulation of *Streptococcus pyogenes* exoproteins. *BMC microbiology* **12**, 114.
- McMillan, D. J., Dreze, P.-A., Vu, T., Bessen, D. E., Guglielmini, J., Steer, A. C., Carapetis, J. R., Melderer, L., Sriprakash, K. S. and Smeesters, P. R.** (2013). Updated model of group A Streptococcus M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clinical microbiology and infection* **19**, E222–E229
- McShan, W. M., Ferretti, J. J., Karasawa, T., Suvorov, A. N., Lin, S., Qin, B., Jia, H., Kenton, S., Najjar, F., Wu, H. et al.** (2008). Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of bacteriology* **190**, 7773–7785
- Medina, E., Goldmann, O., Toppel, A. W. and Chhatwal, G. S.** (2003). Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism

- for persistence and systemic invasion. *Journal of Infectious Diseases* **187**, 597-603.
- Mishalian, I., Ordan, M., Peled, A., Maly, A., Eichenbaum, M. B., Ravins, M., Aychek, T., Jung, S. and Hanski, E.** (2011). Recruited macrophages control dissemination of group A *Streptococcus* from infected soft tissues. *The Journal of Immunology* **187**, 6022–6031.
- Miyazaki, K., Takaku, H., Umeda, M., Fujita, T., Huang, W., Kimura, T., Yamashita, J. and Horio, T.** (1990). Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a Mycoplasma-infected cell line. *Cancer research* **50**, 4522–4527.
- Moreno, R. and Rojo, F.** (2013). The contribution of proteomics to the unveiling of the survival strategies used by *Pseudomonas putida* in changing and hostile environments. *Proteomics* **13**, 2822–2830
- Montel, M. C. and Champomier, M. C.** (1987). Arginine catabolism in *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology* **53**, 2683-2685.
- Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A. G. O., Maggi, T., Taddei, A. R., Grandi, G. and Telford, J. L.** (2005). Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15641–15646.
- Moustafa, H. H. and Collins, E. B.** (1968). Molar growth yields of certain lactic acid bacteria as influenced by autolysis. *Journal of bacteriology* **96**, 117–125.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T. and Erlich, H.** (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-273.
- Nakata, M., Koller, T., Moritz, K., Ribardo, D., Jonas, L., McIver, K. S., Sumitomo, T., Terao, Y., Kawabata, S., Podbielski, A. et al.** (2009b). Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infection and immunity* **77**, 32–44.
- Nascimento, M. M., Liu, Y., Kalra, R., Perry, S., Adewumi, A., Xu, X., Primosch, R. E. and Burne, R. A.** (2013). Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *Journal of dental research* **92**, 604–608.
- Naumoff, D., Xu, Y., Glansdorff, N. and Labedan, B.** (2004). Retrieving sequences of enzymes experimentally characterized but erroneously annotated: the case of the putrescine carbamoyltransferase. *BMC genomics* **5**, 52-60.
- Neves, A. R., Ramos, A., Shearman, C., Gasson, M. J., Almeida, J. S. and Santos, H.** (2000). Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo¹³C-NMR. *European Journal of Biochemistry* **267**, 3859–3868.
- Ni, Y., Schwaneberg, U. and Sun, Z. H.** (2008). Arginine deiminase, a potential anti-tumor drug. *Cancer letters* **261**, 1–11.
- Nicholson, L. J., Smith, P. R., Hiller, L., Szlosarek, P. W., Kimberley, C., Sehouli, J., Koensgen, D., Mustea, A., Schmid, P. and Crook, T.** (2009). Epigenetic

- silencing of argininosuccinate synthetase confers resistance to platinum-induced cell death but collateral sensitivity to arginine auxotrophy in ovarian cancer. *International Journal of Cancer* **125**, 1454–1463.
- Novak, L. and Loubiere, P.** (2000). The metabolic network of *Lactococcus lactis*: distribution of ¹⁴C-labeled substrates between catabolic and anabolic pathways. *Journal of bacteriology* **182**, 1136–1143.
- Palmfeldt, J., Paese, M., Hahn-Hagerdal, B. and Van Niel, E. W.** (2004). The pool of ADP and ATP regulates anaerobic product formation in resting cells of *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology* **70**, 5477–5484.
- Pancholi, V. and Fischetti, V. A.** (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *The Journal of experimental medicine* **176**, 415–426.
- Pancholi, V. and Fischetti, V. A.** (1998). alpha-Enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14503–14515.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. and Hook, M.** (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology* **48**, 585–617.
- Payne-Botha, S. and Bigwood, E. J.** (1959). Amino-acid content of raw and heat-sterilized cow's milk. *British Journal of Nutrition* **13**, 385–389.
- Philip, R., Campbell, E. and Wheatley, D. N.** (2003). Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: enzymatic degradation of arginine in normal and malignant cell cultures. *British journal of cancer* **88**, 613–623.
- Pichichero, M. E., Hoeger, W., Marsocci, S. M., Murphy, A., Francis, A. B. and Dragalin, V.** (1999). Variables influencing penicillin treatment outcome in streptococcal tonsillopharyngitis. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* **153**, 565-570.
- Podbielski, A., Baird, R. and Kaufhold, A.** (1992). The group A streptococcal M-type 3 protein gene exhibits a C terminus typical for class M proteins. *Medical microbiology and immunology* **181**, 209–213.
- Podbielski, A. and Kreikemeyer, B.** (2001). Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells-a safe place? *The Lancet* **358**, 3–4.
- Podbielski, A. and Kreikemeyer, B.** (2004). Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International journal of infectious diseases* **8**, 81–95.
- Podbielski, A., Melzer, B. and Lütticken, R.** (1991). Application of the polymerase chain reaction to study the M protein (-like) gene family in beta-hemolytic streptococci. *Medical microbiology and immunology* **180**, 213–227.
- Podbielski, A., Spellerberg, B., Woischnik, M., Pohl, B. and Lütticken, R.** (1996). Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). *Gene* **177**, 137–147.
- Podbielski, A., Woischnik, M., Leonard, B. A. B. and Schmidt, K.-H.** (1999). Characterization of nra, a global negative regulator gene in group A streptococci. *Molecular microbiology* **31**, 1051–1064.

- Poolman, B., Driessen, A. J. and Konings, W. N.** (1987). Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *Journal of bacteriology* **169**, 5597–5604.
- Ramirez, Y. P., Weatherbee, J. L., Wheelhouse, R. T. and Ross, A. H.** (2013). *Glioblastoma multiforme* therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals* **6**, 1475–1506.
- Ramon-Maiques, S., Marina, A., Guinot, A., Gil-Ortiz, F., Uriarte, M., Fita, I. and Rubio, V.** (2010). Substrate binding and catalysis in carbamate kinase ascertained by crystallographic and site-directed mutagenesis studies: movements and significance of a unique globular subdomain of this key enzyme for fermentative ATP production in bacteria. *Journal of molecular biology* **397**, 1261–1275
- Reinert, R. R.** (2007). *Streptokokken-Infektionen: aktuelle Aspekte zur Diagnostik, Prophylaxe und Therapie*: UNI-MED-Verlag.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C. G. M. and Hill, C.** (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental microbiology* **11**, 432–445.
- Sanderson-Smith, M. L., Dowton, M., Ranson, M. and Walker, M. J.** (2007). The plasminogen-binding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues. *Journal of bacteriology* **189**, 1435–1440.
- Schimke, R. T., Berlin, C. M., Sweeney, E. W. and Carroll, W. R.** (1966). The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 2228–2236.
- Schmidtchen, A., Frick, I.-M., Andersson, E., Tapper, H. and Björck, L.** (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular microbiology* **46**, 157–168.
- Schottmüller, H.** (1903). Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. *München Medical Wochenschr* **50**, 849–853.
- Shibatani, T., Kakimoto, T. and Chibata, I.** (1975). Crystallization and properties of L-arginine deiminase of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 4580–4583.
- Shirai, H., Blundell, T. L. and Mizuguchi, K.** (2001). A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanidino groups. *Trends in biochemical sciences* **26**, 465–468.
- Smoot, J. C., Barbian, K. D., Van Gompel, Jamie J, Smoot, L. M., Sylva, G. L., Sturdevant, D. E., Ricklefs, S. M., Porcella, S. F., Parkins, L. D., Beres, S. B. et al.** (2002). Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4668–4673.
- Spano, G., Chieppa, G., Beneduce, L. and Massa, S.** (2004). Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of applied microbiology* **96**, 185–193.

- Stevens, D. L.** (1995). Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerging infectious diseases* **1**, 69-78.
- Stollerman, G. H.** (1997). Rheumatic fever. *The Lancet* **349**, 935–942.
- Stretton, S. and Goodman, A. E.** (1998). Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 79–85.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, Martin J, Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U. et al.** (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**, 987–996.
- Syed, N., Langer, J., Janczar, K., Singh, P., Lo Nigro, C., Lattanzio, L., Coley, H. M., Hatzimichael, E., Bomalaski, J., Szlosarek, P. et al.** (2013). Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma. *Cell death & disease* **4**, e458-e469.
- Szlosarek, P. W., Klabatsa, A., Pallaska, A., Sheaff, M., Smith, P., Crook, T., Grimshaw, M. J., Steele, J. P., Rudd, R. M., Balkwill, F. R. et al.** (2006). In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clinical cancer research* **12**, 7126–7131.
- Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Jerlström, P. G., Timmis, K. N. and Chhatwal, G. S.** (1992). Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infection and immunity* **60**, 3837–3844.
- Tang, C. H. and Grimm, E. A.** (2004). Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 288–298.
- Terayama, H., Koji, T., Kontani, M. and Okumoto, T.** (1982). Arginase as an inhibitory principle in liver plasma membranes arresting the growth of various mammalian cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **720**, 188–192.
- Thauer, R. K., Kirchniawy, F. H. and Jungermann, K. A.** (1972). Properties and Function of the Pyruvate-Formate-Lyase Reaction in *Clostridiae*. *European Journal of Biochemistry* **27**, 282–290.
- Thomas, T. D., Ellwood, D. C. and Longyear, V Michael C** (1979). Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *Journal of bacteriology* **138**, 109–117.
- Thompson, J.** (1988). Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. *Biochimie* **70**, 325–336.
- Todd, E. W. and Hewitt, L. F.** (1932). A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **35**, 973–974.
- Tolcher, A. W., Gerson, S. L., Denis, L., Geyer, C., La Hammond, Patnaik, A., Goetz, A. D., Schwartz, G., Edwards, T., Reyderman, L. et al.** (2003).

- Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. *British journal of cancer* **88**, 1004–1011.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B. and Brözel, V. S.** (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and environmental microbiology* **72**, 4970–4977.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., McPhail, A. T. and Sim, G. A.** (1966). Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*, 2. *Journal of the American Chemical Society* **88**, 3888–3890.
- Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkha, G., Papsdorf, K., Steinbach, J. P., Sabel, M. et al.** (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology* **13**, 707–715.
- Winterhoff, N., Goethe, R., Gruening, P., Rohde, M., Kalisz, H., Smith, H. E. and Valentin-Weigand, P.** (2002). Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the arginine deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of bacteriology* **184**, 6768–6776.
- Yoon, C. Y., Shim, Y. J., Kim, E.-H., Lee, J. H., Won, N. H., Kim, J. H., Park, I. S., Yoon, D. K. and Min, B. H.** (2007). Renal cell carcinoma does not express argininosuccinate synthetase and is highly sensitive to arginine deprivation via arginine deiminase. *International Journal of Cancer* **120**, 897–905.
- Yoshida, J., Takamura, S. and Nishio, M.** (1998). Characterization of a streptococcal antitumor glycoprotein (SAGP). *Life sciences* **62**, 1043–1053.
- Zuniga, M., Champomier-Verges, M., Zagorec, M. and Perez-Martinez, G.** (1998). Structural and Functional Analysis of the Gene Cluster Encoding the Enzymes of the Arginine Deiminase Pathway of *Lactobacillus sakei*. *Journal of bacteriology* **180**, 4154–4159.
- Zuniga, M. and del Carmen Miralles, Marinez, Gaspar** (2002a). The product of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. *Applied and environmental microbiology* **68**, 6051–6058.
- Zuniga, M., Perez, G. and Gonzalez-Candelas, F.** (2002). Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Molecular phylogenetics and evolution* **25**, 429–444.

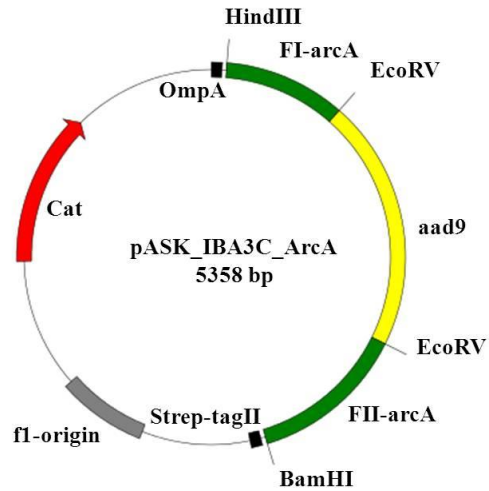
Internetquellen:

<http://www.bacterio.net/>

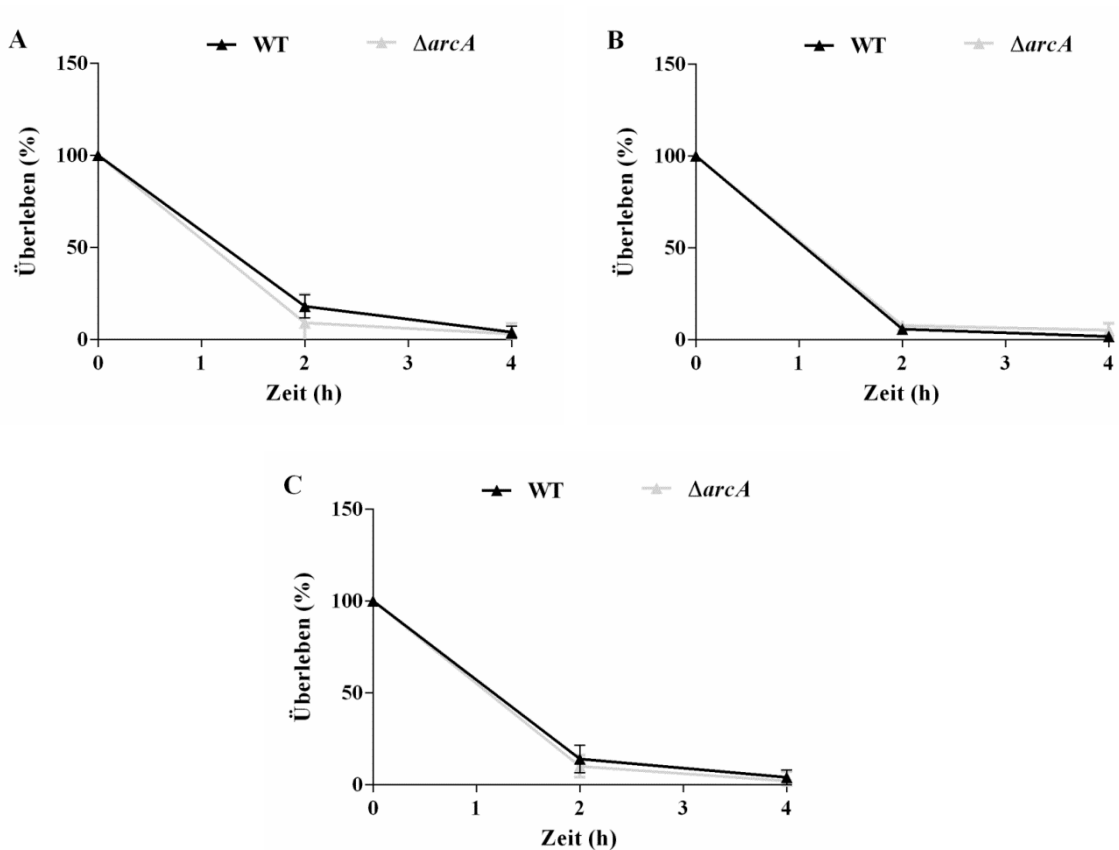
<http://www.brenda-enzymes.org/>

<http://www.primerfox.com/>

Anhang



A-Abbildung 1.: Plasmikarte von Deletionsplasmid pASK_IBA3C_arcA (siehe Abschnitt 3.1)



A-Abbildung 2.: Einfluss von Säurestress auf *S. pyogenes* M49 (WT) und Mutante ($\Delta arcA$). Wildtyp und $\Delta arcA$ -Mutante inkubierten für 4 h in Puffer S mit 50 mM Serin (A), 50 mM Asparagin (B) und 50 mM Glutamin (C) bei 37 °C. Darstellung der Überlebensrate von Wildtyp und Mutante als prozentuale Angabe bezogen auf das Ausgangsinokulum. (siehe Abschnitt 3.3.1)

A

Arginine deiminase

		Identities	Positives
<i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131 (serotype M49)		272/407 (67%)	331/407 (81%)
<i>Enterococcus faecalis</i> V583		90/413 (46%)	265/413 (64%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403: I0329			
<i>S. pyogenes</i>	--MTAQTPIHVYSEIGKLRKLLHRPQKEIENIMPDYLERLIPDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGI		66
<i>E. faecalis</i>	---MSHPINVPSEIGKLRKLLHRPQKEIENIMPDYLERLIPDDIPFLEKQAQEHDAFAELLRSKDI		64
<i>L. lactis</i>	--MNNGINVNSEIGKLRKLLHRPQGAEEVENITFDIMKQLIPDDIPYLYIAQKEHDFPAQTLRDNKA		64
<i>S. pyogenes</i>	EVLDELTALESIGLTPPEIREFIDEYLSEANIRGRATKRAIRELLMAIEDNQELIEKTM		125
<i>E. faecalis</i>	EVVYLEDLAAEALINEEVRROPIDQFLEENIRSESAKRVREIMLEIDDNEELIQRAI		123
<i>L. lactis</i>	ETVYIENLATEVFEKSEETKEEFLSHLLHEAGYRPRGRYDGLTEYLTSMTSKDMVEKIY		123
<i>S. pyogenes</i>	AGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYFFAIDFEMNDYFTRDFEATIGTGVSINHPSEIR		185
<i>E. faecalis</i>	AGIQKQELPKY--EQEFLDMVEADYFFIIDFEMNDYFTRDFEATMGHGISLNHMYSVRI		183
<i>L. lactis</i>	AGVRKVELDIKRTALSDMAGSDAEIN--FYLNELENAFTRDFEQASMGVGMTINKMTFPAI		183
<i>S. pyogenes</i>	NRETLYGKYIFTHHPYGGGKVMVYDRNETTRIEGGDELVLSEKDVLAUGISQRTDAAAI		245
<i>E. faecalis</i>	QRETIFQYIFDYHRRFAGKVEPRVYDRSESTRIEGGDELILSKEVVAIGISQRTDAAAI		243
<i>L. lactis</i>	QPESLITEYVMANHRPFKD--TFIWRDRNHTRIEGGDELILNKTTVAIGVSEPSKTKI		243
<i>S. pyogenes</i>	EKLLVNIFFKQNLG-FKKVLAFAFANRRKFDHDFPTMVDYDKFTIHPEI--EGDLRVYS		305
<i>E. faecalis</i>	EKIARNIFBQKLG-FKNI LAFDIGEHRKFVHDFPTMIDYDKFTIHPEI--EGGLVVYS		303
<i>L. lactis</i>	QNLAKELFANPLSTFDTVLAVIPIHNHAMFDHDFPTMINHDQFTVPEGIMDGAGINIVF		303
<i>S. pyogenes</i>	VTYDNE-ELHIVEERGDLAELLAANLGVKVDLIRCGDNLVAAGREQWIDGSENTLAIAP		365
<i>E. faecalis</i>	ITEKADGDIQITKEKDTLDNILLCKYLHLDNVQLIRCGAGNLTAAREQWIDGSENTLAIAP		363
<i>L. lactis</i>	ILRPGKDDVEIEHLLDILKAAKFKVNLNLSLDELIECGAGDPIAAPREQWIDGSENTLAIAP		363
<i>S. pyogenes</i>	GVVVVYNRNITITNAILESGLKLIKIHSSELVREGRGSPRCMSMPPEREDI		415
<i>E. faecalis</i>	GEVVVYDRNITITNKALEEAGVRLNITPGSELVREGRGSPRCMSMPPYREDL		413
<i>L. lactis</i>	GEIVTYDRNYVTVELLKHSIKVHIELSELVREGRGSPRCMSQPLWREDL		413

B

Carbamate kinase

		Identities	Positives
<i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131 (serotype M49)		201/298 (67%)	245/298 (82%)
<i>Enterococcus faecalis</i> V583		168/314 (54%)	225/314 (71%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403: I0329			
<i>S. pyogenes</i>	MTKQKIVVALGGNAILLSTDA SAKAQEALI STSKSLVKKLIKEGH- EIVIVTHGNPQVGNLLLQ		63
<i>E. faecalis</i>	-MGKIMVVALGGNAILLSDA SAHAQQALVQTSAYLVHLIKQGH- RLIVSHGNPQVGNLLLQ		62
<i>L. lactis</i>	-MAKRIVVALGGNAILLSDPTAQAQSMALNRTABQLMPLIKDNDVEMVIVTHGNPQVGNLLLQ		62
<i>S. pyogenes</i>	QAAADSEKNEAMP LDTCVAMTEGSGIFNLVNALDNELQAQGIQR- EVAAVVTVQIVDAKD		123
<i>E. faecalis</i>	QQAADSEKNEAMP LDTCVAMTQSGI GYWL SNALNOELNKAGIKK- QVATVLTQVVDPAD		122
<i>L. lactis</i>	QLESNSVKNAMP LDTAVAMTQSGI GYVMAQAFTEALANNQMSDVPFVSI VETRTVVDAND		122
<i>S. pyogenes</i>	PAPENPTREPIGPF LTHEEDARK- QMAESGASFREDAGRGWRKVVV SPKPVGKIEANVIRSL		183
<i>E. faecalis</i>	EAPKNPTREPIGPF LTHEAEAKAM-- QAGAIFREDAGRGWRKVVV SPKPIDIHEAETINTL		182
<i>L. lactis</i>	EAPKNPTREPIGPFYSQEAANKIQTQYPDWKLIEDSGRGYRUVV SPPLRIVEANAIKPL		182
<i>S. pyogenes</i>	VDGGVVVSAGGGGVVVEDATSKSLTGVEAVILKDFASQTLSELVDADLFIVLGGVDNV		243
<i>E. faecalis</i>	IKNDIITISCGGGGIPVV---GQELKGVAVIIRDFASENLAEVLVDADALVILGGVDVY		242
<i>L. lactis</i>	LESSALVTVSGGGGIPVIE--FNRGYQGVAVIIRDFPTAAKLAELVDADDELVIFTSVGVY		242
<i>S. pyogenes</i>	YINFNKPDQAKLEEVTVSQMKEMITCDQFAPGSLPKVVEAAIAPVENKPKAKAIITSLN		303
<i>E. faecalis</i>	CINYGREDEKQLTNTVVAELEEMKQAGHPAPGSLPKIEAAICFVE SQPNKQAIITSLN		302
<i>L. lactis</i>	FLNPGKRNQALGVVVFSEMRQLEEGYPAAGSLPKRVAAAVAFVENT-GKHATITSLN		302
<i>S. pyogenes</i>	IDNVLSANAGTQII		317
<i>E. faecalis</i>	LGS-----		305
<i>L. lactis</i>	VENFVKSGAGTRIV		316

A-Abbildung 3.: Vergleich der Aminosäuresequenzen von AD und CK von *S. pyogenes* M49, *Lc lactis* subsp. *lactis* IL1403 und *E. faecalis* V583. A) Identische Aminosäuren sind grau markiert. Die Schlüsselaminosäuren für die Interaktionen mit Wasser und Arginin sind schwarz markiert und die Motive der Guanidinopgruppen-modifizierenden Enzyme sind eingerahmt. B) Die Analogien der Aminosäuresequenz zwischen den verschiedenen CK sind grau markiert. Die Aminosäuren, die für die Bindung von Carbamoylphosphat und ADP verantwortlich sind, sind schwarz markiert. Für die Analyse wurde SIM – Alignment Tool für Proteinsequenzen verwendet (Hering *et al.*, 2013)

Danksagung

Bei Bernd möchte ich mich zuerst herzlich für die Vergabe des interessanten Themas, die freundliche/familiäre Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken. Außerdem gab Bernd mir die Möglichkeit in Manchester zu arbeiten und um dort neue Laborpraktiken zu erlernen. Diese Arbeit wurde zudem mit einer Publikation belohnt.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Tomas für seine jederzeit gewährte Unterstützung, seine Hilfe bei technischen Fragen, beim Verfassen englischer Texte und für seine konstruktive Kritik. Die Gespräche mit Ihm haben sich stets positiv auf den Fortgang der Arbeit ausgewirkt.

Besonders danken möchte ich auch RANS (Regina, Antje, Nikolai; Sylvio). Für die hilfreiche Einführung in die Laborarbeit, ihren guten Ratschläge sowie die freundliche Atmosphäre im Labor. Sie trugen maßgeblich dazu bei, dass mir die Arbeit im Labor Spaß gemacht hat. Sylvio zeigte auch abseits der Arbeit beim Sporten und Skaten, dass man auf Ihn zählen kann.

Danken möchte ich auch Aleks, Jana, Kathleen und Yvonne. Ohne sie wäre ein geregelter Laborablauf nicht möglich. Die gemeinsame Mittagspausen oder die spezielle Schokopause werden mir fehlen.

Auch bei Sari möchte ich mich bedanken. Mit Ihr hatte ich nicht nur abseits der Arbeit viel Spaß, sondern sie drängte mich auch ehrgeizig zur Abgabe meiner Dissertation. Du bist die Beste.

Ein großer Dank gilt auch Franzi, die mich schon seit dem Studium begleitet. Meine Höhen und Tiefen mußte sie ertragen und sie war immer für mich da, wenn ich sie brauchte. Danke dafür!

Es gibt noch viele Leute, die mich während der Dissertation begleiteten, wie Caro, Greta, meine Tanzpartnerin Ramona, Sonja, Nadja, Tini oder Roberto und bei allen möchte mich ebenfalls bedanken.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie speziell meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg sowohl während meines Studiums als auch während der Arbeit an meiner Dissertation gelegt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift