

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Dissertation

Untersuchung des Einflusses kleiner, nicht- kodierender RNAs auf die Virulenzregulation des Humanpathogens *Streptococcus* *pyogenes*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Universität Rostock

Roberto Pappesch
aus Ilmenau

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0086-6

Gutachter:

1. Gutachter: Professor Bernd Kreikemeyer

Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene; Universität
Rostock

2. Gutachter: Professor Sven Hammerschmidt

Institut für molekulare Genetik und Infektionsbiologie, Universität
Greifswald

Datum der Einreichung: 19.05.2017

Datum der Verteidigung: 02.02.2018

Inhalt

1.0	Einleitung.....	6
1.1	Klinische Relevanz von <i>Streptococcus pyogenes</i>	6
1.2	<i>Streptococcus pyogenes</i> -Taxonomie und Serotypisierung	8
1.3	Adhäsion und Invasion von <i>Streptococcus pyogenes</i>	9
1.4	Virulenzgenregulation von <i>Streptococcus pyogenes</i>	12
1.5	Die Regulation über kleine nicht-kodierende-RNAs in GAS.....	14
1.6	Peptidnukleinsäuren.....	17
1.7	Zielstellung.....	18
2.0	Material und Methoden.....	20
2.1	Materialien und Geräte.....	20
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	20
2.1.2	Laborgeräte und Software	22
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.4	Bakterienstämme.....	25
2.1.5	Kulturmedien und Antibiotikazusätze.....	26
2.1.6	Lösungen und Puffer	31
2.1.7	Kits und Größensandards.....	32
2.1.8	Oligonukleotide und Peptidnukleinsäuren	32
2.2	Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1	Stammhaltung	34
2.2.2	Versuchsaufbau für Wachstumsinhibitionsversuche	34
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.3.1	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	35
2.3.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pyogenes</i>	35

2.3.3 Isolierung, reverse Transkription und Quantifikation von RNA aus <i>S. pyogenes</i>	35
2.3.3.1 Vorbereitung der Kulturen für die RNA-Extraktion	35
2.3.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Blut- und THY-Kulturen und Eliminierung von DNA aus RNA-Proben	36
2.3.3.3 cDNA-Synthese und RT-qPCR.....	37
2.3.4 Proteomanalyse.....	37
2.3.4.1 Vorbereitende grobe Proteinextraktion	37
2.3.4.2 Proteinverdau in Lösung.....	38
2.3.4.3 Analyse durch nanoLC-HDMS ^E	38
2.3.3.4 NanoLC-HDMS ^E -Datenprozessierung, Proteinidentifikation und -quantifikation	39
2.3.5 Herstellung elektrokompenter <i>S. pyogenes</i> -Zellen	41
2.3.6 Transformation elektrokompenter <i>S. pyogenes</i> -Zellen	42
2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion	42
2.3.7 Transkriptstabilitätsuntersuchungen	43
2.3.8 Sequenzierungen	43
2.4 Virulenz Untersuchungen.....	44
2.4.1 Überleben im humanen Vollblut und Plasma.....	44
2.4.2 Kapsuläre Hyaluronsäure-Messung	44
2.4.3 Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinozyten	45
2.5 Tierversuche	46
2.5.1 Mausinfektionsmodell.....	46
2.5.2 Larveninfektionsmodell.....	47
3.0 Experimente und Ergebnisse.....	49
3.1 sRNA MarS	49
3.1.1 Die Deletion von MarS resultiert in einem verminderten Überleben in humanem Vollblut.....	51

3.1.2 MarS hat einen positiven Einfluss auf die Kapselproduktion	52
3.1.3 sRNA MarS beeinflusst die Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinozyten	53
3.1.4 Die Deletion von marS resultiert in einer verringerten mga und Mga-abhängigen Transkriptabundanz	55
3.1.5 Die Deletion von MarS führt zu einem verstärkten Wachstum in chemisch definierten Medien (CDM) mit Maltose, α -D-Laktose und Schleimsäure	58
3.1.6 Die Deletion von marS verändert das Proteom von GAS M49	58
3.1.7 Die Deletion von sRNA MarS resultiert in einer höheren Dissemination in vivo	61
3.1.8 MarS hat keinen Einfluss auf die Progression der Infektion in <i>Galleria mellonella</i>	62
3.2 sRNAScanner 66	63
3.2.1 Die Deletion von sRNA 66 zeigt keinen Einfluss auf das Überleben in humanem Vollblut.....	64
3.2.2 Die Deletion von sRNA 66 resultiert in einer verringerten Adhärenz an und einer verstärkten Internalisierung in humane Keratinozyten	64
3.2.4 sRNA 66 hat einen Einfluss auf das Proteom von GAS M49	66
3.2.4 sRNA 66 hat einen starken Einfluss auf die Expression seiner Nachbargene	68
3.3 Die genetisch veränderten Stämme weisen vereinzelte SNPs auf	70
3.4 Etablierung eines <i>Galleria mellonella</i> in vivo Modells zur Analyse von potentiellen alternativen Therapeutika gegen <i>Streptococcus pyogenes</i>	72
3.4.1 <i>Galleria mellonella</i> Larven können erfolgreich mit Levofloxacin behandelt werden.....	72
3.4.2 Tat-Anti-gyrA PNAs sind ein wirksames Therapeutikum gegen <i>Streptococcus pyogenes</i> in vivo	73
3.4.3 Antibiotikaresistenz als neues Ziel im Gegensatz zu essentiellen Genen	75
4.0 Diskussion	77
4.1 sRNA MarS	77

4.2 sRNA 66.....	81
4.3 Invertebratenmodell	84
5.0 Zusammenfassung	86
Literaturverzeichnis	88
Anhang	107
Anhang 1: IntaRNA von sRNA MarS.....	107
Anhang 2: sRNATarget von sRNA 66	108
Anhang 3: TargetRNA2 von sRNA 66.....	110
Anhang 4: SNPs in MarS	111
Anhang 5: SNPs in 66.....	112
Anhang 6: BLAST-Analyse der Sequenzierung von mga in Δ marS, Δ marS::marS und dem WT	113
Anhang 7: Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	120

1.0 Einleitung

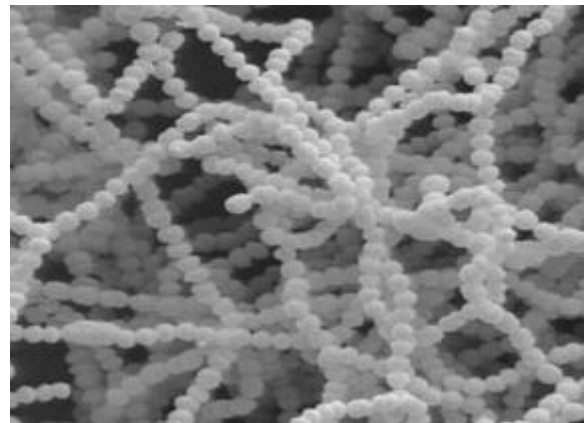
1.1 Klinische Relevanz von *Streptococcus pyogenes*

Auf und in einem Menschen leben etwa 1×10^{14} Bakterien. Diese sind für ihn überlebensnotwendig. Jedoch gibt es Arten, die der Gesundheit des Menschen schaden [7]. *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*) stellt dabei den relevantesten Vertreter der Streptokokken für den Menschen dar. Es handelt sich hierbei um ein klinisch relevantes Pathogen, welches ausschließlich an den Menschen angepasst ist. Das Bakterium verursacht gewöhnlich Infektionen der oberen Atemwege, wie Tonsillitis und Pharyngitis, die mild bis moderat ausfallen können [8]. Von allen Pharyngitisfällen sind 15-30 % bei Kindern und 5-20 % bei Erwachsenen auf eine Infektion mit *Streptococcus pyogenes* zurückzuführen und es wird beobachtet, dass sich diese im Herbst und Winter häufen [9]. Durch Integration eines Prophagen in das Genom werden zusätzliche genetische Informationen erworben und Scharlach induziert. Die Inzidenz von Scharlach ist im vergangenen Jahrhundert mit einer durchschnittlichen Infektionsrate von 4 pro 100000 dramatisch gesunken [10]. Jedoch kommt es weltweit immer wieder zu größeren Ausbrüchen, wie 2009 in Vietnam, 2011 in Hong Kong oder 2014 in England, bei denen die Infektionsrate auf bis zu 49 pro 100000 anstieg [10,11]. Am stärksten betroffen sind Kinder unter 10 Jahren mit der höchsten Inzidenz im Frühling [12]. Zusätzlich zu den oberen Atemwegen befällt *S. pyogenes* auch die Haut und verursacht dort Krankheiten wie Impetigo und Erysipel [13,14]. Die Anzahl der weltweiten Infektionen ist nicht bekannt, jedoch liegen allein die Infektionen der Haut bei Kindern in Entwicklungsländern bei 111 Millionen Fällen jährlich [15]. Hierbei wird die Inzidenz maßgeblich von verschiedenen Faktoren beeinflusst, von denen Klima und Hygienebedingungen die ausschlaggebendsten sind. In tropischen und subtropischen Gebieten ist das Auftreten dieser Infektionen am häufigsten [16]. *Streptococcus pyogenes* ist jedoch auch dazu befähigt in tiefere Gewebsschichten einzudringen und damit schwere lebensgefährliche Infektionen wie nekrotisierende Faszitis (NF), Sepsis oder das Streptokokken-induzierte toxische Schocksyndrom (STSS) auszulösen [14,17]. NF ist die Infektion tieferliegenden subkutanen Gewebes und Faszien, die durch eine extensive sich schnell ausbreitende Nekrose gekennzeichnet ist und führt in 70-80 % der Fälle trotz Behandlung zum Tod

[17–19]. Die Inzidenz ist jedoch mit 0,4 pro 100000 sehr gering. Am stärksten betroffen sind Menschen mit peripheren Durchblutungsstörungen, Störungen des Lymphabflusses oder Immundefizienz und häufig Diabetiker [20]. Die hohe Sterblichkeit bei NF ist auch durch die Assoziation eines STSS zu begründen. Dabei kommt es zur massiven Stimulierung von Immunzellexpansion und einer starken Zytokin-Expression. Der Grund sind bakterielle Toxine die als Superantigene fungieren und dadurch die normale MHC (Major Histocompatibility Complex)-begrenzte Antigen-Prozessierung umgangen wird. Die Folge sind Gewebeschädigungen, sich ausbreitende intravaskuläre Koagulation und Organversagen [21]. Die Inzidenz von invasiven Infektionen durch *Streptococcus pyogenes* wird mit 3,8 pro 100000 angegeben. Das Vorkommen schwerwiegender Verläufe wird mit Infektionen der Serotypen M1 und M3 in Verbindung gebracht [22]. Am häufigsten betroffen sind dabei Personen im Alter von ≥ 65 Jahren. Unbehandelte bzw. unvollständig behandelte Infektionen mit *S. pyogenes* können zusätzlich rheumatisches Fieber und damit assoziierte Herzkrankheiten oder die akute postinfektiöse Glomerulonephritis auslösen [23,24]. Diese Krankheiten sind eine Folge von Kreuzreaktionen der gegen *S. pyogenes* gebildeten Antikörper [25]. Weitere Autoimmunreaktionen können postinfektiös auch zu neuropsychiatrischen Syndromen (PANDAS) führen [26–29]. Die genaue Krankheitslast, die durch *S. pyogenes* ausgelöst wird ist nicht bekannt. Jedoch existieren Zahlen zu einzelnen Krankheitsbildern. Demnach kommt es pro Jahr zu ~ 18,1 Millionen invasiven Infektionen von denen 517000 tödlich verlaufen, 111 Millionen Hautinfektionen, 616 Millionen Fällen von Pharyngitis und 1,9-2,2 Millionen Fällen von rheumatischem Fieber [30]. Damit zählt *S. pyogenes* zu den wichtigsten bakteriellen Pathogenen auf der Welt. Allerdings ist *S. pyogenes* gegen Penicillin sensitiv und leichte Infektionen können effektiv behandelt werden [8,14].

1.2 *Streptococcus pyogenes*-Taxonomie und Serotypisierung

Streptococcus pyogenes, ist ein grampositives, unbewegliches, nicht zur Sporulation befähigtes und Katalase-negatives Bakterium. Es ist paarweise oder kettenförmig angeordnet (Abbildung 1). Taxonomisch zählt *S. pyogenes* zur Gattung *Streptococcus* und wird in die Familie der *Streptococcaceae* eingeordnet.



Aufgrund seiner Fähigkeit des ausschließlich fermentativen Zuckerabbaus

Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. pyogenes* [1].

unter Bildung von Laktat gehört *S. pyogenes* zur Ordnung der *Lactobacilliales* [31,32].

Die erste grobe taxonomische Einteilung von *S. pyogenes* erfolgte durch eine von Brown veröffentlichte Studie. In dieser konnte aufgrund des Hämolyseverhaltens von Streptokokken auf Blutagarplatten die erste grobe Einteilung vorgenommen werden [33]. Die Hämolyse wurde so zu einem wichtigen Differenzierungsmerkmal. Hierbei wird zwischen α -, β - und γ - Hämolyse unterschieden. Als α -Hämolyse wird die Umwandlung von Hämoglobin zu Methämoglobin bezeichnet. Dabei bleiben die Zellmembranen der Erythrozyten intakt und es entsteht ein grüner Hof um die Bakterienkolonien, was auch als Vergrünung bezeichnet wird. Bei der β -Hämolyse hingegen werden von den Streptokokken verschiedene Hämolsine abgegeben, die die Erythrozyten vollständig auflösen. Das Hämoglobin wird dabei abgebaut, so dass auf Blutagarplatten ein klarer durchscheinender Hof um die Kolonien entsteht. Die γ -Hämolyse verändert den Blutagar nicht, weshalb hier auch oft von nichthämolisierenden Streptokokken gesprochen wird [33].

Außer der Einteilung nach der Hämolyseart, gibt es eine weitere Differenzierungsmöglichkeit die 1933 von Lancefield eingeführt wurde. Diese Klassifizierung basiert auf gruppenspezifischen Polysaccharidantigenen (C-Substanz), die ein Bestandteil der Zellwand sind. Mit dieser Methode können eine Vielzahl verschiedener serologischer Gruppen unterschieden werden (A-H, K-V), von denen β -hämolisierende Gruppe A der Streptokokken (GAS), von denen *Streptococcus pyogenes* die Typspezies ist, die größte medizinische Bedeutung besitzen [34]. Zusätzlich kann eine weitere serologische Einteilung von GAS über das M-Protein vorgenommen werden. Bis heute sind über 80 verschiedene Serovare des

M-Proteins bei A-Streptokokken bekannt, die durch den hypervariablen Bereich am N-Terminus des Proteins unterschieden werden können [35]. Da die Herstellung von Typisierungsseren jedoch sehr zeit- und kostenintensiv ist, wird heute in der Diagnostik zunehmend auf molekularbiologische Differenzierung umgestellt. Hierfür werden die für das M-Protein kodierenden Gene (*emm*) genutzt, die je nach Subtyp in verschiedenen Allelen vorkommen. Diese Eigenschaft macht es zu einem guten Ziel für eine *emm*-spezifische Polymerase Kettenreaktion (PCR), sowie für Sequenzierungen [36–38]. Mit diesen Methoden können bisher ~175 verschiedene *emm*-Typen unterschieden werden, was eine noch spezifischere Differenzierung der einzelnen Subtypen zulässt [39,40]. Seltener wird ein weiteres zellwandassoziiertes Protein, das T-Antigen, als Differenzierungsmerkmal für GAS verwendet, das Teil von pilus-ähnlichen Strukturen ist. Bis heute können ~20 T-Serotypen unterschieden werden [39,41]. Auch die Bestimmung des Serum Opazitäts Faktors (SOF) wird zur Typisierung verwendet. Bei SOF handelt es sich um ein Lipoprotein, welches die Freisetzung von Fettsäuren aus Fetttransport-Komponenten in Säugetierseren bewirkt und in der Folge zu einer Ausfällung (Opazität) von unlöslichen Fettsäuresalzen führt. Jedoch liegt der Anteil an SOF-positiven GAS-Subspezies nur bei etwa 50 %, so dass mit dieser Methode ebenfalls nur eine grobe Einteilung möglich ist. Zusätzlich kommt es durch eine hohe intergenetische Rekombinationsrate selten zu zufriedenstellenden Ergebnissen [39,42,43].

1.3 Adhäsion und Invasion von *Streptococcus pyogenes*

Die Wirt-Pathogen-Interaktion und die krankheitsauslösenden Eigenschaften der Pathogene werden durch Virulenzfaktoren bestimmt. Diese können in Adhäsine, Invasine, Aggressine und Immunmoduline unterteilt werden. Für eine vollständige Auflistung wird an dieser Stelle auf die Arbeiten von Cunningham (2008), Nobbs (2009), Walker (2011) und Brouwer (2016) verwiesen [8,14,44,45].

Damit sich GAS erfolgreich im menschlichen Wirt ausbreiten können, evolvierten verschiedene Mechanismen. Eine etablierte Annahme ist, dass *S. pyogenes* zunächst in Kontakt mit extrazellulären Matrixproteinen (ECM) wie Kollagen, Laminin, Fibrinogen, Vitronektin oder Fibronektin kommen muss, um eine erfolgreiche Infektion einzuleiten [46–48]. Dabei kommt es zunächst zu einer schwachen, gefolgt von einer spezifischen, hoch affinen Bindung. Schwache Interaktionen erfolgen durch Lipoteichonsäuren und leiten so die initiale Bindung ein. Diese ermöglicht eine

Einleitung

unterstützende Bindung von Pili [8]. Nach deren Bindung können hoch affine Protein-Protein oder Lektin-Kohlenhydrat Bindungen gebildet werden. GAS besitzt eine Vielzahl Proteine, die diese Bindung eingehen. Sie werden deswegen auch Adhäsine genannt. Viele dieser Adhäsine sind an Peptidoglykan gebunden und somit in der Zellwand der Bakterien verankert. Diese Verankerung wird durch Sortase Enzyme wie SrtA katalysiert [8,49,50]. Die Mehrzahl der Adhäsine bei GAS werden aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Proteinfamilie der MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) zugeordnet [51,52]. Eine wichtige Gruppe der MSCRAMMs

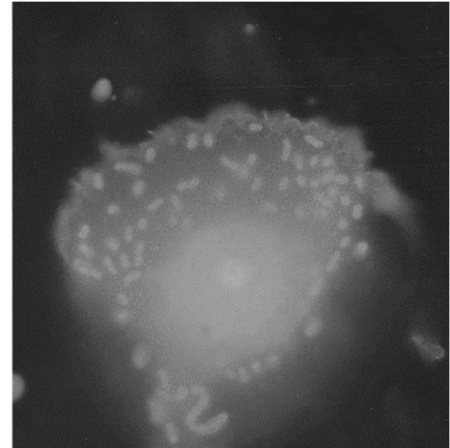


Abbildung 2:
Immunofluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Bindung von GAS an humane Keratinocyten [2]

stellen Fibronektin-bindenden Proteine (FBP) dar. Sie werden neben Pili auf FCT-Pathogenitätsinseln (fibronectin- and collagen-binding \underline{I} -antigen region) (FCT-1-9) kodiert [53]. Die bedeutendsten Proteine dieser Gruppe bei GAS sind PrtF1 und PrtF2 und werden auf FCT-1 kodiert. Fast jeder GAS-Stamm kodiert für ein beziehungsweise beide dieser FBPs [54–56]. Es wurde gezeigt, dass sie die Adhäsion an vielen verschiedenen Zelloberflächen ermöglichen. Neben Fibronektin können sie zusätzlich Fibrinogen binden. Wichtige Vertreter von GAS wie der hoch pathogene Serotyp M1T1 kodieren jedoch für keines der beiden FBPs und binden dennoch sehr effizient Fibronektin, was eine FCT-1 unabhängige Regulation anzeigt [57]. Neben der Regulation über die FCT-Pathogenitätsinseln gibt es weitere Faktoren die für die Bindung von Fibronektin zuständig sind. Hier hervorzuheben sind der Serumopazitätsfaktor (SOF) und das Fibronektin-Bindeprotein X (SfbX). Beide sind ebenfalls durch Sortase A in der Zellwand verankert. Es wurde gezeigt, dass SOF maßgeblich an der Bindung und Invasion von HEp-2 Zellen beteiligt ist [58–60].

Neben den MSCRAMMs sind noch andere Proteine an der Adhäsion der Bakterien an die Wirtsoberfläche beteiligt. Wichtige Vertreter sind hier die kollagenähnlichen Proteine Scl1 und Scl2, die an eine Reihe von Wirtsrezeptoren binden können und dadurch die Adhäsion an und Invasion in humane Zellen fördern. Diese Bindung erfolgt durch die Strukturähnlichkeit wie die Bindung von humanem Kollagen. Diese vermittelt die Absorption von humanen Plasmaproteinen (LDL) und resultiert in der anschließenden Anlagerung an $\alpha 2\beta 1$ -Integrinen an der Wirtsoberfläche [61,62].

Einleitung

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren in GAS ist das M-Protein. Es ist ein ebenfalls durch SrtA in der Zellwand gebundenes Protein, das aus den vier, sich wiederholenden Sequenzen A-D besteht. Diese variieren in der Größe und in der Aminosäurekomposition. Dabei ist der hypervariable A-Bereich maßgeblich für die große Diversität der M-Proteine verantwortlich. Bisher konnten durch Sequenzierung bereits über 220 Varianten beschrieben werden [63,64]. Diese unterscheiden sich nicht nur in der Struktur, sondern auch auf funktioneller Ebene und in den Interaktionen mit dem menschlichen Wirt. Es wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt, dass das M-Protein zur Adhäsion beiträgt und antiphagozytär wirkt [47,65,66]. Auch die Invasion in tiefere Gewebsschichten wurden mit dem M-Protein assoziiert, da es spezifisch an den Rezeptor CD46 und Fibronektin binden kann [8].

Auch nicht zellwandgebundene Faktoren können eine Rolle bei der Adhäsion und Invasion spielen. Ein Beispiel ist das Pyrotoxin B von Streptokokken (SpeB). Als Cysteinprotease hat es die Fähigkeit eine Vielzahl von Molekülen zu degradieren und zu inaktivieren und GAS vor dem Immunsystem des menschlichen Wirtes zu schützen. Die „Reifung“ von SpeB erfolgt über 3 Stufen (mSpeB1-3). Die mSpeB2 Form besitzt eine spezifische RGD-Aminosäuresequenz, die Integrine binden kann und somit Einfluss auf die Invasion von Wirtszellen ausübt [67,68].

Auch die Hyaluronsäurekapsel (HK) von GAS spielt eine bedeutende Rolle bei der Dissemination der Streptokokken im menschlichen Wirt. Hierbei handelt es sich um Glycosaminoglycan, welches aus sich abwechselnden Bestandteilen von N-Acetyl-Glucosamin und Glucuronsäure besteht. Sie schützt direkt vor Phagozytose da eine Assoziation mit PMNs verhindert wird. Ebenfalls bindet die HK an den Rezeptor CD44 und fungiert als Adhäsion. Die Bindung von CD44 führt zu einer neuen Anordnung des Zytoskeletts in humanen Epithelzellen, was zu Störungen innerhalb von Zell-Zell-Verbindungen führt und GAS ermöglicht in tiefere sterile Gewebsschichten einzudringen [14,47]

1.4 Virulenzgenregulation von *Streptococcus pyogenes*

In dieser Arbeit kann nur auf bestimmte Regulationsmechanismen eingegangen werden. Eine detaillierte Übersicht über die Virulenzregulation bietet das Paper von McIver 2016 und Kreikemeyer 2003, an die an dieser Stelle verwiesen wird [62,69].

Die Kontrolle der Genexpression in *S. pyogenes* wird durch eine Reihe von regulatorischen Systemen gesteuert. Diese lassen sich nach dem heutigen Stand der Forschung in 3 Gruppen unterteilen: Zwei-Komponenten Signaldtransduktionssysteme (two component systems, TCSs), sogenannte alleinstehende Transkriptionsaktivatoren/-repressoren (stand alone transcriptional regulators, SATs) und kleine nicht-kodierende RNAs (small RNAs, sRNAs). Bisher sind in GAS 13 TCSs und 30 SATs bekannt, die die Virulenz durch die Integration von Umwelteinflüssen, des eigenen metabolischen Status und „Feedback“-Signalen durch die Expression regulieren und in einer koordinierten Antwort münden [62].

TCSs sind typische Regulationseinheiten in Bakterien und bestehen aus einer transmembranen Sensor-Histidinkinase, welche extrazelluläre Signale erkennt und an einen assoziierten cytoplasmatischen „Responseregulator“ weitergibt. Dieser übermittelt das Signal durch eine Aktivierung oder Repression der Genexpression [69,70]. Das am besten untersuchte TCS in *S. pyogens* ist CovR/S. In diesem System registriert CovS Umweltveränderungen, wie beispielsweise den Mg^{2+} -Gehalt der Umgebung und phosphoryliert und aktiviert damit bei Veränderungen CovR. Dieser Responseregulator hat Einfluss auf eine Reihe von Virulenzgenen, inklusive dem *has*-Operon, dass für die Bildung der Kapsel in GAS verantwortlich ist. Das CovR/S TCS reguliert die Expression von ca. 15 % der Gene in GAS und stellt dadurch einen Masterregulator dar. Für einen besseren Überblick über das Cov-System sei an dieser Stelle auf die Veröffentlichung von Churchward 2007 verwiesen [71].

Einen anderen Masterregulator in GAS stellt der SAT Mga dar. Er reguliert direkt und indirekt die Expression von ca. 10 % des gesamten Genoms in *S. pyogenes*. Hierbei handelt es sich um ein 62 kDa. großes Protein, das bisher in allen GAS-Sero- bzw. Genotypen gefunden wurde [72,73]. Die Nukleotidsequenz von *mga* kann dabei bis zu 21 % variieren. Zusätzlich wurden bis heute 2 verschiedene Allele des Gens (*mga-1*, *mga-2*) identifiziert [74,75]. Trotz der verschiedenen Allele, ähnelt sich die Aminosäuresequenz der beiden Proteine Mga-1 und Mga-2 bis zu 97 %. Das Allel *mga-1* findet man ausschließlich in SOF-negativen Klasse I Stämmen, die mit Infektionen des Rachenraumes assoziiert sind. Das *mga-2* Allel ist hingegen nur in

SOF-positiven Klasse II Stämmen zu finden, die häufig Hautinfektionen auslösen oder Generalisten sind. Das impliziert eine Anpassung des Regulators an verschiedene Bedingungen des jeweiligen Lebensraums [62,73]. Mga reguliert als Positivregulator die Expression verschiedener Gene, die für die Virulenz eine entscheidende Rolle spielen. Das direkt benachbarte Gen *emm*, welches das M-Protein (s.1.3) kodiert, wird von Mga reguliert [62]. Stromabwärts des *mga*-Gens liegen ebenfalls eine Reihe von Genen, die durch Mga reguliert werden. Dieser Bereich wird als *mga*-Lokus bezeichnet und wurde in bisher allen GAS-Stämmen gefunden. Diese Region beinhaltet beispielsweise das für die C5a Peptidase kodierende Gen *scpA*, die Gene *fcrA* und *enn*, welche für M-ähnliche Proteine kodieren, das Gen *sic*, welches für den sekretierten Komplementinhibitor kodiert und *fba*, dass für ein Fibronektinbindeprotein kodiert [76,77]. Jedoch liegen bei weitem nicht alle Gene, die durch Mga reguliert werden auch im *mga*-Lokus. Die Gene, die für die Fibronektin bindenden Proteine SfbX und SOF (s. 1.3) kodieren liegen 12 kb entfernt von *mga* in Klasse II Stämmen und sind dennoch von dem Regulator abhängig [78,79]. Mga beeinflusst auch die Expression des Kollagen-ähnlichen Proteins SclA (s.1.3) dessen Gen *scfA* ca. 30 kb entfernt von *mga* lokalisiert ist [80]. Ferner reguliert Mga auch die Utilisation verschiedener Zucker. Dieser Mechanismus kann ein entscheidender Wachstumsvorteil sein [81]. Die Regulation der Expression von Mga ist zweigeteilt, da sich einerseits Mga positiv autoreguliert und andererseits von anderen Regulatoren beeinflusst wird. Die Produktion des Proteins, welche in der exponentiellen Phase am stärksten ist, scheint auf einer Regulation zu basieren, die auf bestimmte Umweltsignale reagiert. Jedoch ist der genaue Zusammenhang nicht bekannt [82]. Auch TCSs sind an der Regulation der Mga-Expression beteiligt. Ein Beispiel stellt TrxR/S dar, das die Mga-Expression positiv beeinflusst [83,83]. Es wurde auch gezeigt das der SAT CcpA direkt an den Promotor von *mga* (*Pmga*) *Pmga* bindet und eine starke Expression des Proteins während der exponentiellen Phase gewährleistet [84]. Einige „RofA-like protein type“ Regulatoren (RALPs) wie RALP3, RofA und Nra binden an *Pmga*, reprimieren jedoch die Transkription von *mga* [85–87]. Der Regulator RopB hat ebenfalls einen reprimierenden Effekt auf die Expression von Mga, jedoch wurde eine direkte Bindung an *Pmga* noch nicht nachgewiesen [88]. Einen indirekten Einfluss auf die Mga-Expression nimmt auch das TCS CovR/S indem es die Expression von TrxR/S reprimiert [83]. Der Faktor RivR ist als Positivregulator von Mga und Mga-

abhängiger Gene annotiert. Jedoch wird diese Annahme bisher kontrovers diskutiert [89–91].

1.5 Die Regulation über kleine nicht-kodierende-RNAs in GAS

Bakterien nutzen außer den SATs und den TCSs auch kleine nicht-kodierende RNAs (sRNAs) zur Expressionsregulation. Da lange Zeit angenommen wurde, dass proteinvermittelte Regulationsmechanismen in Lebewesen vorrangig sind, rückten Ribonukleinsäuren erst in jüngerer Zeit in den Fokus der Forschung. Im gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* beispielsweise wurden durch systematische Suchmethoden hunderte putative sRNAs gefunden. Davon sind über 80 als regulatorische Einheiten bestätigt und ihre Anzahl wächst stetig. Es wird zunehmend klar, dass sRNAs einen wichtigen Bestandteil des Regulationssystems in Bakterien darstellen und, ähnlich wie regulatorische Proteine, ganze regulatorische Netzwerke ausbilden können [6,92]. Kleine nichtkodierende RNAs können die Transkription, die Translation sowie die mRNA-Stabilität modulieren. Dazu werden unterschiedliche Mechanismen eingesetzt, die das Binden an Proteine, Basenpaarung mit RNAs, Interaktion mit DNA oder Konformationsänderung in RNAs einschließen [93].

Eine Art von regulatorischen RNAs sind „Riboswitches“. Diese sind ein integrierter Bestandteil des 5'-Endes von mRNAs. Sie können auf verschiedene Signale wie stockende Ribosomenaktivität, Temperatur, kleine Liganden und möglicherweise auch auf ungeladene tRNAs reagieren [94]. Das wird durch die Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen ermöglicht. Diese Konformationsänderung führt nach Bindung zur Termination von Transkriptionsprozessen, Initiation von Translationsprozessen oder RNA Prozessierungen [95,96]

Es wurde auch gezeigt, dass einige sRNAs Einfluss auf die Proteinaktivität haben (Abbildung 3). Dabei kommt es durch direkte Interaktion zu spezifischen Aktivitätsänderungen. sRNAs sind durch Konformationsänderungen zudem in der Lage Proteinstrukturen nachzuahmen und somit einen antagonistischen Effekt an deren Wirkungsort zu generieren [6,92,97].

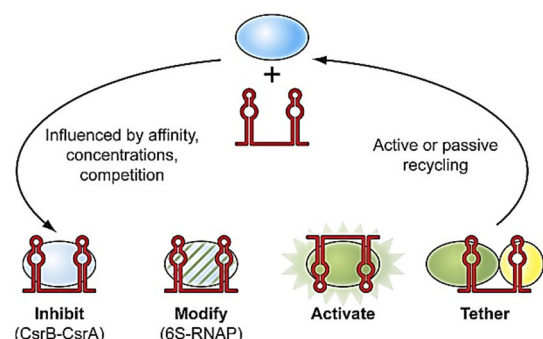


Abbildung 3: Einfluss von sRNAs auf die Proteinaktivität [6]

Einleitung

Eine andere Kategorie von sRNAs interagiert über Basenpaarung mit Ziel mRNAs. Hierbei wird in zwei Klassen unterschieden: den *cis*-kodierenden und den *trans*-kodierenden sRNAs (Abbildung 4). *Cis*-kodierte sRNAs sind auf dem gegenläufigen DNA-Strang lokalisiert, der für ihre Ziel-mRNA kodiert. Diese Klasse zeichnet sich durch eine hohe Komplementarität aus. Trotz der Lokalisation am gleichen Genort, kommt es zu einer unabhängigen Transkription [98].

Die andere Klasse dieser sRNA-Gruppe ist *trans*-kodiert. Diese sRNA-Klasse zeigt gegenüber den *cis*-kodierten sRNAs eine geringe Komplementarität mit ihren Ziel-mRNAs. Sie regulieren die Translation, haben Einfluss auf die Stabilität der Zielmoleküle oder interagieren mit Proteinen. Kleine *trans*-kodierte RNAs binden vorrangig an die 5'UTR ihrer mRNAs, die auch die Ribosomenbindestelle beinhaltet. Eine negative Regulation ist die Folge, wenn die Bindung an die Ziel-mRNA zur Degradierung des Komplexes führt oder die Translation der mRNA

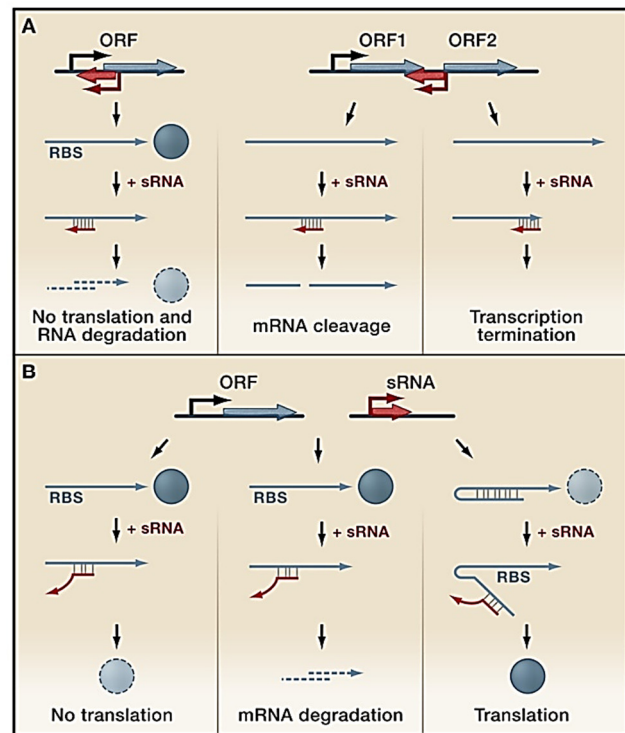


Abbildung 4 Funktionsprinzipien von (A) cis-kodierten und (B) trans-kodierten sRNAs [5]

unterbunden wird. Führt die Bindung an die Ziel-RNA zur Stabilisierung des Transkripts, kommt es zur Transkriptionsaktivierung. Typischerweise können durch den limitierten Kontakt in diskontinuierlichen Mustern einzelne *trans*-sRNAs an mehrere Ziel-mRNAs binden. Jedoch ist das vermutlich auch der Grund warum die *trans*-Regulation häufig von RNA-Chaperonen wie Hfq abhängig ist, die die Basenpaarungen zwischen den Bindungspartnern erleichtern [99–101].

Trotz zahlreicher globaler sRNA Untersuchungen in Streptokokken, ist das Wissen um RNA-abhängige regulonähnliche Netzwerke in GAS nur sehr gering [102]. Eine dieser Netzwerke umfasst sRNAs, die ein Bestandteil des bakteriellen Immunsystems sind. Diese CRISPR-RNAs („Clustered regularly interspaced short palindromic repeat RNAs“) spielen eine bedeutende Rolle in der Virulenzausprägung bei Streptokokken [103,104]. Auch *trans*-agierende sRNAs, die durch direkte Basenpaarung an mRNA

binden wurden in GAS identifiziert. Hierzu gehört die sRNA Pel ("pleiotropic effect locus"). Sie besitzt einen pleiotropen Effekt auf die Virulenz in *S. pyogenes* und es wurde gezeigt, dass sie auf die Expression verschiedener Virulenzfaktoren Einfluss nimmt. Dazu gehören das M-Protein, SpeB, Fibronectin-bindende Proteine und Streptokinase [105]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das untranslatierte Transkript von *pel*, das gleichzeitig für das Streptolysin S Peptid (*sagA*) kodiert, einen Effekt auf die Expression von Virulenzfaktoren in GAS besitzt [106]. Jedoch konnte dieser regulatorische Effekt von PEL für den GAS Serotyp M1T1 nicht nachgewiesen werden und wird kontrovers diskutiert [107,108].

Der Genlocus einer anderen sRNA, *rivX*, ist stromabwärts des Gens, welches für den transkriptionellen Regulator RivR kodiert, lokalisiert. Es wurde gezeigt, dass RivR die Transkription des globalen Regulators Mga steigert. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion der beiden Regulatoren. Über die sRNA RivX wurde spekuliert, dass sie auf separaten Wegen die Expression verschiedener Gene, die von Mga direkt oder indirekt reguliert werden, aktiviert [109]. In einer, mit dieser Ansicht in Konflikt stehenden Veröffentlichung von Trevino *et al.*, konnte eine negative regulatorische Wirkung von RivR auf die Kapselproduktion, jedoch nicht auf das Mga Regulon gezeigt werden. Ebenfalls konnten die Autoren keine regulatorischen Funktionen von RivX nachweisen [110].

Die einzige sRNA in *S. pyogenes*, die bisher detailliert charakterisiert wurde, stellt FasX dar. Sie wurde ursprünglich als Positivregulator für das *fasBCA*-Operon annotiert [111]. Nachträglich konnte jedoch gezeigt werden, dass FasX einen positiven Einfluss auf die Expression der Streptokinase nimmt, indem sie die *ska* mRNA stabilisiert [112]. Sie fungiert ebenso als Negativregulator der Pili-Expression, indem sie die mRNA des Pilus-Operons destabilisiert und somit die Translation des *cpa*-Transkriptes inhibiert, welches ein Pilus Protein kodiert [113]. Diese Inhibierung der Piliexpression erfolgt nach anderen Untersuchungen serotypspezifisch, indem mRNAs der Fibronectin, Kollagen oder T-Antigen (FCT) Regionen inhibiert werden [114]. In einer neuen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass FasX einen negativen Einfluss auf die Expression der Fibronectin-Bindeproteine PrtF1 und PrtF2 (s. 1.3) ausübt [115].

1.6 Peptidnukleinsäuren

Multiresistente Keime sind ein wachsendes Problem in der modernen Medizin und Alternativen zu Antibiotika zu finden ein essentielles Ziel [116,117]. Ein alternatives Therapeutikum könnten Nukleinsäure-Analoga darstellen. In den letzten Jahrzehnten wurden diese extensiv modifiziert, indem die Phosphodiester-Brücke oder das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat durch verschiedene neutrale oder geladene Strukturen ersetzt wurden [118].

Ein Beispiel dafür stellen Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) dar. Eingeführt wurden PNAs durch Nielsen *et al.* 1991 [119,120]. Es handelt sich hierbei um DNA-Analoga, die anstelle des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA oder RNA, ein Peptidrückgrat besitzen (Abbildung 5). Dieses ist aus sich wiederholenden *N*-(2-Aminoethyl)-Glycin Einheiten aufgebaut, die über einen Acetyl-„Linker“ mit Purin- oder Pyrimidinbasen verknüpft sind [4,121]. Das synthetische Rückgrat stattet PNAs mit einer einzigartigen

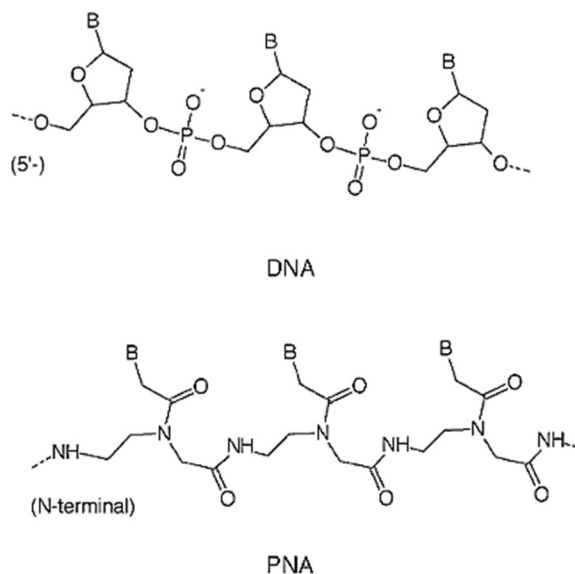


Abbildung 5: Chemischer Aufbau von PNA im Vergleich zu DNA [4]

Hybridisierungscharakteristik aus. Anders als DNA oder RNA sind sie elektrisch neutral und deshalb keiner elektrostatischen Repulsion unterworfen. Die Bindung an Ziel-Nukleinsäuren ist dadurch ungewöhnlich spezifisch, stark und hitzestabil. Das künstliche Rückgrat schützt PNAs zusätzlich vor der Degradierung durch Nukleasen und Proteasen, so dass die Lebensdauer dieser Moleküle ebenfalls ungewöhnlich hoch ist [122].

Diese Eigenschaften verleihen PNAs unter anderem die Fähigkeit über „Antisense“-Bindungen die Transkription von Genen bzw. die Translation von mRNAs zu inhibieren. Auf dieser Basis fanden einige Wachstumsinhibitionsversuche in Prokaryoten statt, um PNAs auch im Kampf gegen pathogene Bakterien einsetzen zu können. Als Ziele wurden mRNAs genutzt, die für essentielle Genprodukte kodieren. Diese Experimente fanden sowohl in den gramnegativen als auch –positiven pathogenen Spezies *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* und einem nicht pathogenen *Escherichia coli* Stamm statt [123,124].

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Region des Start-Codons, die die Shine-Dalgarno Sequenz beinhaltet, das effektivste Ziel für RNaseH- unabhängige „Antisense“-PNAs darstellt. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf die Blockierung der Bindung der 30S-Ribosomenuntereinheit zurückgeht [125].

Die Aufnahme von PNAs in Zellen ist ein limitierender Faktor. Durch ihre hydrophilen Eigenschaften können PNAs schlecht durch Zellmembranen diffundieren, was ein Transportsystem notwendig macht. Es wurde gezeigt, dass sich hierfür besonders Zell-Penetrierende-Peptide (CPPs) eignen, die über Ethylenglycol an PNAs gebunden werden [121,126]. CPPs sind partielle Aminosäuresequenzen, die eine Membran-Transduktionsdomäne (MTD) beinhalten. MTDs ermöglichen die Translokation über die Zellmembran. Deren Sequenzen wurden von Transkriptionsfaktoren, bakteriellen und viralen Oberflächenproteinen, Toxinen, amphipatischen helixbildenden Peptiden und Rezeptorliganden abgeleitet [127]. CPPs können in polykationische und amphipatische Typen unterteilt werden. Die meisten CPPs gehören dem polykationischen Typ an und bestehen überwiegend aus basischen und unpolaren Aminosäuren, während der amphipatische Typ alternierend polare und unpolare Aminosäuren aufweist. Trotz der extensiven Nutzung der CPPs ist der exakte Prozess, der zur zellulären Aufnahme führt nur schlecht verstanden [128]. Erst in den letzten Jahren wird die Translokation hinter einigen CPPs näher untersucht. Dabei wurden verschiedenartige Mechanismen zwischen einzelnen CPP-Typen, mit unterschiedlich effizienter Aufnahme in Zellen und Gewebe identifiziert [129–132].

1.7 Zielstellung

In der letzten Dekade wurde exzessiv an sRNAs geforscht und es gilt als unumstritten, dass diese eine wichtige Rolle in der Regulation von vitalen Prozessen einnehmen [133]. Es konnte auch gezeigt werden, dass sie bei der Resistenzbildung und Virulenzausprägung essentiell sein können [93,133,134]. In *S. pyogenes* ist über die Funktion und den Einfluss von sRNAs noch wenig bekannt. Neben Pel und RivX, über deren Funktion noch wissenschaftlich kontrovers diskutiert wird, existieren bisher nur solide Daten über CRISPR-RNAs und FasX (s.1.5). Deswegen sollte das Ziel dieser Arbeit hauptsächlich darin bestehen, die im Zuge von Vorarbeiten [100] gefundenen putativen sRNAs MarS und 66 zu charakterisieren, und mögliche Funktionen zu definieren. Hierbei war der Einfluss auf die Virulenz von besonderem Interesse. Zusätzlich sollte auf Grundlage früherer *in vitro* Studien mit PNAs [135] ein

Einleitung

Invertebraten-Tiermodell und ein angepasstes *in vitro* Modell entwickelt werden, um CPP-gekoppelte PNAs *in vivo* untersuchen zu können. Der Einsatz von PNAs in *S. pyogenes* stellt eine moderne Strategie dar, um GAS-sRNAs durch einen PNA vermittelten Knock-Down untersuchen zu können.

2.0 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

In Tabelle 1 sind die Chemikalien und Enzyme aufgelistet, die in der Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme

Chemikalien / Enzyme	Hersteller
Acid-Phenol:Chloroform, pH 4.5 (with IAA, 125:24:1)	Thermo Fisher Scientific, MA USA
Agar (Agar technical No.3)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aminobenzoesäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau Natrium-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Columbia Blutagarplatten	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
dNTP-Mix	Qiagen GmbH, Hilden
Eisennitratnonahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Eisensulfatheptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Erythromycin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (absolut)	Zentralapotheke des Klinikums, Universität Rostock
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Folsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
GEbox anaer System	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol (99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Guaninhydrochloridmonohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ladepuffer 6X	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
L-Alanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Aspartat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Cystin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Histidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Hydroxyprolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Lysinmonohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Phenylalanin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Serin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Threonin	Merck KGaA, Darmstadt
L-Tryptophan	Merck KGaA, Darmstadt
L-Tyrosin	Merck KGaA, Darmstadt
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Magnesiumsulfatheptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nicotinamidadenindinukleotid	Merck KGaA, Darmstadt
Panthotensäure Calcium Salz	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Phusion® Polymerase	Finnzymes, Vantaa, Finnland (über Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
PNA	Peps4LS GmbH, Heidelberg
Pyrodoxamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyrodoxalhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Riboflavin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Salzsäure rauchend (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Spectinomycindihydrochlorid x 5 H₂O	MP Biomedicals, LLC, Eschwege
Thiamin HCL	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Todd-Hewitt Broth-Fertignährmedium	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Tris (Trizma®Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Hydrochlorid (Pufferan®)	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TRIzol® RNA Isolation Reagents	Thermo Fisher Scientific, MA USA
Uracil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2 Laborgeräte und Software

In der nachfolgenden Tabelle sind Laborgeräte gelistet, die in der Arbeit verwendet wurden

Tabelle 2: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analysenwaage Typ Adventurer™ Pro	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen

Brutschrank Binder Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Eddy Jet Spiralplater 1.22	IUL Instruments GmbH, Königswinter
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Biometra, Göttingen
Elektroporator Easyject Plus Equibio	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gefrierschrank -80°C Typ Hera freeze	Heraeus, Hamburg
Geldokumentation	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Heizblock Typ Thermostat 5355	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator Precellys 24	VWR International GmbH, Erlangen
Inkubationsschüttler Typ 3031	GFL, Wunstorf
Inkubationsschüttler Typ NB-205L	N-Biotek, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Kühlzentrifuge Typ 5417 R	Eppendorf, Hamburg
mini-Vakuum-Pumpe Typ E1	Axon Lab AG, Baden-Dättwil
Pipetten (2,5; 10; 100; 200; 1000 µl)	
Pipettierhilfe accu jet® pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reinstwasseranlage „Ultra Clear plus“	Systemische Gesellschaft, Berlin
Spektrophotometer Picodrop	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, CA, USA
Spektrophotometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, CA, USA
Stepper „Multipette plus“	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Typ Herasafe	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler (PCR) Typ T3	Biometra, Göttingen
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Vortex-Schüttler	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hamburg
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Hamburg

Es wurde folgende Software verwendet:

- Intas GDS Application, Intas Science Imaging GmbH, Göttingen
- Picodrop _I Spektrophotometer-Software Version 1.03, Picodrop Ltd., SaffronWalden, England
- Windows 10, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Microsoft Office Edition 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Spectramax-Software SoftMax R Pro 5.4, MDS Analytical Technologies (US) Inc., Sunnyvale, CA, US
- Graphpad Prism, GraphPad Software, Inc, CA, USA

Folgende frei verfügbare Software wurde genutzt:

- zum Designen von Primern und Vergleichen von Sequenzdaten:
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
<http://www.primerfox.com/>

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

In nachfolgender Tabelle sind die Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die in der Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1/4" Ceramic sphere	MP Biomedicals Deutschland GmbH, Eschwege
Anaerocult®-Gefäße	Merck KGaA, Darmstadt
Aner Indikator	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
BD Microlance 27G 3/4-Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Desinfektionsmittel AHD2000	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin
Desinfektionsmittel Bacillol®AF	Bode Chemie, Hamburg
Elektroporationsküvetten (2mm-Gap)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Glasperlen (2,85-3,3 mm)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Glasperlen (Ø 0,10 – 0,11 mm)	Satorius, Goettingen
Impfösen 731170, 731101	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen 10 µl, graduiert	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen Pipette Tips (200 & 1000 µl)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Plastikpipetten L27; 64; 08 (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Plastikröhrchen PP-Test tubes (10, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäß steril (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schraubreaktionsgefäß (2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Stepper-Spitzen Combitips plus[®] (5; 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
UVpette-tips für Picodrop Nr. 311.110	Biozym, Hessisch Oldendorf 20
Zellkulturplatten, 96 Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen (75 cm²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

2.1.4 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde mit *Streptococcus pyogenes* M49 (591) und M18 (8232) Isolaten und daraus resultierenden rekombinanten Stämmen gearbeitet. Das *S. pyogenes* M49 Isolat wurde von R. Lütticken (Aachen) zur Verfügung gestellt. Das M18 Isolat stammt

aus dem Zentrum für Epidemiology und Mikrobiologie am nationalen Institut für öffentliche Gesundheit (Prag, Tschechien).

Rekombinante Stämme des M49 Isolats sind Bestandteil der Stammsammlung des Instituts für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene (IMIKRO). In der nachfolgenden Tabelle sind die, in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgelistet.

Tabelle 4: Bakterienstämme und Herkunft

Bakterienstamm	Herkunft
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49	R.Lüttiken, Aachen
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 $\Delta marS$	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 $\Delta marS::marS$	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 $\Delta marS::MMmarS$	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 pAT18/GFP	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 $\Delta 66$	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 $\Delta 66::66$	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M18	Zentrum für Epidemiology und Mikrobiologie, Prag
<i>Streptococcus pyogenes</i> M18 $\Delta marS$	IMIKRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M18 $\Delta marS::marS$	IMIKRO

2.1.5 Kulturmedien und Antibiotikazusätze

Für die Anzucht der Bakterien wurden die nachfolgenden Komplexmedien benutzt. Die Angaben beziehen sich hierbei auf 1 Liter Gesamtvolumen in autoklaviertem Reinstwasser (A. bidest.).

Todd-Hewitt -Yeast Medium: 36,4g Todd-Hewitt-Broth-Fertignährmedium

(THY-Medium) 4,5g Hefextrakt

Brain-Heart-Infusion Medium (BHI): 37g Brain-Heart-Infusion-Broth-Fertignährmedium

CDM-IMIKRO:	Monosaccharide/Disaccharide	1 % / 0.5 %
	Na ₂ HPO ₄	7.35 g
	NaH ₂ PO ₄	3.2 g

Material und Methoden

Na(CH ₃ COO)	4.5 g
A. bidest <i>ad.</i> 200 ml	
Phosphate buffer	10 ml
Asparagine	0.1 g
Amino acid mix	20 ml
L-Leucine	0.2 g
L-Glutamic acid solution	3.4 ml
D/L-Alanine	0.1 g
L-Isoleucine	0.1 g
L-Methionine	0.1 g
L-Threonine	0.2 g
L-Arginine	0.1 g
L-Histidine	0.1 g
L-Tryptophane Lösung	5 ml
L-Valine	0.1 g
-Lysine	0.14 g
Riboflavin Lösung	25 ml
Vitamin mix	25 ml
Biotin Lösung	20 ml
Folsäure Lösung	40 ml
Pyridoxamine 2 HCl	1.44 mg
L-Glutamin	0.4 g
L-Cystin Lösung	5 ml
L-Tyrosin Lösung	10 ml
AGU-Mix	44 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 ml
Salze	5 ml
Pyridoxal HCl	1 mg
NADH	2.5 mg
pH 7.4 mit NaOH	
A. bidest <i>ad.</i> 1000 ml	

Material und Methoden

Vor dem Gebrauch wurden folgende zwei Komponenten frisch zu 10 ml Medium zugefügt:

	Natriumbicarbonat	0.025 g
	L-Cystein	0.005 g
Phosphat-Puffer:	KH ₂ PO ₄	2 g
	K ₂ HPO ₄	10 g
	A. bidest <i>ad.</i>	100 ml
Aminosäure-Mix:	L-Aspartat	2 g
	L-Phenylalanin	2 g
	L-Serin	2 g
	L-Prolin	4 g
	L-Hydroxyprolin	4 g
	Glycin	4 g
	2.5 N NaOH	6.4 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	400 ml
Phosphatpuffer:	KH ₂ PO ₄	2 g
	K ₂ HPO ₄	10 g
	A. bidest <i>ad.</i>	100 ml
Aminosäure Mix:	L-Aspartat	2 g
	L-Phenylalanin	2 g
	L-Serin	2 g
	L-Prolin	4 g
	L-Hydroxyprolin	4 g
	Glycin	4 g

Material und Methoden

L-Glutamat Lösung:	L-Glutamat	6 g
	2.5 N NaOH	19.2 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	200 ml

L-Tryptophan solution:	L-Tryptophan	4 g
	2 N HCl	20 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	200 ml

Riboflavin Lösung:	Riboflavin	8 mg
	Konzentrierte Essigsäure	0.1 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	100 ml

Vitamin Mix:	NADH	100 mg
	Thiamin HCl	20 mg
	Aminobenzoessäure	4 mg
	Ca-Panthothensäure	20 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	250 ml

Biotin Lösung:	Biotin	5 mg
	95 % Ethanol	1 ml
	0.001 N HCl	49 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	200 ml

→ 20 ml dieser Lösung wurden mit 180 ml 0.01 N HCl gemischt

Folsäure Lösung:	Folic acid	5 mg
	2.5 N NaOH	0.1 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	250 ml

L-Cystin Lösung:	L-Cystin	4 g
	2 N HCl	80 ml

Material und Methoden

	A. bidest	<i>ad.</i>	400 ml
L-Tyrosin Lösung:	L-Tyrosine		4 g
	2.5 N NaOH		16 ml
	A. bidest	<i>ad.</i>	400 ml
AGU Mix:	Adeninsulfat		435 mg
	Guanine HCl H ₂ O		310 mg
	Uracil		250 mg
	2 N HCl		50ml
	A. bidest	<i>ad.</i>	500 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O:	MgSO ₄ x 7 H ₂ O		7 g
	2 N HCl		1 ml
	A. bidest	<i>ad.</i>	50 ml
Salts:	FeSO ₄ x 7 H ₂ O		100 mg
	CaCl ₂		200 mg
	MnSO ₄ x H ₂ O		100 mg
	Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O		20 mg
	2 N HCl		1.2 ml
	A. bidest	<i>ad.</i>	100 ml

Für die Herstellung von Festmedien, wurde 15g Agar (Oxoid) zu je 1 Liter THY/BHI-Medium hinzugefügt werden. Jedes Medium wurde vor Verwendung 20 Minuten bei 121°C und 1bar Druck autoklaviert um Keimfreiheit zu gewährleisten.

Zur Herstellung von Selektivmedien wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Antibiotika zugefügt.

Material und Methoden

Tabelle 5: Liste der Antibiotika und deren Konzentration für die Selektion von *E. coli*

Zusatz	Stocklösung	Endkonzentration
Erythromycin	10 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])	300 mg/l
Levofloxacin	10 mg/ml in A. dest.(ste.) + 10 % DMSO	Variabel
Penicilin	5 mg/ml in A. dest., sterilfiltriert	250 mg/l
Spectinomycin	10mg/ml in A. dest., sterilfiltriert	100 mg/l
Rifampicin	10 mg/ml in A.dest., sterilfiltriert	1 g/l

Antibiotika wurden erst nach dem Autoklavieren bei einer Mediumtemperatur von ca. 50°C zugefügt.

2.1.6 Lösungen und Puffer

10x PBS		NaCl	80 g
		KCl	2,0 g
		Na ₂ HPO ₄	14,4 g
		KH ₂ PO ₄	2,4 g
		Aqua bidest. ad.	1000ml
		pH 7,4 mit NaOH; autoklaviert	
6x Loading	Dye:	Bromphenolblau	0,25 % [w/v]
		Xylencyanol	0,2 % [w/v]
		Glycerin	30 % [v/v]
		EDTA-Na ₂ H ₂ O	
		(0,5M, pH 8,0)	50mM
50x TAE-		Puffer Tris -HCl	2M
		Eisessig	1M
		EDTA-Na ₂ H ₂ O	50mM
		(0,5M, pH 8,0)	
		pH 7,5	

Material und Methoden

Nachweis-Lösung	Stains -all	20 µg
	Eisessig	60 µl
	Formamid	50 ml
	A. bidest. <i>ad.</i>	100 ml
Blutlyse-Puffer	Phenol	1 ml
	SDS	300 mg
	EtOH	20 ml
	A. bidest <i>ad.</i>	100 ml

2.1.7 Kits und Größenstandards

Das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) diente der Aufreinigung von PCR-Amplikons und enzymatisch modifizierter Plasmid-DNA.

Für die Determinierung der Größe von doppelsträngiger DNA (dsDNA) durch Agarose-Gelelektrophorese diente der O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, St. Leon- Rot).

Für die RNA-Aufreinigung aus Blut wurde das Direct-zol™RNA miniPrep Kit (Zymo Research, Irvine) nach Herstellerangaben benutzt.

2.1.8 Oligonukleotide und Peptidnukleinsäuren

In der nachfolgenden Liste sind die Oligonukleotide aufgelistet, die für diese Arbeit benutzt wurden.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Gen ID	Stromaufwärts (5'→3')	Stromabwärts (5'→3')
5 S RNA	AGCGACTACCTTATCTCACAG	GAGATACACCTGTACCCATG
<i>gyrA</i>	CGACTTGTCTGAACGCCAAA	TTATCACGTTCCAAACCAGTCAA
<i>sRNASpy490957c</i>	GATTATCAAAGTCGGCTTCCCGC	AGTCACTTTTGCGCAGGGGAGG
<i>mga</i>	TTCACAGATAACAACGTTATGGTC	TTCTGGTTTTTGTACCTCTTTGTCACT
<i>mga I seq</i>	CCTCAAGTTGTGATTGCGC	TGGTGATGCTGAGATTGAGC
<i>mga II seq</i>	CTCGACGAGTATACCATAGC	TTGACCTTACCTCTATGGGC

Material und Methoden

<i>hasA</i>	GGGAGTTCAAACACAGATGC	CGGTGAACGATAACGTTTCG
<i>hasB</i>	CAGAATCGAGAAAATTAAATAGTCACA TG	AGACAATAACCTCCATAACCAAATGA
<i>hasC</i>	TTTATCCGTCAAAGCCACCC	AGTCATCTCCAAGCATGACC
<i>emm49</i>	CGGAGAATAACGTGTCTAGC	CTGTAAGATCGGCGATTTCG
<i>scl</i>	AAAACCTGCTGACAAAGAAGCTAAC	TGGCTACAGGTGTCTTAGCCATATT
<i>sfbX</i>	GGCCCCCTGCTAAACCTGAAG	GTAGCTTGTGACGATCCCTCATCT
<i>sof</i>	CAGTTCGATTATACCAAGCGTGTAG	TGAGGGCTACTACTACCACAGTTATT
<i>cpsY</i>	TTTGTCTCACTCCTCAAGCG	TTCCCAAGTTCTTGTCTCGC
<i>pyrF</i>	ACCAGTGAAGACCAAATCCG	CCATCTAGCTGAGCTTTAGC
<i>pyrE</i>	ACAGTCACAGCAGGTATTCC	TTTGGCCTTTAAGCACACGC
<i>oppA</i>	GAAGCTTTGACAGGTGAAGG	GTTTGAAAGACTGGGCTTCC
<i>slo</i>	AAAACAAACCAGACGCGGTAGT	TGCTTTGTCTCCCATACCTGGTA
<i>sagA</i>	TGCTGCTGTACTACTTGTGCTTCT	GCTAAATAGATTATTTACCTGGCGTATAA CT
<i>speB</i>	GCCGCATAGCTGAAACCTTT	AACTGCTGCACGCGCATA
<i>dppA</i>	ATGATGTGCGCGGCTTATC	GATAGCCATCAGGAGAATCAGTGA

Tabelle 7: Tabelle der verwendeten PNAs. Die Stammlösung für alle PNAs hatte eine Konzentration von 1mM

Bezeichnung	Sequenz PNA	Sequenz scrambled-PNA
KFF-Anti- <i>gyrA</i>	H-(KFF) ₃ K-eg1-tgcatttaag-NH ₂	H-(KFF) ₃ K-eg1- attagactgt-NH ₂
TAT-Anti- <i>gyrA</i>	GRKKRRQRRRYK-eg1-tgcatttaag-NH ₂	GRKKRRQRRRYK-eg1-attagactgt-NH ₂
Antennapedia-Anti- <i>gyrA</i>	RQIKIWFQNRRMKWKK-eg1-tgcatttaag-NH ₂	RQIKIWFQNRRMKWKK-eg1-attagactgt-NH ₂
Cadherin-Anti- <i>gyrA</i>	LLIILRRRIRKQAHAAHSK-eg1- tgcatttaag-NH ₂	LLIILRRRIRKQAHAAHSK-eg1-attagactgt-NH ₂
TAT-Anti- <i>erm</i>	GRKKRRQRRRYK-eg1-gttcatgtaa-NH ₂	GRKKRRQRRRYK-eg1-tgtcagtata-NH ₂

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Stammhaltung

Die *S. pyogenes* Wildtypstämme M49 (WT) und M18 (WT18) wurden auf Columbia Blutagarplatten und rekombinante Bakterienlinien auf THY-Festmedien mit den jeweiligen Antibiotikazusätzen aufbewahrt. Für Übernachtskulturen (ÜNK) wurde Koloniematerial in 10 ml THY-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zusätzlich erfolgte eine Stammhaltung. Zu diesem Zweck wurde eine ÜNK gründlich vermischt und 700 µl der Zellsuspension auf 300 µl 85 % Glycerinlösung gegeben und diese wiederum gut vermischt. Die Stammlösung kann bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.2.2 Versuchsaufbau für Wachstumsinhibitionsversuche

Um einen neuen Versuchsaufbau zu etablieren, welcher für Voruntersuchungen bei Tiermodellen relevanter ist, wurden Tat-Anti-*erm*-PNAs verwendet, die sich gegen eine Erythromycinresistenzgenkasette richten. Zu diesem Zweck wurde als Bakterienstamm ein pAT19 tragender Wildtyp (WT) verwendet. Als Kontrolle der PNA-Spezifität dienten „scrambled“-PNAs. Dabei handelt es sich um PNAs, deren Basen in anderer Anordnung vorliegen, so dass keine Spezifität für die Zielstruktur vorliegt. Desweiteren diente der unveränderte WT als Negativkontrolle im Versuchsaufbau.

Für die Durchführung des Inhibitionsversuches wurde zunächst eine ÜNK in einem BHI/PBS-Gemisch (3:20) 1:20 verdünnt und mit 10 µl Erythromycinlösung (10 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 20 ml versetzt. Die daraus resultierende Übertagkultur (ÜTK) wurde in ein 2 ml Reagenzgefäß überführt und mit einer 20 µM PNA-Endkonzentration in einem Endvolumen von 400 µl versetzt. Um die Wachstumshemmung zu messen, wurden die Suspensionen 6 h bei 37°C unter ständiger Rotation inkubiert.

Um die koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFUs) bestimmen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe des Ausgangsinokulums und der bebrüteten Suspensionen mit PBS angefertigt und auf THY-Platten ausgebracht. Diese wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet. Die Kolonien wurden am Folgetag ausgezählt und ausgewertet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren in Lösungen wurde mit Hilfe des Spektralphotometers Picodrop bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 4 µl einer unverdünnten oder verdünnten Probe gemessen, wobei das Lösungsmittel als Blindwert diente.

Über die zu dem Photometer gehörende Software konnten die Konzentrationen in ng/µl bestimmt werden und zusätzlich wurde der Reinheitsgrad angegeben. Dies erfolgte über das Verhältnis der Extinktionen bei 260/280 nm (Ratio). Proben mit einer Ratio von 1,8-2,0 wurden als nahezu rein betrachtet, wohingegen eine Ratio unterhalb von 1,8 auf Proteinverunreinigungen und überhalb auf Verunreinigungen durch Salze und andere organische Verbindungen hindeutete [136].

2.3.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pyogenes*

Um DNA aus den Bakterien zu isolieren wurde zunächst eine ÜNK bei 4500 rpm (revolutions per minute; „Umdrehungen pro minute“) für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in ein mit 0,3 ml Glasperlen (Durchmesser von 0,10 – 0,11 mm) versetzten 2 ml Schraubröhrchen überführt, bei 6000 rpm für 2 * 20 Sekunden im Homogenisator geschüttelt und anschließend bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert.

100 µl des Überstands wurden mit 500 µl PB-Puffer (Quiagen, Hilden) vermischt und nach dem Protokoll des QIAquick® PCR Purification Kits weiter verfahren. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

2.3.3 Isolierung, reverse Transkription und Quantifikation von RNA aus *S. pyogenes*

2.3.3.1 Vorbereitung der Kulturen für die RNA-Extraktion

Im Zuge der Doktorarbeit wurde RNA aus THY-Kulturen und Blut-Kulturen gewonnen. Für die Isolierung von RNA aus THY-Kulturen wurde zunächst eine ÜNK in einem Verhältnis von 1:20 und einem Endvolumen von 20 ml mit frischen THY-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37 °C und 5 %CO₂ bebrütet. Durch anschließende Zentrifugation bei 4500 rpm für 5 min konnten die Bakterien pelletiert und bis zur RNA-Isolierung bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Isolierung von RNA aus Blutkulturen erfolgte zunächst analog zu der Isolierung aus THY. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und anschließend vorsichtig in jeweils 5 ml humanem Vollblut suspendiert.

In einer Hybridisierungskammer wurden die Kulturen unter ständiger Rotation für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 4500 rpm für 10 min. Um die Blutzellen von den Bakterien zu trennen, wurde das Pellet in Blut-Lyse-Puffer (BLP) gewaschen. Zu diesem Zweck wurde es in 5 ml BLP aufgenommen und kräftig gemischt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4500 rpm für 5 min. Das Pellet wurde in 5 ml 1 x PBS aufgenommen, kräftig gemischt und erneut bei 4500 rpm für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand konnte nachfolgend verworfen und das Pellet bei –20°C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt werden.

2.3.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Blut- und THY-Kulturen und Eliminierung von DNA aus RNA-Proben

Die Pellets der Bakteriensuspensionen aus THY-Kulturen (s. 2.3.3.1) wurden in 1 ml TRIzol® aufgenommen. Anschließend wurden diese in ein mit 0,3 ml Glasperlen versetztes 2 ml Schraubröhrchen überführt und bei Raumtemperatur (RT) und 6500 rpm für 2 * 20 Sekunden im Homogenisator geschüttelt. Nach der Homogenisierung erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min.

Anschließend erfolgte für die RNA aus beiden Kulturen eine Extraktion in saurer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (PCI). Zu diesem Zweck wurden 800 µl der TRIzol-Nukleinsäure-Lösung vom Überstand abgenommen und mit 1 ml PCI vermischt und in ein neues 2 ml Schraubröhrchen überführt. Zusätzlich wurden der Lösung 20 µl einer 2 molaren Natriumacetatlösung (NaAc) beigelegt. Das Gemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur und 2500 rpm für 2 * 20 Sekunden im Homogenisator geschüttelt und danach bei 4°C und 7500 rpm für 10 min zentrifugiert. Die daraus resultierende wässrige, obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und die Extraktion im Anschluss 2 x wiederholt.

Die wässrige Phase wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskalten absolutem Ethanol 24 Stunden bei -20°C präzipitiert.

Material und Methoden

Nach der Präzipitation erfolgte eine Pelletierung durch Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C für 30 min. Nach dieser Prozedur wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, erneut bei 15000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet im offenen Reaktionsgefäß für 20 min unter der Sterilbank angetrocknet und anschließend in 50 µl mit Diethylpyrocarbonat behandelten Wassers (DEPC-H₂O) gelöst.

Um eine vollständige Lösung zu gewährleisten, wurde die Lösung bei 4°C eine Stunde inkubiert und anschließend auf 60 °C für 10 min erhitzt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte nach 2.3.1.

Für die essentielle und vollständige Eliminierung von chromosomaler DNA aus den RNA Proben wurde das TURBO[™]DNase-Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.3.3.3 cDNA-Synthese und RT-qPCR

Für die Synthese von cDNA wurde das “Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR” (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) nach Herstellerangaben genutzt und bis maximal 1 Woche bei 4°C gelagert und verwendet.

Die Quantitative PCR Amplifikation wurde mit dem ViiA[™] 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt), unter Verwendung von SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) durchgeführt. Als Referenztranskript diente die 5S- rRNA.

Die relative Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta ct}$ Methode bestimmt [137].

Alle Primer, die für die RT-qPCR verwendet wurden, sind in Tabelle 7 gelistet.

2.3.4 Proteomanalyse

Die Behandlung und Analyse der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Leiter der Core-Facility „Proteomics“ der Universität Rostock Dr. Stefan Mikkat.

2.3.4.1 Vorbereitende Proteinextraktion

Um Rohextrakte zu isolieren wurden zunächst 3 x 10 ml ÜT- Kulturen aus einer ÜN-Kultur angefertigt. Dies erfolgte durch die Verdünnung der ÜK in einem Verhältnis von 1:20 in frischen THY-Medium. Das Wachstum der Bakterien wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (OD₆₀₀ 0,4; 1,0 und nach 24 h) gestoppt, die Zellen

Material und Methoden

wurden zentrifugiert und 2x mit 1 x PBS gewaschen. Das resultierende Pellet konnte bis zur weiteren Behandlung bei -20°C gelagert werden.

Der Aufschluss des Pellets erfolgte in 500 µl 10mM Tris-HCl Lösung im Precellys 24 Homogenisator bei 6500 rpm für 2 x 20 Sekunden unter Verwendung von Glasperlen. Anschließend erfolgte durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm eine Trennung in eine zytoplasmatische und zytoplasmaarme Fraktion.

2.3.4.2 Proteinverdau in Lösung

Die zytoplasmaarme Fraktion wurde zunächst in 200 µl Lösungspuffer (50mM Ammoniumbicarbonat-Lösung (ABC), 1,5 % Natriumdeoxycholat-Lösung (SDC), 10 mM Dithiothreitol-Lösung (DTT) aufgenommen und bei 95°C für 5 min inkubiert und anschließend in einem Ultraschallbad 10 min behandelt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 22130 rpm für 10 min bei Raumtemperatur. Vom Überstand wurden 130 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 15 mM Iodacetamid-Lösung (IAA) für 20 min bei Raumtemperatur alkalisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit dem doppelten Volumen 50 mM ABC vermischt. Trypsin („sequencing grade“, Promega GmbH, Mannheim) wurde in einer Enzym/Protein-Ratio von ca. 1:100 und einem Endvolumen von 320 µl zugefügt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 16 h.

Für den Verdau der zytoplasmatischen Fraktion wurden 100 µg Protein in Lösungspuffer mit einem Endvolumen von 300 µl 5 min bei 95 °C inkubiert.

Die Alkalisierung und der Verdau mit Trypsin erfolgte analog zu dem Verdau der zytoplasmaarmen Fraktion. SDC wurde aus beiden Fraktionen nach der „phase transfer surfactant“-Methode entfernt [138]. 320 µl Ethylacetat (1 vol) und 6.5 µl 25 % Trifluoressigsäure (0.5 % Endkonzentration) wurden den Lösungen zugefügt, 2 Minuten stark geschüttelt und anschließend bei 12000 rpm für 10 min zentrifugiert um eine Trennung in eine organische und wässrige Phase zu vollziehen. 200 µl der wässrigen Phase wurde durch die Verwendung von Gelladespitzen abgenommen und durch C₁₈-Entsalzungsspitzen entsalzt [139].

2.3.4.3 Analyse durch nanoLC-HDMS^E

Die Massenspektrometrie wurde mit einem Synapt G2-S Massenspektrometer (Waters, Manchester, UK) unter Verwendung der Masslynx Version 4.1 Software in

Verbindung mit dem nanoAcquity UPLC System (Waters) via NanoLockSpray Ionenquelle unter Verwendung eines PicoTip Emitters (New Objective, Woburn, MA, USA) durchgeführt. Die mobilen Phasen A und B enthielten beide 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril. Pro Probe wurden 3 analytische Replikate injiziert. Peptidproben die ca. 150 ng des verdauten Proteins beinhalten, wurden mit 20 fmol Hi3 und Phos B Standards für absolute Proteinquantifikation (Waters) versetzt. Hiernach erfolgte eine Entsalzung und Festsetzung durch eine Vorsäule (nanoAcquity UPLC Symmetry C18, 5 μ m, 180 μ m x 20 mm, Waters) bei einer Flussrate von 10 μ l/min für 4 min mit 99.9 % A. Die Peptide wurden anschließend durch eine Analysensäule (ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 75 μ m x 200 mm, Waters) bei einer Flussrate von 300 ml/min unter Verwendung eines 3 – 35 % Gradienten B über 90 min getrennt. Nach der Separation wurde die Säule mit 85 % B für 10 min gewaschen und mit 97 % A für 20 min reequilibriert. Die Temperatur der Säule wurde auf 35 °C gehalten. Als Referenz diente 100 fmol/ μ l [Glu¹]-Fibrinopeptid B, welches mit 500 nl/min an einen Referenzsprüher der NanoLockSpray-Quelle übertragen wurde. Das SYNAPT G2-S Instrument wurde im unabhängigen Datenmodus betrieben [140] und die Charakterisierung erfolgte durch eine parallele Fragmentation von multiplen Vorläufer Ionen in Kombination mit einer Ionenmobilitätsseparation (HDMS^E) als eine zusätzliche Dimension der Separation [141]. Durch die Durchführung von alternativen Scans bei geringer und erhöhter Kollisionsenergie von je 5 Sekunden, konnten Informationen zu Vorläufer- und Fragment-Ionen gesammelt werden. Im „low-energy MS mode“ wurde die Datensammlung bei konstanter CE von 4eV durchgeführt, wohingegen Driftzeit-abhängige CE-Einstellungen im „elevated-energy MS mode“ betrieben wurden. Die Werte der Driftzeit-abhängigen CE-Einstellungen wurden wie beschrieben genutzt [142]. LockSpray wurde alle 30 Sekunden für die Dauer von 1 Sekunde aufgezeichnet.

2.3.3.4 NanoLC-HDMS^E-Datenprozessierung, Proteinidentifikation und -quantifikation

Progenesis QI for Proteomics version 2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) [143] wurde für die Rohdatenprozessierung, Proteinidentifizierung und für die kennzeichnungsfreie Quantifikation genutzt. Für jedes biologische Experiment wurden die Rohdaten von 3 analytischen Replikaten von WT, Δ marS, and Δ marS::marS Proben derselben Wachstumsphase in ein separates Progenesis Experiment überführt. Während der Überführung wurden die Daten durch die Verwendung eines

Material und Methoden

doppelt geladenen monoisotopischen [Glu¹] -Fibrinopeptid B Ions korrigiert („lock mass-correction“).

Für die Apex3-Prozessierung wurde die Schwelle von Ionen und die totale Ionenintensität für Scans bei niedriger und hoher Energie auf 135, 30 und 750 Zähler eingestellt. Hiernach erfolgte eine Angleichung durch das Herausfiltern von einfach geladenen Ionen um die, innerhalb des LC-Separationsverfahrens auftauchende Variation, auszugleichen. Die Parameter um Höchstwerte aufzeichnen zu können beinhalteten (I) die automatische Auswahl der Sensitivität, (II) die kleinste chromatografische Breite des Höchstwertes von 0,15 min und (III) die maximale Ionenladung von +4. Das “Between-subject design” wurde für die Gruppierung der 3 analytischen Replikate pro Probe in eine gemeinsame Gruppe genutzt.

Für die Suche in Datenbanken wurde eine Datenbank verwendet, die 1701 Proteinsequenzen von *S. pyogenes* M49 NZ131 (UniProt release 2015_01) zusammenstellt und die Sequenzen von Hasen-Phosphorylase B (P00489) und Schweine-Trypsin hinzugefügt. Vorläufer und Fragment Ionen-Massentoleranzen wurden automatisch bestimmt. Eine fehlende Spaltstelle wurde toleriert. Zusätzlich wurde die Oxidation von Methioninresten als variable Modifikation und die Carbamidomethylation als gesetzt betrachtet. Die “false discovery rate” (FDR) wurde basierend auf der Suche nach einer entgegengesetzten Datenbank auf 1 % gesetzt. Peptide mussten durch mindestens 3 und Proteine durch mindestens 7 Fragment Ionen und zusätzlich 2 Peptide identifiziert werden. In anschließenden Filterungsschritten wurden Peptide entfernt die (I) einen Wert von unter 4,5 hatten, (II) weniger als 2 Treffer aufwiesen (z.B.: in mehreren Durchläufen nur 1 Mal gefunden wurden), (III) einen Massenfehler über 7 zeigten, (IV) einen Anova p-Wert über -0,05 erreichten und (V) nur durch Dekonvolution im geladenen Zustand identifiziert wurden. Proteine wurden durch die Hi3-Methode unter Benutzung des Hi3 Phos B Standards (Waters) als Referenz absolut quantifiziert [144]. Der Koeffizient der Variation (CV) in 3 analytischen Replikaten pro Probe, wurde durch das Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert, multipliziert mit 100 bestimmt. Der Gesamt-CV für die Quantifikation aller Proteine war 4.2, 4.8 und 4.1 für WT, $\Delta marS$, und $\Delta marS::marS$ Proben. Für differenziell exprimierte Proteine war der mittlere CV 4.6, 9.5 und 4.3 für die WT, $\Delta marS$, und $\Delta marS::marS$ Proben, was eine gesteigerte Varianz für differenziell exprimierte Proteine in $\Delta marS$ anzeigte. Dieser Fund korreliert mit der signifikanten Reduktion von einigen Proteinen in $\Delta marS$. Die Unterschiede in

40

der Proteinabundanz wurden durch die Berechnung des Verhältnisses der Werte des WT zu $\Delta marS$ und WT zu $\Delta marS::marS$ bestimmt. Veränderungen um ein Vielfaches wurden zunächst durch die durchschnittliche Proteinabundanz der analytischen Replikate pro Probe bestimmt. Hiernach erfolgte diese Bestimmung auch für die biologischen Replikate.

2.3.5 Herstellung elektrokompenter *S. pyogenes*-Zellen [145,146]

Um elektrokompente *S. pyogenes*-Zellen zu gewinnen, erfolgte die Inkubation der Kulturen in Gegenwart von 20 mM Glycin. Dieses Molekül bewirkt eine Destabilisierung der Zellwände und erhöht die Fähigkeit zur DNA-Aufnahme. Für jede Transformation wurden frische elektrokompente GAS nach folgendem Schema angefertigt:

Beimpfen von 10 ml THY-Bouillon / 20mM Glycin mit einer Einzelkolonie, Inkubation ü. N. bei 37 °C und 5 % CO₂

Animpfen der Hauptkultur: 44 ml THY-Medium / 20mM Glycin + 5 ml ÜNK

Inkubation der Hauptkultur bei 37 °C, 5 % CO₂ bis OD₆₀₀ = 0; 2 (ca. 2 h)

sofortiges Abkühlen der HK für 10 min auf Eis

Sedimentieren der Kultur durch Zentrifugation für 10 min bei 4.000 rpm, 4 °C

Aufnahme des Sediments in 30 ml kaltem Elektroporationspuffer (0,3 mol/l Glucose; sterilfiltriert)

Zweimaliges Wiederholen der Waschschritte (5. + 6.)

Zentrifugation für 10 min bei 4.000 rpm, 4 °C

Resuspension des Zellpellets in 0,5 ml kaltem Elektroporationspuffer

kompetente GAS bis zur Elektroporation auf Eis aufbewahren

2.3.6 Transformation elektrokompenter *S. pyogenes*-Zellen

150 µl kompetente *S. pyogenes*-Zellen wurden mit ca. 10 µl Plasmid-DNA (1-2 µg) vermischt und in gekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,7 kV, 481 Ω und 25 µF bei einer Zeitkonstante von 12 ms. Die Küvetten verblieben noch für 1-2 min auf Eis, bevor die Bakteriensuspension in 1 ml vorgewärmtes THY-Medium überführt wurde. Es erfolgte eine Inkubation für 4-5 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ und im Anschluss wurden jeweils 200 µl der Bakteriensuspension auf selektive THY-Agarplatten ausgebracht. Diese wurden für 48-72 Stunden in Anaerobiertöpfen (Anaerocult®-Gefäße, Merck KGaA, Darmstadt) unter geregelter Atmosphäre (GENbox anaer System, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) inkubiert. Die Kolonien wurden durch die Anzucht in Antibiotika-haltigen Flüssigkulturen und Test-PCRs überprüft. Es wurden bei jeder Transformation Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion [147]

Für die Klonierung in dieser Arbeit wurde ausschließlich Phusion® Polymerase (Finnzymes, Fisher Scientific, Schwerte) verwendet, da sie über eine Korrekturlesefunktion verfügt.

Standardansatz für die PCR mit Phusion® Polymerase:

Template-DNA	50-100 ng
Oligonukleotide	je 0,5-1 µM
5x Phusion® HF Puffer (7,5 mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
Phusion® DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,2 µl
Aqua bidest. (steril)	ad 20 µl

Die Komponenten wurden auf Eis gemischt und anschließend erfolgte die Amplifikation in einem Thermocycler (Thermocycler (PCR) Typ T3, Biometra, Göttingen).

Thermocycler-Parameter für die DNA-Amplifikation:

Initiale DNA-Denaturierung	2min	98 °C		
Denaturierung der dsDNA	10 s	98 °C	}	27x
Anlagerung der Primer	30 s	50-60 °C		
Elongation	1 min	72 °C		
Finale Elongation	10 min	72 °C		
Pause	∞	4 °C		

Die Produkte wurden anschließend durch QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.7 Transkriptstabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Maja Wittmann (IMIKRO). Die zu untersuchenden GAS-Stämme wurden in einer HK bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 bebrütet und anschließend wurde Rifampicin in einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugefügt. Dieses Antibiotikum hemmt spezifisch die DNA-abhängige RNA-Polymerase und inhibiert so eine weitere RNA-Synthese. Nach der Zugabe von Rifampicin, wurden je 10 ml Probe nach 0, 1, 2, 3, 5 und 15 min entnommen. Die Proben wurden bei 4500 rpm für 5 min zentrifugiert und das Sediment in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die RNA-Aufbereitung nach 2.3.3.

2.3.8 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der Gesamtgenome wurden in Zusammenarbeit mit Jana Norman realisiert. Hierfür wurde von den Stämmen DNA isoliert (s.2.3.2) und mit dem MiSeq-System (Illumina, San Diego) sequenziert. Die Daten wurden in Kooperation mit Thorsten Hain und der Justus-Liebig-Universität in Gießen ausgewertet.

Für partielle Sequenzierungen wurde chromosomale DNA in eine PCR eingesetzt (s.2.3.6). Die Primer wurden so gewählt, dass sie spezifisch für den Bereich des Interesses waren. Die Produkte wurden anschließend durch QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC (Köln).

2.4 Virulenz Untersuchungen

2.4.1 Überleben im humanen Vollblut und Plasma [148]

Um die Überlebensrate in humanem Vollblut und Plasma zu bestimmen, wurden ÜNKs zu testender Stämme 1:20 mit frischem THY-Medium verdünnt und bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3 - 0,35$) bebrütet (37°C und $5\% \text{ CO}_2$). Von dieser Konzentration wurde eine 1:10000 Verdünnung angelegt, die als Ausgangssuspension (AS) diente. Die CFUs wurden durch Verdünnungsreihen bestimmt, die auf THY-Platten ausgebracht wurden. Jeweils $20\ \mu\text{l}$ der AS wurde mit $480\ \mu\text{l}$ heparinisiertem Blut oder Plasma von drei verschiedenen Personen für drei Stunden bei 37°C unter Rotation inkubiert. Die einzelnen Proben wurden dann in geeigneten Verdünnungsstufen auf THY-Platten ausplattiert. Aus dem Verhältnis der lebensfähigen koloniebildenden Bakterien (KBE) zu denen in der AS, konnte der Multiplikationsfaktor bestimmt werden, der als Maß für die Überlebensfähigkeit der Bakterien verwendet wird.

2.4.2 Kapsuläre Hyaluronsäure-Messung [148,149]

Die quantitative Bestimmung der Hyaluronsäurekapsel erfolgte, indem ÜNKs der einzelnen Stämme durch eine Verdünnung in einem Verhältnis von 1:20 in eine Hauptkultur überführt und bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bebrütet wurden. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen für 5 min bei $1110 \times g$ und 4°C zentrifugiert und die Bakterien danach 2 x mit A. dest. gewaschen. Das resultierende Sediment wurde in $600\ \mu\text{l}$ A. dest. aufgenommen. Zur Bestimmung der Bakterienanzahl wurden ausgehend von der Bakteriensuspension Verdünnungsreihen in 1x PBS in geeigneten Verdünnungsstufen hergestellt und auf THY-Platten ausplattiert. $500\ \mu\text{l}$ der Bakteriensuspension wurden anschließend mit 1 ml Chloroform versetzt und im Homogenisator für 2 x 20 Sekunden bei 2500 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation bei RT. Nach der Inkubation wurde die Suspension 10 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und definierte Volumina des Überstandes von 10, 20, 50, 80 und $100\ \mu\text{l}$ in neue Reaktionsgefäße überführt und mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von $100\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Zu den $100\ \mu\text{l}$ -Ansätzen wurden jeweils 1 ml Nachweis-Lösung (s. 2.1.6) zugegeben und die optische Dichte bei 640 nm im Spektralphotometer bestimmt. Anhand einer erstellten

Eichgerade mit Hyaluronsäure von *Streptococcus suis* wurde die Hyaluronsäure-Konzentration der Proben errechnet.

2.4.3 Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinozyten

Die Versuche für sRNA MarS wurden in Zusammenarbeit mit Afsaneh Khani (IMIKRO) durchgeführt.

Die Fähigkeit an humane Keratinozyten (Zelllinie HaCaT, DKFZ, Heidelberg) zu adhären und zu internalisieren wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Versuch untersucht [150].

Die Zellanzucht erfolgte in DMEM + Glutamaxtm Medium (GIBCO) + 10 % FKS (fetales Kälberserum) + 1 % Penicillin/Streptomycin–Stocklösung (Konzentration: 5.000 U/ml Penicillin [Ratiopharm]; 5.000 U/ml Streptomycin [GIBCO]). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm², Greiner Bio-One) in 25 ml Medium bei 37°C und einer 5 % CO₂ Atmosphäre angezogen. Zur Passage und Kultivierung wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung (200 µl Trypsin [GIBCO]/Kavität) abgelöst, in einer Bürker-Zellzählkammer gezählt und in einer Menge von 3; 5 x 10 Zellen/ml in die Kavitäten einer 24- Well-Mikrotiter-Platte überführt.

Hierzu wurden 24-Well-Mikrotiterplatten verwendet, die mit 2.5*10⁵ HaCaT-Zellen pro Kavität in DMEM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) ohne Antibiotika eingesät wurden. Pro Stamm wurden jeweils drei Kavitäten für die Adhärenz- und die Internalisierungsversuche mit Zellen vorbereitet und diese bei 37 °C und 5 % CO₂ für 12 – 18 h bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Vor dem Versuch wurden die Zellen mit DMEM gewaschen. Anschließend erfolgte die Infektion mit den einzelnen GAS-Stämmen.

Zu diesem Zweck wurden ÜNKs der einzelnen Stämme am Versuchstag in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 – 0,35 bei 37 °C und unter 5 % CO₂-Athmosphäre bebrütet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Bakterien bei 4500 rpm für 5 min. Um Mediumreste zu entfernen wurde das Sediment anschließend in 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Für die Infektion wurde eine Bakteriensuspension in DMEM mit einer OD₆₀₀ = 0,5 hergestellt. Das entspricht einer Bakterienanzahl von ca. 1x10⁸/ml. Aus einer 1:10 Verdünnung dieser Suspension wurden jeweils 1 ml pro Kavität zu den HaCaT- Zellen gegeben. Die genaue Anzahl der Bakterien für die Infektion wurde durch eine Verdünnungsreihe in 1 x PBS und

anschließende Ausplattierung auf THY-Festmedien bestimmt. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C und unter 5 % CO₂-Athmosphäre erfolgte eine Teilung der 24-Well-Mikrotiterplatten um (I) die Anzahl der adhärenenten Bakterien und (II) die Anzahl internalisierter Bakterien zu bestimmen.

Für die Bestimmung der Anzahl adhärenenten Bakterien wurde der Überstand der Kavitäten entfernt und diese jeweils 2 x gründlich mit 1 x PBS gespült. Um die Keratinozyten abzulösen wurde pro Kavität 200 µl Trypsin/EDTA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) zugegeben und bei 37 °C für ca. 10 min inkubiert. Der Inhalt aus den jeweils 3 Kavitäten pro Stamm, wurde in einem Reaktionsgefäß vereint und die Kavitäten zusätzlich mit 600 µl 1 x PBS gespült. Die Waschsuspension wurde anschließend ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Durch eine kurze Zentrifugation (2 min, 10000 rpm, RT) wurden die Zellen sedimentiert und konnten anschließend in 1 ml Aqua bidest. lysiert werden. Zur quantitativen Bestimmung der adhärenenten Bakterien wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 x PBS angefertigt und auf THY- Festmedien ausgebracht.

Für die Bestimmung der Anzahl internalisierter Bakterien wurde nach der Inkubation der HaCaT-Zellen mit den jeweiligen Bakteriensuspensionen der Überstand aus den Kavitäten entfernt, 2 x gründlich mit 1 x PBS gespült und mit 1 ml frischen Medium mit 1 % Penicillin und Streptomycin (5000 µg/ml) versetzt. Die Antibiose eliminierte hierbei die planktonischen und adhärenenten Bakterien. Nach einer weiteren Inkubation für 2 h bei 37 °C und unter 5 % CO₂-Athmosphäre wurde die Isolierung analog zu den adhärenenten Bakterien durchgeführt.

Der Prozentuale Anteil von adhärenenten und internalisierten Bakterien konnte durch den Vergleich mit den lebensfähigen KBE der Ausgangssuspension bestimmt werden.

2.5 Tierversuche

2.5.1 Mausinfektionsmodell

Um die Dessemination der Bakterien *in vivo* zu untersuchen wurde ein Mausmodell durchgeführt. Acht Wochen alte weibliche BALB/C Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) wurden mit verschiedenen Bakteriensuspensionen (WT, $\Delta marS$, $\Delta marS::marS$) mit einer Konzentration von $5-8 \times 10^7$ CFU, intraperitoneal in 0,2 ml 1 x PBS infiziert.

Zu diesem Zweck wurde eine ÜNK in einem Verhältnis von 1:20 mit frischen Medium in eine HK mit einem Gesamtvolumen von 25 ml überführt. Diese wurde bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer OD₆₀₀=0,35-0,4 bebrütet und anschließend bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 1 x PBS aufgenommen so das die Lebendkeimzahl ca. 2,5-4x10⁸/ml und somit 5-8x10⁷/l entsprach. Für die Infektion wurden BD Microlance 27G 3/4-Kanülen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verwendet. Als Negativkontrolle diente eine Injektion von 0,2 ml 1 x PBS ohne Bakterienlast. Zusätzlich zur Negativkontrolle wurde eine Vektorkontrolle mitgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit je 0,2 ml einer M49 pAT18/GFP tragenden Bakteriensuspension infiziert. Die Inkubationszeit nach der Infektion betrug 24 h. Hiernach wurden die Mäuse durch eine Ketamin/Xylazin- Mischung getötet und bei jeder Maus die Leber, die Lunge, die Milz und die Nieren entfernt, um die Dissemination in die einzelnen Organe zu bestimmen. Hierfür wurde jedes Organ in 1 ml 1 x PBS unter Verwendung von Glasperlen im Homogenisator bei 5000 rpm für 2 x 20 Sekunden homogenisiert. Geeignete Verdünnungen wurden auf Blutagarplatten ausplattiert um die Anzahl lebensfähiger KBE zu bestimmen [151].

2.5.2 Larveninfektionsmodell [152]

Für die Untersuchung des Einflusses von MarS und von Peptidnukleinsäuren (PNAs) auf die Sterberate *in vivo*, wurde ein Mottenlarvenmodell genutzt. Zusätzlich wurde die Wirkung von Levofloxacin und von PNAs in Kombination mit Levofloxacin untersucht. Zu diesem Zweck wurden pro Versuch je 10 Mottenlarven der Gattung *Galleria mellonella* intra-hämocoelar mit verschiedenen Bakteriensuspensionen (WT, $\Delta marS$, $\Delta marS::marS$) infiziert. Die Lebendkeimzahl wurde auf 1,5-2x10⁶/ml CFU eingestellt. Für die Behandlung der Larven mit Levofloxacin erfolgte einmalig 30 min nach der Infektion mit WT-Bakteriensuspension eine Injektion intra-hämocoelar von 15, 7,5 oder 1 µg/Larve Levofloxacin-Lösung.

Für die Behandlung mit PNAs wurden die Larven ebenfalls mit WT-Bakteriensuspension infiziert und nach Inkubation für 30 min mit 4 µl einer 1 mM PNA-Lösung behandelt. Für diesen Zweck wurde eine Injektionslösung (IL) hergestellt, indem insgesamt 60 µl der 1 mM PNA-Lösung mit 90 µl 0,9 % NaCl-Lösung vermischt wurden. Von der IL wurden pro Tier 10µl in die Tiere injiziert.

Material und Methoden

Die Kombinationsversuche erfolgten indem nach 30 min Inkubation sowohl die Levofloxacin- als auch die PNA-Lösung intra-hämocoelar injiziert wurden.

Als Negativkontrolle diente 0,9 % NaCl-Lösung bzw. bei Versuchen mit Levofloxacin 0,9 % NaCl-Lösung mit 10 % DMSO. Die Inkubationszeit betrug 7 Tage bei 37 °C mit täglicher Kontrolle der Sterberate.

Vor den Versuchen wurden die Larven nach Gewicht sortiert. Für alle Versuche wurden ausschließlich Laven verwendet, die ein Gewicht von 150-200 mg aufwiesen.

Das Bakterieninokulat wurde aus einer ÜNK hergestellt, indem diese zunächst bei 4500 rpm zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und in 3 ml isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wurde auf eine $OD_{600} = 0,3$ eingestellt und 700 µl mit 350 µl 0,9 % NaCl gemischt. Um die Lebendkeimzahl zu bestimmen wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 X PBS angefertigt und die geeigneten Verdünnungsstufen auf THY-Festmedien ausgebracht und am Folgetag die KBE ausgezählt

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse, u. a. die Erstellung von Diagrammen, Berechnung der Standardabweichung und die Bestimmung der Signifikanzen, wurde mit Graphpad Prism 6 durchgeführt. Dabei wurden für Ergebnisse mit 3 Wiederholungen der t-Test, für Ergebnisse mit mehr als 3 Wiederholungen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und für die Bestimmung der Signifikanz bei Tierversuchen der Cox Mantel Test verwendet. Für alle Ergebnisse galten p-Werte $\leq 0,05$ als schwach signifikant (*), $\leq 0,01$ als signifikant (**), $\leq 0,001$ als hoch signifikant (***) und $\leq 0,0001$ als höchst signifikant (****).

3.0 Experimente und Ergebnisse

Im Rahmen von Vorarbeiten wurden kleine nichtkodierende RNAs (sRNAs) mit verschiedenen Methoden in intergenischen Bereichen von *Streptococcus pyogenes* M49 ermittelt [3].

55 putative sRNAs konnten durch Tiling-Arrays gefunden werden, von denen wiederum 42 sRNAs unbekannt waren. Zusätzlich wurde versucht unter Verwendung zweier Programme intergenische Bereiche *in silico* zu lokalisieren, die mögliche sRNA-Gene tragen. Eines dieser Programme war das modular aufgebaute MOSES. Es basiert auf Java-Technologie und relevante Algorithmen können vom Benutzer frei ausgewählt werden.

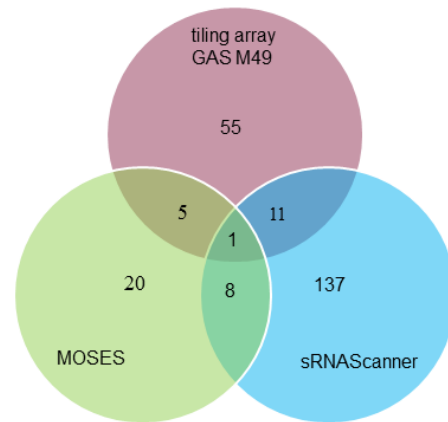


Abbildung 6: Durch Tiling-Arrays, MOSES und sRNAScanner und gefundene Kandidaten[3]. Bereiche, die sich im Diagramm überschneiden, sind Kandidaten, die mit beiden Methoden lokalisiert werden konnten. Der mit allen Methoden gefundene Kandidat, ist die schon beschriebene kleine RNA FasX.

Das zweite Programm sRNAScanner arbeitet mit festgesetzten Algorithmen. Durch diese Methoden konnten nochmals 157 neue sRNA-Kandidaten lokalisiert werden. Einige der gefundenen Kandidaten überschneiden sich mit den Ergebnissen der jeweiligen anderen Methoden. (Abbildung 6) [153]. Die bereits beschriebene sRNA FasX, konnte durch alle Methoden gefunden werden und diente in der fortlaufenden Arbeit als Referenz [154]. Im Anschluss durchgeführte reverse Transkription mit anschließender qPCR verifizierten eine Auswahl der Kandidaten.

Um mögliche Regulationen zu detektieren, wurden Expressionsanalysen via qPCR vorgenommen. Dazu wurden Bakterienkulturen aus verschiedenen Wachstumsphasen und verschiedenen Medien verwendet. Durch die differentielle Expression der sRNAs in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen, konnten weitere Aufschlüsse über die Kandidaten gewonnen werden.

3.1 sRNA MarS

Eine der differentiell exprimierten Kandidaten stellte sRNASpy490957c (MarS) dar. MarS (*mga*-*a*ctivating *r*egulatory *s*RNA) konnte durch Northern blot- und RT-qPCR Analysen verifiziert werden [100]. Das Gen der sRNA ist in Milchsäurebakterien

konservert und durch die Verwendung des „CMfinder“ wurde in einer vergleichenden Genomanalyse eine cis-regulatorische Funktion von MarS vorausgesagt [155]. Andere Studien zeigten jedoch eine Expression des Kandidaten in verschiedenen GAS Serotypen, die von den Nachbargenen unabhängig ist [100,107,156]. In *S. pyogenes* und *S. mutans* weisen die Präsenz einer Terminatorsequenz und eines starken Promotors, die sich stromabwärts des sRNA kodierenden Gens befinden, ebenfalls auf eine eigenständige Expression der sRNA hin [100,157]. Ein Schema des genomischen Locus ist in Abbildung 3A dargestellt. Die Stabilität von MarS wurde durch eine Rifampicinbehandlung mit anschließender RT-qPCR untersucht. Das Transkript zeigte im Serotyp M49 eine sehr hohe Stabilität über die Zeit (Abbildung

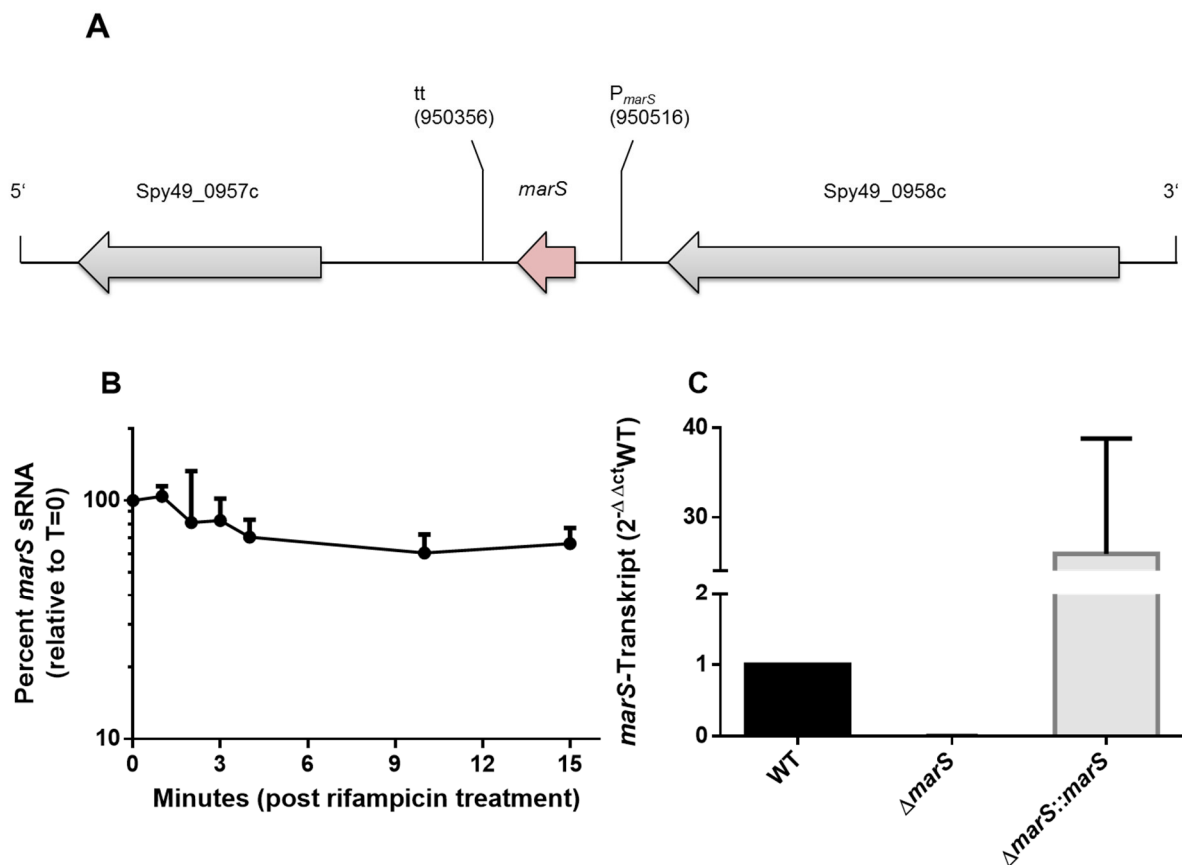


Abbildung 7: sRNA MarS zeigt eine hohe Stabilität über die Zeit und eine erhöhte Abbundanz im Komplementationsstamm

(A) Schema des genomischen Locus von sRNA MarS

(B) Stabilität von MarS nach Behandlung mit Rifampizin (n=3)

(C) Abbundanz von MarS in dem Deletions- und Komplementationsstamm relativ zum WT (n=6)

7B). Eine ähnliche Stabilität, konnte für diese sRNA in einer vorangegangene Studie in GAS M1 gezeigt werden [107]. Die Expression von MarS wurde durch eine RT-qPCR im WT, in der Deletionmutante $\Delta marS$ und dem Komplementationsstamm $\Delta marS::marS$ überprüft. (Abbildung 7C). Es konnte keine Expression der RNA in

$\Delta marS$ nachgewiesen werden. Gegenteilig verhielt es sich in $\Delta marS::marS$. Diese zeigte im Vergleich zum WT eine erhöhte Expression der sRNA.

3.1.1 Die Deletion von MarS resultiert in einem verminderten Überleben in humanem Vollblut

Das Überleben in humanem Vollblut ist essentiell für die Verbreitung von GAS im menschlichen Wirt. Um zu untersuchen ob MarS die Virulenz von *S. pyogenes* M49 beeinflusst, wurden Wachstumsversuche in humanem Vollblut durchgeführt. Das für einen Versuch benötigte Blut wurde jeweils von 3 gesunden Freiwilligen gespendet. $\Delta marS$ zeigte im Vergleich zum WT ein vermindertes Wachstum in Blut (Abbildung 8A). Der Komplementationsstamm $\Delta marS::marS$ zeigte hingegen ein Wachstum auf

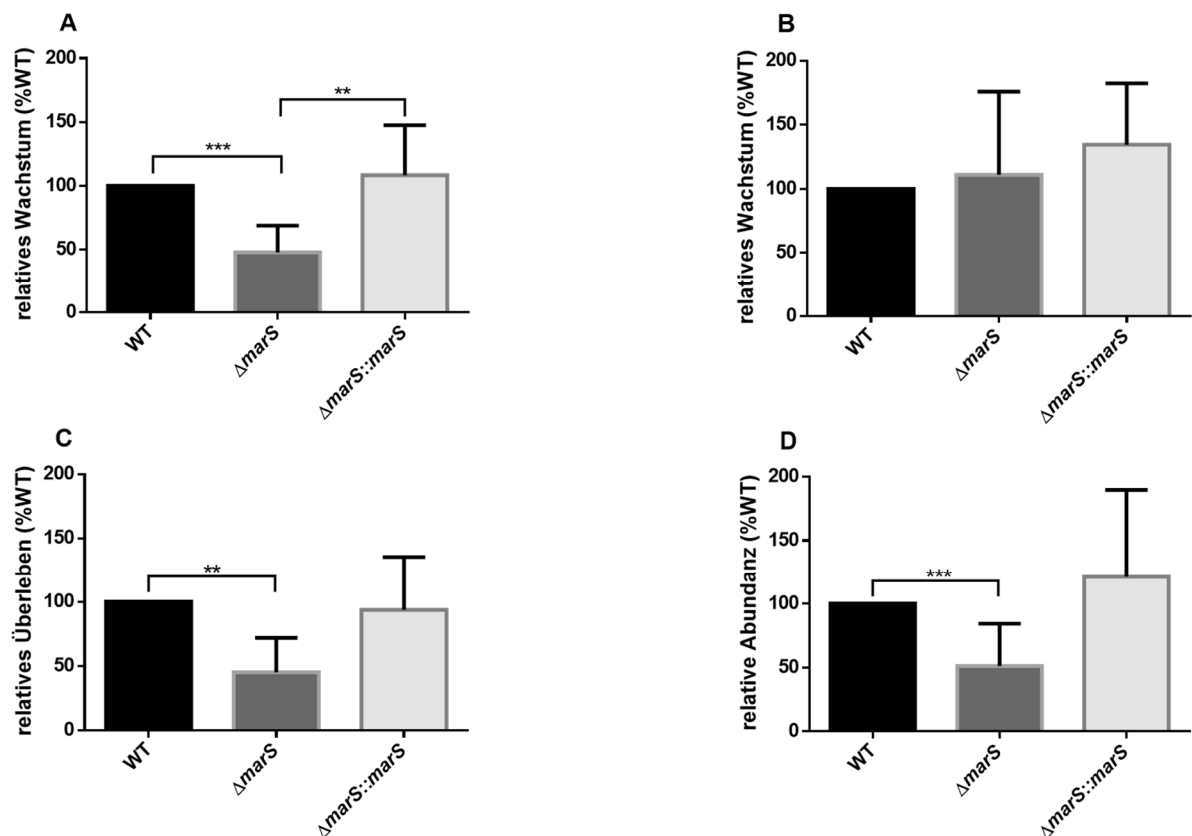


Abbildung 8: Die Deletion von sRNA MarS führt zu einem verringerten Überleben in humanem Vollblut und zu einer höheren Anfälligkeit für Phagocytose

- (A) Relatives Wachstum von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT nach 3h Inkubation in humanem Vollblut (n=9)
 (B) Relatives Wachstum von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT nach 3h Inkubation in humanem Plasma (n=4)
 (C) Relatives Überleben von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT nach 30 min Inkubation mit humanen Neutrophilen (n=5)
 (D) Relative Abundanz von extrazellulären, nicht phagozytierten $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ Bakterien im Vergleich zum WT nach 30 min Inkubation mit humanen Neutrophilen (n=5)

WT-Niveau. Um zu untersuchen ob für diesen Effekt zelluläre oder nicht-zelluläre

Bestandteile des Blutes verantwortlich sind, wurde das Wachstum in humanem Plasma untersucht. Wie in Abbildung 8B zu sehen, zeigten $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ keine signifikanten Wachstumsunterschiede im Vergleich zum WT. Nicht-zelluläre Bestandteile konnten somit als Ursache für das verminderte Wachstum von $\Delta marS$ ausgeschlossen werden. Neutrophile stellen einen wichtigen zellulären Bestandteil des Blutes in Menschen dar und bilden zusammen mit anderen Faktoren eine wichtige Barriere gegen Bakterien im Körper. Aus diesem Grund wurden Neutrophile Granulozyten aus humanem Vollblut isoliert und mit den Stämmen inkubiert. Wie in Abbildung 8C zu sehen ist resultierte die Deletion von *marS* in einer höheren Anfälligkeit gegenüber den weißen Blutkörperchen im Vergleich zum WT und $\Delta marS::marS$. Zusätzlich zeigte dieser Stamm auch die geringste Abundanz extrazellulärer Bakterien, was auf eine verstärkte Aufnahme der Deletionsmutante durch die Neutrophilen hinweist (Abbildung 8D).

3.1.2 MarS hat einen positiven Einfluss auf die Kapselproduktion

Die Hyaluronsäurekapsel von GAS verleiht eine erhöhte Resistenz gegenüber Phagozytose und schützt die Bakterien dadurch vor dem Immunsystem des Wirtes [158–160]. Da $\Delta marS$ ein reduziertes Wachstum in humanem Vollblut und eine höhere Anfälligkeit gegenüber neutrophilen Granulocyten zeigte, wurde überprüft ob die Kapselproduktion in diesem Stamm beeinträchtigt ist. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen $\Delta marS$ und dem WT beobachtet (Abbildung 9A). Interessanterweise zeigte $\Delta marS::marS$ eine erhöhte Produktion von Hyaluronsäurekapsel im Vergleich zum WT. Ein möglicher Grund ist die erhöhte Menge von MarS im Komplementationsstamm. Um diesen Umstand näher zu untersuchen, wurde die Kapselproduktion auf transkriptioneller Ebene untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Menge des *hasABC*-Transkriptes über eine RT-qPCR ermittelt (Abbildung 9B). Das *hasABC* Operon kodiert die Enzyme, die für die Synthese der Hyaluronsäurekapsel in GAS verantwortlich sind [161,162]. $\Delta marS$ zeigte keine signifikanten Unterschiede des Transkriptlevels im Vergleich zum WT, der Komplementationsstamm $\Delta marS::marS$ zeigte jedoch eine erhöhte *hasABC*-Transkriptabundanz im Vergleich zu der Mutante und dem WT. Da GAS M49 als Stamm beschrieben wird, der eine vergleichsweise geringe Menge an endogener Kapsel produziert [161], wurde die Kapselproduktion zusätzlich in GAS M18

untersucht. Dieser Serotyp weist durch eine Mutation in *rocA* eine konstant hohe Kapsel auf [163]. Der M18 $\Delta marS$ Stamm zeigte eine verringerte Produktion von Kapsel im Vergleich zum WT während M18 $\Delta marS::marS$ höhere Mengen von Hyaluronsäurekapsel generierte (Abbildung 9C). Diese Ergebnisse weisen auf einen positiv regulatorischen Effekt von MarS auf die Kapselproduktion in GAS hin.

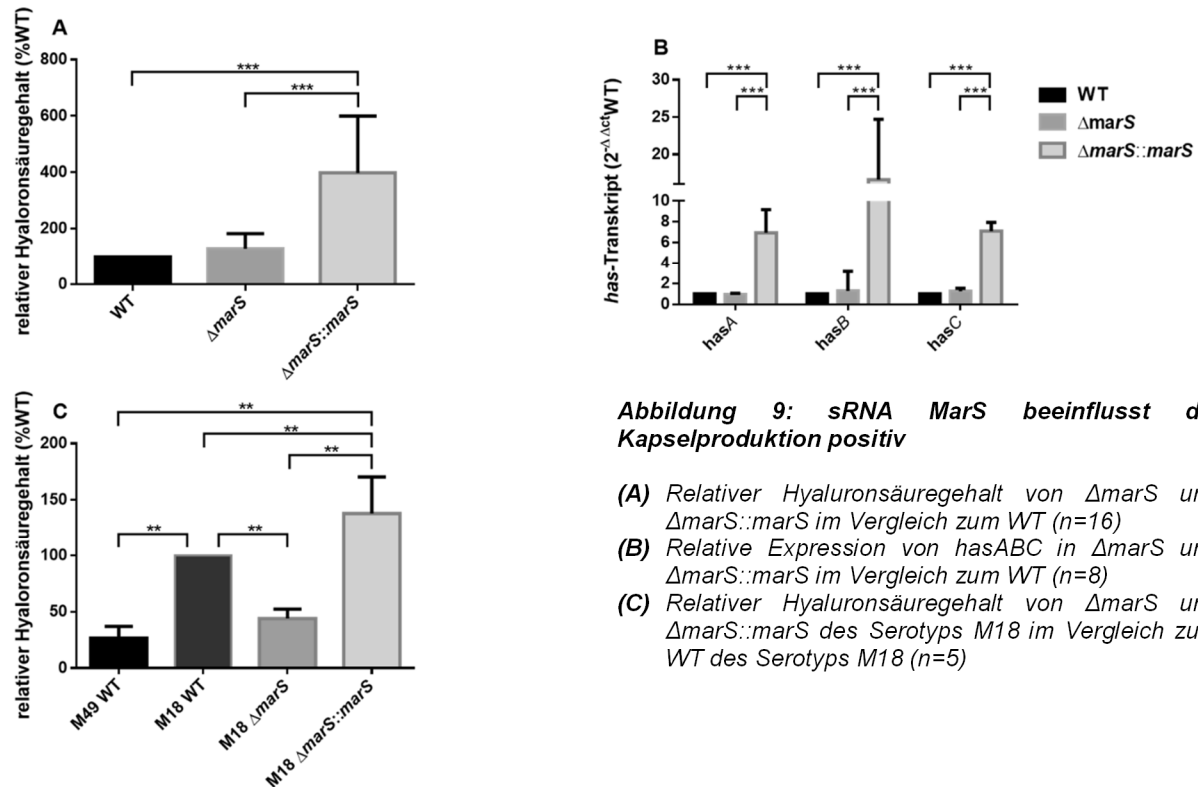


Abbildung 9: sRNA MarS beeinflusst die Kapselproduktion positiv

- (A) Relativer Hyaluronsäuregehalt von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT (n=16)
- (B) Relative Expression von *hasABC* in $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT (n=8)
- (C) Relativer Hyaluronsäuregehalt von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ des Serotyps M18 im Vergleich zum WT des Serotyps M18 (n=5)

3.1.3 Die sRNA MarS beeinflusst die Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinozyten

Während der Kolonisation adhären GAS an Gewebe im Wirt. Zusätzlich findet eine Internalisation in die Zellen der Gewebe statt. Dieser Umstand wird als Grund für wiederkehrende Erkrankungen durch die Persistenz im Wirt diskutiert. Zusätzlich könnte durch diesen Mechanismus das Versagen von Behandlungen mit Penicillin erklärt werden [149,164–166]. Um zu untersuchen ob die sRNA MarS Einfluss auf die Adhärenz und Internalisierung nimmt, wurden die Bakterien mit einer humanen Keratinozytenzelllinie (HaCaT) inkubiert. Die Deletion von MarS resultierte in einer verminderten Fähigkeit an HaCaT-Zellen zu adhären. Der Effekt konnte durch die Komplementation im Stamm $\Delta marS::marS$ aufgehoben werden (Abbildung 10A). Die Fähigkeit zu internalisieren wurde durch einen Antibiotikaprotektionsversuch untersucht. Bei diesem zeigte $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT und zu $\Delta marS$ eine

signifikant gesteigerte Fähigkeit in HaCaT-Zellen zu internalisieren. Im Fall von $\Delta marS$ zeigte sich eine verringerte Internalisierungsrate gegenüber dem WT (Abbildung 10B). Das M-Protein von GAS zeigt eine stark antiphagozytotische Wirkung und spielt ebenfalls bei der Adhärenz an humanes Gewebe eine Rolle [158,159,167–169]. Da die Deletion von *marS* zu einer Abnahme der Fähigkeit an humane Keratinocyten zu

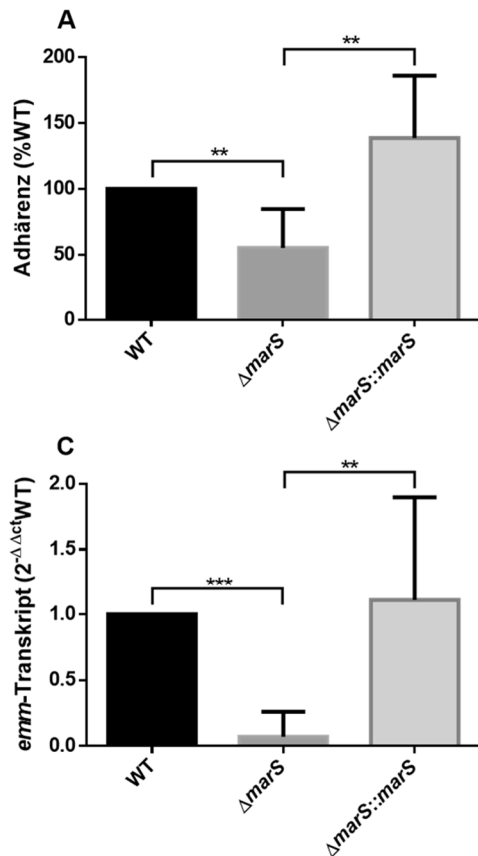


Abbildung 10: sRNA MarS beeinflusst die Adhärenz und Internalisierung

- (A) Relative Adhärenz an humane Keratinocyten von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT $n=6$.
 (B) Relative Internalisierung an humane Keratinocyten von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT $n=6$.
 (C) Relative Expression von *emm* in $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT ($n=8$)

adhärieren und zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber Neutrophilen führte, sollte die Abundanz des *emm*-Transkriptes als mögliche Zielstruktur von MarS untersucht werden. Abbildung 10C zeigt eine signifikante Verringerung der Abundanz in $\Delta marS$ im Vergleich zum WT und $\Delta marS::marS$, was einen direkten oder indirekten Einfluss von MarS auf die *emm*-Expression nahelegt.

3.1.4 Die Deletion von *marS* resultiert in einer verringerten *mga* und Mga-abhängigen Transkriptabundanz

Einer der Hauptmechanismen in der sRNA-vermittelten Regulation in Bakterien ist die direkte Bindung der sRNA an eine Ziel-mRNA durch Basenpaarung. Für die Ausbildung eines Komplexes bedarf es komplementärer Regionen in der RNA-Sequenz und auf der der respektiven Bindungspartner. Der IntaRNA-Algorithmus wurde für die Vorhersage solcher Bindungen entwickelt und für MarS benutzt, um mögliche Zielstrukturen zu identifizieren [170,171]. Als Referenzgenom diente hierbei die Sequenz von *S. pyogenes* NZ131 (NC_011375.1). Unter den vorhergesagten Zielen, wurde *mga*, das Transkript, welches für den M-Protein trans-agierenden Positivregulator kodiert, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit identifiziert (Anhang 1). Die putative Bindestelle liegt innerhalb der 5' untranslatierten Region (5'UTR) von *mga* (Abbildung 11A) und ist in den Serotypen M2, M4, M5, M18, M28, M44, M49, M59, und M83 laut BLAST Analysen konserviert [172]. Ebenso wurde eine putative Bindestelle an das *hasA/B*-Transkript vorhergesagt (Abbildung 11B). Die Sekundärstruktur von MarS wurde mit RNAfold vorausgesagt (The ViennaRNA Web Services, <http://rna.tbi.univie.ac.at/>) und mit VARNA GUI [173] grafisch dargestellt

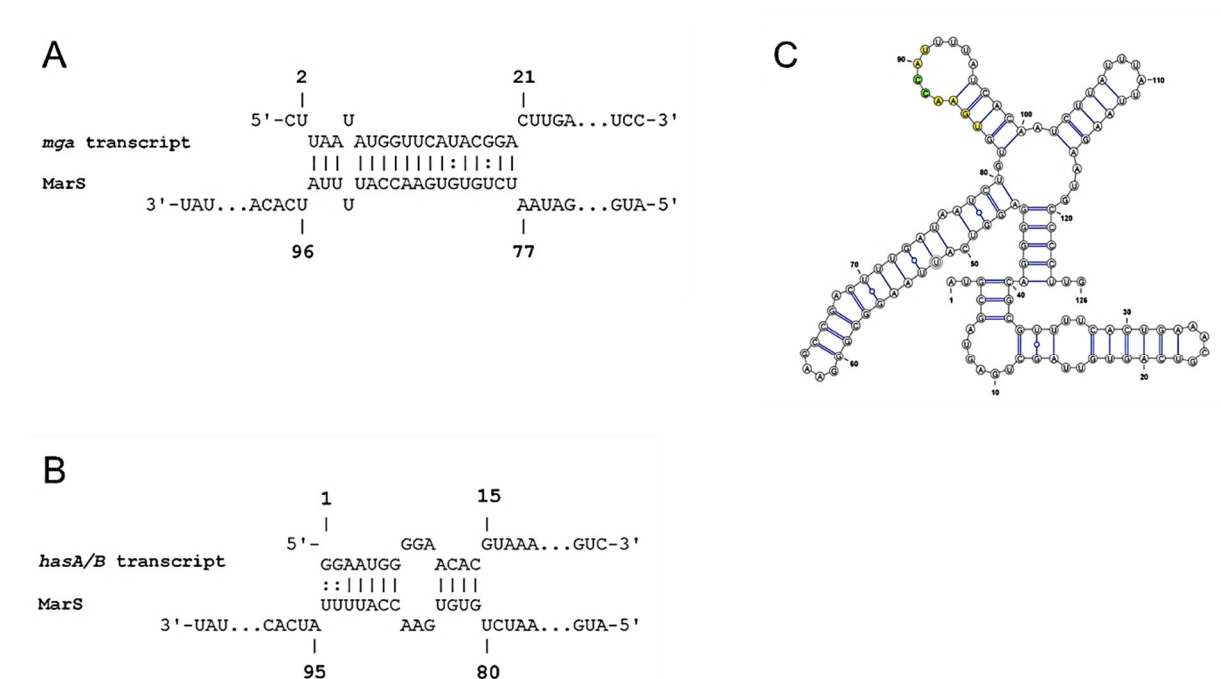


Abbildung 11: Putative Bindestellen und Sekundärstruktur von MarS

(A) Putative Bindestelle der sRNA MarS im *mga*-Transkript

(B) Putative Bindestelle der sRNA MarS im *hasA/B*-Transkript

(C) Putative Sekundärstruktur von MarS. Gelb: Putative Bindestelle für *mga*-Transkript. Grün: Basenaustausch 88-CC-89 → 88-GG-89 zur Generierung eines „Mismatch-Komplementationsstammes“

(Abbildung 11C). Die Terminatorstruktur wird in dem Schema zum leichteren Verständnis nicht gezeigt.

Da die Expression von *emm* positiv von Mga beeinflusst wird und eine veränderte Expression des Gens in der Deletionsmutante festgestellt werden konnte, wurde untersucht ob MarS einen direkten Einfluss auf die Transkriptabundanz von *mga* und den respektiv von Mga regulierten Transkripten aufweist [78]. Die gesamt-RNA von in THY-Medium oder in humanem Vollblut gewachsenen Stämmen wurde mit RT-qPCR untersucht. Hierbei wurden Primer verwendet, die spezifisch für die Transkripte *mga*, *emm*, *sclA* („streptococcal collagen like protein“) und *sof* (serum opacity factor) sind.

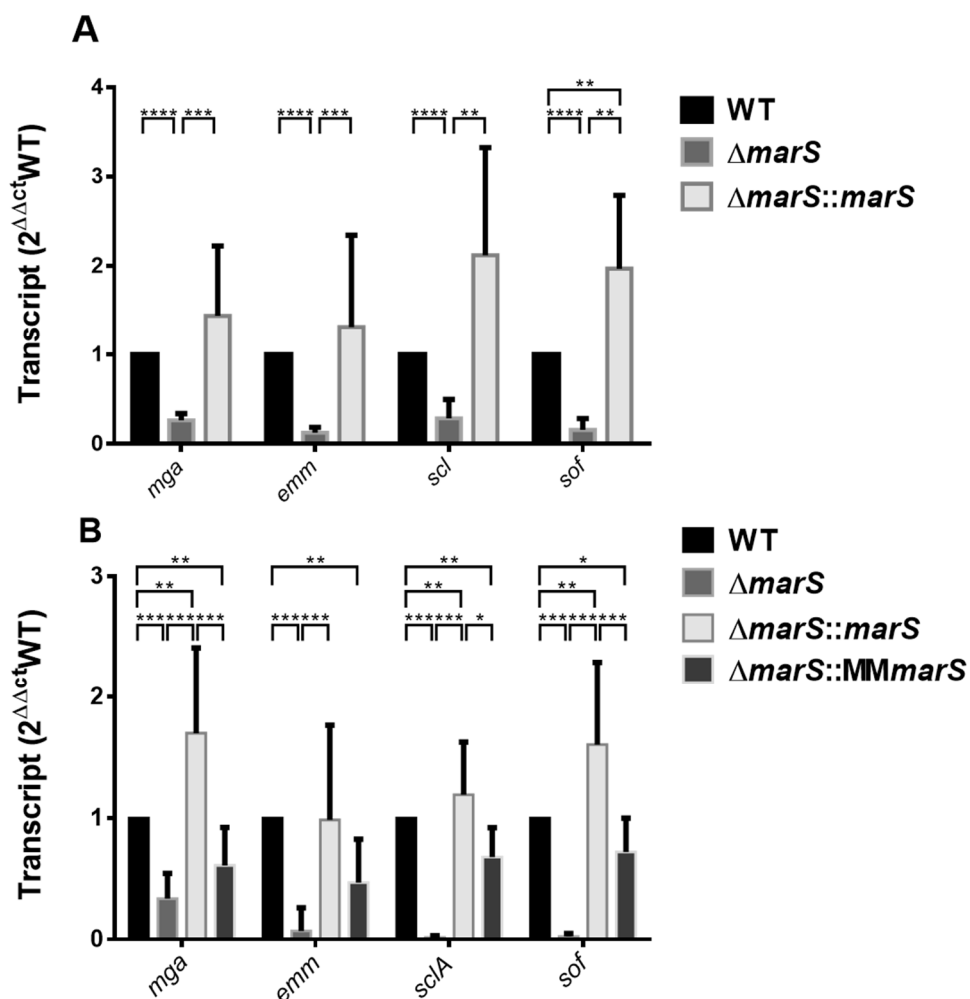


Abbildung 12: sRNA MarS beeinflusst die *mga* und Mga-abhängige Transkriptabundanz

(A) Relative Expression von *mga* und Mga-abhängiger Transkripte von ΔmarS und $\Delta\text{marS}::\text{marS}$ im Vergleich zum WT präinkubiert in THY-Medium (n=8)

(B) Relative Expression von *mga* und Mga-abhängiger Transkripte von ΔmarS , $\Delta\text{marS}::\text{marS}$ und $\Delta\text{marS}::\text{MMmarS}$ im Vergleich zum WT präinkubiert in Blut (n=8)

Für alle untersuchten Transkripte konnte in ΔmarS eine signifikant geringere Abundanz im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abbildung 12A/B). Der Komplementationsstamm $\Delta\text{marS}::\text{marS}$ zeigte bei den THY-Proben eine WT-ähnliche

Abundanz (Abbildung 12A). Die Effekte der Proben aus humanem Vollblut fielen im Vergleich zu denen aus THY allgemein stärker aus. Im Fall von *sclA*, *sof* und *mga* zeigte sich eine erhöhte Transkriptabundanz in $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT. Um einen Effekt auf das Mga-Regulon nachzuweisen, der spezifisch auf MarS basiert wurde ein "Mismatch-Komplementationsstamm" verwendet ($\Delta marS::MMmarS$). Dieser trägt ein Plasmid mit einem modifizierten *marS*-Gen, in dem zwei Basen der putativen Bindestelle ausgetauscht wurden (88-CC-89/88-GG-89) (Abbildung 11C). In den

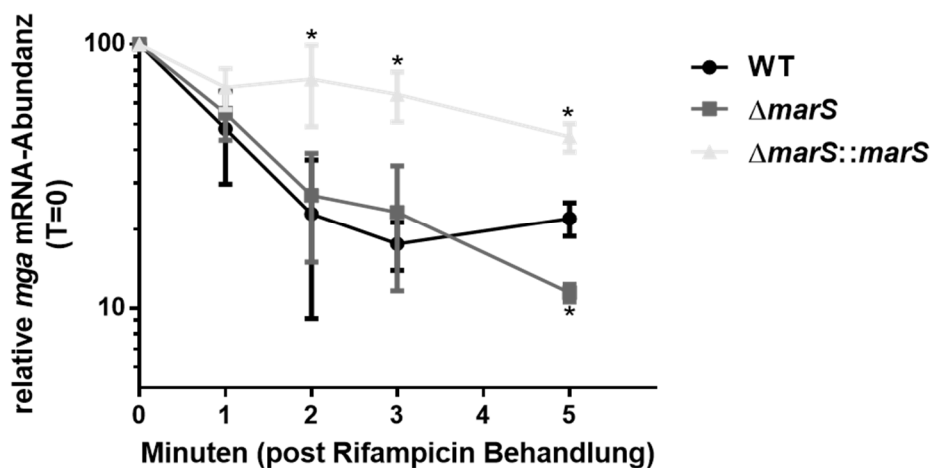


Abbildung 13: sRNA MarS hat einen positiven Einfluss auf die mga-Transkriptstabilität
Stabilität des *mga*-Transkripts in $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT (n=3)

Proben der, in humanem Vollblut gewachsenen Stämme, konnte bei $\Delta marS::MMmarS$ eine signifikante Verringerung der Abundanz aller getesteten Transkripte im Vergleich zum WT und $\Delta marS::marS$ festgestellt werden (Abbildung 12B). Um den Einfluss von MarS auf die Stabilität der *mga* mRNA zu untersuchen wurde die Transkriptabundanz zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Rifampicinbehandlung bestimmt (Abbildung 13). Die Deletion der sRNA führte nicht zu einer Veränderung der Stabilität der *mga*-mRNA innerhalb der ersten 3 Minuten. Die erhöhte Abundanz von MarS im Komplementationsstamm führte zu einer höheren Stabilität des *mga*-Transkriptes im Vergleich zum WT und $\Delta marS$.

Diese Ergebnisse weisen auf einen positiv regulierenden Effekt von MarS auf das *mga*-Transkript und den respektiven Mga-abhängigen Transkripten hin [163].

3.1.5 Die Deletion von MarS führt zu einem verstärkten Wachstum in chemisch definierten Medien (CDM) mit Maltose, α -D-Laktose und Schleimsäure

Für pathogene Organismen ist die Aufnahme von verschiedenen Zuckern von entscheidender Bedeutung bei einer erfolgreichen Infektion. Es wurde gezeigt, dass Mga, dessen Transkript eine putative Zielstruktur von MarS darstellt, einen Einfluss auf die Utilisation von bestimmten Zuckern hat [78]. Aus diesem Grund wurde das

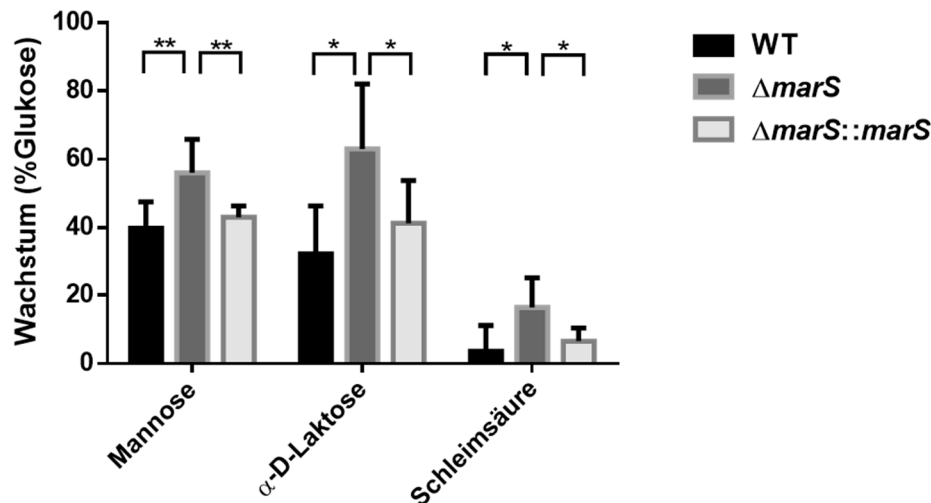


Abbildung 14: MarS beeinflusst die Uतालization von Zuckern negativ

Wachstum von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ und WT auf Mannose, α -D-Laktose und Schleimsäure ($n=6$)

Wachstum von $\Delta marS$ in CDM mit verschiedenen Kohlenhydratquellen mit dem des WT und $\Delta marS::marS$ verglichen. Dazu wurden Wachstumsversuch in speziellen Reaktionsplatten (Biolog phenotype microarray plates) durchgeführt. Hierbei wurde das Wachstum auf 178 verschiedenen Kohlenhydratquellen untersucht. Das Wachstum auf Glukose diente dabei als Referenz. GAS M49 konnte insgesamt auf 26 Zuckerquellen wachsen (Anhang 7). Die Deletion von *marS* resultierte in einem verstärkten Wachstum des rekombinanten Stammes auf Mannose, α -D-Laktose und Schleimsäure (Abbildung 14). Auf den verbleibenden Zuckern wies das Wachstum der rekombinanten Stämme keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum WT auf.

3.1.6 Die Deletion von *marS* verändert das Proteom von GAS M49

Im Anschluss auf den Nachweis unterschiedlicher Expression von Genen, die durch Mga kontrolliert werden und für Oberflächenproteine kodieren, erfolgte eine Proteomanalyse des Deletionsstammes $\Delta marS$ im Vergleich zum WT und dem Komplementationsstamm $\Delta marS::marS$.

Es konnten 17 Proteine identifiziert werden, die in den Stämmen differentiell produziert wurden. Hierbei wurden Proteine als differentiell exprimiert angesehen, wenn sie mindestens einen 2-fachen Unterschied zu den Vergleichstämmen aufwiesen (Tabelle 8). Für die Mehrheit der identifizierten Proteine konnte eine veränderte Synthese in der exponentiellen (exp), der transitionellen (tra) und der stationären (sta) Phase detektiert werden. Zu diesen Proteinen zählte das M-Protein, das Fibronectin bindende Protein SfbX, der FCγ-Rezeptor und der Serumopazitätsfaktor Sof, die von den Genen *emm49*, *sfbX49*, *Spy49_1672c* und *sof* kodiert werden. Diese zeigten eine geringere Abundanz in $\Delta marS$ wohingegen die Proteinmenge in $\Delta marS::marS$ wieder auf WT-Niveau anstieg. Das Thiol-aktivierte Zytolysin (*slo*) lag in $\Delta marS$ während der exp und sta ebenfalls reduziert vor. Im Komplementationsstamm war die Menge des Proteins im Vergleich zum WT leicht erhöht während der tra und sta Wachstumsphase. Demnach resultiert die in $\Delta marS$ beobachtete geringere Abundanz von Mga-kontrollierten Gen-Transkripten in einer verringerten Synthese korrespondierender Proteine. Zusätzlich konnte im Vergleich zum WT eine Reduktion der kollagenähnlichen Oberflächenproteine A und B und der C5a-Peptidase in $\Delta marS$ festgestellt werden. Die Expression der korrespondierenden Gene *scfA*, *scfB*, and *scpA* wird auch von Mga kontrolliert [174–176]. Die Syntheseproteine der Hyaluronsäure HasA und HasB zeigten eine erhöhte Abundanz in $\Delta marS::marS$, was mit der in 3.2 beschriebenen erhöhten Kapselproduktion in diesem Stamm übereinstimmt (Abbildung 9A). Die Menge der Cystein-Proteinase SpeB war im Vergleich zum WT signifikant in $\Delta marS$ reduziert. Auch in $\Delta marS::marS$ konnte eine Reduktion dieses Proteins gegenüber dem WT-Niveau festgestellt werden, die jedoch eher geringfügig ausfiel. Zusammengefasst ist festzustellen, dass von den 17 differentiell exprimierten Proteinen in $\Delta marS$, 14 bekannte Oberflächen assoziierte Proteine sind. Der Regulator Mga, welcher in die Expression eines Teils der beeinflussten Proteine involviert ist wurde auch gefunden, konnte jedoch auf Grund der Fraktion nicht quantifiziert werden. 2 Proteinen konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden.

Experimente und Ergebnisse

Tabelle 8: Differenziell synthetisierte Proteine in der zytoplasmaarmen Phase von GAS M49 WT, M49 Δ marS und M49 Δ marS::marS.

Protein	Gen	Ratio (Durchschnitt von 3 biologischen Replikaten)					
		WT/ Δ m arS exp	WT/ Δ m arS tra	WT/ Δ m arS stat	WT/ Δ marS:: marS exp	WT/ Δ marS:: marS tra	WT/ Δ marS:: marS stat
Proteinvorkommen signifikant verringert in Δ marS							
A0A0H3BZ G1	<i>isp2</i>	3.1	2.4	5.3	2.0	1.3	1.7
A0A0H3BZ 00	<i>scfA</i>	n.d. ^a	6.6	16.2	n.d.	0.7	0.8
A0A0H3C0 M3	<i>scpA</i>	21.2 ^b	4.2	9.2	1.4 ^b	1.0	1.0
A0A0H3C2 F5	<i>emm49</i>	10.7	11.1	7.5 ^c	1.6	0.9	0.9
A0A0H3BZ 39	Spy49_1 672c	10.4	9.7	4.3	1.1	1.3	1.2
A0A0H3C0 34	<i>mga</i>	117.2	62.5	45.2 ^c	2.2	1.2	1.1
A0A0H3C0 44	<i>sfbX49</i>	28.4	11.2	21.3	2.0	0.9	3.1
A0A0H3C0 N6	<i>sof</i>	6.5 ^b	3.7	9.5	3.1	1.1	1.6
A0A0H3BY 98	Spy49_0 015	1.6 ^b	2.6	1.3	1.5	2.0	0.8
A0A0H3BY W1	<i>slo</i>	3.1	1.1	3.2	1.1	0.4	0.6
A0A0H3B WZ9	Spy49_0 343	n.d.	17.8 ^b	8.6 ^b	n.d.	1.0 ^b	0.6 ^b
A0A0H3BZ 17	Spy49_0 412	n.d.	n.d.	8.7	n.d.	n.d.	0.8

A0A0H3BZ Z5	<i>sclb</i>	4.7	5.4	5.3	1.1	1.0	0.9
Proteinvorkommen signifikant verringert in $\Delta marS::marS$							
A0A0H3C0 49	Spy49_1 689c	n.d.	n.d.	2.3	n.d.	n.d.	6.9
A0A0H3C0 P3	<i>speB</i>	n.d.	2.4	5.2	n.d.	13.8	4.7
Proteinvorkommen signifikant erhöht in $\Delta marS::marS$							
A0A0H3C1 07	<i>hasA</i>	1.1	0.7	0.4	0.2	0.1	0.1
A0A0H3C2 36	<i>hasB</i>	1.2	1.5	1.2 ^b	0.1	0.3	0.5 ^b

^a fehlende Werte für die Quantifizierung

^b Durchschnitt von 2 biologischen Replikaten

^c Durchschnitt von 2 biologischen Replikaten; im dritten Replikat wurde das Protein in $\Delta marS$ nicht detektiert

3.1.7 Die Deletion der sRNA MarS resultiert in einer höheren Dissemination *in vivo*

Um den Einfluss von MarS auf die Virulenz von GAS M49 *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Maus-Infektionsmodell eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden

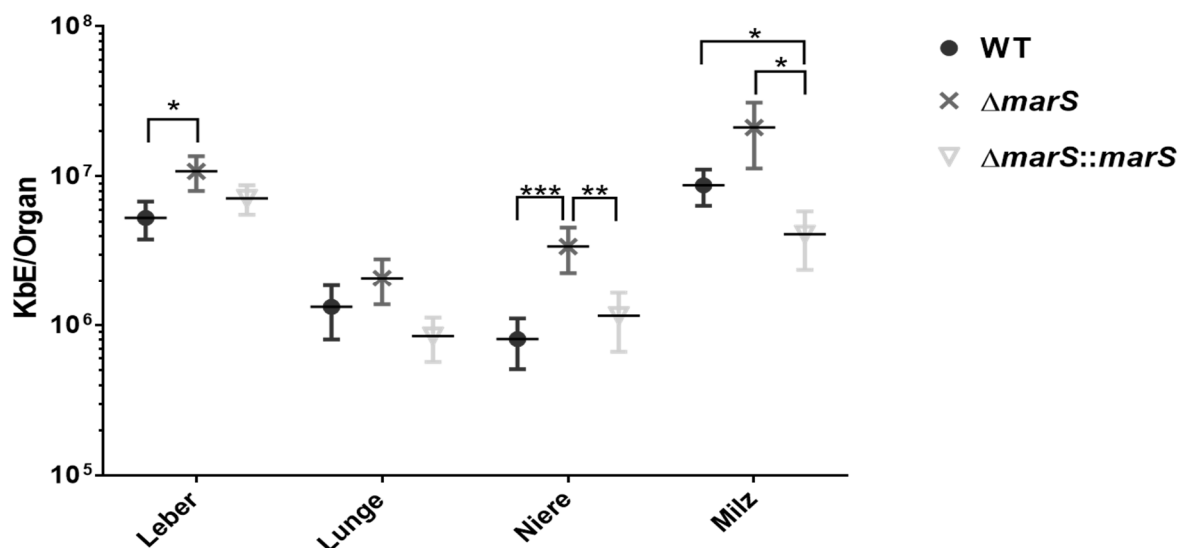


Abbildung 15: Die Deletion von MarS verstärkt die Dissemination in verschiedene Organe
KBEs von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ und WT in verschiedenen Organen nach 24 h Inkubation in Mäusen (n=14)

die Mäuse intraperitoneal mit GAS M49 WT, $\Delta marS$, und $\Delta marS::marS$ infiziert. Alle Tiere zeigten starke Anzeichen einer Infektion und wurden nach 24h erlöst. Den Tieren wurden jeweils die Leber, die Lunge, die Nieren und die Milz entnommen. Diese wurden homogenisiert und die Bakterienlast der Organe durch KBE bestimmt. In den Nieren der infizierten Tiere konnte in $\Delta marS$ im Vergleich zum WT und $\Delta marS::marS$ eine signifikant höhere Anzahl lebender Bakterien isoliert werden (Abbildung 15). Auch in der Leber konnten mehr Bakterien der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden und in der Milz wurde eine geringere Bakterienlast von $\Delta marS::marS$ im Vergleich zum WT und $\Delta marS$ detektiert. Eine leicht erhöhte Anzahl von Bakterien konnte für $\Delta marS$ auch in der Lunge nachgewiesen werden. Diese Erhöhung war jedoch im Vergleich mit den anderen Stämmen nicht signifikant. Es konnte folglich in allen getesteten Organen eine leicht oder signifikant erhöhte Anzahl von lebenden Bakterien der Deletionsmutante im Vergleich zum WT und dem Komplementationsstamm detektiert werden.

3.1.8 MarS hat keinen Einfluss auf die Progression der Infektion in *Galleria mellonella*

Im Mausmodell ist mit dem vorliegenden Serotyp M49 keine klassische Bestimmung der Überlebensrate möglich. Die Problematik dieser Versuche besteht im Mausmodell nicht nur in ethischer Hinsicht, sondern ist auch technisch bedingt, da *S. pyogenes* M49 nur in einem bestimmten Konzentrationsfenster eingesetzt werden kann. Da es sich bei *S. pyogenes* um ein strikt humanpathogenes Bakterium handelt

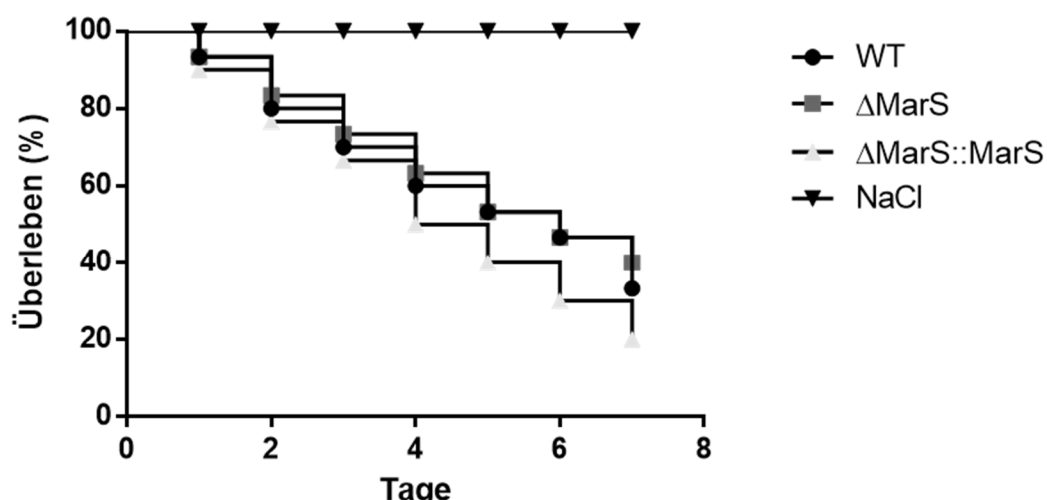


Abbildung 16: MarS hat keinen Einfluss auf die Sterberate in einem *Galleria mellonella*-Modell
Überlebensrate von mit $\Delta marS$, $\Delta marS::marS$ und WT infizierter *Galleria mellonella*-Larven

und M49 keinen hochinvasiven Stamm darstellt, kann im Mausinfektionsmodell keine Dosis eingestellt werden, die eine klassische Überlebensstudie gestattet. Die wirksame Dosis ist für die Tiere innerhalb von 24 h letal. Niedrigere Dosen führen dazu, dass die Tiere zwar starke Zeichen einer Infektion zeigen, sich langfristig aber wieder erholen. Als Alternative sollte ein *Galleria mellonella* Mottenlarvenmodell benutzt werden. Mit diesem Modell ist es auch für diesen Serotyp möglich die Auswirkungen einer Infektion über die Zeit zu betrachten und somit den Effekt von MarS im Infektionsgeschehen *in vivo* zu studieren. Zu diesem Zweck wurden Larven mittlerer Größe mit dem WT, $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ infiziert und anschließend für 7 Tage täglich ausgezählt und die Sterberate dokumentiert. Wie Abbildung 16 zeigt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen festgestellt werden.

3.2 sRNAScanner 66

Eine andere differentiell exprimierte sRNA stellte sRNAScanner 66 (sRNA 66) dar. Diese sRNA konnte durch RT-qPCR Analysen verifiziert werden. Ein Schema des

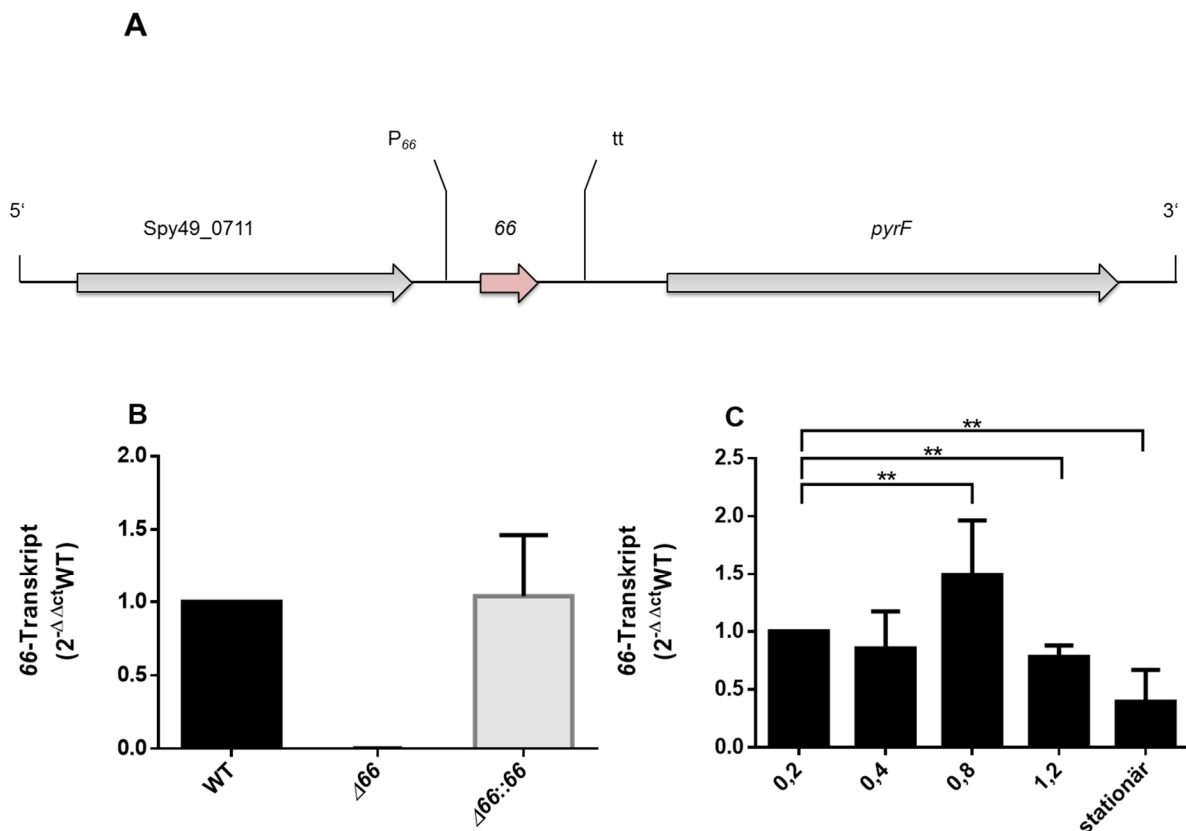


Abbildung 17: sRNA 66 zeigt in der exponentiellen Phase die stärkste Expression

(A) Schema des genomischen Locus von sRNA 66

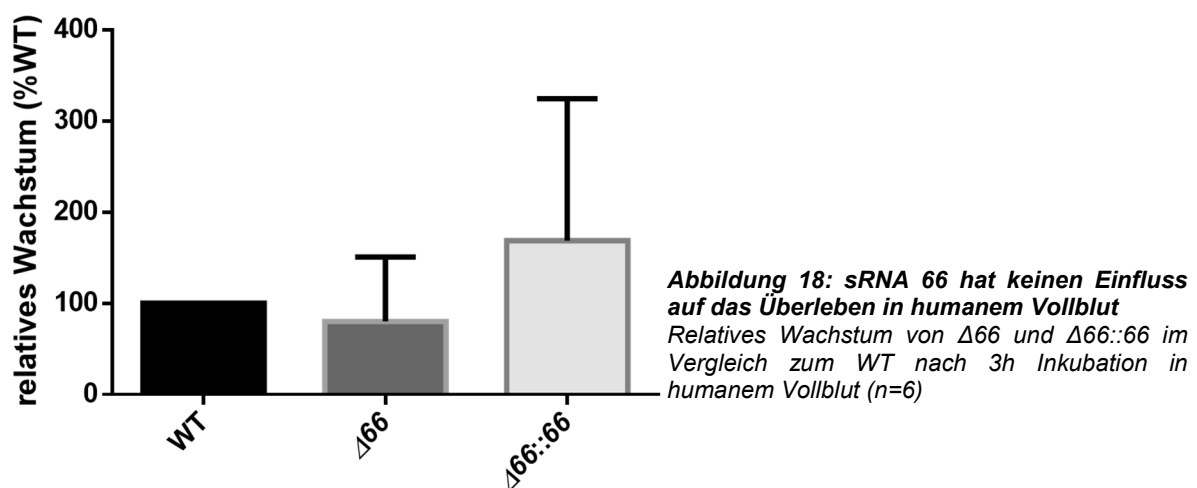
(B) Relative Expression von sRNA 66 in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT in der exponentiellen Wachstumsphase (n=5)

(C) Relative Expression von sRNA 66 in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT in verschiedenen Wachstumsphasen (n=6)

genomischen Locus ist in (Abbildung 17A) dargestellt. In eigenen Vorarbeiten [218] wurde eine Deletionsmutante ($\Delta 66$) und ein Komplementationsstamm ($\Delta 66::66$) hergestellt und keine Beeinträchtigung des Wachstums der Stämme festgestellt werden. Es konnte keine Expression der RNA in $\Delta 66$ nachgewiesen werden (Abbildung 17B). $\Delta 66::66$ zeigte WT-ähnliche Expression der kleinen RNA. Die stärkste Expression zeigte sRNA 66 in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 17C).

3.2.1 Die Deletion der sRNA 66 zeigt keinen Einfluss auf das Überleben in humanem Vollblut

Für die Deletionsmutante und für den Komplementationsstamm der sRNA 66 wurden Wachstumsversuche in humanem Vollblut durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum der einzelnen Stämme festgestellt werden.



3.2.2 Die Deletion der sRNA 66 resultiert in einer verringerten Adhärenz an und einer verstärkten Internalisierung in humane Keratinozyten

Eine wichtige Eigenschaft von *S. pyogenes* ist die Adhärenz an und die Internalisierung in humane Zellen. Durch diese Mechanismen ist das Bakterium in der Lage sich schrittweise im Wirt auszubreiten und in tiefere Gewebsschichten vorzudringen [149,164–166]. Um einen möglichen Effekt der sRNA 66 in diesem Prozess zu untersuchen, wurden Adhärenz- und Internalisierungsversuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien mit der humanen Keratinozyten Ziellinie HaCaT inkubiert. Die Deletion der sRNA resultierte in einer verringerten Fähigkeit an HaCaT-Zellen im Vergleich zum WT zu adhären. Der

Komplementationsstamm $\Delta 66::66$ zeigte eine mit dem WT vergleichbare Adhärenz. (Abbildung 19A). Trotz des Defizits der Mutante konnte in einem anschließenden Antibiotikaprotektionsversuch festgestellt werden, dass ein höherer Prozentsatz der adhärennten Bakterien des $\Delta 66$ -Stammes im Vergleich zum WT in die Keratinozyten internalisieren konnte (Abbildung 19B). $\Delta 66::66$ zeigte ein Internalisierungsverhalten auf Wildtypniveau.

Ein Virulenzfaktor der als wichtiges Adhäsion fungiert und somit bei der Adhärenz an humanes Gewebe eine wichtige Rolle spielt, ist das M-Protein [158,159,167–169]. Um zu untersuchen ob, wie im Fall der sRNA MarS (s. 3.1.3), eine Veränderung der

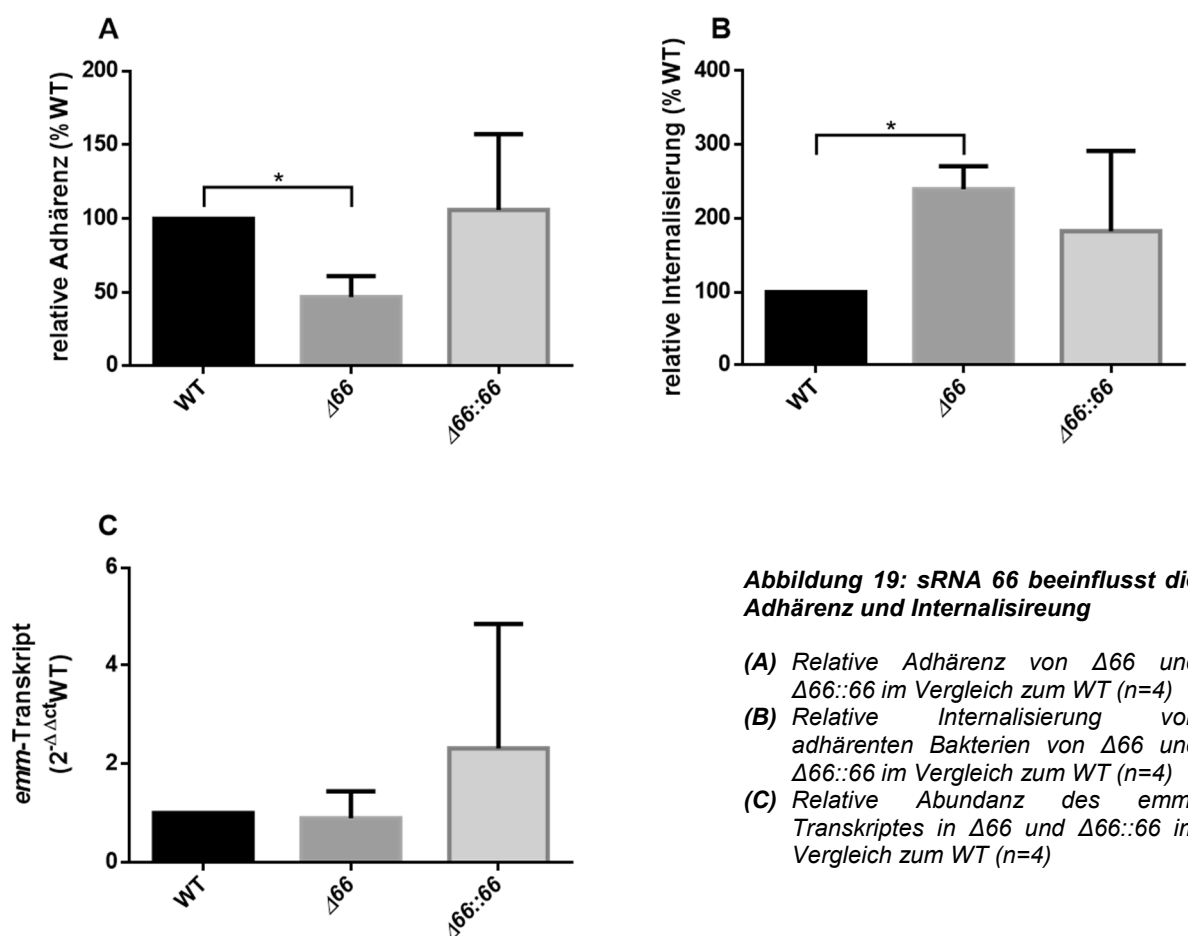


Abbildung 19: sRNA 66 beeinflusst die Adhärenz und Internalisierung

- (A) Relative Adhärenz von $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT (n=4)
 (B) Relative Internalisierung von adhärennten Bakterien von $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT (n=4)
 (C) Relative Abundanz des *emm*-Transkriptes in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT (n=4)

Expression des Proteins ein möglicher Grund für den Phänotyp darstellt, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Wie in Abbildung 15C dargestellt, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz des *emm*-Transkriptes in den einzelnen Stämmen gefunden werden.

3.2.4 sRNA 66 hat einen Einfluss auf das Proteom von GAS M49

Um zu untersuchen, ob die Deletion einen Einfluss auf die Abundanz von Proteinen hat wurden die Gesamtproteingehalte des WT, $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ in der exponentiellen Phase untersucht. Es konnten dabei 13 Proteine identifiziert werden, die in den Stämmen differentiell exprimiert wurden. Hierbei wurden Proteine als differentiell exprimiert angesehen, wenn sie mindestens einen 2-fachen Unterschied zu den Vergleichstämmen aufwiesen (Tabelle 9). Dabei wurden 7 Proteine gefunden, die in der Mutante in höherer Menge vorlagen. Hierzu zählen Streptolysin O (Slo), der putative Transkriptionsregulator CpsY, die putative Amidase AmiC, ein putativer ABC-Transporter und ein nicht charakterisiertes Protein. Zusätzlich wurde ein starker Anstieg der Menge von Orotat-Phosphoribosyltransferase (PyrE) und der Oritidin-5'-Phosphatdecarboxylase (PyrF) in der Mutante festgestellt, deren kodierende Gene *pyrE/F* in direkter Nachbarschaft des Genlocus der sRNA 66 liegen.

Es konnten des Weiteren 5 Proteine identifiziert werden, die in $\Delta 66$ im Vergleich zum WT und $\Delta 66::66$ signifikant verringert vorlagen. Dazu zählen der M-Protein transagierenden Positivregulator Mga, das FBP SfbX, das L-proline Glycine Betaine ABC transport system OpuABC, ein FC-Gamma-Rezeptor und eine NAD-abhängige Malatdehydrogenase.

Zusätzlich konnte ein Protein identifiziert werden, welches sowohl in $\Delta 66$ als auch in $\Delta 66::66$ signifikant verringert vorlag. Dabei handelt es sich um den Oligopeptidtransporter OppA.

Experimente und Ergebnisse

Tabelle 9: Differentiell synthetisierte Proteine von GAS M49 WT, M49 $\Delta 66$ und M49 $\Delta 66::66$.

Protein	Gen	Ratio (Durchschnitt von 3 biologischen Replikaten)	
		WT/ $\Delta 66$	WT/ $\Delta 66::66$
Proteinvorkommen signifikant erhöht in $\Delta 66$			
A0A0H3BYW1	<i>slo</i>	0,3	1,7
A0A0H3BYH2	Spy49_0145	0,5	1,3
A0A0H3BXW2	Spy49_0715	0.3	0.8
A0A0H3BWU6	<i>amiC</i>	0.4	0.5
A0A0H3C063	<i>pyrE</i>	0.1	1.2
B5XL15	<i>pyrF</i>	0.3	1.1
A0A0H3BYG0	<i>cpsY</i>	0.7	1.5
Proteinvorkommen signifikant verringert in $\Delta 66$			
A0A0H3C044	<i>sfbX</i>	1,4	0,7
A0A0H3C034	<i>mga</i>	1,8	0,8
A0A0H3BZ39	Spy49_1672c	2,0	0,9
A0A0H3BYT5	Spy49_0864	9,7	2,1
A0A0H3BYX3	<i>opuABC</i>	2,0	1,7
Proteinvorkommen signifikant verringert in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$			
A0A0H3BWS8	<i>oppA</i>	8,1	11,8

3.2.4 sRNA 66 hat einen starken Einfluss auf die Expression seiner Nachbargene

Da in $\Delta 66$ die Abundanz der Proteine PyrE, (putative Orotatphosphoribosyltransferase) PyrF (putative Orotidin-5'-Decarboxylase) stark

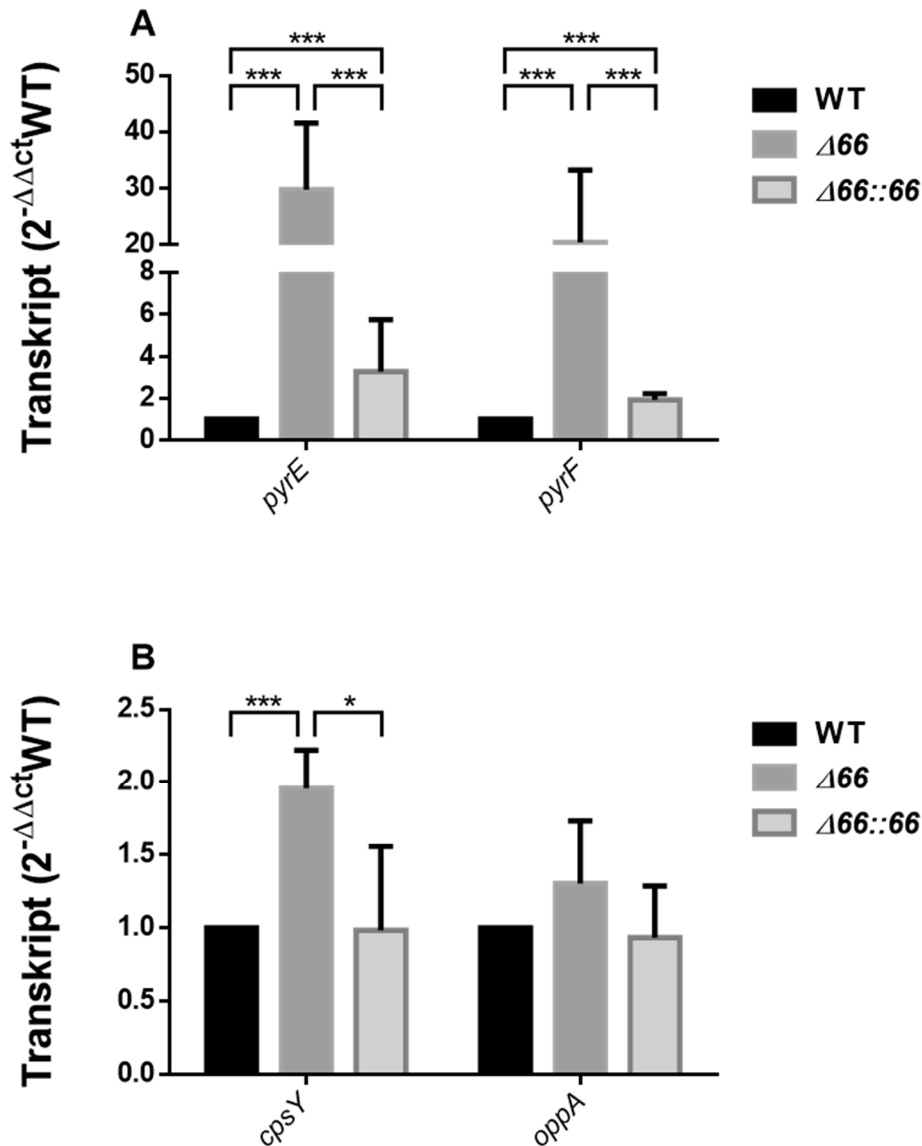


Abbildung 20: sRNA 66 hat einen starken Einfluss auf das pyrF/E-Operon

(A) Relative Expression der pyrE- und pyrF-Transkripte in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT (n=6)

(B) Relative Expression der cpsY- und oppA-Transkripte in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT (n=6)

erhöht und die Abundanz von OppA (Oligopeptid Permease) in der Mutante und dem Komplementationsstamm stark verringert war, sollte untersucht werden, ob diese und andere potentielle Zielstrukturen, die in der Proteomanalyse in veränderten Verhältnissen auftraten, auch Veränderungen auf transkriptioneller Ebene aufweisen. Der putative Transkriptionsregulator CpsY wies in der Proteomanalyse eine leichte Erhöhung in $\Delta 66$ im Vergleich zum WT und $\Delta 66::66$ auf und wurde ebenfalls auf

transkriptioneller Ebene untersucht. Es wurde eine RT-qPCR durchgeführt und die Abundanz der Transkripte *oppA*, *pyrE*, *pyrF* und *cpsY* in den einzelnen Stämmen untersucht. Die Transkripte von *pyrE* und *pyrF* waren in $\Delta 66$ im Vergleich zum WT 20-30-fach erhöht (Abbildung 20A). Der Komplementationsstamm $\Delta 66::66$ zeigte hingegen ein, dem WT entsprechendes Niveau. Auch das leicht erhöhte Niveau des Transkriptionsregulators CpsY in $\Delta 66$ konnte auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden (Abbildung 20B).

Das *oppA*-Transkript lag in allen Stämmen in der gleichen Menge vor (Abbildung 20B). Das Protein OppA wurde mit der Ausprägung von Virulenz in Verbindung gebracht, da es Einfluss auf die Expression von Genen besitzt die für Virulenzfaktoren kodiert.

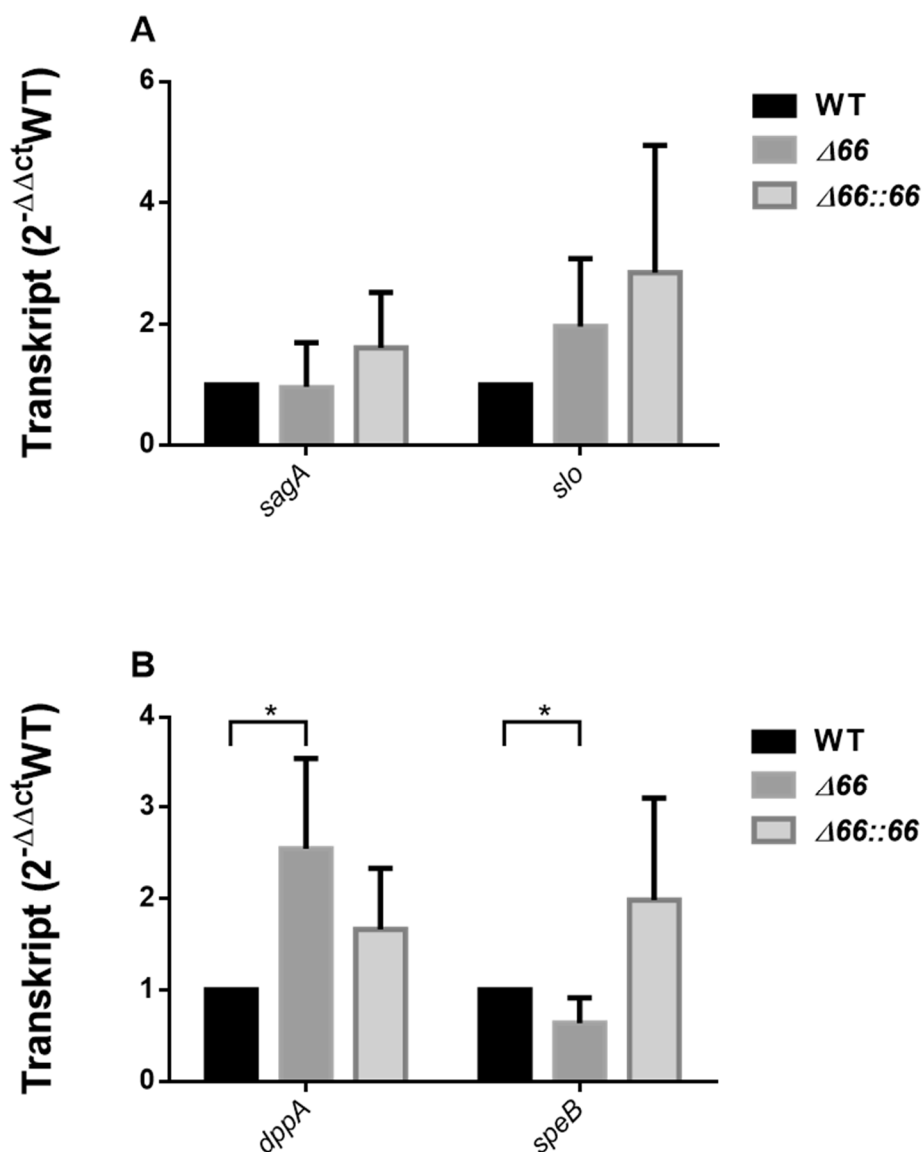


Abbildung 21: Der Verlust von OppA hat keinen Einfluss auf das OppA-Regulon in *S. pyogenes* M49
(A) Relative Expression der *sagA*- ($n=4$) und *slo*-($n=3$) Transkripte in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT
(B) Relative Expression der *dppA*- und *speB*-Transkripte in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT ($n=4$)

Hierzu zählen unter anderen die Gene *speB* (Cystein Protease), *sagA* (Streptolysin S-assoziiertes Gen A), *slo* (Streptolysin O) und *dppA* (Dipeptid Permease) [177]. Da trotz gleicher Transkriptabundanzen von *oppA* in den Stämmen eine Verringerung des Proteins OppA in $\Delta 66$ als auch in $\Delta 66::66$ festgestellt werden konnte, (s.3.2.3) wurden zusätzlich die relativen Mengen der oben genannten Transkripte bestimmt und verglichen. Wie in Abbildung 21A dargestellt, konnte bei den Transkripten *slo* und bei *sagA* kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen festgestellt werden. Im Fall von *dppA* konnte in $\Delta 66$ im Vergleich zum WT und $\Delta 66::66$ eine höhere Abundanz des Transkriptes festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte im Fall des *speB* Transkriptes in der Mutante eine signifikante Verminderung des Transkriptes im Vergleich zu den anderen Stämmen detektiert werden (Abbildung 21B).

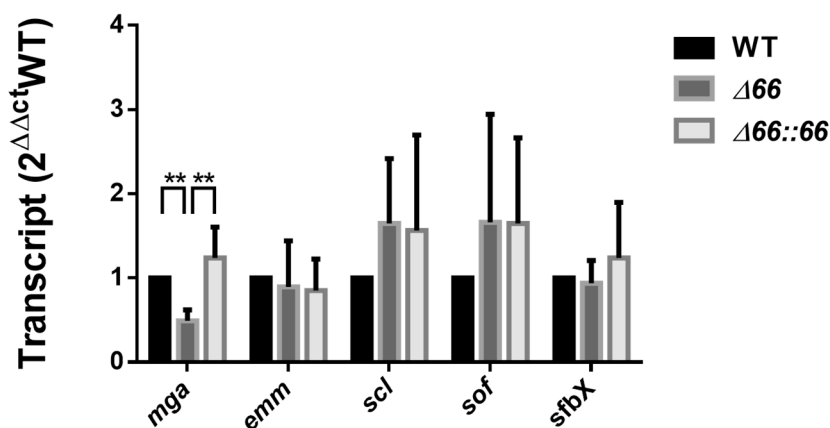


Abbildung 22: Der geringere Abundanz des Regulators Mga hat keinen Einfluss auf das Mga-Regulon
Relative Expression der *mga*-(n=6), *scl*-(n=4), *sfbX* (n=4) *emm*- und *sof* (n=3) Transkripte in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ im Vergleich zum WT

Der globale Transkriptionregulator Mga lag laut Proteomanalyse in $\Delta 66$ verringert vor und wurde ebenfalls auf transkriptioneller Ebene untersucht. Wie Abbildung 22 zeigt, wies $\Delta 66$ im Vergleich zum WT und $\Delta 66::66$ eine Verringerung der Abundanz des *mga*-Transkriptes auf. Um zu untersuchen ob dieser Effekt einen Einfluss auf das gesamte Mga-Regulon hat wurden zusätzlich die Transkriptmengen von *emm*, *scl*, *sof* und *sfbX* bestimmt. Die Expression dieser Gene war jedoch in allen Stämmen gleich.

3.3 Die genetisch veränderten Stämme weisen vereinzelte SNPs auf

Bei der Herstellung von Mutanten kann es zu zusätzlichen sporadischen Mutationen im Genom kommen. Diese Mutationen, können bei der Translation zum Austausch von Aminosäuren führen. Das kann zu einer Dysfunktionalität des Proteins oder, im Fall eines Stop-Kodons, zur Synthese eines verkürzten Proteins führen. Um

zu untersuchen, ob in den Stämmen $\Delta 66::66$, $\Delta 66$, $\Delta marS::marS$ und $\Delta marS$ sporadische Mutationen vorliegen, wurde das Genom der Stämme sequenziert (s.2.3.8) und mit dem WT verglichen.

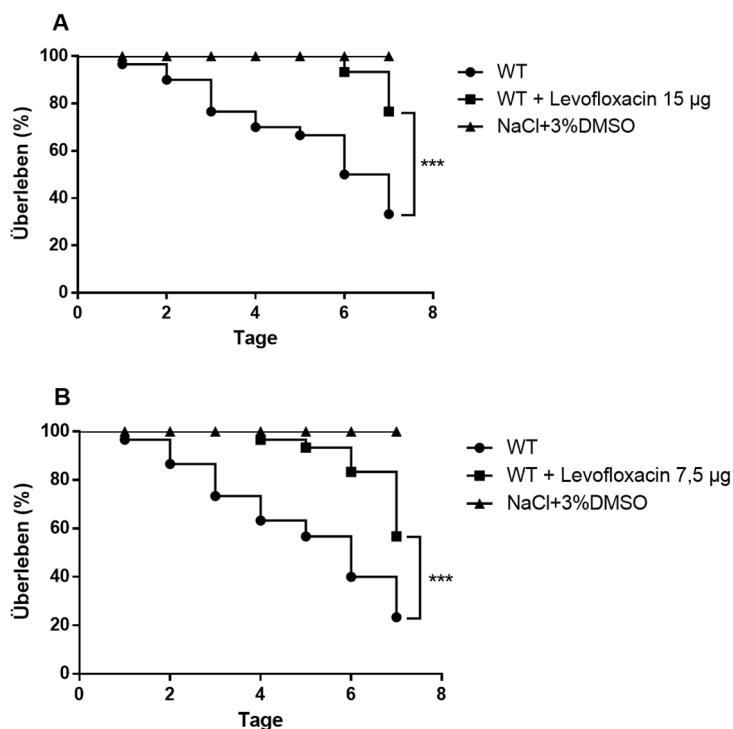
Im Fall der Deletionsmutante $\Delta marS$ wurden in der Genomanalyse 2 einzelständige Nukleotidpolymorphismen (SNPs) gefunden (Anhang 4). Einer wurde in *folE* detektiert, welches für eine GTP Cyclohydrolase kodiert, der in Konsequenz auch in $\Delta marS::marS$ besteht. Dieser SNP ist jedoch stumm und führt zu keiner Veränderung im kodierten Protein. Der zweite SNP wurde in *mga* detektiert, der bei Translation an Position 232 zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin führt. Da in $\Delta marS::marS$ dieser SNP nicht vorlag, wurde eine erneute Sequenzierung des gesamten *mga*-Gens vorgenommen. Hierbei konnte ein Nukleotidaustausch in *mga* und der damit verbundene Aminosäureaustausch in Mga ausgeschlossen werden (s.Anhang).

Im Stamm $\Delta 66$ wurden durch die Transkriptomanalyse 3 SNPs in kodierenden Regionen gefunden, die ihrerseits bei der Translation zu einem Aminosäureaustausch führen. Der erste SNP ereignete sich im Gen *murL*, dass für eine UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-diaminopimelate Ligase kodiert und an der Zellwandsynthese beteiligt ist [178]. Dieser SNP wurde ebenfalls in $\Delta 66::66$ gefunden. Durch den Nukleotidaustausch kommt es bei der Translation zu einem Aminosäureaustausch an Position 252 von Tryptophan zu Arginin. Der Zweite SNP liegt ebenfalls in der Mutante und Komplementante vor. Hierbei ist das Gen *oppA* betroffen, welches für einen Oligopeptid ABC-Transporter kodiert. Hierbei handelt es sich um eine „Nonsense“-Mutation, durch die es bei der Translation der mRNA zu einem Abbruch der Proteinsynthese kommt. Auch in *mga* konnte ein SNP gefunden werden, der bei Translation an Position 204 zu einem Aminosäureaustausch von Histidin zu Arginin führt. Dieser tritt jedoch nicht in der Komplementante auf. SNPs, die nur die Komplementante betreffen wurden in *arp1*, *lepA* und *polA* gefunden. Die SNPs in *arp1* und *lepA* sind still und führen zu keiner Veränderung in der kodierten Proteinsequenz. Bei *PolA* gibt es einen Austausch an Position 610 von Valin zu Glutamin. Das Gen *polA* kodiert für die DNA-Polymerase I und ist essentiell bei der DNA-Replikation.

3.4 Etablierung eines *Galleria mellonella* *in vivo* Modells zur Analyse von potentiellen alternativen Therapeutika gegen *Streptococcus pyogenes*

3.4.1 *Galleria mellonella* Larven können erfolgreich mit Levofloxacin behandelt werden

Um ein Modell zu etablieren, bei dem neue Therapiestrategien gegen *S. pyogenes* schnell *in vivo* getestet werden können, wurde ein *Galleria mellonella* Mottenlarven Modell gewählt, da es nur geringe Kosten verursacht, leicht zu handhaben ist und als ethisch vertretbarer als ein Säugetiermodell eingestuft wird. Zusätzlich konnte in Vorstudien gezeigt werden, dass sich die Larven gut für Infektionsstudien mit *S. pyogenes* eignen. Um grundsätzlich festzustellen, ob die Mottenlarven auf konventionelle Behandlungen reagieren, wurden die Larven zunächst mit einer Bakteriensuspension infiziert und 30 min nach Infektion mit verschiedenen Konzentrationen (15; 7,5; 1 µg/Larve) Levofloxacinlösung behandelt. In den Abbildungen 23A-C sind die Ergebnisse der Experimente dargestellt. Die Levofloxacinkonzentrationen 15 µg und 7,5 µg/Larve führten zu einer deutlichen Verbesserung der Überlebensrate bei infizierten Larven. Bei einer Konzentration von 1 µg/Larve war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gering und die protektive Wirkung stark vermindert.



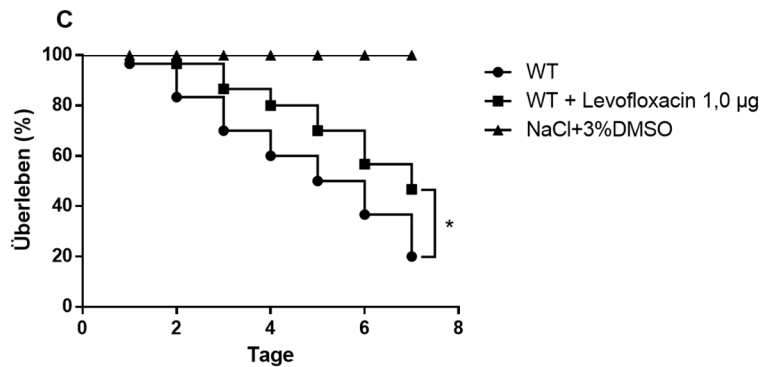


Abbildung 23: Die Behandlung mit Levofloxacin zeigt konzentrationsabhängige Effekte

- (A) Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven behandelt mit 15 µg Levofloxacin im Vergleich zu unbehandelten Larven (n=30)
 (B) Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven behandelt mit 7,5 µg Levofloxacin im Vergleich zu unbehandelten Larven (n=30)
 (C) Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven behandelt mit 1 µg Levofloxacin im Vergleich zu unbehandelten Larven (n=30)

3.4.2 Tat-Anti-*gyrA* PNAs sind ein wirksames Therapeutikum gegen *Streptococcus pyogenes* *in vivo*

Peptidnukleinsäuren (PNAs) konnten in der Vergangenheit erfolgreich zur Hemmung des Bakterienwachstums *in vitro* eingesetzt werden. PNAs werden nicht effektiv von der Zelle aufgenommen und brauchen für das Eindringen zellpenetrierenden Peptide (CPPs). Es wurde gezeigt, dass die Aufnahme und damit die Wirksamkeit von PNAs maßgeblich von der Wahl des CPPs abhängt. In vielen Studien wurden Tat-gekoppelte PNAs als wirksamer im Vergleich zu anderen CPP-gekoppelten PNAs beschrieben [121,126,128,179]. In dieser Arbeit sollte deshalb überprüft werden, ob sich Tat-Anti-*gyrA* PNAs zur Behandlung von *S. pyogenes* infizierten *Galleria mellonella* Larven eignen. Ferner wurde getestet, ob andere,

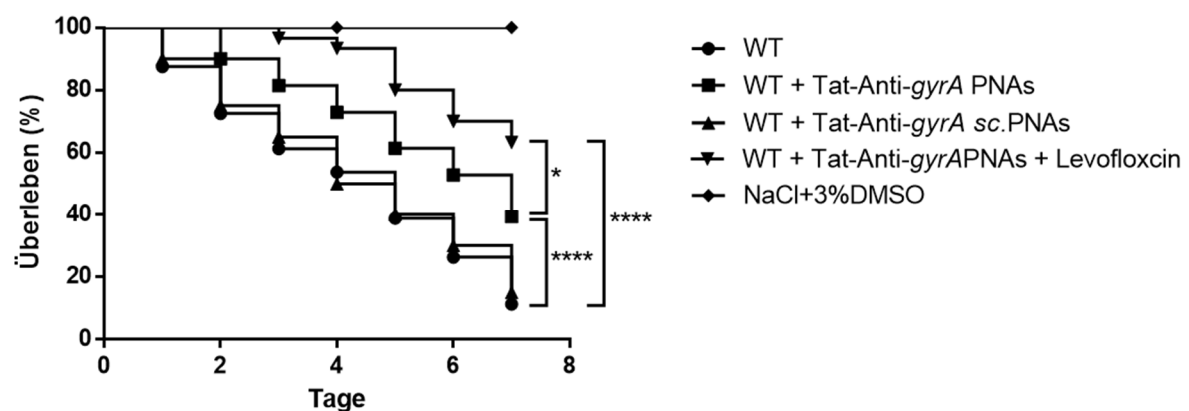


Abbildung 24: TAT-Anti-*gyrA*-PNAs steigern das Überleben von mit GAS M49 infizierten *Galleria mellonella* Larven und sind mit Levofloxacin kombinierbar

Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven ausschließlich behandelt mit TAT-Anti-*gyrA*-PNAs (n=80) und in Kombination mit 1 µg/Larve Levofloxacin (n=30) im Vergleich zu unbehandelten Larven

Experimente und Ergebnisse

herkömmlich gegen Bakterien angewandte CPPs (KFF, TAT) oder bisher nur in Eukaryoten verwendete CPPs (Antennapedia und Cadherin), ähnlich oder besser wirken. Getestet wurden neben Tat-Anti-*gyrA* PNAs auch KFF- und Cadherin-

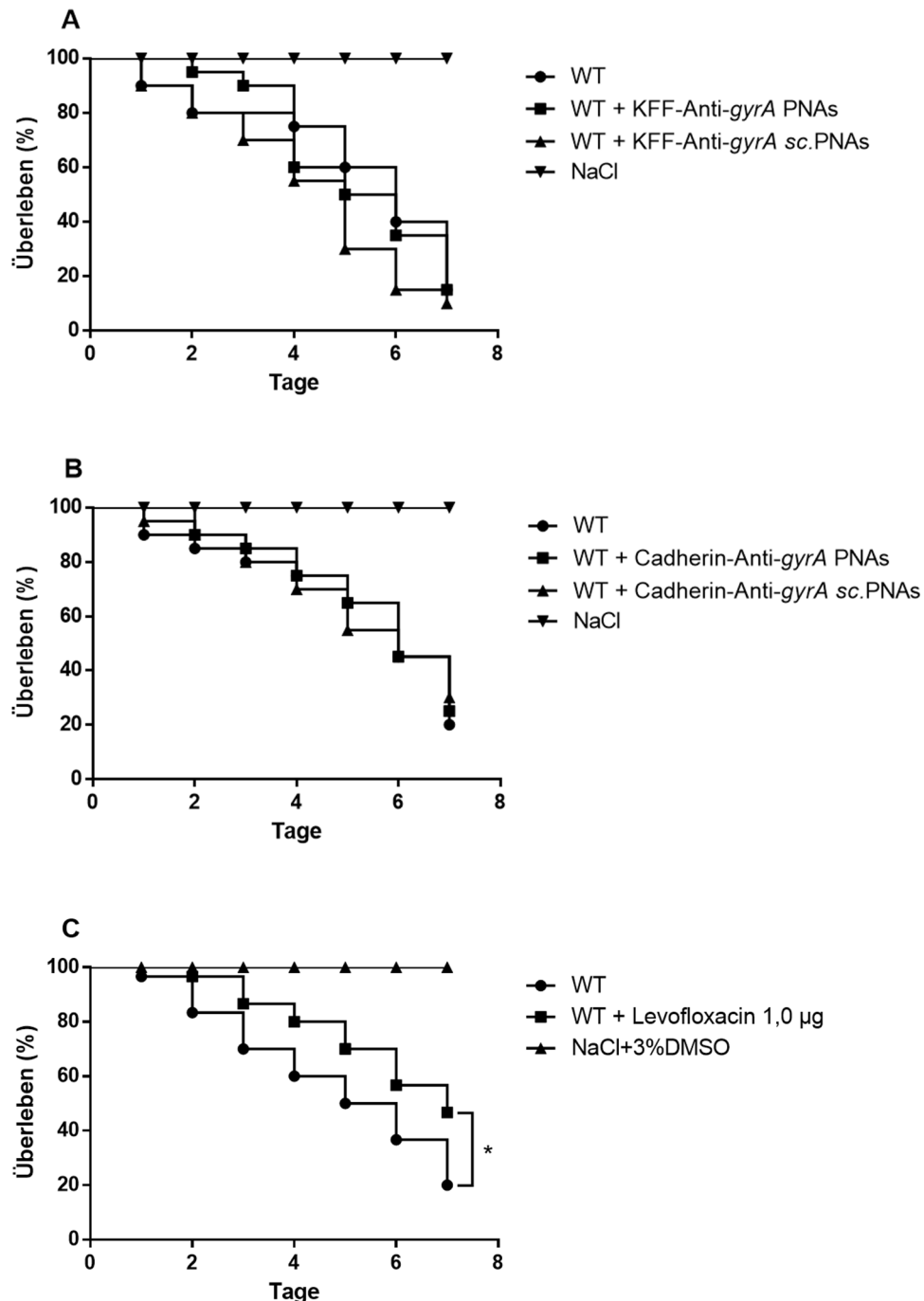


Abbildung 25: KFF-, Cadherin- und Antennapedia- gekoppelte Anti-*gyrA*-PNAs haben keinen Einfluss auf das Überleben von mit GAS M49 infizierter *Galleria mellonella* Larven

(A) Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven behandelt mit KFF-Anti-*gyrA*-PNAs im Vergleich zu unbehandelten Larven (n=20)

(B) Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven behandelt mit Cadherin-Anti-*gyrA*-PNAs im Vergleich zu unbehandelten Larven (n=20)

(C) Überleben infizierter *Galleria mellonella* Larven behandelt mit Antennapedia-Anti-*gyrA*-PNAs im Vergleich zu unbehandelten Larven (n=20)

gekoppelte Anti-*gyrA* PNAs. Wie in Abbildung 24 dargestellt hatten die mit Tat-Anti-*gyrA* PNAs behandelten Larven eine deutliche höhere Überlebensrate als die unbehandelten Larven. Eine Kombinationstherapie mit einer schwach wirksamen Konzentration von Levofloxacin (1 µg/Larve) (s. 3.3.1) konnte den Effekt nochmals verstärken. Im Gegensatz zu Tat-Anti-*gyrA*, zeigten Cadherin-, KFF und Antennapedia-Anti- *gyrA* PNAs keine Verbesserung der Überlebensrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 25A/B).

3.4.3 Antibiotikaresistenz als neues Ziel im Gegensatz zu essentiellen Genen

Die Zielgene von Antisense-PNAs in unserem Labor waren bisher essentielle Gene [135]. Deshalb sollte ein neuer Ansatz mit PNAs getestet werden, die sich gegen

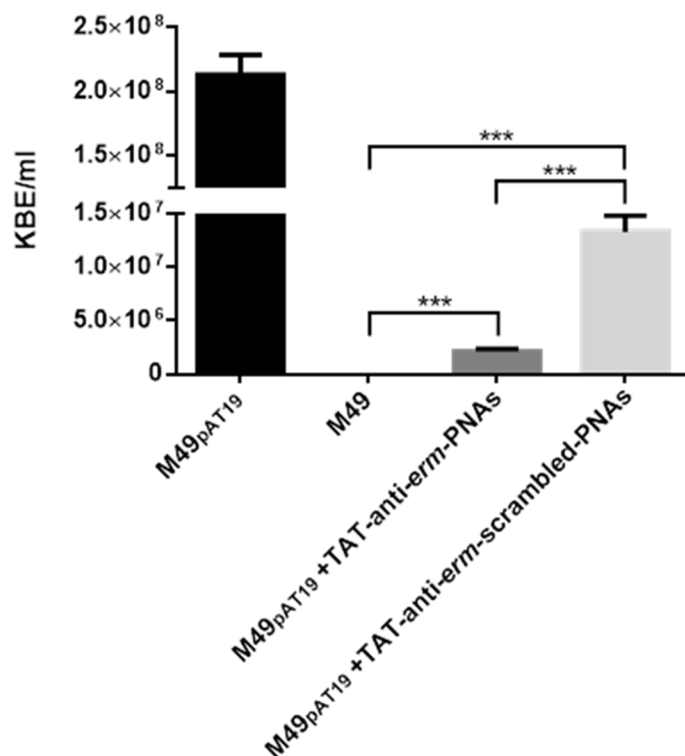


Abbildung 26: TAT-Anti-erm-PNAs können die erworbene Resistenz gegen Erythromycin senken
KBEs von verschiedenen *Streptococcus pyogenes* Stämmen in Erythromycin-haltigen Medium

erworbene Antibiotikaresistenz richtet. Hierbei wurden Tat-Anti-*erm*-PNAs in einem neuen Versuchsaufbau verwendet (s.2.2.2). Alle Stämme wurden einer Bakteriendichte von $1,5-2 \times 10^7$ eingesetzt.

Wie in Abbildung 26 dargestellt ist, konnte ein starkes Wachstum des WT_{pAT19} (WT19) festgestellt werden. Die Bakterienzahl stieg ca. zehnfach im Vergleich zum Inokulat. Im Gegensatz dazu konnte ein starkes Absterben des WT beobachtet werden. Nach Behandlung des WT19 mit TAT-Anti-*erm*-PNAs konnte ebenfalls eine

Experimente und Ergebnisse

Wachstumshemmung und ein Absterben (ca. hundertfach) der Bakterien beobachtet werden. Der mit „scrambled“-PNAs behandelte WT19 zeigte nach 6h eine konstante Zellzahl, die dem des Inokulums ähnelte.

4.0 Diskussion

4.1 sRNA MarS

Die sRNA MarS wurde durch eine Suche nach putativen intergenischen Genloci gefunden, die für sRNAs kodieren könnten [100]. Hierbei wurden durch Wachstumsuntersuchungen in verschiedenen Medien putative sRNAs identifiziert, die potentiell Einfluss auf die Pathogenität von GAS haben könnten. Zu diesen sRNAs gehört *marS* (sRNASpy490957c). Das kodierende Gen der sRNA ist in Milchsäurebakterien konserviert. Genombasierte Studien, die auf einer spezifischen RNA-Motiv-Erkennungssoftware basieren (CMfinder) sagen eine *cis*-regulatorische Funktion voraus [155]. Für einige GAS-Serotypen wurde jedoch eine unabhängige Transkription beschrieben [100,107,156]. In *Streptococcus mutans* und *S. pyogenes* weisen eine Terminatorsequenz und ein starker Promoter stromabwärts des sRNA Gens auf eine unabhängige Transkription hin [100,157]. Ein Schema des Genlocus ist in Abbildung 7A dargestellt. Auf dem Gegenstrang von MarS ist jedoch ein 108 bp offener Leserahmen kodiert, welcher zu einer Expression eines 35 AA-Peptids führen würde. Laut BLAST-Analyse, konnten für dieses Peptid keinerlei Homologien zu anderen Peptiden gefunden werden [172]. Die Stabilität von MarS wurde durch eine sich an eine Rifampicinbehandlung anschließende RT-qPCR bestimmt. Die Stabilität des Transkriptes war in GAS M49 hoch (Abbildung 7B). Diese Beobachtung deckt sich mit zuvor publizierten Daten aus GAS M1 [107]. Um die Rolle von MarS in GAS M49 zu untersuchen, wurde eine isogene Deletionsmutante ($\Delta marS$) und eine Komplementationsmutante ($\Delta marS::marS$) mit ektopischer Expression der sRNA verwendet. Diese Strategie wird empfohlen um spontane Mutationen die bei der Mutagenese auftreten können auszuschließen [180]. Die Expression von MarS wurde durch eine RT-qPCR bestimmt. Es konnte keine Expression der sRNA in $\Delta marS$ festgestellt werden, während in $\Delta marS::marS$ eine verstärkte Expression von MarS detektiert wurde (Abbildung 7C). Die verstärkte Expression lässt sich durch eine erhöhte Kopienzahl des sRNA-Gens erklären.

Die Deletion der sRNA MarS resultierte in einem verminderten Wachstum in humanem Vollblut und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Phagozytose im Vergleich zum WT und der Komplementationsmutante (Abbildung 8). Das Überleben in humanem Plasma war von der Deletion hingegen nicht beeinflusst, was eine Rolle von MarS bei dem Umgehen der Phagozytose nahelegt.

Die Hyaluronsäurekapsel wird mit der Anfälligkeit bzw. Widerstandsfähigkeit gegenüber Neutrophilen in Verbindung gebracht [181,182]. Bei der Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration konnte jedoch kein Unterschied zwischen $\Delta marS$ und dem WT festgestellt werden. Die Expression der Kapselsynthesegene in $\Delta marS::marS$ war gegenüber der des WT und der Deletionsmutante signifikant erhöht (Abbildung 9B).

GAS adhären während der Kolonisation an humanes Gewebe. Die Hyaluronsäurekapsel von GAS kann die Adhärenz an Keratinocyten beeinflussen, da sie als Adhäsine fungiert [183,184]. Zusätzlich wurde die Internalisierung in Wirtszellen als ein Grund für bakterielle Persistenz und daraus resultierende Rezidive und die vorkommende Penicillinunwirksamkeit diskutiert [149,164–166]. Die Deletion von MarS in GAS M49 resultierte in einer eingeschränkten Fähigkeit an humane Keratinozyten zu adhären und in diese zu internalisieren (Abbildung 10A/B). $\Delta marS::marS$ zeigte eine dem WT ähnliche Adhärenz, konnte dieses jedoch trotz gesteigerter Hyaluronsäuremenge nicht übersteigen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Kapsel im Serotyp M49 keine große Rolle als Adhäsine spielt. Um einen möglichen spezifischen Effekt nachzuweisen müsste hier auf einen Serotyp zurückgegriffen werden, der eine starke Kapselproduktion aufweist, wie beispielsweise M18. Das M Protein ist in Adhärenz- und Internalisierungsprozesse involviert [149,168,185] und es wurde gezeigt, dass es eine protektive Funktion für GAS bei Phagocytoseprozessen besitzt [158,159,167,186]. Die Expression von *emm*, welches für das M-Protein kodiert, war in $\Delta marS$ stark reduziert, was die geschwächte Adhärenz, Internalisierung und die höhere Anfälligkeit gegenüber Neutrophilen erklärt. Die Aktivierung der *emm*-Expression wird durch Mga gesteuert. Die *mga* mRNA wurde deshalb mit RT-qPCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *mga* in der Mutante signifikant verringert vorlag. Die Expression von *mga* ist positiv autoreguliert [187] und die *mga*-mRNA wurde durch IntaRNA als mögliche Zielstruktur vorausgesagt (Anhang 1).

Zwei Szenarien könnten zu der Verringerung von *mga* in $\Delta marS$ führen. Im Falle einer indirekten Regulation müsste ein dritter Faktor Einfluss auf die Transkription oder Translation ausüben. Im Falle eines direkten Einflusses würde MarS an die vorausgesagte Bindestelle am 5'-Ende des *mga*-Transkriptes binden (s. 3.1.4). Die Translation könnte so in der Deletionsmutante abgeschwächt sein. Die daraus folgende verringerte Proteinmenge würde in einer geringeren Stimulation der

Transkription durch Mga resultieren. Die verringerte Menge des *mga*-Transkriptes führt konsequent zur Herabregulation verschiedener Gene, wie *scIA* und *sof*, die dem Mga-Regulon angehören [78]. Im Proteom von $\Delta marS$ wurde ein verringertes Vorkommen des kollagenähnlichen Proteins A und B sowie der C5a-Peptidase beobachtet. Die Expression der korrespondierenden Gene *scIA*, *scIB* und *scpA* werden durch Mga reguliert [174–176]. Zusätzlich konnte ein verstärktes Wachstum von $\Delta marS$ auf 3 verschiedenen Kohlenstoffquellen beobachtet werden. Eine dieser Kohlenstoffquellen war Maltose, dessen Utilisation durch Mga negativ beeinflusst wird [188,189].

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass durch die Deletion von MarS die *mga*-Expression direkt oder indirekt beeinflusst und dies zu einer Herabregulation von *mga* und in der Konsequenz zur Herabregulation von Mga-abhängigen Genen in der Deletionsmutante führt. Das resultierende verringerte Vorkommen einer Reihe Virulenzfaktoren in $\Delta marS$ ist für dessen abgeschwächte Virulenz *in vitro* verantwortlich.

Die Virulenz von *mga*-Mutanten *in vivo* ist abhängig vom GAS Serotyp, dem Infektionsmodell und der Art der Mutation. In einer Veröffentlichung von Sanson et al. konnte ein SNP in GAS M59 die Expression von *mga* und 54 anderen Genen verstärken, was in einem Mausmodell stärkere Hautläsionen bei den Tieren hervorrief [190]. In einer anderen Studie führte die Inaktivierung von *mga* in GAS Alab49 in einem humanisierten Mausmodell für Hautinfektionen zu einem Verlust der Virulenz [191]. Die Inhibition der PTS-Phosphorylierung von Mga führte zu geringerer Aktivität des Regulators und einer geschwächten Virulenz in einem Modell für subkutane Hautinfektionen [192]. Zu ähnlich divergierenden Ergebnissen kommt es bei *in vivo*-Modellen für die Untersuchung von *emm*. Im GAS-Isolat 64/14 führte die Inaktivierung von *emm* bei Injektion in die Haut zu einem signifikanten Verlust der Virulenz. Dieser Effekt konnte jedoch bei intraperitonealen Infektion nicht beobachtet werden [193]. In der gleichen Studie führte die Inaktivierung von *mga* zu einer verstärkten Virulenz in der Haut, während die Inaktivierung keinen Einfluss auf den Verlauf der intraperitonealen Infektion hatte. Ein wichtiger Aspekt bei dem Verlauf einer GAS-Infektion ist der Einfluss der Fibronektinbindung. Es wurde gezeigt, dass die Expression des Fibronektin-bindenden Proteins F1 in GAS in einem Mausmodell einerseits die bakterielle Adhärenz steigert, andererseits jedoch die Dissemination in die Milz der infizierten Tiere verringert [194]. Zusammengefasst führt die Verminderung von Adhärenz übermittelnden Virulenzfaktoren zu einer verringerten Fähigkeit an

Diskussion

Zellen zu adhären und dadurch zu einer abgeschwächten Virulenz bei Hautinfektionen. In systemischen Infektionsmodellen, konnte jedoch insgesamt eine erhöhte Dissemination in dieser Situation beobachtet werden.

Im Fall der sRNA MarS spiegelten sich die Ergebnisse dieser Studien wider. Die Deletion der sRNA führte zu einer Verminderung von verschiedenen oberflächenassoziierten Proteinen, wie dem M-Protein und den Fibronectin-bindenden Proteinen SfbX und Sof. Daraus resultierte eine verringerte Fähigkeit an humane Keratinocyten zu binden, während die Dissemination in einem Sepsis-Mausmodell verstärkt wurde. Die Deletionsmutante $\Delta marS$ disseminierte verstärkt in die Leber und die Nieren der Tiere, während die Komplementante $\Delta marS::marS$ sich nur sehr schwach in der Milz verbreiten konnte. Um den Krankheitsverlauf über die Zeit zu untersuchen wurden *Galleria mellonella* Larven als Tiermodell verwendet. Diese werden auf Grund ethischer Bedenken und hoher Kosten von murinen Tiermodellen in der Forschung immer relevanter. Es wurde bereits erfolgreich für verschiedene Fragestellungen bezüglich bakterieller Infektion und zur Überprüfung putativer neuer antimikrobieller Wirkstoffe etabliert und die Ergebnisse ähneln denen von murinen Tiermodellen stark [195]. Auch für *Streptococcus pyogenes* existieren vergleichende Studien verschiedener Serotypen [196,197]. Im Fall der sRNA MarS konnten mit diesem Insektenmodell keine Unterschiede in der Progression der Infektion beobachtet werden (Abbildung 16). Zusammengefasst lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die sRNA MarS zwar einen Einfluss auf die Ausbreitung der Bakterien im Tier hat, aber die Lethalität in den Larven nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis erklärt sich möglicherweise in der Funktionsweise von sRNAs. Anders als proteinerge Regulatoren, wirken diese generell feinregulatorisch und führen in der Konsequenz zu schwächer ausgeprägten Effekten [92]. Jedoch könnte die Progression der Infektion in Vertebraten auch anders verlaufen.

Die Deletion des Gens der sRNA MarS führte in *S. pyogenes* M49 zu einer verminderten Expression von *mga* und Mga-abhängigen Virulenzfaktoren. Ein hoher Gehalt der sRNA führte in dem Komplementationsstamm zur Zunahme von *mga* und Mga-abhängigen mRNAs. Wie in Abbildung 13 dargestellt, ist dies möglicherweise die Folge einer Stabilisierung des *mga*-Transkriptes durch MarS.

Eine Komplementation des Phänotyps mit einem Vektor der eine mutierte sRNA MarS kodierte, konnte das WT-Niveau im Fall der Transkripte nicht wieder herstellen. Ein Grund dafür könnte sein, dass durch den Austausch der Basen 88-CC-89 in 88-GG-

89 die vorhergesagte Bindestelle (Abbildung 11) verändert wurde und es in der Folge zu einer abgeschwächten Bindung an die Targetsequenz kommt. Jedoch könnte durch den Austausch auch die Sekundärstruktur der sRNA verändert worden sein, was in einer Dysfunktion von MarS resultieren könnte.

Unabhängig der genannten Szenarien konnte gezeigt werden, dass MarS die *mga*-Expression positiv moduliert, was sich in der Folge auf das Mga-Regulon und die Virulenz auswirkt. Diese Modulation resultiert in der Folge in einer Erhöhung der Resistenz gegen Phagozytose und einer verstärkten Adhärenz an Wirtsgewebe in GAS M49.

Damit fungiert MarS in einer anderen Wachstumsphase als die sRNA FasX. Diese reguliert die Expression von Pili und Fibronektin bindender Proteine negativ, während die Expression von Streptokinase verstärkt wird. FasX dient somit der Dissemination und führt zur Anpassung in späteren Stadien der Infektion [114,115]. MarS dient hingegen der Anpassung in frühen Stadien der Infektion und fördert die Adhäsion, indem die Expression von verschiedenen ECM-bindenden Oberflächenproteinen verstärkt und die Dissemination gebremst wird.

4.2 sRNA 66

Die sRNA 66 (sRNA_{scan_66}) wurde, wie die sRNA MarS, durch eine Suche nach putativen intergenischen Genloci gefunden, die für sRNAs kodieren könnten [100] und ist in GAS konserviert. Der sRNA 66 wird auf Rfam eine cis-regulatorische Funktion zugeordnet [198], es konnte jedoch durch das Terminator-Vorhersageprogramm ARNold eine putative Terminatorstruktur in GAS M49 identifiziert werden [199,200]. Zu der Rolle der sRNA in Streptokokken, liegen jedoch keine Daten vor. Ein Schema des Genlokus ist in Abbildung 17 dargestellt. Um die Rolle von 66 in GAS M49 zu untersuchen, wurde eine isogene Deletionsmutante ($\Delta 66$) und ein Komplementationsstamm ($\Delta 66::66$) mit ektopischer Expression der sRNA verwendet. Die Expression von 66 wurde durch RT-qPCR bestimmt. Es konnte keine Expression der sRNA in $\Delta 66$ festgestellt werden, während in $\Delta 66::66$ eine Expression ähnlich der des WT detektiert wurde (Abbildung 17B).

Die Deletion der sRNA 66 resultierte nicht in einem veränderten Wachstum in humanen Vollblut. Jedoch zeigte die Mutante eine verminderte Fähigkeit an humane Keratinozyten zu adhären. Von den adhärenen Bakterien der Deletionsmutante

konnten im Vergleich zu denen des WT und des Komplementationsstammes jedoch prozentual mehr in die Keratinozyten internalisieren.

Durch eine Proteomanalyse konnten 13 Proteine identifiziert werden, die in der Deletionsmutante differentiell exprimiert wurden. Unter diesen befanden sich auch Mga und die Mga abhängigen Proteine Slo und SfbX. Mga zeigte, genau wie SfbX, eine verringerte Abundanz in der Deletionsmutante, während Slo stärker exprimiert wurde. Es wurde gezeigt, dass ein Verlust des SfbX-Proteins in einer geschwächten Adhärenz resultiert [59,201]. Somit könnte eine geringere Abundanz von SfbX für den Effekt in der Deletionsmutante verantwortlich sein. Ein Unterschied im Vorkommen des Transkriptes *sfbX* und *slo* konnte jedoch in den Stämmen nicht nachgewiesen werden. Neben *sfbX* und *slo*, wiesen auch die Mga-abhängigen Transkripte *emm*, *scl* und *sof* keine signifikanten Veränderungen in den Stämmen auf. Somit ist ein Einfluss der sRNA 66 auf das Mga-Regulon unwahrscheinlich [80]. Es könnten zwei putative Szenarien für die Veränderung von SfbX und Slo verantwortlich sein. Zum einen könnte sRNA 66 mit einem unbekannten Faktor interagieren, der seinerseits auf die Expression von Slo und SfbX Einfluss hat und zum anderen könnte diese sRNA direkt mit den Proteinen interagieren [6].

Neben Mga wies die Proteomanalyse mit CpsY einen weiteren Regulator in $\Delta 66$ als differentiell exprimiert aus. In beiden Fällen konnte die abweichende Expression auch auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden.

CpsY ist zu 83 % identisch mit MetR, einem Transkriptionsregulator der LysR-Familie in *Streptococcus mutans*, der Gene der Methioninbiosynthese (*metE*) und -aufnahme (*atmB*) reguliert [202]. In *Streptococcus pyogenes* ergibt sich ein anderes Bild mit anderen Funktionen. In GAS 5448 ist CpsY als wichtiger Faktor für das Überleben in humanem Blut beschrieben worden [203]. In einer neuen Studie konnte eine medienabhängige moderate Regulation verschiedener Virulenzfaktoren (*mnte*, *speB*, *nga/spn*, *prtS/SpyCEP*, *sse*), oberflächenassoziiierter Faktoren (*emm1*, *mur1.2*, *sibA/cdhA*, *M5005_Spy0500*) und eine Rolle des Regulators bei der Umgehung des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden [204]. Am stärksten wirkte sich die Deletion von CpsY auf SpeB aus und bewirkte einen starken bis zu 30fachen Anstieg des Virulenzfaktors in der späten exponentiellen Phase. Durch die Deletion der sRNA 66 konnte eine moderate Erhöhung des Transkriptionsregulators auf mRNA- und Protein-Ebene festgestellt werden. In Konsequenz sank die *speB* mRNA-Konzentration in der Deletionsmutante. Diese Absenkung resultierte jedoch nicht in

einer Verringerung der Proteinmenge von SpeB und macht somit eine biologische Relevanz eher unwahrscheinlich. Auch andere beschriebene Faktoren wie *emm* wurden durch die Veränderung nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis steht jedoch im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten, wonach die Regulation durch CpsY nur moderat ausfällt und selbst eine Deletion des Regulators, mit Ausnahme von *speB*, nur zu geringen Veränderungen führt [204]. Es konnte ebenfalls keine gesteigerte Fähigkeit des Überlebens von $\Delta 66$ in humanem Vollblut gezeigt werden. Zusammengefasst ist die Regulation der CpsY-Expression durch sRNA 66 wahrscheinlich, spiegelt sich aber nicht phänotypisch *in vivo* wider.

Im Zuge der Proteomanalyse wurde festgestellt, dass OppA in der Mutante als auch in dem Komplementationsstamm stark reduziert vorlag. Aus einer sich anschließenden RT-qPCR konnte auf transkriptioneller Ebene diese Reduktion nicht nachgewiesen werden. Durch die SNP-Analyse (Anhang 5) zeigte sich jedoch, dass es in der *oppA*-mRNA zu einem Austausch der Basen G395T gekommen ist. Dieser Austausch führte in Konsequenz zu der Generierung eines Stopcodons in OppA, welcher die stark abweichende Proteinmenge in $\Delta 66$ und $\Delta 66::66$ erklärt. OppA hat laut Literatur Einfluss auf die Transkription von Genen die für Virulenzfaktoren kodieren. Hierzu zählen unter anderen die Gene *speB* (Cystein Protease), *sagA* (Streptolysin S-assoziiertes Gen A), *slo* (Streptolysin O) und *dppA* (Dipeptid Permease) [177,205]. Der Verlust von OppA resultierte jedoch nicht in einer Veränderung der Transkriptmenge von *slo* und *sagA*. Unterschiede konnten lediglich bei den Transkripten *dppA* und *speB* festgestellt werden, die jedoch ausschließlich die Mutante betrafen. Das Transkript *dppA* zeigte eine leichte Erhöhung während die Abundanz von *speB* in der Mutante abnahm. Beide Effekte konnten durch den Komplementationsstamm aufgehoben werden und stellen somit keine Konsequenz des verringerten OppA-Niveaus in den Stämmen dar. Das Transkript *dppA* wurde auch als putative Zielstruktur von TargetRNA2 gefunden (Anhang 3). DppA steht mit der Expression von SpeB in Verbindung, da es die Transkription von *speB* positiv beeinflusst [206]. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu denen dieser Arbeit, da das *speB*-Transkript in der Mutante verringert vorlag. Allerdings könnte der Effekt von DppA auch durch den des Regulators CpsY (s.o.) maskiert werden, der die Expression von *speB* negativ reguliert. CpsY hat laut Literatur einen weitaus größeren Einfluss (30fach bei Deletion) auf die Expression von *speB* [204] als DppA (8fach bei Deletion) [206], was ein Aufheben des positiven Effektes durch DppA wahrscheinlich macht.

Den stärksten Einfluss hatte die Deletion des sRNA Gens 66 auf die Expression der Transkripte *pyrE* und *pyrF*, deren Gene sich in direkter Nachbarschaft des Genlocus befinden. Das Transkript *pyrE* wurde auch in der Zielstrukturanalyse von sRNATarget (Anhang 2) gefunden.

Ein sRNA 66 Ortholog wurde als cis-regulatorisches RNA-Element für das *pyr*-Operon in *Bacillus subtilis* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass durch das Binden des Regulatorproteins PyrR an das RNA-Element eine Haarnadelstruktur entsteht, die die Transkription der Gene für die Pyrimidinbiosynthese stoppt [207,208]. In GAS M49 konnte durch die Deletion eine bis zu 30fache Erhöhung der Transkripte nachgewiesen werden. Auch auf Protein-Ebene lag das Niveau von PyrE und PyrF in $\Delta 66$ weit über denen des WT. Jedoch konnte die ektopische Komplementation das Niveau so stark senken, dass die Transkriptabundanz auf ein nahezu WT-ähnliches Niveau sank. Auch im Proteom konnte in $\Delta 66::66$ ein Niveau erreicht werden, das dem des WT ähnelte. Das legt den Schluss einer differentiellen trans-regulatorischen Funktion von sRNA 66 in GAS M49 nahe. Als Negativregulator des *pyrE/F*-Operons nimmt sRNA 66 wie in *Bacillus subtilis* eine wichtige Rolle als Regulator in der Pyrimidinbiosynthese ein. Ein Einfluss der Pyrimidinbiosynthese auf die Virulenz wurde bisher nur im Zusammenhang mit einem stabilen Wachstum in humanem Blut beschrieben [209]. Inwiefern die Regulation der Pyrimidinsynthese die Adhärenz und Internalisierung beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht.

Es ist zudem auffällig, dass andere Gene in räumlicher Nähe des Genlocus der sRNA liegen, deren Transkripte ebenfalls putative Zielstrukturen der sRNA66 darstellen. Darunter fallen *cpsY*, *amiC* und *Spy49_0715*. Es ist demnach möglich, dass sRNA66 für die Regulation der Expression eines kleinen Clusters von räumlich nah kodierten Transkripten unterschiedlicher Funktion zuständig ist.

4.3 Invertebratenmodell

Multiresistente Keime sind ein wachsendes Problem in der modernen Medizin und Alternativen zu Antibiotika zu finden ein essentielles Ziel [116,117]. Ein alternatives Therapeutikum könnten Peptidnukleinsäuren als Antisensemolekül darstellen. In vergangenen Studien wurden PNAs bereits erfolgreich in verschiedenen Mausmodellen *in vivo* getestet. So konnten (RXR)₄XB und (KFF)₃K-gekoppelte Anti-*ropD*-PNAs erfolgreich gegen verschiedene gramnegative Stämme eingesetzt werden

[124]. Auch in mit grampositiven Bakterienstämmen infizierten Mäusen konnte die bacterizide/-statische Wirkung dieser PNAs gezeigt werden [210,211].

Der Einsatz von Vertebraten für das Testen solcher alternativen, wenig ausgereiften Therapeutika ist umstritten und es werden immer häufiger Invertebraten wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* oder *Galleria mellonella* als vorläufige Tiermodelle genutzt [152,212,213]. Diese werden auf Grund ethischer Bedenken und hoher Kosten von murinen Tiermodellen in der Forschung immer relevanter. Für humanpathogene Fragestellungen ist das *Galleria mellonella* Larven Modell geeignet, da die Tiere bei 37°C überleben [195] und so Untersuchungen von temperaturabhängigen Virulenzfaktoren [214,215] möglich sind. Es konnte bereits erfolgreich für unterschiedliche Fragestellungen bezüglich bakterieller Infektion etabliert [195] und für *Streptococcus pyogenes* angewendet werden [196,197].

Durch diese Arbeit sollte ein Therapiemodell für GAS M49 unter Verwendung von *Galleria mellonella* Larven entwickelt werden, mit dem sich alternative Therapeutika wie CPP-gekoppelte PNAs *in vivo* untersuchen lassen. Die Kopplung an CPPs ist notwendig da PNAs durch ihre hydrophilen Eigenschaften allein schlecht durch Zellmembranen diffundieren können. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Kopplung von CPPs an PNAs eine effiziente Aufnahme ermöglichen kann [119,124]. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte eine *in vitro* Studie die Wirksamkeit von Anti-*gyrA*-PNAs bei *Streptococcus pyogenes* belegen. Hierbei zeigten sich TAT-gekoppelte PNAs als besonders wirksam gegen das Humanpathogen [135] und wurden deshalb für das Modell benutzt. Durch TAT-Anti-*gyrA*-PNAs konnte das Überleben der Larven schon bei einmaliger Gabe signifikant verlängert werden. Die gleichzeitige Behandlung mit einer geringen Konzentration von Levofloxacin führte zu einer verstärkten Überlebensrate der Larven. Anti-*gyrA*-PNAs die an alternative CPPs gekoppelt waren zeigten in gleicher Konzentration jedoch keinen Effekt. Dies ist nur durch eine ineffizientere Aufnahme in die Bakterien oder das Gewebe der Tiere zu erklären.

Die Erforschung und Entwicklung potenter CPPs sind für die PNA-Forschung essentiell und können mit dem vorliegenden Modell als ersten Schritt *in vivo* untersucht werden.

5.0 Zusammenfassung

Das humanpathogene grampositive Bakterium *Streptococcus pyogenes* ist ein Erreger, der jährlich hunderte Millionen Menschen infiziert. Die Krankheiten, die dieser Keim auslöst, reichen dabei von leichten Entzündungen der Haut und des Rachens bis hin zu schweren systemischen Manifestationen. Von den ca. 18 Millionen Fällen von leichten Erkrankungen entwickeln sich ca. 517000 zu ernststen invasiven Infektionen, die auch mit moderner Medikation in 25 % der Fälle zum Tod führen [8,216,217]. Die Expression von Virulenzfaktorgenen in GAS untersteht der strikten Kontrolle von Transkriptions- und Translationsregulatoren. In dieser Arbeit wurden zwei regulatorische sRNA Kandidaten, MarS und sRNA 66, charakterisiert.

Die Deletion von MarS führte zu einer Reihe phänotypischer Veränderungen. Das Wachstum in humanem Vollblut war reduziert und eine verstärkte Sensibilität gegenüber Neutrophilen wurde im Phagocytoseassay nachgewiesen. Die Mutante zeigte im Vergleich zum WT zudem eine verminderte Fähigkeit an humane Keratinocyten zu adhären und internalisieren. Die Kapselproduktion war nur beim Komplementationsstamm signifikant erhöht. Auch die Transkripte *hasA/B/C*, die die Hyaluronsäuresynthesegene kodieren, waren in der Komplementationsstamm erhöht. Dieses Ergebnis weist auf einen positiven Effekt von MarS auf die Kapselproduktion hin.

Die Menge des für das M-Protein kodierenden Transkriptes *emm* war in der Mutante stark verringert. Ebenso war im Vergleich zum WT die Abundanz des M-Proteins im Proteom der Mutante reduziert. Sowohl die Kontrolle von *emm* (direkt) als auch des *has*-Operons (indirekt) unterliegen dem Regulator Mga. Die Menge des *mga* Transkriptes war in der Mutante verringert. Transkripte von Genen, die direkt von Mga reguliert werden, zeigten ebenfalls in der Mutante eine verringerte Abundanz. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Utilisationsrate von bestimmten Zuckern in der Deletionsmutante nachgewiesen werden. Eine Proteomanalyse bestätigte, dass hauptsächlich Mga-abhängige Faktoren in geringerer Menge in der Mutante vorlagen. Die Einführung einer Mismatchmutation in der von IntaRNA vorausgesagten putativen Binderegion der sRNA zum *mga*-Transkript in das Komplementationsvektor, führte zu einem Expressionsmuster der Mga-abhängigen Gene, das dem der Mutante ähnelte.

Zusammenfassung

In einem Mausmodell wurde eine verstärkte Dissemination der Deletionsmutante in verschiedene Organe beobachtet. In einem *Galleria mellonella* Model zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen den Stämmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass MarS die *mga*-Expression positiv reguliert und sich somit indirekt auch auf das gesamte Mga-Regulon auswirkt.

Die Deletion von sRNA 66 führte zu einer verringerten Adhärenz an humane Keratinocyten. Eine Proteomanalyse zeigte 13 differentiell exprimierte Proteine. Am stärksten beeinflusst waren Proteine, deren Gene in der direkten Nachbarschaft der sRNA liegen. Diese sind zum größten Teil in den Stoffwechsel involviert. Die einzige Ausnahme bildet der Regulator CpsY. Auf transkriptioneller Ebene konnte die differentielle Expression der meisten Proteine ebenfalls durch eine verringerte Abundanz der Transkripte in der Deletionsmutante nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sRNA 66 ein Regulator ist, der hauptsächlich die Gene in seiner Nachbarschaft negativ reguliert und in Stoffwechselvorgänge involviert ist.

In dieser Arbeit wurde ein *Galleria mellonella in vivo* Modell für die Untersuchung der Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen auf *S. pyogenes* entwickelt. Die Larven wurden zunächst mit *S. pyogenes* infiziert und mit Levofloxacin behandelt, um die Realisierbarkeit des Tiermodells zu überprüfen. Eine Behandlung mit PNAs die sich gegen das *gyrA*-Transkript richten, konnte erfolgreich gegen die Infektion der Larven mit *S.pyogenes* M49 eingesetzt werden. Eine kombinierte Behandlung mit einer geringen Dosis Levofloxacin führte zu einer höheren Überlebensrate der infizierten Larven. Um weitere putative PNA-targets zu untersuchen, wurden *in vitro* antisense-PNAs verwendet, die komplementär für eine Erythromycin-Resistenzgen-Kassette sind. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine erworbene Resistenz mit PNAs vermindern lässt und es zu einem Absterben der Bakterien kommt. Die Ergebnisse deuten auf ein grundsätzliches Potential von PNAs als alternative Therapeutika gegen *S. pyogenes* M49 hin und weitere Forschung auf diesem Gebiet könnte sich als zielführend erweisen.

Literaturverzeichnis

Reference List

1. Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B (2006) Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microbiol* 72: 2864-2875. 72/4/2864 [pii];10.1128/AEM.72.4.2864-2875.2006 [doi].
2. Schragger HM, Alberti S, Cywes C, Dougherty GJ, Wessels MR (1998) Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A Streptococcus to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest* 101: 1708-1716. 10.1172/JCI2121 [doi].
3. Raasch P, Schmitz U, Patenge N, Julio V, Kreikemeyer B et al. (2010) Non-coding RNA detection methods combined to improve usability, reproducibility and precision.
4. Nielsen PE (2004) PNA Technology. *Mol Biotechnol* 26: 233-248. MB:26:3:233 [pii];10.1385/MB:26:3:233 [doi].
5. Waters LS, Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136: 615-628. S0092-8674(09)00125-1 [pii];10.1016/j.cell.2009.01.043 [doi].
6. Storz G, Vogel J, Wassarman KM (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 43: 880-891. S1097-2765(11)00643-5 [pii];10.1016/j.molcel.2011.08.022 [doi].
7. Margulis L, Sagan D (1987) *Microcosmos: the universe within us reveals evolution's secrets*. *Bostonia* 61: 55-58.
8. Brouwer S, Barnett TC, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker MJ (2016) Streptococcus pyogenes adhesion and colonization. *FEBS Lett* . 10.1002/1873-3468.12254 [doi].
9. Choby BA (2009) Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. *Am Fam Physician* 79: 383-390.
10. Guy R, Williams C, Irvine N, Reynolds A, Coelho J, Saliba V, Thomas D, Doherty L, Chalker V, von WB, Chand M, Efstratiou A, Ramsay M, Lamagni T (2014) Increase in scarlet fever notifications in the United Kingdom, 2013/2014. *Euro Surveill* 19: 20749.
11. Luk EY, Lo JY, Li AZ, Lau MC, Cheung TK, Wong AY, Wong MM, Wong CW, Chuang SK, Tsang T (2012) Scarlet fever epidemic, Hong Kong, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 1658-1661. 10.3201/eid1810.111900 [doi].

12. Briko NI, Filatov NN, Zhuravlev MV, Lytkina IN, Ezhlova EB, Brazhnikov AI, Tsapkova NN, Malyshev NA (2003) [Epidemiological pattern of scarlet fever in recent years]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 67-72.
13. Stevens DL, Bryant AE (2016) Impetigo, Erysipelas and Cellulitis. NBK333408 [bookaccession].
14. Cunningham MW (2008) Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae. *Adv Exp Med Biol* 609: 29-42. 10.1007/978-0-387-73960-1_3 [doi].
15. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 5: 685-694. S1473-3099(05)70267-X [pii];10.1016/S1473-3099(05)70267-X [doi].
16. Stevens DL, Bryant AE (2016) Impetigo, Erysipelas and Cellulitis. NBK333408 [bookaccession].
17. Stevens DL, Bryant AE (2016) Severe Group A Streptococcal Infections. NBK333425 [bookaccession].
18. Bisno AL, Stevens DL (1996) Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N Engl J Med* 334: 240-245. 10.1056/NEJM199601253340407 [doi].
19. Wong CJ, Stevens DL (2013) Serious group a streptococcal infections. *Med Clin North Am* 97: 721-xii. S0025-7125(13)00044-8 [pii];10.1016/j.mcna.2013.03.003 [doi].
20. Kaul R, McGeer A, Low DE, Green K, Schwartz B (1997) Population-based surveillance for group A streptococcal necrotizing fasciitis: Clinical features, prognostic indicators, and microbiologic analysis of seventy-seven cases. Ontario Group A Streptococcal Study. *Am J Med* 103: 18-24. S0002934397001605 [pii].
21. Lappin E, Ferguson AJ (2009) Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis* 9: 281-290. S1473-3099(09)70066-0 [pii];10.1016/S1473-3099(09)70066-0 [doi].
22. Nelson GE, Pondo T, Toews KA, Farley MM, Lindegren ML, Lynfield R, Aragon D, Zansky SM, Watt JP, Cieslak PR, Angeles K, Harrison LH, Petit S, Beall B, Van Beneden CA (2016) Epidemiology of Invasive Group A Streptococcal Infections in the United States, 2005-2012. *Clin Infect Dis* 63: 478-486. ciw248 [pii];10.1093/cid/ciw248 [doi].
23. Carapetis JR, Beaton A, Cunningham MW, Guilherme L, Karthikeyan G, Mayosi BM, Sable C, Steer A, Wilson N, Wyber R, Zuhlke L (2016) Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat Rev Dis Primers* 2: 15084. nrdp201584 [pii];10.1038/nrdp.2015.84 [doi].
24. Cunningham MW (2016) Post-Streptococcal Autoimmune Sequelae: Rheumatic Fever and Beyond. NBK333434 [bookaccession].

25. Rodriguez-Iturbe B, Haas M (2016) Post-Streptococcal Glomerulonephritis. NBK333429 [bookaccession].
26. Bottas A, Richter MA (2002) Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS). *Pediatr Infect Dis J* 21: 67-71.
27. Doshi S, Maniar R, Banwari G (2015) Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS). *Indian J Pediatr* 82: 480-481. 10.1007/s12098-014-1641-y [doi].
28. Leonard HL, Swedo SE (2001) Paediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection (PANDAS). *Int J Neuropsychopharmacol* 4: 191-198. doi:10.1017/S1461145701002371 [doi];S1461145701002371 [pii].
29. Orefici G, Cardona F, Cox CJ, Cunningham MW (2016) Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections (PANDAS). NBK333433 [bookaccession].
30. Sims SA, Colquhoun S, Wyber R, Carapetis JR (2016) Global Disease Burden of Group A Streptococcus. NBK333415 [bookaccession].
31. Ferretti J, Kohler W (2016) History of Streptococcal Research. NBK333430 [bookaccession].
32. Patterson MJ (1996) Streptococcus. NBK7611 [bookaccession].
33. Brown JH (1937) Appearance of Double-Zone Beta Hemolytic Streptococci in Blood Agar. *J Bacteriol* 34: 35-48.
34. LANCEFIELD RC (1933) A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J Exp Med* 57: 571-595.
35. LANCEFIELD RC (1962) Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* 89: 307-313.
36. Podbielski A, Melzer B, Luttkien R (1991) Application of the polymerase chain reaction to study the M protein(-like) gene family in beta-hemolytic streptococci. *Med Microbiol Immunol* 180: 213-227.
37. Bidet P, Liguori S, Plainvert C, Bonacorsi S, Courroux C, d'Humieres C, Poyart C, Efstratiou A, Bingen E (2012) Identification of group A streptococcal emm types commonly associated with invasive infections and antimicrobial resistance by the use of multiplex PCR and high-resolution melting analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 2817-2826. 10.1007/s10096-012-1635-5 [doi].
38. Beall B, Facklam R, Thompson T (1996) Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 34: 953-958.

39. Bessen DE (2016) Molecular Basis of Serotyping and the Underlying Genetic Organization of *Streptococcus pyogenes*. NBK333428 [bookaccession].
40. Sanderson-Smith M, De Oliveira DM, Guglielmini J, McMillan DJ, Vu T, Holien JK, Henningham A, Steer AC, Bessen DE, Dale JB, Curtis N, Beall BW, Walker MJ, Parker MW, Carapetis JR, Van ML, Sriprakash KS, Smeesters PR (2014) A systematic and functional classification of *Streptococcus pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. *J Infect Dis* 210: 1325-1338. jiu260 [pii];10.1093/infdis/jiu260 [doi].
41. Mora M, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, Manetti AG, Maggi T, Taddei AR, Grandi G, Telford JL (2005) Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15641-15646. 0507808102 [pii];10.1073/pnas.0507808102 [doi].
42. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB (2003) Serum opacity factor (SOF) of *Streptococcus pyogenes* evokes antibodies that opsonize homologous and heterologous SOF-positive serotypes of group A streptococci. *Infect Immun* 71: 5097-5103.
43. Wertz JE, McGregor KF, Bessen DE (2007) Detecting key structural features within highly recombined genes. *PLoS Comput Biol* 3: e14. 1553-734X-3-1-e14 [pii];10.1371/journal.pcbi.0030014 [doi].
44. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 407-50, Table. 73/3/407 [pii];10.1128/MMBR.00014-09 [doi].
45. Brouwer S, Barnett TC, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker MJ (2016) *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. *FEBS Lett* . 10.1002/1873-3468.12254 [doi].
46. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ (1992) Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 60: 2147-2152.
47. Rohde M, Cleary PP (2016) Adhesion and invasion of *Streptococcus pyogenes* into host cells and clinical relevance of intracellular streptococci. NBK333420 [bookaccession].
48. Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115: 3861-3863.
49. Barnett TC, Scott JR (2002) Differential recognition of surface proteins in *Streptococcus pyogenes* by two sortase gene homologs. *J Bacteriol* 184: 2181-2191.
50. Scott JR, Barnett TC (2006) Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annu Rev Microbiol* 60: 397-423. 10.1146/annurev.micro.60.080805.142256 [doi].

51. Patti JM, Hook M (1994) Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* 6: 752-758.
52. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585-617. 10.1146/annurev.mi.48.100194.003101 [doi].
53. Kratovac Z, Manoharan A, Luo F, Lizano S, Bessen DE (2007) Population genetics and linkage analysis of loci within the FCT region of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 189: 1299-1310. JB.01301-06 [pii];10.1128/JB.01301-06 [doi].
54. Hanski E, Caparon M (1992) Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6172-6176.
55. Ozeri V, Tovi A, Burstein I, Natanson-Yaron S, Caparon MG, Yamada KM, Akiyama SK, Vlodavsky I, Hanski E (1996) A two-domain mechanism for group A streptococcal adherence through protein F to the extracellular matrix. *EMBO J* 15: 989-998.
56. Jaffe J, Natanson-Yaron S, Caparon MG, Hanski E (1996) Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol Microbiol* 21: 373-384.
57. Margarit I, Bonacci S, Pietrocola G, Rindi S, Ghezzi C, Bombaci M, Nardi-Dei V, Grifantini R, Speziale P, Grandi G (2009) Capturing host-pathogen interactions by protein microarrays: identification of novel streptococcal proteins binding to human fibronectin, fibrinogen, and C4BP. *FASEB J* 23: 3100-3112. fj.09-131458 [pii];10.1096/fj.09-131458 [doi].
58. Oehmcke S, Podbielski A, Kreikemeyer B (2004) Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 72: 4302-4308. 10.1128/IAI.72.7.4302-4308.2004 [doi];72/7/4302 [pii].
59. Jeng A, Sakota V, Li Z, Datta V, Beall B, Nizet V (2003) Molecular genetic analysis of a group A *Streptococcus* operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, SfbX. *J Bacteriol* 185: 1208-1217.
60. Timmer AM, Kristian SA, Datta V, Jeng A, Gillen CM, Walker MJ, Beall B, Nizet V (2006) Serum opacity factor promotes group A streptococcal epithelial cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 62: 15-25. MMI5337 [pii];10.1111/j.1365-2958.2006.05337.x [doi].
61. Xu Y, Keene DR, Bujnicki JM, Hook M, Lukomski S (2002) Streptococcal Scl1 and Scl2 proteins form collagen-like triple helices. *J Biol Chem* 277: 27312-27318. 10.1074/jbc.M201163200 [doi];M201163200 [pii].
62. Vega LA, Malke H, McIver KS (2016) Virulence-Related Transcriptional Regulators of *Streptococcus pyogenes*. NBK333412 [bookaccession].

63. Barnett TC, Scott JR (2002) Differential recognition of surface proteins in *Streptococcus pyogenes* by two sortase gene homologs. *J Bacteriol* 184: 2181-2191.
64. Fischetti VA (2016) M Protein and Other Surface Proteins on Streptococci. NBK333431 [bookaccession].
65. McArthur JD, Walker MJ (2006) Domains of group A streptococcal M protein that confer resistance to phagocytosis, opsonization and protection: implications for vaccine development. *Mol Microbiol* 59: 1-4. MMI4967 [pii];10.1111/j.1365-2958.2005.04967.x [doi].
66. Bauer S, Tapper H (2004) Membrane retrieval in neutrophils during phagocytosis: inhibition by M protein-expressing *S. pyogenes* bacteria. *J Leukoc Biol* 76: 1142-1150. 10.1189/jlb.0404260 [doi];jlb.0404260 [pii].
67. Chiang-Ni C, Wu JJ (2008) Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *J Formos Med Assoc* 107: 677-685. S0929-6646(08)60112-6 [pii];10.1016/S0929-6646(08)60112-6 [doi].
68. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715. 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697 [doi].
69. Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A (2003) Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol* 11: 224-232. S0966842X03000982 [pii].
70. Gryllos I, Tran-Winkler HJ, Cheng MF, Chung H, Bolcome R, III, Lu W, Lehrer RI, Wessels MR (2008) Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16755-16760. 0803815105 [pii];10.1073/pnas.0803815105 [doi].
71. Churchward G (2007) The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol* 64: 34-41. MMI5649 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.05649.x [doi].
72. Podbielski A, Kaufhold A, Luttkicken R (1992) [The vir-regulon of *Streptococcus pyogenes*: coordinate expression of important virulence factors]. *Immun Infekt* 20: 161-168.
73. Bessen DE, Manoharan A, Luo F, Wertz JE, Robinson DA (2005) Evolution of transcription regulatory genes is linked to niche specialization in the bacterial pathogen *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 187: 4163-4172. 187/12/4163 [pii];10.1128/JB.187.12.4163-4172.2005 [doi].
74. Hollingshead SK, Readdy TL, Yung DL, Bessen DE (1993) Structural heterogeneity of the emm gene cluster in group A streptococci. *Mol Microbiol* 8: 707-717.

75. Haanes EJ, Cleary PP (1989) Identification of a divergent M protein gene and an M protein-related gene family in *Streptococcus pyogenes* serotype 49. *J Bacteriol* 171: 6397-6408.
76. Hollingshead SK, Arnold J, Readdy TL, Bessen DE (1994) Molecular evolution of a multigene family in group A streptococci. *Mol Biol Evol* 11: 208-219.
77. Podbielski A (1993) Three different types of organization of the vir regulon in group A streptococci. *Mol Gen Genet* 237: 287-300.
78. Hondorp ER, Mclver KS (2007) The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol Microbiol* 66: 1056-1065. MMI6006 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.06006.x [doi].
79. Green NM, Zhang S, Porcella SF, Nagiec MJ, Barbian KD, Beres SB, LeFebvre RB, Musser JM (2005) Genome sequence of a serotype M28 strain of group a streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J Infect Dis* 192: 760-770. JID33878 [pii];10.1086/430618 [doi].
80. Ribardo DA, Mclver KS (2006) Defining the Mga regulon: Comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. *Mol Microbiol* 62: 491-508. MMI5381 [pii];10.1111/j.1365-2958.2006.05381.x [doi].
81. Ribardo DA, Mclver KS (2006) Defining the Mga regulon: Comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. *Mol Microbiol* 62: 491-508. MMI5381 [pii];10.1111/j.1365-2958.2006.05381.x [doi].
82. Hondorp ER, Hou SC, Hause LL, Gera K, Lee CE, Mclver KS (2013) PTS phosphorylation of Mga modulates regulon expression and virulence in the group A streptococcus. *Mol Microbiol* 88: 1176-1193. 10.1111/mmi.12250 [doi].
83. Leday TV, Gold KM, Kinkel TL, Roberts SA, Scott JR, Mclver KS (2008) TrxR, a new CovR-repressed response regulator that activates the Mga virulence regulon in group A *Streptococcus*. *Infect Immun* 76: 4659-4668. IAI.00597-08 [pii];10.1128/IAI.00597-08 [doi].
84. Almengor AC, Kinkel TL, Day SJ, Mclver KS (2007) The catabolite control protein CcpA binds to Pmga and influences expression of the virulence regulator Mga in the Group A streptococcus. *J Bacteriol* 189: 8405-8416. JB.01038-07 [pii];10.1128/JB.01038-07 [doi].
85. Beckert S, Kreikemeyer B, Podbielski A (2001) Group A streptococcal rofA gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization. *Infect Immun* 69: 534-537. 10.1128/IAI.69.1.534-537.2001 [doi].
86. Kwinn LA, Khosravi A, Aziz RK, Timmer AM, Doran KS, Kotb M, Nizet V (2007) Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus

- upstream of the streptolysin s operon in invasive M1T1 Group A Streptococcus. J Bacteriol 189: 1322-1329. JB.01256-06 [pii];10.1128/JB.01256-06 [doi].
87. Podbielski A, Woischnik M, Leonard BA, Schmidt KH (1999) Characterization of nra, a global negative regulator gene in group A streptococci. Mol Microbiol 31: 1051-1064.
88. Federle M (2012) Pathogenic streptococci speak, but what are they saying? Virulence 3: 92-94. 18652 [pii];10.4161/viru.3.1.18652 [doi].
89. Roberts SA, Churchward GG, Scott JR (2007) Unraveling the regulatory network in Streptococcus pyogenes: the global response regulator CovR represses rivR directly. J Bacteriol 189: 1459-1463. JB.01026-06 [pii];10.1128/JB.01026-06 [doi].
90. Trevino J, Liu Z, Cao TN, Ramirez-Pena E, Sumby P (2013) RivR is a negative regulator of virulence factor expression in group A Streptococcus. Infect Immun 81: 364-372. IAI.00703-12 [pii];10.1128/IAI.00703-12 [doi].
91. Roberts SA, Scott JR (2007) RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. Mol Microbiol 66: 1506-1522. MMI6015 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.06015.x [doi].
92. Gottesman S, Storz G (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. Cold Spring Harb Perspect Biol 3. cshperspect.a003798 [pii];10.1101/cshperspect.a003798 [doi].
93. Miller EW, Cao TN, Pflughoeft KJ, Sumby P (2014) RNA-mediated regulation in Gram-positive pathogens: an overview punctuated with examples from the group A Streptococcus. Mol Microbiol 94: 9-20. 10.1111/mmi.12742 [doi].
94. Rossmanith J, Narberhaus F (2016) Exploring the modular nature of riboswitches and RNA thermometers. Nucleic Acids Res 44: 5410-5423. gkw232 [pii];10.1093/nar/gkw232 [doi].
95. Krajewski SS, Narberhaus F (2014) Temperature-driven differential gene expression by RNA thermosensors. Biochim Biophys Acta 1839: 978-988. S1874-9399(14)00058-3 [pii];10.1016/j.bbagr.2014.03.006 [doi].
96. Wachter A (2014) Gene regulation by structured mRNA elements. Trends Genet 30: 172-181. S0168-9525(14)00041-9 [pii];10.1016/j.tig.2014.03.001 [doi].
97. Melamed S, Peer A, Faigenbaum-Romm R, Gatt YE, Reiss N, Bar A, Altuvia Y, Argaman L, Margalit H (2016) Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. Mol Cell 63: 884-897. S1097-2765(16)30413-0 [pii];10.1016/j.molcel.2016.07.026 [doi].

98. Cho KH, Kim JH (2015) Cis-encoded non-coding antisense RNAs in streptococci and other low GC Gram (+) bacterial pathogens. *Front Genet* 6: 110. 10.3389/fgene.2015.00110 [doi].
99. Brantl S, Bruckner R (2014) Small regulatory RNAs from low-GC Gram-positive bacteria. *RNA Biol* 11: 443-456. 28036 [pii];10.4161/rna.28036 [doi].
100. Patenge N, Billion A, Raasch P, Normann J, Wisniewska-Kucper A, Retey J, Boisguerin V, Hartsch T, Hain T, Kreikemeyer B (2012) Identification of novel growth phase- and media-dependent small non-coding RNAs in *Streptococcus pyogenes* M49 using intergenic tiling arrays. *BMC Genomics* 13: 550. 1471-2164-13-550 [pii];10.1186/1471-2164-13-550 [doi].
101. Pitman S, Cho KH (2015) The Mechanisms of Virulence Regulation by Small Noncoding RNAs in Low GC Gram-Positive Pathogens. *Int J Mol Sci* 16: 29797-29814. ijms161226194 [pii];10.3390/ijms161226194 [doi].
102. Patenge N, Pappesch R, Khani A, Kreikemeyer B (2015) Genome-wide analyses of small non-coding RNAs in streptococci. *Front Genet* 6: 189. 10.3389/fgene.2015.00189 [doi].
103. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1: e60. 10.1371/journal.pcbi.0010060 [doi].
104. Le RA, Charpentier E (2012) Small RNAs in streptococci. *RNA Biol* 9: 20104 [pii].
105. Li Z, Sledjeski DD, Kreikemeyer B, Podbielski A, Boyle MD (1999) Identification of pel, a *Streptococcus pyogenes* locus that affects both surface and secreted proteins. *J Bacteriol* 181: 6019-6027.
106. Mangold M, Siller M, Roppenser B, Vlamincx BJ, Penfound TA, Klein R, Novak R, Novick RP, Charpentier E (2004) Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol Microbiol* 53: 1515-1527. 10.1111/j.1365-2958.2004.04222.x [doi];MMI4222 [pii].
107. Perez N, Trevino J, Liu Z, Ho SC, Babitzke P, Sumby P (2009) A genome-wide analysis of small regulatory RNAs in the human pathogen group A *Streptococcus*. *PLoS One* 4: e7668.
108. Zhou Y, Hanks TS, Feng W, Li J, Liu G, Liu M, Lei B (2013) The sagA/pel locus does not regulate the expression of the M protein of the M1T1 lineage of group A *Streptococcus*. *Virulence* 4: 698-706. 26413 [pii];10.4161/viru.26413 [doi].
109. Roberts SA, Scott JR (2007) RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. *Mol*

- Microbiol 66: 1506-1522. MMI6015 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.06015.x [doi].
110. Trevino J, Liu Z, Cao TN, Ramirez-Pena E, Sumby P (2013) RivR is a negative regulator of virulence factor expression in group A Streptococcus. Infect Immun 81: 364-372. IAI.00703-12 [pii];10.1128/IAI.00703-12 [doi].
111. Kreikemeyer B, Boyle MD, Buttaro BA, Heinemann M, Podbielski A (2001) Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. Mol Microbiol 39: 392-406.
112. Ramirez-Pena E, Trevino J, Liu Z, Perez N, Sumby P (2010) The group A Streptococcus small regulatory RNA FasX enhances streptokinase activity by increasing the stability of the ska mRNA transcript. Mol Microbiol 78: 1332-1347. 10.1111/j.1365-2958.2010.07427.x [doi].
113. Liu Z, Trevino J, Ramirez-Pena E, Sumby P (2012) The small regulatory RNA FasX controls pilus expression and adherence in the human bacterial pathogen group A Streptococcus. Mol Microbiol . 10.1111/j.1365-2958.2012.08178.x [doi].
114. Danger JL, Cao TN, Cao TH, Sarkar P, Trevino J, Pflughoeft KJ, Sumby P (2015) The small regulatory RNA FasX enhances group A Streptococcus virulence and inhibits pilus expression via serotype-specific targets. Mol Microbiol 96: 249-262. 10.1111/mmi.12935 [doi].
115. Danger JL, Makthal N, Kumaraswami M, Sumby P (2015) The FasX Small Regulatory RNA Negatively Regulates the Expression of Two Fibronectin-Binding Proteins in Group A Streptococcus. J Bacteriol 197: 3720-3730. JB.00530-15 [pii];10.1128/JB.00530-15 [doi].
116. Medina E, Pieper DH (2016) Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. Curr Top Microbiol Immunol 398: 3-33. 10.1007/82_2016_492 [doi].
117. Dimopoulos G, Kollef MH, Cohen J (2016) In 2035, will all bacteria be multiresistant? Yes. Intensive Care Med 42: 2014-2016. 10.1007/s00134-016-4310-y [doi];10.1007/s00134-016-4310-y [pii].
118. Pellestor F, Paulasova P, Hamamah S (2008) Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis. Curr Pharm Des 14: 2439-2444.
119. Nielsen PE (1993) Peptide nucleic acid (PNA): a model structure for the primordial genetic material? Orig Life Evol Biosph 23: 323-327.
120. Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O (1994) Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. Bioconjug Chem 5: 3-7.

121. Shiraishi T, Nielsen PE (2011) Peptide nucleic acid (PNA) cell penetrating peptide (CPP) conjugates as carriers for cellular delivery of antisense oligomers. *Artif DNA PNA XNA* 2: 90-99.
122. Paulasova P, Pellestor F (2004) The peptide nucleic acids (PNAs): a new generation of probes for genetic and cytogenetic analyses. *Ann Genet* 47: 349-358. S0003-3995(04)00056-5 [pii];10.1016/j.anngen.2004.07.001 [doi].
123. Hatamoto M, Ohashi A, Imachi H (2010) Peptide nucleic acids (PNAs) antisense effect to bacterial growth and their application potentiality in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 397-402. 10.1007/s00253-009-2387-8 [doi].
124. Bai H, You Y, Yan H, Meng J, Xue X, Hou Z, Zhou Y, Ma X, Sang G, Luo X (2012) Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. *Biomaterials* 33: 659-667. S0142-9612(11)01151-3 [pii];10.1016/j.biomaterials.2011.09.075 [doi].
125. Dryselius R, Aswasti SK, Rajarao GK, Nielsen PE, Good L (2003) The translation start codon region is sensitive to antisense PNA inhibition in *Escherichia coli*. *Oligonucleotides* 13: 427-433. 10.1089/154545703322860753 [doi].
126. Bendifallah N, Rasmussen FW, Zachar V, Ebbesen P, Nielsen PE, Koppelhus U (2006) Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjug Chem* 17: 750-758. 10.1021/bc050283q [doi].
127. Mussbach F, Franke M, Zoch A, Schaefer B, Reissmann S (2011) Transduction of peptides and proteins into live cells by cell penetrating peptides. *J Cell Biochem* 112: 3824-3833. 10.1002/jcb.23313 [doi].
128. Trabulo S, Resina S, Simoes S, Lebleu B, Pedroso de Lima MC (2010) A non-covalent strategy combining cationic lipids and CPPs to enhance the delivery of splice correcting oligonucleotides. *J Control Release* 145: 149-158. S0168-3659(10)00226-9 [pii];10.1016/j.jconrel.2010.03.021 [doi].
129. Chao TY, Raines RT (2011) Mechanism of ribonuclease A endocytosis: analogies to cell-penetrating peptides. *Biochemistry* 50: 8374-8382. 10.1021/bi2009079 [doi].
130. Kauffman WB, Fuselier T, He J, Wimley WC (2015) Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem Sci* 40: 749-764. S0968-0004(15)00188-7 [pii];10.1016/j.tibs.2015.10.004 [doi].
131. Qian Z, Martyna A, Hard RL, Wang J, Appiah-Kubi G, Coss C, Phelps MA, Rossman JS, Pei D (2016) Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry* 55: 2601-2612. 10.1021/acs.biochem.6b00226 [doi].

132. Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278: 585-590. 10.1074/jbc.M209548200 [doi];M209548200 [pii].
133. Azhikina TL, Ignatov DV, Salina EG, Fursov MV, Kaprelyants AS (2015) Role of Small Noncoding RNAs in Bacterial Metabolism. *Biochemistry (Mosc)* 80: 1633-1646. BCM80130003 [pii];10.1134/S0006297915130015 [doi].
134. Murina VN, Nikulin AD (2015) Bacterial Small Regulatory RNAs and Hfq Protein. *Biochemistry (Mosc)* 80: 1647-1654. BCM80130033 [pii];10.1134/S0006297915130027 [doi].
135. Patenge N, Pappesch R, Krawack F, Walda C, Mraheil MA, Jacob A, Hain T, Kreikemeyer B (2013) Inhibition of Growth and Gene Expression by PNA-peptide Conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e132. mtna201362 [pii];10.1038/mtna.2013.62 [doi].
136. Sambrook, J. Fritsch E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Springs Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
137. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25: 402-408. 10.1006/meth.2001.1262 [doi];S1046-2023(01)91262-9 [pii].
138. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y (2008) Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res* 7: 731-740. 10.1021/pr700658q [doi].
139. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2: 1896-1906. nprot.2007.261 [pii];10.1038/nprot.2007.261 [doi].
140. Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JI (2009) The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* 9: 1683-1695. 10.1002/pmic.200800562 [doi].
141. Shliaha PV, Bond NJ, Gatto L, Lilley KS (2013) Effects of traveling wave ion mobility separation on data independent acquisition in proteomics studies. *J Proteome Res* 12: 2323-2339. 10.1021/pr300775k [doi].
142. Distler U, Kuharev J, Navarro P, Levin Y, Schild H, Tenzer S (2014) Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods* 11: 167-170. nmeth.2767 [pii];10.1038/nmeth.2767 [doi].

143. Kuharev J, Navarro P, Distler U, Jahn O, Tenzer S (2014) In-depth evaluation of software tools for data-independent acquisition based label-free quantification. *Proteomics* . 10.1002/pmic.201400396 [doi].
144. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ (2006) Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* 5: 144-156. M500230-MCP200 [pii];10.1074/mcp.M500230-MCP200 [doi].
145. Dunny GM, Lee LN, LeBlanc DJ (1991) Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria.
146. Caparon MG, Scott JR (1991) Genetic manipulation of pathogenic streptococci.
147. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24: 17-27.
148. Nakata M, Koller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, Kreikemeyer B (2009) Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect Immun* 77: 32-44. IAI.00772-08 [pii];10.1128/IAI.00772-08 [doi].
149. Schragger HM, Rheinwald JG, Wessels MR (1996) Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest* 98: 1954-1958. 10.1172/JCI118998 [doi].
150. Ozeri V, Rosenshine I, Mosher DF, Fassler R, Hanski E (1998) Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol* 30: 625-637.
151. Oehmcke S, Westman J, Malmstrom J, Morgelin M, Olin AI, Kreikemeyer B, Herwald H (2013) A Novel Role for Pro-Coagulant Microvesicles in the Early Host Defense against *Streptococcus pyogenes*. *Plos Pathogens* 9.
152. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D (2012) The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp* e4392. 4392 [pii];10.3791/4392 [doi].
153. Raasch P, Schmitz U, Patenge N, Vera J, Kreikemeyer B, Wolkenhauer O (2010) Non-coding RNA detection methods combined to improve usability, reproducibility and precision. *BMC Bioinformatics* 11: 491. 1471-2105-11-491 [pii];10.1186/1471-2105-11-491 [doi].
154. Kreikemeyer B, Boyle MD, Buttaro BA, Heinemann M, Podbielski A (2001) Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol Microbiol* 39: 392-406. mmi2226 [pii].

155. Weinberg Z, Wang JX, Bogue J, Yang J, Corbino K, Moy RH, Breaker RR (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biol* 11: R31. gb-2010-11-3-r31 [pii];10.1186/gb-2010-11-3-r31 [doi].
156. Tesorero RA, Yu N, Wright JO, Svencionis JP, Cheng Q, Kim JH, Cho KH (2013) Novel regulatory small RNAs in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* 8: e64021. 10.1371/journal.pone.0064021 [doi];PONE-D-13-07466 [pii].
157. Cardineau GA, Curtiss R, III (1987) Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Streptococcus mutans*. Identification of the promoter region and evidence for attenuator-like sequences preceding the structural gene. *J Biol Chem* 262: 3344-3353.
158. Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wessels MR (1996) Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* 64: 1495-1501.
159. FOLEY MJ, WOOD WB, Jr. (1959) Studies on the pathogenicity of group A streptococci. II. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. *J Exp Med* 110: 617-628.
160. Froude J, Gibofsky A, Buskirk DR, Khanna A, Zabriskie JB (1989) Cross-reactivity between streptococcus and human tissue: a model of molecular mimicry and autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 145: 5-26.
161. Crater DL, van dR, I (1995) Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci. *J Biol Chem* 270: 18452-18458.
162. Dougherty BA, van dR, I (1993) Molecular characterization of *hasB* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268: 7118-7124.
163. Lynskey NN, Goulding D, Gierula M, Turner CE, Dougan G, Edwards RJ, Sriskandan S (2013) *RocA* truncation underpins hyper-encapsulation, carriage longevity and transmissibility of serotype M18 group A streptococci. *PLoS Pathog* 9: e1003842. 10.1371/journal.ppat.1003842 [doi];PPATHOGENS-D-13-01924 [pii].
164. Ogawa T, Terao Y, Okuni H, Ninomiya K, Sakata H, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S (2011) Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb Pathog* 51: 58-68. S0882-4010(11)00061-1 [pii];10.1016/j.micpath.2011.03.009 [doi].
165. Podbielski A, Kreikemeyer B (2001) Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells--a safe place? *Lancet* 358: 3-4. S0140-6736(00)05296-X [pii];10.1016/S0140-6736(00)05296-X [doi].

166. Sela S, Neeman R, Keller N, Barzilai A (2000) Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells. J Med Microbiol 49: 499-502.
167. Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA (1988) Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 1657-1661.
168. Schrager HM, Alberti S, Cywes C, Dougherty GJ, Wessels MR (1998) Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A Streptococcus to CD44 on human keratinocytes. J Clin Invest 101: 1708-1716. 10.1172/JCI2121 [doi].
169. Staali L, Morgelin M, Bjorck L, Tapper H (2003) Streptococcus pyogenes expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. Cell Microbiol 5: 253-265. 272 [pii].
170. Busch A, Richter AS, Backofen R (2008) IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. Bioinformatics 24: 2849-2856. btn544 [pii];10.1093/bioinformatics/btn544 [doi].
171. Wright PR, Georg J, Mann M, Sorescu DA, Richter AS, Lott S, Kleinkauf R, Hess WR, Backofen R (2014) CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. Nucleic Acids Res 42: W119-W123. nar/gku359 [pii];10.1093/nar/gku359 [doi].
172. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410. 10.1016/S0022-2836(05)80360-2 [doi];S0022-2836(05)80360-2 [pii].
173. Darty K, Denise A, Ponty Y (2009) VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. Bioinformatics 25: 1974-1975. btp250 [pii];10.1093/bioinformatics/btp250 [doi].
174. Almengor AC, McIver KS (2004) Transcriptional activation of sclA by Mga requires a distal binding site in Streptococcus pyogenes. J Bacteriol 186: 7847-7857. 186/23/7847 [pii];10.1128/JB.186.23.7847-7857.2004 [doi].
175. Rasmussen M, Bjorck L (2001) Unique regulation of SclB - a novel collagen-like surface protein of Streptococcus pyogenes. Mol Microbiol 40: 1427-1438. mmi2493 [pii].
176. Ribardo DA, McIver KS (2006) Defining the Mga regulon: Comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. Mol Microbiol 62: 491-508. MMI5381 [pii];10.1111/j.1365-2958.2006.05381.x [doi].
177. Wang CH, Lin CY, Luo YH, Tsai PJ, Lin YS, Lin MT, Chuang WJ, Liu CC, Wu JJ (2005) Effects of oligopeptide permease in group a streptococcal

- infection. Infect Immun 73: 2881-2890. 73/5/2881 [pii];10.1128/IAI.73.5.2881-2890.2005 [doi].
178. van HJ (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. Nat Prod Rep 18: 503-519.
179. Ziegler A, Nervi P, Durrenberger M, Seelig J (2005) The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. Biochemistry 44: 138-148. 10.1021/bi0491604 [doi].
180. Cho KH, Wright J, Svencionis J, Kim JH (2013) The prince and the pauper: which one is real? The problem of secondary mutation during mutagenesis in *Streptococcus pyogenes*. Virulence 4: 664-665. 26767 [pii];10.4161/viru.26767 [doi].
181. Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wessels MR (1996) Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. Infect Immun 64: 1495-1501.
182. FOLEY MJ, WOOD WB, Jr. (1959) Studies on the pathogenicity of group A streptococci. II. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. J Exp Med 110: 617-628.
183. Cywes C, Stamenkovic I, Wessels MR (2000) CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. J Clin Invest 106: 995-1002. 10.1172/JCI10195 [doi].
184. Schrager HM, Alberti S, Cywes C, Dougherty GJ, Wessels MR (1998) Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. J Clin Invest 101: 1708-1716. 10.1172/JCI2121 [doi].
185. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB (2002) Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. Ann Med 34: 77-87.
186. Staali L, Morgelin M, Bjorck L, Tapper H (2003) *Streptococcus pyogenes* expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. Cell Microbiol 5: 253-265. 272 [pii].
187. McIver KS, Thurman AS, Scott JR (1999) Regulation of *mga* transcription in the group A streptococcus: specific binding of *mga* within its own promoter and evidence for a negative regulator. J Bacteriol 181: 5373-5383.
188. Ribardo DA, McIver KS (2006) Defining the Mga regulon: Comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. Mol Microbiol 62: 491-508. MMI5381 [pii];10.1111/j.1365-2958.2006.05381.x [doi].

189. Hondorp ER, McIver KS (2007) The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol Microbiol* 66: 1056-1065. MMI6006 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.06006.x [doi].
190. Sanson M, O'Neill BE, Kachroo P, Anderson JR, Flores AR, Valson C, Cantu CC, Makthal N, Karmonik C, Fittipaldi N, Kumaraswami M, Musser JM, Olsen RJ (2015) A naturally occurring single amino acid replacement in multiple gene regulator of group A Streptococcus significantly increases virulence. *Am J Pathol* 185: 462-471. S0002-9440(14)00612-9 [pii];10.1016/j.ajpath.2014.10.018 [doi].
191. Luo F, Lizano S, Banik S, Zhang H, Bessen DE (2008) Role of Mga in group A streptococcal infection at the skin epithelium. *Microb Pathog* 45: 217-224. S0882-4010(08)00081-8 [pii];10.1016/j.micpath.2008.05.009 [doi].
192. Hondorp ER, Hou SC, Hause LL, Gera K, Lee CE, McIver KS (2013) PTS phosphorylation of Mga modulates regulon expression and virulence in the group A streptococcus. *Mol Microbiol* 88: 1176-1193. 10.1111/mmi.12250 [doi].
193. Boyle MD, Raeder R, Flosdorff A, Podbielski A (1998) Role of emm and mrp genes in the virulence of group A streptococcal isolate 64/14 in a mouse model of skin infection. *J Infect Dis* 177: 991-997.
194. Nyberg P, Sakai T, Cho KH, Caparon MG, Fassler R, Bjorck L (2004) Interactions with fibronectin attenuate the virulence of Streptococcus pyogenes. *EMBO J* 23: 2166-2174. 10.1038/sj.emboj.7600214 [doi];7600214 [pii].
195. Tsai CJ, Loh JM, Proft T (2016) Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7: 214-229. 10.1080/21505594.2015.1135289 [doi].
196. Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM (2011) Virulence of serotype M3 Group A Streptococcus strains in wax worms (Galleria mellonella larvae). *Virulence* 2: 111-119. 14338 [pii].
197. Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T (2013) Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 4: 419-428. 24930 [pii];10.4161/viru.24930 [doi].
198. Griffiths-Jones S (2005) Annotating non-coding RNAs with Rfam. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 12: Unit*. 10.1002/0471250953.bi1205s9 [doi].
199. Macke TJ, Ecker DJ, Gutell RR, Gautheret D, Case DA, Sampath R (2001) RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res* 29: 4724-4735.
200. Gautheret D, Lambert A (2001) Direct RNA motif definition and identification from multiple sequence alignments using secondary structure profiles. *J Mol Biol* 313: 1003-1011. 10.1006/jmbi.2001.5102 [doi];S0022-2836(01)95102-2 [pii].

201. Ryan PA, Juncosa B (2016) Group A Streptococcal Adherence. NBK333427 [bookaccession].
202. Sperandio B, Gautier C, McGovern S, Ehrlich DS, Renault P, Martin-Verstraete I, Guedon E (2007) Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 189: 7032-7044. JB.00703-07 [pii];10.1128/JB.00703-07 [doi].
203. Le BY, Mistry P, Valdes KM, Quigley J, Kumar N, Tettelin H, McIver KS (2013) Genome-wide identification of genes required for fitness of group A *Streptococcus* in human blood. *Infect Immun* 81: 862-875. IAI.00837-12 [pii];10.1128/IAI.00837-12 [doi].
204. Vega LA, Valdes KM, Sundar GS, Belew AT, Islam E, Berge J, Curry P, Chen S, El-Sayed NM, Breton YL, McIver KS (2016) The transcriptional regulator CpsY is important for innate immune evasion in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* . IAI.00925-16 [pii];10.1128/IAI.00925-16 [doi].
205. Podbielski A, Pohl B, Woischnik M, Korner C, Schmidt KH, Rozdzinski E, Leonard BA (1996) Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (opp) and its effect on cysteine protease production. *Mol Microbiol* 21: 1087-1099.
206. Podbielski A, Leonard BA (1998) The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in the uptake of essential amino acids and affects the expression of cysteine protease. *Mol Microbiol* 28: 1323-1334.
207. Tomchick DR, Turner RJ, Switzer RL, Smith JL (1998) Adaptation of an enzyme to regulatory function: structure of *Bacillus subtilis* PyrR, a pyr RNA-binding attenuation protein and uracil phosphoribosyltransferase. *Structure* 6: 337-350. S0969-2126(98)00036-7 [pii].
208. Bonner ER, D'Elia JN, Billips BK, Switzer RL (2001) Molecular recognition of pyr mRNA by the *Bacillus subtilis* attenuation regulatory protein PyrR. *Nucleic Acids Res* 29: 4851-4865.
209. Samant S, Lee H, Ghassemi M, Chen J, Cook JL, Mankin AS, Neyfakh AA (2008) Nucleotide biosynthesis is critical for growth of bacteria in human blood. *PLoS Pathog* 4: e37. 07-PLPA-RA-0753 [pii];10.1371/journal.ppat.0040037 [doi].
210. Alajlouni RA, Seleem MN (2013) Targeting *listeria monocytogenes* rpoA and rpoD genes using peptide nucleic acids. *Nucleic Acid Ther* 23: 363-367. 10.1089/nat.2013.0426 [doi].
211. Abushahba MF, Mohammad H, Seleem MN (2016) Targeting Multidrug-resistant *Staphylococci* with an anti-rpoA Peptide Nucleic Acid Conjugated to the HIV-1 TAT Cell Penetrating Peptide. *Mol Ther Nucleic Acids* 5: e339. mtna201653 [pii];10.1038/mtna.2016.53 [doi].
212. Hunt PR (2017) The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol* 37: 50-59. 10.1002/jat.3357 [doi].

213. Lionakis MS (2011) *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2: 521-527. 18520 [pii];10.4161/viru.2.6.18520 [doi].
214. Konkel ME, Tilly K (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2: 157-166. S1286-4579(00)00272-0 [pii].
215. Smoot LM, Smoot JC, Graham MR, Somerville GA, Sturdevant DE, Migliaccio CA, Sylva GL, Musser JM (2001) Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10416-10421. 10.1073/pnas.191267598 [doi];191267598 [pii].
216. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A, Sriprakash KS, Sanderson-Smith ML, Nizet V (2014) Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A *Streptococcus*. *Clin Microbiol Rev* 27: 264-301. 27/2/264 [pii];10.1128/CMR.00101-13 [doi].
217. Barnett TC, Cole JN, Rivera-Hernandez T, Henningham A, Paton JC, Nizet V, Walker MJ (2015) Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cell Microbiol* 17: 1721-1741. 10.1111/cmi.12531 [doi].
218. Pappesch R (2012) Funktionelle Untersuchung von kleinen nicht kodierenden RNAs in der Virulenz von *Streptococcus pyogenes* nach Herstellung rekombinanter Deletionsmutanten

Anhang

Anhang 1: IntaRNA von sRNA MarS

Anhang 1: IntaRNA Ergebnisse für putative Zielstrukturen von sRNA MarS

Rang	p-Wert	fdr-Wert	Ziel	Gen
1	0,0002731	0,46126	Spy49_1814	
2	0,0006603	0,55764	Spy49_0125	
3	0,0012513	0,70451	Spy49_1673c	<i>Mga</i>
4	0,0036196	0,81466	Spy49_0999	
5	0,0039909	0,81466	Spy49_0695c	<i>mvaS2</i>
6	0,0043112	0,81466	Spy49_0036	
7	0,0053759	0,81466	Spy49_1678c	
8	0,0054887	0,81466	Spy49_1719c	<i>Csp</i>
9	0,0062691	0,81466	Spy49_1426c	<i>rpsR</i>
10	0,0064102	0,81466	Spy49_1639c	<i>nudC</i>
11	0,0067561	0,81466	Spy49_0502c	
12	0,0069456	0,81466	Spy49_0898	<i>glyA</i>
13	0,0070933	0,81466	Spy49_1173c	<i>ftsZ</i>
14	0,0072479	0,81466	Spy49_1714c	
15	0,0074619	0,81466	Spy49_0207	<i>rnpA</i>
16	0,0077173	0,81466	Spy49_0169	
17	0,0099486	0,8874	Spy49_1320c	
18	0,0102817	0,8874	Spy49_1674c	
19	0,0104459	0,8874	Spy49_1443c	
20	0,0110774	0,8874	Spy49_1578c	<i>salY</i>
21	0,0113102	0,8874	Spy49_1806	<i>hasB</i>
22	0,0119208	0,8874	Spy49_1655	
23	0,0120842	0,8874	Spy49_0144	<i>Nga</i>
24	0,0128342	0,90121	Spy49_1533c	
25	0,0141731	0,90121	Spy49_1480c	

Anhang

26	0,0152346	0,90121	Spy49_1159c	
27	0,0171043	0,90121	Spy49_0916c	
28	0,0193191	0,90121	Spy49_1700c	

Anhang 2: sRNATarget von sRNA 66

Anhang 2: sRNATarget Ergebnisse für putative Zielstrukturen von sRNA 66

Nummer	Wert	mRNA
1	1	pnP
2	1	Spy49_0292c
3	1	Spy49_1616c
4	1	atmE
5	1	Spy49_0876c
6	1	asp
7	1	Spy49_1219c
8	1	Spy49_0396
9	1	potC
10	1	clpE
11	1	Spy49_0923
12	1	cbp
13	1	nrdH
14	1	Spy49_0089
15	1	Spy49_0998c
16	1	Spy49_1113c
17	1	Spy49_1642c
18	1	Spy49_1145c
19	1	Spy49_0164
20	1	Spy49_0430c
21	1	tagH
22	1	Spy49_0725c
23	1	Spy49_0625

Anhang

24	1	Spy49_1379c
25	1	Spy49_1298c
26	1	Spy49_1344c
27	1	nagA
28	1	mvaK2
29	1	nusA
30	1	murA
31	1	Spy49_0748
32	1	Spy49_045
33	1	Spy49_045
34	1	Spy49_082
35	1	Spy49_125
36	1	atoB
37	1	Spy49_075
38	1	Spy49_1277
39	1	Spy49_127
40	1	argS
41	1	Spy49_0353
42	1	Spy49_106
43	1	Spy49_181
44	1	map
45	0.999	rpmF
46	0.999	metB
47	0.999	manM
48	0.999	Spy49_037
49	0.999	Spy49_077
50	0.999	Spy49_081
51	0.999	ntpE
52	0.999	rbgA
53	0.998	dnaK

Anhang

54	0.998	dnaA
55	0.997	luxS
56	0.997	gpsA
57	0.997	Spy49_0946
58	0.996	Spy49_083
59	0.995	rplQ
60	0.995	tmk
61	0.995	rgpBc
62	0.995	Spy49_050
63	0.995	Spy49_1193
64	0.994	acpS
65	0.994	pmi
66	0.994	dgk
67	0.994	Spy49_1321c
68	0.994	Spy49_1319
69	0.993	aroD
70	0.993	mga
71	0.992	Spy49_0201
72	0.992	Spy49_0757
73	0.991	Spy49_0182
74	0.991	Spy49_1111c
75	0.99	pepT
76	0.989	pyrE
77	0.989	Spy49_0208
78	0.989	aroE+A1:C791

Uu

Anhang 3: TargetRNA2 von sRNA 66

Anhang 3: TargetRNA2 Ergebnisse für putative Zielstrukturen von sRNA 66

Rang	Gen	Synonym	Energie	p-Wert
1	-	Spy49_0562c	-17.47	0.000

Anhang

2	-	Spy49_0741	-13.66	0.002
3	rgpEc	Spy49_0617	-13.2	0.003
4	pflD	Spy49_1697c	-12.99	0.004
5	rplN	Spy49_0057	-12.89	0.004
6	-	Spy49_1271	-12.45	0.006
7	-	Spy49_0897	-12.14	0.007
8	-	Spy49_1491c	-12.04	0.007
9	dppA	Spy49_1660	-12.02	0.007
10	-	Spy49_0729c	-11.79	0.009
11	-	Spy49_1636c	-11.13	0.013

Anhang 4: SNPs in MarS

Anhang 4: SNPs in MarS

Contig	Position	R e f	S N P	D E L	K O M			
S_contig0 00007	48087	G	A	x		missense_v ariant	mga	p.Arg232His
S_contig0 00001	79655	T	C		x	synonymous _variant	cls	p.Leu517Leu
S_contig0 00001	79657	A	T		x	missense_v ariant	cls	p.Leu517Phe
S_contig0 00001	79658	G	A		x	missense_v ariant	cls	p.Val518Ile
S_contig0 00001	79666	A	G		x	synonymous _variant	cls	p.Thr520Thr
S_contig0 00001	170646	G	A	x	x	synonymous _variant	folE	p.Thr170Thr

Anhang 5: SNPs in 66*Anhang 5: SNPs in sRNA 66*

Contig	Position	R e f	S N P	D E L	K O M			
S_contig0 00007	48002	C	T	x		missense_v ariant	mga	p.His204Tyr
S_contig0 00001	94038	G	C		x	upstream_g ene_variant	arp1	
S_contig0 00001	195204	T	A		x	synonymous _variant	lepA	p.Ile19Ile
S_contig0 00008	65523	G	A		x	missense_v ariant	polA	p.Val610Glu
S_contig0 00001	675319	A	T		x	missense_v ariant	murl	p.Trp252Ar g
S_contig0 00006	73409	G	T	x	x	stop_gained	oppA	p.Glu395*
S_contig0 00020	1092	T	G	x	x	synonymous _variant	S_01 708	p.Arg94Arg
S_contig0 00020	1208	T	C	x	x	missense_v ariant	S_01 708	p.Asn56His

Anhang 6: BLAST-Analyse der Sequenzierung von *mga* in $\Delta marS$, $\Delta marS::marS$ und dem WT

Anhang 6: Sequenzvergleich von $\Delta marS$ und $\Delta marS::marS$ mit dem WT

WT/ $\Delta marS$ mgafwl

```

Query 25      TCTCGTTTTATGAAAGATTGAA-G--AATTTTATGGTATACTTTTCCTTAATATGGTTC
81
      ||||| ||||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 8       TCTCG-TTTATGAAAGATTTGAAAGATAATTTTATGGTATACTTTTCCTTAATATGGTTC
66

Query 82      ATACGGACTTGATAAATCTATTACAAAAATAATAAAAAATTAAGATAAGGACATGAAGT
141
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 67      ATACGGACTTGATAAATCTATTACAAAAATAATAAAAAATTAAGATAAGGACATGAAGT
126

Query 142     TAATGCATGTAAGTAAATTATTTACTAGCCAACAATGGAGAGAATTGAAACTGATCTCAT
201
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 127     TAATGCATGTAAGTAAATTATTTACTAGCCAACAATGGAGAGAATTGAAACTGATCTCAT
186

Query 202     ATTTAACAGAAAACCTCAATGCTATCGGAGTTAAAGATAAGGAGCTTAGCAAGGCTCTCA
261
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 187     ATTTAACAGAAAACCTCAATGCTATCGGAGTTAAAGATAAGGAGCTTAGCAAGGCTCTCA
246

Query 262     ATATTTCCATGTTAACATTACAGTCATGCCTCACTAATATGCAGTTCATGAAAGAAGTAG
321
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 247     ATATTTCCATGTTAACATTACAGTCATGCCTCACTAATATGCAGTTCATGAAAGAAGTAG
306

Query 322     GTGGAATTACCTACAAAGACGGCTATATTAACATTTGGTATCACCAGTGTTGTGGGCTAC
381
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 307     GTGGAATTACCTACAAAGACGGCTATATTAACATTTGGTATCACCAGTGTTGTGGGCTAC
366

Query 382     AAGAGGTCTATCAAAAAGCTCTTCGAGAATCGCCTTCTTTGAAATTACTGGAGCTTTTGT
441
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 367     AAGAGGTCTATCAAAAAGCTCTTCGAGAATCGCCTTCTTTGAAATTACTGGAGCTTTTGT
426

Query 442     TTTTCAGAGACTTTAGTTCCTTAGAAGAGTTAGCTGAAGAGCTGTTTGTGAGTTTATCTA
501
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 427     TTTTCAGAGACTTTAGTTCCTTAGAAGAGTTAGCTGAAGAGCTGTTTGTGAGTTTATCTA
486

Query 502     CCCTCAAACGCCTCATCAaaaaaaCCAACACTTACTTGTCTCATACCTTTGCTATTAGTA
561
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 487     CCCTCAAACGCCTCATCAAAAAAACCAACACTTACTTGTCTCATACCTTTGCTATTAGTA
546

```

Anhang

Query	562	TCGTGACAAGTCCAGTGCAGGTATCAGGAGATGAGAGGCAAATCCGCCTGTTTTACCTCA
Sbjct	547	TCGTGACAAGTCCAGTGCAGGTATCAGGAGATGAGAGGCAAATCCGCCTGTTTTACCTCA
Query	622	AGTATTTTTTCAGAAGCCTATAAAATCTCAGAATGGCCATTTGGGGACATTTTAAACCTGA
Sbjct	607	AGTATTTTTTCAGAAGCCTATAAAATCTCAGAATGGCCATTTGGGGACATTTTAAACCTGA
Query	682	AAACTGTGAACGCCTATTGAGCTTATTGATCAAAGAAGTAGATGTCAAAGTTCATTTTA
Sbjct	667	AAACTGTGAACGCCTATTGAGCTTATTGATCAAAGAAGTAGATGTCAAAGTTCATTTTA
Query	742	CGCTATTTTCAGCACTTAAAAATCTTAAGTGGCGTTAACTTGATCCGTTACTACAAGGGGT
Sbjct	727	CGCTATTTTCAGCACTTAAAAATCTTAAGTGGCGTTAACTTGATCCGTTACTACAAGGGGT
Query	802	ATTCTTGCAGTTATAACAATaaaaaaaaCCAGTCACCGTTTTTCTCAACTTATCCAACATT
Sbjct	787	ATTCTTGCAGTTATAACAATAAAAAAACCAGTCACCGTTTTTCTCAACTTATCCAACATT
Query	862	CCTCACAAATCCAGGATCTTTCTCGCTTGTTCTACCTCAAATTTGGGTTACATCTCGACG
Sbjct	847	CCTCAGAAATCCAGGATCTTTCTCGCTTGTTCTACCTCAAATTTGGGTTACATCTCGACG
Query	922	AGTATACCATAGCTGAAATGTTTTCTAACCACCTTAACGACAAGCTAGAAATTGGCTGTG
Sbjct	907	AGTATACCATAGCTGAAATGTTTTCTAACCACCTTAACGACAAGCTAGAAATTGGCTGTG
Query	982	CTTTTGAGATTATCAGTCAGGACCCAACCTCAAGGAGGCCAGTAAAGTAACCCACTTGGA
Sbjct	967	CTTTTGAGATTATCAATCAAGACCCAACATCA-GGAGG-CAGGCAAGTAACCAAC-TGGA
Query	1042	TCCTTCTAATAAGATGACATTGAAGATCGAAGCTCCAATCTCAGAGTTCTACCAATATAA
Sbjct	1024	TCCATCTATT-AGATGAGATGGAA-ATC-AAGCTC-AATCTCAGCAT-C-ACCAATA-AA
Query	1102	TAC-AAG 1107
Sbjct	1077	TACGAAG 1083

Anhang

WT/NZ131 mgafwl

Query	26		
CTCGTTTT-ATGAAAG-ATTTG-AAGA-ATTTTATGGTATACTTTTCCTTAATATGGTTC		81	
Sbjct	1658243		
CTCGTTTTAATGAAAGAATTTGAAAGATATTTTATGGTATACTTTTCCTTAATATGGTTC		1658184	
Query	82		
ATACGGACTTGATAAATCTATTACAAAAATAATAAAAAATTAAGATAAGGACATGAAGT		141	
Sbjct	1658183		
ATACGGACTTGATAAATCTATTACAAAAATAATAAAAAATTAAGATAAGGACATGAAGT		1658124	
Query	142		
TAATGCATGTAAGTAAATTATTTACTAGCCAACAATGGAGAGAATTGAACTGATCTCAT		201	
Sbjct	1658123		
TAATGCATGTAAGTAAATTATTTACTAGCCAACAATGGAGAGAATTGAACTGATCTCAT		1658064	
Query	202		
ATTTAACAGAAAACCTCAATGCTATCGGAGTTAAAGATAAGGAGCTTAGCAAGGCTCTCA		261	
Sbjct	1658063		
ATTTAACAGAAAACCTCAATGCTATCGGAGTTAAAGATAAGGAGCTTAGCAAGGCTCTCA		1658004	
Query	262		
ATATTTCCATGTTAACATTACAGTCATGCCTCACTAATATGCAGTTCATGAAAGAAGTAG		321	
Sbjct	1658003		
ATATTTCCATGTTAACATTACAGTCATGCCTCACTAATATGCAGTTCATGAAAGAAGTAG		1657944	
Query	322		
GTGGAATTACCTACAAAGACGGCTATATTAACATTTGGTATCACCAGTGTTGTGGGCTAC		381	
Sbjct	1657943		
GTGGAATTACCTACAAAGACGGCTATATTAACATTTGGTATCACCAGTGTTGTGGGCTAC		1657884	
Query	382		
AAGAGGTCTATCAAAAAGCTCTTCGAGAATCGCCTTCTTTGAAATTACTGGAGCTTTTGT		441	
Sbjct	1657883		
AAGAGGTCTATCAAAAAGCTCTTCGAGAATCGCCTTCTTTGAAATTACTGGAGCTTTTGT		1657824	
Query	442		
TTTTCAGAGACTTTAGTTCCTTAGAAGAGTTAGCTGAAGAGCTGTTTGTCAGTTTATCTA		501	
Sbjct	1657823		
TTTTCAGAGACTTTAGTTCCTTAGAAGAGTTAGCTGAAGAGCTGTTTGTCAGTTTATCTA		1657764	
Query	502		
CCCTCAAACGCCTCATCaaaaaaaCCAACACTTACTTGTCTCATACCTTTGCTATTAGTA		561	

Anhang

```
|||||
Sbjct 1657763
CCCTCAAACGCCTCATCAAAAAACCAACACTTACTTGTCTCATACCTTTGCTATTAGTA 1657704

Query 562
TCGTGACAAGTCCAGTGCAGGTATCAGGAGATGAGAGGCAAATCCGCCTGTTTTACCTCA 621

|||||
Sbjct 1657703
TCGTGACAAGTCCAGTGCAGGTATCAGGAGATGAGAGGCAAATCCGCCTGTTTTACCTCA 1657644

Query 622
AGTATTTTTTCAGAAGCCTATAAAATCTCAGAATGGCCATTTGGGGACATTTTAAACCTGA 681

|||||
Sbjct 1657643
AGTATTTTTTCAGAAGCCTATAAAATCTCAGAATGGCCATTTGGGGACATTTTAAACCTGA 1657584

Query 682
AAAACGTGTGAACGCCTATTGAGCTTATTGATCAAAGAAGTAGATGTCAAAGTTCATTTTA 741

|||||
Sbjct 1657583
AAAACGTGTGAACGCCTATTGAGCTTATTGATCAAAGAAGTAGATGTCAAAGTTCATTTTA 1657524

Query 742
CGCTATTTTCAGCACTTAAAAATCTTAAGTGGCGTTAACTTGATCCGTTACTACAAGGGGT 801

|||||
Sbjct 1657523
CGCTATTTTCAGCACTTAAAAATCTTAAGTGGCGTCAACTTGATCCGTTACTACAAGGGGT 1657464

Query 802
ATTCTTGCAGTTATAACAATaaaaaaaCCAGTCACCGTTTTTCTCAACTTATCCAACATT 861

|||||
Sbjct 1657463
ATTCTTGCAGTTATAACAATAAAAAAACAGTCACCGTTTTTCTCAACTTATCCAACATT 1657404

Query 862
CCTCACAAATCCAGGATCTTTCTCGCTTGTTCTACCTCAAATTTGGGTTACATCTCGACG 921

|||||
Sbjct 1657403
CCTCAGAAATCCAGGATCTTTCTCGCTTGTTCTACCTCAAATTTGGGTTACATCTCGACG 1657344

Query 922
AGTATACCATAGCTGAAATGTTTTCTAACCACCTTAACGACAAGCTAGAAATTGGCTGTG 981

|||||
Sbjct 1657343
AGTATACCATAGCTGAAATGTTTTCTAACCACCTTAACGACAAGCTAGAAATTGGCTGTG 1657284

Query 982
CTTTTGAGATTATCAGTCAGGACCCAACCTCAAGGAGGCCAGTAAAGTAACCCACTTGGA 1041

|||||
Sbjct 1657283
CTTTTGAGATTATCAATCAAGACCCAACATCA-GGAGG-CAGGCAAGTAACCAACT-GGA 1657227
```

```

Query    1042
TCCTTCTAATAAGATGACATTGAAGATCGAAGCTCCAATCTCAGAGTTCTACCAATATAA   1101

||| |||| | | |||| | | || | || | |||| | |||| | | | |||| | |
Sbjct    1657226
TCCATCTATTA-GATGAGATGGAA-ATC-AAGCTC-AATCTCAGCAT-C-ACCAATA-AA   1657174

Query    1102          TAC-AAGAATTGCC   1114
          ||| |||  ||||
Sbjct    1657173      TACGAAG--TTGCC   1657162

```

WT/NZ131 mgarevII

[illegible]

Anhang

Sbjct 1656952
TATTACCTGGGAAAATAGTTTCTTAAAAGTAAATCAAAAAGATGAAAAAGTACGACTCCT 1656893

Query 427
AGTGATAGAGAGAAGTTACAATAGTGTGCGTAATTTTTTGAAAAAGTACATCGGTGAGTT 486

|||||
Sbjct 1656892
AGTGATAGAGAGAAGTTACAATAGTGTGCGTAATTTTTTGAAAAAGTACATCGGTGAGTT 1656833

Query 487
TTTCAGCATTACTAATTTTGATGAGTTAGATTGTCTGACAATTGATCTAGTAGAGATTGA 546

|||||
Sbjct 1656832
TTTCAGCATTACTAATTTTGATGAGTTAGATTGTCTGACAATTGATCTAGTAGAGATTGA 1656773

Query 547
AAAACAATACGATGTTATCGTGACAGATGTTATGGTGGGTAAAAGCGAAGAGTTAGAGAT 606

|||||
Sbjct 1656772
AAAACAATACGATGTTATCGTGACAGATGTTATGGTGGGTAAAAGCGAAGAGTTAGAGAT 1656713

Query 607
TTTCTTTTTCTACAAGATGATCCCAGAAGCTATTATTGATAGATTAAACGAATTTTTGAA 666

|||||
Sbjct 1656712
TTTCTTTTTCTACAAGATGATCCCAGAAGCTATTATTGATAGATTAAACGAATTTTTGAA 1656653

Query 667
CGTTAGTTTTCACAGATAACAACGTTATGGTCAAAAACCTCGAAGCCCCTTCCTCTTCAAA 726

|||||
Sbjct 1656652
CGTTAGTTTTCACAGATAACAACGTTATGGTCAAAAACCTCGAAGCCCCTTCCTCTTCAAA 1656593

Query 727
ATCTCATAGTGACAAAGAGGTACAAAAACCAGAAAAGCCAGACAATTCAGTTAAACAAGC 786

|||||
Sbjct 1656592
ATCTCATAGTGACAAAGAGGTACAAAAACCAGAAAAGCCAGACAATTCAGTTAAACAAGC 1656533

Query 787
AACATCATCATAGGATTTTCAGACGTCATGGTAAGaaaaaaGAATCATTTACAGCCCATA 846

|||||
Sbjct 1656532
AACATCATCATAGGATTTTCAGACGTCATGGTAAGAAAAAAGAATCATTTACAGCCCATA 1656473

Query 847 GAGGTTAAGGGTCAAAAg 864
Sbjct 1656472 GAGGT-AAGG-TCAAAAG 1656457

ΔmarS/WT mgarevII

Query 1 GGGGTACCCTTTACGACAGCTAGAATTGGCTGTGCTTTTGAGATTATCAATCAAGACCC
60
|||||

Anhang

```
Sbjct  1      GGGGTTA-CCTTTACGACAGCTAGAAATTGGCTGTGCTTTTGAGATTATCAATCAAGACCC
59

Query  61      AACATCAGGAGGCAGGCAAGTAACCAACTGGATCCATCTATTAGATGAGATGGAAATCAA
120
|||||
Sbjct  60      AACATCAGGAGGCAGGCAAGTAACCAACTGGATCCATCTATTAGATGAGATGGAAATCAA
119

Query  121     GCTCAATCTCAGCATCACCAATAAATACGAAGTTGCCGTAACCCCTCCATAACGCTTCGGT
180
|||||
Sbjct  120     GCTCAATCTCAGCATCACCAATAAATACGAAGTTGCCGTAACCCCTCCATAACGCTTCGGT
179

Query  181     GTTAGACGAAGAAGACATTACAGCCAATTATTTGCTGTTTGATTATAAAAAGAGTTACCT
240
|||||
Sbjct  180     GTTAGACGAAGAAGACATTACAGCCAATTATTTGCTGTTTGATTATAAAAAGAGTTACCT
239

Query  241     GAATTTTTTACCAAAAAGAACACCCTCGTATCTATGAGGCCTTTGTGACAAGTGTCGAGAA
300
|||||
Sbjct  240     GAATTTTTTACCAAAAAGAACACCCTCGTATCTATGAGGCCTTTGTGACAAGTGTCGAGAA
299

Query  301     GCTGATGCAGGCAGATAATGCTCAAGTTAGCAAAGAACTGATCAATCAGCTCACTTATTG
360
|||||
Sbjct  300     GCTGATGCAGGCAGATAATGCTCAAGTTAGCAAAGAACTGATCAATCAGCTCACTTATTG
359

Query  361     TTTCTTTATTACCTGGGAAAATAGTTTCTTAAAAGTAAATCAAAAAGATGAAAAAGTACG
420
|||||
Sbjct  360     TTTCTTTATTACCTGGGAAAATAGTTTCTTAAAAGTAAATCAAAAAGATGAAAAAGTACG
419

Query  421     ACTCCTAGTGATAGAGAGAAGTTACAATAGTGTCGGTAATTTTTTGAAAAAGTACATCGG
480
|||||
Sbjct  420     ACTCCTAGTGATAGAGAGAAGTTACAATAGTGTCGGTAATTTTTTGAAAAAGTACATCGG
479

Query  481     TGAGTTTTTTCAGCATTACTAATTTTGATGAGTTAGATTGTCTGACAATTGATCTAGTAGA
540
|||||
Sbjct  480     TGAGTTTTTTCAGCATTACTAATTTTGATGAGTTAGATTGTCTGACAATTGATCTAGTAGA
539

Query  541     GATTGAAAAACAATACGATGTTATCGTGACAGATGTTATGGTGGGTAAAAGCGAAGAGTT
600
|||||
Sbjct  540     GATTGAAAAACAATACGATGTTATCGTGACAGATGTTATGGTGGGTAAAAGCGAAGAGTT
599

Query  601     AGAGATTTTCTTTTTCTACAAGATGATCCCAGAAGCTATTATTGATAGATTAAACGAATT
660
|||||
Sbjct  600     AGAGATTTTCTTTTTCTACAAGATGATCCCAGAAGCTATTATTGATAGATTAAACGAATT
659
```


Anhang

Query	661	TTTGAACGTTAGTTTTCACAGATAACAACGTTATGGTCAAAAACCTCGAAGCCCCTTCCTC	
Sbjct	660	TTTGAACGTTAGTTTTCACAGATAACAACGTTATGGTCAAAAACCTCGAAGCCCCTTCCTC	
	719		
Query	721	TTCAAAATCTCATAGTGACAAAGAGGTACAAAACCAGAAAAGCCAGACAATTTCAGTTAA	
Sbjct	720	TTCAAAATCTCATAGTGACAAAGAGGTACAAAACCAGAAAAGCCAGACAATTTCAGTTAA	
	779		
Query	781	ACAAGCAACATCATCATAGGATTTTCAGACGTCATGGTAAGaaaaaaGAATCATTTACAG	
Sbjct	780	ACAAGCAACATCATCATAGGATTTTCAGACGTCATGGTAAGAAAAAAGAATCATTTACAG	
	839		
Query	841	CCCATAGAGGTTAAGGGTCAAAAggggggggggggggggggg	880
Sbjct	840	CCCATAGAGGTTAA-GGTCAAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGG	878

Anhang 7: Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Anhang 7: Durchschnittliches prozentuales Wachstum von *S. pyogenes* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen aus 6 Versuchen

Zucker	WT	<i>ΔmarS</i>	<i>ΔmarS::marS</i>
α-D-Glukose	100	100	100
N-Acetyl-D-Glucosamine	106,1867766	100,3698922	104,6112965
Trehalose	89,78727617	86,58216756	88,95421146
Mannose	39,89077092	55,8979108	44,74012538
D-Fruktose	66,23566582	70,29689688	71,15786956
Maltose	77,32722189	89,55873505	88,07884131
α-D-Lactose	32,33413553	63,18144755	41,56263832
Lactulose	0,4328569	7,784293519	2,864979444
Sukrose	79,07274672	88,42650207	98,15553515
Uridin	6,803999164	10,52926191	10,6139211
β-Methyl-D-Glucoside	28,6285642	24,43884086	24,63364214
Maltoriose	80,9535734	99,06330401	92,74693318
Schleimsäure	1,031852254	16,35989399	6,411596432
N-Acetyl-β-D-Mannosamin	18,00626906	15,76024184	17,96396654
m-Hydroxyphenyl-Essigsäure	1,627585063	6,866929157	8,651518642

Anhang

Dextrin	27,87602707	23,86893027	24,4558801
Gelantin	5,357430807	2,927135016	5,581014831
Glykogen	2,413529301	3,042852415	5,21016347
Inulin	13,41485784	11,28895047	9,721350116
Mannan	6,350707437	6,016865133	5,638903261
Pektin	18,20734234	14,57725105	17,33177584
Arbutin	16,70162538	16,08710215	16,37096198
3-0-β-D-Galactopyranosyl-D-Arabinose	16,19341666	24,71755269	20,79756546
Salicin	16,59311969	14,57406329	11,56018258
D-Glukosamin	89,41539836	90,61310872	92,48997123
2,3-Butanon	5,298813079	5,371033956	4,332555756

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Mir ist bekannt, dass gemäß Doktoranden-Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock die Promotion wegen einer Pflichtwidrigkeit (Täuschung u.ä.) für nicht bestanden erklärt werden kann.

Rostock, den _____

Unterschrift

Roberto Pappesch

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene anfertigen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. Nadja Patenge, die stets ein offenes Ohr hatte, Rat wusste und im richtigen Momenten auch schützend ihre Flügel über mich hielt. Mal mit und vor allem aber auch ohne Witz waren wir ein eingeschworenes Team mit ornithologischem und anderem kleinem oder großem Interesse an Großem! und Kleinem. Danke für alles.

Auch möchte ich Herrn Dr. habil Tomas Fiedler danken. Er war in der turbulenten Zeit der Promotion die beruhigende Verlässlichkeit und oft auch eine emotionale -ok und auch mathematische- Stütze. Thanks Daddy.

Ein herzlicher Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe und hier vor allem an die Super-TA Jana die so viel kann, weiß und hilft.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie.

Ein großer Dank richtet sich an Margery Black, denn geteiltes Leid ist halbes Leid und überhaupt lässt sich zu zweit einfach herrlich meckern, schlemmen, lachen und Spaß haben. Aus der halben Erbse ist eben doch eine große Ranke geworden, denn auch kleine Erbsen haben Potential. Auch Maike Flügge gilt ein herzlicher Dank, denn selbst wenn sie physisch nicht da ist, ist sie da.

Meiner Schwester und meiner Mutter danke ich für ihre vorbehaltlose Unterstützung und Liebe ohne die ich niemals soweit gekommen wäre. Schön, dass es euch gibt.