

**Die Rolle der nicht-phosphorylierenden  
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GapN  
im Stoffwechsel von Streptokokken und ihr Potenzial als Drug  
Target in *Streptococcus pyogenes***

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Philip Eisenberg, geb. am 04.02.1996 in Ratzeburg

aus Lübeck

Rostock, 2023

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Eisenberg P**, Albert L, Teuffel J, Zitzow E, Michaelis C, Jarick J, Sehlke C, Große L, Bader N, Nunes-Alves A, Kreikemeyer B, Schindelin H, Wade RC and Fiedler T (2022) The Non-phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase GapN Is a Potential New Drug Target in *Streptococcus pyogenes*. Front. Microbiol. 13:802427. Doi: 10.3389/fmicb.2022.802427

**Gutachter:**

PD Dr. Tomas Fiedler, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Mikrobiologie

Prof. Dr. Mirko Basen, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Prof. Dr. Hermann Schindelin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Rudolf-Virchow-Zentrum - Center for Integrative and Translational Bioimaging

**Jahr der Einreichung:** 2023

**Jahr der Verteidigung:** 2024

---

## Inhaltsverzeichnis

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Zusammenfassung.....   | 1  |
| 2     | Einleitung .....   | 2  |
| 2.1   | <i>Streptococcus pyogenes</i> .....  | 3  |
| 2.2   | NADPH-Stoffwechsel und die nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapN ..... | 6  |
| 2.3   | Untersuchungen von essenziellen Genen und deren Funktionen im Stoffwechsel .....                       | 8  |
| 2.4   | Zielbasierte und computergestützte Medikamentenentwicklung.....  | 10 |
| 2.5   | Zielstellung.....  | 11 |
| 3     | Material und Methoden.....   | 13 |
| 3.1   | Materialien .....  | 13 |
| 3.1.1 | Bakterienstämme und Plasmide.....  | 13 |
| 3.1.2 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....  | 15 |
| 3.1.3 | Geräte.....  | 15 |
| 3.2   | Medien und Lösungen.....   | 15 |
| 3.3   | Kultivierung von Bakterien.....  | 16 |
| 3.4   | Antimikrobielle Testungen .....  | 17 |
| 3.4.1 | Antimikrobielle Substanzen .....   | 17 |
| 3.4.2 | Kill Assay .....   | 21 |
| 3.5   | Molekularbiologische Methoden .....  | 22 |
| 3.5.1 | Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken .....   | 22 |
| 3.5.2 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....  | 22 |
| 3.5.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | 22 |
| 3.5.4 | Agarosegelelektrophorese .....   | 24 |
| 3.5.5 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....  | 24 |
| 3.5.6 | Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....   | 25 |
| 3.5.7 | Natriumacetat-Ethanol-Fällung von DNA.....   | 25 |
| 3.5.8 | Dephosphorylierung von DNA .....   | 25 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.5.9  | Ligation von DNA-Fragmenten.....   | 25 |
| 3.5.10 | Herstellung und Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....                  | 26 |
| 3.5.11 | Colony Fast-Screen .....   | 26 |
| 3.5.12 | Herstellung und Transformation von kompetenten <i>S. pyogenes</i> Zellen....                               | 27 |
| 3.5.13 | Sanger-Sequenzierung .....   | 27 |
| 3.6    | Proteinbiochemische Methoden .....   | 27 |
| 3.6.1  | Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....  | 27 |
| 3.6.2  | Isolierung von Proteinen .....   | 28 |
| 3.6.3  | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....  | 29 |
| 3.6.4  | Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen .....   | 30 |
| 3.6.5  | Western Blot.....  | 30 |
| 3.6.6  | Proteinkonzentrationsbestimmung .....  | 31 |
| 3.6.7  | Bestimmung von Enzymaktivitäten .....  | 31 |
| 3.7    | Statistische Analysen.....   | 31 |
| 4      | Ergebnisse.....  | 32 |
| 4.1    | GapN ist essenziell in <i>S. pyogenes</i> .....  | 32 |
| 4.2    | GapN ist die Hauptquelle für NADPH in Streptokokken, denen der oxPPP fehlt.....                            | 35 |
| 4.2.1  | Stoffwechselintermediate hemmen SpyGapN.....   | 36 |
| 4.2.2  | Konstruktion einer konditionellen GapN-Knock-out-Mutante .....   | 39 |
| 4.3    | <i>In-silico</i> -Screening putativer SpyGapN-Inhibitoren .....  | 47 |
| 4.4    | Testung putativer SpyGapN-Inhibitoren .....  | 49 |
| 4.4.1  | <i>In-vitro</i> -Untersuchung des Effekts der putativen Inhibitoren auf die SpyGapN-Aktivität.....         | 50 |
| 4.4.2  | Test der Dosisabhängigkeit von inhibierenden Substanzen .....  | 52 |
| 4.4.3  | Test der Enzymspezifität der inhibierenden Substanzen.....   | 54 |
| 4.4.4  | Effekt der inhibierenden Substanzen auf das Überleben von <i>S. pyogenes</i> und <i>S. cristatus</i> ..... | 60 |
| 4.5    | Fragmentscreening .....  | 66 |
| 5      | Diskussion .....   | 71 |

---

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 5.1   | GapN als Drug Target in <i>S. pyogenes</i> .....                          | 71  |
| 5.2   | GapN ist die Hauptquelle für NADPH in <i>S. pyogenes</i> .....            | 73  |
| 5.3   | Identifizierung von potenziellen spezifischen GapN Inhibitoren .....      | 76  |
| 5.3.1 | Potenziell spezifische Inhibitoren .....                                  | 77  |
| 5.3.2 | Metabolite als Inhibitoren .....  | 78  |
| 5.3.3 | Chemische Sonden als Inhibitoren.....                                     | 81  |
| 5.3.4 | Weitere potenzielle SpyGapN Inhibitoren als antimikrobielle Substanz .... | 83  |
| 5.3.5 | Strukturelle Vergleiche der GapN-Inhibitoren .....                        | 86  |
| 5.3.6 | Inhibitoren aus dem Fragmentscreening .....                               | 87  |
| 5.3.7 | Aktuelle Antibiotika-Entwicklung.....                                     | 88  |
| 5.3.8 | Weiterentwicklung der SpyGapN-Inhibitoren .....                           | 91  |
| 6     | Literaturverzeichnis .....  | 93  |
| 7     | Abkürzungsverzeichnis .....   | 116 |
| 8     | Tabellenverzeichnis .....   | 119 |
| 9     | Abbildungsverzeichnis.....  | 120 |
| 10    | Anhang .....  | 122 |
| 11    | Danksagung .....  | 137 |
| 12    | Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung ... | 138 |



# 1 Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *Streptococcus pyogenes* verursacht mild verlaufende Infektionen, wie zum Beispiel Pharyngitis, kann jedoch auch schwere, lebensgefährliche Infektionen, wie die nekrotisierende Faszitis, auslösen. In dieser Arbeit wird das Enzym nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GapN als neues therapeutisches Target etabliert.

GapN ist ein glykolytisches Enzym, das Glycerinaldehyd-3-Phosphat irreversibel in 3-Phosphoglycerat umwandelt und dabei  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert. Vorarbeiten haben gezeigt, dass dieses Enzym essenziell für einen Laborstamm von *S. pyogenes* ist. Mit Hilfe eines Knock-downs von *gapN* durch antisense-Peptidnukleinsäuren konnte in dieser Arbeit dieses Ergebnis für klinisch relevante Makrolid-resistente Stämme bestätigt werden. Der Knock-down führte zu einer signifikant reduzierten Lebendkeimzahl in allen getesteten Stämmen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass GapN auch für andere Streptokokken essenziell zu sein scheint, wenn diese nicht über den oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Wegs verfügen. GapN ist für diese Bakterien offenbar die Hauptquelle für NADPH. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit 32 *in silico* vorhergesagte potenzielle GapN-Inhibitoren auf ihre Eignung als neues Therapeutikum für *S. pyogenes* Infektionen getestet. Elf der getesteten Substanzen inhibierten *in vitro* die Aktivität der GapN aus *S. pyogenes*. Diese GapN-Inhibitoren zeigten zudem eine höhere inhibitorische Wirkung auf nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen als auf andere Glycerinaldehyd-3-Phosphat-bindende Enzyme. Sieben der elf GapN-Inhibitoren führten in Kill Assays zum Absterben von *S. pyogenes* und hatten somit einen antimikrobiellen Effekt. Lediglich zwei der sieben Substanzen hatten einen ähnlichen Effekt auf *Streptococcus cristatus*, einem Bakterium mit einem vollständigen Pentose-Phosphat-Weg, in dem GapN nicht essenziell ist. Diese beiden Substanzen scheinen dementsprechend über die GapN-Inhibition hinausgehende Effekte in den Bakterien zu haben und auf diese Weise antimikrobiell zu wirken. Alle GapN-Inhibitoren zeigten ihre Wirkungen jedoch erst bei hohen Wirkstoffkonzentrationen. In der sich anschließenden Weiterentwicklung der Substanzen ist es notwendig die Affinität weiter zu erhöhen, um ein geeignetes Therapeutikum zu entwickeln.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass GapN ein geeignetes therapeutisches Ziel in *S. pyogenes* ist, das bei Inhibition durch geeignete Substanzen spezifisch zum Absterben der Bakterien führt.

## 2 Einleitung

Im Jahr 1928 entdeckte Sir Alexander Fleming das erste Antibiotikum Penicillin und revolutionierte damit die Therapie von bakteriellen Infektionen (1). Im Jahr 1945 erhielt er zusammen mit Ernst B. Chain und Howard Florey für diese Entdeckung den Nobelpreis in Physiologie und Medizin. In seiner Lesung zum Nobelpreis sagte er eines der großen Probleme der heutigen Zeit voraus:

„Ich möchte jedoch eine Warnung aussprechen. [...] Es ist nicht schwer, Mikroben im Labor resistent gegen Penicillin zu machen, indem man sie Konzentrationen aussetzt, die nicht ausreichen, um sie abzutöten, und das Gleiche ist gelegentlich auch im Körper passiert.

Es könnte die Zeit kommen, in der Penicillin von jedermann in den Geschäften gekauft werden kann. Dann besteht die Gefahr, dass der Unwissende sich leicht unterdosiert und seine Mikroben durch die Exposition gegenüber nicht tödlichen Mengen des Medikaments resistent macht.“ (2)

Eine Zunahme von genau solchen Antibiotikaresistenzen bei pathogenen Bakterien wurde in den letzten Jahrzehnten beobachtet (3). Es war zwar in Deutschland möglich, für bestimmte Spezies wie z. B. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) die Infektionszahlen zu verringern, dagegen steigen Fallzahlen von Infektionen mit anderen Spezies wie z. B. Penicillin-resistenten *Streptococcus pneumoniae* und Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VRE) weiterhin (4, 5). Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien sind vor allem aus zwei Gründen ein ernstes Problem. Erstens ist die Prognose für Patienten mit einer durch multiresistente Bakterien verursachten Infektion ungünstig, da die Behandlung von solchen Infektionen schwierig oder nicht möglich ist. Die Patienten können durch solchen Infektionen Extremitäten, Organe oder auch ihr Leben verlieren. Zweitens stellen Infektionen mit multiresistenten Bakterien aufgrund der langen Krankenhausaufenthalte der Patienten und der Notwendigkeit komplexer therapeutischer Maßnahmen eine hohe finanzielle Belastung für das öffentliche Gesundheitssystem dar (6–8). Um diese Infektionen besser behandeln zu können, werden dringend neue Therapeutika benötigt. In den letzten 30 Jahren wurden keine neuen antimikrobiellen Substanzklassen zur Marktreife gebracht. Dieses Phänomen wird als „discovery void“ bezeichnet (9, 10).

Aus diesem Grund ist es dringend notwendig, neue Therapieoptionen zu finden und neue antimikrobielle Substanzen zu entwickeln. Diese sollten speziesspezifisch oder zumindest nur effektiv gegen eine kleine Gruppe von Spezies sein. Normalerweise sind Antibiotika nicht spezifisch für eine bestimmte bakterielle Spezies oder eine Familie. Daher werden bei einer antibiotischen Behandlung nicht nur die pathogenen Bakterien abgetötet, sondern auch die kommensale Flora stark beeinträchtigt (11). Antibiosen, insbesondere systemisch über einen

längeren Zeitraum, können somit zu einer Veränderung im Gleichgewicht des Mikrobioms führen, was wiederum weitere Komplikationen mit sich bringt. Ein Beispiel dafür ist die *Clostridioides difficile* assoziierte Diarrhoe (12).

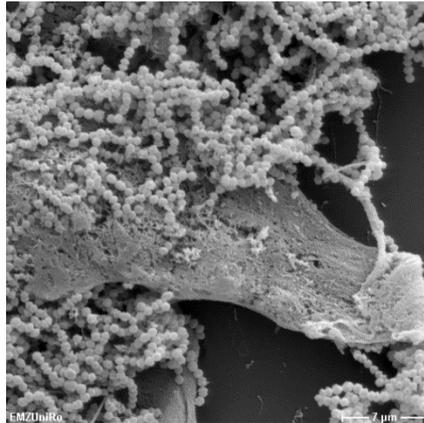
## 2.1 *Streptococcus pyogenes*

Durch *S. pyogenes* verursachte Pharyngitis und Tonsillitis sind häufige Gründe für Verschreibungen von Antibiotika außerhalb von Krankenhäusern. Schätzungen gehen von jährlich etwa 616 Millionen Fällen von *S. pyogenes* bedingter Tonsillitis/Pharyngitis weltweit aus (13). Diese Infektionen werden normalerweise peroral mit Penicillin für zehn Tage behandelt. Alternativ kann die Behandlung auch mit Makroliden (zum Beispiel Erythromycin) oder Cephalosporinen der ersten Generation für fünf bis zehn Tage erfolgen (14–16). Penicillin und seine Derivate, sowie Makrolide und Cephalosporine gehören zu den am häufigsten verschriebenen Antibiotika in Deutschland und den USA (17–20).

Obwohl eine Penicillin-Resistenz bei *S. pyogenes* noch nicht beobachtet wurde, sind in den letzten Jahren Isolate aufgetreten, die eine spezifische Mutation im Penicillin-bindenden Protein PBP2x tragen, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika führt (21–23). Solche Mutationen könnten der Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Resistenz gegen Penicillin sein (22). Im Gegensatz dazu werden regelmäßig Makrolid-resistente *S. pyogenes* Stämme von Patienten isoliert (24–28). Studien zeigen, dass bis zu 38 % der klinischen Isolate gegen das Makrolid Erythromycin resistent sind (29). Dies ist alarmierend, insbesondere im Hinblick auf Patienten, die allergisch auf Penicillin reagieren, aber auch auf Patienten mit rezidivierenden Infektionen oder bei einem Versagen der Penicillintherapie. Sowohl rezidivierende *S. pyogenes* Tonsillitiden/Pharyngitiden als auch das Therapieversagen von Penicillin sind mit einer intrazellulären Persistenz der Bakterien verbunden (30). Bei einer Penicillinallergie ist ein Wechsel hin zu Cephalosporinen nicht ohne weiteres möglich, da auch diese Substanzklasse zu den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gehört und Überempfindlichkeitsreaktionen bis hin zur Anaphylaxie auslösen kann (31). Darüber hinaus besteht bei *S. pyogenes* ein Zusammenhang zwischen Erythromycin-Resistenz und der Fähigkeit, in menschliche Atemwegszellen einzudringen (32, 33). Diese Fähigkeit zur Internalisierung von *S. pyogenes* in die Wirtszellen schützt diese vor Penicillinen, da diese nur schlecht in die Zellen gelangen (34, 35). Im „2019 Antibiotics Resistance Threat Report“ der US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention werden Erythromycin-resistente *S. pyogenes* als eine besorgniserregende Bedrohung eingestuft, die eine sorgfältige Überwachung und Präventionsmaßnahmen erfordert (24).

*S. pyogenes*, auch Gruppe A-Streptokokkus (GAS), ist ein grampositives, kokkoides Bakterium, welches Paare oder Ketten verschiedener Längen formt (Abbildung 1) (16, 36). Es gehört zum Phylum der Firmicutes, der Klasse der Bacilli, Ordnung der Lactobacillales und der Familie der Streptococcaceae (NCBI Taxonomy ID: NCBI:txid1314) (37). *S. pyogenes* ist ein aerotoleranter Anaerobier, der keine Sporen formt und nach der Klassifikation von Schottmüller (1903) und Brown (1919) eine  $\beta$ -Hämolyse bei Wachstum auf Blutagarplatten zeigt (38–40). Es ist eines der wichtigsten grampositiven Pathogene und strikt humanpathogen. Normalerweise kolonisiert *S. pyogenes* zuerst die Haut oder Mukosa der oberen Atemwege und verursacht dort lokale eitrige Entzündungen. Solche lokalen Infektionen, wie zum Beispiel Impetigo oder Tonsillitis und Pharyngitis, sind meist als milde einzustufen, können unbehandelt jedoch Autoimmunerkrankungen (rheumatisches Fieber, rheumatische Herzkrankheit, postinfektiöse Glomerulonephritis) zur Folge haben. Des Weiteren verursacht *S. pyogenes* aber auch schwere invasive, systemisch oder toxinvermittelte Krankheitsbilder, zum Beispiel Scharlach, nekrotisierende Fasziitis oder das Streptokokken-induzierte toxische Schock-Syndrom (41). Die geschätzte jährliche weltweite Belastung durch *S. pyogenes*-Erkrankungen umfasst etwa 616 Millionen Fälle von Tonsillitis/Pharyngitis, 111 Millionen Fälle von Hautinfektionen und eine halbe Million Todesfälle aufgrund schwerer Infektionen (13). Diese Schätzung wird durch neue Daten mit 1 bis 2,6 Millionen Fällen von Pharyngitis, 12.500 bis 20.000 invasiven Infektionen und 1.250 bis 1.900 Todesfällen pro Jahr allein in den USA bestätigt (24). Zudem kam es nach der COVID-19-Pandemie und dem Wegfall vieler Beschränkungen zu einer enormen Zunahme an invasiven Infektionen mit *S. pyogenes* verglichen mit der Zeit vor der Pandemie. In den Niederlanden stiegen die Fälle im Jahr 2022 um mehr als das Zweifache verglichen mit den Jahren 2016 bis 2019. In der Altersgruppe 0 bis 5 Jahre war der Anstieg mit einer Steigerung um das Siebenfache noch dramatischer (42).

Die Schwere von Krankheitsverläufen ist häufig stammabhängig, sodass zur Beurteilung der Epidemiologie von *S. pyogenes* Infektionen Veränderungen in der Prävalenz von verschiedenen *S. pyogenes* Stämme dokumentiert werden. Eine Methode zur Einteilung der Stämme ist die Serotypisierung mit Hilfe des M-Proteins (43, 44). Das M-Protein ist ein in der Membran verankerter Virulenzfaktor von *S. pyogenes* und ist unter anderem an der Adhäsion und Immunevasion der Bakterien beteiligt (45–47). Heutzutage erfolgt die Typisierung nicht mehr serologisch sondern molekularbiologisch über die Genotypisierung des für das M-Protein kodierenden Gens *emm* (48).



**Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. pyogenes* und mesenchymalen Stammzellen (49).**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *S. pyogenes*-Infektionen sehr häufig sind, bereits heute nicht immer behandelt werden können und diese Fälle in Zukunft zunehmen können. Es ist daher wichtig, neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

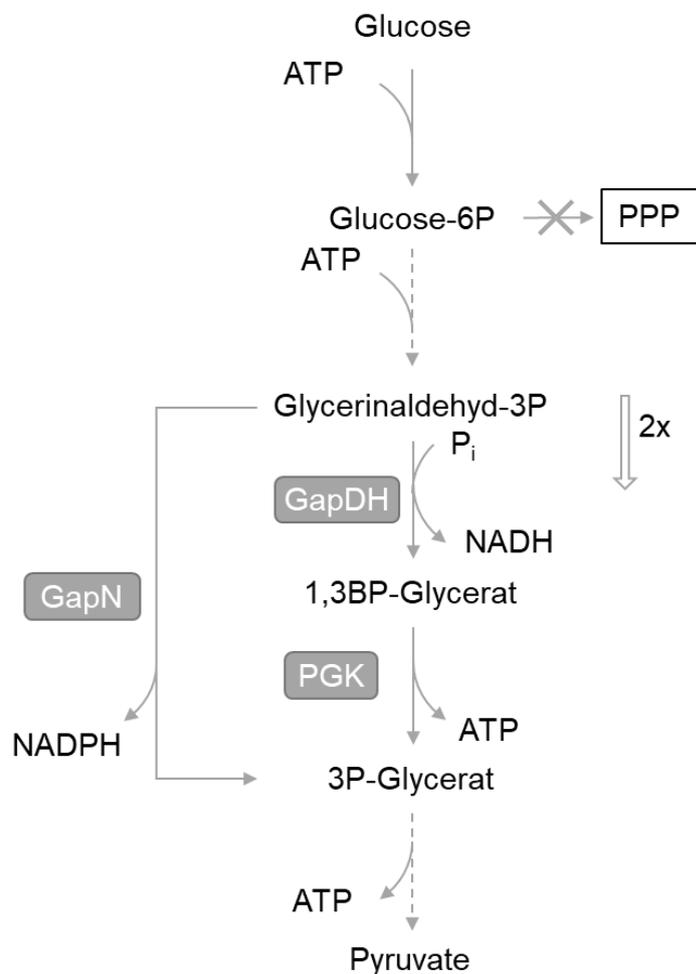
Der zentrale Stoffwechsel von Bakterien ist ein naheliegendes Ziel für antimikrobielle Substanzen. Es überrascht nicht, dass einige der derzeitigen Antibiotika in Stoffwechselprozesse eingreifen. Hierzu gehören z. B. Sulfonamide, die den Folatstoffwechsel stören. Neu zu entwickelnde antimikrobielle Substanzen sollten auf Stoffwechselprozesse abzielen, die in menschlichen Zellen nicht vorhanden oder nicht essenziell sind.

*S. pyogenes* ist ein homofermentatives Milchsäurebakterium, das bedeutet es vergärt Glucose und andere Zucker vorrangig zu Milchsäure. *S. pyogenes* verfügt weder über eine Atmungskette noch über den oxidativen Teil des Pentosephosphatweges (oxPPP). Folglich gewinnen die Bakterien Energie durch Substratkettenphosphorylierung in der Glykolyse (50–53). Der oxPPP ist in der Regel in Bakterien die Hauptquelle für NADPH (54).

NADPH spielt eine wichtige Rolle bei zellulären Elektronenübertragungsreaktionen. Dabei dient es als Donor für die reduktive Biosynthese, die Entgiftung (z. B. Cytochrom P-450), den oxidativen Schutz (z. B. Glutathion) und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (NADPH-Oxidase). Im Rahmen der reduktiven Biosynthese wird NADPH bei der Fettsäuresynthese zur Herstellung von Phospholipiden, Triacylglycerinen und Steroiden, bei der Aminosäuresynthese von z. B. Prolin und Glutamat und bei der DNA-Synthese durch Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden benötigt (55). Eine ausreichende Versorgung mit NADPH ist für Bakterien daher essenziell.

## 2.2 NADPH-Stoffwechsel und die nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapN

Ein Enzym, welches in *S. pyogenes* unabhängig vom oxPPP NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduzieren kann, ist die nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapN. GapN wandelt Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) in einer einstufigen Reaktion in 3-Phosphoglycerat um (Abbildung 2) (56). Diese Reaktion wird von der „herkömmlichen“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapDH und der Phosphoglyceratkinase (PGK) in zwei Schritten katalysiert. Im Gegensatz zu GapDH/PGK wird bei der GapN-Reaktion weder anorganisches Phosphat verbraucht noch ATP erzeugt. Außerdem hängt die GapN-Reaktion von der Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH ab, während GapDH bevorzugt NAD<sup>+</sup> als Cofaktor verwendet.



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der Lokalisation von GapN in der Glykolyse von *S. pyogenes*.** GapN – nicht phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GapDH – Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, PGK – Phosphoglyceratkinase, P<sub>i</sub> – anorganisches Phosphat, PPP – Pentosephosphatweg.

In einer früheren Arbeit deutete ein kinetisches Modell der Glykolyse von *S. pyogenes* darauf hin, dass GapN für die Aufrechterhaltung der Glykolyse unter phosphatarmen Bedingungen essenziell sein könnte. Später postulierte die Gruppe von Kevin McIver, dass *gapN* ein essenzielles Gen in *S. pyogenes* ist, da bei einem Screening einer Bibliothek mit Zehntausenden von Transposon-Mutanten von *S. pyogenes* keine Mutante gefunden wurde, die ein Transposon im *gapN*-Gen trägt (57). Da der oxPPP zur Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH in *S. pyogenes* fehlt, scheint in diesen Bakterien die GapN-vermittelte Reaktion die Hauptquelle für NADPH zu sein. Dies lässt vermuten, dass ein Mangel an NADPH die Bakterien daran hindert, in Abwesenheit von GapN zu wachsen. Bioinformatische Analysen der Genome anderer Streptokokken ergaben, dass diese typischerweise entweder Gene für GapN oder den oxPPP besitzen (Tabelle 1). Bei einer Minderheit der Spezies finden sich Gene für beide Wege, aber keinem der untersuchten Stämme fehlen sowohl Gene für GapN als auch für den oxPPP (58). Darüber hinaus konnte für GapN von *Streptococcus mutans* (SmuGapN) gezeigt werden, dass diese durch Intermediate des oxPPP gehemmt wird. Dies deutet ebenfalls auf eine Rolle von GapN im NADPH-Stoffwechsel hin (59). Für die *S. pyogenes* GapN (SpyGapN) wurde dies bisher noch nicht gezeigt (60). Iddar *et al.* haben die SpyGapN physikochemisch und katalytisch charakterisiert und konnten zeigen, dass das Enzym ein Homotetramer ist und durch Iodacetamid inhibiert wird, vermutlich aufgrund der Alkylierung einer Thiolgruppe eines für die Aktivität essenziellen Cysteins (60, 61). Analysen zur Einbindung in den Metabolismus wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 1 Vorhandensein (+) oder Fehlen (-) von GapN und oxPPP in Streptokokken-Spezies (58).

| Spezies                    | GapN | oxPPP |
|----------------------------|------|-------|
| <i>S. oralis</i>           | +    | +     |
| <i>S. pneumoniae</i>       | +    | +     |
| <i>S. sanguinis</i>        | +    | +     |
| <i>S. cristatus</i>        | +    | +     |
| <i>S. pyogenes</i>         | +    | -     |
| <i>S. agalactiae</i>       | +    | -     |
| <i>S. mutans</i>           | +    | -     |
| <i>S. thermophilus</i>     | +    | -     |
| <i>S. equi</i>             | +    | -     |
| <i>S. uberis</i>           | +    | -     |
| <i>S. parauberis</i>       | +    | -     |
| <i>S. dysgalactiae</i>     | +    | -     |
| <i>S. gallolyticus</i>     | +    | -     |
| <i>S. salivarius</i>       | +    | -     |
| <i>S. infantarius</i>      | +    | -     |
| <i>S. iniae</i>            | +    | -     |
| <i>S. anginosus</i>        | -    | +     |
| <i>S. intermedius</i>      | -    | +     |
| <i>S. macedonicus</i>      | -    | +     |
| <i>S. gordonii</i>         | -    | +     |
| <i>S. pseudopneumoniae</i> | -    | +     |
| <i>S. suis</i>             | -    | +     |
| <i>S. mitis</i>            | -    | +     |

## 2.3 Untersuchungen von essenziellen Genen und deren Funktionen im Stoffwechsel

Zur Analyse der Funktion von Genen und deren Produkten wird häufig das entsprechende Gen aus dem Genom deletiert. Die resultierende Knock-out Mutante wird dann auf phänotypische Veränderungen untersucht, mit dem Wildtyp verglichen und geprüft, ob sich die phänotypischen Veränderungen durch Komplementation mit dem deletierten Gen wieder aufheben lassen. Bei der Analyse von essenziellen Genen ist dies so nicht möglich, da ein Knock-out des Gens per Definition zum Absterben des Organismus führt. Es gibt aber verschiedene Methoden, mit denen die Transkription oder Translation entsprechender

Zielgene verändert und so die phänotypische Analyse der Auswirkungen eines Knock-downs oder Knock-outs ermöglicht werden kann.

Eine Strategie, um die physiologische Rolle von essenziellen Genen zu untersuchen, ist die Generierung einer konditionellen Knock-out-Mutante. Dies ist beispielsweise durch die Insertion eines induzierbaren Riboswitch vor dem Zielgen möglich. Mit diesem kann die Translation der Zielgen-mRNA kontrolliert werden. Riboswitches sind natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte RNA-basierte genetische Schalter, die die Regulation von Genen und Stoffwechselwegen ermöglichen. Natürlich vorkommende Riboswitches erkennen in der Regel Metabolite aus dem zu regulierenden Stoffwechselweg und ermöglichen oder verhindern durch Bindung an die Sekundärstruktur der mRNA die Expression (62). Diese Mechanismen können auch zur artifiziellen Genregulation genutzt werden. Hierzu wurden auch synthetische Riboswitches entwickelt. Topp *et al.* (2010) beschrieben einen Riboswitch, der in Abwesenheit des Induktors die Ribosomen-Bindungsstelle und das Startcodon in einer Stammstruktur der mRNA blockiert. Wenn der Induktor Theophyllin an die Aptamer-Region des Riboswitch bindet, ändert sich die Sekundärstruktur, und das Startcodon und die Ribosomen-Bindungsstelle werden freigegeben und für die Translation zugänglich (63). Die Funktion dieses theophyllinabhängigen Riboswitch E wurde bereits in *S. pyogenes* nachgewiesen und für die Analyse essenzieller Gene in dieser Spezies verwendet (57, 63).

Eine weitere Methode zur Analyse essenzieller Gene ist deren Knock-down mit verschiedenen antisense-Molekülen (64, 65). Zu diesen gehören beispielsweise Antisense-Peptidnukleinsäuren (asPNA). PNA sind Oligonukleotid-Analoga mit einem neutralen Rückgrat. Im Gegensatz zu dem (Desoxy-)Ribosephosphat-Rückgrat von DNA bzw. RNA besteht das Peptidrückgrat der PNA aus N-(2-Aminoethyl)glycin. Die Kopplung von Nukleinsäure-Basen an dieses Rückgrat ermöglicht die spezifische Bindung der PNA an DNA und RNA und blockiert die Translation bzw. Transkription durch diese Bindung. Die PNA-DNA-Bindung ist dabei sogar stärker als die DNA-DNA-Bindung, da das Peptidrückgrat ungeladen ist (66). Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung sind PNA unzugänglich für Nukleasen und Proteasen (67). Ein Problem bei der Verwendung von PNA ist allerdings, dass diese nicht ohne weiteres in die Zielzelle gelangen. Die Lösung für dieses Problem sind zellpenetrierende Peptide (cell penetrating peptide; CPP), die mit der PNA fusioniert sind. Diese ermöglichen die Aufnahme der PNA in Bakterienzellen (68, 69). Bei *S. pyogenes* wurde gezeigt, dass das (RXR)<sub>4</sub>XB-Peptid einen ausreichenden Eintritt von PNA in die Bakterien vermittelt und das Wachstum der Bakterien durch eine (RXR)<sub>4</sub>XB-gekoppelte asPNA, welche gegen das Gyrase-Untereinheit-A-Gen *gyrA* gerichtet war, inhibiert werden konnte (70–72).

Für den Laborstamm *S. pyogenes* M49 591 konnte in Vorarbeiten eine spezifische abtötende Wirkung nach Hemmung der Translation des *gapN*-Gens mit *gapN*-spezifischen (RXR)<sub>4</sub>XB-gekoppelten asPNA nachgewiesen werden (73).

Zusammengenommen deuten die genannten Vorarbeiten darauf hin, dass GapN ein geeignetes Ziel für relativ spezifische antimikrobielle Wirkstoffe für *S. pyogenes* sein könnte.

## 2.4 Zielbasierte und computergestützte Medikamentenentwicklung

Die Entwicklung neuer Medikamente ist ein zeitaufwendiger und teurer Prozess. So beträgt die durchschnittliche Dauer für die Entwicklung eines Medikaments 13,5 Jahre und kostet von der Zielidentifizierung bis zur Markteinführung ca. 1,8 Milliarden US\$ (74). Insbesondere der aufwändige Prozess des *In-vitro*-Screenings von Millionen von Substanzen mit Hilfe von Hochdurchsatzmethoden oder der kombinatorischen Chemie ist sehr teuer (75). Im Anschluss werden Substanzen mit dem gewünschten Effekt hinsichtlich ihrer Zielstruktur und ihres Wirkmechanismus analysiert und dahingehend getestet, ob sie als Medikament geeignet sind (76). Ein Ansatz zur Kostenoptimierung besteht in der Verwendung der reversen Pharmakologie bzw. zielbasierten Medikamentenentwicklung. In dieser können computergestützte Vorhersagen getroffen werden, welche Ziele einen therapeutischen Effekt haben, und ermöglichen somit zielgerichtete Screenings (76).

*In-silco*-Analysen helfen neben der Identifikation von Zielstrukturen auch in der Entwicklung von Wirkstoffen. Die computergestützte Arzneimittelentwicklung lässt sich dabei in strukturbasiertes Wirkstoffdesign, ligandenbasiertes Wirkstoffdesign und sequenzbasierte Ansätze einteilen. Die strukturbasierten Methoden des Wirkstoffdesigns beruhen auf experimentell ermittelten Strukturen des Zielmoleküls (77). Sind weder dreidimensionale Strukturen noch Ligandeninformationen verfügbar, werden sequenzbasierte Ansätze verwendet. In diesen werden Aminosäuresequenzen möglicher Zielstrukturen und Strukturdaten von kleinen Molekülen mit bioinformatischen Methoden analysiert, um mögliche Leitstrukturen zu identifizieren (78). In den letzten Jahren wurde das strukturbasierte Wirkstoffdesign immer relevanter, da die Entwicklung in den strukturbioologischen Technologien wie Kristallographie, kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) oder kryogene Elektronenmikroskopie zu einem massiven Anstieg der verfügbaren Strukturdaten führten (79–81). Auf Grundlage dieser Strukturen wird das molekulare Docking, welches die Bindungskonformation und –energie von Protein und Molekül vorhersagt, bei der strukturbasierten Arzneimittelentdeckung in großem Umfang eingesetzt (79). Diese Methode wird häufig durch die Homologiemodellierung ergänzt, die die Strukturmodellierung von Proteinen unbekannter Struktur auf Basis der Struktur von Proteinen mit ähnlicher

Aminosäuresequenz ermöglicht (82). Dies ist auch bei GapN von *S. pyogenes* der Fall. Die Struktur dieses Enzyms lag bisher nicht vor, dafür jedoch die der SmuGapN. Beide Enzyme sind auf Aminosäuresequenzebene zu 86 % identisch (58, 83). Die Kristallstrukturen der SmuGapN enthalten Homotetramere, wobei jedes Monomer sein eigenes aktives Zentrum hat (83). Auf Grundlage dieser Struktur kann mit der vorliegenden Sequenz der *S. pyogenes* GapN, sowie der Kenntnis der Liganden G3P und NADP, mittels Homologiemodellierung ein *S. pyogenes* GapN Struktur-Modell erstellt und zum *in-silico*-Screening putativer Inhibitoren verwendet werden.

## 2.5 Zielstellung

Diese Arbeit ist eingegliedert in ein Projekt, dass die nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapN von *S. pyogenes* analysiert. Dabei soll GapN als Drug Target für antimikrobielle Substanzen gegen *S. pyogenes* etabliert und spezifische Inhibitoren gefunden werden, die dann als Therapeutika weiterentwickelt werden können.

Im Vorwege dieser Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass GapN in dem Laborstamm *S. pyogenes* M49 591 essenziell ist (73). Dafür wurde die Translation der *gapN*-mRNA mittels asPNA inhibiert. Hier sollte dies auch für klinisch relevante, antibiotikaresistente Stämme von *S. pyogenes* überprüft und damit die Eignung von GapN als Drug Target verifiziert werden.

Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rebecca Wade am Heidelberger Institut für Theoretische Studien sollten *in silico* Analysen und Screenings für potenzielle Inhibitoren durchgeführt werden. Das dabei generierte Modell und die Vorhersagen des Modells sollten in der Folge mit *in-vitro*-Daten korreliert werden. Dafür sollte die *S. pyogenes* GapN in *Escherichia coli* heterolog exprimiert, isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

Für die *in silico* vorhergesagten potenziellen GapN-Inhibitoren sollte ein standardisierter Ablauf zum Testen der Substanzen etabliert werden. Hierbei sollte zunächst in einem *in-vitro*-Screening untersucht werden, ob die *in silico* vorhergesagten Substanzen die *S. pyogenes* GapN-Aktivität inhibieren. Im nächsten Schritt sollten Substanzen, die im initialen Screen inhibitorisch wirkten, *in vitro* auf Dosisabhängigkeit der Inhibition untersucht werden. Anschließend sollte für die vielversprechendsten Inhibitoren ihre Spezifität geklärt werden. Hierfür sollte der Effekt dieser Substanzen auf weitere Glycerinaldehyd-3-Phosphat-bindende Enzyme wie zum Beispiel die *S. pyogenes* GapDH sowie die GapN von *Streptococcus cristatus* analysiert werden. Außerdem sollte der Effekt der Substanzen auf das Überleben von *S. pyogenes* analysiert und gegebenenfalls Time-Kill-Kinetiken untersucht werden.

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass *S. pyogenes* GapN spezifisch für seinen Cofaktor NADPH ist (58, 84). Dies und die bioinformatischen Analysen von Eisenberg *et al.* 2022 deuten darauf hin das GapN die Hauptquelle für NADPH in *S. pyogenes* ist (58). Um dies weiter zu untersuchen, sollte zum einen eine konditionelle Knock-out Mutante von *S. pyogenes* generiert werden, in der *gapN* unter die Kontrolle des Riboswitch E (63) gestellt ist. Dies sollte eine detaillierte Analyse der Funktion von GapN im Stoffwechsel ermöglichen. Des Weiteren zeigten die bioinformatischen Analysen, dass sich die Streptokokken in verschiedene Gruppen einteilen lassen, abhängig vom Vorhandensein der GapN und des oxidativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges. Da postuliert wurde, dass GapN aufgrund seiner Rolle in der Produktion von NADPH in *S. pyogenes* essenziell ist, sollte untersucht werden, wie sich ein asPNA-basierter Knock-down von *gapN* in anderen Streptokokken mit und ohne Gene für den oxPPP auswirkt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme und deren Herkunft sind in Tabelle 2 und Tabelle 3, Plasmide in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 2 *Streptococcus pyogenes* Stämme**

| Stamm     | Infektionsart | Antibiotika-resistenz | <i>emm</i> Typ | Referenz                           |
|-----------|---------------|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| 591       | Haut          | -                     | 49             | Lütticken, R (Aachen, Deutschland) |
| HRO-K-021 | Rachen        | E, L                  | 12             | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |
| HRO-K-033 | Rachen        | E                     | 4              | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |
| HRO-K-071 | Rachen        | E, T                  | 77             | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |
| HRO-K-075 | Rachen        | E                     | 81             | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |
| HRO-K-094 | Rachen        | E                     | 1              | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |
| HRO-K-100 | Rachen        | E, T                  | 58             | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |
| HRO-K-177 | invasiv       | E, L                  | 28             | Köller <i>et al.</i> 2010 (27)     |

E – Erythromycin, L – Levofloxacin, T – Tetracyclin

**Tabelle 3 Weitere Bakterienstämme**

| Stamm   | Referenz                           |
|---|------------------------------------|
| <i>Streptococcus cristatus</i> DSM 8249                                 | DSMZ, Braunschweig                 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i><br>ATCC 12394 | ATCC, Manassa, VA, USA             |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$                                    | DSM 6897, DSMZ Braunschweig        |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)                                      | Studier und Moffatt 1986 (85)      |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pASK-IBA6_gapN                     | Michaelis 2019 (86)                |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pASK-IBA6_gapN                       | diese Arbeit                       |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pASK-IBA2-Sc-gapDH                 | Eisenberg <i>et al.</i> 2022 (58)  |
| <i>Escherichia coli</i> XL1B pASK-IBA7                                  | IBA GmbH, Göttingen<br>Deutschland |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pASK-IBA7_ScrGapN                    | diese Arbeit                       |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pSins                              | Le Breton <i>et al.</i> 2015 (57)  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pHlpK                              | Le Breton <i>et al.</i> 2015 (57)  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 pSinS_RswE-gapN                             | diese Arbeit                       |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pSF152_PRGT                        | Schröder 2017 (87)                 |

**Tabelle 4 Plasmide**

| Plasmid            | Resistenz     | Ori            | Referenz                           |
|--------------------|---------------|----------------|------------------------------------|
| pASK-IBA7          | Ampicillin    | Gram-          | IBA GmbH, Göttingen<br>Deutschland |
| pASK-IBA6_gapN     | Ampicillin    | Gram-          | Michaelis 2019 (86)                |
| pASK-IBA2-Sc-gapDH | Ampicillin    | Gram-          | Eisenberg 2022 (58)                |
| pASK-IBA7_ScrGapN  | Ampicillin    | Gram-          | Diese Arbeit                       |
| pSF152_PRGT        | Spectinomycin | Gram-          | Schröder 2017 (87)                 |
| pSinS              | Spectinomycin | Gram-, (Gram+) | Le Breton <i>et al.</i> 2015 (57)  |
| pHlpK              | Kanamycin     | Gram-, Gram+   | Le Breton <i>et al.</i> 2015 (57)  |
| pSinS_RswE-gapN    | Spectinomycin | Gram-, (Gram+) | diese Arbeit                       |

Ori – Origin of Replication, Replikationsursprung für die entsprechende Bakteriengruppe, (Gram+) – der Replikationsursprung ist unvollständig und benötigt pHlpK zum Replizieren.

### 3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Liste mit den verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang (Tabelle A 1 und Tabelle A 2).

### 3.1.3 Geräte

Die Liste der verwendeten Geräte befindet sich im Anhang (Tabelle A 3).

## 3.2 Medien und Lösungen

Für die Bakterienkultivierung wurden Todd-Hewitt-Medium mit zugesetztem Hefeextrakt (THY, Tabelle 5), Brain-Heart-Infusion Medium (BHI, Tabelle 6) und Lysogeny Broth Medium (LB, Tabelle 7) hergestellt. Zur Herstellung von Festmedium wurde zusätzlich 15 g/l Agar eingewogen. Zum Ansetzen der Medien wurden alle Feststoffe eingewogen und auf das Endvolumen mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die phosphatgepufferte Saline (PBS) wurde als zehnfachkonzentrierte Lösung angesetzt. Die Salze wurden eingewogen, in 90 % des Endvolumens deionisiertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und auf das Endvolumen mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Konzentration des einfachkonzentrierten PBS ist in Tabelle 8 angegeben. Alle Medien und Puffer wurden nach dem Herstellen für 20 min bei 121 °C und 2 bar dampfsterilisiert. Antibiotika wurden dem entsprechenden Medium gegebenenfalls nach dem Autoklavieren in Form einer sterilen Stocklösung zugegeben. Die verwendeten Antibiotika-Konzentrationen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 5 Zusammensetzung THY-Medium**

| Bestandteil       | Konzentration [g/l] |
|-------------------|---------------------|
| Todd-Hewitt Broth | 36,4                |
| Hefeextrakt       | 5                   |

**Tabelle 6 Zusammensetzung BHI-Medium**

| Bestandteil          | Konzentration [g/l] |
|----------------------|---------------------|
| Brain Heart Infusion | 37                  |

**Tabelle 7 Zusammensetzung LB-Medium**

| Bestandteil            | Konzentration [g/l] |
|------------------------|---------------------|
| LB Broth Base (Lennox) | 20                  |
| NaCl                   | 4,5                 |

**Tabelle 8 Zusammensetzung PBS**

| Bestandteil                      | Konzentration [mM] |
|----------------------------------|--------------------|
| NaCl                             | 137                |
| KCl                              | 2,7                |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2                  |

**Tabelle 9 Medien mit Antibiotikazusatz**

| Medium                 | Antibiotikum  | Antibiotikumkonzentration [ $\mu$ g/ml] |
|------------------------|---------------|---|
| LB <sub>Amp100</sub>   | Ampicillin    | 100                                     |
| LB <sub>Kn50</sub>     | Kanamycin     | 50                                      |
| LB <sub>Spec100</sub>  | Spectinomycin | 100                                     |
| THY <sub>Kn300</sub>   | Kanamycin     | 300                                     |
| THY <sub>Spec100</sub> | Spectinomycin | 100                                     |

**Tabelle 10 Medien mit Selektionszusatz**

| Medium             | Selektionszusatz | Konzentration Zusatz [mM] |
|--------------------|------------------|---------------------------|
| THY <sub>TP2</sub> | Theophyllin      | 2                         |

### 3.3 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *S. pyogenes* und *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* erfolgte in THY-Medium bei 37 °C in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre. *S. cristatus* wurde in BHI-Medium unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Kultivierung von *Escherichia coli* erfolgte in LB-Medium aerob bei 37 °C. Die Flüssigkulturen von *E. coli* wurden zusätzlich mit 180 rpm geschüttelt.

Für die kurzfristige Lagerung aller Bakterien (bis 4 Wochen) wurden diese auf Blutagarplatten (Columbia-Agar mit 5 % Schafblut) ausgestrichen, über Nacht inkubiert und anschließend

luftdicht verschlossen bei 4 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurde eine 10 ml Übernachtkultur zentrifugiert, das Bakterienpellet in 1 ml frischem Kulturmedium mit 20 % Glycerol suspendiert und bei -20 °C gelagert.

## **3.4 Antimikrobielle Testungen**

### **3.4.1 Antimikrobielle Substanzen**

#### **3.4.1.1 Peptid-Nukleinsäuren**

Alle verwendeten PNA wurden von der Firma Peps4LS GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen und waren an das zellpenetrierende Peptid (RXR)<sub>4</sub>XB (R – Arginin, X – 6-Aminohexansäure, B – β-Alanin) gekoppelt. Die in dieser Arbeit verwendeten PNA sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Alle verwendeten asPNA sind 10 Basen lang und wurden so konzipiert, dass sie an die Startcodon-Region ihres Zielgens binden. Die Kontrollen (scrambled PNA, scrPNA) wurden durch Randomisieren der Basenreihenfolge der spezifischen asPNA generiert. Jede scrPNA wurde mit dem jeweiligen Genom verglichen (Basic Local Alignment Search Tool – short sequence algorithm (88)), um sicherzustellen, dass die scrPNA nicht komplementär zur Startcodon-Region eines weiteren Gens im jeweiligen Genom ist.

PNA-Lösungen wurden bei 4 °C gelagert. Um die lyophilisierten PNA zu lösen, wurden diese in der entsprechenden Konzentration in deionisiertem Wasser aufgenommen. Danach wurden die Ansätze für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie nach Durchmischen der Lösung für 10 min auf 60 °C erhitzt wurden. Um vollständiges Lösen zu gewährleisten, wurden die Ansätze anschließend für mindestens 48 h bei 4 °C inkubiert. Bevor diese in den jeweiligen Versuchen verwendet wurden, wurden die PNA jeweils für 10 min auf 60 °C erhitzt.

Tabelle 11 Übersicht über die verwendeten PNA

| Spezies  | Zielgen               | PNA-Sequenz |
|--|-----------------------|-------------|
| <i>S. cristatus</i>                            | <i>gapN</i>           | CACGTGACAC  |
|  | <i>gyrA</i>           | CTTGCATTAA  |
|  | - ( <i>scr_gapN</i> ) | CCCCGAAAT   |
|  | - ( <i>scr_gyrA</i> ) | TAGTACTACT  |
| <i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> | <i>gapN</i>           | TTGTCAACGT  |
|  | <i>gyrA</i>           | TGCATTTAAG  |
|  | - ( <i>scr_gapN</i> ) | TCAGTCAGTT  |
|  | - ( <i>scr_gyrA</i> ) | ATTAGACTGT  |
| <i>S. pyogenes</i>                             | <i>gapN</i>           | TTGCCAACGT  |
|  | <i>gyrA</i>           | TGCATTTAAG  |
|  | - ( <i>scr_gapN</i> ) | CATGTGCTAC  |

### 3.4.1.2 Potenzielle GapN Inhibitoren

Zur Identifizierung von neuen antimikrobiellen Substanzen für *S. pyogenes* Infektionen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rebecca Wade am Heidelberger Institut für Theoretische Studien *in-silico*-Screenings für potenzielle Inhibitoren durchgeführt. Die potenziellen Inhibitoren wurden dabei so ausgewählt, dass sie in der G3P-Bindetasche binden und eine sehr hohe Bindeaffinität zu GapN aufweisen. Da G3P kein exklusives Substrat von GapN ist, wurde die Bindeaffinität der Inhibitoren zudem für weitere G3P-bindende Enzyme vorhergesagt, um auf möglichst spezifische Inhibitoren zu selektieren.

Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Eine Tabelle mit der Herkunft aller Substanzen befindet sich im Anhang (Tabelle A 2). Da für die meisten Substanzen keine Angaben zur Löslichkeit vorlagen, wurden alle Substanzen mit einer Endkonzentration von 100 mM (1-13) oder 200 mM (14-25) in 10 mM Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst. Um die Lesbarkeit zu erhöhen, werden in dieser Arbeit in der Regel die den Substanzen zugeordneten Nummern verwendet.

**Tabelle 12** Potenzielle GapN Inhibitoren, deren zugehörige Chemical Abstract Service (CAS) Nummer und ihr berechnete Bindeaffinität zu GapN

| Nr. | Substanz (IUPAC-Name)   | CAS Nr.      | Docking score [kcal/mol]       | Konzentration Stocklösung | DMSO in der Stocklösung |
|-----|---|--------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1   | [2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl]phosphonic acid  | 89873-30-3   | -7.117                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 2   | 4-oxoxolane-2-carboxylic acid   | 2056072-58-1 | -8.400                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 3   | (3 <i>R</i> )-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate   | 338-03-4     | -8.350                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 4   | 2-Sulfonatopropanoate   | 55306-57-5   | -8.102/<br>-7.667 <sup>A</sup> | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 5   | 1-hydroxycyclobutane-1,3-dicarboxylic acid  | 2228571-37-5 | -8.619                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 6   | 2-(2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)acetic acid  | 75125-23-4   | -8.046                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 7   | 6-(3,4 <i>a</i> ,5,7,8,8 <i>a</i> -hexahydro-2 <i>H</i> -pyrano[3,4- <i>b</i> ][1,4]thiazine-1-carbonyl)-2-(4-fluorophenyl)pyridazine-3,5-dione | -            | -8.030                         | 100 mM                    | 20 mM                   |
| 8   | 2-oxo-3-phosphonooxypropanoic acid  | 3913-50-6    | -9.205                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 9   | (3-hydroxy-2-oxopropyl) dihydrogen phosphate  | 57-04-5      | -8.428                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 10  | 2-hydroxy-2-methylbutanedioic acid  | 597-44-4     | -7.905                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 11  | 2-sulfanylbutanedioic acid  | 70-49-5      | -7.703                         | 100 mM                    | 10 mM                   |
| 12  | 2-[3-(1-ethyl-3,5-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrazole-4-sulfonamido)phenyl]acetic acid  | -            | -7.006                         | N/A                       | N/A                     |
| 13  | N-cyclopentylmethanesulfonyl-2-(3,4-dihydro-1 <i>H</i> -2-benzopyran-1-yl)acetamide   | -            | -7.236                         | N/A                       | N/A                     |
| 14  | 3,3-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboxylic acid  | 936-87-8     | -8.056                         | N/A                       | N/A                     |
| 15  | 1-methylcyclopropane-1,2-dicarboxylic acid  | 697-48-3     | -7.945                         | 200 mM                    | 10 mM                   |
| 16  | 5,5,5-trifluoro-4-hydroxypentanoic acid   | 2155852-33-6 | -7.869                         | 200 mM                    | 10 mM                   |
| 17  | cyclobutane-1,3-dicarboxylic acid   | 2398-16-5    | -7.782                         | 200 mM                    | 10 mM                   |
| 18  | Cyclopropane-1,2-dicarboxylate  | 1489-58-3    | -7.705                         | 200 mM                    | 10 mM                   |
| 19  | 5-oxoxolane-2-carboxylic acid   | 4344-84-7    | -7.697                         | 200 mM                    | 10 mM                   |
| 20  | (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-1-propan-2-ylcyclopropane-1,2-dicarboxylic acid   | 702-88-5     | -7.677                         | 200 mM                    | 10 mM                   |

|    |   |              |        |        |       |
|----|---|--------------|--------|--------|-------|
| 21 | 2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)acetic acid                    | 1156726-64-5 | -7.670 | 200 mM | 10 mM |
| 22 | 1,3-dioxolane-2-carboxylate                                       | 5736-05-0    | -7.667 | 200 mM | 10 mM |
| 23 | 3-methyl-2-oxo-1,3-oxazolidine-4-carboxylic acid                  | 1508932-70-4 | -7.560 | 200 mM | 10 mM |
| 24 | 3-methylsulfonylpropanoate  | 645-83-0     | -7.557 | 200 mM | 10 mM |
| 25 | 2-hydroxypentanedioic acid  | 2889-31-8    | -7.528 | 200 mM | 10 mM |
| 26 | 1,2-dihydroxyethane-1,2-disulfonate                               | 517-21-5     | -7.476 | 200 mM | 10 mM |
| 27 | 5-oxoxolane-3-carboxylic acid                                     | 498-89-5     | -7.468 | N/A    | N/A   |
| 28 | [(2R,3S)-3-methyloxiran-2-yl]-dioxido-oxo- $\lambda^5$ -phosphane | 26016-98-8   | -7.463 | N/A    | N/A   |
| 29 | (2S,3S)-2,3-dihydroxybutanedioic acid                             | 147-71-7     | -7.462 | 200 mM | 10 mM |
| 30 | 2-hydroxy-3-sulfopropanoic acid                                   | 38769-05-0   | -7.454 | N/A    | N/A   |
| 31 | 4,4,4-trifluoro-2-hydroxybutanoic acid                            | 879090-39-8  | -7.448 | 200 mM | 10 mM |
| 32 | [ethoxy(oxido)phosphoryl]formate                                  | 55920-24-6   | -7.444 | 200 mM | 10 mM |

N/A – nicht verfügbar

<sup>A</sup> Inhibitor 4 hat zwei verschiedene Isomere. Die Bindeaffinitäten sind wie folgt für die Isomere dargestellt: (S)-Isomer/(R)-Isomer.

Neben dem *in-silico*-Screening zur Identifizierung potenzieller GapN-Inhibitoren wurde eine weitere experimentelle Methode verwendet, um solche Substanzen zu finden. Dafür wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hermann Schindelin am Rudolph-Virchow-Zentrum (Würzburg) ein Fragmentscreening durchgeführt. In diesem wurden 80 Fragmentmoleküle der MiniFrag Sammlung der Firma Astex Pharmaceuticals auf ihre Bindung zu SpyGapN untersucht. Dafür wurde SpyGapN kristallisiert, die Proteinkristalle mit der Fragmentmoleküllösung getränkt und anschließend die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (89). Die dabei identifizierten Substanzen, die in der G3P- oder NADP-Bindetasche gebunden hatten und im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht wurden, sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13** Potenzielle GapN Inhibitoren aus dem Fragmentscreening, deren zugehörige Chemical Abstract Service Nummer und die Bindetasche in der die Substanz nachgewiesen wurde

| Nr. | Substanz (IUPAC-Name)                      | CAS Nr.     | Ort der Bindung |
|-----|--|-------------|-----------------|
| R16 | 2-cyanoacetamide                           | 107-91-5    | G3P             |
| R40 | imidazolidine-2,4-dione                    | 461-72-3    | NADP, G3P       |
| R65 | pyrimidin-5-amine                          | 591-55-9    | NADP            |
| R76 | 1 <i>H</i> -pyridazin-4-one; hydrochloride | 116008-72-1 | NADP            |

### 3.4.2 Kill Assay

#### 3.4.2.1 PNA Kill Assay

Kill Assays mit PNA erfolgten grundsätzlich nach dem von Barkowsky *et al.* (70) publizierten Protokoll für *S. pyogenes*, mit leichten Modifikationen für die Untersuchung von *S. cristatus* und *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. Es wurden Über-Nacht-Kulturen der Bakterien 1:2000 in PBS mit 20 % BHI (*S. pyogenes*), 15 % BHI (*S. cristatus*) oder 10 % BHI (*S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*) auf eine Lebendkeimzahl von  $\sim 10^5$  CFU/ml verdünnt. Die zehnfach konzentrierte PNA-Lösung oder Wasser als Kontrolle wurden anschließend 1:10 in der hergestellten Bakteriensuspension verdünnt und für 6 h bei 37 °C und 7 rpm im Rotator inkubiert. Anschließend wurde die Lebendkeimzahl durch Ausplattieren serieller Verdünnungsreihen auf THY- oder BHI-Agarplatten bestimmt.

#### 3.4.2.2 Kill Assay und Time Kill Assay mit GapN-Inhibitoren

Zur Beurteilung der Eignung von GapN-Inhibitoren als potenzielles Therapeutikum wurden Kill Assays mit den Substanzen durchgeführt. Für Kill Assays mit GapN-Inhibitoren wurde das für die PNA-Testung etablierte Protokoll modifiziert. THY- oder BHI-Übernachtskulturen von *S. pyogenes* und *S. cristatus* wurden in einer Tricin-Puffersalzlösung (TricBS; 137 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 50 mM Tricin, 22 mM NaOH pH 8,0) mit entweder 20 % (v/v) BHI (*S. pyogenes*) oder 15 % BHI (*S. cristatus*) auf  $10^5$  CFU/ml verdünnt. Die zehnfach konzentrierten Lösungen der Testsubstanzen oder die der DMSO-Kontrolle wurden im Verhältnis 1:10 mit der Bakteriensuspension verdünnt und 6 h lang bei 37 °C und 7 rpm in einem Rotator inkubiert. Bei Inhibitorstocklösungen, welche nur eine fünffache Konzentration hatten, bestand der Reaktionsansatz aus 20 % Inhibitorlösung, 35 % TricBS/BHI-Gemisch und 45 % Bakterienkultur mit  $2 \times 10^5$  CFU/ml. Anschließend wurden die Keimzahlen durch Ausplattieren serieller Verdünnungsreihen auf THY- oder BHI-Agarplatten bestimmt. Für Substanzen, die Effekte in den Kill Assays zeigten, wurde eine Kinetik des Kill Assays aufgenommen. Diese

Time Kill Assays erfolgten nach demselben Protokoll wie die Kill Assays, wobei die Lebendkeimzahl über 8 h alle 2 h bestimmt wurde.

### **3.5 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.5.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken**

Zur Isolierung bakterieller chromosomaler DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Bakterien wurden dafür über Nacht in 10 ml des entsprechenden Mediums kultiviert und im Anschluss für 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für die DNA-Isolierung verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Protokoll für grampositive Bakterien.

#### **3.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Bakterien wurden dafür über Nacht in 5-10 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikumkonzentration kultiviert und im Anschluss für 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für die Plasmid-Isolierung verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben ohne den optionalen Waschschrift mit Puffer PB.

#### **3.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

##### **3.5.3.1 Primer**

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Kaneka Eurogentec S. A. (Seraing, Belgien) bezogen und sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14 Oligonukleotide

| Primername      | Orientierung | Sequenz (5'→3')             |
|-----------------|--------------|-----------------------------|
| M13rev          | reverse      | GAGCGGATAACAATTTACACAGG     |
| 10SpgapN_214sR  | reverse      | CAATAGTTGCCTCCATC           |
| 10SpgapN_198iR  | reverse      | GGAAAGCTTCTGCTAGTAACAAAC    |
| 10SpPgapN_199xF | forward      | CCGAATTCTTTTTTGCTAGC        |
| 10XXpSinS_269sF | forward      | GCCAGGGTTTTCCCAGTC          |
| 10XXpSinS_270sR | reverse      | GCGGATAACAATTTACACAGG       |
| 10XXpHlpK_279xF | forward      | CCCTTTATACCGGCTGTCC         |
| 10XXpHlpK_280xR | reverse      | CCATAGATACGCCCAAACCTC       |
| 10SpgapN_281sR  | reverse      | GTTGCCTCCATCTGTATAGA        |
| 10ScgapN_331eR  | reverse      | GGCCATGGTTATTTACATCAAAC     |
| 10ScgapN_335eF  | forward      | CCCGAATTCAAGCAATATAAGAACTAC |
| IBA_for         | forward      | GAGTTATTTTACCACTCCCT        |
| IBA_rev         | reverse      | CGCAGTAGCGGTAAACG           |

### 3.5.3.2 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt 1x Phusion™ HF Buffer, 200 µM je dNTP, 0,4 µM je Primer und 0,02 U/µl Polymerase. Die DNA-Template-Konzentration variierte abhängig von der Ausgangs-DNA zwischen 0,2-4 pg/µl (Plasmid-DNA) und 0,1-2 ng/µl (chromosomale DNA). Die PCR lief nach dem in Tabelle 15 dargestellten Programm mit in der Regel 35 Zyklen von Schritt 2-4 ab. Nach Ablauf der PCR wurde der Erfolg mit einer Agarosegelelektrophorese (3.5.4) untersucht.

Tabelle 15 Standard-PCR Programmablauf

| Schritt | Beschreibung         | Temperatur | Zeit    |
|---------|----------------------|------------|---------|
| 1       | Denaturierung        | 98 °C      | 3 min   |
| 2       | Denaturierung        | 98 °C      | 10 s    |
| 3       | Primerhybridisierung | X °C       | 30 s    |
| 4       | Elongation           | 72 °C      | 15 s/kb |
| 5       | Elongation           | 72 °C      | 5 min   |
| 6       | Kühlung              | 4 °C       | ∞       |

X – Die Annealing-Temperatur richtete sich nach dem verwendeten Primer und entsprach der geringeren der beiden Schmelztemperaturen.

### 3.5.3.3 Kolonie-PCR

Die schnelle Analyse von Stämmen (*E. coli* und *S. pyogenes*) mit rekombinanten Plasmiden erfolgte mittels Kolonie PCR mit der *Taq*-Polymerase (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Hierfür wurde etwas Koloniematerial der zu untersuchenden Bakterien in 20 µl deionisiertem Wasser suspendiert und 10 min inkubiert. Diese Suspension wurde mit der Reaktionslösung gemischt, sodass sie folgende Endkonzentrationen hatte: 1x CoralLoad PCR Buffer, 200 µM je dNTP, 0,4 µM je Primer, 2,5 mU *Taq*-Polymerase und 10 % v/v Bakteriensuspension. Die PCR lief nach dem in Tabelle 16 dargestellten Programm mit in der Regel 35 Zyklen von Schritt 2-4 ab. Nach Ablauf der PCR wurden die PCR-Produkte mit einer Agarosegelelektrophorese (3.5.4) untersucht.

**Tabelle 16 Kolonie-PCR Programm**

| Schritt | Beschreibung         | Temperatur | Zeit    |
|---------|----------------------|------------|---------|
| 1       | Denaturierung        | 94 °C      | 5 min   |
| 2       | Denaturierung        | 94 °C      | 30 s    |
| 3       | Primerhybridisierung | X °C       | 30 s    |
| 4       | Elongation           | 72 °C      | 60 s/kb |
| 5       | Elongation           | 72 °C      | 5       |
| 6       | Kühlung              | 4 °C       | ∞       |

X – Die Annealing-Temperatur richtete sich nach dem verwendeten Primer und entsprach der geringeren der beiden Schmelztemperaturen.

### 3.5.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden Gele mit der Agarosekonzentration 1 % w/v in 1x TAE (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig) mit den DNA-Proben befüllt. Diese wurden zuvor mit 0,2 Vol. TriTrack DNA Loading Dye (6x) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemischt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 90 V für 60 min. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 5 min in einem Ethidiumbromidbad (1,5 µg/ml) gefärbt und im Imaging System UVP ChemStudio PLUS (Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland) dokumentiert.

### 3.5.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte im Mikrovolumenphotometer (PicoDrop, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Dafür wurde die

Absorption bei 260 nm gemessen, wobei eine Absorption von 1 bei dsDNA 50 ng/μl und bei RNA 33 ng/μl entspricht. Reine Nukleinsäureproben sollten zudem ein Verhältnis der Absorptionen  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  von 1,8-2,0 haben.

### **3.5.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Um definierte DNA-Fragmente in Plasmide zu integrieren, wurden die PCR-Produkte und Plasmide mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Alle verwendeten Enzyme waren FastDigest Restriktionsenzyme (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Nach der Restriktion wurden die Enzyme, wenn möglich, hitzeinaktiviert, oder eine DNA-Fällung (3.5.7) durchgeführt.

### **3.5.7 Natriumacetat-Ethanol-Fällung von DNA**

Um DNA aus Lösungen zu isolieren, wurde diese darin gefällt. Dafür wurde die Ausgangslösung mit 0,1 Vol. Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 %, eiskalt) gemischt. Nach einer mindestens 60-minütigen Inkubation bei -20 °C wurde die DNA für 30 min bei 20.000 x g und 4 °C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit Ethanol (70 %, eiskalt) gewaschen, erneut für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert, getrocknet und in dem gewünschten Volumen deionisiertem Wasser gelöst.

### **3.5.8 Dephosphorylierung von DNA**

Um die Religation linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern, wurde diese mit Hilfe der rAPid alkaline phosphatase (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland) an ihrem 5'-Ende dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben.

### **3.5.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Verbindung von passenden Enden von Nukleinsäuren wurde die T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Der Ligationsansatz wurde dabei nach Herstellerangaben angesetzt, wobei standardmäßig 50 ng linearisierter Vektor sowie das DNA-Insert im dreifachen molaren Überschuss in das Reaktionsgemisch gegeben wurden. Die Ligation erfolgte bei 16 °C für 16 h mit anschließender Hitzeinaktivierung.

### 3.5.10 Herstellung und Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* Zellen

Um eine künstliche Kompetenz bei *E. coli* zu erzeugen, wurden *E. coli* Zellen auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde verwendet um 5 ml LB-Medium zu inokulieren. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser Übernachtskultur inokuliert und anschließend bei 37 °C und 180 rpm bis in die exponentielle Phase ( $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ ) kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 5 min auf Eis abgekühlt, 5 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet anschließend in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,8) vorsichtig suspendiert. Nach 90 min Inkubation auf Eis wurde die Kultur 5 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % v/v Glycerol, pH 8,0 (KOH)) vorsichtig suspendiert. Die Zellen wurden anschließend direkt für die Transformation verwendet, oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli* Zellen mit rekombinanten Plasmiden erfolgte mittels Hitzeschock. Dafür wurden entweder 10 µl Ligationsansatz oder 100-250 ng Plasmid mit 100 µl kompetenten Zellen gemischt. Nach 20 min auf Eis wurde der Ansatz für 90 s bei 42 °C inkubiert und anschließend mit 500 µl SOC-Medium (2 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose) (90) gemischt. Die Regeneration der Zellen erfolgte im Thermomixer (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) für 1 h bei 37 °C und 750 rpm. Anschließend wurden 20-100 µl der Kultur auf LB-Agar mit dem jeweiligen selektiven Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.5.11 Colony Fast-Screen

Zum schnellen Nachweis von Plasmid-DNA und deren initialer Analyse wurde ein Colony Fast-Screen durchgeführt. Dafür wurde Koloniematerial des zu analysierenden Stammes in 50 µl 10 mM EDTA pH 8,5 suspendiert. Anschließend wurden 50 µl Cracking-Puffer (20 % w/v Saccharose, 0,5 % w/v SDS, 115 mM NaOH) zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 70 °C erhitzt. Nachdem die Lösung auf Eis abgekühlt war, wurde sie mit 2 µl 3 M KCl/0,25 % Bromphenolblau gemischt, weitere 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zur Analyse wurden 10 µl des Überstands mit einer Agarosegelelektrophorese (3.5.4) untersucht.

### 3.5.12 Herstellung und Transformation von kompetenten *S. pyogenes* Zellen

Um eine künstliche Kompetenz bei *S. pyogenes* zu erzeugen, wurden 10 ml THY/20 mM Glycin mit *S. pyogenes* inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 30 ml THY/20 % Glycin wurden dann 1:10 mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> = 0,2-0,3 wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 3.800 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet zweimal mit 30 ml eiskaltem PBS und anschließend zweimal mit 30 ml eiskalter 0,3 M Glucose-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in 500 µl 0,3 M Glucose-Lösung suspendiert und direkt für die Transformation verwendet.

Für die Transformation von *S. pyogenes* wurden 150 µl Zellsuspension mit 1 µg Plasmid DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation mittels Elektroporation. Dafür wurde die Zell-Plasmid-DNA-Suspension in eine kalte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) überführt und bei 1750 V elektroporiert. Direkt danach wurde 1 ml THY/0,125 M Saccharose in die Küvette gegeben, die Suspension in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 2-5 h bei 37 °C regeneriert. Nach der Regeneration wurden die Zellen für 10 min bei 2.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 500 µl THY-Medium suspendiert und 100 µl Suspension auf THY-Agarplatten mit entsprechendem selektiven Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte anaerob für 3 Tage bei 37 °C.

### 3.5.13 Sanger-Sequenzierung

Zur detaillierten Analyse rekombinanter Plasmide und gentechnisch modifizierter Stämme wurden die Plasmide und PCR-Produkte der relevanten Regionen mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierung wurde dafür bei der Firma Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben.

## 3.6 Proteinbiochemische Methoden

### 3.6.1 Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli* wurden 500 ml LB-Medium mit Zusatz des jeweils selektiven Antibiotikums mit 25 ml einer Vorkultur des rekombinanten *E. coli* Stamms inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer OD<sub>600 nm</sub> von etwa 0,4 wurde die Expression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 0,2 mg/l) induziert. Die Zellen wurden nach Schütteln über Nacht bei 22 °C geerntet (Zentrifugation: 10 min, 4.000 x g) und die Pellets bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung, ob die Induktion erfolgreich

war, wurde je 1 ml Kultur vor der Induktion und nach der Über-Nacht-Inkubation genommen, pelletiert (1 min, 17.900 x g), in 50 µl 5x SDS-Probenpuffer (312,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 10 % w/v SDS, 50 % v/v Glycerol, 0,05 % w/v Bromphenolblau) suspendiert und bei -20 °C bis zur SDS-PAGE (3.6.3) gelagert.

### **3.6.2 Isolierung von Proteinen**

Nach der heterologen Produktion von Proteinen in *E. coli* wurden diese mittels Affinitätschromatographie aus den Zellrohextrakten isoliert. Dafür wurde das Zellpellet in 5 ml Puffer W (100 mM TRIS-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) suspendiert und mit Hilfe der FastPrep-Methode und Glasskügeln (Ø 0,1 – 0,11 mm) zu einem Rohextrakt verarbeitet. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte im Precellys 24 Homogenisator (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) für zweimal 30 s bei 6.500 rpm, wobei die Rohextrakte zwischen den Zyklen auf Eis gekühlt wurden. Die Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation für 10 min bei 17.900 x g und 4 °C entfernt und der Überstand für die Affinitätschromatographie verwendet. Diese erfolgte entweder per Hand mittels Gravity-Flow-Chromatographie (3.6.2.1) oder automatisiert mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC, 3.6.2.2).

#### **3.6.2.1 Gravity-Flow-Affinitätschromatographie**

Für die Gravity-Flow-Affinitätschromatographie wurde eine Säule mit 2 ml Strep-Tactin Sepharose (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland) befüllt und diese mit 5 ml Puffer W äquilibriert. Danach wurde das Proteinrohextrakt (3.6.2) aufgetragen, die Säule mit 15 Säulenvolumen (SV) Puffer W (pH 8,0) gewaschen und das Protein in sechs Fraktionen mit je 0,5 SV Puffer E (Puffer W + 10 mM Desthiobiotin) eluiert. Die Säule wurde im Anschluss mit dreimal 5 SV Puffer R (Puffer W + 1 mM 4'-Hydroxyazobenzol-2-Carbonsäure) regeneriert und nach Auswaschen der 4'-Hydroxyazobenzol-2-Carbonsäure mit Puffer W (pH 10,5) in Puffer W (pH 8,0) bei 4 °C gelagert.

#### **3.6.2.2 Fast Protein Liquid Chromatography**

Zunächst wurde das Proteinrohextrakt (3.6.2) für 5 min bei 17.900 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die FPLC eingesetzt. Für die FPLC wurde die ÄKTA start (Cytiva, Marlborough, MA, USA) sowie die Strep-Tactin® Superflow® high capacity cartridge 1 ml (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet. Bei der Chromatographie wurde eine Flussrate von 1 ml/min verwendet. Nach Äquilibrierung der Säule mit 5 SV Puffer W (pH 8,0)

wurde das Proteinrohextrakt auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 10 SV Puffer W (pH 8,0) wurde das Protein mit 6 SV Puffer E (Puffer W (pH 8,0) + 2,5 mM Desthiobiotin) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Die Elution der Proteine von der Säule wurde über die Messung der Absorption des Eluats bei 280 nm überwacht. Die Sammlung der Elutionsfraktionen wurde beim Überschreiten der  $OD_{280\text{ nm}}$  von 20 mAU gestartet und bei einer Unterschreitung von 15 mAU beendet. Die Säule wurde im Anschluss mit 15 SV Puffer R regeneriert und nach Waschen mit 7 SV Puffer W (pH 10,5) und 12 SV Puffer W (pH 8,0) im Kühlschrank gelagert.

### 3.6.2.3 Dialyse und Ultrafiltration

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde die Proteinprobe in einen Dialyseschlauch (Molecular Weight Cut-Off (MWCO) 12-14 kDa) transferiert und über Nacht in dem 200-fachen Probenvolumen von 0,1 M Zitronensäure pH 6,0 (GapN) oder PBS (GapDH) bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurden die Proben in Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 30 kDa) bei  $3.345 \times g$  und 4 °C zentrifugiert und auf ein Endvolumen von ca. 250 µl eingengt. Die Lagerung der Proteinlösung erfolgte nach Schockfrostern in flüssigem Stickstoff in Aliquots bei -20 °C.

### 3.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung und Analyse von Proteinproben wurde die SDS-PAGE durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12-prozentige Gele (375 mM TRIS (pH 8,8), 12 % w/v Acrylamid, 0,1 % w/v SDS, 0,1 % w/v Ammoniumperoxodisulfat, 0,1 % v/v N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) überschichtet mit 4-prozentigen Sammelgelen (126 mM TRIS (pH 6,8), 4 % w/v Acrylamid, 0,1 % w/v SDS, 0,003 % w/v Bromphenolblau, 0,12 % w/v Ammoniumperoxodisulfat, 0,12 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) verwendet. APS und TEMED wurden als letztes hinzugegeben, um die Polymerisation zu starten. Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit dem SDS-Probenpuffer (312,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 10 % w/v SDS, 50 % v/v Glycerol, 0,05 % w/v Bromphenolblau) gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden dann in zuvor hergestellte SDS-Gele geladen, die in einer Mini-PROTEAN® -Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit 1x SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, 0,1 % w/v SDS, 200 mM Glycin) platziert wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel für etwa 1-1,5 h durchgeführt. Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet.

### 3.6.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Färbung aller Proteine im Polyacrylamidgel wurde dieses dreimal in einer Mikrowelle erhitzt, bis das Wasser fast gekocht hat. Nach jedem Erhitzen wurde das Gel für 3 min schüttelnd in dem Wasser inkubiert, bevor dieses durch neues ersetzt wurde. Im Anschluss wurde das Gel in die Coomassie-Färbelösung (0,008 % Coomassie Brilliant Blue G250, 36 mM HCl) gelegt und erneut erhitzt bis die Färbelösung fast kochte. Nach einer mindestens fünfminütigen, schüttelnden Inkubation in der erhitzten Färbelösung wurde die Färbelösung durch Wasser ersetzt. Die Entfärbung des Gels erfolgte bei Raumtemperatur in Wasser auf einem Schüttler unter Zugabe von einem Labortuch, welches den überschüssigen Farbstoff absorbierte. Das Gel wurde anschließend im Imaging System UVP ChemStudio PLUS (Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland) dokumentiert.

### 3.6.5 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden die in der SDS-PAGE (3.6.3) aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese für 15 min im Semidry-Puffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol) äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde in Ethanol aktiviert und dann ebenfalls im Semidry-Puffer äquilibriert. Danach wurden auf der Anode einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) zwei Lagen feuchtes Whatmanpapier, die Membran, das Gel und dann nochmals zwei Lagen Whatmanpapier platziert. Das Gerät wurde mit der Kathode verschlossen und die Proteine für 30 min bei 15 V auf die Membran übertragen.

Der Nachweis des Strep-Tag II erfolgte im Anschluss mit dem Strep-Tactin AP Conjugate (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland). Dafür wurde die Membran nach erfolgtem Western Blot mit 1 % w/v Magermilchpulver in PBS für 30 min geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurde die Membran mit Strep-Tactin AP Conjugate (1:4000 verdünnt in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die mit dem Strep-Tag II markierten Proteine durch Inkubation der Membran in 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ Nitroblautetrazoliumchlorid sichtbar gemacht. Nach Abstoppen der Reaktion durch Spülen mit Wasser wurde die Membran im Imaging System UVP ChemStudio PLUS (Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland) dokumentiert.

### 3.6.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Qubit™ Protein Broad Range (BR) Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) gemessen. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.6.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### 3.6.7.1 GapN

Die spezifische GapN-Aktivität wurde gemessen wie in Iddar *et al.* (60) beschrieben. Das Protokoll wurde in dieser Arbeit wie folgt modifiziert: Die Reaktionslösung enthielt 50 mM Tricin-Puffer (pH 8,5), 0,5 mM Dithiothreitol, 10 mM NADP<sup>+</sup>, 2 mM DL-G3P, 10 mM Zitronensäure (pH 6,0) und 50 nM Protein. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 200 µl und die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DL-G3P gestartet und die Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH durch Messung der Absorption bei 340 nm in einem Mikroplattenreader für bis zu 60 min detektiert. Als Kontrolle wurde der Test ohne Zugabe der Proteinprobe bzw. ohne Zugabe von G3P durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde in Units pro Milligramm Protein berechnet, wobei eine Unit als Umsatz von 1 µmol G3P pro Minute definiert wurde. Dies entspricht 16,67 Nanokatal.

#### 3.6.7.2 GapDH

Die spezifische GapDH-Aktivität wurde gemessen, wie in Iddar *et al.* (60) beschrieben. Das Protokoll wurde in dieser Arbeit wie folgt modifiziert: Die Reaktionslösung enthielt 50 mM Tricin-Puffer (pH 8,5), 0,5 mM Dithiothreitol, 10 mM NAD<sup>+</sup>, 10 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 2 mM DL-G3P, 3,425 mM NaCl, 67,5 µM KCl, 250 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 50 nM Protein. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 200 µl und die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DL-G3P gestartet. Die Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH wurde durch Messung der Absorption bei 340 nm in einem Mikroplattenreader für bis zu 60 min gemessen. Als Kontrolle wurde der Test ohne Zugabe der Proteinprobe bzw. ohne Zugabe von G3P durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte analog zu GapN.

## 3.7 Statistische Analysen

Die Anzahl der biologischen Wiederholungen (n) und die zur Bestimmung der statistischen Signifikanz verwendeten Tests sind in den jeweiligen Bildunterschriften angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, MA, USA) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 GapN ist essenziell in *S. pyogenes*

NADPH ist ein essenzieller Co-Faktor für viele anabole Reaktionen und wird in den meisten Organismen im oxPPP durch Reduktion von NADP<sup>+</sup> generiert. Da *S. pyogenes* der oxPPP fehlt, scheint in diesen Bakterien GapN das zentrale NADP<sup>+</sup>-reduzierende Enzym zu sein. In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass bei dem Laborstamm *S. pyogenes* M49 591 durch einen *gapN*-Knock-down mittels asPNA die Lebendkeimzahl signifikant und konzentrationsabhängig reduziert wird (73).

Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse auch bei antibiotikaresistenten klinischen *S. pyogenes* Isolaten reproduzieren lassen. Es wurden sieben Makrolid-resistente Stämme verschiedener *emm*-Typen (Tabelle 2) ausgewählt und mit diesen Stämmen Kill Assays mit GapN-spezifischen asPNA durchgeführt (3.4.2.1). Die Bakterien wurden dafür auf 10<sup>5</sup> CFU/ml eingestellt und für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden asPNA bzw. als Kontrolle mit der scrPNA inkubiert. Im Anschluss wurde die Lebendkeimzahl bestimmt. Bei allen sieben getesteten Stämmen konnte dabei eine Reduktion der Lebendkeimzahl nach Behandlung mit *gapN*-asPNA nachgewiesen werden (Abbildung 4). Auch die scrPNA reduzierte die Lebendkeimzahl im Vergleich zur komplett unbehandelten Kontrolle. Dies zeigt, dass das für den Membrantransport an die PNA gekoppelte CPP (RXR)<sub>4</sub>XB selbst einen cytotoxischen Effekt auf *S. pyogenes* hat. Bei den Stämmen HRO-K-094 und HRO-K-100 war ab einer Konzentration von 2 µM die Lebendkeimzahl nach Behandlung mit asPNA signifikant geringer als in der scrPNA-behandelten Kontrolle. Bei HRO-K-075 war dies ab einer PNA-Konzentration von 4 µM der Fall, für alle anderen getesteten Stämme ab einer Konzentration von 3 µM. Bei dem Laborstamm M49 591 war bereits bei Behandlung mit 1 µM der Effekt der asPNA signifikant höher als der der scrPNA (73). Bei der höchsten getesteten Konzentration von 5 µM war die Lebendkeimzahl nach asPNA-Behandlung bei allen getesteten Stämmen um ein bis zwei Log-Stufen niedriger als nach scrPNA-Behandlung.

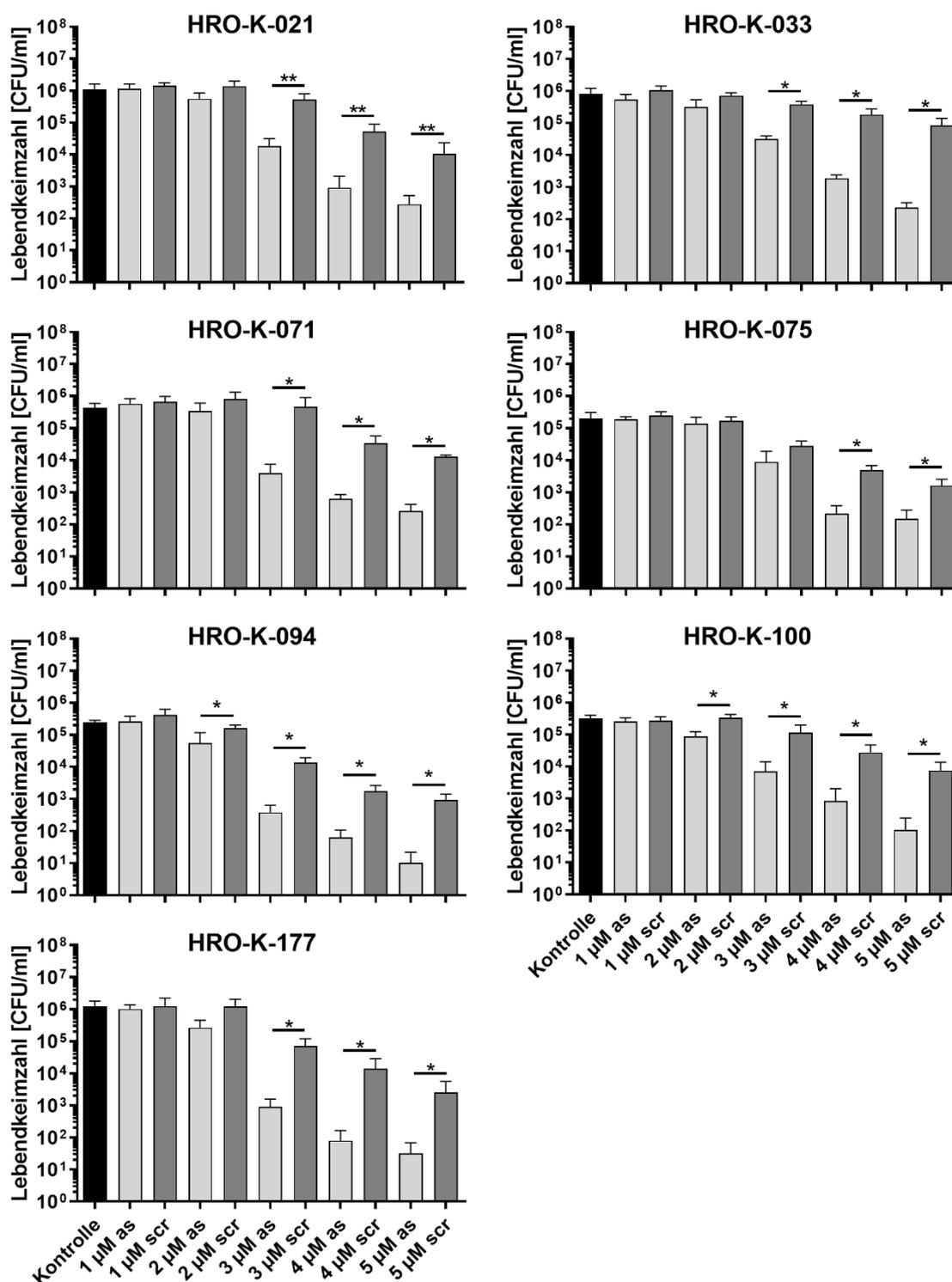
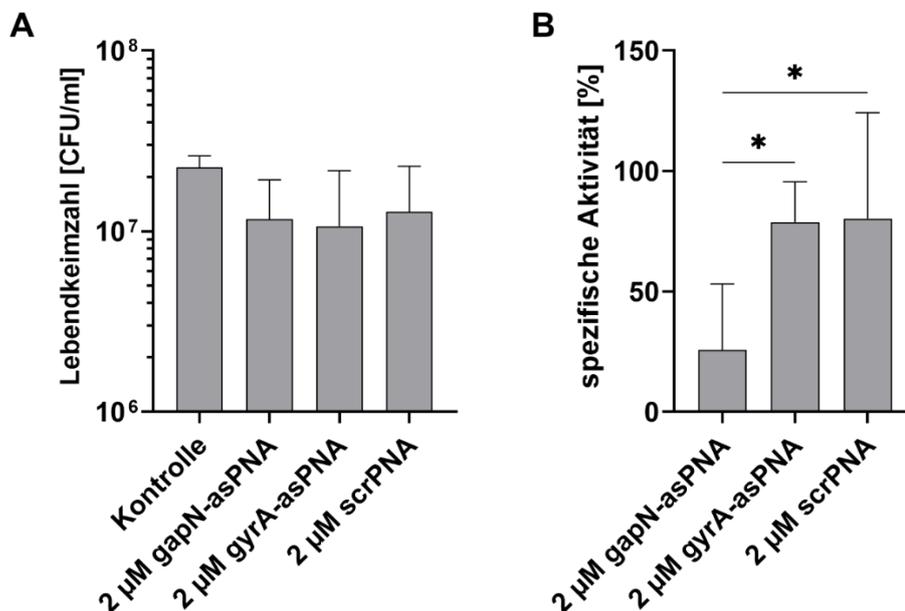


Abbildung 3. Überleben verschiedener klinischer *S. pyogenes*-Stämme nach 6 h-Inkubation mit  $(RXR)_4XB$ -gapN-asPNA und  $(RXR)_4XB$ -gapN-scrPNA. Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n = 5$  (HRO-K021) oder  $n = 4$  (alle anderen Stämme), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney U-Test (Abbildung modifiziert aus Eisenberg *et al.* 2022 (58)).

Um zu bestätigen, dass die Behandlung von *S. pyogenes* mit *gapN*-spezifischen asPNA tatsächlich zu einem Knock-down von *gapN* führt, sollte die spezifische Enzymaktivität von GapN in Proteinrohextrakten von mit den entsprechenden PNA inkubierten Bakterien bestimmt werden. Hierfür wurde der Laborstamm M49 591 verwendet. Als Kontrollen dienten die gegen das essenzielle Gen *gyrA* gerichtete *gyrA*-asPNA sowie die scrambled Kontrolle *gapN*-scrPNA. Um genügend Protein für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von GapN nach 6 h Behandlung der Bakterien mit den PNA zu erhalten, wurde der PNA Kill Assay (3.4.2.1) modifiziert. So wurde eine zehnfach höhere Ausgangslebendkeimzahl ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) verwendet. Die Behandlung erfolgte zudem mit unter diesen Bedingungen subletalen Konzentrationen der PNA von  $2 \mu\text{M}$ , die entsprechend keine signifikante Reduktion der Lebendkeimzahl zur Folge hatte (Abbildung 4A). In Proteinextrakten der mit  $2 \mu\text{M}$  *gapN*-asPNA behandelten Bakterien war die GapN Aktivität um ca. 75 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringert (Abbildung 4B). Die Kontroll-Behandlungen der Bakterien mit der *gyrA*-asPNA sowie der *gapN*-scrPNA reduzierten dagegen die GapN-Aktivität in den Proteinrohextrakten signifikant weniger stark um nur ca. 25 %. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass der asPNA-basierte Knock-down von *gapN* spezifisch die GapN-Aktivität in den Bakterien verringert.



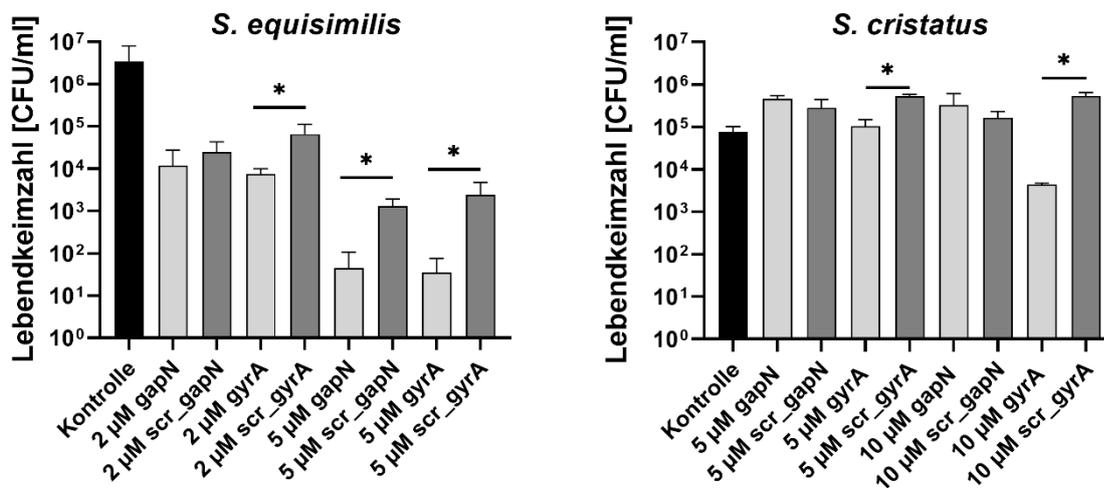
**Abbildung 4. Einfluss der PNA-Behandlung auf (A) das Überleben von *S. pyogenes* und (B) die spezifische GapN-Aktivität.** Überleben von *S. pyogenes* M49 591 sowie die GapN Aktivität in Proteinrohextrakten von *S. pyogenes* M49, die entweder mit  $2 \mu\text{M}$  (RXR)<sub>4</sub>XB-*gapN*-asPNA, (RXR)<sub>4</sub>XB-*gyrA*-asPNA oder (RXR)<sub>4</sub>XB-*gapN*-scrPNA (scr) behandelt wurden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n \geq 4$ , \* $p < 0,05$ , paarweiser Vergleich mit Mann-Whitney U-Test (Abbildung B modifiziert aus Eisenberg *et al.* 2022 (58)).

## 4.2 GapN ist die Hauptquelle für NADPH in Streptokokken, denen der oxPPP fehlt

Wie oben beschrieben, konnte gezeigt werden, dass GapN für *S. pyogenes* essenziell ist. Vorarbeiten haben zudem ergeben, dass alle untersuchten *Streptococcus*-Spezies die Enzyme für mindestens einen der beiden NADPH produzierenden Stoffwechselwege, oxPPP und GapN, im Genom kodieren. Einige Spezies kodieren auch die Enzyme für beide Stoffwechselwege (Tabelle 1, (58)). Davon ausgehend, dass oxPPP und GapN in Streptokokken die zentralen NADPH generierenden Stoffwechselwege sind, sollte GapN in Spezies, die über oxPPP und GapN verfügen, nicht essenziell sein.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in zwei weiteren *Streptococcus*-Spezies, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* und *S. cristatus*, *gapN* Knock-downs mittels asPNA durchgeführt. Analog zu *S. pyogenes* fehlt in *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* ebenfalls der oxPPP. *S. cristatus* hingegen verfügt sowohl über den oxPPP als auch über GapN. Da für keine der Spezies bisher ein geeignetes CPP zum Transport von PNA in die Bakterienzelle beschrieben wurde, musste zunächst untersucht werden, ob das für *S. pyogenes* geeignete CPP (RXR)<sub>4</sub>XB auch in *S. cristatus* und *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* den Transfer der PNA über die Membran ermöglicht. Dazu wurden an (RXR)<sub>4</sub>XB gekoppelte *gyrA*-asPNA in Kill Assays mit beiden Spezies eingesetzt, da *gyrA* in allen Bakterienspezies essenziell ist. Nach sechs Stunden Inkubation mit der *gyrA*-asPNA konnte für *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* ab einer Konzentration von 2 µM und für *S. cristatus* ab 5 µM eine signifikant reduzierte Lebendkeimzahl im Vergleich zur scrPNA-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 5). (RXR)<sub>4</sub>XB ermöglicht somit die Aufnahme von PNA bei allen drei Spezies.

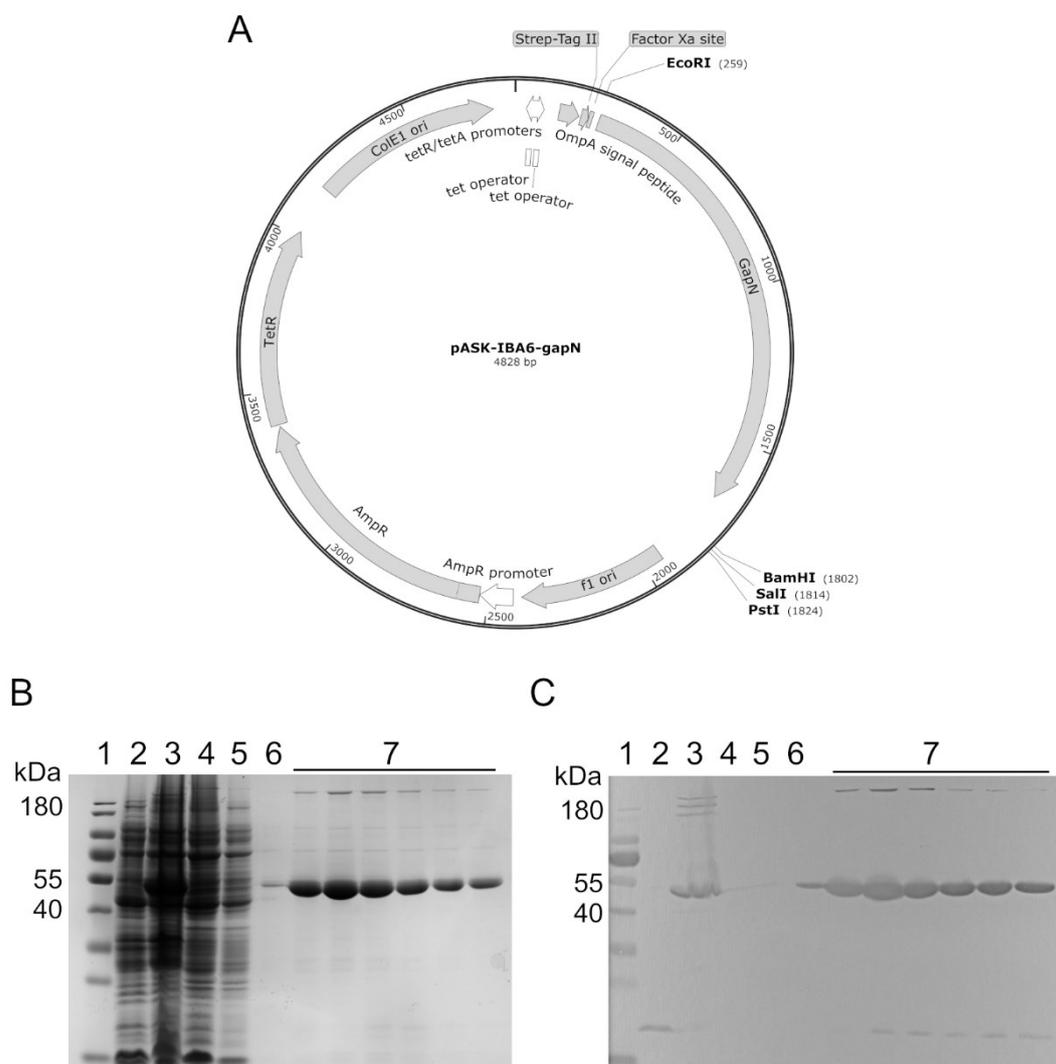
Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden speziesspezifische *gapN*-asPNA an (RXR)<sub>4</sub>XB gekoppelt und in PNA Kill Assay mit den Spezies eingesetzt. Bei *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* (GapN<sup>+</sup>/oxPPP<sup>-</sup>) konnte im Gegensatz zur *gyrA*-asPNA erst ab 5 µM asPNA eine signifikante Reduktion der Lebendkeimzahl im Vergleich zur scrPNA-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 5). Die Inkubation von *S. cristatus* (GapN<sup>+</sup>/oxPPP<sup>+</sup>) mit der *gapN*-asPNA hatte, ähnlich der scrPNA, keinen Einfluss auf das Überleben der Bakterien. Diese Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass GapN nur in *Streptococcus*-Spezies essenziell ist, in denen der oxPPP fehlt.



**Abbildung 5. Überleben verschiedener *Streptococcus*-Spezies nach 6 h-Inkubation mit (RXR)<sub>4</sub>XB gekoppelter PNA gerichtet gegen *gapN* und *gyrA*.** Mittelwerte und Standardabweichungen, n ≥ 4, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, paarweiser Vergleich mit der korrespondierenden scrPNA mittels Mann-Whitney U-Test (Abbildung modifiziert aus Eisenberg *et al.* 2022 (58)).

#### 4.2.1 Stoffwechselintermediate hemmen SpyGapN

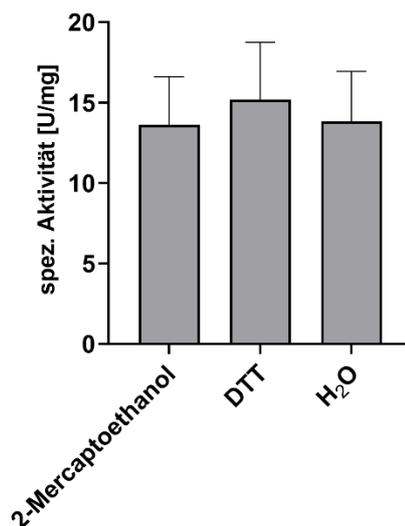
Crow und Wittenberger (59) zeigten, dass verschiedene Stoffwechsel-Intermediate und Salze einen Einfluss auf die Aktivität von aus *S. mutans* (GapN<sup>+</sup>, oxPPP<sup>-</sup>) gewonnener GapN haben. Um die Einbindung von SpyGapN in den Stoffwechsel in *S. pyogenes* besser nachvollziehen zu können, sollte dies auch für die SpyGapN getestet werden. Dafür war es notwendig, reines, aktives Enzym zu gewinnen. Dazu wurde die SpyGapN mit Hilfe des in Vorarbeiten konstruierten Vektors pASK-IBA6-gapN (Abbildung 6A) (86) heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) produziert (3.6.1). Die Isolierung erfolgte mittels Gravity-Flow-Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepahrose-Säulen (3.6.2.1). Der Erfolg der SpyGapN-Isolierung wurde im Anschluss mit einer SDS-PAGE und einem Western Blot analysiert. Zuletzt wurde die SpyGapN in 0,1 M Zitronensäure (pH 6,0) dialysiert und über eine Ultrafiltration konzentriert (3.6.2.3). Gel und Western Blot einer repräsentativen SpyGapN Isolierung sind in Abbildung 6 (B und C) dargestellt. Die Elutionsfraktionen zeigen dort eine dominante Bande zwischen 40 kDa und 55 kDa, welche das GapN Monomer repräsentiert (52.937,55 Da), sowie eine kleinere Bande über 180 kDa, welche wahrscheinlich das Homotetramer repräsentiert (211.750,2 Da) (58).



**Abbildung 6. Heterologe Produktion und Isolierung von SpyGapN mittels Gravity-Flow-basierter Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.** (A) Plasmidkarte des Expressionsplasmids pASK-IBA6-gapN. OmpA – Signalsequenz zur Proteinsekretion in den periplasmatischen Raum bei *E. coli*, Strep-Tag II – N-terminaler Affinitätstag, Factor Xa site – Erkennungs- und Spaltungsstelle von Faktor Xa, GapN – *S. pyogenes* M49 591 *gapN*, EcoRI/BamHI/SalI/PstI – Restriktionsenzymchnittstelle, f1 ori – Replikationsursprung der f1 Bakteriophage, AmpR – Ampicillinresistenzgen, TetR – Tetracyclin Repressor TetR, ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*, tetR/tetA promoters – überlappende Promotoren für *tetR* und *tetA*, tet operator – Bindemotiv für TetR. (B) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel und (C) Western Blot der SpyGapN-Isolierung mittels Gravity-Flow-Affinitätschromatographie. SDS-PAGE-Gele waren beladen mit (1) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa, Proteinrohextrakte (2) vor und (3) nach der Induktion der Expression mit AHT, Durchfluss der Säule (4) vom Auftragen des Proteinrohextrakt, von der (5) zweiten und (6) zehnten Waschfraktion und (7) den Elutionsfraktionen der Strep-Tactin® Affinitätschromatographie. Strep-Tag-II-gekoppeltes SpyGapN wurde mittels Strep-Tactin® alkaline phosphatase conjugate und NBT/BCIP detektiert.

Nach der Isolierung der SpyGapN erfolgte eine Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität. Dafür wurde die in Iddar *et al.* (60) publizierte Methode modifiziert. Iddar *et al.* verwendeten jeweils 1 mM G3P und NADP<sup>+</sup>. Für SpyGapN wurde jedoch mittels Michaelis-

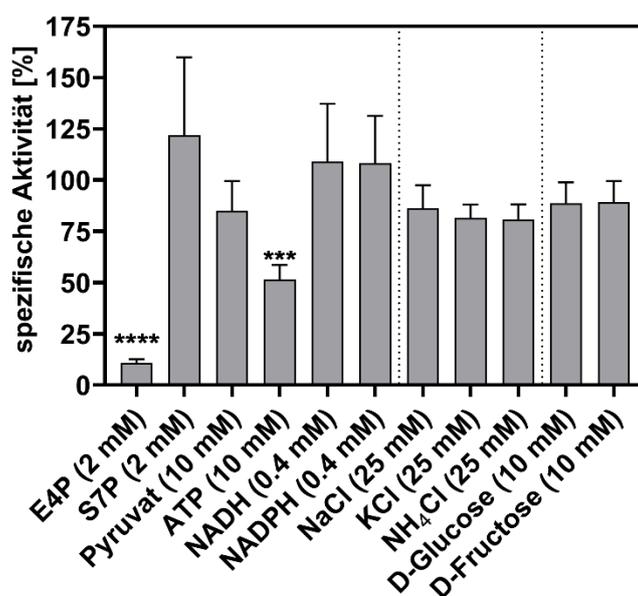
Menten-Kinetik für NADP<sup>+</sup> ein K<sub>M</sub> von 0,63 mM (86) und für DL-G3P ein K<sub>M</sub> von 0,58 mM (91), bestimmt. Um sicher zu stellen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch die Verfügbarkeit von G3P und NADP<sup>+</sup> limitiert wird, wurden im Assay die Konzentrationen von NADP<sup>+</sup> auf 10 mM und G3P auf 2 mM erhöht. Zusätzlich enthielt die Assaylösung von Iddar *et al.* 3 mM 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel. Dies ist toxisch und sollte daher in der Assaylösung ersetzt werden. Entsprechende Aktivitätsuntersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der SpyGapN Aktivität bei Verwendung von Dithiotreitol (DTT) im Vergleich zu 2-Mercaptoethanol in der Assaylösung (Abbildung 7). Es waren auch keine signifikanten Unterschiede nachweisbar, wenn komplett auf ein Reduktionsmittel verzichtet wurde. Um sicher zu stellen, dass das für die Aktivität von GapN essenzielle Cystein (60) in seiner reduzierten, aktiven Form verbleibt, wurde ungeachtet dessen nicht auf ein Reduktionsmittel in der Assaylösung verzichtet, sondern für alle nachfolgenden Untersuchungen 2-Mercaptoethanol durch DTT ersetzt. Für alle Aktivitätsbestimmungen wurde eine SpyGapN-Konzentration von 50 nM eingesetzt.



**Abbildung 7. Spezifische SpyGapN-Aktivität abhängig vom verwendeten Reduktionsmittel.** SpyGapN Aktivität wurde in der Präsenz von 3 mM 2-Mercaptoethanol, 0,5 mM DTT bzw. ohne Reduktionsmittel (H<sub>2</sub>O) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 5, one-way ANOVA.

Analog zu den Untersuchungen von Crow und Wittenberger an der SmuGapN (59) wurde der Einfluss verschiedener putativer Effektoren auf die SpyGapN untersucht. Dafür wurden diese in den in Abbildung 8 angegebenen Konzentrationen in die Assaylösung gegeben und die spezifische SpyGapN-Aktivität gemessen. Erythrose-4-phosphat (E4P), ein Intermediat des nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs, reduzierte bei einer Konzentration von 2 mM die spezifische Aktivität der SpyGapN signifikant auf etwa 10 % im Vergleich zur Kontrolle

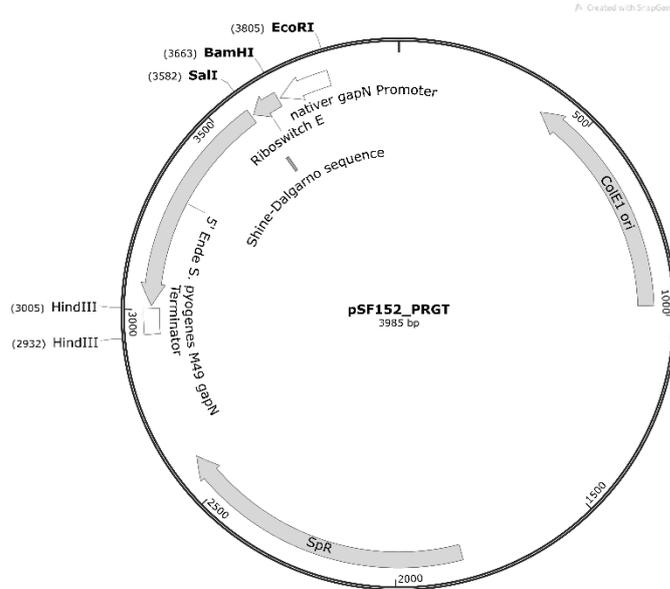
(Abbildung 8). Der Zusatz von 10 mM ATP führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der SpyGapN-Aktivität auf 50 %. Sedoheptulose-7-phosphat (S7P), ein weiteres Intermediat aus dem nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs, hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der SpyGapN. Dasselbe gilt für NADH, NADPH, Pyruvat, Glucose, Fructose sowie Natrium-, Ammonium- und Kaliumchlorid.



**Abbildung 8. Einfluss von verschiedenen Metaboliten, Salzen und Zuckern auf die spezifische Aktivität von isolierter SpyGapN.** Spezifische Aktivitäten sind relativ zur spezifischen Aktivität in der Standard-Assaylösung gezeigt. E4P – Erythrose-4-phosphat; S7P – Sedoheptulose-7-phosphat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 4, one-way ANOVA gefolgt vom Tukey's Multiple Comparisons Test, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

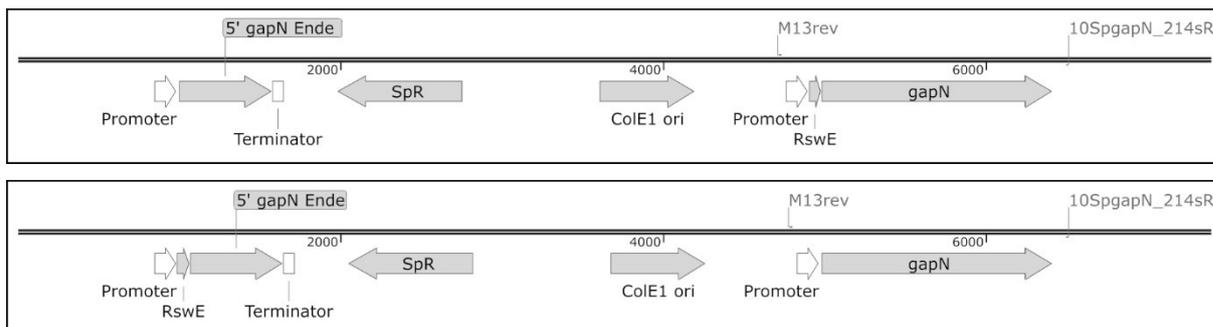
#### 4.2.2 Konstruktion einer konditionellen GapN-Knock-out-Mutante

Zur detaillierteren Analyse der Funktion von GapN im Stoffwechsel von *S. pyogenes* sollte eine konditionelle *gapN* Knock-out-Mutante in *S. pyogenes* M49 591 generiert werden. Dafür sollte die Translation der *gapN*-mRNA unter die Kontrolle des Theophyllin-abhängigen Riboswitch E (63) gestellt werden. Im Vorwege dieser Arbeit wurde dafür das Plasmid pSF152\_PRGT (Abbildung 9) konstruiert (87). Das Plasmid basiert auf dem Plasmid pSF152, welches lediglich einen Replikationsursprung für gramnegative Bakterien trägt. Es wurde als ein Shuttle-Vektor zur Integration des Plasmids in das Streptokokken-Genom entwickelt (92). In dieses Plasmid wurde die Sequenz des nativen Promotors von *gapN*, des Riboswitchs E, des 5'-Endes von *gapN* (571 bp) und der Terminatorregion von *gapN* kloniert. Die Klonierung der verschiedenen Sequenzen erfolgte in der genannten Reihenfolge. Die Selektion auf mit dem Plasmid transformierte Klone erfolgt über die Zugabe von Spectinomycin.



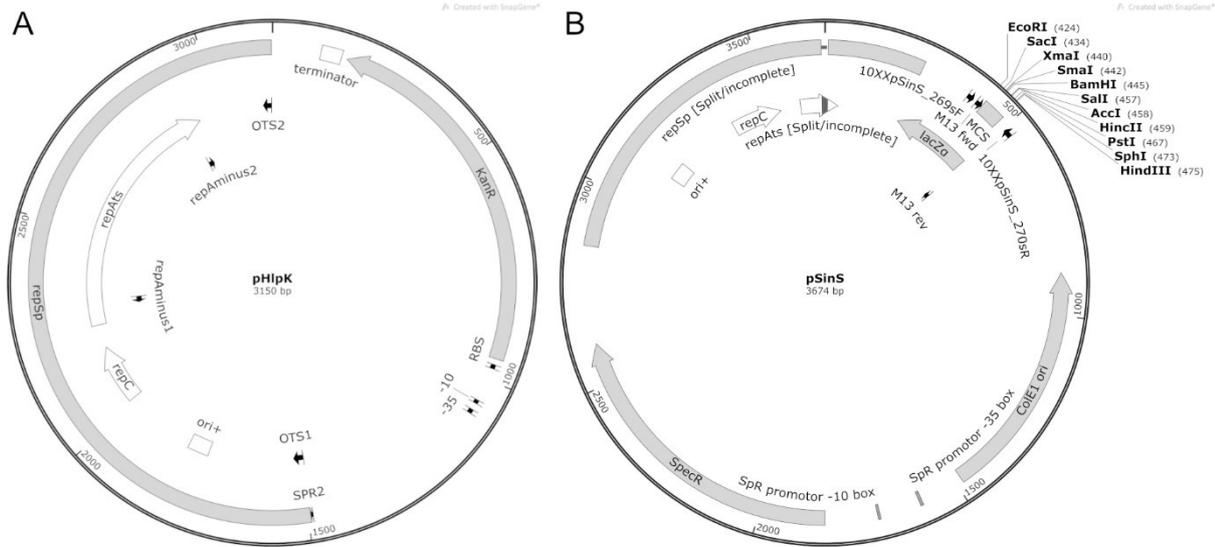
**Abbildung 9. Plasmidkarte des Plasmids pSF152\_PRGT.** ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*, SpR – Spectinomycinresistenzgen, EcoRI/BamHI/SalI/HindIII – Restriktionsenzymchnittstelle.

pSF152\_PRGT wurde zunächst aus dem Stamm *E. coli* DH5α pSF152\_PRGT isoliert (3.5.2). *S. pyogenes* wurde im Anschluss mittels Elektroporation mit pSF152\_PRGT transformiert und auf Spectinomycin und Theophyllin enthaltenden THY-Agarplatten inkubiert. Um in Präsenz von Spectinomycin zu überleben, muss das Plasmid über homologe Rekombination in das Genom integrieren, da es keinen Replikationsursprung für *S. pyogenes* besitzt. Die homologe Rekombination soll dabei über das 5'-Ende von *gapN* erfolgen. Die nach der Transformation und Selektion erhaltenen Klone wurden mittels PCR auf die Integration des Plasmides überprüft. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass der eine Primer (M13rev) auf dem ehemaligen Plasmidrückgrat und der andere Primer (10SpgapN\_214sR) im Genom downstream von *gapN* bindet. Auf diese Weise wurde kontrolliert, ob das Plasmid vor *gapN* integriert ist, denn nur dann ergibt die PCR ein Produkt. Die auf die Integration positiv getesteten Klone wurden im Anschluss mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Dazu wurde das zuvor beschriebene PCR-Fragment, welches mit den Primern M13rev und 10SpgapN\_214sR amplifiziert wurde, sequenziert. Es zeigte sich, dass das Plasmid integrierte, jedoch erfolgte die homologe Rekombination nicht wie geplant über das 5'-Ende sondern über den nativen Promotor von *gapN*. Aus diesem Grund ist der Riboswitch in den Klonen nicht zwischen Promotor und dem funktionalen *gapN* integriert (Abbildung 10 unten; Sequenzierung Anhang Abbildung A 1). Durch die Integration über den Promotor ist *gapN* nicht unter der Kontrolle des Riboswitch E. Die Integration von pSF152\_PRGT erfolgte bei allen getesteten Klonen in dieser Weise, sodass es nicht möglich war mit diesem Plasmid eine konditionelle Knock-out-Mutante zu generieren.



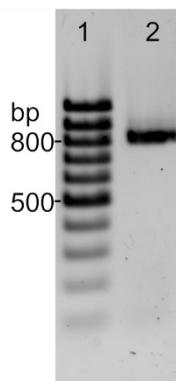
**Abbildung 10. Schematische Darstellung der Sequenz um *gapN* zur Darstellung der Integrationsmöglichkeiten von pSF152\_PRGT in das Chromosom von *S. pyogenes* M49 591.** Integration erfolgt über das 5'-Ende (oben) oder über den Promotor (unten) von *gapN*. Promoter – nativer *gapN* Promotor; RswE – Riboswitch E; SpR – Spectinomycinresistenzgen (*aad9*); ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*; M13rev/10SpgapN\_214sR – Bindestelle für den jeweiligen Primer.

Da die Insertion des Riboswitch E mit pSF152\_PRGT im Rahmen dieser Arbeit nicht korrekt möglich war, wurde ein anderes System zur stabilen Integration von Plasmiden in das *S. pyogenes* Genom verwendet. Dieses besteht aus den beiden Plasmiden pHlpK und pSinS und wurde 2015 durch Le Breton *et al.* entwickelt (57). pSinS ist ein mutagenes Suizidplasmid, welches nicht selbstständig in *S. pyogenes* repliziert werden kann. pHlpK ist ein Helferplasmid, das den thermosensitiven Replikationsursprung des Plasmids pWV01 trägt. Es kann bei 30 °C in *S. pyogenes* und *E. coli* vermehrt werden. pHlpK ermöglicht außerdem die Replikation von pSinS in *S. pyogenes* bei 30 °C, wenn beide Plasmide in einer Zelle vorliegen. Die Integration von pSinS wird durch Selektionsdruck mit Spectinomycin und eine Temperaturerhöhung auf 37 °C induziert. Bei dieser Temperatur kann pHlpK und damit auch pSinS nicht mehr repliziert werden und pSinS integriert mittels homologer Rekombination über eine zuvor in das Plasmid klonierte Sequenz in das Genom.



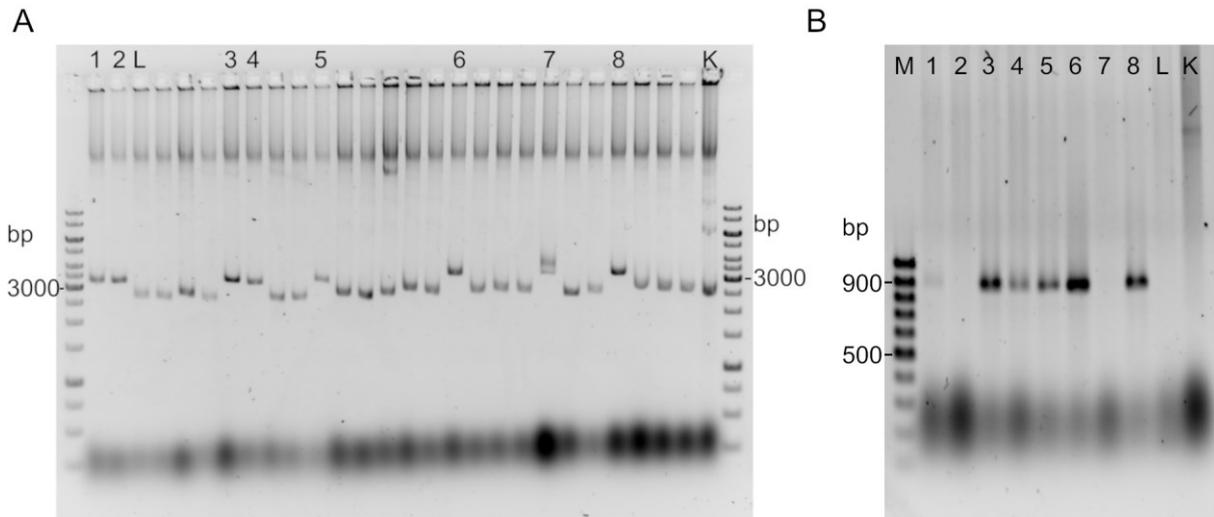
**Abbildung 11. Plasmidkarten von pHlpK (A) und pSinS (B).** repSp – thermosensitiver Replikationsursprung von pWV01, KanR – Kanamycinresistenzgen, repSp [Split/incomplete] – unvollständiger thermosensitiver Replikationsursprung von pWV01, ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*, SpR – Spectinomycinresistenzgen, EcoRI/SacI/XmaI/SmaI/BamHI/SalI/AccI/HincII/PstI/SphI/HindIII – Restriktionsenzymstichstelle, MCS – multiple Klonierungsstelle, lacZα – Gen für das Alpha-Fragment der *E. coli* β-Galactosidase (57).

Zur Integration des Riboswitch E zwischen dem nativen Promotor und dem Startcodon von *gapN* war es notwendig, Promotor, Riboswitch und das 5' Ende von *gapN* in pSinS zu ligieren. Dafür wurde pSF152\_PRGT aus *E. coli* DH5α pSF152\_PRGT isoliert (3.5.2) und als Template-DNA in der PCR verwendet. Im Plasmid lagen die drei Sequenzen in der korrekten Reihenfolge vor und wurden mit den Primern 10SpgapN\_198iR und 10SpPgapN\_199xF amplifiziert (3.5.3.2). Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.5.4) überprüft (Abbildung 12). Diese zeigte eine Bande von ca. 800 bp und entspricht damit der erwarteten DNA-Fragment-Größe von 811 bp.



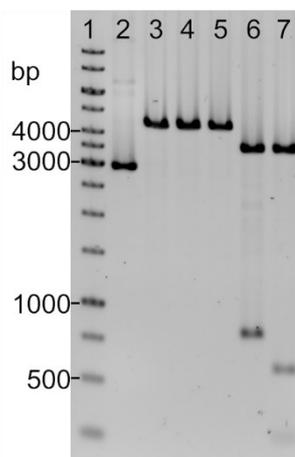
**Abbildung 12. Agarosegel (1 %) der PCR zur Amplifikation von *gapN* Promotor, Riboswitch E und 5'-Ende von *gapN*.** Als Größenstandard wurde der MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use aufgetragen (1). Die DNA-Sequenz wurde mit den Primern 10SpgapN\_198iR und 10SpPgapN\_199xF von pSF152\_PRGT amplifiziert (2).

Das so vervielfältigte PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII hydrolysiert (3.5.6) und mit pSinS, das mit denselben Enzymen hydrolysiert und mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert wurde (3.5.8), ligiert (3.5.9). Mit dem Ligationsansatz transformierte *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden im Anschluss mit dem Colony Fast Screen auf das Vorhandensein des rekombinanten Plasmids analysiert (3.5.10; 3.5.11). Wie in Abbildung 13 (links) zu sehen ist, wiesen acht Spuren eine im Vergleich zur Kontrolle (Spur 9) höhere Bande auf, was darauf hindeutete, dass die Plasmide in diesen Kolonien größer sind als die der Kontrolle mit dem leeren pSinS. Aus diesem Grund wurden diese Kolonien zusätzlich mit einer Kolonie-PCR (3.5.3.3) mit den Primern 10XXpSinS\_269sF und 10XxpSinS\_270sR, die stromaufwärts und -abwärts der multiplen Klonierungsstelle auf dem Plasmidrückgrat binden (Abbildung 11B), untersucht. Das Agarosegel mit diesen PCR-Produkten (Abbildung 13) weist in sechs Spuren eine Bande auf der Höhe von ca. 900 bp auf, während die Spuren der Kontrollen L und K keine definierte Bande aufweisen. Bei Kontrolle K handelt es sich um den *E. coli* Stamm mit dem Plasmid pSinS. Entsprechend ist das theoretische Fragment, welches bei der PCR entstehen sollte, 147 bp groß. Bei der Kontrolle L handelt es sich um eine im Colony Fast Screen identifizierte Kolonie mit einer Bande auf derselben Höhe wie die Kontrolle K. Die 900 bp-Bande entspricht der erwarteten Größe von 896 bp für das Amplifikat des gewünschten rekombinanten Plasmids.



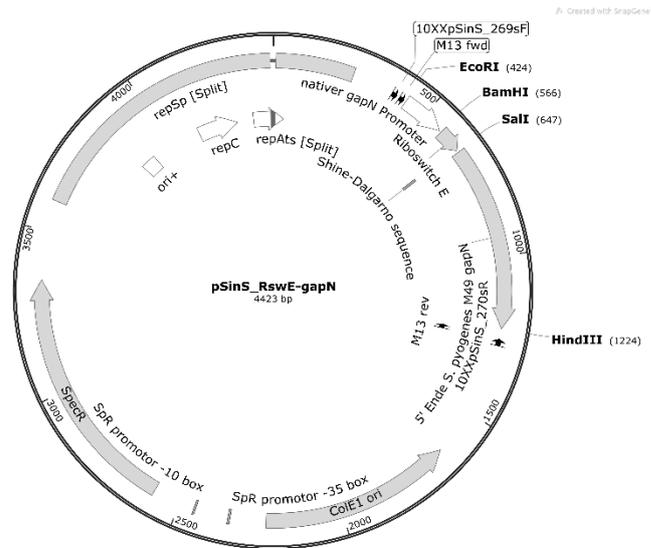
**Abbildung 13. Agarosegele (1 %) (A) des Colony Fast Screen und (B) der Kolonie-PCR von mit pSinS-RswE-gapN transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$ .** Im Colony Fast Screen mit 1-8 markierte Spuren zeigen eine höher laufende Bande als die Kontrolle (Spur K; *E. coli* pSinS). Als Größenstandard wurde links und rechts die GeneRuler 1 kb DNA Ladder auftragen. Die Stämme der im Colony Fast Screen markierten Spuren wurden mit der Kolonie-PCR mit den Primern 10XxpSinS\_269sF und 10XxpSinS\_270sR weiter untersucht. In Spur M wurde MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use als Größenstandard aufgetragen.

Der Klon, der in den vorherigen Agarosegelen in Spur 3 analysiert wurde, wurde als *E. coli* DH5 $\alpha$  pSinS\_RswE-gapN weiterverwendet. Das Plasmid wurde isoliert, Kontrollrestriktionen unterzogen und diese in Agarosegelen aufgetrennt (3.5.6). Die Einzel-Restriktionen mit EcoRI, HindIII und Sall resultieren jeweils in einer Bande auf Höhe von über 4.000 bp (Abbildung 14). Die theoretische Größe des rekombinanten Plasmids entspricht 4.423 bp.



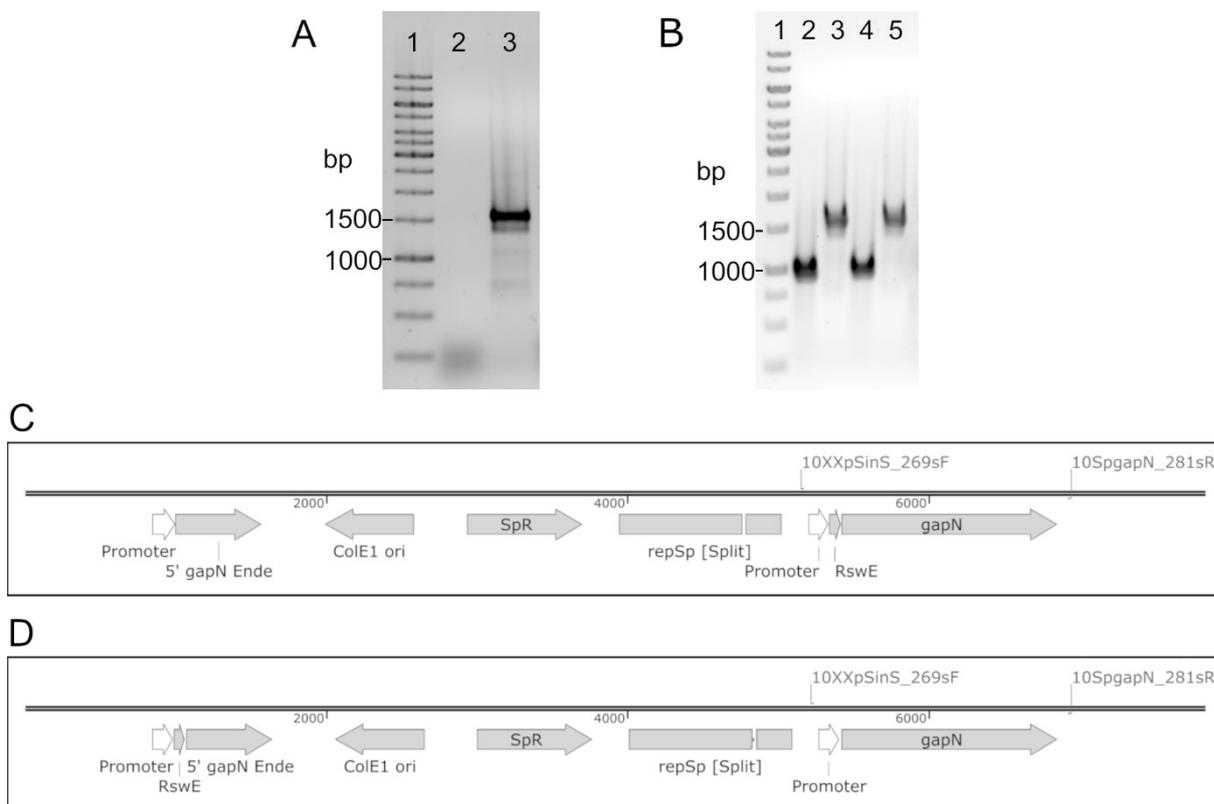
**Abbildung 14. Agarosegel (1 %) der Kontrollrestriktion von pSinS\_RswE-gapN.** Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder aufgetragen (1). Zur Analyse wurde pSinS\_RswE-gapN ungeschnitten (2), mit EcoRI (3), mit HindIII (4), mit Sall (5), mit EcoRI/HindIII (6) und mit EcoRI/HindIII/Sall (7) verdaut aufgetragen.

Die Spuren mit den Plasmiden nach Mehrfach-Verdau mit EcoRI/HindIII bzw. EcoRI/HindIII/Sall zeigen jeweils eine Bande auf Höhe von 3.500 bp, welche das Plasmidrückgrat von pSinS (3.623 bp) repräsentiert. Die Bande auf Höhe von ca. 750 bp nach EcoRI/HindIII-Restriktion (Spur 6) entspricht dem DNA-Fragment mit Promotor, Riboswitch und 5'-*gapN*-Ende (800 bp). Auch die weiteren Banden nach EcoRI/HindIII/Sall-Restriktion (Spur 7) bestätigen die erfolgreiche Klonierung. Die theoretischen Fragmentgrößen sind 223 bp für das Promotor und Riboswitch E umfassende Fragment und 577 bp für das 5'-Ende von *gapN* und sind auch so im Agarosegel zu erkennen. Die nachfolgende Sequenzierung (Anhang Abbildung A 2) bestätigte die Ergebnisse der Kontrollrestriktion und damit die erfolgreiche Klonierung von pSinS\_RswE-gapN (Abbildung 15).



**Abbildung 15. Plasmidkarte von pSinS\_RswE-gapN.** repSp [Split/incomplete] – unvollständiger thermosensitiver Replikationsursprung von pWV01, ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*, SpecR – Spectinomycinresistenzgen, EcoRI/BamHI/SalI/HindIII – Restriktionsenzymchnittstelle.

Das Plasmid pSinS\_RswE-gapN wurde danach zur Generierung der konditionellen *gapN*-Knock-out-Mutante verwendet. Dafür wurde zuerst *S. pyogenes* M49 591 mit dem Helfer-Plasmid pHlpK transformiert. Die Kultivierung erfolgte nach der Transformation bei 30 °C auf THY<sub>Kn300</sub>. Als Nachweis für die erfolgreiche Transformation wurden die gewachsenen Klone mit einer Kolonie-PCR auf das Vorhandensein von pHlpK untersucht (Abbildung 16A). Der resultierende Stamm *S. pyogenes* M49 591 pHlpK wurde im Anschluss mit pSinS\_RswE-gapN transformiert. Nach dieser Transformation erfolgte die Kultivierung bei 30 °C auf THY<sub>Spec100; Tp2</sub>. Die so generierten Klone wurden auf das Vorhandensein beider Plasmide untersucht (Abbildung 16B). Nach diesem Nachweis wurden diese Klone bei 37 °C kultiviert, um die homologe Rekombination von pSinS\_RswE-gapN zu induzieren. Die Klone wurden im Anschluss vereinzelt und über mehrere Tage bei 37 °C auf THY<sub>Spec100; Tp2</sub> kultiviert. Nach Kontrolle auf das Fehlen der Kanamycin-Resistenz wurde die Integration mit PCR und Sequenzierung untersucht. Dafür wurde der Abschnitt nach dem Plasmidrückgrat mit den Primern 10XXpSinS\_269sF und 10SpgapN\_281sR amplifiziert. Bei korrekter Insertion sollte in diesem Abschnitt der Riboswitch E auf den GapN Promotor folgen und zum Schluss das vollständige *gapN* (Abbildung 16C). Die Sequenzierung zeigte jedoch, dass auf den Promotor nicht der Riboswitch E folgte, sondern direkt die kodierende Sequenz von *gapN* (Abbildung 16D, Sequenzierung Anhang Abbildung A 3). Damit erfolgte die Insertion von pSinS\_RswE-gapN, wie schon bei den Versuchen mit pSF152\_PRGT, über den *gapN*-Promotor. Es war auch mit diesem Plasmidsystem nicht möglich, eine konditionelle *gapN*-Knock-out-Mutante zu erzeugen.



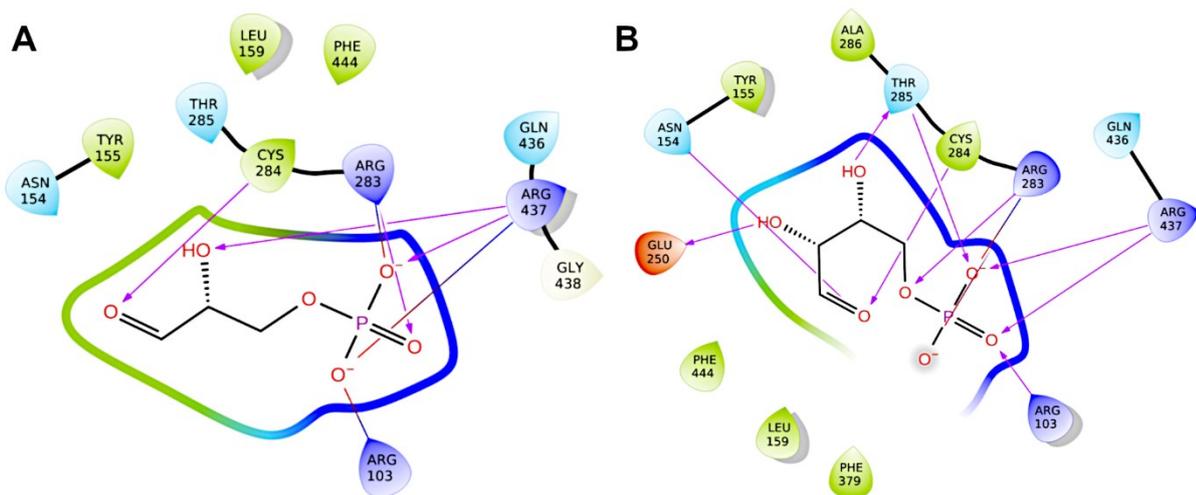
**Abbildung 16. Konstruktion der konditionalen Knock-out Mutante von *S. pyogenes* 591 mit Hilfe der Plasmide pHlpK und pSinS\_RswE-gapN.** Agarosegele (1 %) (A) der Kolonie-PCR zum Nachweis von pHlpK und (B) pHlpK und pSinS\_RswE-gapN in *S. pyogenes* M49 591. Der Nachweis von pHlpK erfolgte mit 10XXpHlpK\_279xF und 10XXpHlpK\_280xR und pSinS\_RswE-gapN mit 10XXpSinS\_269sF und 10XXpSinS\_270sR. Das Gel der Kolonie-PCR zum Nachweis von pHlpK (links) zeigt den Größenstandard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (1), das PCR-Produkt von *S. pyogenes* M49 591 (2) und *S. pyogenes* M49 591 pHlpK (3). Das Gel der Kolonie-PCR von beiden Plasmiden (rechts) zeigt den Größenstandard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (1), die PCR-Produkt zum Nachweis von pSinS\_RswE-gapN (2, 4) und pHlpK (3, 5) von zwei verschiedenen *S. pyogenes* Klonen (2+3 und 4+5). (C+D) Schematische Darstellung der Sequenz um *gapN* zur Darstellung der Integrationsmöglichkeiten von pSinS\_RswE-gapN in das Chromosom von *S. pyogenes* M49 591. Integration erfolgt über (C) das 5'-Ende oder (D) über den Promotor von *gapN*. Promotor – nativer *gapN* Promotor; RswE – Riboswitch E; SpR – Spectinomycinresistenzgen (*aad9*); repSp [Split] – unvollständiger thermosensitiver Replikationsursprung von pWV01 ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*; 10XxpSinS\_269sF/10SpgapN\_281sR – Bindestelle für den jeweiligen Primer.

### 4.3 *In-silico*-Screening putativer SpyGapN-Inhibitoren

Mit Hilfe der asPNA-Technologie wurde bestätigt, dass GapN in *S. pyogenes* essenziell ist (58), wie bereits von Le Breton *et al.* postuliert (57). Da das Enzym im Menschen und vielen Bakterien nicht vorkommt bzw. nicht essenziell ist, eignet es sich als Drug Target für *S. pyogenes*. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, potenzielle Inhibitoren der SpyGapN zu identifizieren, die sich ggf. als Therapeutika gegen *S. pyogenes*-Infektionen weiterentwickeln lassen. Dafür wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rebecca Wade

am Heidelberger Institut für Theoretische Studien ein *in-silico*-Modell von SpyGapN erstellt. Dies erfolgte mittels Homologiemodellierung anhand der Sequenz der SpyGapN (58, 86) mit der Röntgenkristallstruktur der SmuGapN (PDB 1QI1) als Template (83).

Dieses Modell sollte für ein *in-silico*-Screening auf potenzielle Inhibitoren der SpyGapN verwendet werden. Der Fokus lag hierbei zunächst auf der Suche nach kompetitiven Inhibitoren, die in die G3P Bindetasche der SypGapN binden. Hierfür wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Wade molekulare Docking Analysen *in silico* durchgeführt, die die sterischen Gegebenheiten und die Ladungen der Aminosäuren in der G3P-Bindetasche berücksichtigen. Zur Validierung der Vorhersagekraft des molekularen Dockings mit diesem Modell wurde die Docking scores des Substrats G3P und der Metabolite E4P und S7P berechnet (Abbildung 17). Je niedriger der Docking score ist, desto höher ist die Affinität des entsprechenden Moleküls in der G3P-Bindetasche von SpyGapN. Von dem Modell wurde für G3P ein Docking score von -7,6 kcal/mol berechnet. Für E4P wurde ebenfalls ein Wert von -7,6 kcal/mol berechnet. Dies deutet auf eine inhibierende Wirkung von E4P hin, was mit dem in 4.2.1 beschriebenen *in vitro* gemessenen Effekt übereinstimmt (Abbildung 8). Für S7P berechnete das Modell einen Docking score von  $\sim$ -5 kcal/mol, d.h. die Bindungsaffinität ist geringer als die von G3P. Somit sagte das Modell keinen inhibierenden Effekt von S7P vorher. Auch dies stimmt mit den entsprechenden *in-vitro*-Messungen überein (Abbildung 8). Das Modell eignet sich somit zur Vorhersage für potenzielle Inhibitoren von SpyGapN.



**Abbildung 17. Zweidimensionale Darstellungen der Docking-Positionen von (A) G3P und (B) E4P an SpyGapN.** Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Ligand sind durch Pfeile in Richtung des Akzeptors dargestellt. Salz-Brücken-Wechselwirkungen sind durch Linien dargestellt, die bei negativer Ladung rot und bei positiver Ladung blau gefärbt sind (Abbildung aus Eisenberg *et al.* (58)).

Mit dem so validierten Modell wurden dann *in-silico*-Screenings von Substanzdatenbanken auf potenzielle Inhibitoren durchgeführt. Die analysierten Substanzen sind entweder bekannte Inhibitoren von verwandten Proteinen, wurden von virtuellen Substanzbibliotheken generiert, wurden auf Grundlage ihrer Ähnlichkeit zu G3P ausgewählt oder waren Bestandteil weiterer Substanzdatenbanken. Es wurden die Docking scores der entsprechenden Substanzen für die Bindung in die G3P-Bindetaschen berechnet. Als putative Inhibitoren wurden dabei Substanzen gewertet, die einen niedrigeren oder gleichwertigen Docking score wie G3P aufweisen. Substanzen, die dieses Kriterium erfüllten, wurden im nächsten Schritt *in silico* auf ihre Spezifität für SpyGapN untersucht. Dafür wurde die Bindungsaffinität der potenziellen Inhibitoren an humane G3P-bindende Enzyme berechnet. Der Docking score sollte dabei  $-6,5$  kcal/mol nicht unterschreiten. Mit dieser Methode konnten 99 verschiedene Substanzen vorhergesagt werden, die teilweise in verschiedenen Gruppen klassifiziert werden können. Die erste Gruppe umfasst potenziell spezifische Inhibitoren, d.h. Substanzen die käuflich zu erwerben sind und für kein humanes Enzym einen Docking score von  $< -6,5$  kcal/mol aufweisen (Tabelle 12 Nr. 1, 12, 13). Die zweite Gruppe umfasst Metabolite. Bei diesen Substanzen ist nicht davon auszugehen, dass sie spezifisch GapN inhibieren, aber sie sollten leicht zu beschaffen und gut löslich sein und könnten als Ausgangsubstanzen für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren dienen (Tabelle 12 Nr. 8, 9, 10, 11, 25, 29). Als dritte Gruppe wurden chemische Sonden definiert. Diese Gruppe umfasst kleine geladene Verbindungen mit Docking scores von mindestens  $-8$  kcal/mol für GapN (Tabelle 12 Nr. 2, 3, 4, 5, 6 und 7). Diese Substanzen waren im Modell nicht GapN-spezifisch, da sie mindestens ein humanes Enzym gebunden haben, sind aufgrund ihrer Bindeaffinität aber ebenfalls als Ausgangspunkt für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren interessant (Jonathan Teuffel und Rebecca Wade, unpublizierte Daten).

#### 4.4 Testung putativer SpyGapN-Inhibitoren

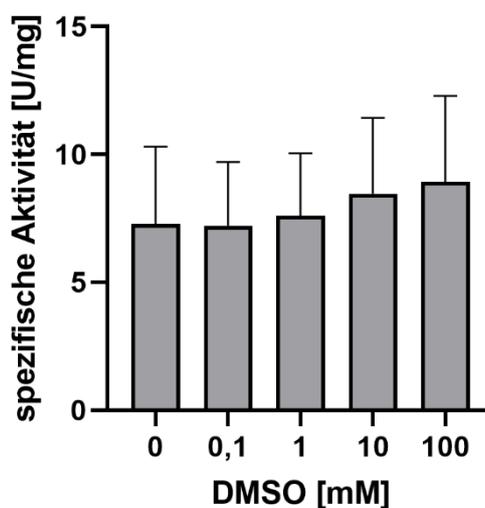
Die *in silico* vorhergesagten potenziellen GapN-Inhibitoren sollten auf ihre Eignung als Inhibitor und Ausgangspunkt zur Entwicklung potenzieller Therapeutika getestet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür ein standardisierter Ablauf etabliert und 32 der 99 *in silico* vorhergesagten putativen Inhibitoren untersucht. Diese wurden ausgewählt, da sie nicht nur durch eine hypothetische Reaktion erzeugt werden können, sondern bereits synthetisiert wurden. Zudem wurden die Inhibitoren mit dem niedrigsten Docking score ausgewählt. Die Untersuchung umfasste dabei jeweils die folgenden Schritte:

1. *In-vitro*-Untersuchung des Effekts der putativen Inhibitoren auf die SpyGapN-Aktivität
2. Test der Dosisabhängigkeit von inhibierenden Substanzen
3. Test der Enzymspezifität der inhibierenden Substanzen
4. Effekt der inhibierenden Substanzen auf das Überleben von *S. pyogenes* und *S. cristatus*
5. Effekt der inhibierenden Substanzen auf das Wachstum von *S. pyogenes* und *S. cristatus*

#### **4.4.1 *In-vitro*-Untersuchung des Effekts der putativen Inhibitoren auf die SpyGapN-Aktivität**

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Effekte der potenziellen Inhibitoren auf die Aktivität von SpyGapN in *in-vitro*-Aktivitätsassays mit gereinigter SpyGapN. Da hierfür große Mengen an SpyGapN benötigt wurden, wurde die Isolierung der heterolog mit pASK-IBA6-gapN produzierten SpyGapN mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie von dem unter 3.6.2.1 beschriebenen Gravity-Flow-basierten Verfahren auf ein FPLC-basierter Verfahren umgestellt (3.6.2.2). Mittels Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung und im Western Blot konnte die Isolierung von SpyGapN nachgewiesen werden. Die so isolierte GapN wurde für die Inhibitor-Untersuchungen eingesetzt.

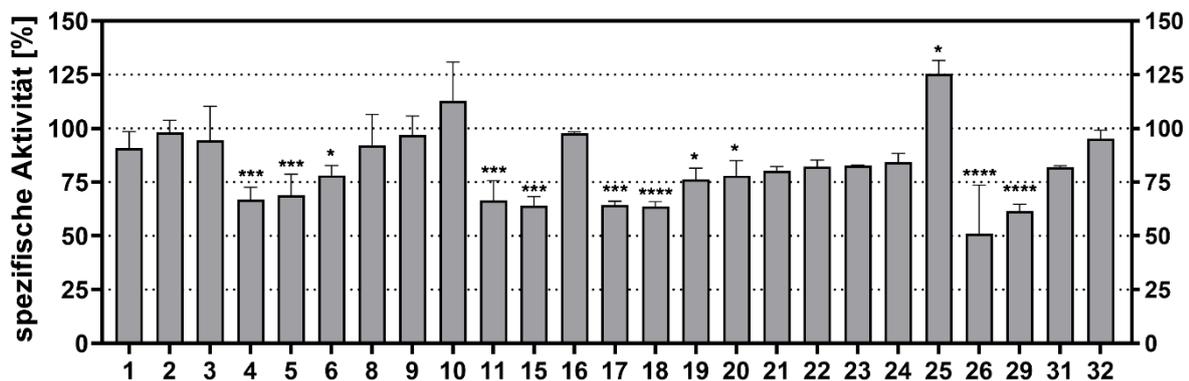
Viele der vom Modell vorhergesagten putativen Inhibitoren sind uncharakterisierte Substanzen. Entsprechend lagen zu diesen Substanzen keine Informationen zu deren Löslichkeit vor. Um das Lösen möglichst vieler Substanzen unter den gleichen Bedingungen zu ermöglichen, sollten alle Substanzen möglichst in 10 mM DMSO gelöst werden. Daher musste zunächst der Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität von SpyGapN untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass DMSO bis zu der höchsten getesteten Konzentration vom 100 mM keinen Einfluss auf die SpyGapN-Aktivität hatte (Abbildung 18).



**Abbildung 18. Effekt von DMSO in verschiedenen Konzentrationen auf die spezifische Aktivität von SpyGapN.** DMSO wurde in den angegebenen Konzentrationen zur Standardassaylösung hinzugegeben und die spezifische Aktivität bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 3.

Die putativen Inhibitoren wurden in den in Tabelle 12 angegebenen Konzentrationen in 10 mM bzw. in einem Fall in 20 mM DMSO gelöst und für die nachfolgenden Experimente verwendet. Die Substanzen 7, 12, 13, 14, 27, 28 und 30 konnten nicht dauerhaft gelöst werden und wurden daher nicht in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

Die übrigen Test-Substanzen wurden im initialen Screen in einer Konzentration von 4 mM in den Standardassaymix gegeben und die SpyGapN-Aktivität gemessen. Die Konzentration der putativen kompetitiven Inhibitoren war im Assay damit doppelt so hoch wie die Konzentration des natürlichen Substrats G3P. Als Kontrolle wurde immer ein Ansatz mit DMSO aber ohne Testsubstanz mitgeführt. Von den 25 getesteten Substanzen führten zwölf zu einer signifikant veränderten Aktivität der SpyGapN verglichen mit der Aktivität im Kontrollansatz (Abbildung 19). Die Inhibitoren Nr. 4, 5, 6, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 26 und 29 reduzierten und Substanz Nr. 25 erhöhte die Enzymaktivität. Inhibitor 26 reduzierte dabei am stärksten die Aktivität auf 50 % der Aktivität der Kontrolle.



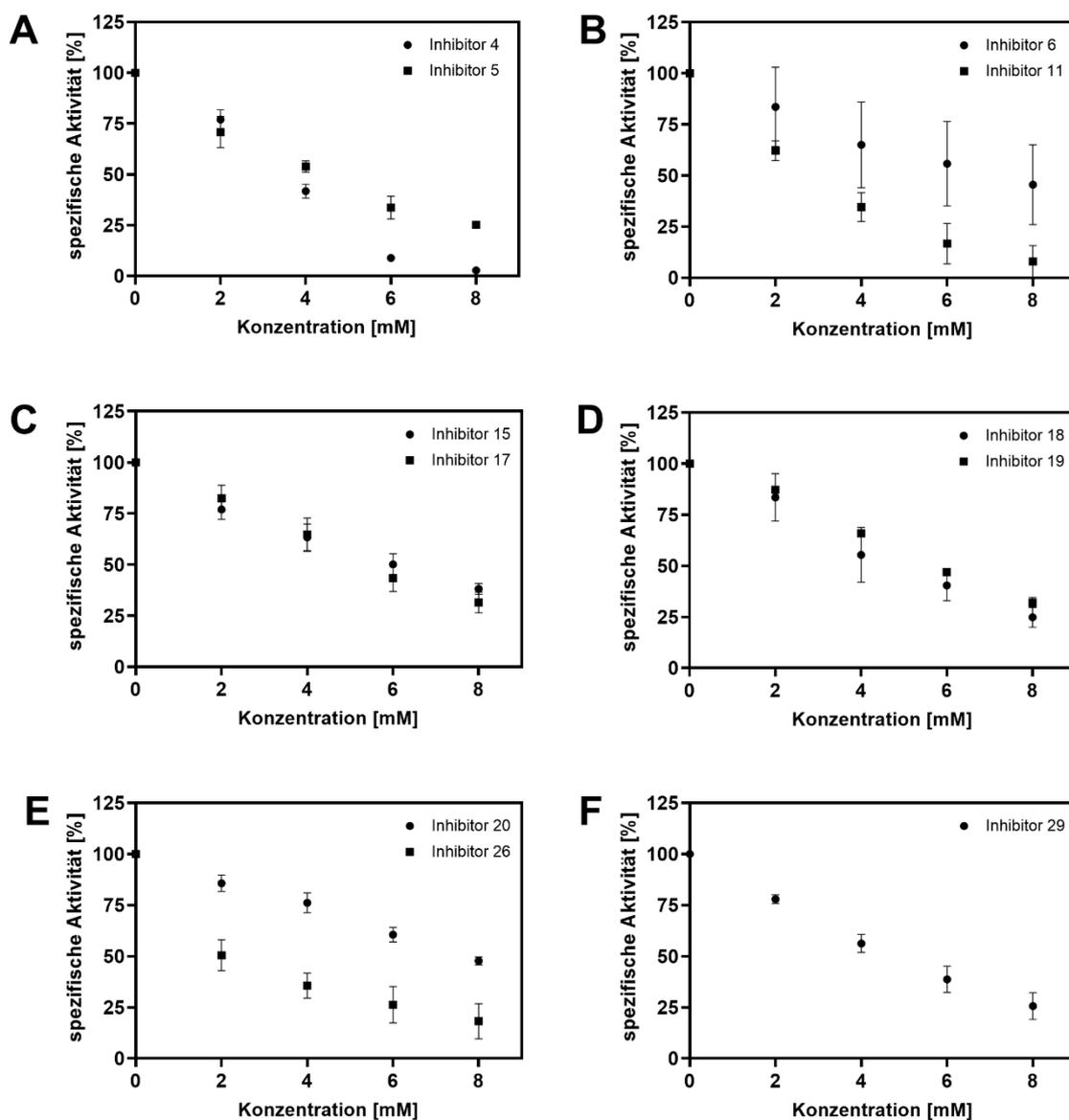
**Abbildung 19. Einfluss von potenziellen Inhibitoren auf die spezifische Aktivität von isolierter SpyGapN.** Die spezifische Aktivität wurde in Präsenz von 4 mM Inhibitor gemessen und ist relativ zur Kontrolle ohne inhibierende Substanzen dargestellt. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen;  $n = 3$ ; one-way ANOVA gefolgt vom Dunnett's Multiple Comparisons Test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Da Inhibitor 25 (2-Hydroxyglutarsäure) die Aktivität erhöhte und zur Substanz-Gruppe der Metabolite gehört, wurde geprüft, ob SpyGapN 2-Hydroxyglutarsäure als Substrat nutzen kann. Dazu wurde die GapN-Aktivität in Präsenz verschiedener Konzentrationen (2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM) der 2-Hydroxyglutarsäure in Abwesenheit von G3P untersucht. Bei keiner der getesteten Konzentrationen zeigte GapN eine Aktivität (Anhang Tabelle A 4). Diese war erst messbar nachdem G3P in den Ansatz gegeben wurde. Dabei zeigte sich die Tendenz einer dosisabhängigen Erhöhung der SpyGapN-Aktivität durch 2-Hydroxyglutarsäure. 2-Hydroxyglutarsäure scheint somit ein Aktivator für SpyGapN zu sein. Alle Substanzen, die einen signifikant inhibierenden Effekt auf die SpyGapN hatten, wurden in der Folge weiter getestet.

#### 4.4.2 Test der Dosisabhängigkeit von inhibierenden Substanzen

Im initialen Screen auf eine inhibierende Wirkung wurde jede Substanz lediglich in der Konzentration 4 mM getestet. Als nächster Schritt sollte für alle im initialen Screen inhibitorischen Substanzen untersucht werden, ob die Inhibition dosisabhängig ist. Dafür wurden die Inhibitoren in den Konzentrationen 2 mM, 4 mM, 6 mM und 8 mM in den Standardassaymix gegeben und die Aktivität der SpyGapN gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 20 dargestellt. Für alle getesteten Inhibitoren war eine dosisabhängige Inhibition nachweisbar. Inhibitor 26 zeigte im initialen Screen mit einer Reduktion um ca. 50 % die stärkste Inhibition. Der Effekt höherer Substanzkonzentrationen ist jedoch nicht so stark wie bei anderen Inhibitoren. So reduzierten 8 mM von Inhibitor Nr. 26 die

Aktivität nur auf ca. 25 %, während bei Zusatz von 8 mM Inhibitor 4 fast keine Aktivität mehr messbar war. Eine starke Enzyminhibition auf unter 25 % der Aktivität der Kontrolle erreichten lediglich Inhibitor 4 ( $\geq 6$  mM), 5 (8 mM), 11 ( $\geq 6$  mM), 18 (8 mM), 26 (8 mM) und 29 (8 mM). Auffällig ist, dass die Aktivitäts-Werte unter Zusatz von Inhibitor 6 eine sehr hohe Standardabweichung aufweisen. Dies indiziert starke Schwankungen des Effekts von Inhibitor 6.



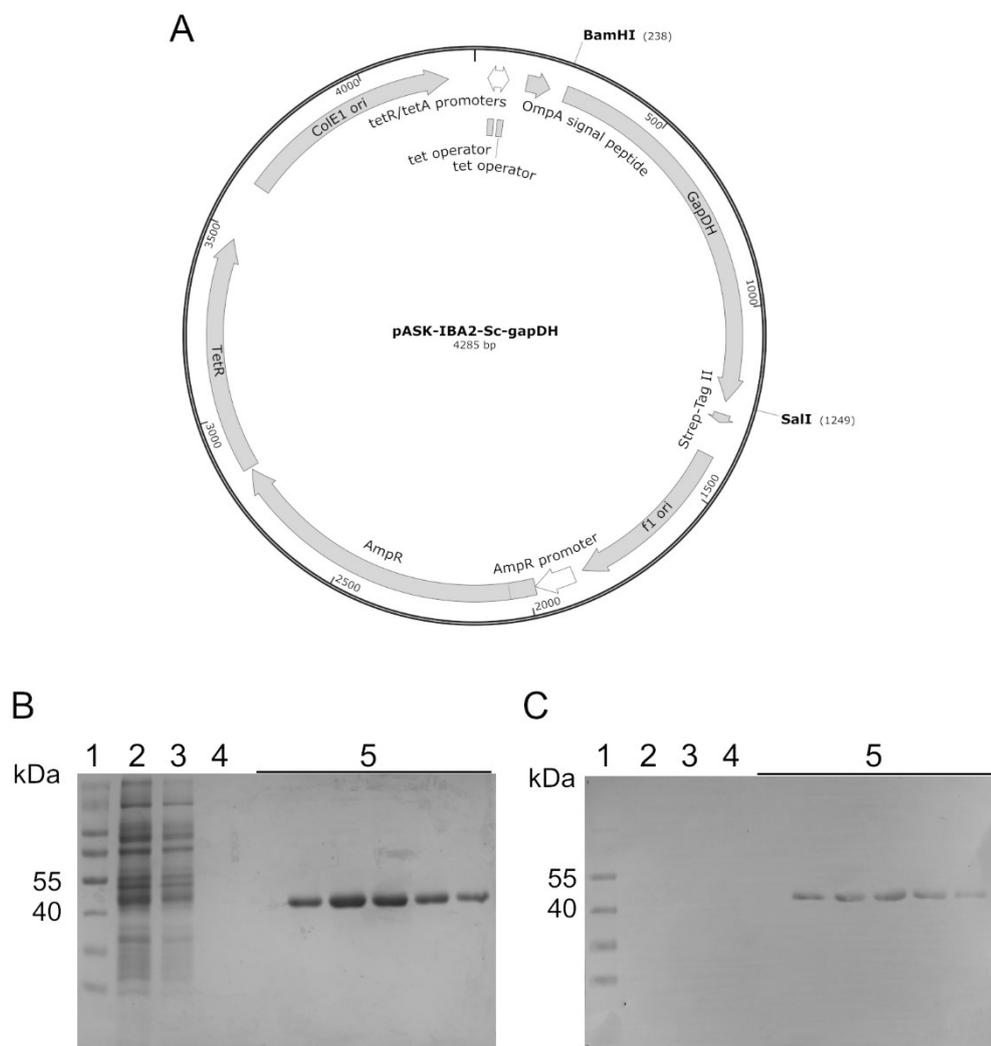
**Abbildung 20. Dosisabhängige Effekte der Inhibitoren auf die SpyGapN-Aktivität.** Spezifische Aktivitäten wurden in Gegenwart von Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen gemessen und sind im Verhältnis zur spezifischen Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor angegeben. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen;  $n \geq 3$ .

#### 4.4.3 Test der Enzymspezifität der inhibierenden Substanzen

Für alle im *in-silico*-Screening identifizierten Substanzen wurde eine hohe Bindeaffinität in der G3P-Bindetasche der SpyGapN berechnet. Es gibt allerdings eine Vielzahl an Enzymen, die G3P als Substrat nutzen und daher ebenfalls G3P-Bindetaschen besitzen. Eines der wichtigsten Beispiele ist die konventionelle GapDH, ein zentrales NAD-abhängiges Enzym der Glycolyse. Dieses Enzym ist essenziell in dem Großteil der mikrobiologischen Flora im Körper und auch für humane Zellen. Ein GapN-Inhibitor, der gleichzeitig weitere G3P-bindende Enzyme wie die GapDH hemmt, ist somit nicht geeignet, um als Therapeutikum für *S. pyogenes*-Infektionen eingesetzt zu werden. Daher wurde als nächster Schritt die Enzymspezifität der einzelnen Inhibitoren aus dem initialen Screen untersucht. Dafür wurde der Effekt der Inhibitoren auf die GapDH von *S. pyogenes* (SpyGapDH) und die GapN von *S. cristatus* (ScrGapN) untersucht.

##### 4.4.3.1 Heterologe Produktion der *S. pyogenes* GapDH

Zur Analyse des Effekts der verschiedenen Inhibitoren auf die SpyGapDH war es notwendig, diese heterolog zu exprimieren und im Anschluss zu isolieren. Dafür wurde der Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK-IBA2-Sc-gapDH (58) verwendet. Dieser trägt den rekombinanten Vektor pASK-IBA2-Sc-gapDH (Abbildung 21 A) und ermöglicht die Induktion der Produktion des Proteins durch Zugabe von AHT (3.6.1), sowie die Isolierung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Die Isolierung erfolgte für dieses Enzym mit Hilfe der Gravity-Flow-Affinitätschromatographie (3.6.2.1). Der Erfolg der SpyGapDH-Präparation wurde mit einer SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung (3.6.4) und Western Blot Analyse (3.6.5) überprüft. Abbildung 21 B und C zeigt eine repräsentative Aufreinigung der SpyGapDH. Es ist deutlich erkennbar, dass in den Elutionsfraktionen nur die der SpyGapDH entsprechende Bande auf Höhe von ca. 40 kDa nachweisbar ist. Diese wird auch im Western Blot detektiert. Die so gewonnene SpyGapDH wurde im Anschluss für die Enzymaktivitätsassays eingesetzt.



**Abbildung 21. Heterologe Produktion und Isolierung von SpyGapDH mittels Gravity Flow basierter Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.** (A) Plasmidkarte des Expressionsplasmids pASK-IBA2-Sc-gapDH. OmpA – Signalsequenz zur Proteinsekretion in den periplasmatischen Raum bei *E. coli*, GapDH – *S. pyogenes* M49 591 gapDH, BamHI/SalI – Restriktionsenzymstichstelle, Strep-Tag II – C-terminaler Affinitätstag, f1 ori – Replikationsursprung der f1 Bakteriophage, AmpR – Ampicillinresistenzgen, TetR – Tetracyclin Repressor TetR, ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*, tetR/tetA promoters – überlappende Promotoren für *tetR* und *tetA*, tet operator – Bindemotiv für TetR. (B) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel und (C) Western Blot der SpyGapDH-Isolierung mittels Gravity-Flow-Affinitätschromatographie. SDS-PAGE-Gele waren beladen mit (1) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa, Durchfluss der Säule (2) vom Auftragen des Proteinrohextrakt, von der (3) zweiten und (4) zehnten Waschfraktion und (5) den Elutionsfraktionen der Strep-Tactin® Affinitätschromatographie. Strep-Tag-II-gekoppeltes SpyGapDH wurde mittels Strep-Tactin® alkaline phosphatase conjugate und NBT/BCIP detektiert.

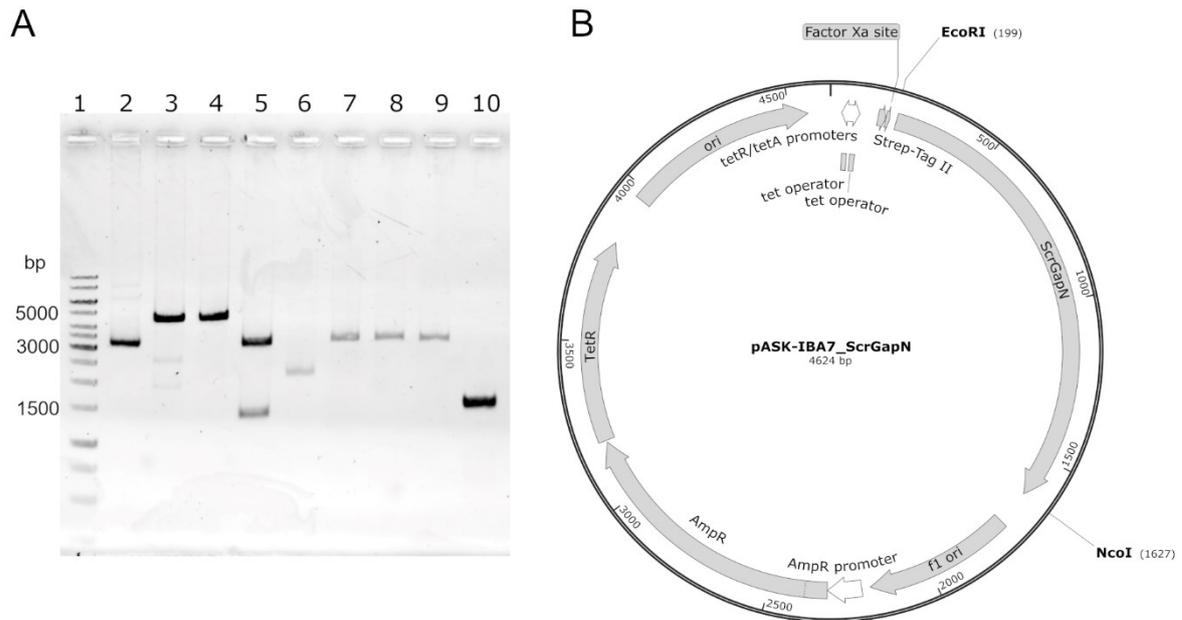
Um die Effekte der SpyGapN-Inhibitoren auf die SpyGapDH Aktivität zu messen, sollte zunächst ein Enzymassay für die GapDH etabliert werden, der dem SpyGapN-Assay möglichst ähnlich ist, um eventuelle Einflüsse von Komponenten unterschiedlicher Assaylösungen auszuschließen. Als Vorlage diente der von Iddar *et al.* (60) publizierte Assay

für die SpyGapDH. Dieser wurde analog dem Assay von SpyGapN modifiziert. So wurde 3 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol durch 0,5 mM DTT ersetzt und die Konzentrationen von G3P auf 2 mM und von NAD<sup>+</sup> auf 10 mM erhöht. Der modifizierte Assay zur Messung der GapDH-Aktivität wurde für die Inhibitor-Analysen angewendet.

#### 4.4.3.2 Heterologe Produktion der *S. cristatus* GapN

Um den Effekt der SpyGapN-Inhibitoren auf ähnliche Enzyme beurteilen zu können, sollte die inhibierende Wirkung der Substanzen auf die ScrGapN untersucht werden. Hierfür war es notwendig, einen Vektor zu konstruieren, der die heterologe Produktion der ScrGapN in *E. coli* und deren Isolierung ermöglicht.

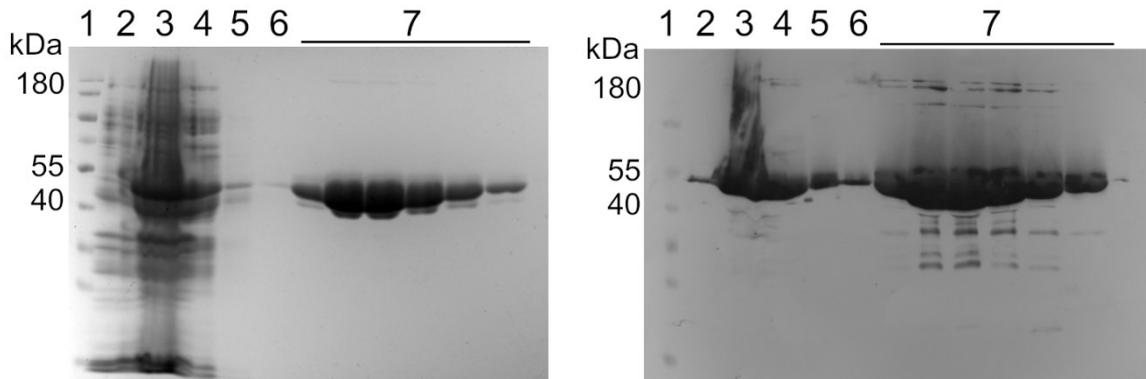
Zunächst wurde die chromosomale DNA von *S. cristatus* isoliert (3.5.1) und als Template-DNA zur Amplifikation von *S. cristatus gapN* mit den Primern 10ScgapN\_331eR und 10ScgapN\_335eF eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt (Abbildung 22A, Spur 10) und das Plasmid pASK-IBA7 wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und NcoI hydrolysiert (3.5.6). Es folgte eine Dephosphorylierung des 5'-Endes des linearisierten Plasmids (3.5.8) und die Ligation mit dem PCR-Produkt (3.5.9). Mit dem Ligationsansatz transformierte *E. coli* DH5 $\alpha$ -Klone (3.5.10) wurden danach im Colony Fast Screen (3.5.11) auf das Vorhandensein eines rekombinanten Plasmids untersucht. Zur weiteren Analyse wurde das Plasmid aus einem im Colony Fast Screen positiven Klon isoliert und mittels Kontrollrestriktionen untersucht. Als Kontrolle wurde zudem der leere pASK-IBA7 den gleichen Reaktionen unterzogen. Alle Reaktionsansätze und das PCR-Produkt der *S. cristatus gapN* wurden im Anschluss in einem Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 22). Das mit EcoRI oder NcoI einfach hydrolysierte pASK-IBA7\_ScrGapN (Spur 3 und 4) hatte eine Größe von 4.000 – 5.000 bp und war größer als die Banden der vergleichbaren Reaktionsansätze vom pASK-IBA7 (Spur 7 und 8). Die Spur mit dem mit EcoRI und NcoI zweifach hydrolysierten pASK-IBA7\_ScrGapN zeigt zwei Banden, wobei die eine auf derselben Höhe wie die des Kontrollplasmids und die andere auf der Höhe des ScrGapN-PCR-Produktes liegt. Die Kontrollrestriktion bestätigte somit die korrekte Konstruktion von pASK-IBA7-ScrGapN (Abbildung 21B). Die abschließende Sanger Sequenzierung bestätigte dieses Ergebnis.



**Abbildung 22 Expressionsplasmid pASK-IBA7\_ScrGapN.** (A) Agarosegel (1 %) der Kontrollrestriktion. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder aufgetragen (1). Zur Analyse wurde pASK-IBA7\_ScrGapN ungeschnitten (2), mit EcoRI (3), mit NcoI (4), mit EcoRI/NcoI (5) verdaut aufgetragen. Als Kontrolle wurde der ungeschnittene pASK-IBA7 (6), sowie mit EcoRI (7), mit NcoI (8), EcoRI/NcoI (9) verdaute pASK-IBA7 und das amplifizierte *S. cristatus gapN* aufgetragen (10). (B) Plasmidkarte des Plasmids. Strep-Tag II – N-terminaler Affinitätstag, Factor Xa site – Erkennungs- und Spaltungsstelle von Faktor Xa, ScrGapN – *S. cristatus gapN*, EcoRI/NcoI – Restriktionsenzymchnittstelle, f1 ori – Replikationsursprung der f1 Bakteriophage, AmpR – Ampicillinresistenzgen, TetR – Tetracyclin Repressor TetR, ColE1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*, tetR/tetA promoters – überlappende Promotoren für *tetR* und *tetA*, tet operator – Bindemotiv für TetR.

Mit dem Plasmid pASK-IBA7\_ScrGapN wurde dann der zur Expression von heterologen Proteinen optimierte *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert (3.5.10). Mit diesem Stamm erfolgte die heterologe Produktion der ScrGapN. Anschließend wurde das Protein mittels Gravity Flow Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert. Der Erfolg der Isolierung wurde mit einer SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und Western Blot analysiert (Abbildung 23). Die Elutionsfraktionen zeigen im Coomassie-gefärbten Gel nur eine der ScrGapN (53,6 kDa) entsprechende Bande auf Höhe von knapp unter 55 kDa. Die zusätzlichen Banden auf Höhe von über 180 kDa, die im Western Blot in den Elutionsfraktionen detektiert wurden, repräsentieren wahrscheinlich das Homotetramer des Proteins. Die Bande unterhalb der 55 kDa-Bande sind möglicherweise Abbruchfragmente der ScrGapN, die mit aufgereinigt wurden. Das Plasmid pASK-IBA7\_ScrGapN kodiert den Strep-Tag II stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle, sodass sich der Tag am N-Terminus der ScrGapN befindet. Somit lässt sich nicht verhindern, dass auch nicht vollständig translatierte Proteine in der Affinitätschromatographie isoliert werden. Nach der Isolierung wurde zunächst nachgewiesen,

dass das isolierte Enzym aktiv ist. Zur Bestimmung der ScrGapN-Aktivität wurde der Assay verwendet, wie er für die SpyGapN etabliert wurde. Mit diesem Protokoll war es möglich, die Aktivität der ScrGapN zu messen.

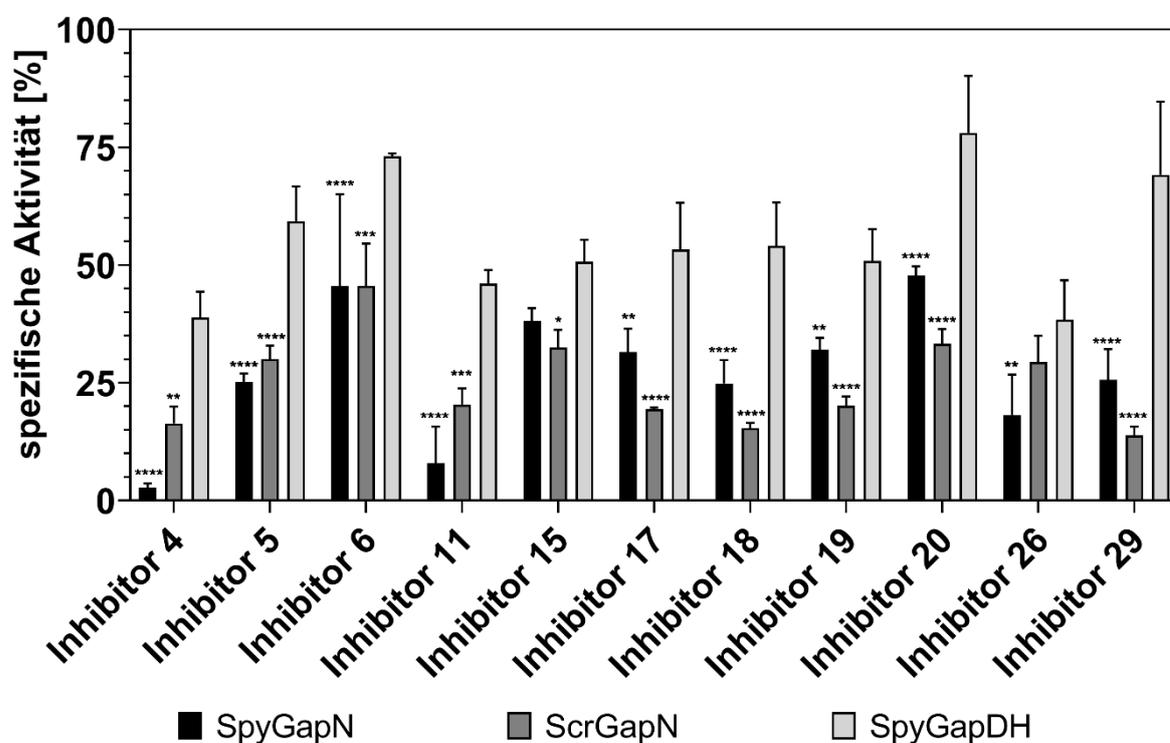


**Abbildung 23. Isolierung von ScrGapN mittels Gravity Flow Affinitätschromatographie.** Coomassie-gefärbetes SDS-PAGE-Gel (links) und Western Blot (rechts). SDS-PAGE-Gel waren beladen mit (1) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa, Proteinrohextrakte (2) vor und (3) nach der Induktion der Expression mit AHT, Durchfluss der Säule (4) vom Auftragen des Proteinrohextrakt, von der (5) zweiten und (6) zehnten Waschfraktion und (7) den Elutionsfraktionen der Strep-Tactin® Affinitätschromatographie. Strep-Tag-II-gekoppeltes SpyGapN wurde mittels Strep-Tactin® alkaline phosphatase conjugate und NBT/BCIP detektiert.

#### 4.4.3.3 Test der Enzymspezifität der SpyGapN-Inhibitoren

Nach erfolgreicher Klonierung, Überexpression und Isolierung der SpyGapDH und der ScrGapN wurde der Effekt der SpyGapN-Inhibitoren auf die beiden Enzyme im Vergleich zur SpyGapN analysiert. Dafür wurden die Inhibitoren mit einer Konzentration von 8 mM in die Standardassaylösungen der einzelnen Enzymassays gegeben und die Aktivität der Enzyme gemessen (Abbildung 24). Alle Inhibitoren reduzierten die Aktivität der SpyGapN und der ScrGapN stärker als die der SpyGapDH. Lediglich bei Inhibitor 15 war dieser Effekt für die SpyGapN nicht signifikant. Dasselbe gilt für Inhibitor 26 bei der ScrGapN-Aktivität. Des Weiteren zeigte sich, dass nicht alle durch das Modell vorhergesagten Substanzen die SpyGapN stärker inhibieren als die ScrGapN. Vielmehr ist bei der Hälfte der Substanzen die ScrGapN stärker inhibiert, was vermutlich auf die Homologie beider Enzyme zurückzuführen ist. Beide Enzyme sind auf Aminosäuresequenzebene zu 75 % identisch. Bei dem *in silico* Vergleich der Strukturen der G3P-Bindetaschen sind beide Strukturen zudem identisch (Jonathan Teuffel und Rebecca Wade, unpublizierte Daten). Da die Bindetasche gleich ist, in der die Substanzen binden, ist auch nicht von einer unterschiedlichen Inhibition auszugehen. Die Spezifität im Vergleich von GapN zur SpyGapDH ist substanzabhängig. Auch dies überrascht nicht, da die Struktur der SpyGapDH-Bindetasche aus publizierten Strukturen sich

deutlich von der SpyGapN-Bindetasche unterscheidet (Jonathan Teuffel und Rebecca Wade, unpublizierte Daten). Die im initialen Screen und bei der Dosisabhängigkeit sehr gut wirkenden Substanzen Nr. 4, 11 und 26 reduzieren auch die SpyGapDH-Aktivität auf unter 50 %. Die Inhibitoren 5 und 29 führen zu einer relativ starken Reduktion der SpyGapN auf ~25 % und reduzieren die SpyGapDH-Aktivität nur auf 60-70 %. Insgesamt ist festzustellen, dass alle getesteten Inhibitoren auch die GapDH-Aktivität reduzieren, und somit nicht hochspezifisch für die SpyGapN sind. Eine Inhibition von weiteren G3P-bindenden Enzymen durch diese Substanzen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Davon war nach dem initialen *in-silico*-Screen allerdings auch nicht auszugehen und es sollten lediglich Ausgangsstrukturen zur Entwicklung eines spezifischen GapN-Inhibitors identifiziert werden.

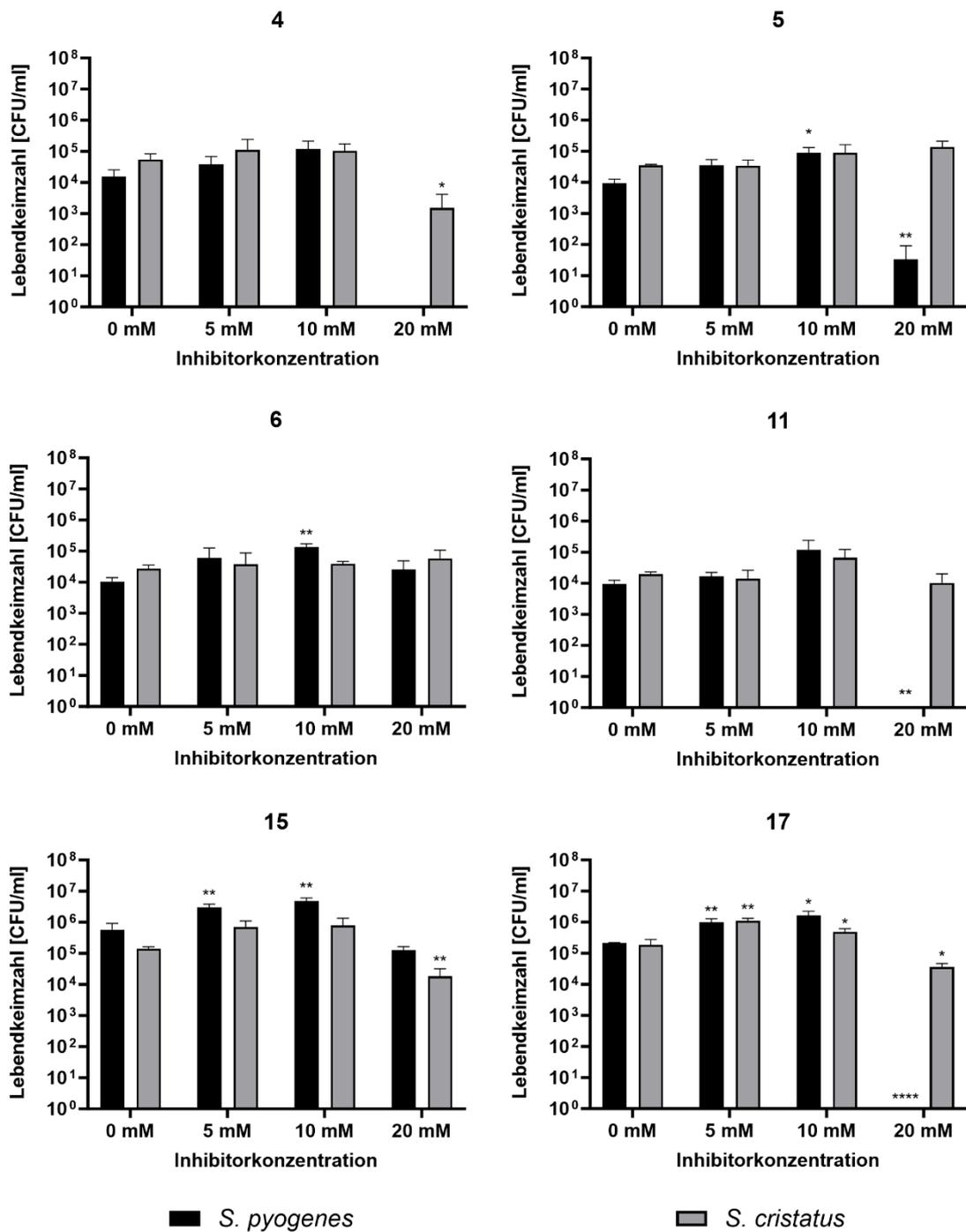


**Abbildung 24. Effekt der Inhibitoren auf die Aktivität von SpyGapN und SpyGapDH sowie ScrGapN.** Die spezifischen Aktivitäten wurden in Gegenwart von 8 mM Inhibitor gemessen und sind relativ zur spezifischen Aktivität der Kontrolle ohne inhibierende Substanzen angegeben. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen;  $n \geq 3$ ; Two-Way ANOVA gefolgt vom Tukey's Multiple Comparisons Test, verglichen mit der entsprechenden SpyGapDH \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

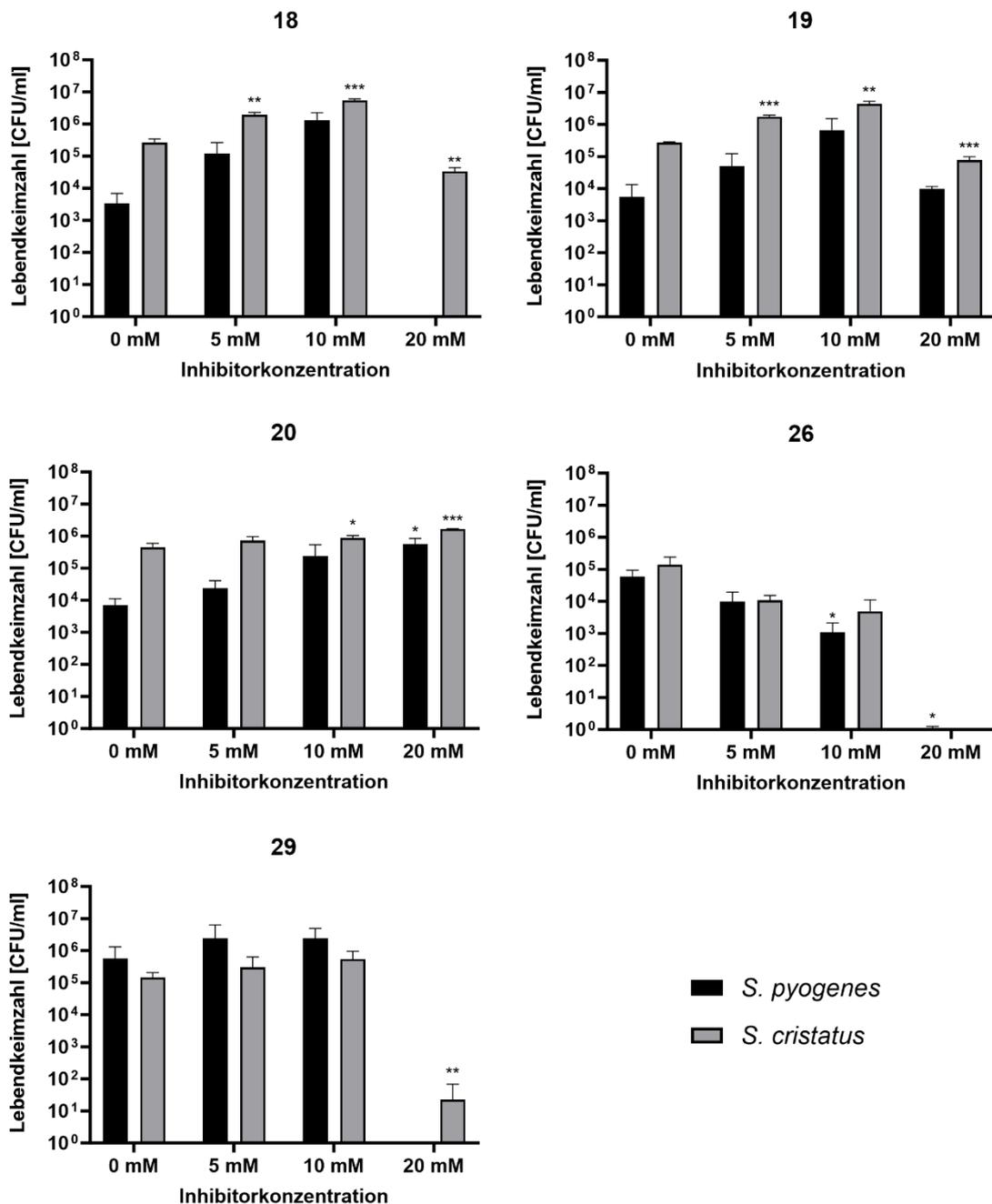
#### 4.4.4 Effekt der inhibierenden Substanzen auf das Überleben von *S. pyogenes* und *S. cristatus*

GapN ist ein cytosolisches Enzym. Es ist daher unumgänglich, dass SpyGapN-Inhibitoren als potenzielle Therapeutika die Zellwand und Zellmembran von *S. pyogenes* überwinden müssen, um das essenzielle GapN zu hemmen. Da für die getesteten Substanzen keine detaillierten Informationen vorlagen, ob diese in Bakterienzellen eindringen können, sollte der Effekt der SpyGapN-Inhibitoren auf das Überleben von *S. pyogenes* untersucht werden. Dies geschah in Kill-Assays analog denen, die mit den PNA durchgeführt wurden. Viele der SpyGapN-Inhibitoren sind Säuren, weshalb es notwendig war, einen stärkeren Puffer als PBS zu verwenden (3.4.2.2). Aus diesem Grund wurde eine Tricin-gepufferte Saline verwendet und der pH-Wert des Puffers leicht auf 8,0 erhöht. Außerdem wurden in den Kill Assays höhere Inhibitorkonzentrationen verwendet als in den Enzym-Assays.

Die Ergebnisse der Kill Assays mit den SpyGapN-Inhibitoren sind in Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt. Für die Inhibitoren 6, 15, 19 und 20 zeigte sich bei keiner getesteten Konzentration eine Reduktion der Lebendkeimzahl von *S. pyogenes* oder *S. cristatus* nach der sechsstündigen Inkubation mit den Inhibitoren. Die Inhibitoren 4, 11, 17, 18, 29 hingegen bewirkten in einer Konzentration von 20 mM ein vollständiges Abtöten von *S. pyogenes*. Nach 6-stündiger Inkubation mit diesen Inhibitoren waren keine koloniebildenden Einheiten mehr nachweisbar. Gleichzeitig führte die Inkubation von *S. cristatus* mit denselben fünf Inhibitoren lediglich bei den Substanzen 4 und 29 zu einer signifikant erniedrigten Lebendkeimzahl. Inhibitor 5 reduzierte die Lebendkeimzahl von *S. pyogenes* bei 20 mM um ca. 2,5 Log-Stufen während *S. cristatus* nach Inkubation mit dieser Substanz eine erhöhte Lebendkeimzahl aufwies. Inhibitor 26 verursachte eine Reduktion der Lebendkeimzahlen bei beiden Spezies, wobei der Effekt klar dosisabhängig ist. Der Effekt auf *S. cristatus* war hierbei stärker ausgeprägt. Nach 6 h Inkubation mit 20 mM Inhibitor 26 waren keine koloniebildenden Einheiten von *S. cristatus* mehr nachzuweisen.



**Abbildung 25.** Überleben von *S. pyogenes* M49 591 und *S. cristatus* nach 6 h-Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 4, 5, 6, 11, 15 und 17. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n \geq 3$ , t-Test, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Abbildung 26.** Überleben von *S. pyogenes* M49 591 und *S. cristatus* nach 6 h Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 18, 19, 20, 26 und 29. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen, n ≥ 3, t-Test, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

Um ein besseres Verständnis für den Effekt auf das Überleben der Bakterien zu bekommen, wurde mit den Inhibitoren 4, 5, 11, 17, 18, 26 und 29, welche im Kill Assay die Bakterien abtöteten, eine Überlebens-Kinetik unter denselben Assay-Bedingungen aufgenommen

(3.4.2.2). Die Überlebenskurven sind in Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt.

Bei Inkubation von *S. pyogenes* und *S. cristatus* mit 10 mM der Inhibitoren reduzierte nur Inhibitor 26 die Lebendkeimzahl. Bei Zusatz von 10 mM aller anderen Inhibitoren waren die Lebendkeimzahlen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell erhöht, sodass es den Anschein erweckt, als würden die Inhibitoren in niedrigen Konzentrationen das Überleben der Bakterien fördern. Die beobachteten Effekte sind jedoch sehr wahrscheinlich auf einen pH-Effekt zurückzuführen. Da ein Großteil der Substanzen Säuren sind, wurde das Protokoll des Kill Assays mit den Inhibitoren im Vergleich zu den PNA Kill Assay angepasst. Um dem Effekt der Erniedrigung des pH-Wertes durch die Substanzen entgegenzuwirken, wurde der pH-Wert leicht von pH 7,4 auf pH 8,0 erhöht. Die Zugabe von geringen Konzentrationen der Säuren bewirkt daraufhin eine Verlagerung des pH-Wertes in ein neutrales Milieu, welches das Überleben der Bakterien fördert. Die Überlebenskurven resultieren somit aus einer Mischung aus pH-Wert Effekten kombiniert mit den Effekten der Substanzen als Inhibitor. Die Inkubation von *S. pyogenes* mit 20 mM Inhibitor 4 führte dazu, dass schon nach 2 Stunden keine lebenden Bakterien mehr nachgewiesen werden konnte. Bei *S. cristatus* war dieser Effekt weniger ausgeprägt. Auch hier reduzierten jedoch 20 mM Inhibitor 4 über die Zeit die Lebendkeimzahl. Der Zusatz von 20 mM Inhibitor 5 führte bei *S. cristatus* analog zu dem bei 10 mM beobachteten Effekt ebenfalls zu einer leichten Steigerung der Lebendkeimzahl über den Zeitverlauf im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu nahm die Lebendkeimzahl von *S. pyogenes* bei dieser Konzentration konstant über sechs Stunden ab und es waren nach 8 h keine lebenden Bakterien mehr nachzuweisen. Dieser speziesspezifische Effekt war auch für Inhibitor 11 und 17 nachzuweisen. Inhibitor 11 führte bei *S. pyogenes* bei 20 mM zum Abtöten aller Bakterien innerhalb von 4 h, hatte jedoch auf *S. cristatus* keinen Effekt. Die Inkubation von *S. pyogenes* mit Inhibitor 17 und 18 führte bei 20 mM zum Absterben der Bakterien in den ersten zwei bzw. 4 Stunden. Das Überleben von *S. cristatus* wurde auch von diesen Inhibitoren nicht wesentlich beeinflusst. Inhibitor 29 reduzierte über die Zeit die Lebendkeimzahl beider getesteten Spezies, sodass für *S. pyogenes* nach 4 h und für *S. cristatus* nach 8 h keine lebenden Bakterien mehr nachweisbar waren. Wie bereits in den Kill Assays beobachtet, waren auch im Zeitverlauf die Effekte von Inhibitor 26 deutlich, aber nicht speziesspezifisch. Bereits die Konzentration von 10 mM reduzierte über die Zeit tendenziell die Lebendkeimzahl beider Spezies und die Inkubation mit 20 mM resultierte darin, dass nach 6 h Inkubation bei beiden Spezies keine koloniebildenden Einheiten mehr nachgewiesen werden konnten.

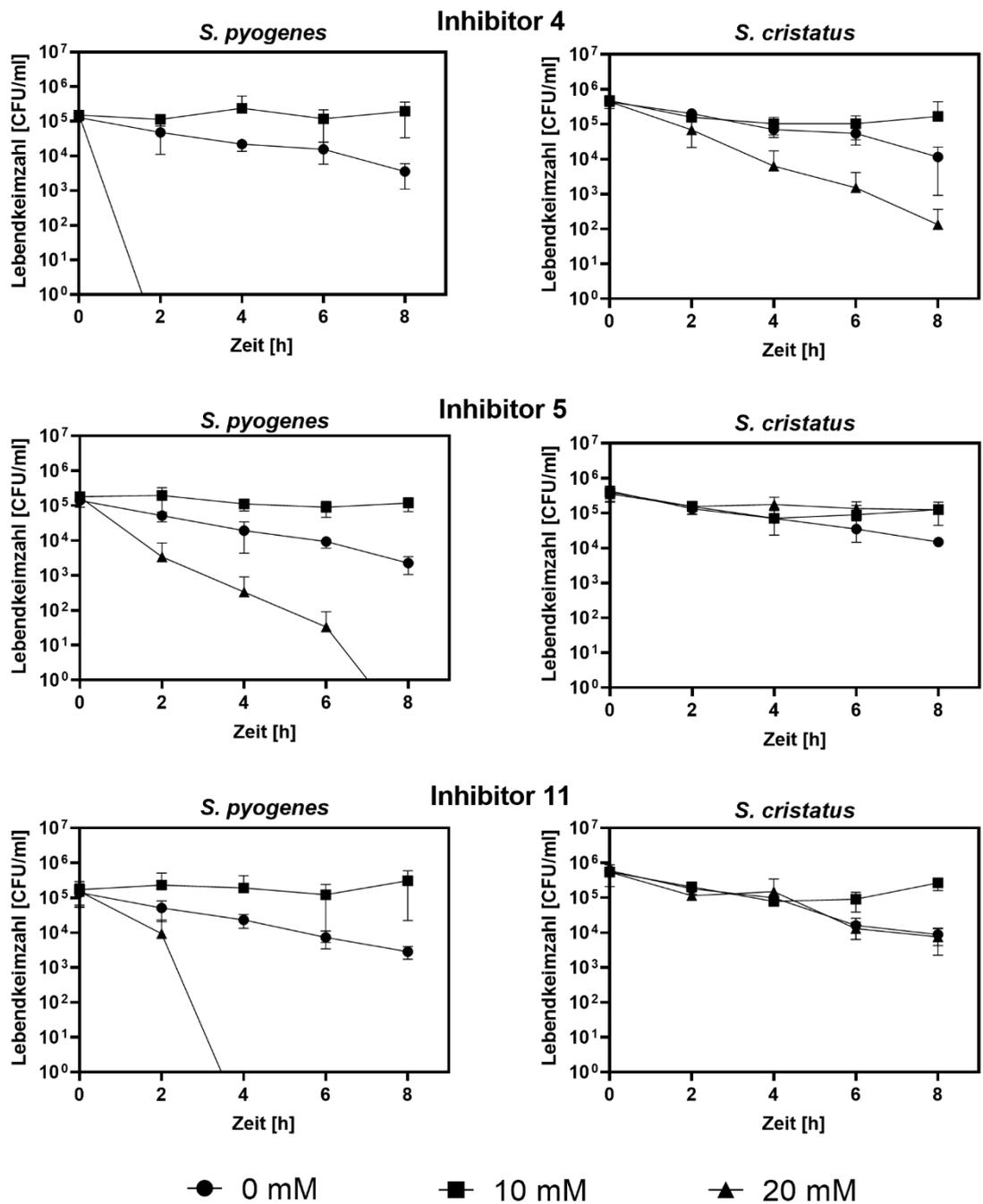


Abbildung 27 Überlebenskurven von *S. pyogenes* M49 591 und *S. cristatus* bei Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 4, 5 und 11. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 3.

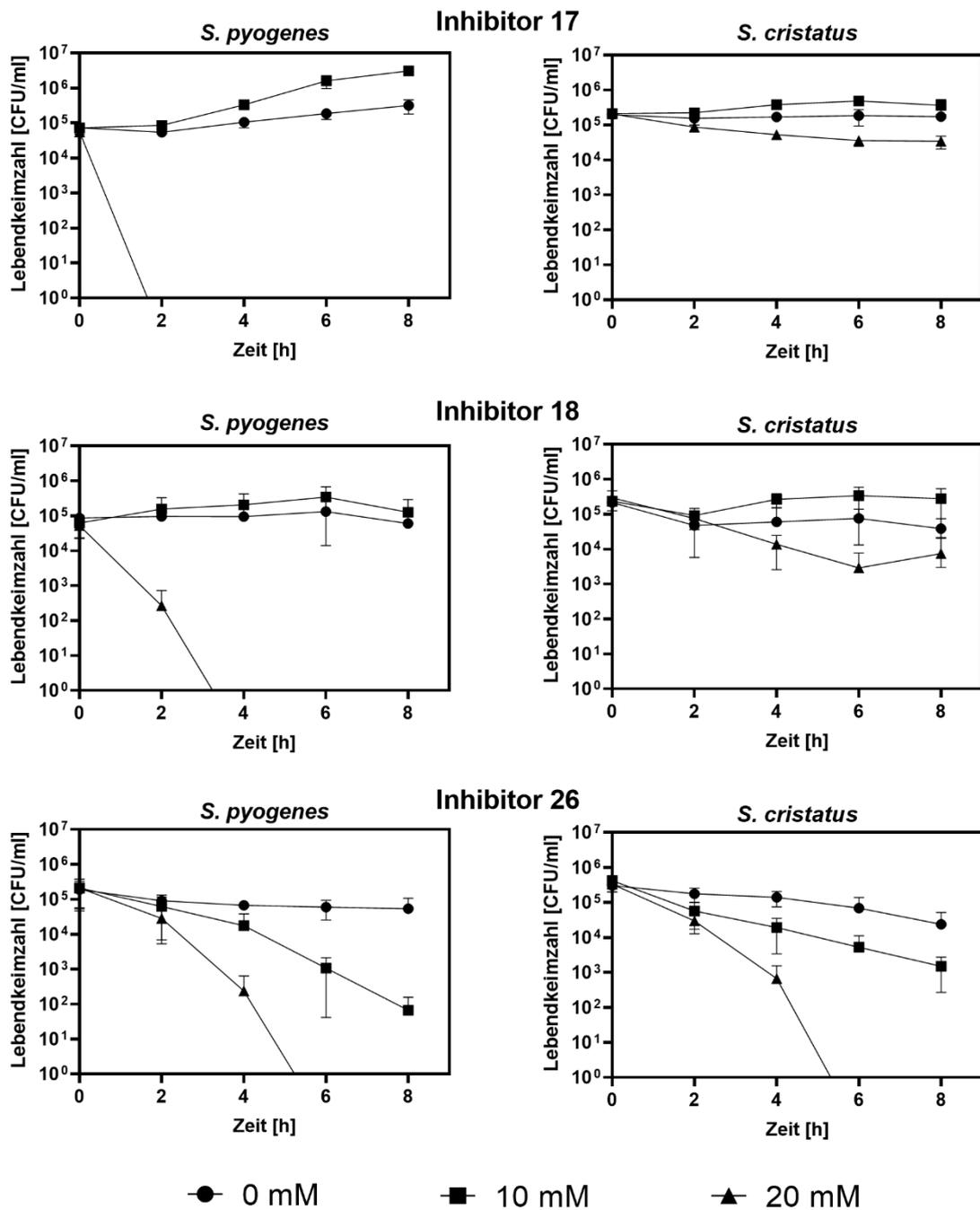
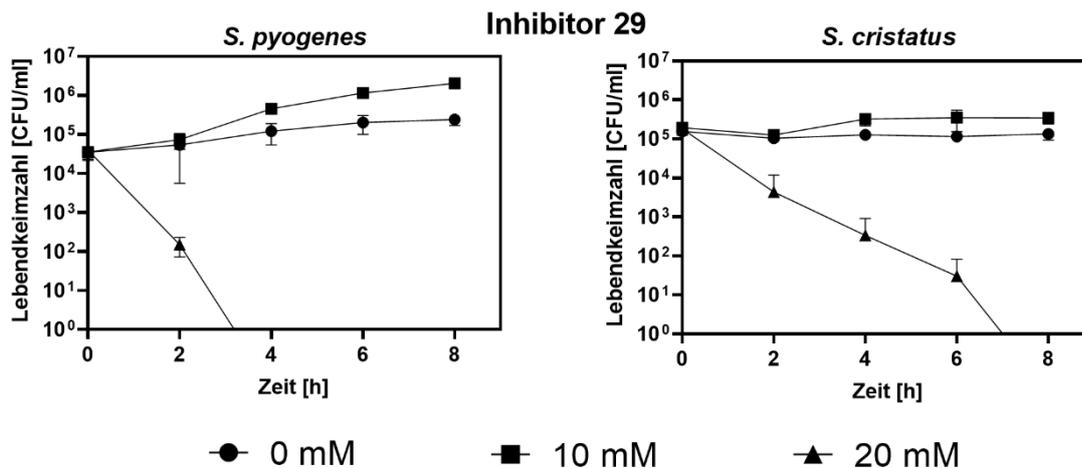


Abbildung 28. Überlebenskurven von *S. pyogenes* M49 591 und *S. cristatus* bei Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 17, 18 und 26. Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 3.



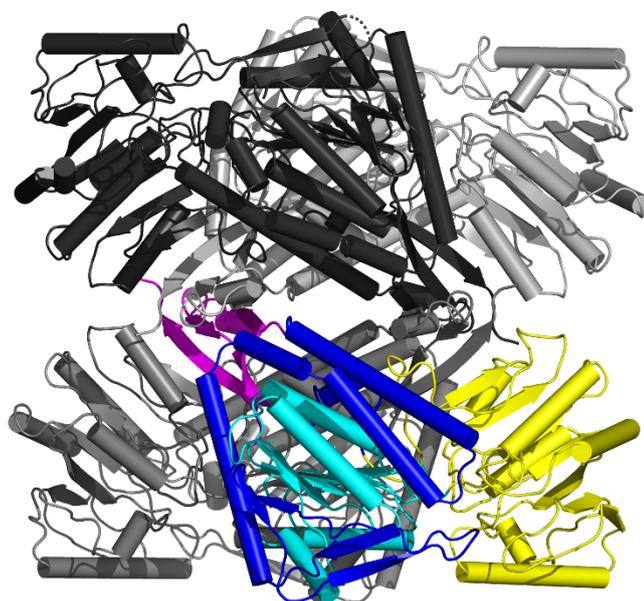
**Abbildung 29.** Überlebenskurven von *S. pyogenes* M49 591 und *S. cristatus* bei Inkubation mit dem SpyGapN-Inhibitor 29. Inhibitornummer entspricht der Nummer in Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 3.

Alle in den Time-Kill Assays getesteten SpyGapN-Inhibitoren führten somit zu einer Reduktion der Lebendkeimzahl bei *S. pyogenes*. Bei den Inhibitoren 5, 11, 17 und 18 war dieser Effekt eindeutig speziesspezifisch, während die Inhibitoren 4, 26 und 29 auch das Überleben von *S. cristatus* reduzierten.

## 4.5 Fragmentscreening

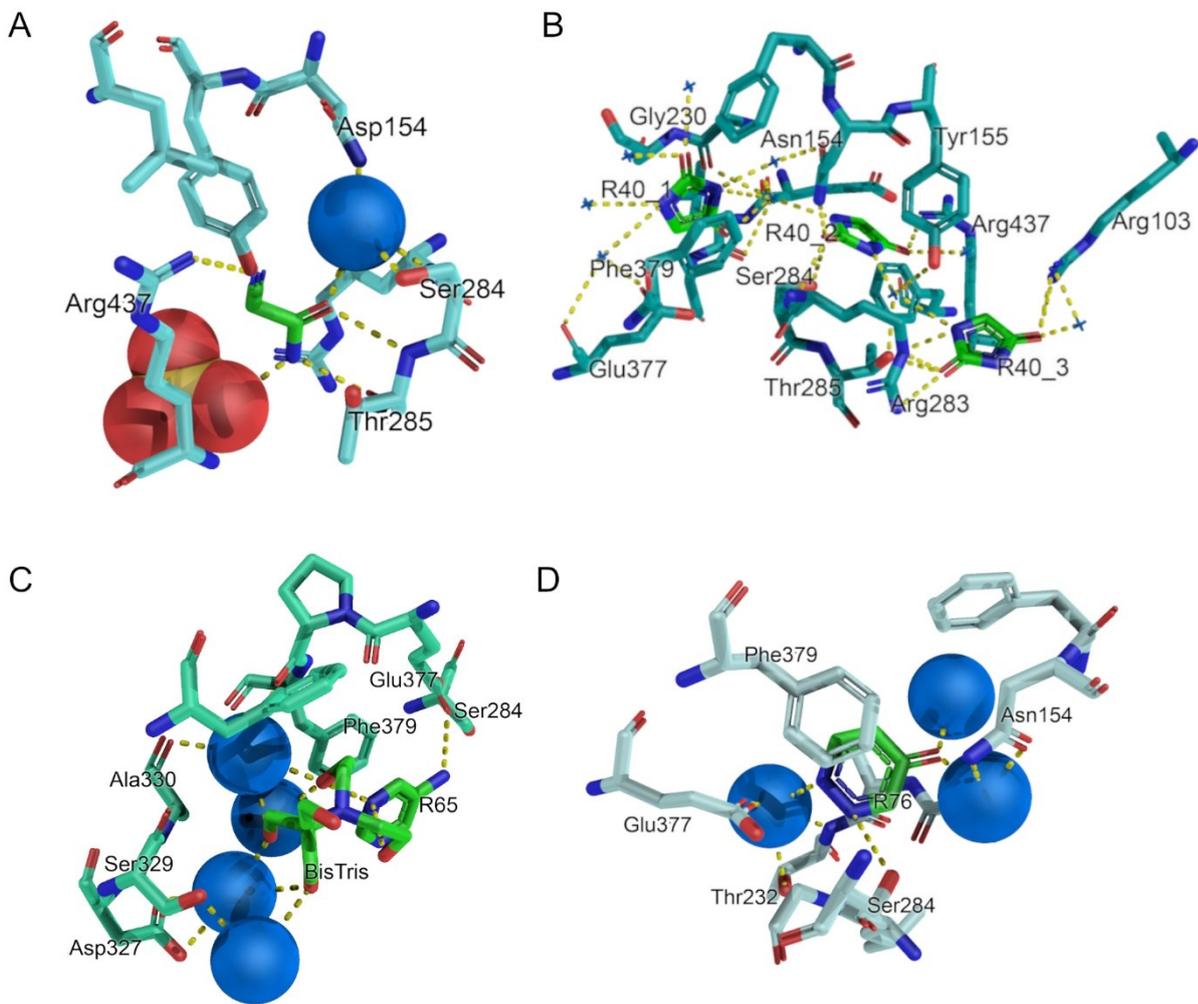
Zusätzlich zum Molecular Docking wurde eine weitere Methode verwendet, um potenzielle SpyGapN-Inhibitoren zu identifizieren. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hermann Schindelin am Rudolph-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg hat dafür ein Fragmentscreening durchgeführt. Dies sollte kleine Fragmentmoleküle identifizieren, die in die Substrat- oder Co-Faktor-Bindetaschen von SpyGapN binden und die in der Folge als Ausgangspunkt für die Entwicklung spezifischer SpyGapN-Inhibitoren dienen sollten. Für dieses Screening wurde SpyGapN<sup>C284S</sup> zunächst aus einer 2,5 mg/l konzentrierten Proteinlösung (0,02 M HEPES pH 8,5, 0,125 M NaCl) kristallisiert. Dabei wurde die Mutante SpyGapN<sup>C284S</sup> verwendet in der an der Stelle 284 das Cystein durch Serin ersetzt. Dies war notwendig, da das Cystein in der Kristallisation zuvor modifiziert war und keine korrekte Struktur der SpyGapN ohne Modifikation bestimmt werden konnte. Die Kristallisation erfolgte in 0,1 M BisTris pH 6,7, 0,2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 21-22 % w/v Polyethylenglykol 3350. Die Kristallstruktur eines SpyGapN-Tetramers ist in Abbildung 30 dargestellt. Nach der Kristallisation wurden die SpyGapN-Kristalle mit Lösungen von 80 verschiedenen Fragmentmolekülen getränkt und diese Kristalle mittels

Röntgenstrukturanalyse auf das Vorhandensein dieser Moleküle in einer der beiden Bindetaschen untersucht (89).



**Abbildung 30. Kristallstruktur des Tetramers der SpyGapN<sup>C284S</sup> Mutante.** Jedes Monomer besteht aus einer hervorstehenden Domäne (magenta), einer Cofaktor-bindenden Domäne (cyan) und einer katalytisch aktiven Domäne (gelb). (Abbildung aus Eisenberg *et al.* (58)).

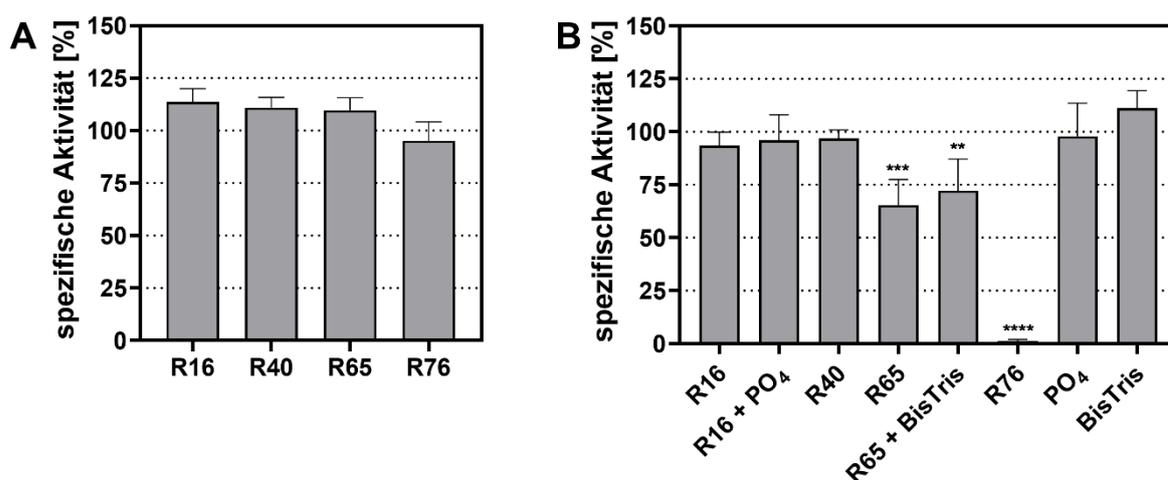
Bei diesem Fragmentscreening war es möglich, vier verschiedene Substanzen zu identifizieren, die in den Bindetaschen gebunden hatten (Abbildung 31). Zwei Substanzen zeigten dabei eine Bindung zur G3P-Bindetasche (R16 und R40), während drei Substanzen in der NADP-Bindetasche gebunden hatten (R40, R65 und R76). Die identifizierten Substanzen sind in Tabelle 13 zusammengefasst und sollten in dieser Arbeit auf ihr Potenzial als SpyGapN-Inhibitor und Ausgangspunkt für ein Drug Design untersucht werden.



**Abbildung 31. Polare Wechselwirkungen der Fragmente mit SpyGapN.** Interaktionen des (A) Fragments R16 (grün), (B) der Fragmente R40 (grün), (C) des Fragments R65 (grün) und (D) des Fragments R76 (grün) mit den umgebenden Aminosäureresten der Proteinstruktur (aquamarin, türkis, grün-cyan, blasscyan). Sulfat (farbkodiert nach Atomen) und Wassermoleküle (marine) sind als Kugeln bzw. Kreuze (B) dargestellt. In der Struktur in (C) bildet ein BisTris-Molekül (grün) ebenfalls polare Wechselwirkungen. Für die Darstellung wurden die Ketten H (A, B), G (C) und F (D) aus der Struktur gewählt (Abbildungen aus Wandinger 2022 (89)).

Auch für die im Fragmentscreening identifizierten Substanzen wurde zunächst der Effekt auf die SpyGapN-Aktivität in einem Screening analysiert, wobei keines der Fragmente eine inhibierende Wirkung zeigte (Abbildung 32 A). Die im Enzymassay getestete Konzentration von 4 mM war jedoch auch deutlich geringer als die im Fragmentscreening eingesetzte Konzentration (333 mM bis 1 M). Des Weiteren zeigten sich bei der Analyse der Kristalle mit den Fragmentmolekülen weitere Moleküle in der Kristallstruktur in unmittelbarer Nähe zum Fragmentmolekül. Für R16 wurde die zusätzliche Struktur als  $\text{SO}_4^{2-}$  aus der Kristallisationslösung modelliert. Bei Fragment R76 wurde zudem BisTris in der Bindung

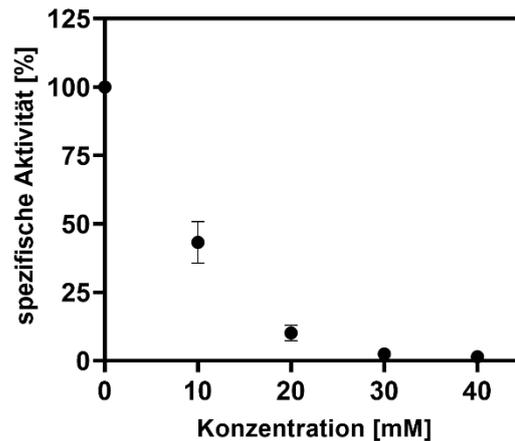
gefunden und könnte relevant für diese sein. Aus diesen Gründen wurde der Screening-Assay für die inhibierenden Effekte dieser Substanzen angepasst. Zunächst wurde die Konzentration der Fragmentmoleküle auf 40 mM erhöht. Zusätzlich wurde der Effekt von R76 bei dieser erhöhten Konzentration in Kombination mit BisTris getestet. Auch für R16 sollte der Einfluss der erhöhten Konzentration mit  $\text{SO}_4^{2-}$  untersucht werden. Dies war jedoch nicht möglich, da das Substrat G3P als Bariumsulfat vorlag und Bariumionen in Lösung mit Sulfationen einen schwerlöslichen Niederschlag bilden (93). Um den Einfluss des in der Struktur gefundenen Sulfats trotzdem untersuchen zu können, wurde stattdessen das strukturell sehr ähnliche Phosphat  $\text{PO}_4^{3-}$  verwendet. In diesem angepassten Screen zeigte sich, dass die erhöhte Konzentration bei R65 und R76 eine Inhibition der SpyGapN auslöst (Abbildung 32 B). R65 reduziert die Aktivität auf ca. 60 % und 40 mM R76 inhibierten die Aktivität nahezu vollständig. Für R16 und R40 zeigte sich auch in der erhöhten Konzentration kein Effekt auf die SpyGapN. Das zusätzlich getestete BisTris und Phosphat führten nicht zu einer Erhöhung der inhibierenden Effekte.



**Abbildung 32. Einfluss von im Fragmentscreening identifizierten potenziellen Inhibitoren auf die spezifische Aktivität von SpyGapN.** Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 13. Spezifische Aktivitäten wurden in der Präsenz von (A) 4 mM Inhibitor bzw. (B) 40 mM Inhibitor, ggf. in Kombination mit den Zusätzen 200 mM  $\text{PO}_4$  und 100 mM BisTris, gemessen und ist relativ zur Kontrolle ohne inhibierende Substanzen dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen;  $n = 3$ ; one-way ANOVA gefolgt vom Dunnett's Multiple Comparisons Test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

R76 zeigt somit bei dieser hohen Konzentration eine sehr starke inhibierende Wirkung, während es im initialen Screen keinen Effekt hatte. Um diesen dosisabhängigen Effekt noch weiter zu untersuchen, wurde im Anschluss die SpyGapN-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen von Fragment R76 analysiert (Abbildung 33). SpyGapN zeigte dabei bereits

bei 30 mM kaum eine Aktivität und auch 20 mM reduzierte die Aktivität auf ca. 10 %. Die Inhibition der SpyGapN mit R76 ist somit konzentrationsabhängig. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass R76 ein vielversprechender Kandidat zur Entwicklung einer antimikrobiellen Substanz ist. Wie bereits bei den weiteren Inhibitoren muss sich eine Analyse der Enzymspezifität und eine Analyse der Effekte dieser Substanz auf die Bakterien anschließen.



**Abbildung 33. Dosisabhängiger Effekt der Substanz R76 auf die SpyGapN-Aktivität.** Spezifische Aktivitäten wurden in Gegenwart von Substanz R76 in den angegebenen Konzentrationen gemessen und sind im Verhältnis zur spezifischen Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 4.

## 5 Diskussion

Infektionskrankheiten haben auch im 21. Jahrhundert noch eine große gesellschaftliche Relevanz. Dies wurde insbesondere in der COVID-19 Pandemie in den Jahren 2019-2023, die zu weltweit 770 Millionen Infizierten und 7 Millionen Toten geführt hat, deutlich (94). Ähnlich hohe Fallzahlen haben auch Infektionen mit dem Humanpathogen *S. pyogenes*. Dieses Bakterium führt auf der ganzen Welt zu ca. 727 Millionen Fällen an Tonsillitis, Pharyngitis und Hautinfektionen, aber auch zu einer halben Million Toten pro Jahr (13). Die Behandlung dieser Infektionen ist insbesondere bei Makrolid-resistenten Stämme erschwert. Ziel dieser Arbeit war es daher, die nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GapN als neues Drug Target in *S. pyogenes* zu etablieren.

### 5.1 GapN als Drug Target in *S. pyogenes*

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen. Es gibt die NAD-abhängige GapDH (EC 1.2.1.12), die NADP-abhängige GapDH (EC 1.2.1.13) und die NADP-abhängige GapN (EC 1.2.1.9). Die ersten beiden Enzyme setzen G3P reversibel zu 1,3-Bisphosphoglycerat um und sind dabei abhängig von anorganischem Phosphat. Die GapN dagegen wandelt phosphatunabhängig G3P in 3-Phosphoglycerat um. GapN wurde zuerst in Pflanzengewebe beschrieben (95, 96). Verwandte Enzyme kommen aber auch in Archaeen und Bakterien vor (59, 97–99). Die physiologische Funktion ist in vielen Organismen bisher aber unklar. Für *Streptococcus equinus* wurde postuliert, dass das Enzym vermutlich eine wichtige Rolle im NADPH-Stoffwechsel hat (100). NADPH ist ein essenzieller Cofaktor in anabolen Reaktionen wie zum Beispiel der Fett- und Aminosäurebiosynthese (101). Die Hauptquellen für NADPH sind in den meisten Bakterien die beiden oxidierenden Reaktionen im Pentosephosphatweg (54). Die Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die diese beiden Reaktionen katalysieren, sind aber nicht im Genom aller Bakterien kodiert und fehlen auch in vielen Streptokokken. In diesen Bakterien könnte GapN die Hauptquelle für NADPH und somit essenziell sein (58).

Le Breton *et al.* identifizierten auf Grundlage der Analyse von hoch gesättigten Transposonmutanten-Bibliotheken (Transposoninsertionen ca. alle 25 Nukleotide) *gapN* als ein essenzielles Gen im Core-Genom von *S. pyogenes* (52). Dies wurde durch einen Knock-down des *gapN*-Gens in dem Laborstamm *S. pyogenes* M49 591 bestätigt (73). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch für die sieben untersuchten Makrolid-resistenten klinischen Isolate von *S. pyogenes* eine Reduktion der Lebendkeimzahl durch Behandlung mit *gapN*-asPNA nachgewiesen. Ein signifikanter Effekt war bei Konzentrationen ab 2-4  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen. Der Laborstamm *S. pyogenes* M49 591 zeigte eine signifikante Reduktion der

Lebendkeimzahl bereits ab 1  $\mu\text{M}$  *gapN*-asPNA (73). Die inhibitorischen Konzentrationen der *gapN*-asPNA liegen damit im selben Bereich, der zuvor für asPNA-Knock-downs von anderen bekannten essenziellen Genen bei grampositiven Bakterien beschrieben wurde. So wurde bei *S. pyogenes* die Reduktion der Anzahl lebensfähiger Bakterien mit (RXR)<sub>4</sub>XB gekoppelter *gyrA*-asPNA im gleichen Versuchsaufbau bei einer Konzentration von  $\geq 4$   $\mu\text{M}$  beschrieben (70). Für *Streptococcus pneumoniae* wurde gezeigt, dass  $\geq 5$   $\mu\text{M}$  (RXR)<sub>4</sub>XB- und TAT-gekoppelte *gyrA*-asPNA zu einer signifikanten Reduktion der Lebendkeimzahl führten (102). Ein asPNA-Knock-down von *gyrA* und *fmbB*, welches für ein Protein in der Zellwandsynthese codiert (103), mit 10  $\mu\text{M}$  (KFF)<sub>3</sub>K gekoppelter PNA führte bei *Staphylococcus aureus* zu einem verminderten Wachstum der Bakterien (104). Die minimalen Hemmkonzentrationen von asPNA gegen das *rpoD*-Gen, das den RNA-Polmerase Sigma-Faktor D kodiert, liegen bei *Staphylococcus aureus* je nach verwendetem CPP im Bereich von 6,25-12  $\mu\text{M}$  (105). Für klinische Isolate von *Listeria monocytogenes* wurde eine minimale Hemmkonzentration von (RXR)<sub>4</sub>XB gekoppelter *rpoA*-asPNA von  $\leq 4$   $\mu\text{M}$  bestimmt (106).

Antisense-PNA hemmen die Translation ihrer Zielgene in den Bakterien (107, 108). In vielen publizierten Arbeiten erfolgt der Nachweis über den Erfolg der asPNA-Behandlung nicht nur durch Wachstumsinhibitions- und Kill Assays (70, 71, 102, 105, 106, 109), sondern es werden häufig zusätzlich Analysen der Transkriptabundanz des Zielgens in entsprechend behandelten Bakterien durchgeführt (70, 71, 102, 106, 109). Für die Bakterienspezies *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* und *L. monocytogenes* sind beispielweise RNA-Abundanzreduktionen von etwa 50 % bei PNA-Konzentrationen von etwa 2  $\mu\text{M}$  beschrieben (70, 71, 102, 106). Im Vergleich dazu wurde beschrieben, dass mit den in einer anderen Studie verwendeten CPP-PNA-Konstrukten eine Reduktion der Transkriptabundanz von  $\geq 50$  % in den Spezies *E. coli*, *Salmonella enterica* und *Klebsiella pneumoniae* erst bei Konzentrationen von  $\geq 25$   $\mu\text{M}$  erreicht wird (109).

Bai *et al.* konnten für verschiedene Spezies zeigen, dass die asPNA-Behandlung auch zu einer Reduktion der Proteinmenge des vom Zielgen der asPNA kodierten Proteins führt (109). Ein entsprechender Nachweis konnte in dieser Arbeit auch für die *gapN*-asPNA-Behandlung von *S. pyogenes* erbracht werden. Hier führte die Behandlung der Bakterien mit 2  $\mu\text{M}$  *gapN*-asPNA zu einer Reduktion der cytosolischen GapN-Aktivität um ca. 75 %. In *E. coli* wurden die Auswirkungen der PNA-basierten Translationshemmung der Gene für die beiden Enzyme  $\beta$ -Galactosidase und  $\beta$ -Lactamase beschrieben (110). Die Behandlung der Bakterien mit 2  $\mu\text{M}$  bzw. 4  $\mu\text{M}$  einer asPNA, die gegen das  $\beta$ -Galactosidase-Gen gerichtet war, führten zu einer Reduktion der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität um 40 % bzw. 60 %. Im Falle der  $\beta$ -Lactamase resultierte die Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  der effektivsten PNA zu einer Reduktion der Aktivität um 60 %, bei Einsatz von 4  $\mu\text{M}$  um 75 %. Die in dieser Arbeit mit der *gapN*-asPNA in *S. pyogenes*

erzielte Aktivitätsreduktion liegt also in der gleichen Größenordnung bzw. ist sogar etwas stärker.

Zusammengenommen zeigen die Versuche mit den *gapN*-asPNA, dass ein Knock-down von *gapN* die intrazelluläre GapN-Aktivität in *S. pyogenes* reduziert und die Bakterien abtötet. Die *gapN*-asPNA sind dabei ähnlich effizient wie asPNA gegen andere essenzielle Gene in grampositiven Bakterien. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass sich GapN als Drug Target in *S. pyogenes* eignet.

## 5.2 GapN ist die Hauptquelle für NADPH in *S. pyogenes*

Der Grund, aus dem GapN essenziell ist, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Für *S. mutans* und *S. equinus* wurde bereits postuliert, dass GapN in diesen Spezies eine wichtige Rolle im NADPH Metabolismus hat (100, 111, 112). Als wichtigster Stoffwechselweg in der NADPH-Produktion gilt der oxPPP. Bei der Analyse verschiedener Streptokokken-Genome auf die Präsenz beider Stoffwechselwege wurde gezeigt, dass die Streptokokken sich in drei Gruppen einteilen lassen (58). Es gibt Streptokokken, die beide Stoffwechselwege haben, sowie Streptokokken die nur GapN oder nur den oxPPP haben. Dies deutet darauf hin, dass mindestens einer der beiden Stoffwechselwege vorhanden sein muss, damit die Bakterien überleben können. Die Hypothese über den Zusammenhang zwischen der Präsenz des oxPPP und der Rolle von GapN im NADPH Metabolismus konnte in dieser Arbeit anhand der Untersuchungen an *S. equisimilis* (GapN<sup>+</sup>/oxPPP<sup>-</sup>) und *S. cristatus* (GapN<sup>+</sup>/oxPPP<sup>+</sup>) unterstützt werden. Für beide Spezies konnte in dieser Arbeit erstmals eine erfolgreiche asPNA-Behandlung etabliert werden. (RXR)<sub>4</sub>XB erwies sich in beiden Spezies als geeignetes CPP um asPNA in die Bakterien aufzunehmen. Beide Spezies zeigten nach Behandlung mit (RXR)<sub>4</sub>XB gekoppelter *gyrA*-asPNA eine signifikante Reduktion der Lebendkeimzahl. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass GapN dann essenziell ist, wenn der oxPPP fehlt, war es möglich, bei *S. equisimilis* (GapN<sup>+</sup>/oxPPP<sup>-</sup>) mit 5 µM *gapN*-asPNA eine signifikante Reduktion der Lebendkeimzahl zu erzielen. Auch hier liegt die zur Keimzahlreduktion notwendige Konzentration an asPNA im gleichen Bereich wie für andere essenzielle Gene bei grampositiven Bakterien beschrieben (70, 102, 104–106). Eine solche Reduktion der Lebendkeimzahl war bei *S. cristatus* (GapN<sup>+</sup>/oxPPP<sup>+</sup>) mit *gapN*-asPNA nicht möglich. Diese zeigte auch bei höheren PNA-Konzentrationen keinen Effekt auf das Überleben der Bakterien. Dass *S. cristatus* aber grundsätzlich mit PNA zu hemmen ist, wird durch die Hemmung bei der Verwendung von 5 µM *gyrA*-asPNA deutlich.

Zu erwähnen ist, dass im Genom von *S. pyogenes* ein weiteres Enzym kodiert ist, welches NADPH produziert. Es handelt sich hierbei um die vom *gabD*-Gen kodierte Succinatsemialdehyddehydrogenase GabD (53, 113, 114). GabD katalysiert die irreversible Reaktion von Succinatsemialdehyd und NADP<sup>+</sup> zu Succinat und NADPH und ist Teil des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Stoffwechsels (GABA-Stoffwechsel) (114). Die GabD von *S. pyogenes* zeigt dabei eine Cofaktor-Spezifität für NADP<sup>+</sup> und *gabD* wird konstant exprimiert (91, 114). Die weiteren Enzyme des GABA-Stoffwechsels sind im Genom von *S. pyogenes* jedoch nicht kodiert und nach der KEGG-Datenbank hat GabD auch keinen Anschluss an weitere Stoffwechselwege in *S. pyogenes* (115–118). Es ist daher fraglich, ob GabD tatsächlich eine Rolle im (NADPH-)Stoffwechsel von *S. pyogenes* spielt. Das *gabD*-Gen findet sich zudem in den von Le Breton *et al.* publizierten nicht essenziellen Genen von *S. pyogenes*. Die Funktion von GabD sollte in zukünftigen Arbeiten detaillierter untersucht werden.

Um die Regulation und Einbindung von SpyGapN in den Stoffwechsel besser zu verstehen, wurde der Einfluss von verschiedenen Stoffwechselintermediaten, Zuckern und Salzen auf die Aktivität des Enzyms untersucht. Für GapN aus *S. mutans* ist bereits gezeigt worden, dass Phosphohydroxypyruvat, E4P und S7P die spezifische Aktivität hemmen (59). Auch für GapN aus Algen oder Pflanzengewebe wurde eine Hemmung durch E4P beschrieben (119, 120). Der Effekt von E4P konnte im Rahmen dieser Arbeit für die SpyGapN bestätigt werden. S7P hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die SpyGapN-Aktivität. E4P und S7P werden im nicht-oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Wegs produziert (121, 122), welcher auch in *S. pyogenes* vorhanden ist. Die physiologische Bedeutung der GapN-Inhibition durch Intermediate des nicht-oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Wegs ist nicht geklärt. Für die GapN aus Gewebe von Erbsensprossen wurde postuliert, dass diese Inhibition mit dem NADPH-Level zusammenhängt (120). Im Gewebe der Erbsensprossen ist im Gegensatz zu *S. pyogenes* jedoch auch der oxidative Teil der Pentose-Phosphat-Wegs vorhanden. Somit lässt sich argumentieren, dass hohe E4P-Konzentrationen aus einer hohen Aktivität des Pentosephosphatwegs resultieren und somit – bei Vorhandensein des vollständigen PPP – viel NADPH produziert wird. GapN würde in dieser Situation in Organismen mit vollständigem PPP nicht zur NADPH-Produktion benötigt. Weder *S. mutans* noch *S. pyogenes* verfügen jedoch über den oxPPP, somit sind in diesen Spezies die Intermediate des PPP nicht an das NADPH-Level gekoppelt. Die Regulation von SmuGapN und SpyGapN durch PPP-Intermediate ist möglicherweise ein Überbleibsel aus der Entwicklungsgeschichte dieser Spezies. Während E4P beide Enzyme hemmt, ist die Hemmung durch S7P bei der SpyGapN möglicherweise evolutionär bereits verloren gegangen.

Als weiterer natürlicher Inhibitor der SpyGapN-Aktivität wurde in dieser Arbeit ATP identifiziert. ATP ist das zentrale Molekül zur Verbindung von energieerzeugenden und

energieverbrauchenden Reaktionen (123). Es wird in *S. pyogenes* primär in der Glykolyse erzeugt und repräsentiert als zentrales Energiespeichermolekül das Energielevel der Zellen (50–53). Andere glykolytische Enzyme wie die Phosphofruktokinase und die Pyruvatkinase werden ebenfalls durch hohe ATP-Konzentrationen gehemmt und dadurch bei ausreichend ATP im Cytosol die Glykolyse-Rate insgesamt gehemmt (124). Eine Hemmung von GapN als glykolytisches Enzym durch ATP erscheint physiologisch plausibel und konnte auch für die GapN von *S. mutans* und *Sulfolobus solfataricus*, einem thermophilen Archaeon, gezeigt werden (59, 125). Eine ähnliche Inhibition durch ATP ist ebenso für die konventionelle GapDH bei anderen Spezies beschrieben (59, 126). Andere beschriebene Aktivatoren bzw. Inhibitoren der *S. mutans* GapN sowie weitere Verbindungen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel zeigten keine Effekte auf die Aktivität der SpyGapN.

Zur weiteren Analyse der Funktion von GapN im Stoffwechsel von *S. pyogenes* sollte eine konditionelle Knock-out-Mutante hergestellt werden, in der die Translation des *gapN*-Gens mit dem Riboswitch E gesteuert werden kann (63). Dafür muss der Riboswitch E stromaufwärts des Startcodons des entsprechenden Gens eingefügt werden. Dort bildet er eine Stem-loop-Struktur, in der die Ribosomenbindestelle unzugänglich ist. Bei Zugabe von Theophyllin bindet dieses an die Aptamer-Region des Riboswitch E, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und die Ribosomenbindestelle freigegeben wird (63). Durch Theophyllin wird also die Translation der entsprechenden mRNA ermöglicht. Topp *et al.* beschrieben für *S. pyogenes*, dass die Induktion mit Theophyllin zu einer Steigerung der cytosolische Enzymaktivität der unter der Kontrolle des Riboswitch E stehenden  $\beta$ -Glucuronidase um den Faktor 60 führt (63). Des Weiteren wurde der Riboswitch E bereits durch Le Breton *et al.* zur Bestätigung anderer anhand von Transposonmutantenbibliotheken von *S. pyogenes* vorhergesagter essenzieller Gene genutzt. Mit Hilfe eines Suizidplasmids und eines Helferplasmids mit thermosensitivem Replikationsursprung konnten die Autoren durch homologe Rekombination die essenziellen Gene *murE* (kodiert für die UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-Glutamat-L-Lysin-Ligase aus der Peptidoglykansynthese) und *vicR* (kodiert für einen Zwei-Komponenten-System-Regulator) unter die Kontrolle des Riboswitch E bringen (57). Weder mit dem zum Transfer und zur Inaktivierung von Genen in Streptokokken entwickelten Vektor pSF152 (127) noch mit dem von Le Breton *et al.* entwickelten Suizidplasmid/Helferplasmid System gelang es in dieser Arbeit, den Riboswitch E stromaufwärts des *gapN* Gens in das Genom von *S. pyogenes* zu integrieren. Dass sich pSF152 grundsätzlich zur Integration von Sequenzen in das Genom von *S. pyogenes* und weiteren Streptokokken eignet, wurde in einer Vielzahl an Arbeiten gezeigt (128–131). Dies gelang zwar auch in der vorliegenden Arbeit, aber sowohl bei Verwendung von pSF152 als auch bei Verwendung des von Le Breton *et al.* entwickelten Plasmidsystems integrierte das jeweilige Plasmid durch homologe Rekombination mit dem Promotorbereich

von *gapN* und nicht, wie beabsichtigt, über das 5'-Ende des *gapN*-Gens. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit verwendete Le Breton *et al.* in ihrem Suizidvektor nicht die nativen Promotoren ihrer Ziel-Gene sondern den Promotor  $P_{sag}$  des Operons zur Produktion des Virulenzfaktors Streptolysin S aus *S. pyogenes* (57, 132). Burysheva *et al.* andererseits inserierten den Riboswitch E stromaufwärts des Gens *hlp* unter Verwendung des nativen Promotors dieses essenziellen Gens, welches für ein Histon-ähnliches DNA-bindendes Protein kodiert (133). Mit Hilfe des Riboswitch E war es möglich zu zeigen, dass der entsprechende Klon nur in Präsenz von Theophyllin wachsen konnte. Grundsätzlich scheint die Verwendung des nativen Promotors also möglich zu sein. Warum es in dieser Arbeit nicht gelang, den Riboswitch E vor den Startcodonbereich des *gapN*-Gens zu inserieren, konnte nicht geklärt werden. Weitere Analysen zur Rolle von GapN im NADPH-Metabolismus konnten daher nicht durchgeführt werden und sollten in folgenden Arbeiten erfolgen. Um dies zu ermöglichen, könnte die Insertion mit dem Plasmidsystem von Le Breton *et al.* erfolgen, wobei diesmal der  $P_{sag}$  Promotor verwendet wird, da dieses System für essenzielle Gene bei *S. pyogenes* bereits etabliert ist (57). Dies hätte zwar den Nachteil, dass damit nicht der physiologische Promotor verwendet wird, würde aber die weiteren Analysen ermöglichen. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines CRISPR/Cas-Systems zur gezielten Integration von DNA-Sequenzen. Die wurde bereits in verschiedene gramnegative Bakterienspezies genutzt (134). Die Verwendung von CRISPR/Cas-Systemen ist darüber hinaus auch erfolgreich in der grampositiven Spezies *S. aureus* angewendet worden (135). Eine Verwendung dieser Techniken bei der Genommodifizierung von *S. pyogenes* erscheint durchaus sinnvoll, da die Entdeckung des CRISPR/Cas Systems in genau dieser Spezies erfolgte (136, 137).

Interessant wären auch Untersuchungen zum Beitrag von GapN zur Abwehr von oxidativem Stress. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnten Brouwer *et al.* zeigen, dass ein gestörter Gluthationtransport zu einer Erhöhung der NADPH-Produktion führte (138). Aufgrund der Stellung von GapN im NADPH-Stoffwechsel wurde von den Autoren die Hypothese aufgestellt, dass GapN zu dieser erhöhten NADPH-Produktion als Antwort von *S. pyogenes* auf oxidativen Stress beiträgt.

### **5.3 Identifizierung von potenziellen spezifischen GapN Inhibitoren**

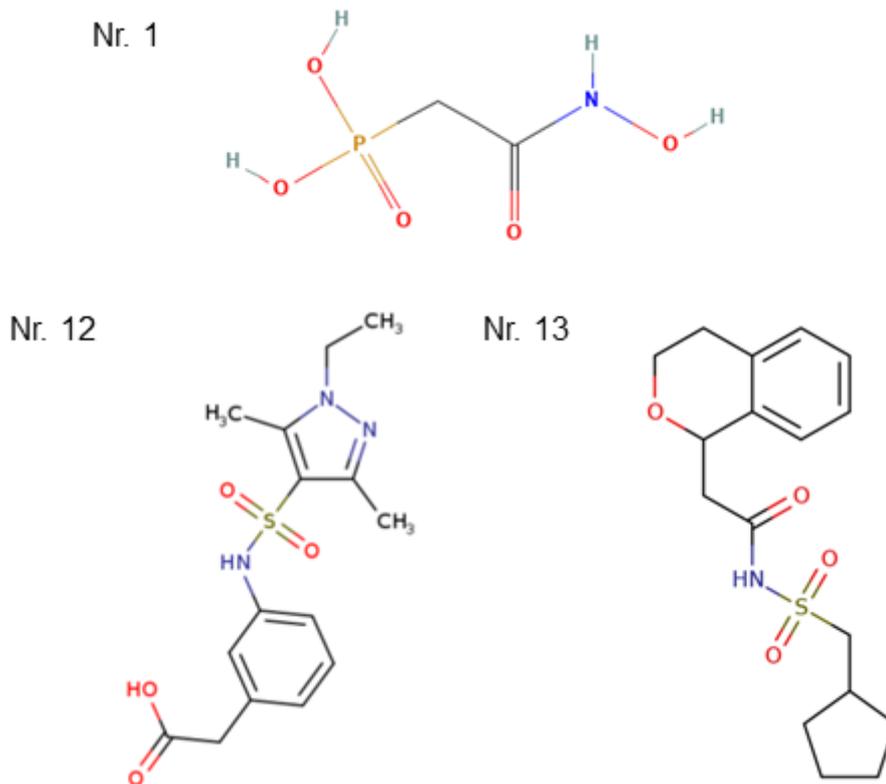
Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, potenzielle GapN Inhibitoren zu identifizieren und zu testen. Zur Vorhersage der potenziellen Inhibitoren wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rebecca Wade (Heidelberg) *in silico* mit einem Modell der SpyGapN ein molekulares Docking durchgeführt. Die identifizierten Substanzen sollten die SpyGapN inhibieren und

optimalerweise keine weiteren G3P-bindende Enzyme beeinflussen. Es sollte ein möglichst spezifischer Inhibitor, der nur *S. pyogenes* abtötet, identifiziert werden. Das in dieser Arbeit zur Vorhersage von Inhibitoren verwendete *in silico* Modell sagte im molekularen Docking für E4P eine ähnliche Bindungsaffinität und für S7P eine geringere Bindungsaffinität verglichen mit der des natürlichen Substrat G3P voraus (58). Diese Vorhersagen des Modells stimmten mit den in 5.2 diskutierten experimentellen Ergebnissen überein. Dies deutet auf eine gute prognostische Qualität des Modells hin.

Von den in den molekularen Docking Analysen vorhergesagten 99 potenziellen Inhibitoren wurden in dieser Arbeit 32 untersucht. Zum Lösen der Testsubstanzen wurde das organische Lösungsmittel DMSO verwendet. Einige Enzyme werden von DMSO gehemmt (139–141). Dies war für die SpyGapN jedoch nicht der Fall. Sieben Substanzen ließen sich nicht dauerhaft lösen. Elf der übrigen 25 Substanzen hatten bei einem zweifachen molaren Überschuss gegenüber dem Substrat einen inhibierenden Effekt auf die SpyGapN. Der inhibierende Effekt war bei allen elf Substanzen konzentrationsabhängig und konnte entsprechend durch Erhöhen der InhibitorKonzentration verstärkt werden. Dabei zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede im inhibitorischen Potenzial, die aber nicht abhängig von der Inhibitor-Klasse sind.

### 5.3.1 Potenziell spezifische Inhibitoren

Zu der Inhibitor-Klasse der potenziell spezifischen Inhibitoren, die kein humanes Protein mit einer hohen Affinität binden, gehören die Substanzen Nummer 1 ([2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl]phosphonic acid), 12 (2-[3-(1-ethyl-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-sulfonamido)phenyl]acetic acid) und 13 (N-cyclopentylmethanesulfonyl-2-(3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-1-yl)acetamide). Chemisch sind diese drei Substanzen sehr unterschiedlich. Inhibitoren 12 und 13 stellen aufgrund ihrer Vielzahl an ringförmigen Kohlenwasserstoffverbindungen sehr große und unpolare Moleküle dar (Abbildung 34). Ein Testen der beiden Substanzen war in dieser Arbeit nicht möglich, da sie sich aufgrund ihrer Hydrophobizität nicht lösen ließen. Im Gegensatz dazu ist Inhibitor 1 ein kleines geladenes Molekül und war löslich (Abbildung 34). Es zeigte in den *in-vitro*-Test in dieser Arbeit jedoch keine inhibitorische Wirkung auf die SpyGapN. Somit war für keine Substanz dieser Klasse eine inhibitorische Wirkung nachzuweisen. Alle drei Substanzen dieser Klasse hatten *in silico* einen geringeren Docking score zur SpyGapN als alle andere getestete Substanzen. Sie binden zwar kein humanes Enzym, jedoch scheint die Bindeaffinität zumindest von Inhibitor 1 zur SpyGapN nicht auszureichen, um einen inhibitorischen Effekt zu erzielen.



**Abbildung 34. Chemische Strukturen der Substanzen der potenziell spezifischen Inhibitoren [2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl]phosphonic acid (Nr. 1), 2-[3-(1-ethyl-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-sulfonamido)phenyl]acetic acid (Nr. 12) und N-cyclopentylmethanesulfonyl-2-(3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-1-yl)acetamide (Nr. 13) (142–144). Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.**

### 5.3.2 Metabolite als Inhibitoren

Aus der Gruppe der Metabolite konnten alle Substanzen gelöst werden. Die Substanzen Nummer 8 (3-Phosphohydroxypyruvat), 9 (Dihydroxyacetonphosphat) und 10 (Citramalat) hatten im *in-vitro*-Screening keinen Einfluss auf die SpyGapN und wurden daher nicht weiter untersucht. Für Substanz 25 (2-Hydroxyglutarsäure), welches durch Reduktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat im Stoffwechsel entsteht (145), wurde eine Aktivierung statt einer Inhibierung der SpyGapN nachgewiesen. Sie eignet sich somit nicht als Inhibitor.

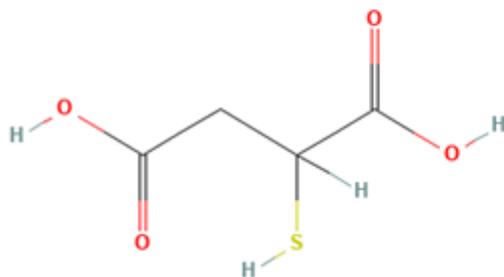
Eine inhibitorisch wirksame Substanz aus der Klasse der Metabolite ist Substanz Nr. 11 (2-Sulfanylbernsteinsäure), die auch als Mercaptosuccinylsäure oder Thioäpfelsäure bekannt ist. 2-Sulfanylbernsteinsäure gehört chemisch zu den Thiolen und besitzt neben der reaktiven SH-Gruppe auch noch zwei Carboxylgruppen (Abbildung 35). Sie ist damit strukturell sehr ähnlich dem Malat (Äpfelsäure), welches eine Hydroxygruppe anstatt der Thiolgruppe hat. Bereits 1968 konnte gezeigt werden, dass es bestimmten Bakterien möglich ist

2-Sulfanylbernsteinsäure als Kohlenstoff-, Schwefel und Energiequelle zu nutzen (146). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2-Sulfanylbernsteinsäure die SpyGapN hemmt, während die SpyGapDH nicht im gleichen Ausmaß beeinträchtigt wird. Dies führte dazu, dass in den Kill Assays *S. pyogenes* abgetötet wird, während *S. cristatus* überlebt. 2-Sulfanylbernsteinsäure ist somit ein vielversprechendes Ausgangsmolekül zur Weiterentwicklung als Therapeutikum. Interessant wird dies insbesondere dadurch, dass es bereits medizinische Anwendungen mit 2-Sulfanylbernsteinsäure gibt (147). Es wird unter anderem in Formulierungen zur Detektion und Identifikation von verschiedenen Tumorkrankheiten verwendet (148–150). Des Weiteren ist bereits bekannt, dass 2-Sulfanylbernsteinsäure die Glutathionperoxidase hemmt und damit oxidativen Stress auslöst (151, 152). Dieser Effekt wird unter anderem in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis genutzt (152). Darüber hinaus unterdrückt mit Gold und Kupfer komplexierte 2-Sulfanylbernsteinsäure die Aktivierung von Lymphozyten und deren Adhäsion an das Endothel. Aufgrund dieser anti-inflammatorischen Effekte werden Metallionenkomplexe der 2-Sulfanylbernsteinsäure in der Behandlung von rheumatoiden Erkrankungen eingesetzt (153, 154). Außerdem wurden für Metall-2-Sulfanylbernsteinsäure-Komplexe antimikrobielle Effekte beschrieben. Für Kupfer-Komplexe wurden beispielsweise MHK von 0,031 mg/ml bei *Bacillus subtilis* und 0,25 mg/ml bei *Staphylococcus aureus* bestimmt (155). Formulierungen von 2-Sulfanylbernsteinsäure in Kombination mit Erythromycin wurden zudem in einer klinischen Studie therapeutisch bei Patienten mit Bronchopneumonien eingesetzt (156). Die Ergebnisse führten zu einer Anmeldung eines Patents für Präparationen und pharmazeutische Kompositionen, welche aus beiden Substanzen bestehen (157). Für 2-Sulfanylbernsteinsäure lässt sich zusammenfassen, dass die Substanz in dieser Arbeit einen antimikrobiellen Effekt auf *S. pyogenes* gezeigt hat und die Substanz im medizinischen Bereich eingesetzt wird. Somit ist 2-Sulfanylbernsteinsäure ein guter Kandidat als Ausgangspunkt zur Entwicklung eines Therapeutikums gegen *S. pyogenes* Infektionen.

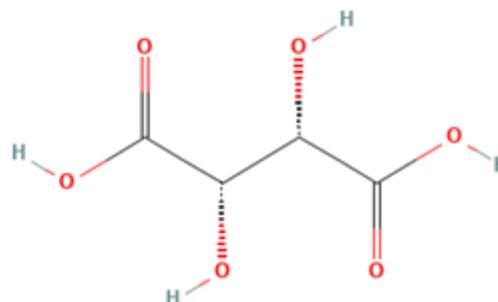
Der zweite inhibitorisch wirksame Kandidat aus der Gruppe der getesteten Metabolite ist die Substanz 29, das D-Enantiomer der Weinsäure. Strukturchemisch ist die D-(-)-Weinsäure wie die 2-Sulfanylbernsteinsäure dem Malat (Äpfelsäure) ähnlich (Abbildung 35). Die D-(-)-Weinsäure hat verglichen mit Malat eine Hydroxygruppe mehr. In dieser Arbeit erzielte die D-(-)-Weinsäure *in vitro* und *in vivo* sehr gute Ergebnisse als Inhibitor der SpyGapN und als antimikrobielle Substanz. D-(-)-Weinsäure und 2-Sulfanylbernsteinsäure hatten einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die GapN-Aktivität. Im Gegensatz zur 2-Sulfanylbernsteinsäure hatte D-(-)-Weinsäure jedoch auch einen starken Effekt auf das Überleben von *S. cristatus*. Antimikrobielle Effekte von D-(-)-Weinsäure wurden bereits in der Literatur beschrieben. In einer kürzlich erschienen Publikation wurde D-(-)-Weinsäure als

gegen *S. mutans* antimikrobiell aktive Substanz in Extrakten der Pflanze *Schisandra chinensis* identifiziert (158). In einer weiteren aktuellen Studie identifizierten die Autoren computerbasiert die UDP-N-Acetylglucosaminacyltransferase (LpxA) als ein therapeutisches Ziel bei multiresistenten *Acinetobacter baumannii* (159). Docking Experimente sagten einen Docking score von  $<-9$  kcal/mol für D-(-)-Weinsäure bei diesem therapeutischen Ziel vorher. Bei der Testung der antimikrobiellen Aktivität konnte eine MHK von 0,39 mg/ml bestimmt werden und die Behandlung einer Wundinfektion mit D-(-)-Weinsäure im Tiermodell führte zu einer signifikanten Reduktion der nachweisbaren lebenden Bakterien. Die Autoren beschreiben zudem eine Cytotoxizität erst ab Konzentrationen von 2 mg/ml aufwärts (159). Damit ist die in dieser Arbeit getestete Konzentration von 3 mg/ml ( $\approx 20$  mM) zu hoch für den Einsatz als Therapeutikum. Bereits bei einer geringfügigen Steigerung der Effektivität beispielsweise durch eine andere Formulierung wäre dieser Inhibitor eine vielversprechende antimikrobielle Substanz gegen *S. pyogenes*. Ein Effekt über die UDP-N-Acetylglucosaminacyltransferase (LpxA) kann bei *S. pyogenes* ausgeschlossen werden, da dieses Enzym im *S. pyogenes* Genom nicht kodiert ist (115–118). Auch für weitere Bakterien wie zum Beispiel *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* und *Campylobacter* spp. wurde eine antimikrobielle Aktivität der D-(-)-Weinsäure beschrieben (160, 161). Die Wirkmechanismen sind dabei nicht vollständig geklärt. Die gängigste Annahme ist, dass die protonierte Säure die Zellwand und -membran überwinden kann und aufgrund des pH-Wertes im Cytosol des Bakteriums deprotoniert. Dadurch wird im Cytosol der pH-Wert gesenkt und die Zellfunktion gestört (162). Hinzu kommt der Effekt der Akkumulation von Anionen im Cytosol, welchem auch eine Toxizität zugeschrieben wird (163). Diese Effekte sind für *S. pyogenes* nicht auszuschließen, sodass die beobachteten Effekte in dieser Arbeit nicht nur auf einer GapN-Inhibition beruhen müssen. D-(-)-Weinsäure wäre entsprechend kein hoch spezifisches Antibiotikum gegen *S. pyogenes*, könnte aber eine Alternative in der Behandlung werden. Darüber hinaus könnte sich D-(-)-Weinsäure als Leitsubstanz eignen, um durch gezielte chemische Modifikationen ein spezifisches Antibiotikum gegen *S. pyogenes* auf Grundlage der GapN-Inhibition zu entwickeln. Ein weiterer Vorteil der D-(-)-Weinsäure besteht darin, dass diese bereits als Arzneimittel zur Behandlung von Stress-Inkontinenz bei jungen Frauen durch die Europäische Arzneimittel-Agentur EMA zugelassen ist (164).

Nr. 11



Nr. 29



**Abbildung 35. Chemische Strukturen der SpyGapN-Inhibitoren 2-Sulfanylbernsteinsäure (Nr. 11) und D-(-)-Weinsäure (Nr. 29) (165, 166).** Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.

### 5.3.3 Chemische Sonden als Inhibitoren

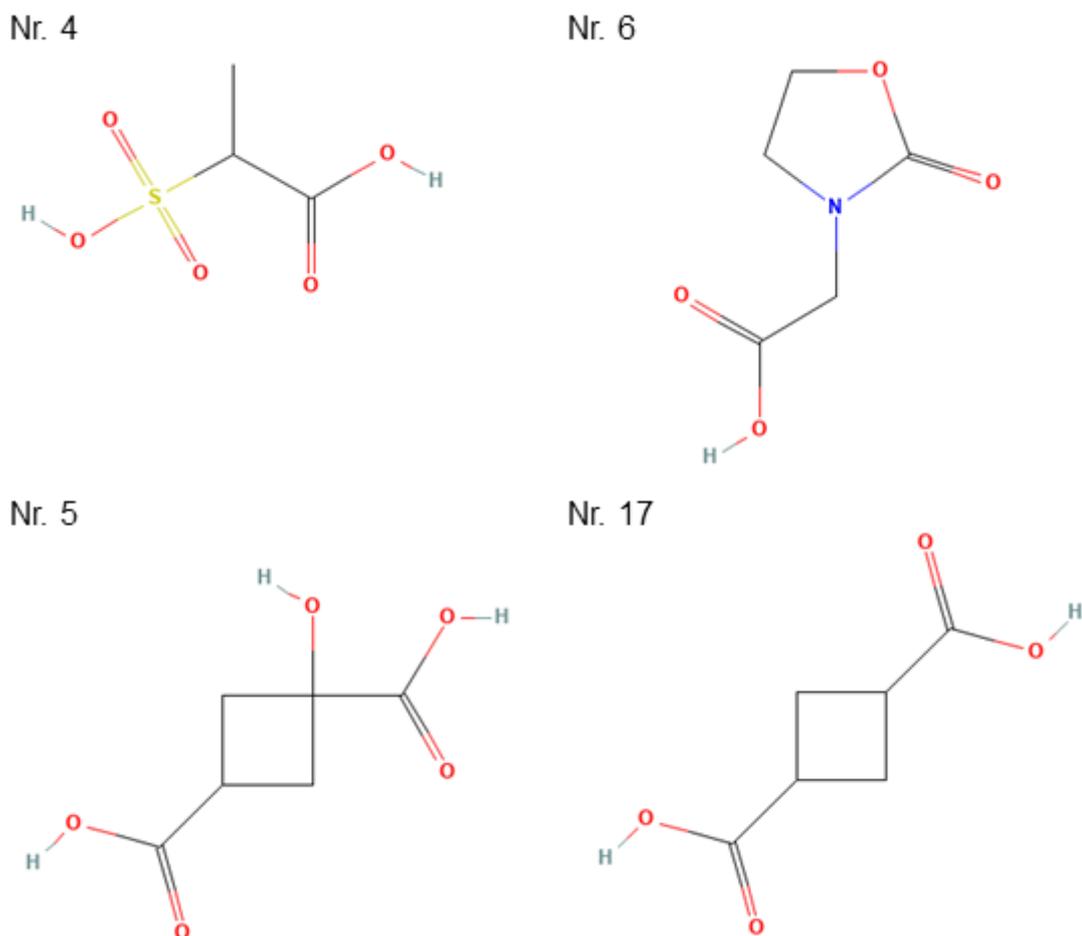
In der dritten Gruppe der potenziellen Inhibitoren wurden chemische Sonden zusammengefasst, die einen Docking score von  $<-8$  kcal/mol für die GapN haben. Darüber hinaus haben diese Substanzen aber mindestens ein humanes Enzym im *in silico* Screen gebunden. Der potenzielle Inhibitor Nr. 7 (6-(3,4a,5,7,8,8a-hexahydro-2H-pyrano[3,4-b][1,4]thiazine-1-carbonyl)-2-(4-fluorophenyl)pyridazine-3,5-dione) war nicht stabil lösbar und konnte nicht analysiert werden. Die Substanzen Nr. 2 (4-oxoxolane-2-carboxylic acid) und 3 ((3R)-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate), die auch der Gruppe der chemischen Sonden zuzuordnen sind, zeigten im initialen Screen keinen Einfluss auf die SpyGapN-Aktivität.

Inhibitor 4 (2-Sulfopropionat) gehört chemisch zu den Sulfonsäuren, hat zusätzlich noch eine Carboxylgruppe und beide Enantiomere der Substanz zeigten im *in silico* Screen eine inhibierende Wirkung (Abbildung 36). Sie ist die Substanz, die in dieser Arbeit am stärksten die Aktivität der SpyGapN inhibierte. Darüber hinaus zeigte 2-Sulfopropionat auch eine antibakterielle Wirkung auf *S. pyogenes*, während *S. cristatus* weniger stark gehemmt wurde. Für 2-Sulfopropionat ist dies die erste Beschreibung als antimikrobielle Substanz. Auf Grundlage der Ergebnisse scheint 2-Sulfopropionat ein vielversprechender Kandidat für die Auswahl einer Leitsubstanz in der Antibiotikaentwicklung zu sein.

Als weitere Substanz dieser Gruppe wurde Inhibitor 5 (1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure) untersucht. Strukturell sehr ähnlich zu dieser Substanz ist Inhibitor 17 (Cyclobutan-1,3-dicarbonsäure). Beides sind Cyclobutan-Verbindungen mit zwei Carboxylgruppen (Abbildung 36). 1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure hat, wie der Name bereits sagt, zusätzlich eine Hydroxygruppe anstatt eines Wasserstoffs. Vergleicht man ihre Effekte auf die *in-vitro*-Aktivität der SpyGapN, sind diese sehr vergleichbar. Bei den *in-vivo*-

Effekten zeigen sich geringfügige Unterschiede. Zwar führt eine Inkubation mit beiden Inhibitoren innerhalb von 8 h zum Absterben von *S. pyogenes*, jedoch tritt dieser Effekt bei Cyclobutan-1,3-dicarbonsäure innerhalb von 2 h ein, während 1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure dafür die vollen 8 h benötigt. Cyclobutan-1,3-dicarbonsäure scheint somit effektiver zu sein, während beide Inhibitoren keinen Effekt auf das Überleben von *S. cristatus* hatten. Eine Korrelation mit den vorhergesagten Bindeaffinitäten kann nicht hergestellt werden, da diese für 1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure höher ist. Möglicherweise sind die zu beobachteten Unterschiede auch auf einen unterschiedlichen Transmembrantransport zurückzuführen. Vergleichbare Ergebnisse mit diesen Substanzen und deren Effekt auf Bakterien sind bisher nicht publiziert. Beide Substanzen sind jedoch Teil eines Patents (167). Dieses Patent schützt Cyclobutanderivate als mögliche Therapeutika in der Krebstherapie. Die Cyclobutanderivate dienen dabei als Inhibitor der Farnesyltransferase, welche für die Prenylierung des Ras-Proteins zuständig ist, einem essenziellen Schritt zur Aktivierung dieses Proteins (168). Ras ist ein Regulator von Überlebenssignalen sowie Wachstums- und Differenzierungsprozessen in humanen Zellen und ist in Tumoren häufig mutiert (169). Die Farnesyltransferase wurde aufgrund dieser Funktion als Drug Target identifiziert und in diesem Zusammenhang die Cyclobutanderivate als Inhibitoren getestet (170). Es sollten daher die Effekte von Cyclobutan-1,3-dicarbonsäure und 1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure auf die Aktivität der Farnesyltransferase getestet werden, da beide Substanzen einen cytotoxischen Effekt aufweisen könnten. Bei der potenziellen Weiterentwicklung der Substanzen zu antimikrobiellen Wirkstoffen sollte daher ggf. berücksichtigt werden, dass die Strukturen möglichst so modifiziert werden, dass die Bindung an die Farnesyltransferase verhindert wird.

Inhibitor 6 (2-(2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)essigsäure) scheint nicht optimal in der G3P-Bindetasche zu binden, da es bei den entsprechenden Tests zu hohen Schwankungen in der *in-vitro*-SpyGapN-Aktivität kam. Darüber hinaus zeigte der Inhibitor keine Effekte auf das Überleben beider getesteten Bakterienspezies, sodass neben der schwankenden Effektivität als GapN-Inhibitor möglicherweise Probleme beim Transmembran- und Zellwandtransport auftraten. Weiterführende Literatur zu dieser Substanz im Zusammenhang mit antimikrobieller Anwendung ist nicht zu finden.



**Abbildung 36. Chemische Strukturen der SpyGapN-Inhibitoren 2-Sulfopropionsäure (Nr. 4), 1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure (Nr. 5), 2-(2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)essigsäure (Nr. 6) und Cyclobutan-1,3-dicarbonsäure (Nr. 17) (171–174).** Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.

#### 5.3.4 Weitere potenzielle SpyGapN Inhibitoren als antimikrobielle Substanz

Neben den zuvor genannten Inhibitoren wurden auch Substanzen getestet, die sich keiner der drei zuvor beschriebenen Klassifizierungen zuordnen lassen. Zu diesen gehören die drei ähnlichen Substanzen Nummer 15 (1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure), 18 (1,2-Cyclopropandicarbonsäure) und 20 (1-Propanyl-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure). In dieser Gruppe ist die Grundstruktur durch 1,2-Cyclopropandicarbonsäure vorgegeben und besteht aus einem Cyclopropan mit zwei Carboxylgruppen (Abbildung 37). Diese Struktur wurde um eine Methylgruppe (Nr. 15) bzw. Propanylgruppe (Nr. 20) ergänzt. Während 1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure und 1,2-Cyclopropandicarbonsäure die SpyGapN-Aktivität ähnlich effektiv inhibieren, ist 1-Propanyl-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure mit der

größeren Propanylgruppe schwächer in der inhibierenden Wirkung. Dieser Effekt ist auch bei den anderen getesteten Enzymen zu erkennen. Im Gegensatz zu den sehr ähnlichen Ergebnissen *in vitro* zwischen 1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure und 1,2-Cyclopropandicarbonsäure hat 1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure *in vivo* keinen messbaren Effekt im getesteten Konzentrationsbereich, während 1,2-Cyclopropandicarbonsäure *S. pyogenes* abtötet. *S. cristatus* wird dabei kaum beeinflusst. 1-Propanyl-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure hat analog zu den vorherigen Ergebnissen einen geringeren Effekt als 1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure und somit keine antimikrobielle Wirkung. Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuren spielen eine Rolle in der Entwicklung von neuen Therapeutika gegen gramnegative Pathogene. Insbesondere zielen sie auf die Hemmung des Cystein-Stoffwechsels und dort auf O-Acetylserin-Sulphydrolase CysK ab. Das Gen für dieses Enzym ist auch im *S. pyogenes* Genom kodiert (115–118). Im Zuge dieser Untersuchungen führte die Verwendung von Cyclopropane-1,2-dicarbonsäure zu einer verbesserten Penetration der äußeren gramnegativen Membran im Vergleich zu einer Phenyl-Cyclobutancarbonsäure, welche auch eine CysK-Inhibition zeigte. (175). Des Weiteren werden diese Substanzen als Inhibitor der 3-Methylaspartat-Ammonium-Lyase (3-Methylaspartase,  $\beta$ -Methylaspartase) eingesetzt (176). Diese wandelt L-threo-3-methylaspartat zu Mesaconat um und spielt eine Rolle in der Glutamat Fermentation (177, 178). Das Gen für die 3-Methylaspartat-Ammonium-Lyase ist in *S. pyogenes* jedoch nicht kodiert, sodass die beobachteten Effekte nicht mit dieser Inhibition zu tun haben können (115–118). Insbesondere 1,2-Cyclopropandicarbonsäure eignet sich somit für die Entwicklung eines Antibiotikums. Die Modifikationen bei den anderen beiden Substanzen erwiesen sich nicht als zielführend für eine Verbesserung der Wirksamkeit. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass 1,2-Cyclopropandicarbonsäure ein Enzym des Cystein-Stoffwechsels hemmt. Diesem Inhibitor fehlt somit die Speziespezifität. Um diese zu erreichen, muss diese Substanz in der weiteren Entwicklung so verändert werden, dass sie ihre Bindeaffinität zu anderen Enzymen verliert, während die zur SpyGapN verbessert wird.

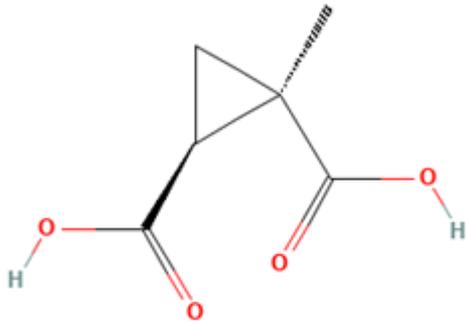
Eine weitere Substanz, die keiner der anderen Gruppe zugeordnet wurde, ist Inhibitor 19 (5-Oxooxolan-2-carbonsäure). 5-Oxooxolan-2-carbonsäure basiert auf einem Oxolan welches über eine Carboxyl- und Oxogruppe modifiziert und somit polarer ist (Abbildung 37). Diese Substanz inhibierte in den *in-vitro*-Versuchen sowohl die SpyGapN als auch die ScrGapN. Ein Effekt auf das Überleben von *S. pyogenes* und *S. cristatus* war jedoch nicht nachzuweisen. Dies könnte auf einen schlechten Transport dieser Substanz in das Cytosol hindeuten, sodass der Inhibitor das Zielmolekül GapN nicht erreicht. Eine Effektivitätssteigerung wäre somit denkbar, wenn dieser Inhibitor in einer Formulierung verwendet wird, welche die Aufnahme in die Zelle ermöglicht. 5-Oxooxolan-2-carbonsäure ist laut der PubChem-Datenbank Bestandteil

---

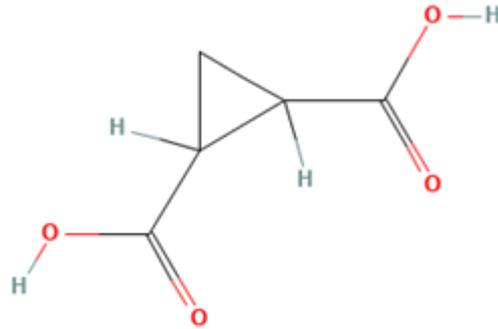
eines Patents, in dem es um die spezifische Kontrolle von *Acinetobacter baumannii* geht, sodass ein gewisses antimikrobielles Potenzial für diesen Inhibitor schon beschrieben wurde (179, 180).

Ebenfalls wurde noch Inhibitor 26 (1,2-dihydroxyethan-1,2-disulfonat oder Glyoxalbisulfit) auf seine Eignung als antimikrobielle Substanz gegen *S. pyogenes* untersucht. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein sehr polares Molekül mit zwei reaktiven Sulfogruppen und zwei Hydroxygruppen (Abbildung 37). Glyoxalbisulfit inhibierte *in vitro* die SpyGapN, wobei diese Substanz im initialen Screen die größte inhibierende Wirkung aufwies. Diese positiven Ergebnisse wurden in den Untersuchungen des Effektes auf das Überleben von *S. pyogenes* und *S. cristatus* bestätigt. Zwar stirbt *S. cristatus* bei der Inkubation mit Glyoxalbisulfit komplett ab, jedoch wird auch die Lebendkeimzahl von *S. pyogenes* stark gesenkt und es ist für beide Spezies eine Dosisabhängigkeit zu beobachten. Mukerji und Yang haben Glyoxalbisulfit bereits als Inhibitor der Phosphoenolpyruvatcarboxylase beschrieben (181). Dieses Enzym hat eine zentrale Rolle im C4-Metabolismus und katalysiert die Umwandlung von Phosphoenalpyruvat in Oxalacetat (182). Mit Hilfe von Glyoxalbisulfit war es möglich, dieses Enzym zu blocken und die CO<sub>2</sub>-Fixierung in Spinatgewebe zu verhindern (181). Weitere Informationen zur Eignung als ein Therapeutikum in irgendeiner Form sind nicht vorhanden. Aufgrund des Absterbens von *S. cristatus* wird aber deutlich, dass Glyoxalbisulfit keine spezifische antimikrobielle Substanz gegen *S. pyogenes* ist. Vielmehr scheint der Effekt speziesübergreifend zu sein. Trotzdem ist es eine vielversprechende Leitsubstanz für die Entwicklung eines Therapeutikums.

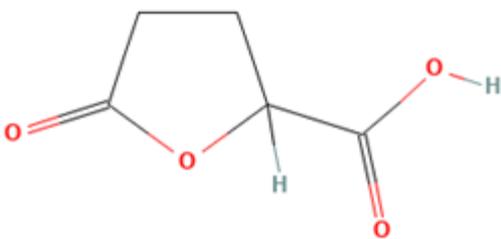
Nr. 15



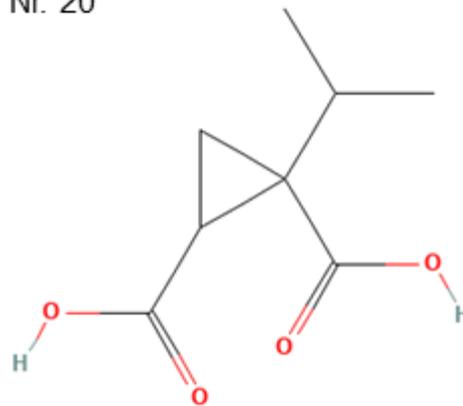
Nr. 18



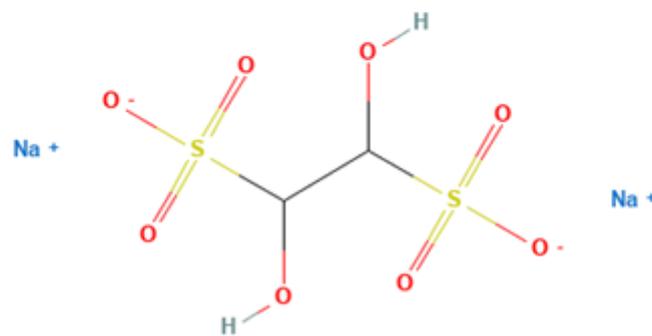
Nr. 19



Nr. 20



Nr. 26



**Abbildung 37. Chemische Strukturen der SpyGapN-Inhibitoren 1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure (Nr. 15), 1,2-Cyclopropanedicarbonsäure (Nr. 18), 5-Oxooxolan-2-carbonsäure (Nr. 19), 1-Propenyl-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure (Nr. 20) und Glyoxalbisulfit (Nr. 26) (183–187). Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.**

### 5.3.5 Strukturelle Vergleiche der GapN-Inhibitoren

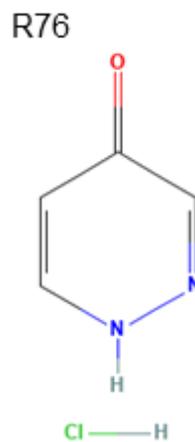
Vergleicht man die in dieser Arbeit identifizierten SpyGapN-Inhibitoren gibt es strukturell grundsätzlich zwei Gruppen. Zum einen scheinen Substanzen die SpyGapN zu inhibieren, die als Grundlage einen Cyclopropan-, Cyclobutan- oder heterocyclischen Ring aus 5 Atomen besitzen. Die Cyclopropan- und Cyclobutanringe sind auf 2 Seiten mit einer Carboxylgruppe

modifiziert und die heterocyclischen Ringe mit einer Carboxyl- und einer Oxogruppe. Es sind somit alle Moleküle, die polare Seitengruppen auf beiden Seiten aufweisen. Dies trifft auch auf die Inhibitoren in der anderen Gruppe zu. Hierbei handelt es sich um kurze organische Verbindungen, die Ähnlichkeit mit der Bernsteinsäure aufweisen. Einzig 2-Sulfopropionat kann keiner dieser beiden Grundstrukturen zugeordnet werden. Wichtig für die Bindung in die G3P ist bei der Analyse der Inhibitoren eine funktionelle Gruppe mit einem geladenen Sauerstoffmolekül zur Bindung in das Oxyanion-Loch in der Bindetasche. Dieses wird durch die Aminosäuren Cystein<sup>284</sup> und Asparagin<sup>154</sup> gebildet (Jonathan Teuffel und Rebecca Wade, unpublizierte Daten). Darüber hinaus ist auch eine saure Struktur für die Interaktion mit dem Eingangsbereich der Bindetasche von Nöten. Dieser Eingangsbereich enthält drei Argininseitenketten (R<sup>103</sup>, R<sup>283</sup> und R<sup>437</sup>), welche eine basische Umgebung schaffen. Diese Bindung wird in den gefundenen Inhibitoren durch eine Carboxylgruppe oder eine Sulfogruppe realisiert. Zusätzliche Hydroxygruppen ermöglichen eine weitere Stabilisation der Moleküle mittels Wasserstoffbrückenbindungen über die Seitenketten von Tyrosin<sup>155</sup> und Threonin<sup>285</sup> (Jonathan Teuffel und Rebecca Wade, unpublizierte Daten). Die Voraussetzungen für diese Bindungen sind offenbar bei den modifizierten zyklischen Kohlenstoffverbindungen und Derivaten der Bernsteinsäure am besten. Diese Verbindungen eignen sich aber noch nicht als Therapeutika, da die effektiven Wirkstoffkonzentrationen der Substanzen sehr hoch sind. Die Inhibitoren zeigen erst bei niedrigen millimolaren Konzentrationen eine Wirkung. Das zeigt, dass die Bindung noch verbessert werden muss. Zudem ist der Transport der Substanzen in die Bakterien noch ein Problem, da die antibakteriellen Wirkstoffkonzentrationen noch höher waren als die im *in-vitro*-Enzymassay zur Inhibition notwendigen Konzentrationen. Eine Verbesserung der Wirkstoffe durch Modifizierung der Moleküle und Nutzung von „Drug Delivery Systemen“ ist unabdingbar. So sind beispielsweise 20 mM (>3 g/l) von Inhibitor 4 zum vollständigen Abtöten von *S. pyogenes* notwendig. Für das Standardtherapeutikum Penicillin beträgt die minimale Hemmkonzentration <0,25 mg/l bei sensitiven *S. pyogenes* Stämmen (188). Eine Steigerung der Affinität und Effektivität der Substanzen hilft auch in der Problematik, dass viele der Substanzen den pH-Wert erniedrigen und somit unspezifischen Druck auf alle Zellen ausüben.

### 5.3.6 Inhibitoren aus dem Fragmentscreening

Zusätzlich zum Testen von *in silico* vorhergesagten Substanzen wurden in dieser Arbeit auch vier verschiedene Substanzen getestet, welche *in vitro* eine Bindung in eine der beiden Bindetaschen kristallisierter SpyGapN zeigten. Vergleicht man die Fragmente mit den zuvor beschriebenen Inhibitoren, sind zehnfach höhere Substanzkonzentrationen nötig, um zumindest bei Substanz R65 (5-Aminopyrimidin) einen leichten Effekt, und bei R76

(Pyridazin-4-ol) eine nahezu komplette Inhibition der SpyGapN-Aktivität zu erzielen. Strukturell handelt es sich bei Pyridazin-4-ol um einen heterocyclischen Ring mit nur einer funktionellen Gruppe, einer Hydroxygruppe (Abbildung 38). Im Fragmentscreening wurde die Substanz in der Kristallstruktur in der NADP-Bindetasche nachgewiesen. Somit verwendet diese Substanz im Gegensatz zum Rest der getesteten Substanzen einen anderen Angriffspunkt. Gerade weil NADP aber ein wichtiger Cofaktor im Stoffwechsel ist, muss die Substanz auf ihre Enzymspezifität untersucht werden. Trotzdem eignet sich diese Substanz für die Weiterentwicklung zur potenziell antimikrobiellen Substanz. Da eine Kristallstruktur der Substanz mit der SpyGapN vorliegt, können gezielte Modifikationen an der Substanz zur Affinitäts- und Spezifitätsverbesserung vorgenommen werden. Auf Grund der Bindung von Pyridazin-4-ol in der NADP<sup>+</sup>-Bindetasche ist zudem eine Kombination dieser Substanz mit den in der G3P-Bindetasche bindenden anderen Inhibitoren denkbar, um potenziell synergistische Effekte zu erzielen. Eine antimikrobielle Wirkung oder ein inhibitorischer Effekt auf Enzyme ist für diese Substanz bisher nicht beschrieben.



**Abbildung 38. Chemische Struktur von Pyridazin-4-ol (R76) (189).** Inhibitornummer entspricht der Nummer in Tabelle 13.

### 5.3.7 Aktuelle Antibiotika-Entwicklung

Wie bereits beschrieben, ist die Entwicklung von neuen Antibiotika schwierig und zeigt lange kaum neue Ergebnisse. Insgesamt waren Ende 2022 62 verschiedene Substanzen in klinischen Studien zur Evaluierung ihrer Eignung als Antibiotika (190). Die Anzahl der Substanzen in klinischen Studien zur Zulassung als Antibiotika ist somit in 10 Jahren um das 1,5fache gestiegen (191). Von den im Moment getesteten Substanzen haben 34 ein neues Pharmakophor und somit auch neue Wirkungsweisen. Die Wirkziele sind dabei breit gefächert, über die Zellwand, die DNA, die Proteinsynthese, Stoffwechselwege, wie die oxidative

Phosphorylierung oder den Cholesterol-Metabolismus, Virulenzfaktoren oder das Umkehren von Resistenzmechanismen (190, 192–201).

Im Vergleich mit den derzeit in der klinischen Testung befindlichen neuen Antibiotika müssen die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren noch deutlich in ihrer Effizienz verbessert werden.

Für *Staphylococcus aureus* beispielsweise ist derzeit ein Antibiotikum in der Entwicklung, das spezifisch die Virulenz des Bakteriums stört, indem es das Protein CrtN inhibiert (202). CrtN ist in die Bildung von Staphyloxanthin involviert, das von *S. aureus* als Schutz gegen reaktiven Sauerstoffspezies und zum Schutz vor Neutrophilen benötigt wird (203). Dieser als NP16 bezeichnete CrtN-Inhibitor führte im Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der nachweisbaren Bakterien. NP16 diente als Leitstruktur für die Medikamentenentwicklung. Eine von NP16 abgeleitete Substanz wurde bereits in einer klinischen Phase I Studie getestet (204). Verglichen mit den Substanzen in dieser Arbeit zeigte NP16 aber bereits bei geringeren Konzentrationen eine Wirkung. So ist die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) mit 300 nM beschrieben.

In einer weiteren Studie wurde in einem Hochdurchsatzscreening von 50.240 kleinen Molekülen die Substanz SA-558 als wirksam gegen Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) identifiziert (205). SA-558 führt zu einer Erhöhung der ATP-Produktion und erhöht zudem die ROS. Eine Monotherapie zeigte *in vitro* keinen Effekt auf das Überleben der Bakterien, jedoch ermöglichte der Stoff die Behandlung mit Gentamycin, gegen welchen der *S. aureus*-Stamm ohne SA-558 resistent war. Im Tierversuch führte SA-558 zu einer Reduktion der lebenden Bakterien und erhöhte hier auch die Sensitivität der Bakterien gegenüber Vancomycin. SA-558 zeigte eine höhere Aktivität verglichen mit den Inhibitoren dieser Arbeit. Lu *et al.* verwendeten die Substanz *in vitro* in einer Konzentration von 26,25 mg/l. Diese ist somit deutlich niedriger als die >3 g/l von 2-Sulfopropionsäure (Inhibitor 4), dem effektivsten in dieser Arbeit getesteten Inhibitor. Eine Verbesserung der Leitsubstanzen ist somit unabdingbar.

Auch zur Behandlung oder Prophylaxe von Infektionen mit Streptokokken gibt es verschiedene neue Strategien. Für das selektive Abtöten des Karies verursachenden Bakteriums *S. mutans* wurde eine Therapiemöglichkeit mit antimikrobiellen Peptiden gezeigt (206). Die antimikrobielle Substanz in dieser Studie war das Peptid G2, welches ein breites Wirkspektrum aufweist. Zudem wurde das „competence stimulating peptide“ genutzt, ein von *S. mutans* produziertes Pheromon. Eine acht Aminosäure große Region des „competence stimulating peptide“ war ausreichend, um zielgerichtet mit Hilfe von G2, welches an das „competence stimulating peptide“ gekoppelt war, *S. mutans* abzutöten. Die MHK der Substanzen für verschiedene *S. mutans* Stämme war <4 µM. Den Autoren gelang es außerdem, mit den Peptiden spezifisch *S. mutans* abzutöten, ohne weitere orale Streptokokken in einem

Multispeziesbiofilm zu beeinträchtigen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode war, dass die Wirkung sehr schnell eintrat und der Biofilm kein Hindernis war. Dieser Vorteil ist für die Behandlung von Karies von entscheidender Rolle, sodass die Forschung und Entwicklung von antimikrobiellen Peptiden gegen *S. mutans* ein vielversprechendes Feld ist (207–209).

Eine Substanz, die als Antibiotikum zur Behandlung von *S. pneumoniae*-Infektionen in einer klinischen Studie ist, ist GSK1322322 (210). Dies ist ein Inhibitor der Peptiddeformylase und ist auch gegen *S. pyogenes* effektiv. Auch dieser Stoff hat verglichen mit den Inhibitoren aus dieser Studie eine deutlich geringere minimale Hemmkonzentration von 0,5 mg/l, bei der 90 % der Bakterien gehemmt wurden. Interessant ist aber, dass dieser Stoff einen längeren Zeitraum benötigt, um die Bakterien abzutöten. In einer Zeitkinetik mit der vierfachen MHK-Konzentration zeigte lediglich ein Drittel der Stämme nach 8 h ein Absterben. Um diesen Effekt für alle Stämme zu erzeugen, war es notwendig, den Inkubationszeitraum auf 24 h auszudehnen. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sollten die unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testbedingungen nicht wirksamen Inhibitoren für 24 h mit den Bakterien inkubiert werden, um eventuell später auftretende Effekte beobachten zu können. Zudem sollte getestet werden, ob die bereits identifizierten Inhibitoren bei längerer Einwirkzeit auch in einer niedrigeren Konzentration wirksam sind.

Auch bei der Entwicklung eines neuen Antibiotikums gegen *S. pyogenes* werden verschiedene Ansätze verfolgt. Singh *et al.* lieferten mit ihrer Studie mögliche therapeutische Ziele von *S. pyogenes* (211) Sie untersuchten durch computergestützte Analysen Stoffwechselwege von *S. pyogenes* und verglichen die Produkte essenzieller Gene mit humanen Proteinen. Dabei wurden Ziele ausgeschlossen, welche paralog oder homolog zu humanen Proteinen waren. Mit dieser Methode war es möglich, 28 potenzielle therapeutische Ziele zu identifizieren. Eine Identifizierung von GapN erfolgte in dieser Studie nicht. Trotzdem zeigt sie verschiedene andere mögliche therapeutische Ziele auf. Experimentelle Daten zur Bestätigung der Vorhersagen von Singh *et al.* liegen zum aktuellen Zeitpunkt nicht vor. Eine weitere Studie zeigt, dass der Virulenzfaktor Streptolysin O ein mögliches Drug Target ist (212). Ein Austausch von zwei Aminosäuren im Streptolysin O führte zu einer drastisch reduzierten Virulenz des entsprechenden *S. pyogenes* Stamms, unter anderem aufgrund seiner eingeschränkten Fähigkeit zur Abwehr von Immunzellen. Die Entwicklung einer Streptolysin O neutralisierenden Substanz könnte somit die Bakterien so beeinträchtigen, dass das Immunsystem eine Infektion einfacher bewältigen kann. Dies wäre ein Ansatz analog zu dem, der bei *S. aureus* bereits mit NP16 angewendet wird und welcher zu einer klinischen Studie führte. Neben der reinen Identifizierung von Drug Targets sind bereits Substanzen in der Testung. In einer Studie von Wijesundara *et al.* wurden verschiedenen Phytochemikalien und deren Effekt auf das Überleben von *S. pyogenes* analysiert (213). In der Studie wurde die

Substanz Carvacrol identifiziert. Diese Substanz zeigte sich effektiv in der Behandlung von *S. pyogenes* Infektionen. Carvacrol hat eine minimale Hemmkonzentration von 0,53 mM gegen *S. pyogenes*. Diese Konzentration ist somit 37-mal geringer als die wirksame Konzentration der Inhibitoren dieser Arbeit. Die antimikrobielle Wirkung von Carvacrol ist dabei auf die Veränderung der Membranintegrität zurückzuführen, wobei die Substanz keinen cytotoxischen Effekt auf humane Epithelzellen hat. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es eine Synergie mit Penicillin gibt, sodass auch eine Kombinationstherapie durchgeführt werden könnte. Die Autoren schlagen auf dieser Grundlage den Einsatz von Carvacrol zur Therapie von eine *S. pyogenes* Pharyngitis vor.

### 5.3.8 Weiterentwicklung der SpyGapN-Inhibitoren

Der Vergleich der wirksamen Konzentrationen der SpyGapN-Inhibitoren dieser Arbeit mit den sich in der Entwicklung befindenden Antibiotika oder bereits zugelassenen Medikamenten zeigt, dass die Inhibitoren dieser Arbeit noch weiterentwickelt werden müssen. In dieser Entwicklung ist dabei die Bindeaffinität zu erhöhen, um die minimale Hemmkonzentrationen zu senken. Gleichzeitig ist die Enzymspezifität weiter zu erhöhen, um möglichst nur die SpyGapN zu inhibieren. Die Hemmung der anderen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-bindenden Enzyme ist dabei weiter zu reduzieren.

Zur Verbesserung der Inhibitoren sollten diese in der Zukunft in iterativen Runden analysiert, modifiziert und getestet werden. So sollten die wirksamen SpyGapN-Inhibitoren als nächstes mit der SpyGapN kokristallisiert werden. Dies ermöglicht eine genaue Analyse der Bindung dieser Substanzen in der G3P-Bindetasche. Erste Versuche wurden für 2-Sulfopropionat im Rahmen einer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Schindelin (Würzburg) bereits durchgeführt (89). Ein Tränken eines SpyGapN-Kristalls in 2-Sulfopropionat führte zu einer Besetzung der Bindetasche, was in der Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden konnte. Eine genaue Analyse der Bindung war aufgrund der Auflösung jedoch noch nicht möglich. Nach Aufklärung der Bindung der Inhibitoren in der G3P-Bindetasche sollten diese mit der zuvor *in silico* modellierten Struktur verglichen werden. Auf diese Weise kann das Modell verbessert werden, um weitere Vorhersagen zu optimieren. Außerdem ist es möglich, nach Aufklärung der Bindung die Substanzen *in silico* so zu modifizieren, dass die Bindung verbessert wird. In diesem Schritt kann zudem die Bindung zu anderen Enzymen verschlechtert werden. Die Etablierung dieses Arbeitsablaufs kann mit Hilfe des Inhibitors R76 durchgeführt werden. Dieser wurde im Fragmentscreening identifiziert, sodass die Strukturdaten der Bindung vorliegen. Auf Grundlagen dieser Daten kann das Molekül für eine bessere Bindung modifiziert werden und erneut *in vitro* getestet werden.

Eine andere Möglichkeit wäre das Beladen von „Drug Delivery Systemen“, wie Liposomen, mit den Inhibitoren. Der Fortschritt im Gebiet der Nanotechnologie könnte ein Design dieser Systeme ermöglichen, sodass diese Liposomen spezifisch mit den Bakterienzellen verschmelzen (214). Somit wäre es möglich, lokal die Wirkstoffkonzentration zu erhöhen und somit potenzielle Cytotoxizitäten zu umgehen.

Als nächster Schritt in der Analyse der SpyGapN-Inhibitoren sollten diese zudem auf ihre Cytotoxizität untersucht werden, denn nur wenn keine bzw. nur eine sehr geringe Cytotoxizität nachweisbar ist, eignen sich diese Substanzen als Therapeutikum. Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass bei einer Affinitätserhöhung der Substanzen und damit einer anderen verwendeten Konzentration der Inhibitoren, sich die Cytotoxizität ändert. Somit sollten im Moment cytotoxische Substanzen nicht kategorisch ausgeschlossen werden. Inhibitoren die in diesen Assays keine Cytotoxizität aufweisen, sollten im nächsten Schritt in einem Infektionsmodell getestet werden. Ein hierfür geeignetes Modell nutzt die Larven der Großen Wachsmotte *Galleria melonella* (70, 215–219). In diesem Modell kann untersucht werden, ob bei Behandlung von mit *S. pyogenes* infizierten Tieren mit den SpyGapN-Inhibitoren, die Überlebensrate der Tiere verbessert wird.

Alle Substanzen, die in dieser Arbeit als Inhibitor getestet wurden, waren nicht-kovalent bindende kompetitive Inhibitoren. Eine weitere Möglichkeit wäre das Testen von Substanzen, die eine kovalente Bindung mit GapN eingehen. Diese binden irreversibel an GapN und könnten somit eine sehr hohe Spezifität aufweisen (220).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus dem Screening von 32 potenziellen *in silico* vorhergesagten Substanzen sieben Substanzen identifiziert werden konnten, die die SpyGapN inhibieren und darüber hinaus bereits antimikrobielle Effekte gegen *S. pyogenes* zeigen. Die identifizierten Substanzen benötigen, um diese Effekte zu erzielen, jedoch noch sehr hohe Konzentrationen, sodass sie sich nicht als Therapeutikum eignen. Sie eignen sich aber sehr wohl als Leitstrukturen für die Weiterentwicklung dieser Inhibitoren in spezifische Therapeutika gegen *S. pyogenes* Infektionen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929; 10(3):226–36.
2. Fleming A. Nobel Lecture - The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945: Penicillin; 2023 [Stand: 18.08.2023]. Verfügbar unter: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>.
3. World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Genf: World Health Organization; 2014 [Stand: 21.08.2023]. Verfügbar unter: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1).
4. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data. Kopenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2022.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
6. Resch A, Wilke M, Fink C. The cost of resistance: incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals. *Eur J Health Econ* 2009; 10(3):287–97. doi: 10.1007/s10198-008-0132-3.
7. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 2015; 6:22–9. doi: 10.1016/j.nmni.2015.02.007.
8. Thabit AK, Crandon JL, Nicolau DP. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opin Pharmacother* 2015; 16(2):159–77. doi: 10.1517/14656566.2015.993381.
9. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(1):71–109. doi: 10.1128/CMR.00030-10.
10. Broughton CE, van den Berg HA, Wemyss AM, Roper DI, Rodger A. Beyond the Discovery Void: New targets for antibacterial compounds. *Sci Prog* 2016; 99(2):153–82. doi: 10.3184/003685016X14616130512308.
11. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(4):233–43. doi: 10.1038/nrmicro2536.

12. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Mehdizadeh Aghdam E, Nazeri S. Clostridium difficile Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. Scientifica (Cairo) 2014; 2014:916826. doi: 10.1155/2014/916826.
13. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect Dis 2005; 5(11):685–94. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70267-X.
14. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2002; 35(2):113–25. doi: 10.1086/340949.
15. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2012; 55(10):e86-102. doi: 10.1093/cid/cis629.
16. Podbielski A, van der Linden M, Lüttiken R. RKI-Ratgeber - Streptococcus pyogenes-Infektionen; 2023 [Stand: 23.08.2023]. Verfügbar unter: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Streptococcus\\_pyogenes.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Streptococcus_pyogenes.html).
17. Augustin J, Mangiapane S, Kern W. Antibiotika-Verordnungen im Jahr 2010 im regionalen Vergleich. Berlin: Zentralinstitut für kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi); 2012. (Versorgungsatlas-Bericht Nr.12/07).
18. CDC. Outpatient Antibiotic Prescriptions — United States, 2019; 2022 [Stand: 24.08.2023]. Verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html>.
19. King LM, Bartoces M, Fleming-Dutra KE, Roberts RM, Hicks LA. Changes in US Outpatient Antibiotic Prescriptions From 2011-2016. Clin Infect Dis 2020; 70(3):370–7. doi: 10.1093/cid/ciz225.
20. Bätzing-Feigenbaum J, Schulz M, Schulz M, Hering R, Kern WV. Outpatient Antibiotic Prescription. Dtsch Arztebl Int 2016; 113(26):454–9. doi: 10.3238/arztebl.2016.0454.
21. Musser JM, Beres SB, Zhu L, Olsen RJ, Vuopio J, Hyryläinen H-L et al. Reduced In Vitro Susceptibility of Streptococcus pyogenes to  $\beta$ -Lactam Antibiotics Associated with Mutations in the pbp2x Gene Is Geographically Widespread. J Clin Microbiol 2020; 58(4). doi: 10.1128/jcm.01993-19.

22. Southon SB, Beres SB, Kachroo P, Saavedra MO, Erlendsdóttir H, Haraldsson G et al. Population Genomic Molecular Epidemiological Study of Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* in Iceland, 1995 to 2016: Identification of a Large Clonal Population with a *pbp2x* Mutation Conferring Reduced In Vitro  $\beta$ -Lactam Susceptibility. *J Clin Microbiol* 2020; 58(9). doi: 10.1128/jcm.00638-20.
23. Vannice KS, Ricaldi J, Nanduri S, Fang FC, Lynch JB, Bryson-Cahn C et al. *Streptococcus pyogenes* *pbp2x* Mutation Confers Reduced Susceptibility to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Clin Infect Dis* 2020; 71(1):201–4. doi: 10.1093/cid/ciz1000.
24. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
25. Powell LM, Choi SJ, Chipman CE, Grund ME, LaSala PR, Lukomski S. Emergence of Erythromycin-Resistant Invasive Group A *Streptococcus*, West Virginia, USA, 2020-2021. *Emerg Infect Dis* 2023; 29(5):898–908. doi: 10.3201/eid2905.221421.
26. Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburgh. *N Engl J Med* 2002; 346(16):1200–6. doi: 10.1056/NEJMoa013169.
27. Köller T, Manetti AGO, Kreikemeyer B, Lembke C, Margarit I, Grandi G et al. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus pyogenes* isolates from various infection sites. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 4):442–52. doi: 10.1099/jmm.0.013581-0.
28. Reinert RR, Lütticken R, Sutcliffe JA, Tait-Kamradt A, Cil MY, Schorn HM et al. Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(4):1369–73. doi: 10.1128/aac.48.4.1369-1373.2004.
29. Rubio-López V, Valdezate S, Alvarez D, Villalón P, Medina MJ, Salcedo C et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiol* 2012; 12:215. doi: 10.1186/1471-2180-12-215.
30. Podbielski A, Kreikemeyer B. Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells—a safe place? *Lancet* 2001; 358(9275):3–4. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05296-X.
31. Khan DA, Banerji A, Bernstein JA, Bilgicer B, Blumenthal K, Castells M et al. Cephalosporin Allergy: Current Understanding and Future Challenges. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019; 7(7):2105–14. doi: 10.1016/j.jaip.2019.06.001.

32. Facinelli B, Spinaci C, Magi G, Giovanetti E, E Varaldo P. Association between erythromycin resistance and ability to enter human respiratory cells in group A streptococci. *Lancet* 2001; 358(9275):30–3. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05253-3.
33. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E et al. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2721–7. doi: 10.1128/jcm.00512-06.
34. Johnson AF, LaRock CN. Antibiotic Treatment, Mechanisms for Failure, and Adjunctive Therapies for Infections by Group A *Streptococcus*. *Front Microbiol* 2021; 12:760255. doi: 10.3389/fmicb.2021.760255.
35. Sela S, Barzilai A. Why do we fail with penicillin in the treatment of group A streptococcus infections? *Ann Med* 1999; 31(5):303–7. doi: 10.3109/07853899908995895.
36. Lancefield RC. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J Exp Med* 1933; 57(4):571–95. doi: 10.1084/jem.57.4.571.
37. SKERMAN VBD, McGowan V, SNEATH PHA. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1980; 30(1):225–420. doi: 10.1099/00207713-30-1-225.
38. Patterson MJ. *Medical Microbiology: Streptococcus*. 4<sup>th</sup>. Galveston (TX); 1996.
39. Brown JH. *The Use of blood agar for the study of streptococci*. New York: Rockefeller Institute for medical research; 1919. (Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research; Bd. 9).
40. Schottmüller H. Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. *Münchener med. Wochenschrift* 1903; (20, 21).
41. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A *Streptococcus*. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(2):264–301. doi: 10.1128/cmr.00101-13.
42. Gier B de, Marchal N, Beer-Schuurman I de, Te Wierik M, Hooiveld M, Melker HE de et al. Increase in invasive group A streptococcal (*Streptococcus pyogenes*) infections (iGAS) in young children in the Netherlands, 2022. *Euro Surveill* 2023; 28(1). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.1.2200941.

43. Lancefield RC. THE ANTIGENIC COMPLEX OF STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS : I. DEMONSTRATION OF A TYPE-SPECIFIC SUBSTANCE IN EXTRACTS OF STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS. *J Exp Med* 1928; 47(1):91–103. doi: 10.1084/jem.47.1.91.
44. Lancefield RC. THE ANTIGENIC COMPLEX OF STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS : II. CHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF THE PROTEIN FRACTIONS. *J Exp Med* 1928; 47(3):469–80. doi: 10.1084/jem.47.3.469.
45. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* 2002; 34(2):77–87. doi: 10.1080/07853890252953464.
46. Carlsson F, Berggård K, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G. Evasion of phagocytosis through cooperation between two ligand-binding regions in Streptococcus pyogenes M protein. *J Exp Med* 2003; 198(7):1057–68. doi: 10.1084/jem.20030543.
47. Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends Microbiol* 2010; 18(6):275–82. doi: 10.1016/j.tim.2010.02.007.
48. Ghosh P. Variation, Indispensability, and Masking in the M protein. *Trends Microbiol* 2018; 26(2):132–44. doi: 10.1016/j.tim.2017.08.002.
49. Fiedler T, Salamon A, Adam S, Herzmann N, Taubenheim J, Peters K. Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2013; 319(18):2883–92. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.08.020.
50. Feldman-Salit A, Hering S, Messiha HL, Veith N, Cojocar V, Sieg A et al. Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria. *J Biol Chem* 2013; 288(29):21295–306. doi: 10.1074/jbc.M113.458265.
51. Levering J, Musters MWJM, Bekker M, Bellomo D, Fiedler T, Vos WM de et al. Role of phosphate in the central metabolism of two lactic acid bacteria—a comparative systems biology approach. *FEBS J* 2012; 279(7):1274–90. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08523.x.
52. Fiedler T, Bekker M, Jonsson M, Mehmeti I, Pritschke A, Siemens N et al. Characterization of three lactic acid bacteria and their isogenic Idh deletion mutants shows optimization for YATP (cell mass produced per mole of ATP) at their physiological pHs. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(2):612–7. doi: 10.1128/AEM.01838-10.

53. Levering J, Fiedler T, Sieg A, van Grinsven KWA, Hering S, Veith N et al. Genome-scale reconstruction of the *Streptococcus pyogenes* M49 metabolic network reveals growth requirements and indicates potential drug targets. *J Biotechnol* 2016; 232:25–37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.01.035.
54. Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, Kengen SWM. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front Microbiol* 2015; 6:742. doi: 10.3389/fmicb.2015.00742.
55. Agledal L, Niere M, Ziegler M. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Rep* 2010; 15(1):2–10. doi: 10.1179/174329210X12650506623122.
56. Habenicht A. The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. *Biol Chem* 1997; 378(12):1413–9.
57. Le Breton Y, Belew AT, Valdes KM, Islam E, Curry P, Tettelin H et al. Essential Genes in the Core Genome of the Human Pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Sci Rep* 2015; 5:9838. doi: 10.1038/srep09838.
58. Eisenberg P, Albert L, Teuffel J, Zitzow E, Michaelis C, Jarick J et al. The Non-phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase GapN Is a Potential New Drug Target in *Streptococcus pyogenes*. *Front Microbiol* 2022; 13:802427. doi: 10.3389/fmicb.2022.802427.
59. Crow VL, Wittenberger CL. Separation and properties of NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Streptococcus mutans*. *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254(4):1134–42. doi: 10.1016/S0021-9258(17)34179-0.
60. Iddar A, Valverde F, Serrano A, Soukri A. Purification of recombinant non-phosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes* expressed in *E. coli*. *Mol Cell Biochem* 2003; 247(1-2):195–203. doi: 10.1023/a:1024112027440.
61. Grant GA. Modification of Cysteine. *Curr Protoc Protein Sci* 2017; 87:15.1.1-15.1.23. doi: 10.1002/cpps.22.
62. Barrick JE, Breaker RR. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* 2007; 8(11):R239. doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r239.
63. Topp S, Reynoso CMK, Seeliger JC, Goldlust IS, Desai SK, Murat D et al. Synthetic riboswitches that induce gene expression in diverse bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(23):7881–4. doi: 10.1128/AEM.01537-10.

- 
64. Ji Y, Zhang B, Van SF, Horn, Warren P, Woodnutt G et al. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* 2001; 293(5538):2266–9. doi: 10.1126/science.1063566.
65. Pifer R, Greenberg DE. Antisense antibacterial compounds. *Transl Res* 2020; 223:89–106. doi: 10.1016/j.trsl.2020.06.001.
66. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254(5037):1497–500. doi: 10.1126/science.1962210.
67. Demidov VV, Potaman VN, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchard O, Sönnichsen SH et al. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol* 1994; 48(6):1310–3. doi: 10.1016/0006-2952(94)90171-6.
68. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, Lima MCP de. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010; 3(4):961–93. doi: 10.3390/ph3040961.
69. Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(3):99–103. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01447-4.
70. Barkowsky G, Lemster A-L, Pappesch R, Jacob A, Krüger S, Schröder A et al. Influence of Different Cell-Penetrating Peptides on the Antimicrobial Efficiency of PNAs in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 18:444–54. doi: 10.1016/j.omtn.2019.09.010.
71. Patenge N, Pappesch R, Krawack F, Walda C, Mraheil MA, Jacob A et al. Inhibition of Growth and Gene Expression by PNA-peptide Conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; 2(11):e132. doi: 10.1038/mtna.2013.62.
72. Herce HD, Garcia AE, Litt J, Kane RS, Martin P, Enrique N et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J* 2009; 97(7):1917–25. doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.066.
73. Eisenberg P. Untersuchungen zur Eignung der nicht-phosphorylierenden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GapN als therapeutisches Target bei Streptokokken [Bachelorarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2018.
74. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry’s grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(3):203–14. doi: 10.1038/nrd3078.

75. Chiba S, Ikeda K, Ishida T, Gromiha MM, Taguchi Y-H, Iwadate M et al. Identification of potential inhibitors based on compound proposal contest: Tyrosine-protein kinase Yes as a target. *Sci Rep* 2015; 5:17209. doi: 10.1038/srep17209.
76. Takenaka T. Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU Int* 2001; 88 Suppl 2:7-10; discussion 49-50. doi: 10.1111/j.1464-410X.2001.00112.x.
77. Ou-Yang S-S, Lu J-Y, Kong X-Q, Liang Z-J, Luo C, Jiang H. Computational drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(9):1131–40. doi: 10.1038/aps.2012.109.
78. Wang F, Liu D, Wang H, Luo C, Zheng M, Liu H et al. Computational screening for active compounds targeting protein sequences: methodology and experimental validation. *J Chem Inf Model* 2011; 51(11):2821–8. doi: 10.1021/ci200264h.
79. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2011; 7(2):146–57.
80. RCSB Protein Data Bank. Number of Released PDB Structures per Year [Stand: 11.10.2023]. Verfügbar unter: <https://www.rcsb.org/stats/all-released-structures>.
81. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1):235–42. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
82. Chen L, K. Morrow J, T. Tran H, S. Phatak S, Du-Cuny L, Zhang S. From Laptop to Benchtop to Bedside: Structure-based Drug Design on Protein Targets. *curr drug metab* 2012; 18(9):1217–39. doi: 10.2174/138920012799362837.
83. Cobessi D, Tête-Favier F, Marchal S, Branlant G, Aubry A. Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol* 2000; 300(1):141–52. doi: 10.1006/jmbi.2000.3824.
84. Eisenberg P. Elucidating the Role of the Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase GapN as Major NADPH Source in *Streptococcus pyogenes* and its Potential as a Drug Target [Masterarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2020.
85. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986; 189(1):113–30. doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
86. Michaelis C. Investigating the role of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GapN in oral streptococci [Masterarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2019.

- 
87. Schröder T. Identifizierung von GapN als mögliches essentielles Enzym in *Streptococcus pyogenes* [Masterarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2017.
  88. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3):403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
  89. Wandinger A-M. Functional studies of aldehyde dehydrogenase GapN from *Streptococcus pyogenes* - Fragment screening with GapN for drug development [Masterarbeit]. Würzburg: Julius-Maximilian-Universität Würzburg; 2022.
  90. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166(4):557–80. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
  91. Roßmann A-L. NADPH generating processes and their potential as drug targets in *S. pyogenes* [Masterarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2022.
  92. Podbielski A, Spellerberg B, Woischnik M, Pohl B, Lütticken R. Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). *Gene* 1996; 177(1-2):137–47. doi: 10.1016/0378-1119(96)84178-3.
  93. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 24414, Barium Sulfate; 2023 [Stand: 28.09.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Barium-Sulfate>.
  94. World Health Organization. WHO COVID-19 Dashboard: Latest reported counts of cases and deaths; 2020 [Stand: 03.10.2023]. Verfügbar unter: <https://covid19.who.int/WHO-COVID-19-global-table-data.csv>.
  95. ARNON DI, ROSENBERG LL, WHATLEY FR. A New Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase from Photosynthetic Tissues. *Nature* 1954; 173(4415):1132–4. doi: 10.1038/1731132a0.
  96. ROSENBERG LL, ARNON DI. The preparation and properties of a new glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from photosynthetic tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1955; 217(1):361–71.
  97. Iddar A, Valverde F, Assobhei O, Serrano A, Soukri A. Widespread occurrence of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase among gram-positive bacteria. *Int Microbiol* 2005; 8(4):251–8.
  98. Iglesias AA, Losada M. Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1988; 260(2):830–40. doi: 10.1016/0003-9861(88)90514-0.

99. Brunner NA, Brinkmann H, Siebers B, Hensel R. NAD<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. The first identified archaeal member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(11):6149–56. doi: 10.1074/jbc.273.11.6149.
100. Asanuma N, Hino T. Presence of NAD<sup>+</sup>-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and CcpA-dependent transcription of its gene in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 257(1):17–23. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00111.x.
101. Xu J-Z, Yang H-K, Zhang W-G. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis. *Crit Rev Biotechnol* 2018; 38(7):1061–76. doi: 10.1080/07388551.2018.1437387.
102. Barkowsky G, Abt C, Pöhner I, Bieda A, Hammerschmidt S, Jacob A et al. Antimicrobial Activity of Peptide-Coupled Antisense Peptide Nucleic Acids in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Spectr* 2022; 10(6):e0049722. doi: 10.1128/spectrum.00497-22.
103. Rohrer S, Ehlert K, Tschierske M, Labischinski H, Berger-Bächi B. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16):9351–6. doi: 10.1073/pnas.96.16.9351.
104. Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Nielsen PE, Good L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther* 2004; 10(4):652–9. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.006.
105. Bai H, Sang G, You Y, Xue X, Zhou Y, Hou Z et al. Targeting RNA polymerase primary  $\sigma_{70}$  as a therapeutic strategy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antisense peptide nucleic acid. *PLoS One* 2012; 7(1):e29886. doi: 10.1371/journal.pone.0029886.
106. Abushahba MFN, Mohammad H, Thangamani S, Hussein AAA, Seleem MN. Impact of different cell penetrating peptides on the efficacy of antisense therapeutics for targeting intracellular pathogens. *Sci Rep* 2016; 6:20832. doi: 10.1038/srep20832.
107. Knudsen H, Nielsen PE. Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(3):494–500. doi: 10.1093/nar/24.3.494.

108. Bonham MA, Brown S, Boyd AL, Brown PH, Bruckenstein DA, Harvey JC et al. An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(7):1197–203. doi: 10.1093/nar/23.7.1197.
109. Bai H, You Y, Yan H, Meng J, Xue X, Hou Z et al. 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* 2012; 33(2):659–67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.075.
110. Good L, Nielsen PE. Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nat Biotechnol* 1998; 16(4):355–8. doi: 10.1038/nbt0498-355.
111. Boyd DA, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 1995; 177(10):2622–7. doi: 10.1128/jb.177.10.2622-2627.1995.
112. Arutyunov D, Schmalhausen E, Orlov V, Rahuel-Clermont S, Nagradova N, Branlant G et al. An unusual effect of NADP<sup>+</sup> on the thermostability of the nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochem Cell Biol* 2013; 91(5):295–302. doi: 10.1139/bcb-2012-0104.
113. Patenge N, Rückert C, Bull J, Strey K, Kalinowski J, Kreikemeyer B. Whole-Genome Sequence of *Streptococcus pyogenes* Strain 591, Belonging to the Genotype emm49. *Microbiol Resour Announc* 2021; 10(43):e0081621. doi: 10.1128/mra.00816-21.
114. Jang EH, Park SA, Chi YM, Lee KS. Kinetic and structural characterization for cofactor preference of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Cells* 2014; 37(10):719–26. doi: 10.14348/molcells.2014.0162.
115. KEGG. *Streptococcus pyogenes* M1 GAS (serotype M1): SPy\_1067 [Stand: 19.10.2023]. Verfügbar unter: [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?spy:SPy\\_1067](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?spy:SPy_1067).
116. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1):27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.
117. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci* 2019; 28(11):1947–51. doi: 10.1002/pro.3715.
118. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res* 2023; 51(D1):D587-D592. doi: 10.1093/nar/gkac963.

119. Iglesias AA, Serrano A, Guerrero MG, Losada M. Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1987; 925(1):1–10. doi: 10.1016/0304-4165(87)90141-3.
120. Kelly GJ, Gibbs M. Nonreversible d-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase of Plant Tissues. *Plant Physiol* 1973; 52(2):111–8. doi: 10.1104/pp.52.2.111.
121. Williams JF, Blackmore PF, Duke CC, MacLeod JK. Fact, uncertainty and speculation concerning the biochemistry of D-erythrose-4-phosphate and its metabolic roles. *Int J Biochem* 1980; 12(3):339–44. doi: 10.1016/0020-711X(80)90112-3.
122. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2015; 90(3):927–63. doi: 10.1111/brv.12140.
123. Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, Marchi E de, Suski JM, Bononi A et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* 2012; 8(3):343–57. doi: 10.1007/s11302-012-9305-8.
124. Larsson C, Phlman I, Gustafsson L. The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2000; 16(9):797–809. doi: 10.1002/1097-0061(20000630)16:9<797::AID-YEA553>3.0.CO;2-5.
125. Ettema TJG, Ahmed H, Geerling ACM, van der Oost J, Siebers B. The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. *Extremophiles* 2008; 12(1):75–88. doi: 10.1007/s00792-007-0082-1.
126. Cao R, Zeidan AA, Rådström P, van Niel EWJ. Inhibition kinetics of catabolic dehydrogenases by elevated moieties of ATP and ADP—implication for a new regulation mechanism in *Lactococcus lactis*. *FEBS J* 2010; 277(8):1843–52. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07601.x.
127. Tao L, LeBlanc DJ, Ferretti JJ. Novel streptococcal-integration shuttle vectors for gene cloning and inactivation. *Gene* 1992; 120(1):105–10. doi: 10.1016/0378-1119(92)90016-I.
128. Murakami J, Terao Y, Morisaki I, Hamada S, Kawabata S. Group A streptococcus adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein. *J Biol Chem* 2012; 287(26):22266–75. doi: 10.1074/jbc.M112.350082.

- 
129. Fiedler T, Kreikemeyer B, Sugareva V, Redanz S, Arlt R, Standar K et al. Impact of the *Streptococcus pyogenes* Mga regulator on human matrix protein binding and interaction with eukaryotic cells. *Int J Med Microbiol* 2010; 300(4):248–58. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.07.004.
130. Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K et al. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog* 2010; 6(4):e1000832. doi: 10.1371/journal.ppat.1000832.
131. Ato M, Ikebe T, Kawabata H, Takemori T, Watanabe H. Incompetence of neutrophils to invasive group A streptococcus is attributed to induction of plural virulence factors by dysfunction of a regulator. *PLoS One* 2008; 3(10):e3455. doi: 10.1371/journal.pone.0003455.
132. Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L, Low DE et al. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun* 2000; 68(7):4245–54. doi: 10.1128/IAI.68.7.4245-4254.2000.
133. Bugrysheva JV, Froehlich BJ, Freiberg JA, Scott JR. The histone-like protein Hlp is essential for growth of *Streptococcus pyogenes*: comparison of genetic approaches to study essential genes. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(13):4422–8. doi: 10.1128/AEM.00554-11.
134. Vo PLH, Ronda C, Klompe SE, Chen EE, Acree C, Wang HH et al. CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering. *Nat Biotechnol* 2021; 39(4):480–9. doi: 10.1038/s41587-020-00745-y.
135. Wu X, Zha J, Koffas MAG, Dordick JS. Reducing *Staphylococcus aureus* resistance to lysostaphin using CRISPR-dCas9. *Biotechnol Bioeng* 2019; 116(12):3149–59. doi: 10.1002/bit.27143.
136. Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA Biol* 2019; 16(4):380–9. doi: 10.1080/15476286.2019.1582974.
137. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096):816–21. doi: 10.1126/science.1225829.
138. Brouwer S, Jespersen MG, Ong C-LY, Oliveira DMP de, Keller B, Cork AJ et al. *Streptococcus pyogenes* Hijacks Host Glutathione for Growth and Innate Immune Evasion. *mBio* 2022; 13(3):e0067622. doi: 10.1128/mbio.00676-22.

139. Baswar D, Mishra A. Effect of Organic Solvents on Acetylcholinesterase Inhibition and Enzyme Kinetics. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2023; 23(1):40–7. doi: 10.2174/1871524923666230417094549.
140. Misuri L, Cappiello M, Balestri F, Moschini R, Barracco V, Mura U et al. The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32(1):1152–8. doi: 10.1080/14756366.2017.1363744.
141. Kumar A, Darreh-Shori T. DMSO: A Mixed-Competitive Inhibitor of Human Acetylcholinesterase. *ACS Chem Neurosci* 2017; 8(12):2618–25. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00344.
142. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 445375; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445375#section=2D-Structure>.
143. ENAMINE Ltd. Z1278761982; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://new.enaminestore.com/catalog/Z1278761982?cat=SCR>.
144. Molport SIA. N-cyclopentylmethanesulfonyl-2-(3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-1-yl)acetamide; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://www.molport.com/shop/molecule-image?id=35829858&width=350&height=350&quality=100>.
145. Intlekofer AM, Wang B, Liu H, Shah H, Carmona-Fontaine C, Rustenburg AS et al. L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. *Nat Chem Biol* 2017; 13(5):494–500. doi: 10.1038/nchembio.2307.
146. Hall MR, Berk RS. Thiosulfate oxidase from an *Alcaligenes* grown on mercaptosuccinate. *Can J Microbiol* 1972; 18(2):235–45. doi: 10.1139/m72-036.
147. Brandt U, Deters A, Steinbüchel A. A jack-of-all-trades: 2-mercaptosuccinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(11):4545–57. doi: 10.1007/s00253-015-6605-2.
148. Ghaderi S, Ramesh B, Seifalian AM. Synthesis of mercaptosuccinic acid/MercaptoPolyhedral oligomeric silsesquioxane coated cadmium telluride quantum dots in cell labeling applications. *J Nanosci Nanotechnol* 2012; 12(6):4928–35. doi: 10.1166/jnn.2012.4907.
149. Rizvi SB, Yildirimer L, Ghaderi S, Ramesh B, Seifalian AM, Keshtgar M. A novel POSS-coated quantum dot for biological application. *Int J Nanomedicine* 2012; 7:3915–27. doi: 10.2147/IJN.S28577.

150. Yong K-T, Ding H, Roy I, Law W-C, Bergey EJ, Maitra A et al. Imaging pancreatic cancer using bioconjugated InP quantum dots. *ACS Nano* 2009; 3(3):502–10. doi: 10.1021/nn8008933.
151. Behnisch-Cornwell S, Laubenstein G, Bednarski PJ. Studies of the inhibitory activities of tiopronin and mercaptosuccinic acid on glutathione peroxidase and their cytotoxic and antioxidant properties. *Pharmazie* 2019; 74(9):536–42. doi: 10.1691/ph.2019.9472.
152. Chaudiere J, Wilhelmsen EC, Tappel AL. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259(2):1043–50.
153. Hopkins SJ, Jayson MI, van der Zeil P. Inhibition of lymphocyte activation by gold sodium thiomalate. *Br J Pharmacol* 1983; 79(2):617–22. doi: 10.1111/j.1476-5381.1983.tb11037.x.
154. Newman PM, To SS, Robinson BG, Hyland VJ, Schrieber L. Effect of gold sodium thiomalate and its thiomalate component on the in vitro expression of endothelial cell adhesion molecules. *J Clin Invest* 1994; 94(5):1864–71. doi: 10.1172/JC1117536.
155. Gizer SG, Sahiner N. The effect of sulphur on the antibacterial properties of succinic acid-Cu(II) and mercaptosuccinic acid-Cu(II) MOFs. *Inorganica Chimica Acta* 2021; 528:120611. doi: 10.1016/j.ica.2021.120611.
156. Concia E, Marone P, Moreo GC, Sardi C, Braschi R. RV11 (propionyl erythromycin mercaptosuccinate) pharmacokinetics in bronchial secretions. *J Int Med Res* 1986; 14(3):137–41. doi: 10.1177/030006058601400304.
157. Gonella J, inventor; Pierrel SpA. Salts of erythromycin with mercapto-succinic acid having therapeutic activity, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them. EP0174395A2.
158. Jeong J-H, Kim S-H, Huh C-K. Separation and Identification of an Antimicrobial Substance from *Schisandra chinensis* Extract against *Streptococcus mutans* KCCM 40105 Strain. *Molecules* 2023; 28(8). doi: 10.3390/molecules28083417.
159. Badie OH, Basyony AF, Samir R. Computer-Based Identification of Potential Druggable Targets in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: A Combined In Silico, In Vitro and In Vivo Study. *Microorganisms* 2022; 10(10). doi: 10.3390/microorganisms10101973.

160. Over KF, Hettiarachchy N, Johnson MG, Davis B. Effect of organic acids and plant extracts on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in broth culture model and chicken meat systems. *J Food Sci* 2009; 74(9):M515-21. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01375.x.
161. Peh E, Kittler S, Reich F, Kehrenberg C. Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. and development of combinations-A synergistic effect? *PLoS One* 2020; 15(9):e0239312. doi: 10.1371/journal.pone.0239312.
162. Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 2003; 82(4):632–9. doi: 10.1093/ps/82.4.632.
163. Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology* 1992; 73(5):363–70. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x.
164. European Medicines Agency. Decision on the granting of a product specific waiver for tartaric acid (EMA-000772-PIP01-09): P/41/2010; 2010 [Stand: 05.11.2023]. Verfügbar unter: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p/41/2010-european-medicines-agency-decision-31-march-2010-granting-product-specific-waiver-tartaric-acid/2006-european-parliam\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p/41/2010-european-medicines-agency-decision-31-march-2010-granting-product-specific-waiver-tartaric-acid/2006-european-parliam_en.pdf).
165. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 6268; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6268#section=2D-Structure>.
166. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 439655; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439655#section=2D-Structure>.
167. Arendsen DL, Baker WR, Fakhoury SA, Fung, K.L. Anthony, Garey, David S., McClellan WJ, O’connor SJ et al., inventors; Abbot Laboratories. Cyclobutane derivatives as inhibitors of squalene synthase and protein farnesyltransferase. EP0821665A1. 04.02.1998.
168. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 2017; 170(1):17–33. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.009.
169. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011; 2(3):344–58. doi: 10.1177/1947601911411084.
170. Rowinsky EK, Windle JJ, Hoff DD von. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999; 17(11):3631–52. doi: 10.1200/JCO.1999.17.11.3631.

171. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 423699; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/423699#section=2D-Structure>.
172. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 136576256; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/136576256#section=2D-Structure>.
173. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 12676756; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12676756#section=2D-Structure>.
174. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 137582; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/137582#section=2D-Structure>.
175. Joshi P, Gupta A, Gupta V. Insights into multifaceted activities of CysK for therapeutic interventions. *3 Biotech* 2019; 9(2):44. doi: 10.1007/s13205-019-1572-4.
176. Badiani K, Lightfoot P, Gani D. Synthesis and mode of action of 1-substituted trans-cyclopropane 1,2-dicarboxylic acids: inhibitors of the methylaspartase reaction. *Chem. Commun.* 1996; (5):675. doi: 10.1039/CC9960000675.
177. Barker HA, Smyth RD, Wilson RM, Weissbach H. The Purification and Properties of  $\beta$ -Methylaspartase. *Journal of Biological Chemistry* 1959; 234(2):320–8. doi: 10.1016/S0021-9258(18)70297-4.
178. Kato Y, Asano Y. 3-Methylaspartate ammonia-lyase as a marker enzyme of the mesaconate pathway for (S)-glutamate fermentation in Enterobacteriaceae. *Arch Microbiol* 1997; 168(6):457–63. doi: 10.1007/s002030050522.
179. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 251524, 5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid; 2023. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic-acid>.
180. Dascalu AE, Rouleau Billamboz M, Guinet A, Rigo B, Lipka Belloli E, Hartkoorn RC et al., inventors. Hydrazide derivatives and their specific use as antibacterial agents by controlling acinetobacter baumannii bacterium. WO2020169682A1. 27.08.2020.
181. Mukerji SK, Yang SF. Phosphoenolpyruvate carboxylase from spinach leaf tissue: inhibition by sulfite ion. *Plant Physiol* 1974; 53(6):829–34. doi: 10.1104/pp.53.6.829.

182. Kai Y, Matsumura H, Izui K. Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2003; 414(2):170–9. doi: 10.1016/s0003-9861(03)00170-x.
183. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 919318; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/919318#section=2D-Structure>.
184. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 136524; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/136524#section=2D-Structure>.
185. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 251524; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/251524#section=2D-Structure>.
186. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 567821; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/567821#section=2D-Structure>.
187. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 2723958; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2723958#section=2D-Structure>.
188. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1; 2023 [Stand: 24.10.2023]. Verfügbar unter: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_13.1\\_Breakpoint\\_Tables.xlsx](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.xlsx).
189. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 91927097; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91927097#section=2D-Structure>.
190. Butler MS, Henderson IR, Capon RJ, Blaskovich MAT. Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. *J Antibiot (Tokyo)* 2023; 76(8):431–73. doi: 10.1038/s41429-023-00629-8.
191. Butler MS, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *J Antibiot (Tokyo)* 2011; 64(6):413–25. doi: 10.1038/ja.2011.44.
192. Anthony NG, Breen D, Clarke J, Donoghue G, Drummond AJ, Ellis EM et al. Antimicrobial lexitropsins containing amide, amidine, and alkene linking groups. *J Med Chem* 2007; 50(24):6116–25. doi: 10.1021/jm070831g.

193. Blondiaux N, Moune M, Desroses M, Frita R, Flipo M, Mathys V et al. Reversion of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by spiroisoxazoline SMART-420. *Science* 2017; 355(6330):1206–11. doi: 10.1126/science.aag1006.
194. Hariguchi N, Chen X, Hayashi Y, Kawano Y, Fujiwara M, Matsuba M et al. OPC-167832, a Novel Carbostyryl Derivative with Potent Antituberculosis Activity as a DprE1 Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64(6). doi: 10.1128/AAC.02020-19.
195. Li X, Hernandez V, Rock FL, Choi W, Mak YSL, Mohan M et al. Discovery of a Potent and Specific *M. tuberculosis* Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor: (S)-3-(Aminomethyl)-4-chloro-7-(2-hydroxyethoxy)benzoc1,2oxaborol-1(3H)-ol (GSK656). *J Med Chem* 2017; 60(19):8011–26. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00631.
196. Nesterenko LN, Zigangirova NA, Zayakin ES, Luyksaar SI, Kobets NV, Balunets DV et al. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones suppresses *Salmonella* infection in vivo. *J Antibiot (Tokyo)* 2016; 69(6):422–7. doi: 10.1038/ja.2015.131.
197. Nuermberger EL, Martínez-Martínez MS, Sanz O, Urones B, Esquivias J, Soni H et al. GSK2556286 Is a Novel Antitubercular Drug Candidate Effective In Vivo with the Potential To Shorten Tuberculosis Treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2022; 66(6):e0013222. doi: 10.1128/aac.00132-22.
198. Nelson RG, Rosowsky A. Dicyclic and Tricyclic Diaminopyrimidine Derivatives as Potent Inhibitors of *Cryptosporidium parvum* Dihydrofolate Reductase: Structure-Activity and Structure-Selectivity Correlations. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(3):940. doi: 10.1128/AAC.
199. Payne DJ, Miller WH, Berry V, Brosky J, Burgess WJ, Chen E et al. Discovery of a novel and potent class of FabI-directed antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(10):3118–24. doi: 10.1128/AAC.46.10.3118-3124.2002.
200. Pethe K, Bifani P, Jang J, Kang S, Park S, Ahn S et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat Med* 2013; 19(9):1157–60. doi: 10.1038/nm.3262.
201. Wright GE, Brown NC, Xu W-C, Long Z-Y, Zhi C, Gambino JJ et al. Active site directed inhibitors of replication-specific bacterial DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(3):729–32. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.11.016.
202. Gao P, Davies J, Kao RYT. Dehydrosqualene Desaturase as a Novel Target for Anti-Virulence Therapy against *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2017; 8(5). doi: 10.1128/mbio.01224-17.

203. Raisig A, Sandmann G. 4,4'-diapophytoene desaturase: catalytic properties of an enzyme from the C(30) carotenoid pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1999; 181(19):6184–7. doi: 10.1128/JB.181.19.6184-6187.1999.
204. Kao RYT, Gao P, Li X, Liu M, inventors. Compounds affecting pigment production and methods for treatment of bacterial diseases. USA Patent 11052078.
205. Iu H-T-V, Fong P-M, Yam H-C-B, Gao P, Yan B, Lai P-M et al. Identification of a Small Molecule Compound Active against Antibiotic-Tolerant *Staphylococcus aureus* by Boosting ATP Synthesis. *Int J Mol Sci* 2023; 24(7). doi: 10.3390/ijms24076242.
206. Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi F, Anderson MH, Shi W. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(11):3651–7. doi: 10.1128/aac.00622-06.
207. Zhang OL, Niu JY, Yin IX, Yu OY, Mei ML, Chu CH. Growing Global Research Interest in Antimicrobial Peptides for Caries Management: A Bibliometric Analysis. *J Funct Biomater* 2022; 13(4). doi: 10.3390/jfb13040210.
208. Zhang B, Zhao M, Tian J, Lei L, Huang R. Novel antimicrobial agents targeting the *Streptococcus mutans* biofilms discovery through computer technology. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12:1065235. doi: 10.3389/fcimb.2022.1065235.
209. Luong AD, Buzid A, Luong JHT. Important Roles and Potential Uses of Natural and Synthetic Antimicrobial Peptides (AMPs) in Oral Diseases: Cavity, Periodontal Disease, and Thrush. *J Funct Biomater* 2022; 13(4). doi: 10.3390/jfb13040175.
210. O'Dwyer K, Hackel M, Hightower S, Hoban D, Bouchillon S, Qin D et al. Comparative analysis of the antibacterial activity of a novel peptide deformylase inhibitor, GSK1322322. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(5):2333–42. doi: 10.1128/AAC.02566-12.
211. Singh S, Singh DB, Singh A, Gautam B, Ram G, Dwivedi S et al. An Approach for Identification of Novel Drug Targets in *Streptococcus pyogenes* SF370 Through Pathway Analysis. *Interdiscip Sci* 2016; 8(4):388–94. doi: 10.1007/s12539-015-0139-2.
212. Chiarot E, Faralla C, Chiappini N, Tuscano G, Falugi F, Gambellini G et al. Targeted amino acid substitutions impair streptolysin O toxicity and group A *Streptococcus* virulence. *mBio* 2013; 4(1):e00387-12. doi: 10.1128/mBio.00387-12.
213. Wijesundara NM, Lee SF, Cheng Z, Davidson R, Rupasinghe HPV. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. *Sci Rep* 2021; 11(1):1487. doi: 10.1038/s41598-020-79713-0.

- 
214. Ferreira M, Ogren M, Dias JNR, Silva M, Gil S, Tavares L et al. Liposomes as Antibiotic Delivery Systems: A Promising Nanotechnological Strategy against Antimicrobial Resistance. *Molecules* 2021; 26(7). doi: 10.3390/molecules26072047.
215. Oehmcke-Hecht S, Nass LE, Wichura JB, Mikkat S, Kreikemeyer B, Fiedler T. Deletion of the L-Lactate Dehydrogenase Gene *ldh* in *Streptococcus pyogenes* Leads to a Loss of SpeB Activity and a Hypovirulent Phenotype. *Front Microbiol* 2017; 8:1841. doi: 10.3389/fmicb.2017.01841.
216. Chalmers C, Khemlani AHJ, Sohn CR, Loh JMS, Tsai CJ-Y, Proft T. *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA) mediated virulence does not exclusively depend on nuclease activity. *J Microbiol Immunol Infect* 2020; 53(1):42–8. doi: 10.1016/j.jmii.2017.09.006.
217. Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013; 4(5):419–28. doi: 10.4161/viru.24930.
218. Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 2013; 4(5):350–3. doi: 10.4161/viru.25240.
219. Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence* 2011; 2(2):111–9. doi: 10.4161/viru.2.2.14338.
220. Aljoundi A, Bjjj I, El Rashedy A, Soliman MES. Covalent Versus Non-covalent Enzyme Inhibition: Which Route Should We Take? A Justification of the Good and Bad from Molecular Modelling Perspective. *Protein J* 2020; 39(2):97–105. doi: 10.1007/s10930-020-09884-2.
221. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 105; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/105#section=2D-Structure>.
222. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 668; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/668#section=2D-Structure>.
223. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 1081; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1081#section=2D-Structure>.
224. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 43; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43#section=2D-Structure>.

225. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 124138234; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124138234#section=2D-Structure>.
226. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 136168; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/136168#section=2D-Structure>.
227. ENAMINE Ltd. Z2027662891; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://new.enaminestore.com/catalog/Z2027662891?cat=SCR>.
228. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 21679072; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21679072#section=2D-Structure>.
229. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 132371607; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/132371607#section=2D-Structure>.
230. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 43444971; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43444971#section=2D-Structure>.
231. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 355326; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/355326#section=2D-Structure>.
232. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 21700121; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21700121#section=2D-Structure>.
233. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 120308; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/120308#section=2D-Structure>.
234. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 11051676; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11051676#section=2D-Structure>.
235. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 93095; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/93095#section=2D-Structure>.

236. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 656446; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/656446#section=2D-Structure>.
237. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 19800617; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19800617#section=2D-Structure>.
238. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 13077914; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13077914#section=2D-Structure>.
239. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 7898; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7898#section=2D-Structure>.
240. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 10006; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10006#section=2D-Structure>.
241. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Chemical Structure Depiction for CID 344373; 2023 [Stand: 19.11.2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/344373#section=2D-Structure>.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

### allgemeine Abkürzungen

|          |  |
|----------|--|
| %        | Prozent  |
| % v/v    | Volumenprozent (volume per volume)   |
| % w/v    | Gewichtsprozent (weight per volume)  |
| °C       | Grad Celsius   |
| cal      | Kalorie  |
| Da       | Dalton   |
| g        | Gramm  |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung  |
| h        | Stunde   |
| kat      | Katal  |
| l        | Liter  |
| M        | Mol pro Liter  |
| min      | Minute   |
| mol      | Mol  |
| s        | Sekunde  |
| U        | Unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Umsatz eines Stoffes - Aktivität von Enzymen) |
| V        | Volt   |

### Präfixe

|       |       |
|-------|-------|
| k     | kilo  |
| m     | milli |
| $\mu$ | mikro |
| n     | nano  |

### weitere Abkürzungen

|                |  |
|----------------|--|
| asPNA          | antisense Peptid-Nukleinsäure                    |
| AU             | Willkürliche Einheit                             |
| BHI-Medium     | Brain-Heart-Infusion Medium                      |
| CFU            | Koloniebildende Einheiten (colony forming units) |
| CPP            | zellpenetrierendes Peptid                        |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                 |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                           |
| DTT            | Dithiotreitol                                    |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                          |

---

|                         |  |
|-------------------------|--|
| E4P                     | Erythrose 4-Phosphat   |
| EDTA                    | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| <i>et al.</i>           | und andere   |
| FPLC                    | Fast Protein Liquid Chromatography                                       |
| G3P                     | Glycerinaldehyd-3-phosphat   |
| GabD                    | Succinatsemialdehyddehydrogenase GabD                                    |
| GapDH                   | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapDH                           |
| GapN                    | nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase<br>GapN |
| GapN <sup>-</sup>       | GapN im Genom nicht kodiert  |
| GapN <sup>+</sup>       | GapN im Genom kodiert  |
| <i>L. monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i>  |
| LB-Medium               | Lysogeny Broth Medium  |
| NAD <sup>+</sup>        | β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid   |
| NADH                    | β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert                              |
| NADP <sup>+</sup>       | β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat                                |
| NADPH                   | β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert                     |
| Nr.                     | Nummer   |
| OD                      | Optische Dichte  |
| oxPPP                   | Oxidativer Teil des Pentose-Phosphat-Wegs                                |
| oxPPP <sup>-</sup>      | oxPPP im Genom nicht kodiert   |
| oxPPP <sup>+</sup>      | oxPPP im Genom kodiert   |
| PBS                     | Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)                |
| PCR                     | Polymerasekettenreaktion   |
| PGK                     | Phosphoglyceratkinase  |
| PNA                     | Peptid Nuklein Säure (Peptide Nucleic Acid)                              |
| PNA                     | Peptid-Nukleinsäure  |
| PPP                     | Pentose-Phosphat-Weg   |
| RNA                     | Ribonukleinsäure   |
| rpm                     | Umdrehungen pro Minute   |
| RswE                    | Riboswitch E   |
| <i>S. aureus</i>        | <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| <i>S. cristatus</i>     | <i>Streptococcus cristatus</i>   |
| <i>S. dysgalactiae</i>  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> Subspezies <i>equisimilis</i>          |
| <i>ssp. equisimilis</i> |  |
| <i>S. mutans</i>        | <i>Streptococcus mutans</i>  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| <i>S. pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                      |
| <i>S. pyogenes</i>   | <i>Streptococcus pyogenes</i>                        |
| S7P                  | Sedoheptulose-7-phosphat                             |
| ScrGapN              | GapN von <i>S. cristatus</i>                         |
| scrPNA               | randomisierte (scrambled) Peptid-Nukleinsäure        |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat                                 |
| SDS-PAGE             | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese  |
| SmuGapN              | GapN von <i>S. mutans</i>                            |
| SpyGapDH             | GapDH von <i>S. pyogenes</i>                         |
| SpyGapN              | GapN von <i>S. pyogenes</i>                          |
| SV                   | Säulenvolumen  |
| THY-Medium           | Todd-Hewitt Broth Medium mit zugesetztem Hefeextrakt |
| TricBS               | Tricingepufferte Salzlösung                          |
| TRIS                 | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                     |
| Vol.                 | Volumen  |

## 8 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1 Vorhandensein (+) oder Fehlen (-) von GapN und oxPPP in Streptokokken-Spezies (58).....  | 8  |
| Tabelle 2 <i>Streptococcus pyogenes</i> Stämme .....   | 13 |
| Tabelle 3 Weitere Bakterienstämme .....  | 14 |
| Tabelle 4 Plasmide .....   | 14 |
| Tabelle 5 Zusammensetzung THY-Medium .....   | 15 |
| Tabelle 6 Zusammensetzung BHI-Medium .....   | 15 |
| Tabelle 7 Zusammensetzung LB-Medium.....   | 16 |
| Tabelle 8 Zusammensetzung PBS.....   | 16 |
| Tabelle 9 Medien mit Antibiotikazusatz .....   | 16 |
| Tabelle 10 Medien mit Selektionszusatz .....   | 16 |
| Tabelle 11 Übersicht über die verwendeten PNA.....   | 18 |
| Tabelle 12 Potenzielle GapN Inhibitoren, deren zugehörige Chemical Abstract Service (CAS) Nummer und ihr berechnete Bindeaffinität zu GapN .....                                     | 19 |
| Tabelle 13 Potenzielle GapN Inhibitoren aus dem Fragmentscreening, deren zugehörige Chemical Abstract Service Nummer und die Bindetasche in der die Substanz nachgewiesen wurde..... | 21 |
| Tabelle 14 Oligonukleotide .....   | 23 |
| Tabelle 15 Standard-PCR Programmablauf.....  | 23 |
| Tabelle 16 Kolonie-PCR Programm .....  | 24 |

## 9 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>S. pyogenes</i> und mesenchymalen Stammzellen (49).....  | 5  |
| Abbildung 2. Schematische Darstellung der Lokalisation von GapN in der Glykolyse von <i>S. pyogenes</i> .....  | 6  |
| Abbildung 3. Überleben verschiedener klinischer <i>S. pyogenes</i> -Stämme nach 6 h-Inkubation mit (RXR) <sub>4</sub> XB-gapN-asPNA und (RXR) <sub>4</sub> XB-gapN-scrPNA.....       | 33 |
| Abbildung 4. Einfluss der PNA-Behandlung auf (A) das Überleben von <i>S. pyogenes</i> und (B) die spezifische GapN-Aktivität.....  | 34 |
| Abbildung 5. Überleben verschiedener <i>Streptococcus</i> -Spezies nach 6 h-Inkubation mit (RXR) <sub>4</sub> XB gekoppelter PNA gerichtet gegen <i>gapN</i> und <i>gyrA</i> .....   | 36 |
| Abbildung 6. Heterologe Produktion und Isolierung von SpyGapN mittels Gravity-Flow-basierter Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....   | 37 |
| Abbildung 7. Spezifische SpyGapN-Aktivität abhängig vom verwendeten Reduktionsmittel.....  | 38 |
| Abbildung 8. Einfluss von verschiedenen Metaboliten, Salzen und Zuckern auf die spezifische Aktivität von isolierter SpyGapN.....  | 39 |
| Abbildung 9. Plasmidkarte des Plasmids pSF152_PRGT.....  | 40 |
| Abbildung 10. Schematische Darstellung der Sequenz um <i>gapN</i> zur Darstellung der Integrationsmöglichkeiten von pSF152_PRGT in das Chromosom von <i>S. pyogenes</i> M49 591..... | 41 |
| Abbildung 11. Plasmidkarten von pHIpK (A) und pSinS (B).....   | 42 |
| Abbildung 12. Agarosegel (1 %) der PCR zur Amplifikation von <i>gapN</i> Promotor, Riboswitch E und 5'-Ende von <i>gapN</i> .....  | 43 |
| Abbildung 13. Agarosegele (1 %) (A) des Colony Fast Screen und (B) der Kolonie-PCR von mit pSinS-RswE-gapN transformierten <i>E. coli</i> DH5α.....                                  | 44 |
| Abbildung 14. Agarosegel (1 %) der Kontrollrestriktion von pSinS_RswE-gapN.....  | 45 |
| Abbildung 15. Plasmidkarte von pSinS_RswE-gapN.....  | 46 |
| Abbildung 16. Konstruktion der konditionellen Knock-out Mutante von <i>S. pyogenes</i> 591 mit Hilfe der Plasmide pHIpK und pSinS_RswE-gapN.....                                     | 47 |
| Abbildung 17. Zweidimensionale Darstellungen der Docking-Positionen von (A) G3P und (B) E4P an SpyGapN.....  | 48 |
| Abbildung 18. Effekt von DMSO in verschiedenen Konzentrationen auf die spezifische Aktivität von SpyGapN.....  | 51 |
| Abbildung 19. Einfluss von potenziellen Inhibitoren auf die spezifische Aktivität von isolierter SpyGapN.....  | 52 |
| Abbildung 20. Dosisabhängige Effekte der Inhibitoren auf die SpyGapN-Aktivität.....  | 53 |

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 21. Heterologe Produktion und Isolierung von SpyGapDH mittels Gravity Flow basierter Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. ....   | 55 |
| Abbildung 22 Expressionsplasmid pASK-IBA7_ScrGapN. ....   | 57 |
| Abbildung 23. Isolierung von ScrGapN mittels Gravity Flow Affinitätschromatographie.....  | 58 |
| Abbildung 24. Effekt der Inhibitoren auf die Aktivität von SpyGapN und SpyGapDH sowie ScrGapN.....  | 59 |
| Abbildung 25. Überleben von <i>S. pyogenes</i> M49 591 und <i>S. cristatus</i> nach 6 h-Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 4, 5, 6, 11, 15 und 17. ....   | 61 |
| Abbildung 26. Überleben von <i>S. pyogenes</i> M49 591 und <i>S. cristatus</i> nach 6 h Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 18, 19, 20, 26 und 29. ....  | 62 |
| Abbildung 27 Überlebenskurven von <i>S. pyogenes</i> M49 591 und <i>S. cristatus</i> bei Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 4, 5 und 11. ....   | 64 |
| Abbildung 28. Überlebenskurven von <i>S. pyogenes</i> M49 591 und <i>S. cristatus</i> bei Inkubation mit den SpyGapN-Inhibitoren Nr. 17, 18 und 26. ....  | 65 |
| Abbildung 29. Überlebenskurven von <i>S. pyogenes</i> M49 591 und <i>S. cristatus</i> bei Inkubation mit dem SpyGapN-Inhibitor 29.....  | 66 |
| Abbildung 30. Kristallstruktur des Tetramers der SpyGapN <sup>C284S</sup> Mutante.....  | 67 |
| Abbildung 31. Polare Wechselwirkungen der Fragmente mit SpyGapN.....  | 68 |
| Abbildung 32. Einfluss von im Fragmentscreening identifizierten potenziellen Inhibitoren auf die spezifische Aktivität von SpyGapN.....   | 69 |
| Abbildung 33. Dosisabhängiger Effekt der Substanz R76 auf die SpyGapN-Aktivität.....  | 70 |
| Abbildung 34. Chemische Strukturen der Substanzen der potenziell spezifischen Inhibitoren [2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl]phosphonic acid (Nr. 1), 2-[3-(1-ethyl-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-sulfonamido)phenyl]acetic acid (Nr. 12) und N-cyclopentylmethanesulfonyl-2-(3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-1-yl)acetamide (Nr. 13)..... | 78 |
| Abbildung 35. Chemische Strukturen der SpyGapN-Inhibitoren 2-Sulfanylbernsteinsäure (Nr. 11) und D-(-)-Weinsäure (Nr. 29). ....   | 81 |
| Abbildung 36. Chemische Strukturen der SpyGapN-Inhibitoren 2-Sulfopropionsäure (Nr. 4), 1-Hydroxycyclobutan-1,3-dicarbonsäure (Nr. 5), 2-(2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)essigsäure (Nr. 6) und Cyclobutan-1,3-dicarbonsäure (Nr. 17). ....  | 83 |
| Abbildung 37. Chemische Strukturen der SpyGapN-Inhibitoren 1-Methylcyclopropan-1,2-dicarbonsäure (Nr. 15), 1,2-Cyclopropandicarbonsäure (Nr. 18), 5-Oxooxolan-2-carbonsäure (Nr. 19), 1-Propanyl-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure (Nr. 20) und Glyoxalbisulfit (Nr. 26). ...   | 86 |
| Abbildung 38. Chemische Struktur von Pyridazin-4-ol (R76).....  | 88 |

## 10 Anhang

**Tabelle A 1. Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial**

| <b>Name</b>  | <b>Hersteller/Händler</b>                           |
|--|---|
| 2-Mercaptoethanol                                    | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| 4'-Hydroxyazobenzol-2-Carbonsäure (HABA)             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Acrylamid: Rotiphorese Gel 30 (37.5:1)               | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Agar Technical (Agar No. 2)                          | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Agarose  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Ammonium persulfat (APS)                             | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Ampicillin   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| AMPUWA® Wasser                                       | Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland         |
| Anhydrotetrazyklin                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| ATP  | Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland        |
| BCIP®/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| BisTris  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Brain Heart Infusion                                 | Oxoid Limited, Basingstoke, Vereinigtes Königreich  |
| Bromphenolblau                                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| Columbia Agar  | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA           |
| Coomassie Brilliant Blue G-250                       | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| D-Erythrose-4-Phosphat                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |

|   |   |
|---|---|
| Desthiobiotin                             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| DL-Glyceraldehyde 3-phosphate, Bariumsalz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| DMSO                                      | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| DNeasy Blood & Tissue Kit                 | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland                    |
| dNTPs                                     | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| DTT                                       | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| EDTA                                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Eisessig                                  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| Ethanol ablosut                           | Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland         |
| Ethidiumbromid                            | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| FastDigest Enzyme                         | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Fructose                                  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder                 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Glass beads                               | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Glucose                                   | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| Glycerol                                  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Glycin                                    | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| HCl                                       | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>           | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| K-Acetat                                  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| Kanamycin                                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| KCl                                       | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>           | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| LB Broth Base (Lennox)                    | Invitrogen, Waltham, MA, USA                        |
| Lysozyme                                  | Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland        |

|  |   |
|--|---|
| Magermilchpulver                                     | Oxoid Limited, Basingstoke, Vereinigtes Königreich  |
| MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use         | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Methanol   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| MgCl <sub>2</sub>                                    | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| MgSO <sub>4</sub>                                    | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| MnCl <sub>2</sub>                                    | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| MOPS   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Na-Acetat  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| NaCl   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| NAD <sup>+</sup>                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| NADH   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| NADP <sup>+</sup>                                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| NADPH  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| NaOH   | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                  |
| NH <sub>4</sub> Cl                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase                | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| PNA  | Peps4LS GmbH, Heidelberg, Deutschland               |
| Primer   | Kaneka Eurogentec S. A., Seraing, Belgien           |

|   |   |
|---|---|
| PVDF membrane   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| QIAprep Spin Miniprep Kit                             | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland                    |
| rAPid alkalische Phosphatase                          | Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland        |
| RbCl  | Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland    |
| Saccharose  | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| SDS   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Sedoheptulose-7-phosphat                              | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Natriumpyruvate                                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Spectinomycin   | MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland  |
| Strep-Tactin® AP conjugate                            | IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland       |
| Strep-Tactin® Sepharose                               | IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland       |
| Strep-Tactin® Superflow® high capacity cartridge 1 ml | IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland       |
| T4 DNA Ligase   | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Taq-Polymerase  | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland                    |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)           | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA       |
| Theophyllin   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Todd-Hewitt broth                                     | Oxoid Limited, Basingstoke, Vereinigtes Königreich  |
| Tricin  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| TRIS  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Triton® X-100   | Fluka BioChemika,                                   |
| TriTrack  | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                 |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Trizma HCl                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,<br>Deutschland |
| Trypton (Bacto)             | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA              |
| Whatmanpaper                | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland     |
| Yeast Extract (Hefeextrakt) | Oxoid Limited, Basingstoke, Vereinigtes<br>Königreich  |
| Zitronensäure monohydrat    | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                     |

**Tabelle A 2. Hersteller der verwendeten potenziellen Inhibitoren**

| <b>Nr.</b> | <b>Hersteller/Händler</b>            | <b>Artikelnr.</b>   |
|------------|--------------------------------------|---------------------|
| 1          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-266374        |
| 2          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-1087082       |
| 3          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-14885         |
| 4          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-267365        |
| 5          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-1726267       |
| 6          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-172179        |
| 7          | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | Z2027662891         |
| 8          | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland   | 02711               |
| 9          | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland   | D7137               |
| 10         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | MolPort-046-795-892 |
| 11         | Molport SIA, Riga, Lettland          | EN300-20552         |
| 12         | Molport SIA, Riga, Lettland          | MolPort-023-171-573 |
| 13         | Molport SIA, Riga, Lettland          | MolPort-035-829-858 |
| 14         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-139341        |
| 15         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-383776        |
| 16         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-1387021       |
| 17         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-54842         |
| 18         | BLD Pharmatech Ltd., Shanghai, China | BL3H97F033EF-250MG  |
| 19         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-82161         |
| 20         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-703950        |
| 21         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-139268        |
| 22         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-154942        |
| 23         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-332838        |
| 24         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-31387         |
| 25         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-7433568       |
| 26         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-19157         |
| 27         | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-113234        |

|     |                                      |                  |
|-----|--------------------------------------|------------------|
| 28  | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-19663303   |
| 29  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland   | T206-25G         |
| 30  | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-171617     |
| 31  | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-1932013    |
| 32  | BLD Pharmatech Ltd., Shanghai, China | BD01052914-250MG |
| R16 | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-17156      |
| R40 | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-18068      |
| R65 | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-139664     |
| R76 | ENAMINE Ltd., Kiew, Ukraine          | EN300-244673     |

Tabelle A 3. Geräteliste

| <b>Name</b>                                | <b>Hersteller</b>   |
|--|---|
| Äkta start                                 | Cytiva, Marlborough, MA, USA                                |
| Biometra Trio 48                           | Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland              |
| Centrifuge 5424R                           | Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland                          |
| D-SC Spectrophotometer                     | DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA                           |
| ECM 399 Electroporation System             | BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA                   |
| Megafuge 1.OR                              | Heraeus Electronics GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland       |
| Mini-PROTEAN Tetra Cell                    | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA               |
| Multifuge X3                               | Heraeus Electronics GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland       |
| Picodrop PICOPET01                         | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland     |
| PowerPac HC                                | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA               |
| PreCellys™ 24-Dual, Lysis & Homogenisation | Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich |
| Qubit 4 Fluorometer                        | Invitrogen, Waltham, MA, USA                                |
| Rocking Platform                           | Biometra, Göttingen, Deutschland                            |
| Schüttler MTS4                             | IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland                      |
| SpetraMax M3                               | Molecular Devices, LLC, San José, CA, USA                   |
| Thermocycler                               | Biometra Trio, Analytik Jena AG                             |
| Thermomixer compact                        | Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland                          |
| Trans-Blot SD semi-dry transfer cell       | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA               |
| UVP ChemStudio PLUS                        | Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland              |

```

ACGAATTCTTTTTTGGCTAGCTAAAAGTACAATTACTTTTTGGTGTGAAATCATTGAGTTAT
CAAATAATTATCGGAATTTTCAGATATTTAGTGTAGCCAAATCTTGAATTATATCGGAAAAG
TGATAGAATAAGATTACTACCATAAAAGGAGATAAAACGTTGGCAAACAATATAAAAATTT
AGTGAACGGTGAATGGAAACTATCAGAAAACGAGATTACCATTTACGCACCAGCAACAGGTG
AAGAGTTAGGATCAGTTCAGCGATGACGCAGGCAGAGGTAGATGCTGTTTACGCTTCAGCT
AAAAAGGCTCTATCAGATTGGCGCACCTTGTCTTATGTGGAACGTGCAGCTTACCTTCATAA
AGCGGCTGATATTTTAGTACGTGATGCTGAAAAGATCGGCGCGATTCTTTCAAAGAAGTAG
CCAAAGGTCACAAGGCAGCTGTCAGTGAAGTTATTCGTACCGCTGAAATCATTAAATTATGCA
GCAGAAGAAGGGCTTCGTATGGAAGGTGAAGTTCTTGAAGGTGGTAGCTTCGAAGCCGCAAG
TAAGAAGAAGATTGCTATTGTTTCGTCTGAACCAGTTGGTTTAGTTCTTGCCATCTCACCTT
TTAATTATCCCGTTAACTTGGCAGGTTCTAAAATTGCTCCAGCTCTTATTGCAGGAAATGTT
GTTGCTCTTAAACCACCAACACAAGGCTCTATTTCTGGTTTGTTACTAGCAGAAGCTTTTGC
AGAAGCTGGTATTCAGCAGGTGTCTTTAATACCATTACAGGGCGAGGTTCTGTTATCGGTG
ATTATATCGTTGAGCACGAAGCGGTTAACTTTATCACTTTACAGGTTCTACTCCAATTGGG
GAAGGAATCGGTAAATTAGCGGGTATGCGACCAATTATGCTTGAGCTTGGCGGTAAGGATTC
TGCTATCGTTTTTGAAGATGCAGATCTGGCTTTAGCAGCGAAAAATATTGTAGCCGGTGCTT
TTGGTTACTCAGGCCAACGTTGTACAGCGGTAAA
    
```

**Abbildung A 1. Sequenzierung der *gapN*-Region von mit pSF152\_PRGT transformierten *S. pyogenes* M49 591.** Sequenzierung des PCR-Produktes aus der PCR mit den Primern M13rev und 10SpgapN\_214sR. Sequenzierung erfolgte mit M13rev als Sequenzierprimer. Promotorregion – fett; GapN – unterstrichen; letzte Basen der 5' GapN Sequenz auf pSF152\_PRGT.

```

GAATTCTTTTTTGGCTAGCTAAAAGTACAATTACTTTTTGGTGTGAAATCATTGAGTTATCA
AATAATTATCGGAATTTTCAGATATTTAGTGTAGCCAAATCTTGAATTATATCGGAAAAGTG
ATAGAATAAGATTACTACGGATCCATACGACTCACTATAGGTACCGGTGATACCAGCATCGT
CTTGATGCCCTTGGCAGCACCTTGCTAAGGAGGTAACGTGCAGCTTGGCAAACAATATAAAA
ATTTAGTGAACGGTGAATGGAAACTATCAGAAAACGAGATTACCATTTACGCACCAGCAACA
GGTGAAGAGTTAGGATCAGTTCAGCGATGACGCAGGCAGAGGTAGATGCTGTTTACGCTTC
AGCTAAAAGGCTCTATCAGATTGGCGCACCTTGTCTTATGTGGAACGTGCAGCTTACCTTC
ATAAAGCGGCTGATATTTTAGTACGTGATGCTGAAAAGATCGGCGCGATTCTTTCAAAGAA
GTAGCCAAAGGTCACAAGGCAGCTGTCAGTGAAGTTATTCGTACCGCTGAAATCATTAAATTA
TGCAGCAGAAGAAGGGCTTCGTATGGAAGGTGAAGTTCTTGAAGGTGGTAGCTTCGAAGCCG
CAAGTAAGAAGAAGATTGCTATTGTTTCGTCTGAACCAGTTGGTTTAGTTCTTGCCATCTCA
CCTTTTAATTATCCCGTTAACTTGGCAGGTTCTAAAATTGCTCCAGCTCTTATTGCAGGAAA
TGTTGTTGCTCTTAAACCACCAACACAAGGCTCTATTTCTGGTTTGTTACTAGCAGAAGCTT
    
```

**Abbildung A 2. Sequenzierung von pSinS\_RswE-gapN.** Sequenzierung des PCR-Produktes aus der PCR mit den Primern 10XXpSinS\_269sF und 10XXpSinS\_270sR. Sequenzierung erfolgte mit denselben Primern. Promotorregion – unterstrichen; GapN – kursiv; 5'-Ende *gapN* Sequenz.

```

GGCaGTGAaTTCTTTTTTGCTAGCTAAAAGTACAATTACTTTTTGGTGTGAAATCATTGAG
TTATCAAATAATTATCGGAATTTTCAGATATTTAGTGTAGCCAAATCTTGAATTATATCGGA
AAAGTGATAGAATAAGATTACTACCATAAAAGGAGATAAAACGTTGGCAAAACAATATAAAA
ATTTAGTGAACGGTGAATGGAACTATCAGAAAACGAGATTACCATTTACGCACCAGCAACA
GGTGAAGAGTTAGGATCAGTTCAGCGATGACGCAGGCAGAGGTAGATGCTGTTTACGCTTC
AGCTAAAAGGCTCTATCAGATTGGCGCACCTTGCTTATGTGGAACGTGCAGCTTACCTTC
ATAAAGCGGCTGATATTTTAGTACGTGATGCTGAAAAGATCGGC GCGATTCTTTCAAAGAA
GTAGCCAAAGGTCACAAGGCAGCTGTCAGTGAAGTTATTCGTACCGCTGAAATCATTAATTA
TGCAGCAGAAGAAGGGCTTCGTATGGAAGGTGAAGTTCTTGAAGGTGGTAGCTTCGAAGCCG
CAAGTAAGAAGAAGATTGCTATTGTTTCGTGTAACCAGTTGGTTTAGTTCTTGCCATCTCA
CCTTTTAATTATCCCGTTAACTTGGCAGGTTCTAAAATTGCTCCAGCTCTTATTGCAGGAAA
TGTGTTGCTCTTAAACCACCAACACAAGGCTCTATTTCTGGTTTGTTACTAGCAGAAGCTT
TTGCAGAAGCTGGTATTCCAGCAGGTGTCTTTAATACCATTACAGGGCGAGGTTCTGTTATC
GGTGATTATATCGTTGAGCACGAAGCGGTTAACTTTATCAACTTTACAGGTTCTACTCCAAT
TGGGGAAGGAATCGGTAAATTAGCGGGTATGCGACCAATTATGCTTGAGCTTGGCGGTAAGG
ATTCTGCTATCGTTTTGGAAGATGCAGATCTTGCTTTAGCAGCGAAAAATATTGTAGCCGGT
GCTTTTGGTTACTCAGGCCAACGTTGTACAGCGGTTAAACGTGTTCTTGTGATGGACAAGG

```

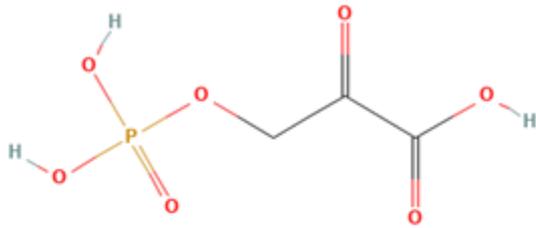
**Abbildung A 3. Sequenzierung mit pSinS\_RswE-gapN transformierten *S. pyogenes* M49 591 nach Integration des Plasmids in die chromosomale DNA.** Sequenzierung des PCR-Produktes aus der PCR mit den Primern 10XXpSinS\_269sF und 10SpgapN\_281sR. Sequenzierung erfolgte mit 10XXpSinS\_269sF als Sequenzierprimer. Promotorregion – fett; GapN – unterstrichen; letzte Basen der 5' GapN Sequenz auf pSinS\_RswE-gapN.

**Tabelle A 4. Spezifische GapN-Aktivität in Abhängigkeit von Inhibitor 25 bei Abwesenheit und Präsenz von G3P**

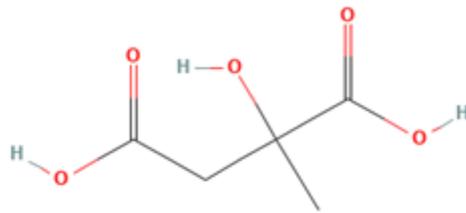
| Konzentration Inh. 25 | Aktivität ohne G3P [%] | Aktivität mit G3P [%] |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| 2 mM                  | 0,046 (± 0,249)        | 120,7 (± 5,04)        |
| 4 mM                  | -0,001 (± 0,126)       | 129,9 (± 19,52)       |
| 6 mM                  | 0,090 (± 0,253)        | 137,1 (± 21,30)       |
| 8 mM                  | -0,043 (± 0,160)       | 139,4 (± 22,19)       |

Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Aktivität sind relativ zur unbehandelten Kontrolle im Standardassaymix dargestellt.

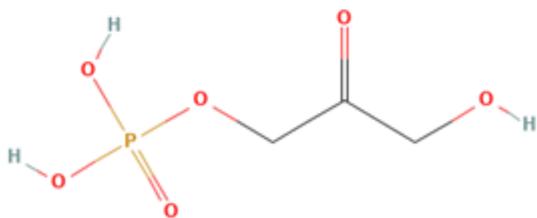
Nr. 8



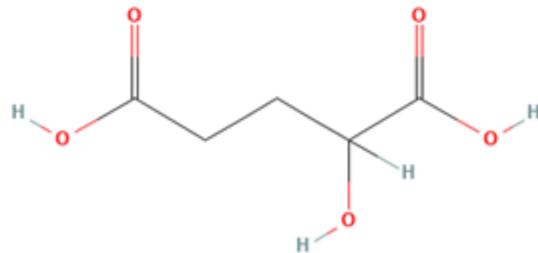
Nr. 10



Nr. 9

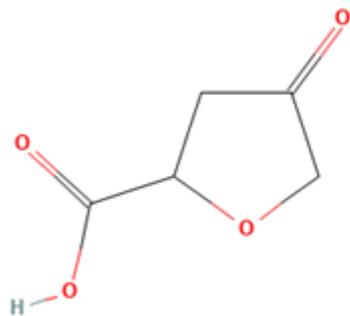


Nr. 25

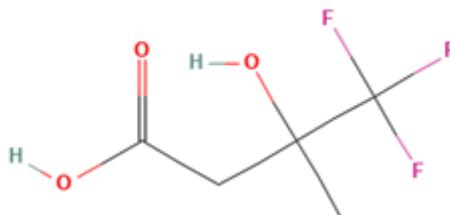


**Abbildung A 4.** Chemische Strukturen von 3-Phosphohydroxypyruvat (Nr. 8), Dihydroxyacetonphosphat (Nr. 9), Citramalat (Nr. 10) und 2-Hydroxyglutarsäure (Nr. 25) aus der Gruppe der Metabolite (221–224). Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.

Nr. 2



Nr. 3



Nr. 7

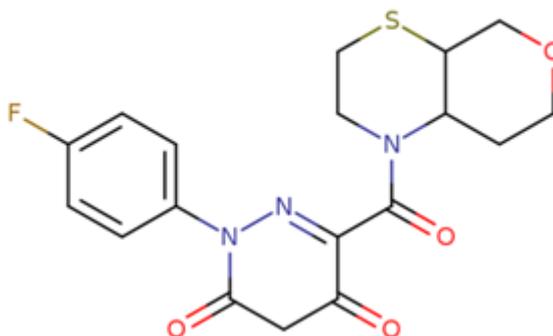
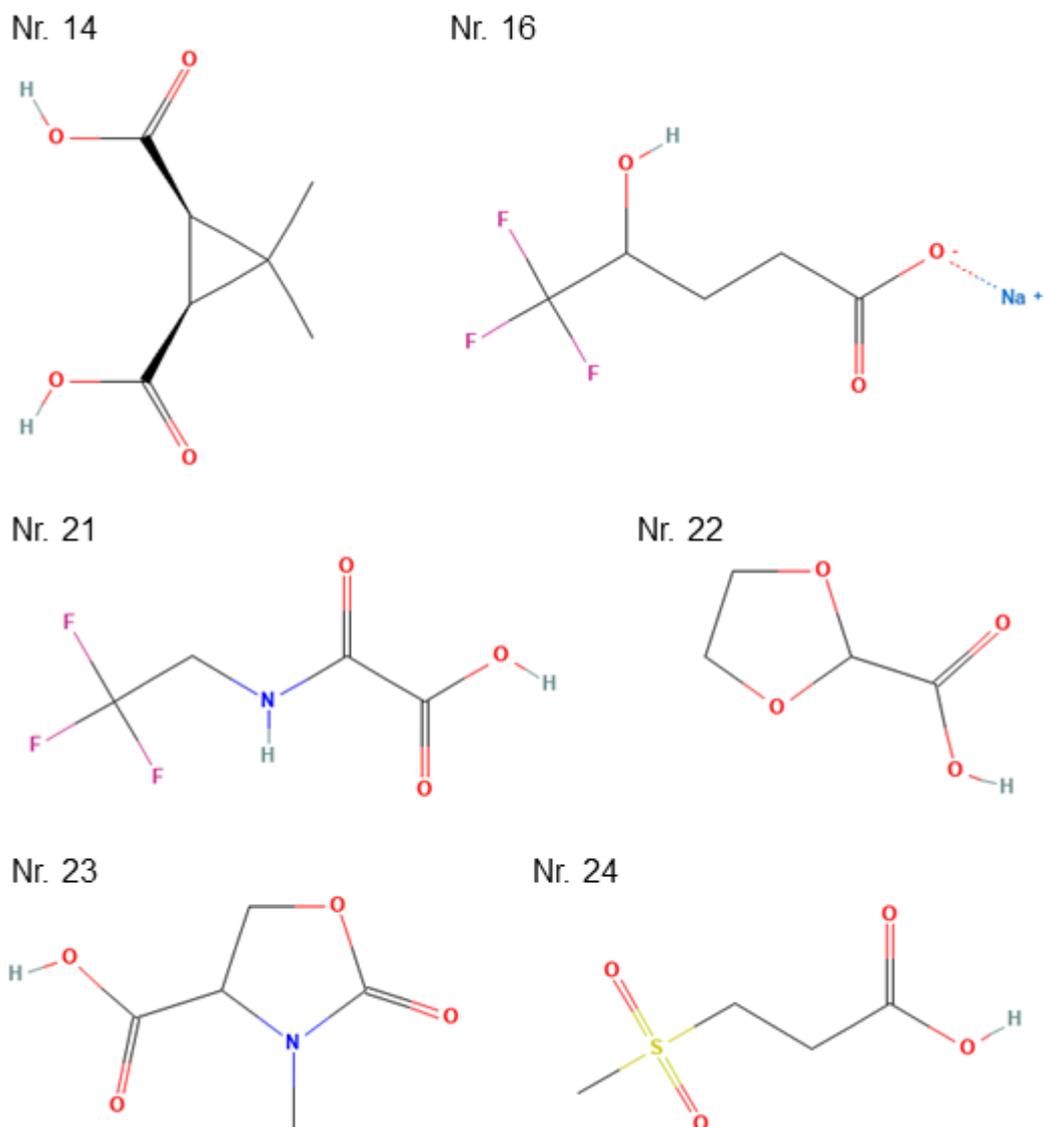
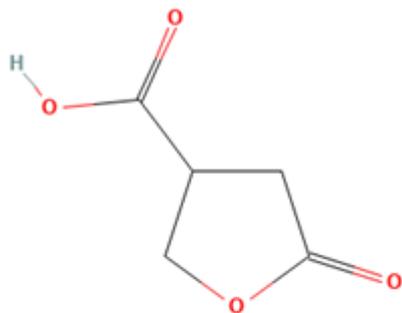


Abbildung A 5. Chemische Strukturen von 4-oxoxolane-2-carboxylsäure (Nr. 2), (3R)-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-3-methylbutansäure (Nr. 3) und 6-(3,4a,5,7,8,8a-hexahydro-2H-pyrano[3,4-b][1,4]thiazine-1-carbonyl)-2-(4-fluorophenyl)pyridazine-3,5-dione (Nr. 7) aus der Gruppe der chemischen Sonden (225–227). Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.

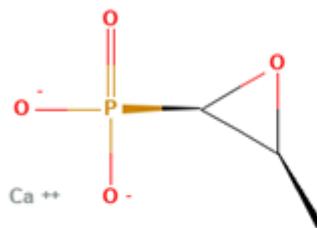


**Abbildung A 6.** Chemische Strukturen von 3,3-Dimethylcyclopropane-1,2-dicarboxylsäure (Nr. 14), 5,5,5-Trifluoro-4-hydroxypentansäure (Nr. 16), 2-Oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)essigsäure (Nr. 21), 1,3-Dioxolane-2-carboxylsäure (Nr. 22), 3-Methyl-2-oxo-1,3-oxazolidine-4-carboxylsäure (Nr. 23) und 3-Methyl-sulfonylpropansäure (Nr. 24) (228–233). Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.

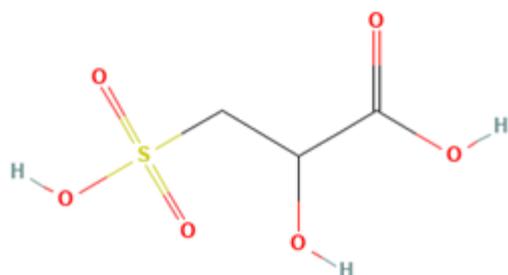
Nr. 27



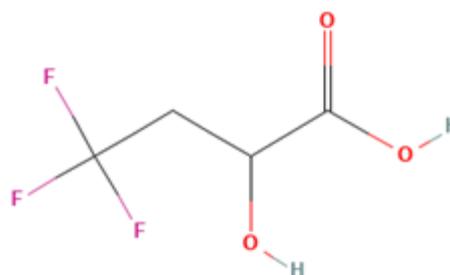
Nr. 28



Nr. 30



Nr. 31



Nr. 32

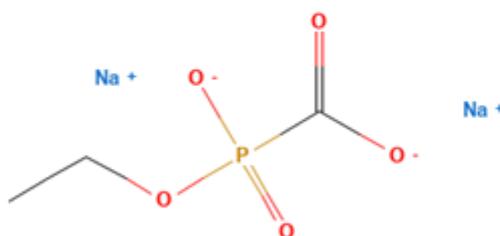
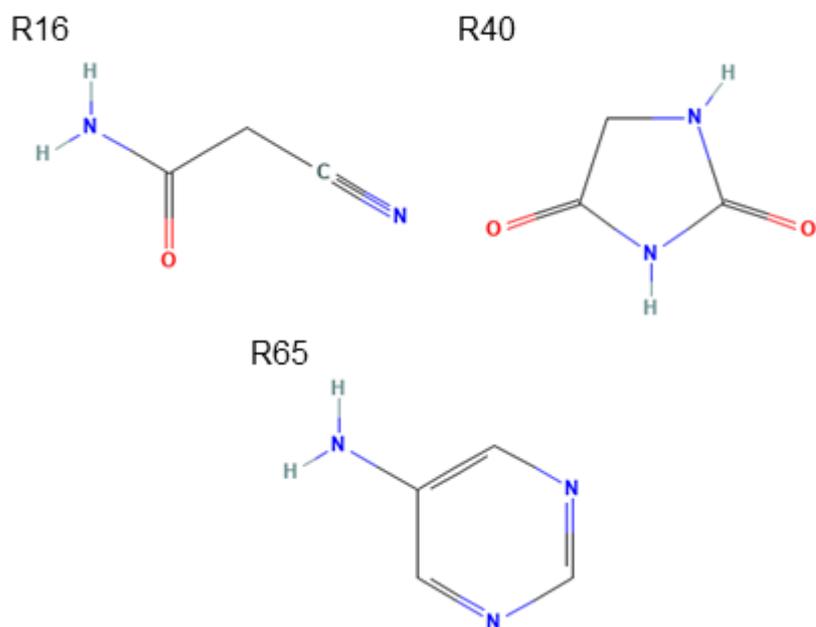


Abbildung A 7. Chemische Strukturen von 5-Oxoxolane-3-carboxylsäure (Nr. 27), [(2R,3S)-3-Methyloxiran-2-yl]-dioxido-oxo- $\lambda^5$ -phosphan (Nr. 28), 2-Hydroxy-3-sulfopropansäure (Nr. 30), 4,4,4-Trifluoro-2-hydroxybutansäure (Nr. 31) und [Ethoxy(oxido)phosphoryl]format (Nr. 32) (234–238). Inhibitornummern entsprechen den Nummern in Tabelle 12.



**Abbildung A 8. Chemische Strukturen von 2-Cyanoacetamid (R16), Imidazolidin-2,4-dion (R40) und Pyrimidin-5-amin (R65) (239–241). Inhibitornummern entsprechen der Nummer in Tabelle 13.**

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Tomas Fiedler vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock bedanken. Du hast mich während meines Studiums, meinen Abschlussarbeiten, der Arbeit während der Promotion und beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt. Ich möchte mich für dein Vertrauen bedanken und danke für die Möglichkeit für dich zu arbeiten. Es hat mir immer großen Spaß gemacht.

Des Weiteren möchte ich mich bei Isabell Wagner bedanken. Du bist in den letzten zwei Jahren eine gute Freundin geworden und die Arbeit mit dir im Labor hat immer Spaß gemacht. Ohne deine Hilfe zum Schluss wäre es nicht möglich gewesen, die Arbeit so zu Ende zu bringen.

Mein besonderer Dank geht an Jana Bull und Yvonne Humboldt für ihre hervorragende technische Unterstützung. Ohne euch würde das Labor nicht laufen und ich wäre vor ganz andere Probleme gestellt worden. Auf eure Erfahrung konnte ich immer bauen. Danke dafür.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Katharina Ekart bedanken. Unsere qualifizierten Fachgespräche haben die Arbeitstage aufgelockert und wenn ich dann doch mal eine Frage hatte, konnte ich mich auf dich verlassen.

Mein Dank gilt auch Bernd Kreikemeyer. Du hast es mir ermöglicht, an dem Projekt zu arbeiten, es voranzubringen und hast mich in meiner Entwicklung unterstützt.

Weiterhin möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern der Forschungsabteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene bedanken. Dies gilt auch für alle Bachelor- und Masterstudenten, während meiner Zeit am Institut. Es war immer ein tolles Arbeitsklima und wenn es Probleme gab, war immer jemand da, um einem zu helfen.

Ich möchte mich auch bei meiner Mutter Conny, meinem Bruder Nico und Sophie bedanken, die mich während des gesamten Studiums und vor allem beim Korrigieren dieser Arbeit unterstützt haben.

Abschließend gilt mein Dank meiner Freundin Leoni. Du hast mich immer unterstützt und aufgebaut. Du bist die große Stütze in meinem Leben und ohne dich wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Vielen Dank euch allen.

## 12 Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung

Doktoranden-Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

Name: ..... Eisenberg, Philip .....

Anschrift: .....

Ich habe eine Dissertation zum Thema

..... Die Rolle der nicht-phosphorylierenden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GapN  
..... GapN im Stoffwechsel von Streptokokken und ihr Potenzial als Drug Target in *Streptococcus*  
..... *pyogenes* .....

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock angefertigt.  
Dabei wurde ich von

Herrn ..... PD Dr. rer. nat. habil. Tomas Fiedler ..... betreut.

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den ..... .....