



Institut für Mikrobiologie

Masterarbeit

„Charakterisierung einer Sulfit-Reduktase von *Acinetobacter baumannii*“

von

Maria Magdalena Johanna Heindorf

4114006

November 2012

durchgeführt am



P22 *Acinetobacter baumannii* - Biologie eines Krankenhauserregers

Referent: Prof. Dr. Michael Steinert

Korreferent: PD Dr. Gottfried Wilharm

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit eidesstattlich, dass ich die vorliegende Masterarbeit „Charakterisierung einer Sulfit-Reduktase von *Acinetobacter baumannii*“ selbstständig verfasst sowie die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Wernigerode, den 12.11.12

[Unterschrift]

Magdalena Heindorf
Bokestraße 3
38871 Darlingerode

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	X
1 Einleitung	1
1.1 <i>Acinetobacter</i> spp.	1
1.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
1.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> : Pathogenese und Virulenz	4
1.3.1 Biofilmbildung	4
1.3.2 Motilität und natürliche Kompetenz	6
1.3.3 Antibiotika-Resistenzen	8
1.4 Schwefelwasserstoff (H ₂ S) in Bakterien	9
1.5 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2 Geräte und Zubehör	13
2.1.3 Bakterien, Plasmide und Primer	14
2.1.3.1 Bakterienstämme	14
2.1.3.2 Vektoren und Plasmide	14
2.1.3.3 Primer/Oligonukleotide	15
2.1.4 Nährmedien, Kultivierung und Stammhaltung	15
2.1.4.1 Nährmedien	15
2.1.4.2 Kultivierung	16
2.1.4.3 Bestimmung der optischen Dichte	16
2.1.4.4 Stammhaltung	17
2.2 Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1 Gewinnung von Bakterien-Schnellysaten	17
2.2.2 Isolierung von genomischer DNA	17
2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA	17

2.2.4	DNA-Aufreinigung.....	18
2.2.5	DNA-Fällung.....	18
2.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	18
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	18
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.2.9	Restriktionsverdau (Plasmid und PCR-Amplifikat).....	21
2.2.10	DNA-Isolierung aus dem Agarosegel	21
2.2.11	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	22
2.2.12	Ligation linearer DNA-Fragmente.....	22
2.2.13	Transformation	22
2.2.13.1	Herstellung elektrokompetenter <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
2.2.13.2	Transformation elektrokompetenter <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
2.2.13.3	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	23
2.2.13.4	Transformation natürlich kompetenter <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
2.2.14	DNA-Sequenzierung.....	24
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.3.1	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.3.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
2.3.3	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau R-250.....	26
2.3.4	Immunochemischer Nachweis von Proteinen im Western Blot	27
2.3.5	Proteinexpression und Proteinreinigung.....	29
2.3.5.1	Rekombinante Produktion von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in <i>E. coli</i>	29
2.3.5.2	Zellaufschluss	30
2.3.5.3	GST-Affinitätsreinigung.....	30
2.3.5.4	Spaltung desGST-Fusionsproteins	31
2.3.5.5	Pufferaustausch von Proteinlösungen.....	31
2.4	Herstellung polyklonaler Antiseren.....	32
2.5	Motilitäts-Assay	32
2.6	Wachstumstests auf Minimalmedium.....	33
2.7	Biofilm-Assay	33
2.8	Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration (MHK).....	34
2.9	<i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell.....	35

3 Ergebnisse	36
3.1 Inaktivierung der Sulfite-Reduktase in <i>A. baumannii</i>	36
3.2 Motilitäts-Assay	37
3.2.1 Kompensation von Motilitätsdefekten der Mutanten durch Supplementierung	38
3.3 Charakterisierung der Mutanten auf Minimalmedium.....	40
3.3.1 Kompensation von Wachstumsdefekten der Mutanten durch Supplementierung	41
3.4 Genetische Komplementierung von Mutationseffekten	43
3.4.1 Klonierung	43
3.4.2 Komplementierung der Motilitätsdefekte der Mutanten	46
3.4.3 Komplementierung von Wachstumsdefekten der Mutanten	47
3.5 Biofilm-Assay	49
3.6 Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration (MHK).....	50
3.7 <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell.....	55
3.8 Rekombinante Herstellung der Sulfite-Reduktase	58
3.8.1 Klonierung	58
3.8.2 Expression und Reinigung.....	62
3.9 Herstellung eines polyklonalen <i>A. baumannii</i> -SR-Antiserums	64
4 Diskussion	66
4.1 Inaktivierung der Sulfite-Reduktase	66
4.2 Charakterisierung der Motilität	67
4.3 Charakterisierung des Wachstums auf Minimalmedium	67
4.4 Analyse der Biofilmbildung	68
4.5 Resistenzprüfungen durch Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	68
4.6 <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell.....	69
4.7 Rekombinante Herstellung der Sulfite-Reduktase	70
Literaturverzeichnis	71
Danksagung	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schwefelstoffwechsel von <i>Acinetobacter baumannii</i> (KEGG-Datenbank) ...	10
Abb. 1.2: Die Bedeutung von Superoxid-Dismutase (SOD) und Sulfit-Reduktase (SR) für die Resistenz- und Virulenzausprägung von Bakterien	11
Abb. 3.1: Kolonie-PCR der Inaktivierung der SR auf 1 %igen Agarosegel	36
Abb. 3.2: Motilitäts-Tests der Isolate auf Motilitäts-Medium.....	38
Abb. 3.3: Kompensation von Motilitätsdefekten durch den H ₂ S-Donor NaHS auf Motilitäts-Medium	39
Abb. 3.4: Wachstumstests auf Simmons-Minimalmedium	40
Abb. 3.5: Einfluss der NaHS-Supplementierung auf die Wachstumsdefekte der SR-Mutanten	41
Abb. 3.6: Einfluss der Cystein-Supplementierung auf die Wachstumsdefekte der SR-Mutanten	42
Abb. 3.7: PCR-Amplifikat der Genloci A1S_2846 und A1S_2845 inklusive Promotor- und Terminatorregionen	44
Abb. 3.8: PCR-Produkte der Kolonie-PCR nach Transformation in kompetente SR-Mutanten von <i>A. baumannii</i>	44
Abb. 3.9: Konstruktion des Plasmids pWH1266_SR	45
Abb. 3.10: Komplementierungsversuche von Motilitätsdefekte der SR-Mutanten auf Motilitäts-Medium.....	46
Abb. 3.11: Komplementierungsversuch von Wachstumsdefekten der SR-Mutanten auf Minimalmedium	47
Abb. 3.12: Komplementierungsversuch von Wachstumsdefekten der SR-Mutanten auf Minimalmedium	48
Abb. 3.13: Biofilm-Assays der <i>A. baumannii</i> -Isolate	50
Abb. 3.14: MHK-Bestimmung für das Isolat 95/07 und dessen SR-Mutante auf LB-Medium	51
Abb. 3.15: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der Isolate für das Antibiotikum Imipenem mit und ohne Zusatz von H ₂ S	53
Abb. 3.16: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der Isolate für das Antibiotikum Tetracyclin mit und ohne Zusatz von H ₂ S	53
Abb. 3.17: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der Isolate für das Antibiotikum Levofloxacin mit und ohne H ₂ S.....	53

Abb. 3.18: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der Isolate für das Antibiotikum Gentamicin mit und ohne H_2S	54
Abb. 3.19: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der Isolate für das Antibiotikum Ampicillin mit und ohne Zusatz von H_2S	54
Abb. 3.20: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der Isolate für das Antibiotikum Nalidixinsäure mit und ohne Zusatz von H_2S	54
Abb. 3.21: <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsversuche 48 h nach der Infektion.....	55
Abb. 3.22: Überlebensrate der mit Isolat 95/07 infizierten <i>G. mellonella</i> -Raupen.....	57
Abb. 3.23: Überlebensrate der mit Isolat 96/10 infizierten <i>G. mellonella</i> -Raupen.....	57
Abb. 3.24: Überlebensrate der mit Isolat 102/07 infizierten <i>G. mellonella</i> -Raupen.....	57
Abb. 3.25: Überlebensrate der mit Isolat 30011 infizierten <i>G. mellonella</i> -Raupen.....	58
Abb. 3.26: Überlebensrate der mit Isolat ATCC 17978, alter Mutante 179 und neuer Mutante 179 infizierten <i>G. mellonella</i> -Raupen.....	58
Abb. 3.27: PCR-Amplifikat der β -Untereinheit (A1S_2846) der SR aus <i>A. baumannii</i>	59
Abb. 3.28: PCR-Produkte der Kolonie-PCR der zehn Klone nach Transformation in <i>E.coli</i> TOP 10.....	60
Abb. 3.29: Restriktionsverdau der vier Klone mit BamHI und NotI nach Plasmidpräparation.....	60
Abb. 3.30: Expressionskonstrukt pGEX-6P-3_SR	61
Abb. 3.32: Expressionstests der SR aus <i>A. baumannii</i> bei 37°C in <i>E. coli</i> TOP 10	62
Abb. 3.33: Expression bei 20°C in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>pLysS</i> und Reinigung der SR aus <i>A. baumannii</i>	63
Abb. 3.34: Pufferaustausch durch PD10-Säule und Protease-Spaltung.....	64
Abb. 3.35: Validierung des <i>A. baumannii</i> -SR-Antiserums aus Kaninchen im Western Blot	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Übersicht verwendeter Geräte und Zubehör	13
Tab. 2.2: Übersicht verwendeter Bakterienstämme	14
Tab. 2.3: Übersicht verwendeter Vektoren und hergestellter Plasmide.....	14
Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Primer.....	15
Tab. 2.5: Übersicht verwendeter Antibiotika und Medienzusätze	16
Tab. 2.6: Zusammensetzung der Sammel-/Trenngele für die SDS-PAGE	26
Tab. 2.7: Basisprotokoll für 2 Immunisierungsmonate eines Kaninchens der Firma Pineda Berlin	32
Tab. 2.8: Übersicht verwendeter Antibiotika für die MHK-Bestimmung.....	34

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Acinetobacter</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	<i>engl. basepairs</i> , Basenpaare
β-ME	β-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
ca.	circa
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	<i>lat. et alii</i> , und andere
etc.	<i>lat. et cetera</i> , und so weiter
g	Erdbeschleunigung
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde, Stunden
HGT	horizontaler Gentransfer
H ₂ S	Schwefelwasserstoff, Sulfid
IB	<i>engl. inclusion bodies</i> , Einschlusskörper
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
µg	Mikrogramm

mg	Milligramm
min	Minute, Minuten
µl	Mikroliter
µmol	Mikromolar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>engl. polymerase-chain-reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	<i>lat. potentium hydrogenii</i>
pmol	Pikomol
ROS	<i>engl. reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	<i>engl. rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde, Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SO ₄ ²⁻	Sulfat
SO ₃ ²⁻	Sulfit
SR	Sulfit-Reduktase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T4P	Typ IV Pili
usw.	und so weiter
V	Volt
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Acinetobacter baumannii ist ein gram-negativer Erreger nosokomialer Infektionen, der zunehmend multiresistent ist, so dass die therapeutischen Möglichkeiten immer begrenzter werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Schwefelwasserstoff (H_2S) in verschiedenen Bakterien als Signalmolekül wirkt, welches zur Resistenzausprägung gegenüber antimikrobiellen Substanzen beiträgt. Nach neueren Erkenntnissen lösen bakterizid wirkende Antibiotika oxidativen Stress durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus. H_2S kann dabei offensichtlich ROS direkt inaktivieren und zusätzlich die Aktivierung von Entgiftungsenzymen wie Superoxid-Dismutase (SOD) stimulieren. Vor diesem Hintergrund wurde die Sulfid-Reduktase (SR), die aus Sulfid H_2S generiert und aus α - und β -Untereinheit besteht, in *A. baumannii* näher charakterisiert. Dazu wurde die β -Untereinheit der SR zunächst in unterschiedlichen klinischen Isolaten von *A. baumannii* inaktiviert. Die SR-Mutanten waren auf Minimalmedium mit Sulfat als einziger Schwefelquelle nicht mehr kultivierbar. Sowohl durch Zugabe des H_2S -Donors Natriumhydrogensulfid, als auch von Cystein sowie durch genetische Komplementierung des inaktivierten Genlocus konnte dieser Wachstumsdefekt kompensiert werden. Damit wurde hier gezeigt, dass die SR die einzige H_2S -produzierende Reaktion in *A. baumannii* katalysiert. Die Inaktivierung der SR führte außerdem zu einer Virulenzabschwächung im Infektionsmodell der Wachsmottenlarve (*Galleria mellonella*), einer reduzierten Biofilmbildung und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika-Wirkstoffklassen. Hemmstoffe gegen die SR, die in Säugern nicht vorkommt, könnten damit die Wirksamkeit gängiger Antibiotika unterstützen und gleichzeitig die Virulenz der Erreger schwächen. Die β -Untereinheit der SR konnte in dieser Arbeit bereits erfolgreich rekombinant hergestellt werden und steht nun für strukturelle Arbeiten und für die weitere Wirkstoffsuche zur Verfügung. Aus Säugern ist bekannt, dass H_2S als Signalmolekül über die Modifikation von Aminosäuren (Sulfhydrierung von Cystein) wirkt und so die Aktivität von Enzymen beeinflusst. Die Möglichkeit der Sulfhydrierung von Proteinen ist in Bakterien bislang jedoch noch nicht beschrieben wurden.

1 Einleitung

1.1 *Acinetobacter* spp.

Innerhalb der Gammaproteobakterien gehört die Gattung *Acinetobacter* (griech. *akinētos* = unbeweglich, *baktron* = Stab) zur Familie der *Moraxellaceae* [1]. *Acinetobacter*-Spezies (spp.) sind gram-negative Stäbchenbakterien, welche während der stationären Phase eine eher kokkoide Form ausbilden. Es sind anspruchslose Organismen, die sich durch eine große metabolische Diversität bei der Verwertung von Kohlenstoff- und Energiequellen auszeichnen [2-4]. *Acinetobacter* spp. sind strikt aerobe Non-Fermenter und in der Umwelt ubiquitär verbreitet. Sie können in Boden- und Süßwasserproben ebenso wie in unterschiedlichen Lebensmitteln nachgewiesen werden [4-6]. Bei etwa 40 % aller nicht-hospitalisierten Menschen stellen einige *Acinetobacter* spp. einen Bestandteil der normalen Hautflora dar, wobei bevorzugt feuchte Areale, wie z. B. die Achselhöhlen, die Leistengegend oder die Interdigitalbereiche der Füße besiedelt werden. Die Nachweisraten hospitalisierter Menschen liegen bei bis zu 75 % [1, 7]. Hier können *Acinetobacter* spp. meist bei immunsuppressiven Patienten zu nosokomialen Infektionen wie beispielsweise Wundinfektionen, Bakteriämie, Infektionen des Respirations-, Urogenital- oder Gastrointestinaltraktes führen [8]. Durch das zunehmende Auftreten resistenter Stämme bei nosokomialen Infektionen in der Humanmedizin erlangten *Acinetobacter* spp. ihre aktuelle Bedeutung [4]. Von nosokomialen Pneumonien mit Mortalitätsraten von 30-75 % wurde berichtet [9].

Die Krankenhausinfektionen, auch nosokomiale („*hospital-acquired*“) Infektionen, sind von den ambulant erworbenen („*community-acquired*“) Infektionen abzugrenzen, welche nicht im Zusammenhang mit einer Hospitalisierung stehen. Dabei kommt es durch *Acinetobacter* spp. zum Auftreten von Pneumonien bei nicht-hospitalisierten Patienten. Meist sind prädisponierende Faktoren wie Alkoholabusus, Diabetes, Rauchen, Krebs und/oder eine Grunderkrankung des Respirationstraktes vorhanden. Während des Krankheitsverlaufs entwickelt sich bei 30 % der Fälle ein septischer Schock und die Mortalitätsrate liegt zwischen 40 % und 64 %. Von „*community-acquired*“-*Acinetobacter*-Infektionen wurde hauptsächlich in tropischen Regionen, wie z. B. Südostasien oder Australien in warmen und trockenen Monaten berichtet. Das Auftreten von multiresistenten Stämmen und anderen klinischen Manifestationen konnte bei ambulanten erworbenen Infektionen selten beobachtet werden [2, 4].

Die Gattung *Acinetobacter* wurde durch Brisou und Prévot 1954 [10] durch die Spezies *Acinetobacter calcoaceticus* eingeführt. Bereits 1911 wurde durch Beijerinck *Micrococcus calco-aceticus* beschrieben, später wurde dieser Keim verschiedenen Gattungen wie *Achromobacter*, *Diplococcus*, *Moraxella* oder *Neisseria* zugeordnet [11]. Die Taxonomie hat in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte gemacht und unterscheidet heute über 32 unterschiedliche *Acinetobacter* spp., wovon 17 namentlich genannt werden, weitere 15 Spezies grenzen sich genomisch von den anderen ab. Diese werden als genomische Spezies (gen. sp.) bezeichnet, da ihnen bisher noch kein Name zugeteilt wurde [4]. Einige der *Acinetobacter* spp., *A. baumannii* und *A. calcoaceticus*, *A. gen. sp. 3* (*A. pittii* sp. nov.) und *A. gen. sp. 13 TU* (*A. nosocomialis* sp. nov.) besitzen DNA-Sequenzhomologie von etwa 70 %, können aber phänotypisch nicht unterschieden werden. Sie werden im sogenannten *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*-Komplex (ACB-Komplex) zusammengefasst [4]. Parallel zur Entwicklung der Taxonomie werden kontinuierlich neue Methoden etabliert, welche es ermöglichen sollten, *Acinetobacter*-Stämme den verschiedenen Spezies zuzuordnen, da die kommerziell erwerblichen Testsysteme wie API 20 NE keine zuverlässige Unterscheidung der Spezies anhand ihres Phänotyps ermöglichen [4].

1.2 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii ist ein opportunistischer Krankenhauserreger und besitzt von allen Vertretern der Gattung das größte pathogenetische Potential, wobei das Wissen über mögliche Pathogenitätsmechanismen noch relativ gering ist. Auch das natürliche Reservoir dieses fakultativen Erregers konnte bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert werden [3, 4]. *A. baumannii* wird selten auf der Haut von gesunden Menschen gefunden und wenn nur in sehr geringen Keimzahlen [1]. Trotzdem gilt dieser Keim neben *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* als Hauptverursacher nosokomialer Infektionen [3]. Beschrieben werden Infektionen der Atemwege, Bakteriämien bis hin zur Sepsis sowie sekundäre Meningitiden, aber auch Wundinfektionen und Infektionen des Urogenitaltraktes können durch *A. baumannii* verursacht werden [12]. Während des Irak- und Golfkrieges wird von Epidemieausbrüchen in Militärkrankenhäusern bei schwer verwundeten Soldaten berichtet [13, 14]. Hier ließ sich eine erhöhte *Acinetobacter*-Infektionsrate mit multiresistenten Isolaten nachweisen. Als Ursache kommen vermutlich die erhöhte Patientendichte in den Krankenhäusern und die damit verbundene Vernachlässigung von Hygienemaßnahmen in Frage [13, 15]. Auf Grund zunehmender Berichte über *A. baumannii*-Ausbrüche in Krankenhäusern gilt der Keim neben den Methicillin-

resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen gegenwärtig als einer der alarmierendsten nosokomialen Erreger [3], da Therapieoptionen wegen multipler Resistenzen begrenzt sind und der Einsatz von Reserveantibiotika häufig unumgänglich ist [1, 8]. Die „*Infectious Diseases Society of America*“ benennt unter dem Akronym ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*) auch *A. baumannii* als einen der sechs wichtigsten multiresistenten Erreger, für die therapeutische Möglichkeiten knapp werden [16, 17].

Hauptsächlich werden durch *A. baumannii* respiratorische Infektionen bei ventilierten Patienten auf Intensivstationen verursacht [2]. Die dabei identifizierten Risikofaktoren, die eine *A. baumannii*-Infektion begünstigen, umfassen neben einem fortgeschrittenen Alter und einem durch andere Grunderkrankungen geschwächten Immunsystem, auch die Präsenz von medizinischen Fremdkörpern, wie z. B. Kathetern oder Beatmungstuben. Als prädisponierende Faktoren sind insbesondere lange Krankenhausaufenthalte (Intensivstation), anhaltende Antibiotika-Therapien, vorausgegangene chirurgische Eingriffe oder Schädeltraumata zu nennen [1-4, 18]. Bei immunsupprimierten Patienten können auch Bakteriämien und Septikämien bis hin zum fulminanten septischen Schock auftreten. Der primäre Infektionsherd ist dabei meist respiratorischen Ursprungs und die begünstigenden Faktoren sind Malignome, Traumata sowie Verbrennungen [2, 3]. Meningitis tritt praktisch ausschließlich als sekundäre Form nach einem Schädelhirntrauma oder nach neurochirurgischen Eingriffen auf. Dabei können ventrikuläre Shunts mit einer Liquorableitung nach außen beteiligt sein, aber auch Lumbalpunktion und andere neurochirurgische Manipulationen sind beschrieben worden. Ein weiterer Risikofaktor ist eine hochdosierte Behandlung solcher Patienten mit Antibiotika auf der Intensivstation [3]. Die Übertragung von *A. baumannii* erfolgt primär über den Kontakt mit infizierten Personen oder durch das Krankenhauspersonal. Die Übertragung über die Hände scheint daher von entscheidender Bedeutung bei der Ausbreitung nosokomialer Infektionen zu sein [19]. Speziell *A. baumannii* ist gegenüber Umwelteinflüssen sehr resistent und in der Lage, über einen längeren Zeitraum auf unbelebten Gegenständen zu überleben [3]. Somit besteht die Möglichkeit, dass in Krankenhäusern jegliche medizinische Ausrüstung, kontaminierte Bettwäsche oder Instrumente (Beatmungsschläuche, Tuben usw.), als Infektionsquelle bzw. Vektor für den Menschen in Frage kommt. Dies führt zur Hypothese, dass das Krankenhausgebäude selbst mit allen Einrichtungen und seinem Personal das Reservoir für *A. baumannii* ist [20].

1.3 *Acinetobacter baumannii*: Pathogenese und Virulenz

Die Pathogenität von *A. baumannii* ist relativ gering, da es hauptsächlich zur Kolonisierung und erst später zu einer Infektion durch diesen Erreger kommt. Bei der Kolonisierung, Infektion und epidemische Ausbreitung von *A. baumannii* spielen eine Reihe von Mechanismen eine wesentliche Rolle [4]. Eine Schlüsselstellung in der Pathogenese besitzt die Adhärenz (Anheften) der Bakterien an den Wirtsorganismus. Sie vermittelt den primären Kontakt zwischen Krankheitserreger und Wirt, ohne den eine Besiedelung bzw. Kolonisierung der Wirtsorganismus durch unspezifische Abwehrmechanismen, wie Sekretbildung oder Peristaltik, nicht möglich wäre [21]. Die Interaktion von Strukturen der Bakterienoberfläche, den Adhäsinen, mit komplementären Strukturen an der Oberfläche des Wirtsorganismus, meist spezifische Glycoproteine oder -lipide, sind Voraussetzung für die Adhärenz des Bakteriums an den Wirt [22, 23]. Die Adhäsine können in *A. baumannii* zusätzlich als Hämagglutinine fungieren und menschliche Erythrozyten agglutinieren [24]. Die Invasion in eukaryotische Zellen ist für viele pathogene Bakterien ein wichtiger Schritt im Verlauf der Infektion eines Organismus und verschafft ihnen zahlreiche Vorteile, die Angriffe des Immunsystems und die Wirkung von Antibiotika zu umgehen. Der Invasionsprozess erlaubt es Ihnen auch, durch bestimmte Zellschichten hindurchzutreten und in tiefer gelegene Wirtsgewebe und Organe einzuwandern [25]. Weiterhin stimuliert das LPS (Lipopolysaccharid) von *A. baumannii* das Immunsystem von Eukaryoten und führt während einer *A. baumannii*-Infektion zu einer proinflammatorischen Immunantwort im Mausmodell [26]. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Interaktion zwischen Fimbrien auf der Oberfläche von *A. baumannii* und eukaryotischen Epithelzellen beobachtet werden [27]. Zusätzlich wurde ein auf die Epithelzellen zytotoxisch wirkender Effekt nachgewiesen, welcher auf ein „outer membrane protein“ (Omp38, OmpA), ein Porin auf der Oberfläche von *A. baumannii*, zurückzuführen ist. Es besitzt eine Signalsequenz für die Mitochondrien der Wirtszellen und führt zu einer Aktivierung von Apoptose-induzierenden Faktoren, wie z. B. Cytochrom C oder Faktor AIF [28].

1.3.1 Biofilmbildung

Das Vermögen pathogener Mikroorganismen, Biofilme auszubilden, spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen chronischer Infektionen. Biofilme können auf nahezu allen feuchten Oberflächen gebildet werden [29]. Grenzflächen des Wassers jeglicher Art sind bevorzugte Besiedlungsräume von Mikroorganismen, weil sie sich leicht akkumulieren und Biofilme bilden können [30]. Biofilme bestehen aus Wasser,

extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Mikroorganismen [29]. Der Hauptbestandteil ist mit einem Anteil von 80-98 % das Wasser. Von der Trockenmasse kann bis zu 90 % die EPS ausmachen [30, 31]. Biofilme sind durchzogen von Gängen und Tunneln über die Wasser wie auch Nährstoffe alle Bereiche des Biofilms erreichen können. Nährstoffe und Stoffwechselprodukte werden dabei über Diffusion innerhalb des Biofilms transportiert [32, 33]. Biofilme findet man ubiquitär überall dort, wo Wasser und Nährstoffe vorhanden sind. Bakterien können sich an verschiedenen Grenzflächen wie z. B. zwischen Gas- und Flüssigphasen, Flüssig- und Festphasen, oder auch zwischen Flüssig- und Flüssigphasen absetzen. Generell haben, bei der Entstehung von Biofilmen, eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf deren Eigenschaften. Die Umgebungstemperatur, der pH-Wert, der Druck, wirkende Scherkräfte, die Ladung der Zelloberflächen oder die chemische Zusammensetzung des Substrats wirken auf den Biofilm ein [34-36]. Biofilme sind im Allgemeinen als mikrobielle Gemeinschaft definiert, charakterisiert durch Zellen, die in der Regel irreversibel mit Substraten, bzw. Interphasen oder miteinander verbunden sind [34]. Der Prozess der Biofilmbildung wird in 5 Phasen eingeteilt [37]. Es beginnt mit einer reversiblen Adhäsion von Makromolekülen, wie Huminstoffen, Polysacchariden, Proteinen und hydrophoben Molekülen aus der wässrigen Phase an eine Oberfläche („*conditioning film*“) [38]. Die Bildung eines „*conditioning film*“ an Oberflächen ist auch als Pellikel oder Kahmhaut bekannt und wird von unterschiedlichen Parametern beeinflusst [39, 40]. Die Mikroorganismen können sich am „*conditioning film*“ über Pili anheften [39] und es kommt zur Produktion von EPS [41]. Infolge der Vermehrung und Synthese von EPS, die von den Bakterien selbst produziert werden, kommt es zur Ausbildung einer geschlossenen Biofilmmatrix [42]. Diese wächst zunächst mehrschichtig auf und bildet schließlich die typische dreidimensionale Strukturen eines Biofilms aus [12]. In der Plateauphase hat sich ein Gleichgewicht zwischen absterbenden und sich replizierenden Mikroorganismen eingestellt. Planktonische Mikroorganismen werden absorbiert und an die Umgebung abgegeben, zudem lösen sich ständig kleinste Teile aus der Biofilmmatrix heraus.

Biofilmbildung konnte schon in einigen *Acinetobacter*-Arten beobachtet werden [43, 44]. *A. baumannii* ist in der Lage, Biofilme auf biotischen und abiotischen Oberflächen auszubilden [45]. Pilus-vermittelte Biofilmbildung auf Glas und Kunststoff konnte ebenfalls demonstriert werden [46]. Damit wird diesem Erreger eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen verliehen, sowie die Fähigkeit, mehrere Tage bis Wochen in unbelebter Umgebung zu überleben [19]. Um diese dreidimensionale Struktur und die damit verbundene Diversität aufzubauen, müssen die Bakterien

koordiniert zusammenarbeiten. Sie kommunizieren mit Hilfe von kleinen sezernierter Signalmolekülen [12]. Diese Kommunikation, das „*Quorum Sensing*“, ermöglicht es den Bakterien, zelldichteabhängig Gene zu regulieren und, bei genügend großer Dichte, Biofilme zu bilden. Das Vorhandensein von „*Quorum Sensing*“ in *A. baumannii* konnte durch die Detektion eines Gens, was für Produktion eines Autoinduktors kodiert, bestätigt werden. Die Bakterien kontrollieren so verschiedene Stoffwechselprozesse, einschließlich ihrer Biofilmbildung [47]. Im Zusammenhang mit Infektionen wird die Fähigkeit zur Biofilmbildung als entscheidender Virulenzfaktor angesehen, der den Bakterien die Möglichkeit bietet, auch in feindlicher Umgebung zu überleben [34, 45]. So sind die im Biofilm eingeschlossenen Erreger wirkungsvoll geschützt vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus und zeigen eine außerordentliche Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen. Letzteres wird durch verschiedene Faktoren begünstigt: Die EPS des Biofilmes wirken als Diffusionsbarriere, die zu einer verzögerten Penetration der antimikrobiellen Wirkstoffe durch die Biofilm-Matrix führt. Zudem zeigen Biofilm-Bakterien einen Phänotyp mit verringerter Wachstumsrate im Vergleich zu frei in der Dispersion wachsenden Bakterien und antimikrobielle Substanzen können somit viel langsamer aufgenommen werden. Zusätzlich kommt es zu einer veränderten Gentranskription in Abhängigkeit von den im Biofilm vorherrschenden Bedingungen, was sich bei *A. baumannii* u. a. in einer Überproduktion von β -Laktamasen zeigen kann [34]. Die von *A. baumannii* gebildeten Biofilme konnten bereits von verschiedenen medizinischen Geräten isoliert werden, wie z. B. von Kathetern, Beatmungsschläuchen, künstlichen Herzklappen und Prothesen [4].

1.3.2 Motilität und natürliche Kompetenz

A. baumannii ist ein gram-negativer, nosokomialer Erreger und wird in der Literatur als unbewegliches kokkoides Stäbchenbakterium beschrieben, das keine Flagellen besitzt [1, 3, 46, 48]. Unterschiedliche Flagellen-unabhängige Beweglichkeitsformen innerhalb der Gattung *Acinetobacter* wurden bereits in einigen Studien untersucht [49-51]. Barker und Maxted entdeckten 1975 eine Form der Motilität, bei der die Bakterienzellen kleine Furchen im Agar ausbilden und sich entlang dieser Furchen bewegen. Diese Form wurde zunächst als „*ditching*“ beschrieben [49], eine Art schwärmende Fortbewegung, welche später durch die Arbeiten von Henrichsen 1984 als Pilus-abhängiges Phänomen interpretiert und in „*twitching motility*“ umbenannt wurde [51]. Anhand von Genomsequenzen konnte dann die Existenz von Genen für den Aufbau von Typ IV-Pili (T4P) nachgewiesen werden [47]. *A. baumannii* nutzt offenbar als Motilitätsmechanismus die T4P-vermittelte „*twitching motility*“, um sich

entlang feuchter Oberflächen zu bewegen [52-54]. Dieses Gleiten beruht auf der Synthese und Retraktion von Pilusstrukturen unter Vorschub der Zelle [55].

Im Jahr 2010 wurde über einer Form der Oberflächenmotilität in *A. baumannii* berichtet, die durch Licht beeinflussbar ist [56]. Motilität ist eine typische Eigenschaft klinischer Isolate von *A. baumannii*, die von der Expression zweier Gene für die Synthese von Polyamin 1,3-Diaminopropan (DAP) abhängt [54]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass viele Isolate von *A. baumannii* natürlich kompetent werden, während sie sich fortbewegen [Wilharm & Skiebe, zur Publikation eingereicht]. Neben der „*twitching motility*“ kann durch ein T4P auch die natürliche Aufnahme von freier DNA aus der Umwelt vermittelt werden [57]. Die Aufnahme linearer DNA wird von den meisten Mikroorganismen mit Hilfe von DNA-Aufnahme-Systemen durchgeführt, die Homologien zu z. B. T4P zeigen [47, 58]. In *Neisseria gonorrhoeae* ist der T4P verantwortlich für die Beweglichkeit des Bakteriums und für die Aufnahme von DNA über natürliche Transformation [59]. Die Transformation ist neben der Transduktion und der Konjugation eine der drei wichtigsten Möglichkeiten des horizontalen Gentransfers (HGT) bei Prokaryoten. Die Fähigkeit lineare DNA aus der Umgebung aufzunehmen, die zur Transformation führt, wird als natürliche Kompetenz bezeichnet [60]. Rekombinatorische Ereignisse innerhalb der Zelle führen nach Aufnahme dazu, dass die DNA ganz oder teilweise in das bakterielle Chromosom integriert werden kann. Einem Bakterium wird durch natürliche Kompetenz somit die Reparatur und Erweiterung des eigenen Genpools ermöglicht. Natürliche Kompetenz ist für viele Bakterienstämme sowohl gram-positiver Spezies, wie *Bacillus* [61] und *Streptococcus* [62], als auch für gram-negative Spezies, wie *Campylobacter* [63] oder *Helicobacter* [64] beschrieben. Viele Bakterien sind zumeist in einer bestimmten Wachstumsphase natürlich kompetent [58]. Bedingt durch äußere Einflüssen, wie z. B. Nährstoffmangel, wird die Fähigkeit zur Transformation aber nur bei einigen Zellen der Population ausgebildet. Die Aufnahme von DNA findet dann Zelldichte-abhängig statt. Allerdings nimmt ein Bakterium nicht wahllos DNA auf, sondern meistens aus nah verwandten Stämmen. DNA aus entfernt verwandten Organismen wird in der Regel als Fremd-DNA erkannt und von Nukleasen zerstört. Für *Bacillus subtilis* ist der Vorgang der natürlichen Kompetenz sehr gut untersucht und beschrieben [61, 65]. Die Aufnahme von DNA ist an das allgemeine Stressantwort-System gekoppelt und abhängig von Wachstumsphase, Zelldichte und Zelltyp, da nicht alle Zellen einer Population kompetent werden. In *B. subtilis* ist die Ausbildung der natürlichen Kompetenz an einen „*Quorum sensing*“-Mechanismus gekoppelt [66]. *A. baumannii* und andere Spezies sind ebenso in der Lage lineare DNA aus der Umgebung aufzunehmen [54,

67-69]. Diese Möglichkeit der Genomveränderung mit Hilfe des HGT beschreibt, neben der Kolonisierung und Infektion durch den Erreger, die zusätzliche Gefahr die von diesem nosokomialen Keim ausgeht [1, 4, 70].

1.3.3 Antibiotika-Resistenzen

Zu den oben beschriebenen Problemen kommt die zunehmende Resistenz von *Acinetobacter* spp. gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika [1, 15, 48, 71, 72]. Häufig treten diese in Form einer Multiresistenz gegen β -Laktame und Aminoglykoside auf. Diese wird hauptsächlich durch hydrolysierende β -Laktamasen, sowie von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen vermittelt [1]. Eine enzymatische Inaktivierung, oder der aktive Transport der antimikrobiellen Substanzen nach außen (Effluxpumpen), bzw. der gedrosselte Einstrom sind klassische Mechanismen, die zusätzlich zum umfangreichen Resistenzvermögen von *A. baumannii* beitragen [1]. Die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen wird zum einen über die Mutation im *gyrA*- und *gyrB*-Gen hervorgerufen und zum anderen durch eine gedrosselte Akkumulation dieser Wirkstoffe in der Zelle. Ursache dafür sind die Abnahme der Zellpermeabilität und eine Überexpression zweier Effluxpumpen [1, 2, 73]. Auch im Zusammenhang mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol werden ebenfalls Effluxsysteme beschrieben [1]. Durch DNA-Sequenzierung des Stamms ATCC 17978 (*American Type Culture Collection*) von *A. baumannii* wurden z. B. 16 Genominseln (putative alien islands (pAs)) identifiziert, welche in Verbindung stehen mit Antibiotika-Resistenz, Pilus Biogenese oder Lipidmetabolismus [47]. Diese pAs tragen putative Virulenzgene, die offensichtlich durch sukzessive Insertion mobiler genetischer Elemente mit einem weiten Wirtsspektrum an bevorzugter Stelle in das *A. baumannii*-Chromosom aufgenommen wurden [74]. Dabei bildet *A. baumannii* genetische Austauschgemeinschaften mit anderen wichtigen Erregern, wie den *Enterobacteriaceae* oder den *Pseudomonaden* [75-77]. Die New Delhi Metallo- β -Lactamase NDM-1 wurde beispielsweise zunächst in *E. coli* und *Klebsiella* identifiziert, stammt aber ursprünglich aus *A. baumannii* [77].

1.4 Schwefelwasserstoff (H₂S) in Bakterien

Schwefelwasserstoff (H₂S) ist eine stark giftige, gasförmige Verbindung, die als Nebenprodukt des Schwefelstoffwechsels in verschiedenen Bakterien schon sehr lange bekannt ist [78]. Dabei dient Sulfat unter anaeroben oder mikroaerophilen Bedingungen als alternativer Elektronenakzeptor der Energiegewinnung (Sulfatdissimilation). Viele Bakterien können Sulfat aber auch als Schwefelquelle für die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren und als Kofaktoren nutzen (Sulfatassimilation). Doch muss Sulfat (SO₄²⁻) vor dem Einbau in schwefelhaltige Aminosäuren von den Zellen in der assimilatorischen Sulfatreduktion auf die Stufe des Schwefelwasserstoffs (H₂S) reduziert werden [79]. Die Umsetzung des Sulfats (SO₄²⁻) zu Schwefelwasserstoff (H₂S) wird dabei durch zwei energieverbrauchende Aktivierungsschritte eingeleitet: es bildet sich mit Hilfe von Adenosintri-phosphat (ATP) und der ATP-Sulfurylase das Adenosinphosphosulfat (APS). Anschließend erfolgt durch die APS-Phosphokinase und ATP die Reaktion zu Phospho-adenosinphosphosulfat (PAPS). Die Reduktionen von PAPS zu Sulfit (SO₃²⁻) wird danach durch die PAPS-Reduktase katalysiert und abschließend reduziert die Sulfit-Reduktase das entstandene Sulfit (SO₃²⁻) zu Sulfid (H₂S) [80].

Außerdem wurden kürzlich in verschiedenen Bakterien H₂S-generierende Systeme identifiziert, die denen von Säugern sehr ähnlich sind [78]. In Erregern wie *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* wurden die Enzyme Cystathion β-Synthase (CBS), Cystathion γ-Lyase (CSE) und 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (MST) identifiziert, welche für die H₂S-Bildung verantwortlich sind [81]. In *A. baumannii* gibt es diese Enzyme nicht. Allerdings konnten durch die Genomsequenzierung des *A. baumannii* Stamms ATCC 17978 Gene annotiert werden, die für die α- (A1S_2798) und β-Untereinheit (A1S_2846) der Sulfit-Reduktase (EC 1.8.1.2.) kodieren [47]. Die Sulfit-Reduktase (SR) gehört zu der Klasse der Oxidoreduktasen und reduziert Sulfit (SO₃²⁻) zu Sulfid (H₂S). Laut der KEGG-Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) kommt es als einziges Enzym für die H₂S-Produktion in *A. baumannii* in Frage (Abb. 1.1).

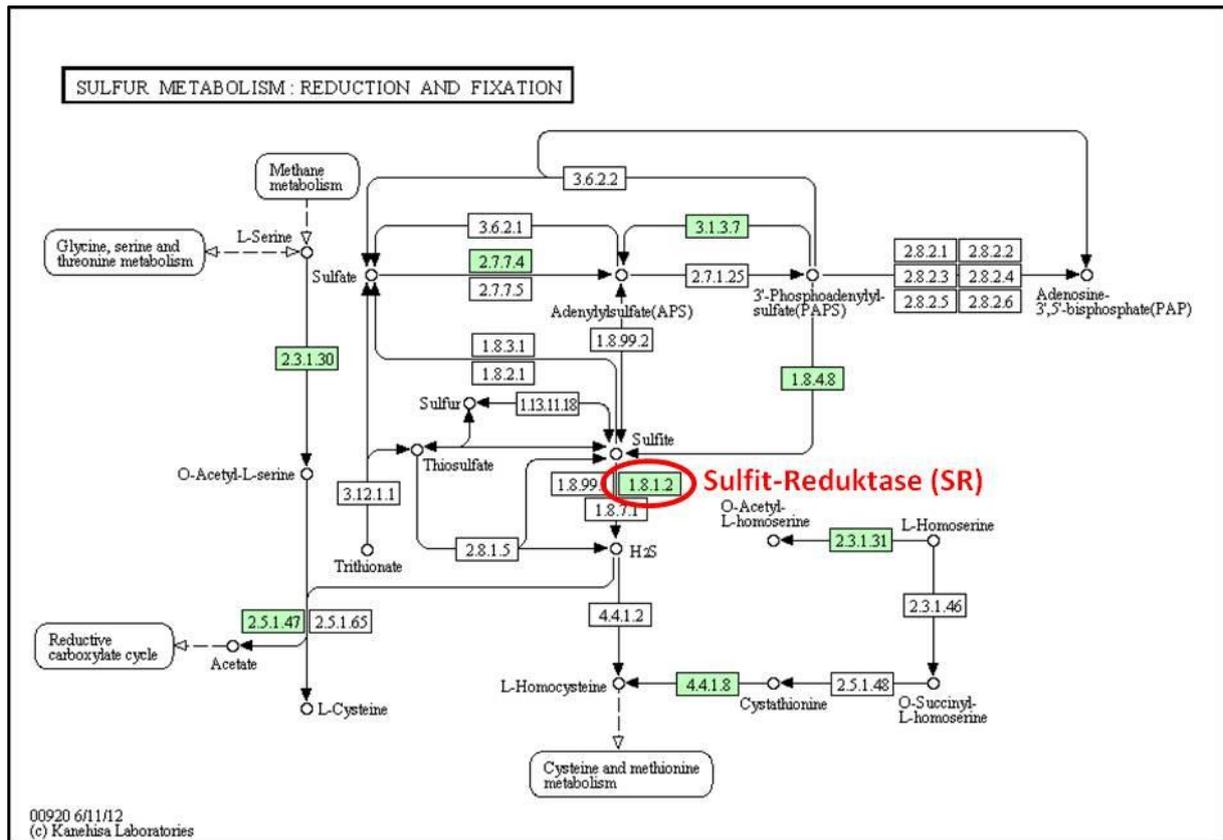


Abb. 1.1: Schwefelstoffwechsel von *Acinetobacter baumannii* (KEGG-Datenbank)
 Grün unterlegte EC-Nummern kennzeichnen Enzyme, welche bereits in *Acinetobacter baumannii* identifiziert werden konnten.

Schwefelwasserstoff (H₂S) ist erst seit einigen Jahren bei Säugern als dritter gasförmiger Botenstoff, neben Stickstoff- und Kohlenstoffmonoxid, bekannt [82-86]. Es konnte gezeigt werden, dass H₂S Auswirkungen auf die Insulin-Sekretion hat [85] und sowohl inflammatorische [84] als auch vaskuläre Prozesse [83] regulieren kann. Im vergangenen Jahr wurde nun bekannt, dass H₂S in Bakterien ebenfalls als Signalmolekül wirkt und für die Resistenzausprägung gegenüber Antibiotika und oxidativen Stress eine entscheidende Rolle spielt [81]. Wie man erst seit wenigen Jahren weiß, beruht die Wirkung vieler Antibiotika, wie die Hemmung von Zellwandbiosynthese (z. B. durch β-Lactam-Antibiotika), Translation (z. B. durch Aminoglykoside) oder Replikation (z. B. Fluorchinolone als Gyrase-Hemmer) unter anderem auf der Auslösung von oxidativem Stress innerhalb der Bakterienzelle. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.: reactive oxygen species* (ROS)) wirken bakterizid, was die eigentliche Toxizität vieler antibakterieller Substanzen ausmacht [87-90]. Diese durch Antibiotika induzierten Stressantworten konnten bereits bei subinhibitorischen Konzentrationen beobachtet werden. In deren Folge kann H₂S dabei vermutlich direkt mit den ROS reagieren und so zur Entgiftung beitragen.

Offensichtlich wird durch H_2S aber auch die Expression von Entgiftungsenzymen wie z. B. Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen oder Glutathion S-Transferasen (GST) stimuliert [81]. Die durch ROS aktivierte SOS-Antwort führt zusätzlich zur Anpassung an die Stressbedingungen durch eine Überexpression und Aktivierung von Effluxpumpen sowie durch „*Quorum Sensing*“ und Biofilmbildung [4].

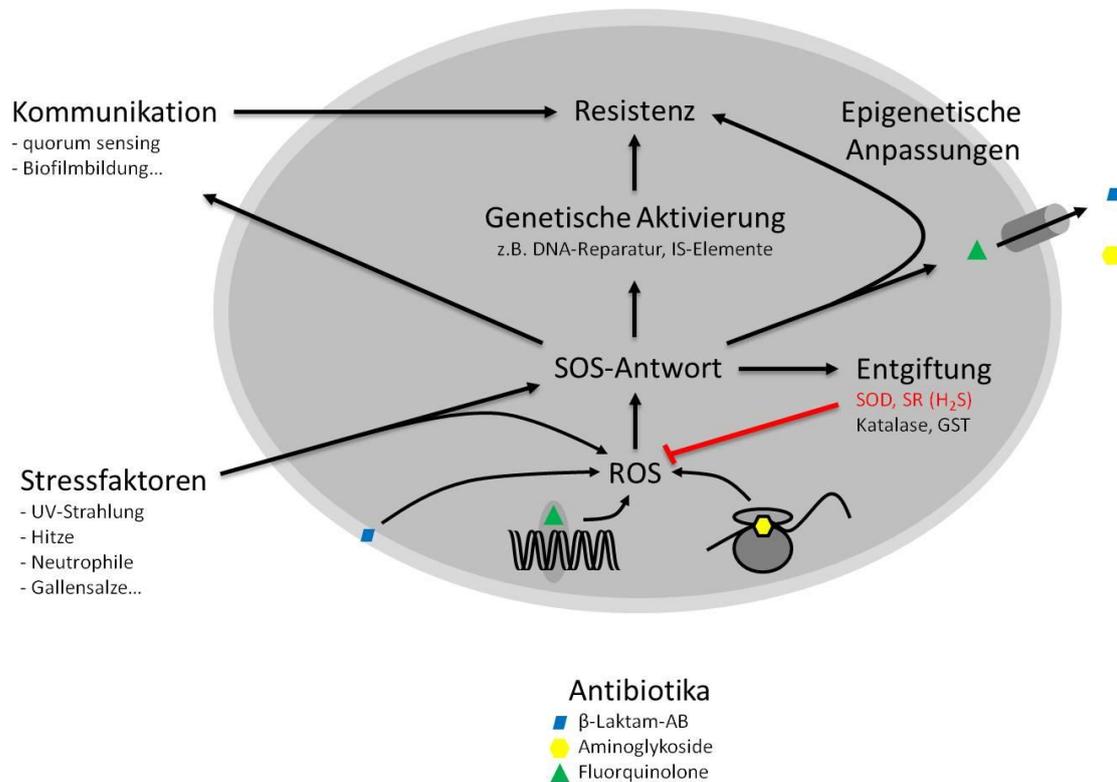


Abb. 1.2: Die Bedeutung von Superoxid-Dismutase (SOD) und Sulfid-Reduktase (SR) für die Resistenz- und Virulenzausprägung von Bakterien.

Oxidativer Stress stimuliert bei gram-negativen Bakterien neben der adaptiven Resistenzentwicklung auch genetische Veränderungen. In Folge der Aktivierung von IS-Elementen oder Stimulierung der natürlichen Kompetenz kommt es zu einer Steigerung der Resistenz des Organismus [90]. Neben Antibiotika können auch zusätzliche Stressfaktoren, wie z. B. UV-Strahlung, Hitze oder der Stoffwechsel des Erregers diese SOS-Antworten auslösen [90, 91]. Zudem spielen sie eine bedeutende Rolle während des Infektionsverlaufs, da die Generierung von ROS wichtige Säulen der Erregerabwehr darstellen. Zusammengefasst kommt der Fähigkeit der Bakterien zur Entgiftung des oxidativen Stress bzw. der entstehenden ROS daher eine zentrale Rolle bei der Ausprägung und Entwicklung der Resistenzen gegenüber Antibiotika zu und trägt zur Widerstandskraft der Erreger gegenüber Angriffen des Immunsystems bei. Für die Entwicklung effizienterer Therapien und neuer Therapeutika ist es daher von besonderem Interesse, diese Prozesse zu verstehen und zu manipulieren.

1.5 Zielsetzung

Im Vorfeld dieser Arbeit war eine Transposon-Mutagenese des komplett sequenzierten Stammes von *A. baumannii* ATCC 17978 durchgeführt worden [47, 54]. Anschließend waren die Mutanten im Motilitäts-Assay analysiert und bei bestehenden Motilitätsdefekten einer Mutantenbibliothek zugeordnet worden. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Motilität klinischer Isolate von *A. baumannii*, von der Synthese des Polyamin 1,3-Diaminopropan (DAP) abhängig ist [54]. Eine weitere identifizierte Mutante mit Motilitätsdefekt (Mutante 179) zeigte eine Transposon-Insertion in dem für die β -Untereinheit der Sulfid-Reduktase (SR) kodierenden Gen (A1S_2846) von *A. baumannii* ATCC 17978. Die SR aus *A. baumannii* reduziert im Schwefelstoffwechsel Sulfid (SO_3^{2-}) zu Sulfid (H_2S), der für die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren genutzt wird. Die Mutante 179 (ATCC 17978) sollte daher nicht mehr in der Lage sein, Schwefelwasserstoff (H_2S) zu synthetisieren, da die SR laut KEGG-Datenbank das einzige Enzym zur Bildung von H_2S und Assimilation von Schwefel für den Cystein-Methionin-Metabolismus in *A. baumannii* darstellt. Der Motilitätsdefekt dieser Mutante 179, könnte darauf hindeuten, dass die Produktion von H_2S in *A. baumannii* an der Fähigkeit zur Fortbewegung beteiligt ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass H_2S bei Bakterien als Signalmolekül wirkt und für die Resistenzprägung gegenüber Antibiotika und oxidativen Stress eine entscheidende Rolle spielt [81].

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die SR aus *A. baumannii* zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte das für die β -Untereinheit kodierende Gen (A1S_2846) der SR in verschiedenen natürlich kompetenten *A. baumannii*-Isolaten inaktiviert werden [54]. Die Wildtypen und entstandenen SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate sollten anschließend hinsichtlich ihrer Motilität, ihres Wachstums und ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung überprüft werden. Die dabei auftretenden Mutationseffekte sollten über Supplementierung mit einem H_2S -Donor und Cystein kompensiert und die SR-Mutanten genetisch komplementiert werden. Weiterhin sollte eine mögliche Beteiligung der SR bei der Resistenzprägung gegenüber verschiedenen Antibiotika untersucht und der Einfluss der SR auf die Virulenz von *A. baumannii* im Wachsmotten-Infektionsmodell (*Galleria mellonella*) analysiert werden. Zusätzlich sollte die rekombinante Herstellung der β -Untereinheit (A1S_2846) in *E. coli* etabliert und das gereinigte Protein zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Antikörper wurden über die Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt a. Main, Deutschland), Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien), Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland) und GE Healthcare (Deutschland) bezogen. Genutzte Kits stammen von Epicentre Biotechnologies (Madison, USA) und Qiagen (Hilden, Deutschland). Plastikverbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Brand GmbH (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) angefordert. Nitrozellulose-Membranen stammten von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Filterpapier aus dem Hause GE Healthcare (Deutschland). Glasware kam von der Duran Group GmbH (Wertheim, Deutschland) und Sartorius Stedium Biotech GmbH (Göttingen, Deutschland) lieferte Filter für die Sterilfiltration. Systeme für den Pufferaustausch von Proteinen wurden von der Firma GE Healthcare (Deutschland) eingesetzt.

2.1.2 Geräte und Zubehör

Zum Einsatz gekommene Geräte und sonstiges Zubehör wurden in den entsprechenden Methoden einzeln aufgeführt und sind mit Angaben des Herstellers benannt. In Tabelle 2.1 sind die Geräte mit Zubehör angegeben, die immer wieder zum Einsatz kamen.

Tab. 2.1: Übersicht verwendeter Geräte und Zubehör

Geräte/Zubehör	Modell	Hersteller
Analysenwaage	LA120S	Sartorius Stedium Biotech
Brutschrank/Schüttelinkubator	innova 4200; innova 4230	New Brunswick Scientific
Pipetten	Concept	Eppendorf
pH Meter	Seven Easy	Mettler Toledo
Spannungsquellen	Power Pac Basic	Bio-Rad
Sterilwerkbank	HERA safe	Herhaeus instruments
Heizblock/Thermomixer	comfort; compact	Eppendorf
Zentrifuge	5418; 5417R	Eppendorf
Zentrifuge	Sigma 3K30	Sigma
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Spiralrad	Röhrchenrotator	VWR

2.1.3 Bakterien, Plasmide und Primer

2.1.3.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Patientenisolate von *A. baumannii* sind durch das Robert Koch-Institut, Außenstelle Wernigerode, zur Verfügung gestellt wurden (Tab. 2.2). Die Stammbezeichnung entspricht der laufender Eingangsnummer im Labor und dem Jahr der Einsendung.

Tab. 2.2: Übersicht verwendeter Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	Klonierungsstamm, F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^r) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen GB
BL21 (DE3) pLysS	Expressionsstamm, F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS Cm ^r	Invitrogen GB
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
ATCC 17978		ATCC
95/07		Deutschland
96/10		Deutschland
102/07		Deutschland
30011		DSMZ
Mutante 179	ATCC 17978 SR::Km ^r	[54]
Mutante 95/07	95/07 SR::Km ^r	diese Arbeit
Mutante 96/10	96/10 SR::Km ^r	diese Arbeit
Mutante 102/07	102/07 SR::Km ^r	diese Arbeit
Mutante 30011	DSMZ 30011 SR::Km ^r	diese Arbeit

2.1.3.2 Vektoren und Plasmide

Alle verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide, welche in dieser Arbeit genutzt und hergestellt wurden, sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.3: Übersicht verwendeter Vektoren und hergestellter Plasmide

Vektor/Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEX-6P-3	Expressionsvektor, oriV, <i>lacI^q</i> -Repressor, <i>ptac</i> , rrnBTerminator, Amp ^r , GST, PreScission-Proteaseschnittstelle	GE Healthcare
pGEX-6P-3_SR	Genlocus A1S_2846, BamHI, NotI, PCR-Amplifikat aus <i>A. baumannii</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pWH1266	Expressionsvektor, Fusion aus pBR322 und pWH1277, Amp ^r	[92]
pWH1266_SR	Genlocus A1S_2845 und A1S_2846 mit Promotor- und Terminatorregionen, BamHI, PCR-Amplifikat aus <i>A. baumannii</i> , Amp ^r	diese Arbeit

2.1.3.3 Primer/Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer stammen von der Firma Thermo Scientific (lyophilisiert) und sind nach Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst wurden. Die Konzentration der Primer-Stammlösung betrug 100 pmol/μl und als Gebrauchslösung kam eine Konzentration von 5 pmol/μl zum Einsatz. Das Design der Primer wurde spezifisch zur Zielsequenz mit einer Anlagerungstemperatur von etwa 58°C gestaltet. Tabelle 2.4 zeigt die verwendeten Primer mit ihren entsprechenden Sequenzen. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die eingeführten Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

Tab. 2.4:Übersicht verwendeter Primer

Primer	Sequenz (5'–3')	Schnittstellen
SR_for	ATCGGTAATAAAGCCGATATGCG	-
SR_rev	TCAGCAGCTGATTAATCAACGAG	-
SR-6P-3_for	ATTAG <u>GATCC</u> ATGTATTTATATACCGATTTTCGATCAG	BamHI
SR-6P-3_rev	ATTAG <u>CGGCCGCT</u> TAAGCATATGCACGCTCCTTAAATGG	NotI
SR-pWH_for	ATTAG <u>GATCC</u> GTATTGGTACAATTCGTGACAG	BamHI
SR-pWH_rev	ATTAG <u>GATCC</u> AACACATATAAAATTCCAGCTTGC	BamHI

2.1.4 Nährmedien,Kultivierung und Stammhaltung

2.1.4.1 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Festmedien wurden zusätzlich 1,5 % Agar zugesetzt. Hitzeempfindliche Komponenten wie Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen in steril filtrierter Form zugeführt. Für die Transformation wurde reichhaltiges S.O.C.-Medium genutzt. Zur Kultivierung von *E. coli* und *A. baumannii* kamen 2YT- und LB-Medium zum Einsatz.

Luria-Bertani-Medium (LB): 1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl
pH 7,4

2YT-Medium: 6,25 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl
pH 7,4

S.O.C.-Medium:	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	nach dem Autoklavieren wird dem Medium
	20 mM Glukose (steril filtriert) zugesetzt
	pH 7,4

2.1.4.2 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* und *A. baumannii* erfolgte aerob bei 37°C auf Agarplatten oder im Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator bei 200 RPM, um eine ausreichende Belüftung der Kultur sicherzustellen. Die folgende Tabelle (Tab. 2.5) gibt einen Überblick über Antibiotika und andere Medienzusätze, welche bei der Kultivierung zur Anwendung kamen. Die verwendeten Antibiotika bzw. Medienzusätze wurden als Stammlösung hergestellt, steril filtriert und bei -20°C bzw. +8°C gelagert.

Tab. 2.5:Übersicht verwendeter Antibiotika und Medienzusätze

Zusätze	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Antibiotika			
Ampicillin (Amp)	ddH ₂ O	10mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Km)	ddH ₂ O	5mg/ml	50 µg/ml
Medienzusätze			
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ddH ₂ O	1 M	1 mM
Cystein (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	ddH ₂ O	1 M	1 mM
Natriumhydrogensulfid (NaHS)	ddH ₂ O	1 M	1 mM

2.1.4.3 Bestimmung der optischen Dichte

Die Zelldichte von Bakteriensuspensionen wurde mit dem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg; Deutschland) bei 595 nm bestimmt. Als Referenz diente das jeweilige bakterielle Anzuchtmedium. Nach Bedarf konnte die Bakteriensuspensionen mit Medium verdünnt werden ($OD_{595} \geq 1$), um eine Linearität zwischen der Zelldichte und der Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zu gewährleisten.

2.1.4.4 Stammhaltung

Bakterienstämme können in der Regel auf Agarplatten bis zu vier Wochen bei 4°C unter entsprechendem Selektionsdruck gelagert werden. Die Langzeitlagerung der Stämme erfolgte in 15 % Glycerol bei -80°C.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gewinnung von Bakterien-Schnellysaten

Dieser Schnell-Zellaufschluss diente der Überprüfung von Transformanten mittels PCR. Für die Gewinnung von Gesamt-Zellysaten wurde eine Bakterienkolonie in 20 µl ddH₂O eingerieben und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Das Lysat wurde anschließend für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand als Template für die PCR eingesetzt.

2.2.2 Isolierung von genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA wurde zunächst 1 ml Übernachtskultur für 10 Minuten bei 7000 x g zentrifugiert. Die Zugabe eines Lysis-Puffers zum Pellet zerstört die Zellwand der Bakterien. Die im Lysat vorhandene RNA wird hierbei durch RNase A aufgelöst und Proteinase K wird für den Abbau von Proteinen und zur Freisetzung der Nukleinsäuren hinzugegeben. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wird der Überstand bei Raumtemperatur mit Isopropanol inkubiert, wodurch die Hydrathülle der DNA verdrängt und so deren Pelletierung ermöglicht wird. Nach erneuter Zentrifugation wird das DNA-Pellet zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in der gewünschten Menge Puffer oder ddH₂O aufgenommen. Für die Isolation von Gesamt-DNA kam das Master Pure DNA Purification Kit von Epicentre Biotechnologies (Madison, USA) zum Einsatz. Die Durchführung fand nach Angaben des Herstellers statt und die DNA wurde letztlich in einem entsprechenden Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA beruhte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Die im Lysat vorhandene RNA wird hierbei durch RNase aufgelöst und in Gegenwart eines chaotropen Salzes bindet die Plasmid-DNA selektiv an die Glasfaser- oder Silica-Oberfläche einer Minisäule. Durch mehrfaches Waschen und Zentrifugieren werden kontaminierende bakterielle Komponenten beseitigt und die Plasmid-DNA kann mit Hilfe salzreicher Puffer oder ddH₂O eluiert werden. Die

Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte bis zu einer Menge von 20 µg (Minipräparation) mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (250) von Qiagen (Hilden, Deutschland). Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt und die Plasmid-DNA wurde mit ddH₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (250) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. In Anwesenheit eines chaotropen Salzes bindet die DNA selektiv an eine Glasfaser- oder Silica-Oberfläche und wird anschließend durch eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten von noch vorhandenen Primern, Nukleotiden und störenden Salzen gereinigt. Die DNA wurde mit ddH₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5 DNA-Fällung

Zur Konzentrierung wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2 Volumen 100 % Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die Fällung erfolgte durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 20000 x g. Das DNA-Pellet wurde zweimal in 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet und anschließend in einem entsprechenden Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen erfolgte spektrophotometrisch in Verdünnungen von 1:50 bzw. 1:100 mit Hilfe des Biophotometers (Eppendorf) bei 260 nm in UV-Halb-Mikro-Küvetten (Roth) gegen ddH₂O. Eine Absorptionseinheit (OD 1,0) einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger Nukleinsäure von 50 ng/µl. Um die Qualität der DNA-Präparationen sicher zu stellen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm zur Abschätzung der Protein-Verunreinigung bestimmt. Das Verhältnis 260/280 nm sollte größer als 1,8 sein, da sonst Verunreinigung mit Proteinresten die DNA-Qualität mindern.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Die PCR, welche erstmals 1985 erwähnt wurde [93], ist eine enzymatische Amplifikation von DNA-Sequenzen, mit der es in der Molekularbiologie möglich ist, selbst geringste Mengen an DNA so zu vervielfältigen, dass eine weitere

molekularbiologische Bearbeitung möglich ist. Die PCR verläuft nach folgendem Schema:

- 1. Denaturierung:** Auftrennen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge. Durch Erwärmung auf bis zu 95°C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Ketten der zu vervielfältigenden DNA gespalten und die Nukleinsäure liegt dann einzelsträngig vor.
- 2. Annealing:** Anlagern spezifischer Oligonukleotide/Primer (Primerhybridisierung) am 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches der als Einzelstränge vorliegenden DNA bei Temperaturen von etwa 60°C.
- 3. Elongation:** Verlängern der komplementär angelagerten Oligonukleotide (Polymerisierung) in 5'-3'-Richtung mittels DNA-Polymerase bei Temperaturen von etwa 70°C und Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTP's) bis die Polymerase vom Strang abfällt oder die Reaktion durch Temperaturerhöhung unterbrochen wird.

Die neu synthetisierten Ketten werden wieder bei 95°C geschmolzen und ermöglichen eine wiederholte Anlagerung von Oligonukleotiden/Primern. An alle einzelsträngigen DNA-Moleküle kann die DNA-Polymerase erneut ansetzen und komplementäre Stränge synthetisieren. Der Ablauf von Schmelzen, Anlagerung der Primer und Synthese der Doppelstränge kann so lange wiederholt werden, bis die benötigte DNA-Menge hergestellt ist. Dabei entstehen in exponentieller Menge DNA-Fragmente einer bestimmten Länge, die für weitere gentechnische Experimente verwendet werden können. Als Matrize für den PCR-Ansatz dienten Plasmid-DNA oder bakterielle Schnell-Zellaufschlüsse. Primerpaare wurden so konstruiert, dass ihr Schmelzpunkt ($T_m = 58^\circ\text{C}$) möglichst identisch zueinander ist. Die Primer besaßen nach Bedarf am 5'-Ende Basen für Restriktionsschnittstellen zur Klonierung. Zusätzlich wurden 4 Basen zur Verbesserung der Restriktionseffizienz der Exonukleasen an den Start der Primer angehängt. Das HotStarTaq Master Mix Kit von Qiagen mit der Taq-Polymerase ohne Korrekturlese-Exonuklease-Aktivität fand bei der Überprüfung von Transformanten oder beim Nachweis bestimmter DNA-Bereiche Verwendung. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Aufreinigung der Amplifikate im QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder eine Analyse im Agarosegel. Die PCR wurde nach folgendem Schema pipettiert und anschließend im 2720 Thermal Cycler von Applied Biosystems amplifiziert:

HotStarTaq Master Mix (Qiagen):

1. Template	3 μ l Bakterienlysat bzw. 30 ng Plasmid-DNA
2. Master Mix	5 μ l
3. Oligonukleotid 1 (5 pmol/ μ l)	1 μ l
4. Oligonukleotid 2 (5 pmol/ μ l)	1 μ l
5. ddH ₂ O	ad 10 μ l

Die Amplifizierung erfolgte mit folgendem Programm:

1. Denaturierung I	95°C, 5 min
2. Denaturierung II	95°C, 30 s
3. Annealing	58°C, 30 s
4. Elongation	72°C, 1 min/kb (0,5-2,5 min)
5. finale Elongation	72°C, 7 min
6. Kühlung	4°C, ∞

(25 Zyklen aus Denaturierung II, Annealing und Elongation)

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Größe und Ladung der einzelnen Teilchen bestimmt dabei ihre jeweilige elektrophoretische Beweglichkeit, auch Mobilität genannt. Wegen ihres Zuckerphosphatgerüsts sind Nukleinsäuren über einen großen pH-Bereich negativ geladen. Innerhalb eines elektrischen Feldes wandern Nukleinsäuren daher zur positiv geladenen Anode. Da Nukleinsäuren eine gleichbleibende Ladungsdichte aufweisen, werden die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten nur durch Unterschiede in der Molekülgröße bestimmt. Die DNA-Moleküle werden also nach ihrer Größe aufgetrennt. Eine Polymer-Matrix wie Agarose bildet ein Netzwerk, das die Mobilität der großen Moleküle behindert. Die Trennung erfolgt letztlich aufgrund unterschiedlicher Retentionszeitender einzelnen Teilchen mit verschiedenen Größen im Gel. Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA im 1,5 %igen Agarosegel mit TBE als Laufpuffer. Für die Detektion der DNA-Banden unter UV-Bestrahlung wurden die Gele anschließend für 20 Minuten im Ethidiumbromid-Bad gefärbt (0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in ddH₂O). Als DNA-Marker diente die 1 kb Plus DNA Ladder von Invitrogen (Life Technologies). Zur Dokumentation wurden die Gele mit der GelDoc 2000 von Bio-Rad fotografiert.

TBE-Puffer:	40 mM Tris
	40 mM Borsäure
	1 mM EDTA
	pH 8,0

2.2.9 Restriktionsverdau (Plasmid und PCR-Amplifikat)

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige Nukleinsäuren an spezifischen Erkennungssequenzen von etwa 4-8 Basen, die sehr häufig palindromisch sind (z. B. BamHI: G'GATCC), zu spalten. Definierte Restriktionsschnittstellen können durch PCR an die DNA-Abschnitte angehängt werden. Plasmide besitzen eine MCS (*Multiple Cloning Site*), welche Erkennungssequenzen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen enthält. Wenn Plasmid und DNA-Amplifikat durch die Endonukleasen verdaut worden entstehen kompatible Enden, die anschließend miteinander ligieren können. Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland). Für den Restriktionsverdau wurden 20 µl-Ansätze mit 1 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Amplifikat verwendet. Der Verdau fand für 1 Stunde bei 37°C im Heizblock statt. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert. Die Prüfung des Restriktionsverdaus erfolgte im Agarosegel. Danach wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Für weitere Experimente musste die DNA aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert und der linearisierte Vektor dephosphoryliert werden.

2.2.10 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese, also die Isolierung von elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus dem Agarosegel, erfolgte zunächst wie die analytische Agarose-Gelelektrophorese. Zusätzlich wurde 1 mM Guanosin in das Gel eingegossen und ebenso dem Laufpuffer zugesetzt. Dies schützt die DNA vor Quervernetzung und Strangbrüchen durch UV-Licht. Das Gel wurde daraufhin kurz gefärbt und unter UV-Licht die entsprechende DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgte anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (250) von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde dann mit einem entsprechenden Volumen ddH₂O eluiert und für weitere Experimente genutzt.

2.2.11 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um die Religation des Vektors bei der Klonierung zu vermeiden, mussten die durch den Restriktionsverdau geschnittenen Enden des Vektors dephosphoryliert werden. Dies erfolgte mit der Alkalischen Phosphatase (Fast AP, Thermosensitive) von Fermentas (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland). Entsprechend des Herstellers wurde der 20 µl-Ansatz des verdauten Plasmides mit 2 µl 10 x Puffer des Herstellers und 1 µl Fast AP (1 U/µl) versetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte die Inaktivierung der Reaktion für 5 Minuten bei 75°C und das Plasmid konnte zur Ligation eingesetzt werden.

2.2.12 Ligation linearer DNA-Fragmente

Das PCR-Amplifikat und der Vektor wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, wodurch kompatible DNA-Enden am Amplifikat und am Vektor entstehen. Diese kompatiblen DNA-Enden von verschiedenen, geschnittenen Fragmenten oder Vektoren können wieder miteinander ligiert werden. Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 3'-Hydroxygruppen und 5'-Phosphatgruppen der kompatiblen Enden der DNA zwischen Insert und Plasmid, unter ATP-Spaltung. Die Verwendung der T4-DNA-Ligase fand nach Herstellerangaben (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) statt. Das Insert wurde im 3-fachen Überschuss dem linearisierten und dephosphorylierten Plasmid in einem 20 µl-Reaktionsansatz zugesetzt. Des Weiteren wurde der Ansatz mit 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl, Fermentas), 2 µl 10 x Puffer und der entsprechenden Menge ddH₂O versetzt. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C im Heizblock statt. Das Ligationsprodukt konnte direkt nach der Inaktivierung bei 65°C für 10 Minuten zur Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.2.13 Transformation

Eine von drei Möglichkeiten des Gentransfers bei Prokaryoten ist neben der Transduktion und der Konjugation, die Transformation. Die Fähigkeit eines Bakteriums, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen, welche zur Transformation führt, wird als natürliche Kompetenz bezeichnet [60]. Aufgenommene lineare DNA kann über homologe Rekombinationsereignisse ganz oder teilweise ins bakterielle Chromosom integriert werden. Einem Bakterium wird durch natürliche Kompetenz somit die Reparatur und ebenso die Erweiterung des eigenen Genpools ermöglicht. In

weiteren Experimenten konnte die Gruppe von Avery belegen, dass die Transformation auch *in vitro* durchgeführt werden kann [94]. Die molekularbiologische Bedeutung von natürlicher oder künstlich erzeugter (induzierbarer) Kompetenz ist daher sehr hoch, weil damit die Handhabung der Stämme zur genetischen Manipulation im Labor erleichtert wird. Mit Hilfe der induzierten Kompetenz ist es möglich, Genome gezielt zu verändern. Dafür müssen die Bakterienzellen in einen Zustand gebracht werden, der es ihnen ermöglicht, von außen zugeführte DNA, z. B. Plasmid-DNA, in die Zelle aufzunehmen. Es sind unterschiedliche Methoden bekannt, um die Kompetenz von Zellen herzustellen. Am weitesten verbreitet sind z. B. die Hitzeschock-Methode oder die Methode der Elektroporation, bei der mit Hilfe von kurzen Stromstößen die Membran geöffnet wird.

2.2.13.1 Herstellung elektrokompetenter *Acinetobacter baumannii*

Für die Herstellung elektrokompetenter *A. baumannii*-Zellen wurden 10 ml einer 1:50 Verdünnung in LB-Medium aus einer Übernachtskultur angesetzt und bei 37°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5-0,7 angezogen. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C und mit sterilen, vorgekühlten Lösungen. Hierfür wurden 8 ml der Kultur auf vier 2 ml-Tubes verteilt und die Zellen durch Zentrifugation bei 7000 x g für 10 Minuten geerntet. Die Pellets wurden danach zweimal mit 300 mM Sucrose-Lösung gewaschen und vereinigt [95]. Letztendlich wurden die Zellen in 30-50 µl 300 mM Sucrose-Lösung aufgenommen und direkt für die Elektroporation eingesetzt.

2.2.13.2 Transformation elektrokompetenter *Acinetobacter baumannii*

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompetente Zellen von *Acinetobacter baumannii* mit 100-200 ng aufgereinigten DNA-Amplifikat bzw. Plasmid gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser II von Bio Rad bei 2,5 kV, 200 W und 25 µF [95]. Danach wurde der Ansatz sofort in 1 ml vorgewärmtem S.O.C.-Medium aufgenommen und bei 37°C und 200 RPM für 30 Minuten im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einem entsprechenden Selektionsmedium (Kanamycin: 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.13.3 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte mit Top 10 bzw. One Shot BL21 (DE3) *pLysS* (Invitrogen). Hierfür wurde jeweils 50 µl der Zellen mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock im Heizblock bei 42°C für 30 Sekunden. Der Ansatz wurde anschließend

in 250 µl vorgewärmtem S.O.C.-Medium aufgenommen und bei 37°C und 200 RPM für 30 Minuten im Heizblock inkubiert. Letztlich wurden die Zellen auf einem entsprechenden Selektionsmedium (Ampicillin: 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.13.4 Transformation natürlich kompetenter *Acinetobacter baumannii*

Einige *A. baumannii*-Isolate haben die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz, d. h. sie können freie DNA aus der Umgebung aufnehmen und über homologe Rekombination ins Genom einbauen [60]. Um die Rolle der β -Untereinheit der Sulfit-Reduktase (SR) in *A. baumannii* hinsichtlich Motilität, Virulenz und Resistenz zu charakterisieren, wurde das Gen der β -Untereinheit in vier natürlich kompetenten *A. baumannii*-Isolaten durch Transformation mit genomischer DNA der SR-defizienten Mutante 179 (ATCC 17978) inaktiviert. Dazu wurde genomische DNA der Mutante 179 (ATCC 17978) isoliert, aufgereinigt und im Verhältnis 1:1 mit Bakteriensuspension (OD_{595} 1,0) der Isolate 95/07, 96/10, 102/07 und 30011 gemischt. Danach wurde halbfestes Motilitätsmedium (0,5 % Agarose) punktuell mit 7 x 2 µl des DNA-Bakterien-Gemisches jedes Isolats beimpft. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 800 µl PBS-Puffer von der Agaroseoberfläche und vom Boden der Petrischale abgeschwemmt und eine optische Dichte (OD_{595}) von 0,8 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 µl auf LB-Medium (30 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der β -Untereinheit der SR in den Transformanten der einzelnen Isolate wurde durch Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer SR_for und SR_rev bestätigt. Das PCR-Produkt wurde auf 1 %iger Agarose gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die korrekte Sequenz von Klonierungskonstrukten wurde mit Hilfe der DNA-Sequenzierung bestätigt. Dazu wurde der Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG (Deutschland) genutzt. Die Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 100 ng/µl und einem Gesamtvolumen von 20 µl zur Sequenzierung eingesandt. Mit Hilfe des Softwarepaketes LaserGene 10 SeqMan Pro konnten die erhaltenen Chromatogramme analysiert und die Sequenzen ausgewertet werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Brilliantblau G-250-Färbelösung von 465 nm auf 595 nm durch die Anlagerung des Farbstoffes an die kationischen Aminosäurereste (Arginin, Lysin, Histidin) des Proteins [96]. Daher ist die Proteinbestimmung nach Bradford stark von der Aminosäuresequenz abhängig. Zur Bestimmung der Proteinmenge in Lösung wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Hierfür wurden 5 µl einer Lösung mit unbekannter Proteinmenge mit 795 µl ddH₂O in eine 1,5 ml Küvette (Brand, Wertheim, Deutschland) gegeben. Diese Proteinlösung wurde mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München, Deutschland) versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte dann mit Hilfe des Biophotometers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Referenz aus 200 µl Bradford-Reagenz mit 800 µl ddH₂O.

2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli et al. [97]. Hierfür werden Natrium-Dodecylsulfat (SDS), β-Mercaptoethanol (β-ME) oder Dithiothreitol (DTT) zum Probenpuffer zugegeben. Durch die Anlagerung großer Mengen des anionischen Detergenz SDS werden nicht-kovalente Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört, die Proteine werden denaturiert und es entsteht ein negativ geladener Komplex. β-ME und DTT destabilisieren dabei die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine, indem sie Disulfidbrücken lösen. Die Anlagerung von SDS an Proteine erfolgt sehr regelmäßig, daher verhält sich die Menge der gebundenen Ladung in etwa proportional zur Größe des Proteins. Die elektrophoretische Auftrennung der nun stark negativ geladenen Proteine erfolgt so näherungsweise entsprechend ihrer molekularen Masse. Die Proteine werden zunächst ein- bis fünffach in denaturierendem Laemmlipuffer (2,5 ml Tris pH 8,8; 0,5 ml Glycerin; 1 ml Mercaptoethanol; 4 ml 10 %iges SDS; Bromphenolblau, ad 10 ml ddH₂O) aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini Protean 3 Cell von Bio-Rad (München, Deutschland). Als Laufpuffer diente SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS), ein kombiniertes Tris-Glycin-System. Im Sammelgel

liegt ein pH-Wert von 6,8 vor. Hier liegen die Glycin-Ionen näherungsweise ungeladen vor und wandern sehr langsam Richtung Anode. Die Chlorid-Ionen des Puffers laufen dagegen schnell zur Anode, so dass ein elektrischer Feldstärkegradient entsteht in dem die negativ geladenen Proteine in Richtung des engmaschigen Trenngels laufen. Dadurch wird eine Konzentrierung der Proteine an der Trenngelfront erreicht, und die Auflösung im Trenngel wird erheblich verbessert. Die Glycin-Ionen vom Sammelgel (pH = 6,8) erhalten im basischen Trenngel (pH = 8,8) eine negative Ladung und wandern dort schneller als die Proteine zur Anode. Kleine Proteine wandern im Vergleich zu größeren Proteinen schneller durch die engmaschigen Vernetzungen des Polyacrylamidgels und werden so nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Als Größenstandard wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, Deutschland) verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem 11 %igen Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel. Die Prozentigkeit des Trenngels richtete sich nach den Molekulargewichten des aufzulösenden Proteingemisches. Zur Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten gereinigt und in den Gießstand eingesetzt. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (ca. 2 cm unter die Oberkante der kleinen Glasplatte) und mit ddH₂O überschichtet. Nach der Polymerisierung der Gelmatrix wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel aufgegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Gele konnten nach etwa 45 Minuten Polymerisierung verwendet werden. Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte bei 150 V, für 10 Minuten und im Trenngel bei 180 V für 45 Minuten. In Tabelle 2.5 sind die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels aufgelistet. Dieser Ansatz ist ausreichend für 2 Gele à 10 x 15 cm.

Tab. 2.6: Zusammensetzung der Sammel-/Trenngele für die SDS-PAGE

	4 %iges Sammelgel	11 %iges Trenngel
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	-
1 M Tris pH 8,8	-	3,75 ml
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	0,7 ml	3,7 ml
10 % SDS	100 µl	200 µl
10 % TEMED	200 µl	200 µl
10 % APS	40 µl	40 µl
ddH₂O	2,71 ml	2,11 ml

2.3.3 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau R-250

Die Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau R-250 ist eine Standardmethode zum Nachweis von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel [98]. Coomassie-Brilliantblau R-250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an basische Seitenketten von

Proteinen (Arginin, Histidin und Lysin) anlagert. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine in der PAGE wurde das Gel für 20-30 Minuten in Coomassie-Brilliantblau R-250-Färbelösung unter ständiger Bewegung auf dem Schwenker (ST5 CAT, Neo Lab) inkubiert. Anschließend erfolgte für weitere 20 Minuten die Inkubation in Fixierlösung und die Entfärbung des unspezifischen Hintergrundes über Nacht in ddH₂O. Das Gel konnte bis zum Trocknen in ddH₂O gelagert und zur Dokumentation fotografiert werden. Für die endgültige Konservierung wurde es für etwa 3 Tage zwischen 2 Cellophanfolien, die mit einem Rahmen und einer Rückwand (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingespannt wurden, mit 300 µl Trocknerlösung getrocknet.

Färbelösung:	10 % Essigsäure 25 % Isopropanol 0,05 % Coomassie-Brilliantblau R-250
Fixierlösung:	10 % Essigsäure 40 % Methanol
Trocknerlösung:	10 % Glycerin 20 % ml Ethanol

2.3.4 Immunochemischer Nachweis von Proteinen im Western Blot

Der Western Blot ist eine sehr sensitive Methode, um Proteine nachzuweisen [99]. Bis zu 1 ng Protein pro Bande können detektiert werden. Das Proteingemisch wird elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (blotting). Die Membran wird anschließend mit einem primären Antikörper inkubiert, welcher spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet. Die Detektion erfolgt über einen Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper, welcher den primären Antikörper bindet. Durch das gekoppelte Enzym wird eine Farbreaktion an der Position auf der Membran katalysiert, an der sich das zu detektierende Protein befindet. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Whatman, GE Healthcare) erfolgte mit dem Semidry Blot-System unter Verwendung der Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell von Bio-Rad (München, Deutschland). Hierfür wurden 2 Filterpapiere (GB003, Whatman, GE Healthcare) in Anodenpuffer I, 1 Filterpapier in Anodenpuffer II und 3 Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt und in dieser Reihenfolge übereinander auf die Anode gestapelt. Die Nitrozellulose-Membran wurde ebenfalls in Anodenpuffer II getränkt und zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen den in Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren fixiert. Der Transfer erfolgte bei 22 V, 150 mA für 15 min.

Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung geschwenkt (ST5 CAT, Neo Lab, Heidelberg, Deutschland). Am nächsten Tag erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (anti-GST IgG; Immunisierungswirt: Ziege; GE Healthcare, Deutschland) in einer 1:10000 Verdünnung mit Blockierungslösung. Anschließend folgten 3 Waschschritte für jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer. Danach wurde die Membran für 1 Stunde mit dem sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper (anti-Ziege IgG HRPO; Immunisierungswirt: Kaninchen; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:5000 mit Blockierungslösung inkubiert. Abschließend folgten 2 Waschschritte für jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer. Das Substrat zur Detektion der Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper war DAB (Diaminobenzidin). Die Detektion des Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit Hilfe des DAB-Enhanced Liquid Substrate System von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zu Dokumentationszwecken wurde der Blot fotografiert.

- Anodenpuffer 1:** 300 mM Tris
20 % Methanol
- Anodenpuffer 2:** 25 mM Tris
20 % Methanol
- Kathodenpuffer:** 25 mM Tris
40 mM Aminocapronsäure
0,01 % SDS
- PBS-Puffer:** 140 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,4
- Blockierungslösung:** 0,5 % Tween 20
1 % Magermilchpulver
1 % Rinderserumalbumin
in PBS-Puffer
- Waschpuffer:** 0,5 % Tween 20
in PBS-Puffer

2.3.5 Proteinexpression und Proteinreinigung

2.3.5.1 Rekombinante Produktion von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E. coli*

pGEX-Vektoren ermöglichen die Expression des Zielproteins als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag. Zusätzlich wird in Abhängigkeit vom gewählten Vektor zwischen GST und dem Zielprotein eine Thrombin- oder PreScission-Proteaseschnittstelle eingefügt, die nach Reinigung die Spaltung des GST vom Zielprotein erlaubt. Das Gen A1S_2846, welches für die β -Untereinheit der SR aus *A. baumannii* kodiert, wurde in den Vektor pGEX-6P-3 (GE Healthcare, Deutschland) kloniert. Der Genlocus A1S_2846 wurden durch PCR mit den entsprechenden forward und reverse Primern (Tab. 2.3) amplifiziert und dabei die jeweiligen Schnittstellen für die Klonierung an das Fragment angefügt. Der Genlocus A1S_2846 wurde im Leserahmen an das 3'-Ende des GST-Gens kloniert, welches unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors (*ptac*) steht. In Abwesenheit des Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ist der Promotor durch den *lacI*-Repressor blockiert. Zugabe von IPTG induziert die Expression des Fusionsproteins durch Inaktivierung des Repressors. Als Klonierungsstamm und zur Plasmidanreicherung wurde das resultierende Plasmid SR_6P-3 (Tab. 2.4) in *E. coli* TOP 10 transformiert. Durch Sequenzierung wurde das Plasmid SR_6P-3 überprüft und dann für die heterologe Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* transformiert, dessen endogene RNA-Polymerase an den *ptac*-Promotor bindet und die Transkription durchführt. Zwischen dem GST-Tag und dem Zielprotein befindet sich eine PreScission-Proteaseschnittstellen in pGEX-6P-3, welche die Abspaltung des GST-Tag vom Zielprotein erlaubt. Für die Expression rekombinater Proteine wurde eine Einzelkolonie der transformierten *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* in 3 ml 2YT-Medium über Nacht bei 20°C und 200 RPM angezogen. Am nächsten Tag wurden mit der Übernachtskultur 100 ml frisches 2YT-Medium im Verhältnis 1:50 beimpft und ebenfalls bei 20°C und 200 RPM inkubiert. Bei einer OD₅₉₅ von 0,7 wurde die Proteinexpression durch Zugabe einer finalen Konzentration von 0,5 mM IPTG induziert und die Kultur bei 20°C weiter inkubiert. Nach 4 Stunden erfolgte die Zellernte für 20 Minuten bei 10000 x g und 4°C (Beckman Avanti J25, Rotor JA2550, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet sofort aufgeschlossen oder bei -80°C gelagert. Mittels SDS-PAGE fand die Prüfung der Überexpression des Fusionsproteins statt.

2.3.5.2 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4°C mit Hilfe der French Press (EmulsiFlex-C3 von Avestin, Ontario, Kanada). Hierzu wurde das Zellpellet in 7 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Feuchtgewicht der Zellen resuspendiert. Der Aufschlusspuffer enthielt zusätzlich noch Dithiothreitol (DTT). DTT schützt vor inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zwischen den Thiolgruppen von Cystein-Seitenketten. Dieses musste aufgrund seiner geringen Halbwertszeit frisch hergestellt und dem Aufschlusspuffer hinzugegeben werden (1 mM DTT). Lysozym hydrolysiert die N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminbindung der Peptidoglykanschicht in Bakterienzellwänden und sorgt für einen effektiveren Zellaufschluss. Die *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* Zellen verfügen über eigenes Lysozym, daher musste dieses nicht separat hinzugefügt werden. Mechanische Scherkräfte der EmulsiFlex-C3 (Avestin) unterstützen die Effizienz der Lyse und die Zellsuspension wurde in mehreren Zyklen durch Hochdurchhomogenisation bei 1000 bar physikalisch aufgeschlossen. Um Zellfragmente und unlösliche Proteine abzutrennen wurde abschließend 20 Minuten bei 4°C mit 20000 x g zentrifugiert (Beckman Avanti J25, Rotor JA2550 in Oak Ridge PCO 50 ml Zentrifugenröhrchen, Thermo Scientific Nalgene, Langenselbold, Deutschland). Der klare Überstand mit dem löslichen überexprimierten Protein wurde zur weiteren Reinigung verwendet.

PBS-Puffer: 140 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Aufschlusspuffer: 1 mM DTT
in PBS-Puffer

2.3.5.3 GST-Affinitätsreinigung

Für die GST-Affinitätsreinigung im Anschluss an den Zellaufschluss wurde die GSTrap FF, 1 ml von GE Healthcare (Deutschland) eingesetzt. Diese besitzt eine Bindekapazität von bis zu 11 mg Fusionsprotein pro Säulenmatrix bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die GST-Affinitätsreinigung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Dazu wurde das Rohlysat zunächst steril filtriert (Minisart Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Säule wurde von Ethanol befreit und mit 5 CV Bindungspuffer

equilibriert. Im Anschluss erfolgte die Beladung der Säule mit dem steril filtrierten Rohlysat. Das Herauswaschen nicht gebundener unspezifischer Proteine wurde mit 7 CV Bindungspuffer durchgeführt. Abschließend erfolgte die Elution des Fusionsproteins mit Hilfe von 10 mM reduziertem Glutathion durch 7 CV Elutionspuffer. Die Reinheit des Fusionsproteins konnte in der SDS-PAGE überprüft werden.

Bindungspuffer: 1 mM DTT
in PBS-Puffer

Elutionspuffer: 10 mM GSH (reduziert)
in Bindungspuffer

2.3.5.4 Spaltung des GST-Fusionsproteins

Nach der Affinitätsreinigung erfolgte die Abspaltung des GST-Tags durch einen Proteaseverdau. Der Verdau erfolgte bei Fusionsproteinen, die aus pGEX-6P-3-Konstrukten mit der PreScission-Protease-Schnittstelle gereinigt wurden, über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsrad. Hier wurden 1 U PreScission-Protease (2 U/µl, GE Healthcare, 46 kD) pro 100 µg Fusionsprotein eingesetzt. Bei erfolgter Spaltung entstanden das Tag-freie Zielprotein und das 26 kD große GST. Die Effizienz der Spaltung konnte mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft werden.

2.3.5.5 Pufferaustausch von Proteinlösungen

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe einer PD10-Säule (GE Healthcare, Deutschland) und basiert auf dem Prinzip der Gelfiltration. Die Säule ist mit dem Makromolekülmaterial Sephadex G-25 gefüllt, welches als Molekularsieb wirkt und den Pufferaustausch bei Proteinlösungen bis zu einem Volumen von 2,5 ml erlaubt. Der Austausch des Puffers erfolgt dadurch, dass größere Moleküle wie Proteine im Ausschlussvolumen des Säulenmaterials eluieren, während die kleineren Moleküle wie Salze in den Poren des Gelfiltrationsmaterials zurückgehalten werden und später eluieren. Die Verwendung der PD-10-Säule fand nach Angaben des Herstellers statt. Dazu wurde die Säule mit 25 ml Puffer A equilibriert. Im Anschluss wurden 600 µl Probe aufgetragen und mit 1,9 ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte letztlich mit 3,5 ml des gleichen Puffers.

Puffer A: 20 mM NaCl
150 mM Tris
1 mM DTT
pH 7,4

2.4 Herstellung polyklonaler Antiseren

Das durch Affinitätschromatographie gereinigte Protein mit GST-Tag wurde in Elutions-Puffer mit einer Konzentration von 1,7 µg/µl zur Immunisierung im Kaninchen an die Firma Pineda Berlin versandt. Die Immunisierung wurde nach dem Protokoll in Tabelle 2.7 durchgeführt. Das zugesandte Serum wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Nach 30 Tagen erfolgte eine erste Blutentnahme und das gewonnene Serum wurde im Western Blot analysiert. Das Präimmunserum diente als Negativkontrolle und als Probe wurde das gereinigte Protein mit GST-Tag eingesetzt.

Tab. 2.7: Basisprotokoll für 2 Immunisierungsmonate eines Kaninchens der Firma Pineda Berlin

Tag	Maßnahme	Immunisierung mit
1	Abnahme Präimmunserum Primärimmunisierung, intradermal	Protein in komplettem Freund'schen Adjuvans
20	1. Injektion, subcutan	Protein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans
30	1. Blutentnahme (Serentestung) 2. Injektion, subcutan	Protein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans
40	3. Injektion, subcutan	Protein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans
61	2. Blutentnahme	

2.5 Motilitäts-Assay

Für alle SR-Mutanten und deren Wildtypen wurden Motilitäts-Tests durchgeführt, um die Motilität der SR-Mutanten auf Motilitäts-Medium (0,5 % Agarose) zu untersuchen [54]. Für die Motilitäts-Assays wurde zunächst die Agaroseschicht viermal mit Bakterien punktiert. Dabei ist darauf zu achten, dass bis an den Boden der Petrischale punktiert wird, um sowohl Wachstum an der Agaroseoberfläche als auch an der Grenzfläche zwischen Plattenboden und Agarose (Interphase) zu ermöglichen. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen, um der Austrocknung vorzubeugen und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Analyse und Dokumentation der Ergebnisse erfolgte am nachfolgenden Tag.

Motilitäts-Medium: 0,5 % Trypton
0,25 % NaCl
0,5 % Agarose
pH 7,4

2.6 Wachstumstests auf Minimalmedium

Die Sulfit-Reduktase (SR) aus *A. baumannii* ist ein Enzym, welches Sulfit (SO_3^{2-}) zu Sulfid (H_2S) reduziert. Sie erzeugt also H_2S , was als Schwefelquelle zur Synthese von Cystein und Methionin dient, zweier wichtiger Aminosäuren im Stoffwechsel von *A. baumannii*. In den SR-Mutanten ist die SR ausgeschaltet, daher sind diese nicht mehr in der Lage H_2S als Schwefelquelle für den Cystein-Methionin-Metabolismus herzustellen. Zur Charakterisierung der SR-Mutanten wurde ein H_2S - und Cystein-freies Minimalmedium getestet. Als Minimalmedium wurde das modifizierte Simmons-Medium [100] ohne Indikator, mit Succinat als Kohlenstoffquelle und ohne H_2S oder Cystein als Schwefelquelle eingesetzt. Die Wildtypen und SR-Mutanten von *A. baumannii* wurden in einem Impfstrich auf das Minimalmedium aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung und Dokumentation der Agarplatten.

Simmons-Medium:	0,1 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
	0,1 % KH_2PO_4
	0,5 % NaCl
	0,02 % MgSO_4
	0,5 % Succinat
	1,5 % Difcoagar
	pH 6,9

2.7 Biofilm-Assay

Der Begriff Biofilm beschreibt eine komplexe Struktur von Mikroorganismen, die innerhalb einer extrazellulären polymeren Matrix (EPS = extrazelluläre polymere Substanz) eingeschlossen sind und sich auf einer biologischen oder auch nicht-biologischen Grenzfläche ansammeln [42]. Biofilmbildung konnte schon in einigen *Acinetobacter*-Arten, unter anderem in *A. baumannii*, beobachtet werden [43, 44]. Dabei sammeln sich die Bakterienzellen an der Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase und bilden eine sogenannte Kahmhaut (Pellicel) auf der Oberfläche des Nährmediums aus. Im Biofilm-Assay wurden alle Wildtypen mit ihren zugehörigen SR-Mutanten analysiert. Dazu wurde eine Flüssigkultur von 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie des jeweiligen Isolats beimpft. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur für 72 Stunden ohne Bewegung (ohne Schütteln) inkubiert. Zur Auswertung und Dokumentation wurde der Ansatz fotografiert.

2.8 Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration (MHK)

Die Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK; *engl.*: MIC für Minimal Inhibitory Concentration) wurde mit Hilfe der MIC Test-Streifen-Methode von Liofilchem (Bestbion dx GmbH, Köln, Deutschland) durchgeführt. Dabei wird diejenige Konzentration eines Antibiotikums bestimmt, die das Wachstum eines Bakterienstammes gerade noch hemmt. Die MIC Test-Streifen-Methode ist eine quantitative Methode zur Bestimmung der MHK von antimikrobiellen Substanzen gegen bestimmte Erreger und für die Untersuchung von Resistenzmechanismen. MIC Test-Streifen sind spezielle Papierstreifen, imprägniert mit einem definierten Konzentrationsgradienten eines Antibiotikums über 15 zweifache Verdünnungsstufen. Auf der Rückseite des Streifens befinden sich eine entsprechende MHK-Skala in $\mu\text{g/ml}$ und ein Code für die jeweilige antimikrobielle Substanz. Die zur Bestimmung der MHK eingesetzten Antibiotika sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Legt man den MIC Test-Streifen auf eine inokulierte Agaroberfläche, wird der vorgeformte exponentielle Gradient der antimikrobiellen Substanz sofort auf die Agarmatrix übertragen. Nach 18-stündiger Inkubation wird entlang des Streifens eine symmetrische Hemmellipse gebildet. Die MHK wird direkt von der Skala in $\mu\text{g/ml}$ an dem Punkt abgelesen, an dem die Hemmellipse den MIC Test-Streifen schneidet. Die Testdurchführung erfolgte in Anlehnung an die Herstellerangaben. Hierzu wurde zunächst eine Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterien 1:100 verdünnt. 2 ml dieser Suspension wurden auf eine Agarplatte LB-Medium gegeben, der Überschuss an Suspension wurde mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Vor dem Auflegen des Test-Streifens musste sichergestellt werden, dass die Plattenoberfläche getrocknet und frei von Flüssigkeit war. Der Streifen wurde im Anschluss mit der Skala nach oben auf die inokulierte Agaroberfläche aufgelegt und mit einer sterilen Pinzette angedrückt. Dabei ist darauf zu achten, dass dieser auf der ganzen Länge aufliegt und nach Kontakt mit dem Agar nicht mehr verschoben wird. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Die Auswertung und Dokumentation fand am nächsten Tag statt.

Tab. 2.8: Übersicht verwendeter Antibiotika für die MHK-Bestimmung

Antibiotikum	Code	$\mu\text{g/ml}$
Ampicillin	AMP	0,016 - 256
Gentamicin	CN	0,016 - 256
Imipenem	IMI	0,002 - 32
Levofloxacin	LEV	0,002 - 32
Nalaidixinsäure	NA	0,016 - 256
Tetracyclin	TET	0,016 - 256

2.9 *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Die Analyse der Virulenz der SR-Mutanten und ihrer zugehörigen Wildtypen erfolgte durch das *Galleria mellonella*-Infektionsmodell. Die *Galleria mellonella*-Raupen (Wachsmottenlarve) wurden von Reptilienkosmos.de, Niederkrüchten, Deutschland bezogen. Die Infektionsversuche fanden nach Peleg et al. (2009) statt [101]. Dazu wurde für jedes Isolat eine Kultur von 3 ml LB-Medium angesetzt und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension 1:25 mit 3 ml frischem LB-Medium verdünnt und nochmals 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert, um Bakterien der logarithmischen Phase zu erhalten. Danach folgte die Zellenernte durch Zentrifugation und die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen. Für das Inokulum der Isolate mit zugehörigen Mutanten wurde eine OD₅₉₅ von 1,0 (entspricht 10⁸ Zellen) mit PBS-Puffer eingestellt. Das Inokulum der Isolate 102/07 und 30011, mit jeweiligen SR-Mutanten, ATCC 17978 und Mutante 179 (alt und neu) wurde 1:5 verdünnt. Die Isolate 30011 und ATCC 17978 zeigten bereits im Biofilm-Assay eine vermehrte Biofilmbildung. Weiterhin kam es zu Problemen bei der Einstellung der Zellzahl (OD₅₉₅), was unter anderem auf eine starke Wechselwirkung und Bindung (Adhärenz) der Bakterienzellen an die Oberfläche der Standard-Reaktionsgefäße zurückzuführen ist. Für den Wildtyp und die Mutante der Isolate 30011, ATCC 17978 und Mutante 179 (alt und neu) kamen daher LoBind Tubes der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zum Einsatz, da hier die Anlagerung der Probe an die Kunststoffoberfläche verringert werden konnte. Jeder Versuch wurden mit Gruppen von 16 *Galleria mellonella*-Raupen pro Isolat und zwei Kontrollgruppen durchgeführt, eine mit PBS inokulierte und eine nicht inokulierte Kontrollgruppe. Es wurden 5 µl Inokulum des jeweiligen Isolats in das letzte rechte Bauchbein der einzelnen Raupen injiziert. Die Inkubation der Raupen erfolgte fünf Tage bei 37°C. Dabei wurden die einzelnen Tiere hinsichtlich ihrer Vitalität beobachtet. Jeden Tag fand die Dokumentation der gestorbenen Tiere statt. Die Ergebnisse wurden nicht verwendet, wenn mehr als zwei tote Raupen in den Kontrollgruppen innerhalb von fünf Tagen zu finden waren. Zur statistischen Absicherung wurden drei unabhängige Infektionsversuche durchgeführt.

PBS-Puffer: 140 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄
 1,8 mM KH₂PO₄
 pH 7,4

3 Ergebnisse

3.1 Inaktivierung der Sulfit-Reduktase in *A. baumannii*

Um die Rolle der β -Untereinheit der Sulfit-Reduktase (SR) in *A. baumannii* hinsichtlich Motilität, Virulenz und Resistenz zu charakterisieren, wurde das für die β -Untereinheit kodierende Gen (A1S_2846) in vier natürlich kompetenten *A. baumannii*-Isolaten inaktiviert. Dazu wurde genomische DNA der SR-defizienten Mutante 179 (ATCC 17978) über natürliche Kompetenz in die Isolate 95/07, 96/10, 102/07 und 30011 transformiert (Abschnitt 2.2.13.4). Bestätigt wurde die Inaktivierung mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer SR_for und SR_rev. Das PCR-Produkt wurde auf 1 %iger Agarose gelelektrophoretisch analysiert. Die erwartete Größe der amplifizierten PCR-Produkte der Wildtypen betrug etwa 1200 bp. Auf Grund der eingebrachten Kanamycinkassette (1200 bp) wurden für die vier Mutanten ein PCR-Amplifikat von etwa 2400 bp erwartet. Die Ergebnisse der Kolonie-PCR sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Für alle Wildtypen der klinischen Isolate konnte ein PCR-Produkt von etwa 1200 bp amplifiziert werden. Das PCR-Produkt der entsprechenden Mutanten betrug wie erwartet etwa 2400 bp.

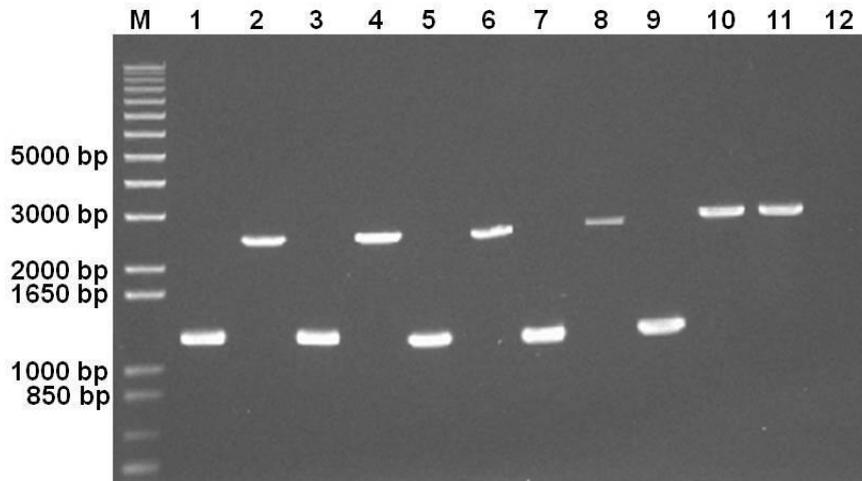


Abb. 3.1: Kolonie-PCR der Inaktivierung der SR auf 1 %igen Agarosegel

M: Molekularer Größenstandard; **Spur 1:** 95/07 Wildtyp; **Spur 2:** 95/07 Mutante; **Spur 3:** 96/10 Wildtyp; **Spur 4:** 96/10 Mutante; **Spur 5:** 102/07 Wildtyp; **Spur 6:** 102/07 Mutante; **Spur 7:** 30011 Wildtyp; **Spur 8:** 30011 Mutante; **Spur 9:** ATCC 17978; **Spur 10:** Mutante 179 alt; **Spur 11:** Mutante 179 neu; **Spur 12:** Negativkontrolle (H₂O-Probe)

Um den Mutationseffekt der Mutante 179 der Transposon-Mutagenese zu bestätigen, wurde die Mutante 179 (ATCC 17978) erneut konstruiert. Im Gegensatz zu den klinischen Isolaten ist der Stamm ATCC 17978 nicht natürlich kompetent. Deswegen wurde die genomische DNA der Mutante 179 mittels Elektroporation in die elektrokompenten Zellen des Stammes ATCC 17978 transformiert

(Abschnitt 2.2.13.2). Das Ergebnis der anschließenden Kolonie-PCR ist in Abbildung 3.1 Spur 11 dargestellt. Für diese Mutante, welche nachfolgend als neue Mutante 179 bezeichnet wird, konnte ebenfalls ein PCR-Produkt von etwa 2400 bp amplifiziert werden. Die Mutante 179 der Mutantenbibliothek [54] wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als alte Mutante 179 bezeichnet. Das Ergebnis der Kolonie-PCR bestätigt die erfolgreiche Inaktivierung der β -Untereinheit der SR in den vier verschiedenen Isolaten und der neu konstruierten Mutante 179. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Rekonstruktion der alten Mutante 179 aus dem Stamm ATCC 17978 durch Elektroporation mit genomischer DNA.

3.2 Motilitäts-Assay

Um den Einfluss der SR auf die Motilität von *A. baumannii* zu bestimmen, wurden Motilitäts-Tests mit den unterschiedlichen Wildtypen und den jeweiligen SR-Mutanten auf halbfestem Motilitätsmedium (0,5 % Agarose) durchgeführt (Abschnitt 2.5). Die Ergebnisse der Motilitäts-Tests der einzelnen SR-Mutanten und der zugehörigen Wildtypen sind in Abbildung 3.2 A-F dargestellt. Hier wurde jede Agaroseplatte viermal mit dem gleichen Isolat punktuell inokuliert. Die Isolate zeigen zwei unterschiedliche Arten der Motilität auf den Agaroseplatten: zum einen das Wachstum auf der Agaroseoberfläche (weißer Pfeil) und zum anderen die Ausbildung einer Interphase am Plattenboden zwischen Agarose und dem Boden der Petrischale (schwarzer Pfeil) (Abb. 3.2). Die Fähigkeit zur Motilität variierte je nach Isolat sehr stark. Für die einzelnen Isolate wurden unterschiedliche Eigenschaften innerhalb der Motilitäts-Tests beobachtet. Die SR-Mutanten der Isolate 95/07 und 96/10 verhielten sich ähnlich wie ihre Wildtypen (Abb. 3.2 A, B). Bei diesen Isolaten wurde Motilität an der Agarose-Oberfläche und die Ausbildung einer Interphase beobachtet. Hier konnten keine Unterschiede der Motilitätseigenschaften zwischen Wildtypen und Mutanten beobachtet werden. Hingegen zeigten die SR-Mutanten der Isolate 102/07 und 30011 sogar eine größere Oberflächenmotilität als ihre Wildtypen (Abb. 3.2 C-D). Diese Mutationseffekte von Isolat 30011 und 102/07 variierten allerdings innerhalb unabhängiger Experimente und waren nicht reproduzierbar. Der Wildtyp ATCC 17978 zeigte eine am stärksten ausgeprägte Motilität an der Agaroseoberfläche, bildete jedoch keine Interphase (Abb. 3.2 E, F). Im direkten Vergleich zum Wildtyp zeigte die alte Mutante 179 als einzige Mutante einen erheblichen Defekt der Oberflächenmotilität (Abb. 3.2 E). Interessanterweise, konnte dieser Motilitätsdefekt bei der neuen Mutante 179 nicht beobachtet werden, diese verhielt sich wie der Wildtyp ATCC 17978 (Abb. 3.2 F).

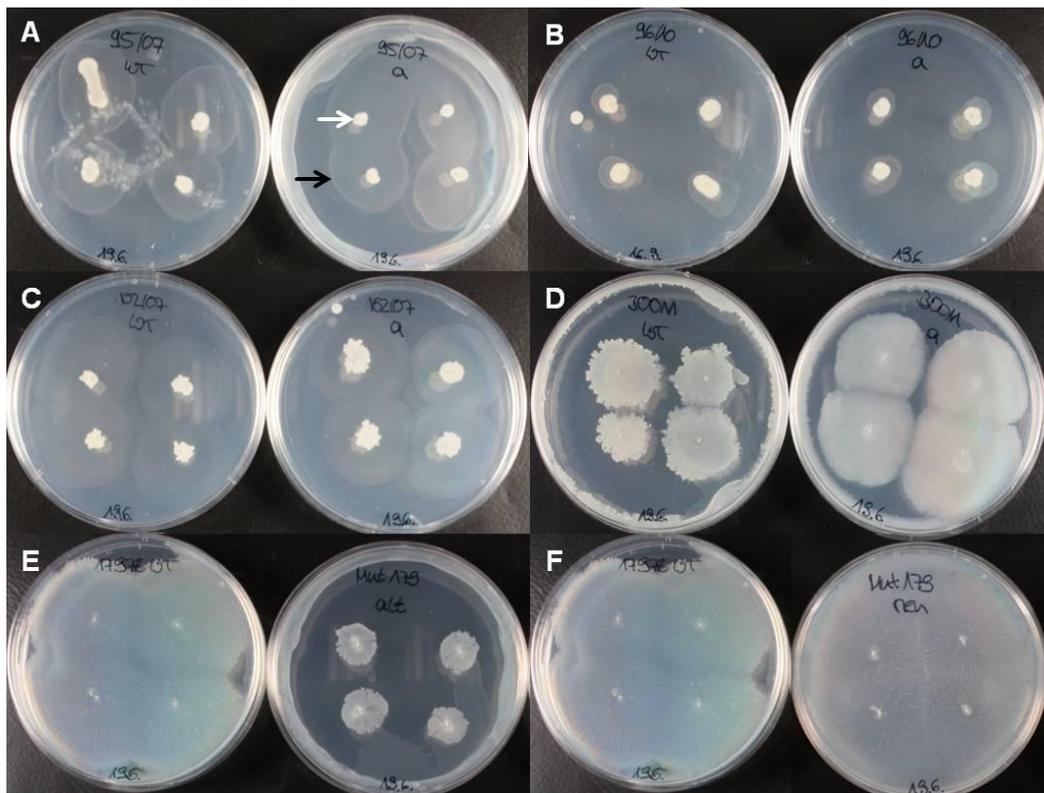


Abb. 3.2: Motilitäts-Tests der Isolate auf Motilitäts-Medium

A: links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07; **B:** links Wildtyp 96/10, rechts Mutante 96/10; **C:** links Wildtyp 102/07, rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011, rechts Mutante 30011; **E:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 alt; **F:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 neu; weißer Pfeil kennzeichnet Oberflächenmotilität; schwarzer Pfeil kennzeichnet Interphase; Agaroseplatten wurden viermal mit jeweiligen Isolat inokuliert

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Motilitätsdefizite, die auf die Inaktivierung der SR zurückzuführen sind, nur bei der alten Mutante 179 beobachtet werden konnten. Durch die Motilitäts-Tests wurde daher kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Fehlen der SR und der Motilität der unterschiedlichen *A. baumannii*-Isolate ermittelt.

3.2.1 Kompensation von Motilitätsdefekten der Mutanten durch Supplementierung

In dieser Arbeit wurde die β -Untereinheit der SR in den einzelnen *A. baumannii*-Isolaten inaktiviert. Die SR ist ein Enzym, welches Sulfit (SO_3^{2-}) zu Sulfid (H_2S) reduziert. Daher sollten die SR-Mutanten nicht mehr in der Lage sein, H_2S zu produzieren. Dieser Stoffwechseldefekt geht bei der alten Mutante 179 im Vergleich zum Wildtyp ATCC 17978 mit einem Motilitätsdefekt einher (Abschnitt 3.2). Durch Zugabe von H_2S zum Motilitätsmedium müsste dieser Defekt kompensiert werden können und die alte Mutante 179 sollte wieder eine ähnliche Beweglichkeit auf dem Motilitätsmedium zeigen wie ihr Wildtyp ATCC 17978. Der Versuch zur Kompensation der Motilitätsdefekte der Mutanten der einzelnen *A. baumannii*-Isolate durch

Supplementierung wurde mit dem H₂S-Donor NaHS (Natriumhydrogensulfid) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 A-F dargestellt. Nur für die alte Mutante 179 wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 17978 eine geringere Oberflächenmotilität ermittelt (Abschnitt 3.2). Diese Beweglichkeit auf der Agaroseoberfläche konnte nun durch Zugabe des H₂S-Donors NaHS zum Nährmedium teilweise wieder hergestellt werden (Abb. 3.3 E).

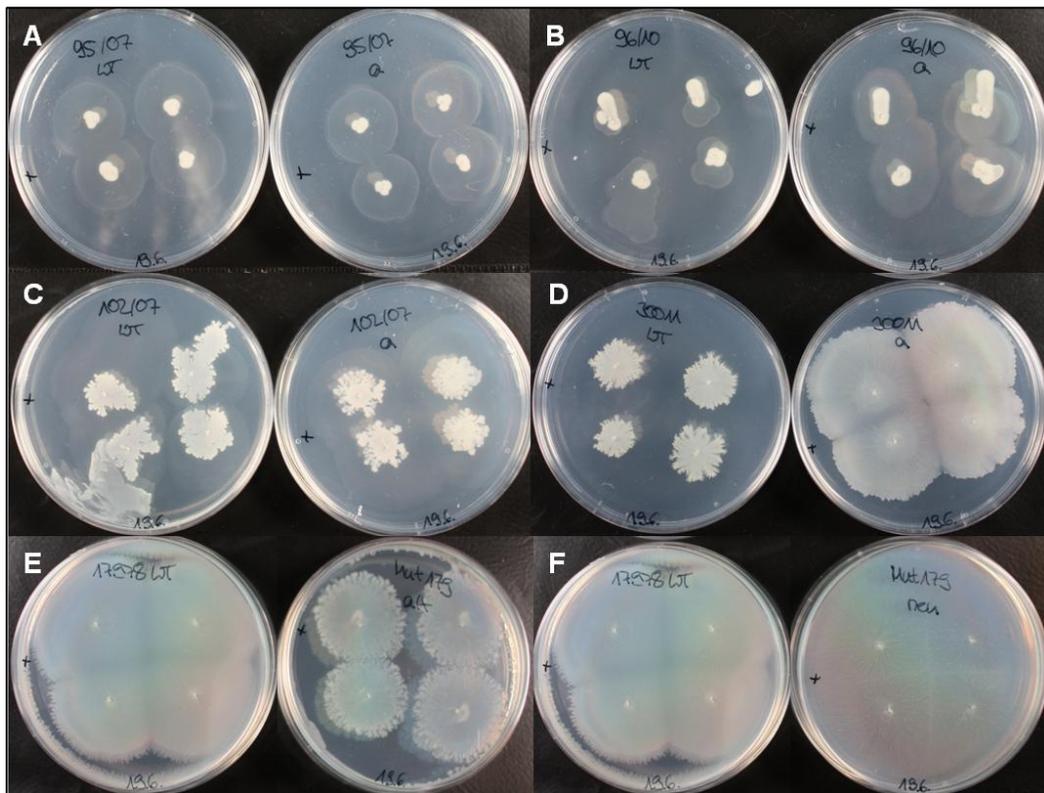


Abb. 3.3: Kompensation von Motilitätsdefekten durch den H₂S-Donor NaHS auf Motilitäts-Medium
A: links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07; **B:** links Wildtyp 96/10, rechts Mutante 96/10; **C:** links Wildtyp 102/07, rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011, rechts Mutante 30011; **E:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 alt; **F:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 neu; Agaroseplatten wurden viermal mit jeweiligen Isolat inokuliert

Durch die Motilitätstestung der anderen Isolate konnten keine Motilitätsdefizite der jeweiligen Mutanten ermittelt werden (Abschnitt 3.2). Eine Kompensation der Motilitätsdefekte der SR-defizienten Mutanten der natürlich kompetenten Isolate durch den H₂S-Donor konnte daher auch nicht beobachtet werden (Abb. 3.3 A-D, F). Für den Wildtyp und die Mutante des Isolats 102/07 wurde aber eine stärker ausgeprägte Motilität an der Agaroseoberfläche durch den H₂S-Donor analysiert (Abb. 3.3 C). Die Mutante des Isolats 30011 zeigte wie im Motilitäts-Test eine erhöhte Oberflächenbeweglichkeit im Vergleich zu ihrem Wildtyp (Abb. 3.3 D). Alle anderen Isolate und die neu konstruierte Mutante 179 zeigten durch den H₂S-Donor keine Veränderung hinsichtlich ihrer Motilität (Abb. 3.3 F).

3.3 Charakterisierung der Mutanten auf Minimalmedium

Die Charakterisierung der Mutanten auf Minimalmedium erfolgte mit Hilfe von Wachstumstests (Abschnitt 2.6). In den SR-Mutanten ist die SR ausgeschaltet, daher sollten sie nicht mehr in der Lage sein, H₂S als Schwefelquelle für den Cystein-Methionin-Metabolismus zu nutzen. Zur Charakterisierung der SR-Mutanten wurde ein H₂S- und Cystein-freies Minimalmedium getestet. Als Minimalmedium wurde das modifizierte Simmons-Medium [100] ohne Indikator, mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle und Sulfat als einziger Schwefelquelle eingesetzt. Die Wildtypen und SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate wurden in einem Impfstrich auf das Simmons-Minimalmedium aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dazu wurde eine Agarplatte halbiert und jeweils mit dem Wildtyp und der Mutante der einzelnen Isolate beimpft. Die Ergebnisse der Wachstumstests auf dem Simmons-Medium sind in Abbildung 3.4 A-F dargestellt.

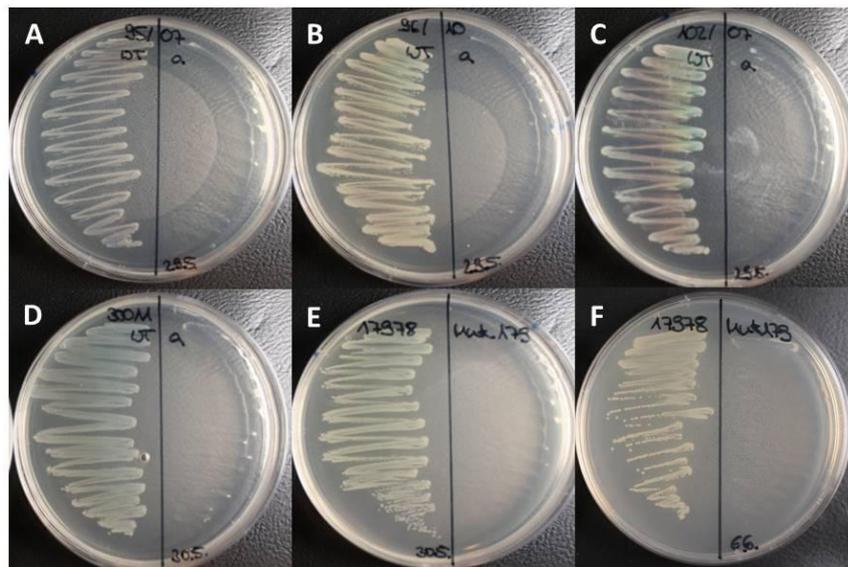


Abb. 3.4: Wachstumstests auf Simmons-Minimalmedium

A: links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07; **B:** links Wildtyp 96/10, rechts Mutante 96/10; **C:** links Wildtyp 102/07, rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011, rechts Mutante 30011; **E:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 alt; **F:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 neu

Alle Wildtypen der einzelnen Isolate mit einer funktionellen SR konnten auf dem Simmons-Medium kultiviert werden. Erwartungsgemäß waren die einzelnen Mutanten nicht in der Lage, auf dem Minimalmedium zu wachsen, da sie auf Grund der Inaktivierung der SR keinen Schwefel mehr assimilieren können. Das Simmons-Minimalmedium ist daher als Nachweismedium für die Kompensation der Wachstumsdefekte durch Supplementierung und für die genetische Komplementierung der SR-defizienten Mutanten von *A. baumannii* sehr gut geeignet.

3.3.1 Kompensation von Wachstumsdefekten der Mutanten durch Supplementierung

Die SR aus *A. baumannii* gehört zu den Oxidoreduktasen und reduziert Sulfit (SO_3^{2-}) zu Sulfid (H_2S). Die SR-Mutanten aus dieser Arbeit sind nicht mehr in der Lage H_2S zu synthetisieren. Die Kultivierung der Mutanten auf dem Simmons-Minimalmedium war ebenfalls nicht möglich, da diese ohne intakte SR keinen Schwefel mehr assimilieren können (Abschnitt 3.3). Durch Zugabe von Schwefel in Form von H_2S bzw. Cystein zum Minimalmedium sollten die Wachstumsdefekte kompensiert werden und den SR-Mutanten sollte es wieder möglich sein auf dem Minimalmedium zu wachsen. Zunächst sollte eine Kompensation der Wachstumsdefekte der SR-Mutanten durch Supplementierung des H_2S -Donor NaHS (Natriumhydrogensulfid) zum Simmons-Minimalmedium versucht werden. Dazu wurden die Wildtypen und SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate in einem Impfstrich auf das Simmons-Minimalmedium mit NaHS (1 mM) aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine Agarplatte wurde wieder halbiert und jeweils mit dem Wildtyp und der SR-Mutante der einzelnen Isolate beimpft. Die Ergebnisse diese Supplementierung mit dem H_2S -Donor NaHS sind in Abbildung 3.5 A-F dargestellt.

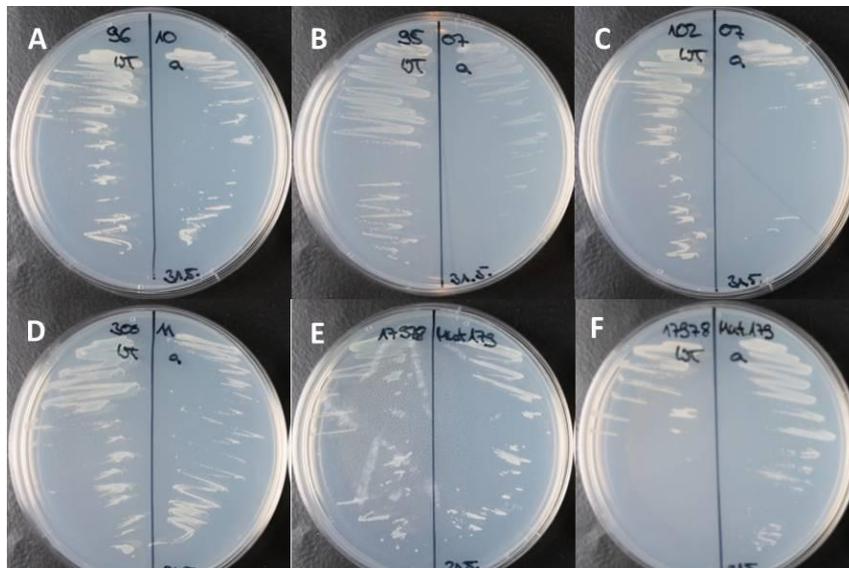


Abb. 3.5: Einfluss der NaHS-Supplementierung auf die Wachstumsdefekte der SR-Mutanten

A: links Wildtyp 96/07, rechts Mutante 96/07; **B:** links Wildtyp 96/10, rechts Mutante 96/10; **C:** links Wildtyp 102/07, rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011, rechts Mutante 30011; **E:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 alt, **F:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 neu

Die Wildtypen der *A. baumannii*-Isolate zeigten ein weniger deutliches Wachstum auf dem NaHS-angereicherten Minimalmedium im Vergleich zum NaHS-freien Medium (siehe auch Abb. 3.4). Es ist bekannt dass zu hohe Konzentrationen an H_2S toxisch wirken [102] und so die Wachstumshemmung der Wildtyp-Isolate erklärt werden kann.

Dem gegenüber waren die jeweiligen SR-Mutanten durch den H₂S-Donor erst in der Lage auf dem Minimalmedium zu wachsen. Durch die Zugabe des H₂S-Donors NaHS zum Simmons-Medium war es also möglich, die Wachstumsdefekte der SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate zu kompensieren.

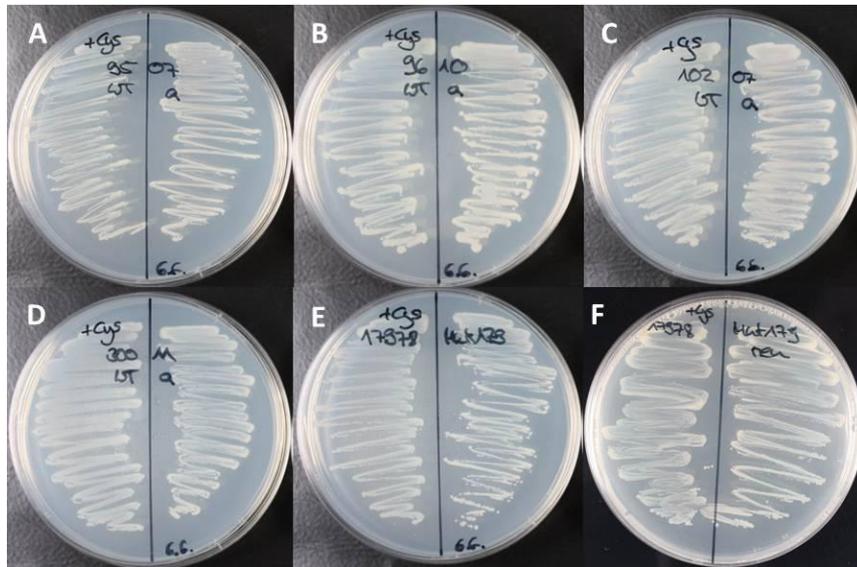


Abb. 3.6: Einfluss der Cystein-Supplementierung auf die Wachstumsdefekte der SR-Mutanten
A: links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07; **B:** links Wildtyp 96/10, rechts Mutante 96/10; **C:** links Wildtyp 102/07, rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011, rechts Mutante 30011; **E:** links ATCC 17978, rechts Mutante 179 alt

Die Kompensation der Wachstumsdefekte der SR-Mutanten der einzelnen *A. baumannii*-Isolate erfolgte weiterhin durch Zugabe von Cystein zum Simmons-Minimalmedium. Die Wildtypen und SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate wurden in einem Impfstrich auf das Simmons-Minimalmedium mit Cystein aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine Agarplatte wurde halbiert und jeweils mit dem Wildtyp und der SR-Mutante der einzelnen Isolate beimpft. Die Ergebnisse der Supplementierung mit Cystein sind in Abbildung 3.6 A-F dargestellt. Die Wildtypen der *A. baumannii*-Isolate konnten auf dem mit Cystein angereicherten Minimalmedium sehr gut kultiviert werden. Die einzelnen SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate zeigten auf dem mit Cystein angereicherten Minimalmedium ein ebenso gut ausgeprägtes Wachstum wie ihre jeweiligen Wildtypen. Durch Zugabe von Cystein zum Simmons-Minimalmedium war es demnach ebenfalls möglich, die Wachstumsdefekte der einzelnen SR-Mutanten zu kompensieren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kultivierung der SR-Mutanten auf dem Simmons-Minimalmedium nicht möglich war, da die Mutanten nicht mehr in der Lage waren Schwefel zu assimilieren. Dementsprechend war es durch Supplementierung mit dem H₂S-Donor NaHS oder Cystein möglich, die SR-Mutanten auf dem angereicherten

Minimalmedium zu kultivieren. Die SR katalysiert demnach die einzige H₂S-produzierende Reaktion im Stoffwechsel von *A. baumannii* und ist daher essentiell für die Schwefelassimilation.

3.4 Genetische Komplementierung von Mutationseffekten

3.4.1 Klonierung

Für die genetische Komplementierung der SR-Mutanten wurde das für die β -Untereinheit (A1S_2846) der SR kodierende Gen aus *A. baumannii* inklusive Promotor- und Terminatorregionen und des angrenzenden Genlocus A1S_2845 in den Vektor pWH1266 kloniert. Der angrenzende Genlocus A1S_2845 wurde zusätzlich in den Vektor kloniert, da er laut Datenbank (NCBI) noch als hypothetisches Protein beschrieben wird und sein Start-Codon im kodierenden Bereich des Genlocus A1S_2846 liegt. Für die Klonierung in den Vektor pWH1266 wurde das Primerpaar SR-pWH_for/SR-pWH_rev verwendet. Die Amplifizierung des etwa 3000 bp großen PCR-Produkts erfolgte an genomischer DNA von *A. baumannii* ATCC 17978. Zu Kontrollzwecken wurde ein Teil des Amplifikats auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.7). Über die Primer wurden Schnittstellen für BamHI eingeführt, welche der anschließenden Klonierung in den Vektor pWH1266 dienen. Der Vektor pWH1266 ist ein Shuttle-Vektor für *E. coli* und *Acinetobacter*, der bereits erfolgreich für genetische Komplementierungsexperimente eingesetzt wurde [54]. Im Anschluss an die Amplifizierung erfolgte der Restriktionsverdau des PCR-Produkts und des Vektors mit Hilfe des Restriktionsenzym BamHI. Der Vektor pWH1266 wurde zusätzlich noch dephosphoryliert. Die Ansätze des Restriktionsverdaus wurden auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen und die benötigten Banden aus dem Gel extrahiert. Die gereinigte DNA des Vektors und des Amplifikats wurde für die anschließende Ligation eingesetzt und das Ligationsprodukt zunächst in den Klonierungsstamm *E. coli* TOP10 transformiert. Das konstruierte Plasmid, welches die β -Untereinheit (A1S_2846) inklusive Promotor- und Terminatorregionen und den angrenzenden Genlocus A1S_2845 enthielt, wurde als pWH1266_SR bezeichnet. Zu Kontrollzwecken erfolgte im Anschluss an die Transformation in *E. coli* TOP 10 eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar SR-pWH_for/SR-pWH_rev. Danach wurde die Plasmidpräparation des konstruierten Plasmids pWH1266_SR aus einem positiven Transformanten durchgeführt. Das Konstrukt pWH1266_SR wurde für weitere Komplementierungsversuche in kompetente Zellen der alten Mutante 179 und der neu konstruierten Mutante 179 transformiert. Zusätzlich erfolgte die Transformation des konstruierten Plasmids pWH1266_SR noch in kompetente SR-Mutanten der

A. baumannii-Isolate 95/07 und 30011. Die Ergebnisse der Elektroporation wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft (Abb. 3.8). Die Abbildung 3.9 zeigt den kodierenden Bereich der β -Untereinheit (A1S_2846) inklusive Promotor- und Terminatorregionen und den des angrenzenden Genlocus A1S_2845 nach Klonierung in den Vektor pWH1266.

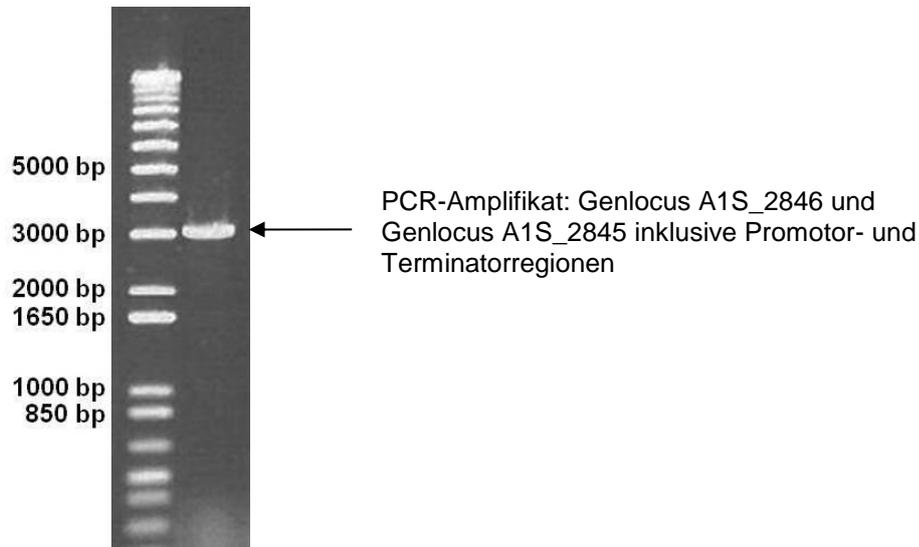


Abb. 3.7: PCR-Amplifikat der Genloci A1S_2846 und A1S_2845 inklusive Promotor- und Terminatorregionen auf 1 %igen Agarosegel; Pfeil kennzeichnet etwa 3000 bp großes PCR-Produkt

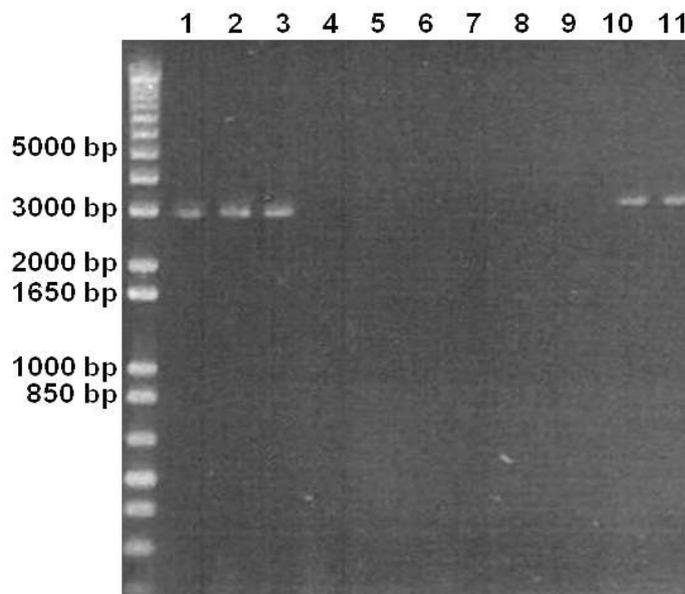


Abb. 3.8: PCR-Produkte der Kolonie-PCR nach Transformation in kompetente SR-Mutanten von *A. baumannii* auf 1 %igen Agarosegel; **Spur 1:** Mutante 95/07; **Spur 2:** Mutante 30011; **Spur 3:** Mutante 179 alt; **Spur 4:** Negativkontrolle; **Spur 5-9:** leer; **Spur 10:** Mutante 179 neu; **Spur 11:** Positivkontrolle.

```

1 BamHI
  ggatccgcat tggtaacaat cgtgacagtt taccgaactt gtccacgta ccagctgtaa aaattgggtg tccctggtta ggtggttcta tttctaactg aggtaatgct atgtttgtg
121 gtgcaactca agataactac atccgtgctt ttaacgtaac gaatggtagg aaactttggg aagcgcggtt accagcaggt ggacaagcaa caccaatgac ttaatgaatt aatggttaac
241 aatatgtgtt aatatggcc ggtggtcatg gttcatttgg tacaaaaatg ggogactatt tagtggttta tgcattacca gataacaaat aaaagtttgc tatcaaaaaa gcccggtatt
361 atctgggttt tttttatgct aatttagatt aaagcttctc aataaaaccg ttatataata tgcataaaaaa gcaatttatt gatgaatana agctcgctat gctatccgcc ttaataatga
481 atctaactage cataccgcat gtatttatac accgatttcc atcagcagct gataatacaa ccagtttctc agttccgcca tcagacagag cctattttag cgggcaaatc tctcaagat
  >>.....2846.....
  m y l y t d f d q q l i n g r v a q f r d q t e r y l a g k l s e d
601 gaataccgcc cattacgttt gcaaaaatgt ttaatatgct aacgttatgc accaatgcta cgtattgtct tgcctatggt cttaatgaac tcaaaaacat taagtaaatc tgcgtaagta
  >.....2846.....
  e y r p i r l q n g l y v q r y a p l r i a v p y g l a n s k q l r k i a e v
721 tcaactaat atgaccgtgg ctatgcacac gtatctacgc gtaaaaatct taagtaaac tgcctatggt tgaagatgt gccaganaat ttatgtgaac tgcgaactgt acaaatgcat
  >.....2846.....
  s t q y d r g y a h v s t r q n i q l n u p a l e d v p e i l a e l a t v q m h
841 gccattcaaa ccagtggttaa ctgtattcgt aacacgacta ctgaccagta tgcaggtgta gttgcaggtg aaattgctga tccacgccca acatgtgaat tgatctgca gtggagtaca
  >.....2846.....
  a i q t s g n c i r n t t t d q y a g v v a g e i a d p r p t c e l i r q w a t
961 tccaaccgg aatttgatct ctacacagct aaatttaaaa tgcctgttcc tgcacttgaa gaaaagacc gtcagcaaac agcattccac gatattgggt tgtatctgtc gcgttaagaa
  >.....2846.....
  f h p e f a f i p r k f k i a v s a l e e k d r a a t a f h d i g v y i v r n e
1081 gcaagcgaga tgggtacaaa aatcatggtg ggtggtggtt taggcctgac tccgattatt ggtagtgtca ttcccgagtt ttaccacgt gaagatttaa tgcgtattt agaagcagtg
  >.....2846.....
  a g e m g y k i m v g g g l g r t p i i g a v i r e f l p r e d i l a y l e a v
1201 ttacgtgttt ataacttaca tggccgtcgt gatacaaat ataaaggcgc tatcaaaatc ttggttaag cattaacgcc tgaagtatt gcacaganaa ttgaagctga attgaacac
  >.....2846.....
  l r v y n i h g r r d n k y k a r i k i l v k a l t p e v f a q k v e a e f e h
1321 acacgtgaaa cattaanaat tcagccagaa atcttgaaaa aattagaca agagttcagc cegtttgatt atcaagattt agaagatgaa gctttacag ctttatttgc tgagatcca
  >.....2846.....
  t r e t i k i q p e i l k k l d e e f t p f d y q d l e d e d f t a l f a e h p
1441 aaattcaaac aatgtgtcaa tatcaatagc catgcgcata aagtaagggt ctatcgtatt gttacgattt ctttaaaagc tgcaggtatc gcaacagcgc atagaccac tgaagaatg
  >.....2846.....
  k f k q w f n i n t h a h k v k g y r i v t i s l k r a g i a p g d m t t e e m
1561 aactctatg cagatctcgc tgataaatat acgtttgttg aactctgac gactcagaaa caaaacattg ctttgcgaga tgcactcaa aaagatttgt tctgtatgac gcaagcgtct
  >.....2846.....
  n f i a d l a d k y t f g e l r t t h e q n i a l a d v p q k d l f d v w q a l
1681 gaacaacaca acatggctcg tgcgcatac ggctttatac ccgatattat tagctgccc ggtggtgatt tctgttcaat tgcanaatgc aaatcaatc ctattgtgca agcattaca
  >.....2846.....
  e q h n m a r a h i g f i t d i i s c p g g d f c s l a n a k s i p i a e a i t
1801 cgccttttg aagatttaga taaagttat gatcttggc attagactt aaatattct ggctgtatga atgcttggg tcaccaccac gtgggtaaca tccgtattt agygttagat
  >.....2846.....
  r r f e d l d k v y d i g h i d l n i s g c m n a c g h h h v g n i g i l g v d
1921 aaaaaaggc ctgatttcta tcaaatata ttagtggtta atcagacca tgaattctca atgttgaca tottagaac atcatttga cagaagccg tgcctatgct cattgaagaa
  >.....2846.....
  k k g a e f y q i t l g g n s d h d a s i g d i l g p s f a a e a v p d v i e e
2041 gtataaata cgtatcttga ttactgtact gaagtgagc gttctgtga tacatctcgc cgttaggaa tcaaccatt taaggagcgt gcattgctt aatacagtc tacctgtgct
  >.....2846.....
  v i n t y l d i r t e g e r f v d t y r r v g i q p f k e r a y a -
  >>.....2845.....
  m i n t a i p v
2161 ttataaagat ggcacgattg cagataaac ttatcaaatc attgctgaag atgtgtgat tctcaaggt gacgtgttt taacaacagc acagctgat caactgcta acattcaagg
  >.....2845.....
  l y k d g t i a d n t y q i i a e d g v i p q g d v v l t t a q l d q l a n i q
2281 taaaaagct ttgatgtga ctgtgaagca tcaccagaa gatcaatac tcccacttag tgaactgtat gcaatttita tgaagtccg aggttcgga gatggggag gttatcatt
  >.....2845.....
  g k k a l y v t v n d s p e d h t f p l s e l d a i f i e f a g f g d g r g y s
2401 cctgcatta ttacgtcgc aaggttcca agtgaaacta cgtgcaacag gtgatgtatt taaggatgc ttaattatt taaaacgtc aggtttgat agttttgca ttaagaagg
  >.....2845.....
  f a a l l r r q g f q g e l r a t g d v f k d v l i n y l k r s g f d s f v i k e
2521 taaagatgt caagaagctg ctgctgttt gcaagactt actcatctt accaagctc aacagctgt ccaaaaagca gttatcaac tgggtgttaa atagcttca agtgaagg
  >.....2845.....
  g k d v q e a a a g l q d f t h p y q a s t a v p k a s y q t g a -
2641 ctgaactcag gttcagttt tttataaat aatttttaa ataatgaat tgaagaataa gaatgttgc ttaattca aaaaataac ctggtgctg gtggttaata ttogctattg
2761 cgcaggtgt actttcaacc tttattcag ctaaaagcaa tggattagt aataaaactg ctcaggggat tctctatgt ttgtatata tctctttgc atgtctgct attgcttga
2881 aatatatgca agctggaatt ttatatgtg tggatcc
  
```

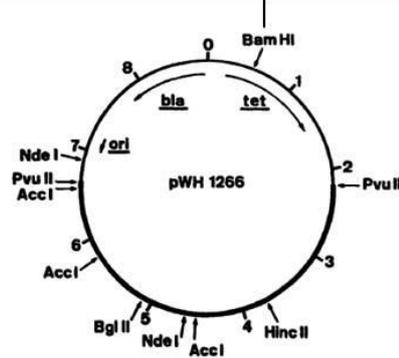


Abb. 3.9: Konstruktion des Plasmids pWH1266_SR
 Sequenz der β-Untereinheit (A1S_2846) der SR inklusive Promotor, Terminator und angrenzenden Genlocus A1S_2845 aus *A. baumannii* (ATCC 17978) nach Ligation in den Vektor pWH1266. Das Insert wurde über das Restriktionsenzym BamHI in den Vektor kloniert. Resultierende translatierte Proteinsequenzen sind grün dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind blau markiert.

3.4.2 Komplementierung der Motilitätsdefekte der Mutanten

Wie unter Abschnitt 3.2 berichtet konnten für die neu generierten SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate keine ausgeprägten Phänotypen bezüglich der Motilität beobachtet werden. Nur die alte Mutante 179 zeigte eine deutliche Beeinträchtigung ihrer Motilität im Vergleich zum Wildtyp ATCC 17978. Daher wurden für die genetischen Komplementierungsversuche der Motilitätsdefekte der SR-Mutanten die mit pWH1266_SR transformierte alte Mutante 179 und die mit pWH1266_SR transformierte neu konstruierte Mutante 179 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich der Vektor pWH1266 ohne Insert in die SR-Mutanten transformiert. Die Versuche zur genetischen Komplementierung wurden auf Motilitäts-Medium durchgeführt und die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.10 A-H dargestellt. Die Abbildungen 3.10 A-D zeigen den Wildtyp ATCC 17978 (Abb. 3.10 A, C), die zugehörige alte Mutante 179 (Abb. 3.10 B) und die neu konstruierte Mutante 179 (Abb. 3.10 D) auf Motilitäts-Medium.

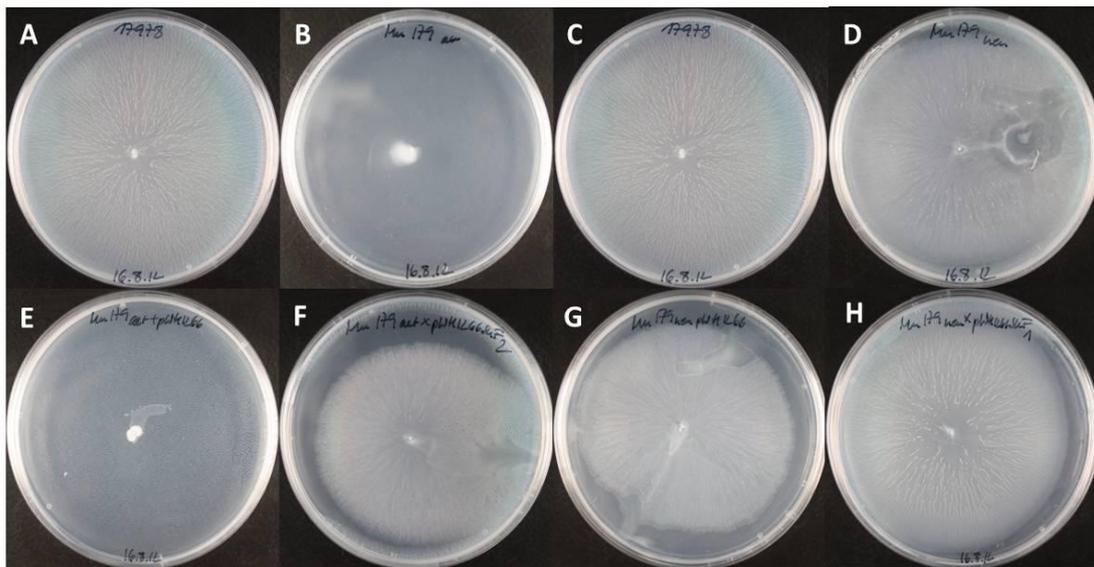


Abb. 3.10: Komplementierungsversuche von Motilitätsdefekte der SR-Mutanten auf Motilitäts-Medium
A: ATCC 17978; **B:** alte Mutante 179; **C:** ATCC 17978; **D:** neue Mutante 179; **E:** alte Mutante 179 mit Leervektor; **F:** alte Mutante 179 mit pWH1266_SR transformiert; **G:** neue Mutante 179 mit Leervektor; **H:** neue Mutante 179 mit pWH1266_SR transformiert

Wie zuvor berichtet, zeigt der Wildtyp ATCC 17978 eine ausgeprägte Motilität an der Agaroseoberfläche. Die Motilität der alten Mutante 179 ist deutlich verringert und bei der neu konstruierten Mutante 179 können keine Motilitätsdefekte beobachtet werden. Nach Komplementierung mit dem Leervektor pWH1266 können keine Veränderungen der Motilität der beiden Mutanten beobachtet werden (Abb. 3.10 E; G). Die Komplementierungen der Mutanten mit dem Plasmid pWH1266_SR sind in den Abbildungen 3.10 F und H dargestellt. Die komplementierte alte Mutante 179 zeigt nun

eine ausgeprägte Motilität an der Agaroseoberfläche (Abb. 3.10 F) und bei der neu konstruierten komplementierten Mutante 179 können keine Veränderungen der Motilität beobachtet werden (Abb. 3.10 H). Damit konnte der Motilitätsdefekt der alten Mutante 179 durch Komplementierung mit dem pWH1266_SR kompensiert werden. Unverstanden bleibt damit allerdings, warum die neu konstruierte Mutante 179 keinen Motilitätsphänotyp aufweist.

3.4.3 Komplementierung von Wachstumsdefekten der Mutanten

Wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben konnten durch die Kultivierung der einzelnen SR-Mutanten auf dem Simmons-Minimalmedium Wachstumsdefekte der SR-Mutanten festgestellt werden. Die Kultivierung der SR-Mutanten auf dem Minimalmedium war nicht möglich. Für die genetische Komplementierung dieser Wachstumsdefekte wurden die mit pWH1266_SR transformierten SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate 95/07, 30011 und sowie die neue und alte Mutante 179 des Stammes ATCC 17978 verwendet. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich der Vektor pWH1266 ohne Insert in die SR-Mutanten transformiert. Die Versuche zur genetischen Komplementierung wurden auf Simmons-Minimalmedium durchgeführt und die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.11 A-F und 3.12 A-F dargestellt.

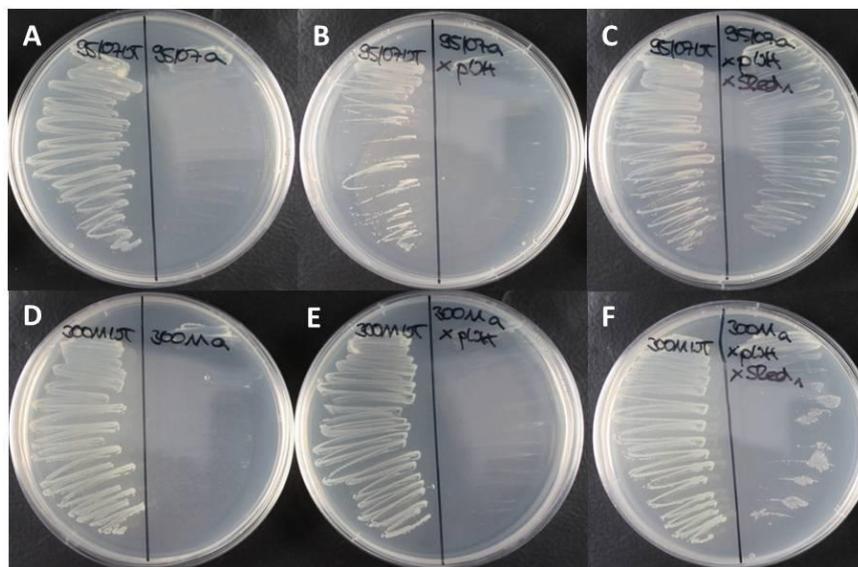


Abb. 3.11: Komplementierungsversuch von Wachstumsdefekten der SR-Mutanten auf Minimalmedium
A: links Wildtyp 95/07; rechts Mutante 95/07; **B:** links Wildtyp 95/07; rechts Mutante 95/07 mit Leervektor; **C:** links Wildtyp 95/07; rechts Mutante 95/07 mit pWH1266_SR transformiert; **D:** links Wildtyp 30011; rechts Mutante 30011; **E:** links Wildtyp 30011; rechts Mutante 30011 mit Leervektor; **F:** links Wildtyp 30011; rechts Mutante 30011 mit pWH1266_SR transformiert

Die Agarplatten wurden halbiert und zum besseren Vergleich auf der linken Seite mit dem Wildtyp beimpft. Die rechte Seite der Agarplatte wurde entweder mit der zugehörigen Mutante, der zugehörigen Mutante mit Leervektor oder der zugehörigen

mit pWH1266_SR transformierten Mutante beimpft. Die Abbildungen 3.11 A und D zeigen die *A. baumannii*-Isolate 95/07 und 30011 mit den jeweiligen SR-Mutanten. Hier ist ein deutlicher Wachstumsdefekt der Mutanten zu erkennen. In den Abbildungen 3.11 B und E sind als Kontrolle die mit dem Leervektor transformierten SR-Mutanten dargestellt. Durch die Transformation mit dem Leervektor können die Wachstumsdefizite erwartungsgemäß nicht ausgeglichen werden. Die Abbildungen 3.11 C und F zeigen die mit pWH1266_SR transformierten Mutanten der Isolate 95/07 und 30011. Die Transformation mit dem pWH1266_SR kann die Wachstumsdefekte aufheben und die komplementierten SR-Mutanten der Isolate 95/07 und 30011 sind auf dem Simmons-Minimalmedium wieder kultivierbar. Die Abbildungen 3.12 A und D zeigen, das *A. baumannii*-Isolat ATCC 17978 mit der alten Mutante 179 und der neuen Mutante 179. Hier sind ebenso deutliche Wachstumsdefekte der Mutanten erkennbar. In den Abbildungen 3.12 B und E sind als Kontrolle die mit dem Leervektor transformierte alte und neue Mutante 179 dargestellt. Durch die Transformation mit dem Leervektor können die Wachstumsdefizite nicht ausgeglichen werden. Die Abbildungen 3.12 C und F zeigen die mit pWH1266_SR transformierte alte und neue Mutante 179.

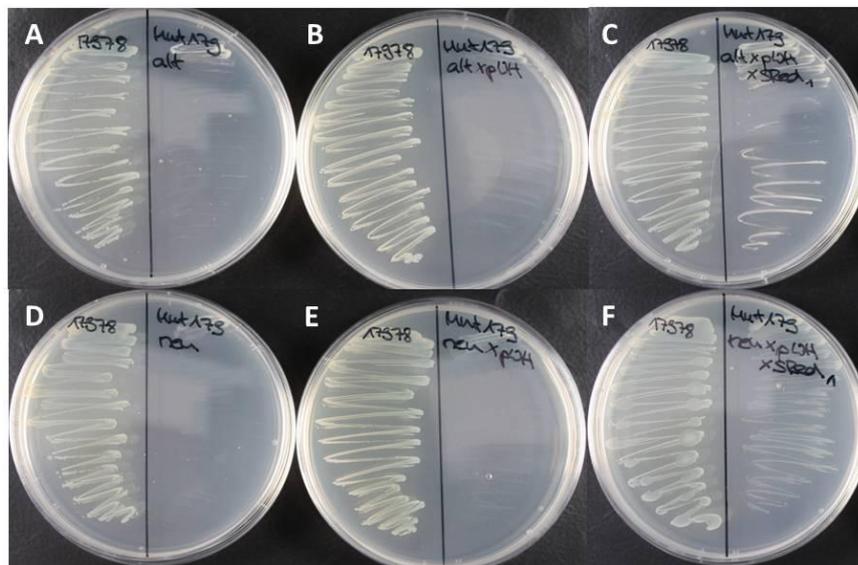


Abb. 3.12: Komplementierungsversuch von Wachstumsdefekten der SR-Mutanten auf Minimalmedium
A: links ATCC 17978; rechts alte Mutante 179; **B:** links ATCC 17978; rechts alte Mutante 179 mit Leervektor; **C:** links ATCC 17978; rechts alte Mutante 179 mit pWH1266_SR transformiert; **D:** links ATCC 17978; rechts neue Mutante 179; **E:** links ATCC 17978; rechts neue Mutante 179 mit Leervektor; **F:** links ATCC 17978; rechts neue Mutante 179 mit pWH1266_SR transformiert

Die Transformation mit pWH1266_SR kann die Wachstumsdefekte aufheben und die komplementierte alte und neue Mutante 179 sind auf dem Simmons-Minimalmedium ebenfalls wieder kultivierbar. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der

genetischen Komplementierung darauf schließen, dass durch das Plasmid pWH1266_SR die Sulfit-Reduktase-Aktivität rekonstituiert wurde.

3.5 Biofilm-Assay

Im ersten Schritt der Biofilmbildung kommt es zur Anlagerung eines Mikroorganismus aus dem Umgebungsmedium an einer Oberfläche [37]. Bakterien können sich an allen Grenzflächen wie z.B. Gas- und Flüssigphasen, Flüssig- und Festphasen, oder auch zwischen Flüssig- und Flüssigphasen absetzen. Dies geschieht in Form eines „*conditioning film*“, auch Pellikel oder Kahmhaut genannt, den die Bakterien zusammen mit extrazellulären Proteinen und Polysacchariden ausbilden [103]. Verschiedene Parameter beeinflussen die Bildung des Pellikels an der Materialoberfläche [39, 40]. Biofilmbildung konnte schon in einigen *Acinetobacter*-Arten, unter anderem in *A. baumannii*, beobachtet werden [43, 44]. *A. baumannii* ist zur Biofilmbildung auf natürlichen und künstlichen Flächen fähig [45]. Pilus-vermittelte Biofilmbildung auf Glas und Kunststoff konnte ebenfalls demonstriert werden [46]. Um den Einfluss der SR der *A. baumannii*-Isolate und der jeweiligen SR-defizienten Mutanten auf die Biofilmbildung zu analysiert wurden Biofilm-Assays durchgeführt (Abschnitt 2.7). Hier kamen die Isolate 95/07, 96/10, 102/07, 30011 mit ihren zugehörigen Mutanten und Isolat ATCC 17978 mit der alten Mutante 179 und der neu konstruierten Mutante 179 zum Einsatz. Biofilm-bildende Bakterien können sich an der Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase sammeln und eine sogenannte Kahmhaut (Pellikel) auf der Oberfläche des Nährmediums ausbilden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 A-E dargestellt. Der Wildtyp des Isolats 95/07 zeigte eine sehr schwache Ausbildung eines Biofilmes an der Oberfläche des Nährmediums, welcher bei der zugehörige SR-Mutante nicht beobachtet werden konnte (Abb. 3.13 A). Die Wildtypen und Mutanten der Isolate 96/10 und 102/07 waren nicht in der Lage einen Biofilm an der Oberfläche des Nährmediums auszubilden (Abb. 3.13 B-C). Für den Wildtyp des Isolats 30011 und ATCC 17978 wurde eine ausgeprägte Biofilmbildung an der Oberfläche des Nährmediums beobachtet (Abb. 3.13 D-E). Interessanterweise war das restliche Medium klar und weitgehend frei von Bakterienzellen. Demgegenüber konnte für die Mutante des Isolats 30011 und die neue und alte Mutante 179 die Ausprägung eines Biofilmes an der Oberfläche des Nährmediums nicht beobachtet werden. Damit kann festgestellt werden, dass durch die Inaktivierung der β -Untereinheit der SR, in den stark Biofilm-bildenden Isolaten ATCC 17978 und 30011, die Ausbildung eines Biofilms deutlich reduziert wird. Außerdem konnte hier im Gegensatz zu den Motilitätsstudien ein ähnlicher Phänotyp der alten und neuen Mutante des Isolats 17978 beobachtet werden.

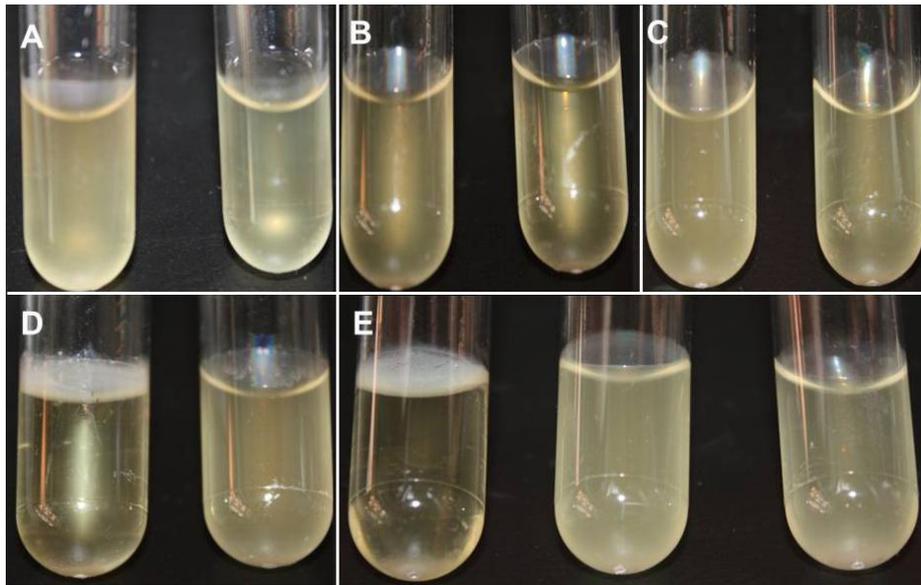


Abb. 3.13: Biofilm-Assay der *A. baumannii*-Isolate

A: links Wildtyp 95/07; rechts Mutante 95/07; **B:** links Wildtyp 96/10; rechts Mutante 96/10; **C:** links Wildtyp 102/07; rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011; rechts Mutante 30011; **E:** links ATCC 17978; Mitte alte Mutante 179; rechts neue Mutante 179

3.6 Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration (MHK)

In dieser Arbeit wurde die β -Untereinheit der SR in den einzelnen *A. baumannii*-Isolaten inaktiviert und die SR konnte als einziges H_2S -produzierendes Enzym in *A. baumannii* identifiziert werden. Da die SR Sulfit (SO_3^{2-}) zu Sulfid (H_2S) reduziert sind die einzelnen SR-Mutanten nicht mehr in der Lage H_2S zu synthetisieren. Kürzlich wurde bekannt, dass Schwefelwasserstoff (H_2S) in verschiedenen Bakterien als Signalmolekül wirkt, dem für die Resistenzprägung gegenüber Antibiotika eine wichtige Rolle zukommt [81]. Sollte H_2S in *A. baumannii* ebenfalls als Signalmolekül wirken, könnten die SR-Mutanten eine geringere Toleranz gegenüber Antibiotika bzw. oxidativen Stress aufweisen. Das Resistenzniveau der einzelnen *A. baumannii*-Isolate und ihrer Mutanten wurde deshalb durch die Bestimmung der MHK-Werte mit Hilfe der MIC Test-Streifen-Methode auf LB-Medium analysiert (Abschnitt 2.8). Um eine mögliche Beteiligung der H_2S -Produktion durch die SR für die Resistenzprägung gegenüber Antibiotika zu untersuchen, wurde dem LB-Medium zum Vergleich 1 mM NaHS (Natriumhydrogensulfid) als H_2S -Donor zugesetzt. Die MHK-Werte wurden für die Wildtypen (WT) und Mutanten (SR⁻) der Isolate 95/07 und 30011, für das Isolat ATCC 17978 und die alte Mutante 179 bestimmt. Es wurden die β -Laktam-Antibiotika Ampicillin und das Carbapenem Imipenem eingesetzt. Beide wirken bakterizid und hemmen die Peptidoglycansynthese während der Zellteilung. Weiterhin wurde das Aminoglycosid-Antibiotikum Gentamicin und Tetracyclin verwendet, welche die Hemmung der Proteinbiosynthese verursachen. Die beiden Chinolon-Antibiotika, zwei

Gyrase-Hemmer, Nalidixinsäure und das Flouchinolon Levofloxacin kamen ebenso zum Einsatz. In den Abbildungen 3.14 A-D, 3.15 und 3.16 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmung mit und ohne Zugabe von NaHS für die Antibiotika Imipenem und Tetracyclin des Isolats 95/07 und deren zugehörige SR-Mutante dargestellt und graphisch aufgetragen.

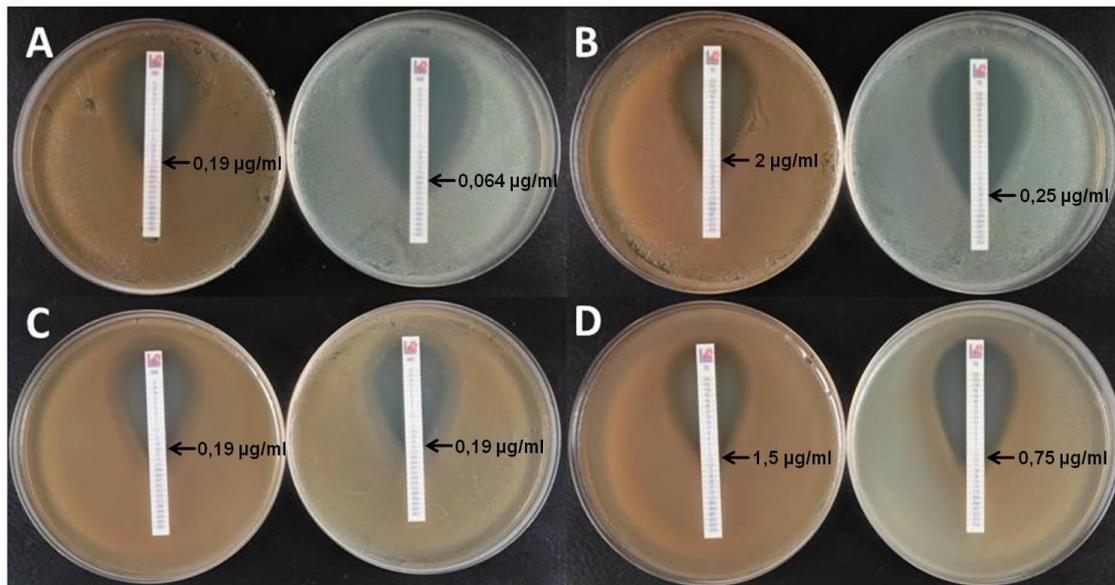


Abb. 3.14: MHK-Bestimmung für das Isolat 95/07 und dessen SR-Mutante auf LB-Medium

A: links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07, MIC Test-Streifen: Imipenem, ohne NaHS; **B:** links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07, MIC Test-Streifen: Tetracyclin, ohne NaHS; **C:** links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07, MIC Test Strip: Imipenem, mit 1 mM NaHS; **D:** links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07, MIC Test Strip: Tetracyclin, mit 1 mM NaHS; MHK-Werte durch Pfeile gekennzeichnet

Zwischen Wildtyp und SR-Mutante des Isolats 95/07 ist ohne Zugabe von NaHS ein deutlicher Unterschied in der Ausprägung der Hemmellipse bei beiden Antibiotika zu beobachten (Abb. 3.14 A, B). Die SR-Mutante wurde durch das Antibiotikum in ihrem Wachstum stärker gehemmt als der Wildtyp. Ohne Zugabe von NaHS zum Medium konnten für die Wildtypen der anderen Isolate im Vergleich zur jeweiligen Mutante immer größere MHK-Werte für die Antibiotika Tetracyclin, Imipenem, Levofloxacin und Gentamicin analysiert werden (Abb. 3.15-Abb. 3.18). Daher führt die Inaktivierung der SR in den klinischen Isolaten 95/07, 30011, Stamm ATCC 17978 und in der alte Mutante 179 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclin, Imipenem, Levofloxacin und Gentamicin. Die Inaktivierung führt zusätzlich in Isolat 95/07 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin (Abb. 3.19) und bei Stamm ATCC 17978 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure (Abb. 3.20).

Nach Zugabe von NaHS zum Kulturmedium konnten zwischen dem Wildtyp und der SR-Mutante des Isolats 95/07 kein Unterschied in der Ausprägung der Hemmellipse gegenüber Imipenem beobachtet werden (Abb. 3.14 C). Die SR-Mutante wurde durch das Antibiotikum nun weniger in ihrem Wachstum gehemmt als ohne Zugabe des H₂S-Donors (Abb. 3.14 C, Abb. 3.14 D). Für die eingesetzten SR-Mutanten der klinischen Isolate wurden durch die Zugabe von NaHS zum Nährmedium erhöhte MHK-Werte gegenüber den verwendeten Antibiotika ermittelt (Abb. 3.15-3.20). Daher führt die Kompensierung der Inaktivierung der SR durch Supplementierung mit dem H₂S-Donor NaHS in den Isolaten 95/07, 30011, ATCC 17978 und in der alte Mutante 179 zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber Imipenem, Tetracyclin, Gentamicin, Ampicillin, Nalidixinsäure und Levofloxacin.

Zusätzlich zeigte der Wildtyp des Isolats 30011 durch die Supplementierung mit NaHS eine ebenso verringerte Empfindlichkeit gegenüber Imipenem, Tetracyclin, Levofloxacin und Nalidixinsäure (Abb. 3.15-3.17, Abb. 3.20). Für den Wildtyp des Isolats 95/07 konnte durch die Supplementierung eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin und Tetracyclin beobachtet werden, da hier unter Umständen inhibitorische Konzentrationen von NaHS vorlagen (Abb. 3.14 D, 3.16, 3.18). Weiterhin ist der Wildtyp des Isolats 95/07 durch die Produktion eines Redox-sensitiven bräunlichen Farbstoffs gekennzeichnet (Abb. 3.14 A, B). Bei diesem handelt es sich vermutlich um eine Art Pyomelanin, wie sie für *Pseudomonas aeruginosa* bereits beschrieben sind [104]. Die Inaktivierung der SR hat einen wesentlichen Einfluss auf die Braunfärbung bzw. den Redox-Status der Bakterien, da die SR-Mutanten keine bräunliche Verfärbung des Kulturmediums hervorrufen. Die fehlende Braunfärbung der Mutante kann durch Zugabe von NaHS zum Kulturmedium wieder hergestellt werden (Abb. 3.14 C, D).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es durch die Inaktivierung der β -Untereinheit der SR in den klinischen Isolaten zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika kommt. Das Fehlen der H₂S-Produktion führt demzufolge in *A. baumannii* zu einer verringerten Toleranz der klinischen Isolate gegenüber antimikrobiellen Substanzen. Die Unterschiede zwischen den MHK-Werten der Wildtypen und SR-Mutanten konnten mit einem H₂S-Donor supplementiert werden. Somit ist die SR und die damit verbundene H₂S-Produktion in *A. baumannii* wesentlichen an der Resistenzausprägung gegenüber Antibiotika beteiligt.

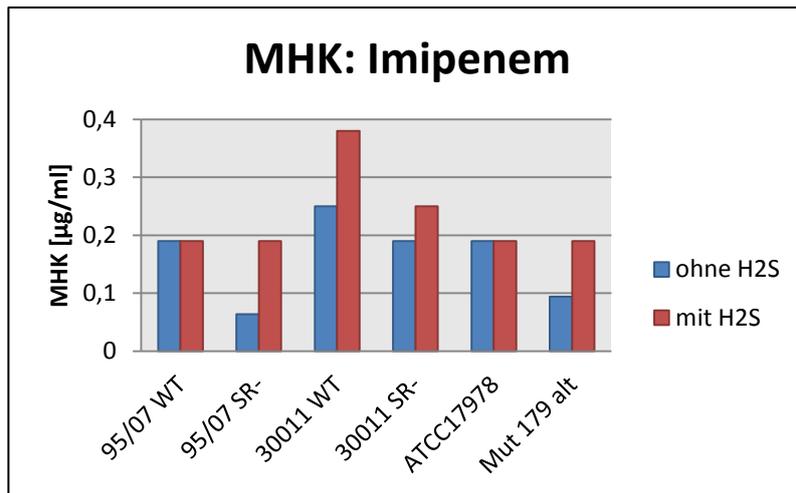


Abb. 3.15: MHK-Werte [µg/ml] der Isolate für das Antibiotikum Imipenem mit und ohne Zusatz von H₂S
WT: Wildtyp; SR-: SR-Mutante

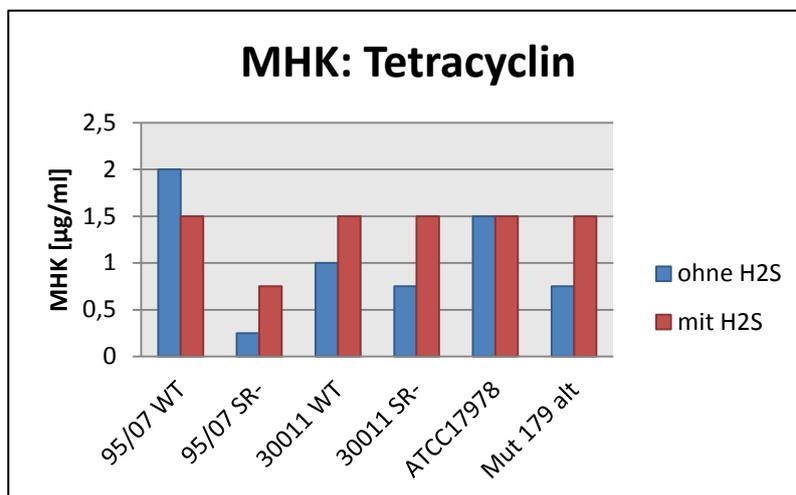


Abb. 3.16: MHK-Werte [µg/ml] der Isolate für das Antibiotikum Tetracyclin mit und ohne Zusatz von H₂S
WT: Wildtyp; SR-: SR Mutante

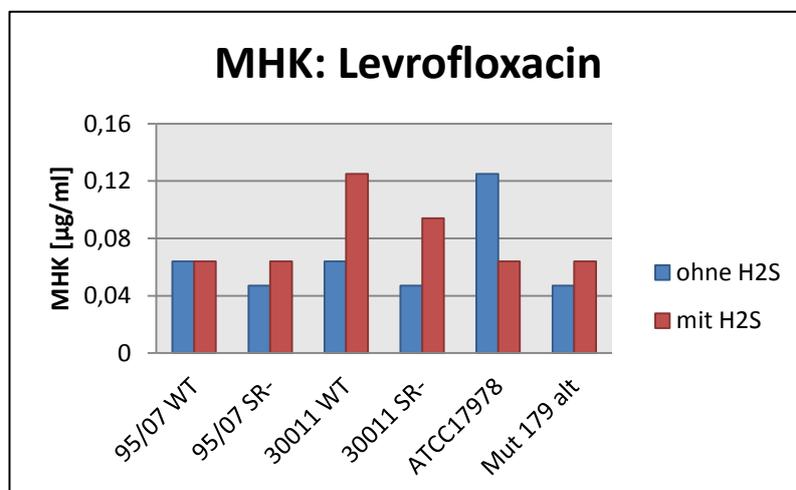


Abb. 3.17: MHK-Werte [µg/ml] der Isolate für das Antibiotikum Levofloxacin mit und ohne H₂S
WT: Wildtyp; SR-: SR-Mutante

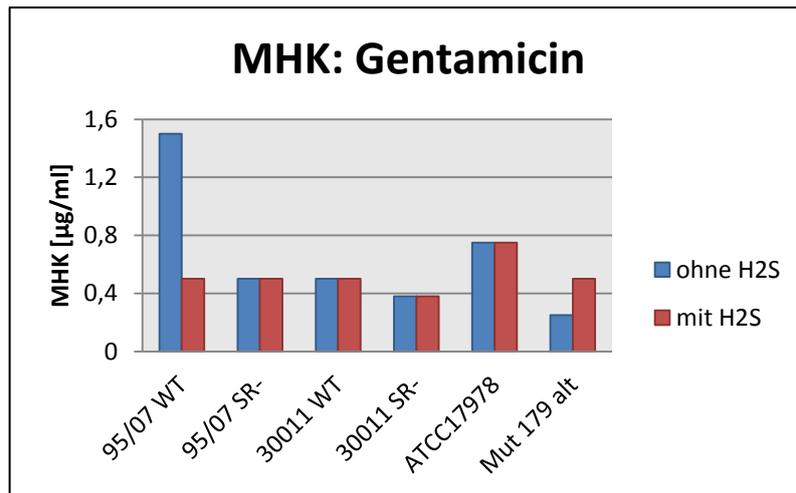


Abb. 3.18: MHK-Werte [µg/ml] der Isolate für das Antibiotikum Gentamicin mit und ohne H₂S
WT: Wildtyp; SR-: SR-Mutante

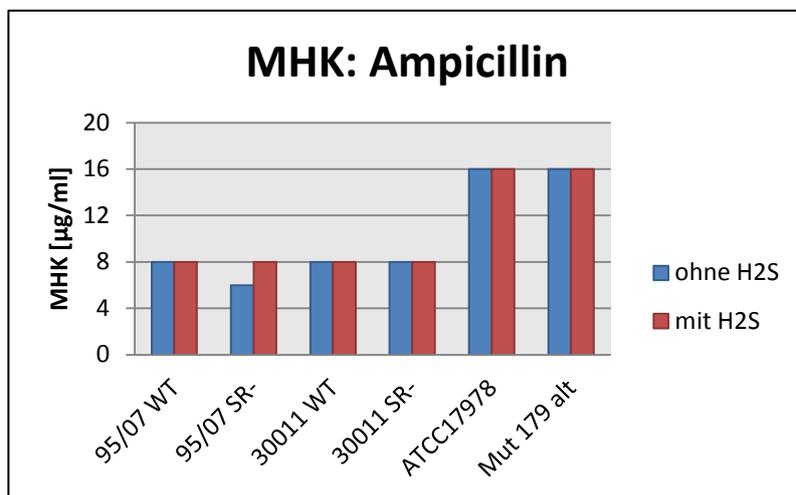


Abb. 3.19: MHK-Werte [µg/ml] für das Antibiotikum Ampicillin mit und ohne Zusatz von H₂S
WT: Wildtyp; SR-: SR-Mutante

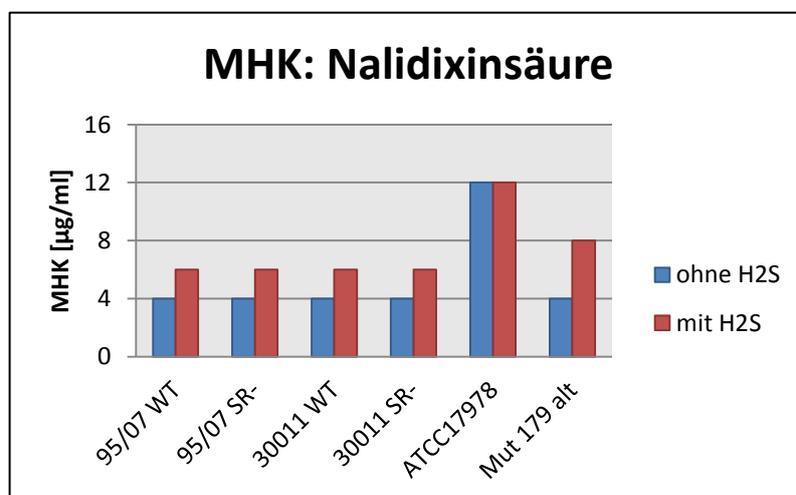


Abb. 3.20: MHK-Werte [µg/ml] für das Antibiotikum Nalidixinsäure mit und ohne Zusatz von H₂S
WT: Wildtyp; SR-: SR-Mutante

3.7 *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Um den Einfluss der der SR auf die Virulenz von *A. baumannii* zu untersuchen, wurde die Wildtyp-Isolate mit ihren zugehörigen SR-Mutanten im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell charakterisiert. Die Larven der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) sind als Testorganismus sehr interessant, da sie über ein angeborenes Immunsystem verfügen und im Gegensatz zu vielen anderen invertebraten Wirtssystemen bei 37°C gehalten werden können. Aufgrund der einfachen Lagerung, Haltung und Verfügbarkeit eignet sich dieser Organismus besonders gut für Infektionsversuche. Darüber hinaus ist *Galleria mellonella* bereits als Modellorganismus für *A. baumannii* etabliert [101]. In jedem Versuch wurden Gruppen von 16 *Galleria mellonella*-Raupen pro Isolat und zwei Kontrollgruppen (mit PBS bzw. nicht inokulierte Raupen) verwendet. Die Inokula der Wildtyp-Isolate und zugehörigen Mutanten wurde in das letzte rechte Bauchbein der einzelnen Raupen injiziert. Die Inkubation der Raupen erfolgte für fünf Tage bei 37°C in Petrischalen. Dabei wurde jeden Tag die Vitalität der einzelnen Tiere beobachtet und dokumentiert. Zur statistischen Absicherung wurden drei unabhängige Infektionsversuche durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.21-3.26 dargestellt.



Abb. 3.21: *Galleria mellonella*-Infektionsversuche 48 h nach der Infektion

A: links PBS-Kontrolle, rechts nicht inokulierte Kontrolle; **B:** links Wildtyp 95/07, rechts Mutante 95/07; **C:** links Wildtyp 102/07, rechts Mutante 102/07; **D:** links Wildtyp 30011, rechts Mutante 30011

Die Aufnahmen in Abbildung 3.21 entstanden 48 Stunden nach der Infektion der *G. mellonella*-Raupen mit den unterschiedlichen *A. baumannii*-Isolaten. Nach 48 Stunden konnte eine dunkle Pigmentierung der Kutikula der einzelnen Raupen beobachtet werden (Abb. 3.21). Diese als Melanisierung bezeichnete Schwarzfärbung

der Raupen ist eine Stressantwort auf die *A. baumannii*-Infektion und nahm über die fünf Tage deutlich zu. Die Melanisierung der einzelnen Raupen war in Bezug auf die verschiedenen Isolate unterschiedlich stark ausgeprägt. Alle Wildtypen der *A. baumannii*-Isolate verursachten aber eine stärkere Melanisierung als ihre SR-Mutanten (Abb. 3.21 B-D). Bei den beiden Kontrollgruppen, der mit PBS inokulierten Kontrolle und der nicht inokulierten Kontrolle, konnte keine Melanisierung der Raupen beobachtet werden (Abb. 3.21 A). Die Raupen dieser Kontrollgruppen zeigten innerhalb des beobachteten Zeitraums keinen Sterbefall.

In den Abbildungen 3.22-3.26 sind die Überlebensraten der mit den einzelnen Wildtypen und den SR-Mutanten infizierten Raupen graphisch dargestellt. Hier ist der zeitliche Verlauf über die gesamten fünf Tage der Versuchsfolge in drei Wiederholungen zu sehen. Die Überlebensraten der SR-Mutanten waren immer größer als die der zugehörigen Wildtypen. Somit führte die Inaktivierung der SR in allen analysierten Isolaten zu einer Attenuierung der Virulenz im *Galleria*-Infektionsmodell. Dieser Unterschied ist besonders zwischen Stamm ATCC 17978 und der alten Mutante 179 zu beobachten (Abb. 3.26). Die alte Mutante 179 weist eine starke Signifikanz im Unterschied zum Wildtyp ATCC 17978 auf (P-Wert $\leq 0,025$). Auch zwischen Stamm ATCC 17978 und der neuen Mutante 179 konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden (P-Wert $\leq 0,05$). Weniger prägnant sind die Abweichungen vom Wildtyp für die SR-Mutanten der Isolate 95/07, 96/19 und 30011 (P-Wert $\leq 0,05$) (Abb. 3.22, 3.23, 3.25). Zusätzlich konnten für die SR-Mutante des Isolats 102/07 (Abb. 3.24) in jeder Versuchsreihe Unterschiede zum Wildtyp gezeigt werden, die jedoch im nicht-signifikanten Bereich lagen (P-Wert $\geq 0,05$). Zusammenfassend konnte im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell für alle SR-Mutanten der unterschiedlichen Isolate im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen eine Virulenzabschwächung beobachtet werden.

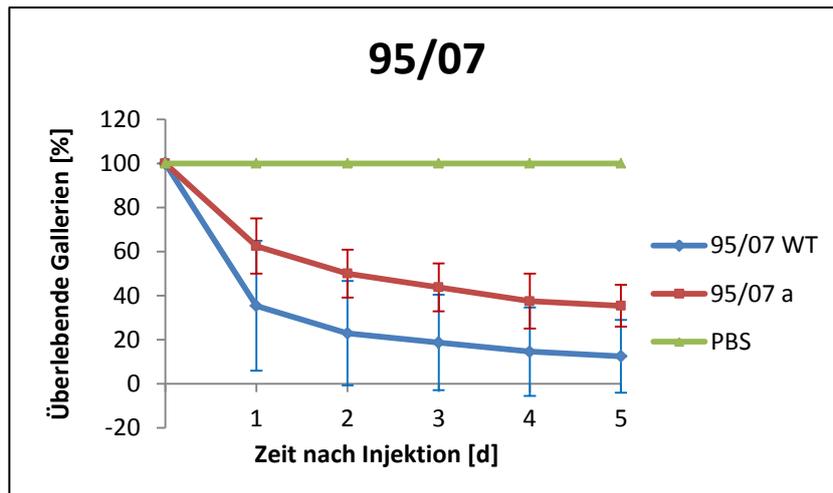


Abb. 3.22: Überlebensrate der mit Isolat 95/07 infizierten *G. mellonella*-Raupen
WT: Wildtyp; a: SR-Mutante; aufgetragen wurden Mittelwerte der drei Wiederholungen in Prozent mit zugehöriger Standardabweichung und PBS-Kontrolle über fünf Tage

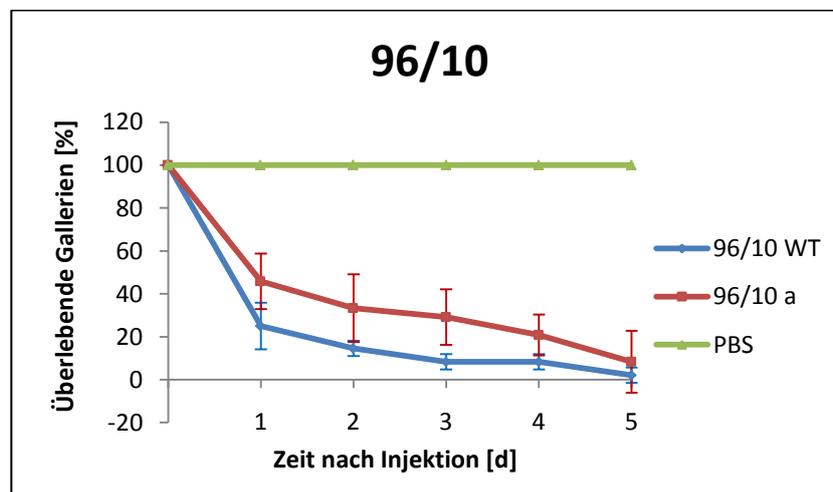


Abb. 3.23: Überlebensrate der mit Isolat 96/10 infizierten *G. mellonella*-Raupen
WT: Wildtyp; a: SR-Mutante; aufgetragen wurden Mittelwerte der drei Wiederholungen in Prozent mit zugehöriger Standardabweichung und PBS-Kontrolle über fünf Tage

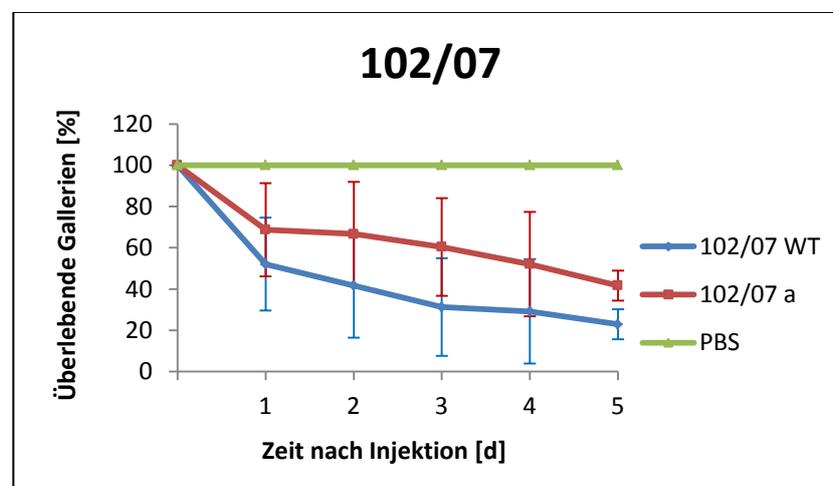


Abb. 3.24: Überlebensrate der mit Isolat 102/07 infizierten *G. mellonella*-Raupen
WT: Wildtyp; a: SR-Mutante; aufgetragen wurden Mittelwerte der drei Wiederholungen in Prozent mit zugehöriger Standardabweichung und PBS-Kontrolle über fünf Tage

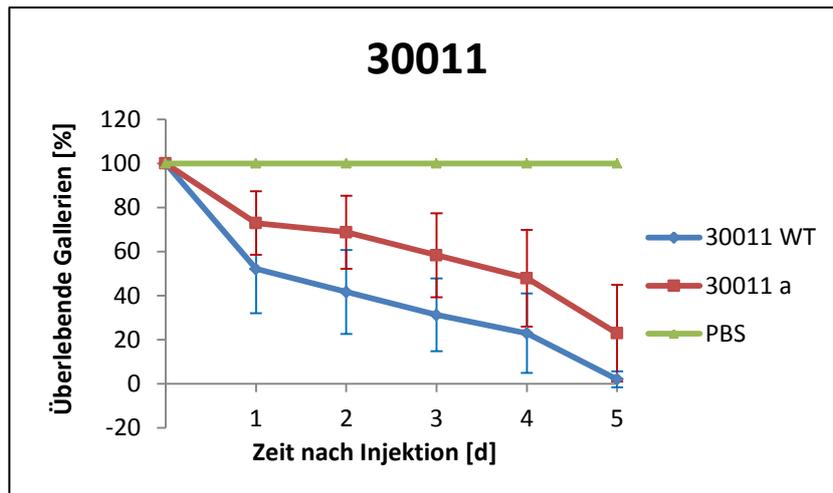


Abb. 3.25: Überlebensrate der mit Isolat 30011 infizierten *G. mellonella*-Raupen
WT: Wildtyp; a: SR-Mutante; aufgetragen wurden Mittelwerte der drei Wiederholungen in Prozent mit zugehöriger Standardabweichung und PBS-Kontrolle über fünf Tage

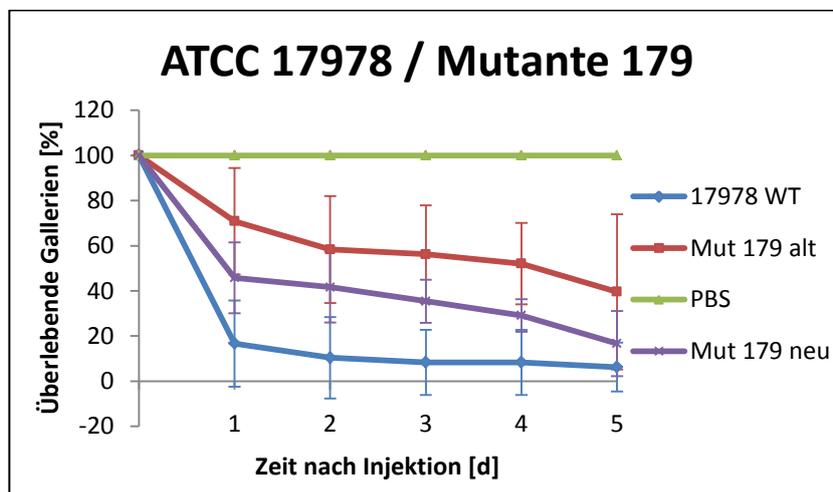


Abb. 3.26: Überlebensrate der mit Isolat ATCC 17978, alter Mutante 179 und neuer Mutante 179 infizierten *G. mellonella*-Raupen
WT: Wildtyp; a: SR-Mutante; aufgetragen wurden Mittelwerte der drei Wiederholungen in Prozent mit zugehöriger Standardabweichung und PBS-Kontrolle über fünf Tage

3.8 Rekombinante Herstellung der Sulfit-Reduktase

3.8.1 Klonierung

Für die Klonierung der β -Untereinheit (A1S_2846) der SR aus *A. baumannii* wurde das Primerpaar SR-6P-3_for/SR-6P-3_rev verwendet. Die Amplifizierung des 1600 bp großen PCR-Produkts erfolgte an genomischer DNA von *A. baumannii* ATCC 17978. Zu Kontrollzwecken wurde ein Teil des Amplifikats auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.27). Über die Primer wurden Schnittstellen für BamHI und NotI eingeführt, welche der anschließenden Klonierung in den Vektor pGEX-6P-3 dienen.

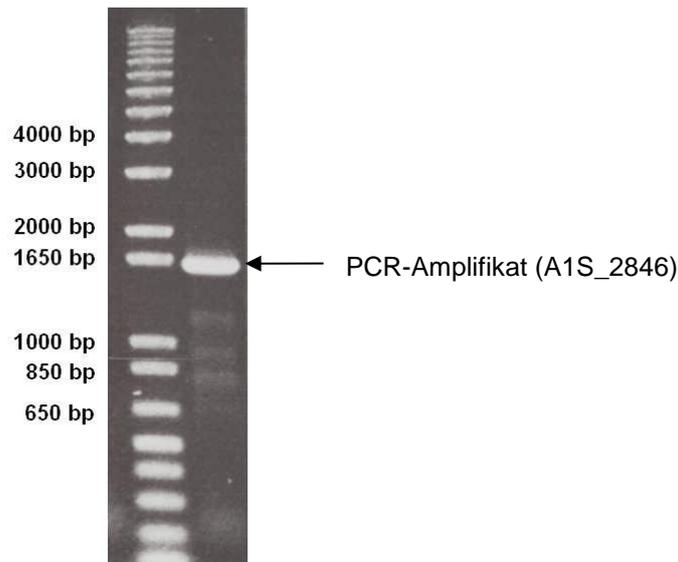


Abb. 3.27: PCR-Amplifikat der β -Untereinheit (A1S_2846) der SR aus *A. baumannii* auf 1 %igen Agarosegel; Pfeil kennzeichnet das etwa 1600 bp große PCR-Produkt

Der Vektor pGEX-6P-3 wurde gewählt, da er zusätzlich N-terminal ein GST-Tag mit einer PreScission-Protease-Schnittstelle an das Zielprotein anhängt. Der GST-Tag dient der anschließenden Reinigung des Zielproteins und die Protease-Schnittstelle sollte der späteren Entfernung des GST-Tags vom Zielprotein dienen. Im Anschluss an die Amplifizierung erfolgte der Restriktionsverdau des PCR-Produkts und des Vektors mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und NotI. Der Vektor pGEX-6P-3 wurde zusätzlich noch dephosphoryliert. Die Ansätze des Restriktionsverbaus wurden auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen und die benötigten Banden aus dem Gel extrahiert. Die gereinigte DNA des Vektors und des Amplifikats wurde für die weitere Ligation eingesetzt und das Ligationsprodukt zunächst in den Klonierungsstamm *E. coli* TOP10 transformiert. Die Transformation wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft (Abb. 3.28). Anschließend erfolgte eine Plasmidpräparation der Klone eins, zwei, fünf und sechs und ein abschließender Restriktionsverdau dieser Expressionskonstrukte (Abb. 3.29). Die korrekte Sequenz des Plasmid-Inserts der vier Klone wurde durch Sequenzierung überprüft. Hierzu wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Originalsequenz (A1S-2846) aus *A. baumannii* ATCC 17978 verglichen. Die Sequenz des Klons sechs erwies sich als am besten geeignet für die rekombinante Herstellung der Sulfid-Reduktase (A1S_2846) aus *A. baumannii* in *E. coli*, da hier keine Deletionen, Insertionen oder Substitutionen einzelner Basen identifiziert werden konnten. Für die weitere Transformation und Expression in *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* wurde daher der Klon sechs eingesetzt. Das konstruierte Plasmid von Klon sechs, welches das kodierende Gen für die β -Untereinheit (A1S_2846) enthielt, wurde als pGEX-6P-3_SR bezeichnet. Die Abbildung 3.30 zeigt die

Aminosäuresequenz der β -Untereinheit (A1S_2846) nach Klonierung in den Vektor pGEX-6P-3.

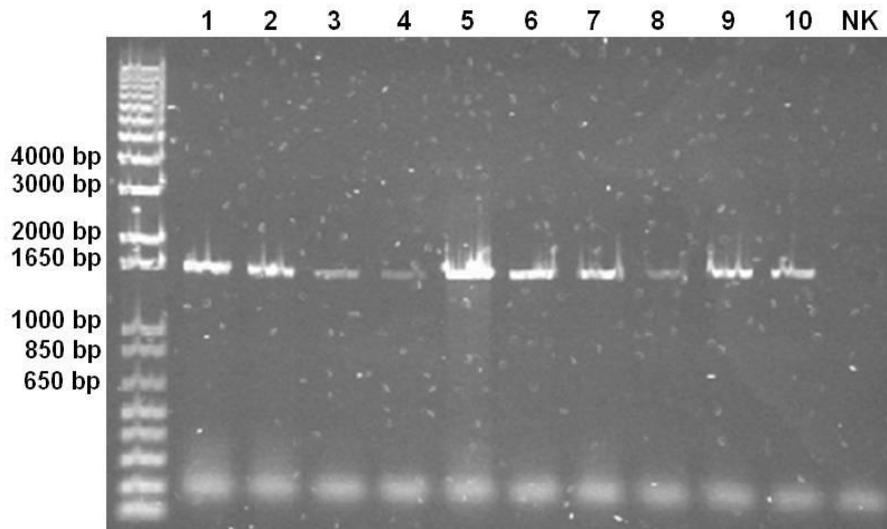


Abb. 3.28: PCR-Produkte der Kolonie-PCR der zehn Klone nach Transformation in *E. coli* TOP 10 auf 1 %igen Agarosegel; **1-10:** Transformanten 1-10 (gepickte Kolonien 1-10); NK: Negativkontrolle

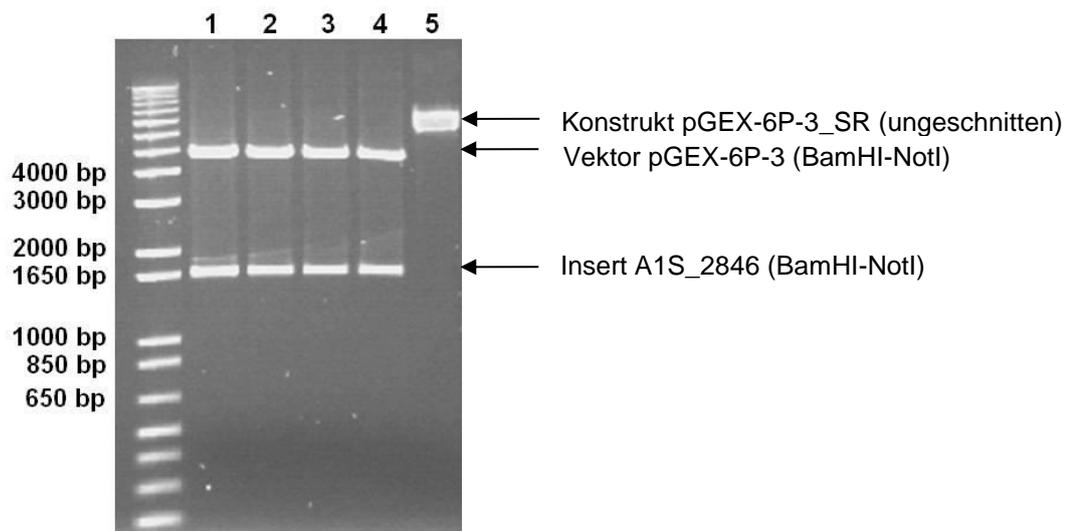


Abb. 3.29: Restriktionsverdau der vier Klone mit BamHI und NotI nach Plasmidpräparation
Spur 1: Klon eins; **Spur 2:** Klon zwei; **Spur 3:** Klon fünf; **Spur 4:** Klon sechs; **Spur 5:** Klon sechs unverdaut

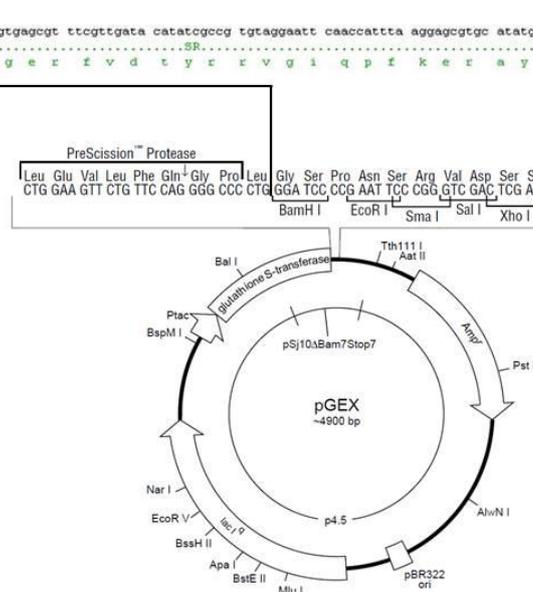
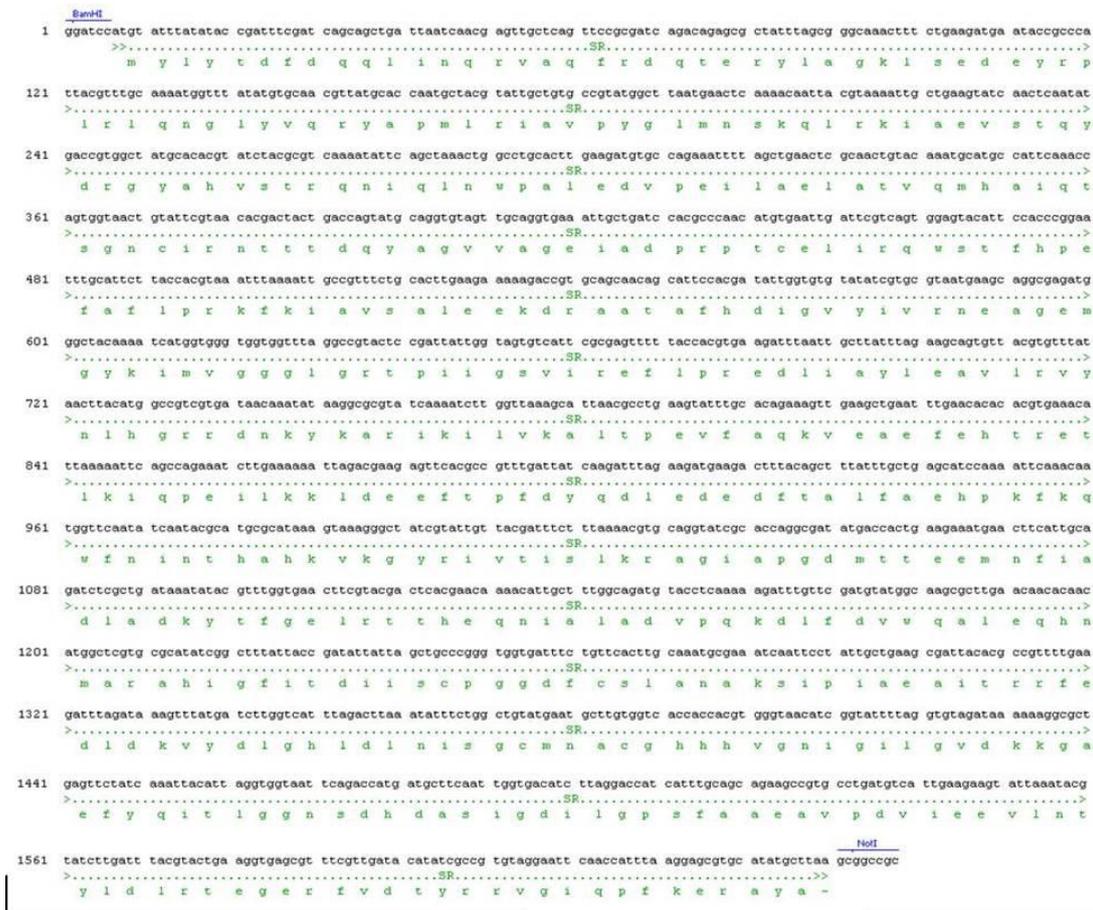


Abb. 3.30: Expressionskonstrukt pGEX-6P-3_SR

DNA-Sequenz der β -Untereinheit der SR aus *A. baumannii* (ATCC 17978) nach Ligation in pGEX-6P-3. Das Insert wurde über die Restriktionsenzyme BamHI und NotI unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors (*P_{tac}* Promotor) in den Vektor pGEX-6P-3 kloniert. Die resultierende translatierte Proteinsequenz ist grün dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind blau markiert.

3.8.2 Expression und Reinigung

Das Expressionskonstrukt pGEX-6P-3_SR wurde durch Elektroporation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* transformiert. Die Analyse der Expression und Reinigung erfolgte auf 11 %igen SDS-Polyacrylamidgelen mit anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 3.31, Abb. 3.32). Zusätzlich wurden die Expressions- und Reinigungsschritte im Western Blot analysiert und die gereinigten Proteinbanden mit einem GST-Antikörper als GST-Fusionsprotein verifiziert (Abb. 3.32). Die SR aus *A. baumannii* besteht aus 547 Aminosäuren, woraus sich ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 62 kDa ergibt. Der GST-Tag hat ein Molekulargewicht von 26 kDa, daher liegt die erwartete Größe des Fusionsproteins bei etwa 88 kDa. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Löslichkeit des Proteins stark von der Expressionstemperatur abhängt. So war bei 37°C das gesamte produzierte Protein unlöslich und fand sich nach dem Zellaufschluss nicht im Überstand, sondern als unlösliches Aggregat in Form von „inclusion bodies“ (IB) wieder (Abb. 3.31 Spur 4, 8). Neben der Expressionstemperatur wurde auch die Stärke der Expressionsinduktion getestet. Eine Konzentration von 1 mM IPTG verringert die Ausbeute an Fusionsprotein im Vergleich zu einer Konzentration von 0,1 mM IPTG (Abb. 3.31 Spur 2, 3, 6, 7).

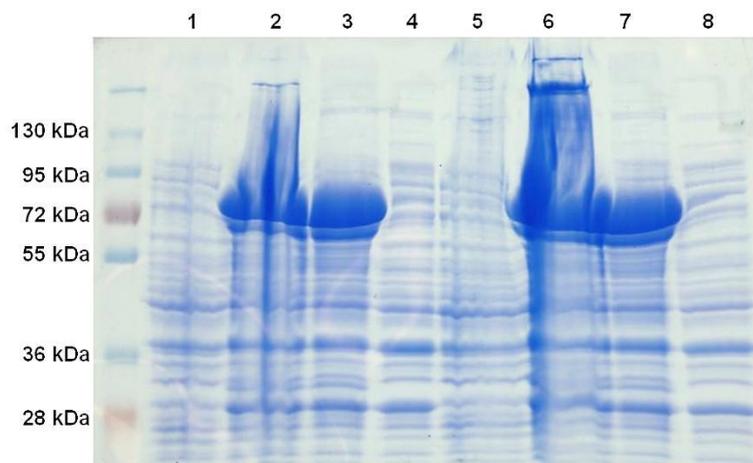


Abb. 3.31: Expressionstests der SR aus *A. baumannii* bei 37°C in *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* 11 %iges SDS-Gel; **Spur 1 + 5:** nicht induziert; **Spur 2:** 2 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; **Spur 3:** nach Zellaufschluss; **Spur 4:** Überstand nach Zellaufschluss; **Spur 6:** 2 h nach Induktion mit 0,1 mM IPTG; **Spur 7:** nach Zellaufschluss; **Spur 8:** Überstand nach Zellaufschluss

Die Expression erfolgte daher in *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* für 5 Stunden bei 20°C in einem Kulturvolumen von 100 ml im Schikanekolben (1000 ml) mit einer Induktionskonzentration von 0,1 mM IPTG. In Abbildung 3.32 sind die Ergebnisse der Expression und Reinigung der SR aus *A. baumannii* auf 11 %iges SDS-Gel und im Western Blot gegenübergestellt. Anschließend wurde der Zellaufschluss mit Hilfe der

French Press bei 4°C durchgeführt und das Fusionsprotein lag in löslicher Form im Überstand vor (Abb. 3.32 Spur 4, 5). Die Reinigung des GST-Fusionskonstrukts erfolgte affinitätschromatographisch über eine Glutathion (GSH)-gekoppelte Säule. Die Elutionsfraktionen, die das gewünschte Fusionsprotein (GST-SR) enthielten, wurden vereint und es konnte eine Konzentration von 1,752 µg/µl GST-SR ermittelt werden (Abb. 3.32 Spur 6). Das Konstrukt GST-SR wurde an die Firma Pineda Berlin versandt, um ein polyklonales GST-SR-Antiserum im Kaninchen produzieren zu lassen (Abschnitt 2.4). Unter optimierten Expressionsbedingungen betrug die Ausbeute an GST-SR aus 100 ml Bakterienkultur etwa 2,1 mg. Nach der Aufreinigung sollte der GST-Tag abgespalten werden. Zu diesem Zweck befand sich zwischen dem GST-Tag und dem Plasmid-Insert eine Erkennungssequenz für die PreScission-Protease (Abb. 3.30). Durch die Spaltung entstehen das GST-Tag (ca. 26 kDa) und die β-Untereinheit der SR (ca. 62 kDa). Die Spaltung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt und das Ergebnis ist in Abbildung 3.32 Spur 7 dargestellt. Der Verdau war nicht sehr effizient, da nach der Inkubation über Nacht immer noch sehr viel Fusionsprotein im Ansatz vorhanden war.

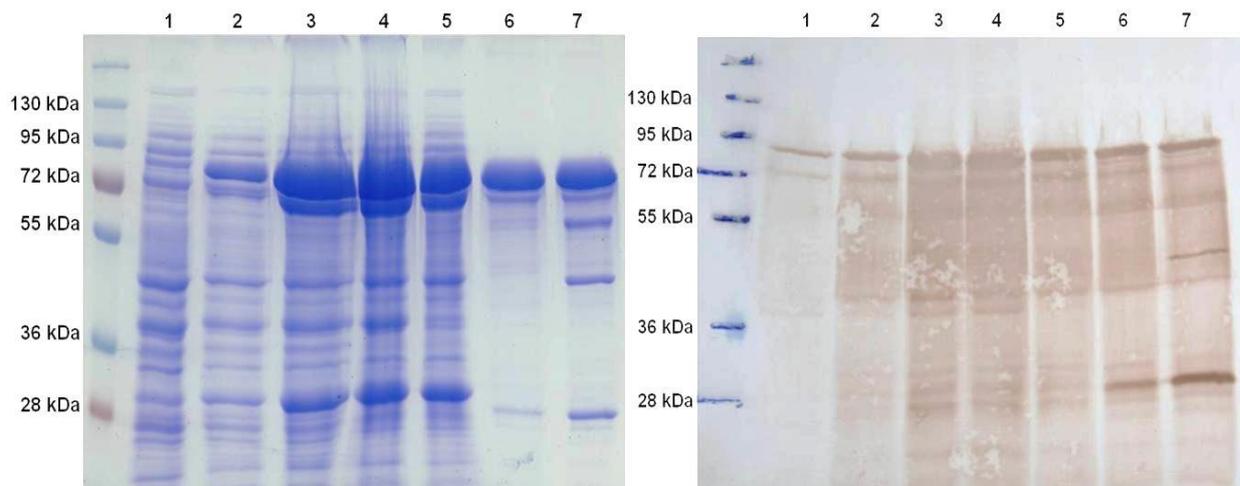


Abb. 3.32: Expression bei 20°C in *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* und Reinigung der SR aus *A. baumannii* links 11 %iges SDS-Gel, rechts Western Blot; **Spur 1:** nicht induziert; **Spur 2:** 2 h nach Induktion mit 0,1 mM IPTG; **Spur 3:** 5 h nach Induktion mit 0,1 mM IPTG; **Spur 4:** nach Zellaufschluss; **Spur 5:** Überstand nach Zellaufschluss; **Spur 6:** nach Affinitätsreinigung; **Spur 7:** nach Protease-Spaltung

Daraufhin wurde bei Spaltungsexperimenten der Elutionspuffer der Affinitätsreinigung als limitierender Faktor für eine effektive Spaltung ermittelt. Dazu wurde ein anderes GST-Fusionsprotein in PBS-Puffer mit PreScission-Protease versetzt und zusätzlich 1:2 mit Elutionspuffer verdünnt und dann mit PreScission-Protease versetzt. Die Ergebnisse zeigten eine vollständige Abspaltung des GST-Tags in PBS und eine weniger effektive Spaltung im Elutionspuffer. Um die Effizienz der Spaltung zu erhöhen wurde das exprimierte gereinigte Fusionskonstrukt GST-SR über eine

PD10-Säule umgepuffert (Abb. 3.33 Spur 1, 2) und wieder mit Protease versetzt. Durch die Abspaltung des Löslichkeits-vermittelnden GST-Tags ging die Löslichkeit des überexprimierten Zielproteins zurück und es befand sich nach der Spaltung als unlösliches Aggregat im Pellet (Abb. 3.33 Spur 3, 4). Für eine erfolgreiche Abspaltung des GST-Tag sollte das Fusionsprotein deshalb neu hergestellt und in anderen Pufferlösungen für weitere Spaltungsexperimente verwendet werden.

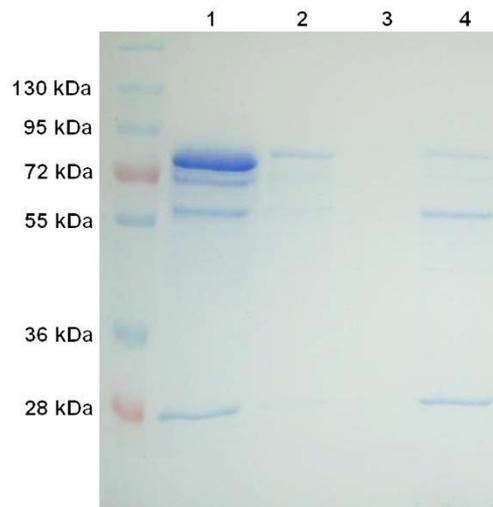


Abb. 3.33: Pufferaustausch durch PD10-Säule und Protease-Spaltung

Spur 1: Probenauftrag PD10-Säule; **Spur 2:** Elution mit Puffer A; **Spur 3:** Überstand nach Protease-Spaltung; **Spur 4:** Pellet nach Protease-Spaltung

3.9 Herstellung eines polyklonalen *A. baumannii*-SR-Antiserums

Für die Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers wurde nativ gereinigtes GST-Fusionsprotein (GST-SR) verwendet. Die Immunisierung wurde von der Firma Pineda Berlin nach einem Protokoll wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben, durchgeführt. Ein erstes Immuneserum wurde bereits nach 30 Tagen mit einem Titer von 1:1000 auf das Vorhandensein von anti-SR-Antikörpern im Western Blot getestet und auf Kreuzreaktivität mit dem Präimmuneserum verglichen (Abb. 3.34). Als Probe diente das nativ gereinigte GST-SR.

Das 88 kDa große GST-Fusionsprotein (GST-SR) konnte mit dem anti-SR-Serum spezifisch detektiert werden. Der Hintergrund des Western Blots mit dem anti-SR-Serum zeigte kleinere Proteine (Abb. 3.34 links). Dabei handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte des GST-Fusionsproteins (GST-SR), da diese erst ab einer Größe von < 88 kDa detektiert worden. Das Präimmuneserum war größtenteils frei von kreuzreagierenden Antikörpern gegen die SR aus *A. baumannii* (Abb.3.34 rechts). Lediglich eine unspezifische schwache Bande war mit dem Präimmuneserum bei etwa 60 kDa

detektierbar. Hier handelt es sich vermutlich um das Hsp60-Protein, ein Hitzeschock-Protein das von vielen Organismen exprimiert wird. Dies sollte für die weitere Verwendung des anti-SR-Serum aus dem Kaninchen berücksichtigt werden. Die Produktion eines polyklonalen *A. baumannii*-SR-Antiserums mit Hilfe der rekombinant hergestellten und gereinigten SR aus *A. baumannii* konnte somit erfolgreich durchgeführt werden.

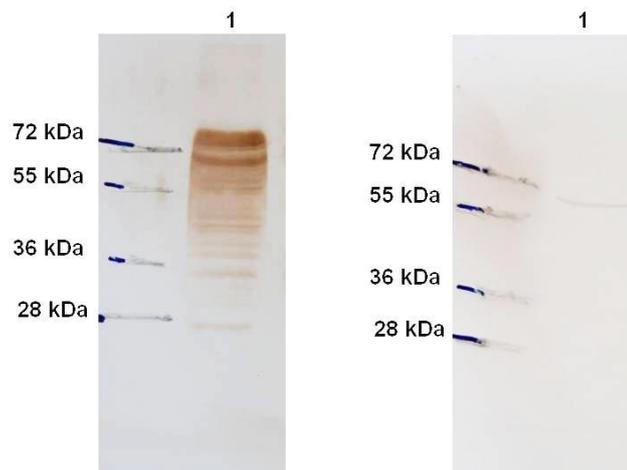


Abb. 3.34: Validierung des *A. baumannii*-SR-Antiserums aus Kaninchen im Western Blot

links: Western Blot mit anti-SR-Serum; **rechts:** Westernblot mit Präimmunserum; **Spur 1:** als Probe diente nativ gereinigtes GST-SR

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der SR aus *A. baumannii*, welche bislang gänzlich unbearbeitet war. Zu Beginn der Untersuchungen wurde dazu das für die β -Untereinheit (A1S_2846) der SR kodierende Gen in vier klinischen natürlich kompetenten Isolaten von *A. baumannii* inaktiviert [54]. Die Wildtypen und entstandenen SR-Mutanten der *A. baumannii*-Isolate wurden anschließend hinsichtlich ihrer Motilität, ihres Wachstums und ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung überprüft. Die dabei auftretenden Mutationseffekte wurden durch Supplementierung mit einem H_2S -Donor und Cystein kompensiert und die SR-Mutanten genetisch komplementiert. Weiterhin wurde eine mögliche Beteiligung der SR und der H_2S -Produktion in *A. baumannii* bei der Resistenzausprägung gegenüber verschiedenen Antibiotika untersucht und der Einfluss auf die Virulenz von *A. baumannii* im Wachsmotten-Infektionsmodell (*Galleria mellonella*) analysiert. Zusätzlich wurde die rekombinante Herstellung der β -Untereinheit (A1S_2846) in *E. coli* etabliert und das gereinigte Protein zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt.

4.1 Inaktivierung der Sulfit-Reduktase

A. baumannii und andere Spezies sind in der Lage lineare DNA aus der Umgebung aufzunehmen [54, 67-69]. Die in dieser Arbeit verwendeten klinischen Isolate von *A. baumannii* besitzen ebenfalls die Fähigkeit der natürlichen Kompetenz [54]. Die Aufnahme der inaktivierten β -Untereinheit der SR von Mutante 179 in die Zelle erfolgte über natürliche Transformation. Die Integration mittels homologer Rekombination in den Genlocus A1S_2846 der vier Isolate wurde durch eine Kolonie-PCR erfolgreich bestätigt. Die entstandenen SR-Mutanten der klinischen Isolate sollten nicht mehr in der Lage sein H_2S für die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren zu synthetisieren. Die Inaktivierung der β -Untereinheit der SR in den klinischen *A. baumannii*-Isolaten 95/07, 96/10, 102/07 und 30011 konnte erfolgreich durchgeführt werden. Weiterhin konnte durch die Kolonie-PCR die erfolgreiche Inaktivierung der β -Untereinheit auch in der neuen Mutante 179 bestätigt werden. Die erhaltenen fünf Mutanten und die alte Mutante 179 wurden im Verlauf dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Motilität, ihres Wachstums und ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung analysiert.

4.2 Charakterisierung der Motilität

Unterschiedliche Beweglichkeitsformen innerhalb der Gattung *Acinetobacter* wurden bereits in einigen Studien untersucht [49-51]. *A. baumannii* nutzt offenbar als Motilitätsmechanismus die T4P-vermittelte „*twitching motility*“, um sich entlang feuchter Oberflächen zu bewegen. [46, 52, 53]. Die Wildtypen und die sechs korrespondierenden Mutanten wurden zunächst hinsichtlich ihrer Motilität untersucht. Dabei wurde für die alte Mutante 179 ein deutlicher Motilitätsdefekt identifiziert. Im Gegensatz dazu konnte bei der neuen Mutante 179 kein Einfluss auf die Motilitätseigenschaften beobachtet werden. Auch in den weiteren klinischen Isolaten von *A. baumannii* konnte nach Inaktivierung der β -Untereinheit der SR kein Motilitätsdefekt ermittelt werden. Die Supplementierung mit dem H₂S-Donor NaHS zeigte nur bei der alten Mutante 179 einen sichtbaren Effekt und konnte den auftretenden Motilitätsdefekt gegenüber dem Wildtyp ATCC 17978 kompensieren. Auch eine genetische Komplementierung mit dem Plasmid pWH1266_SR konnte den Motilitätsdefekt ausgleichen und die alte Mutante 179 war wieder in der Lage sich auf der Agaroseoberfläche fortzubewegen. Eine zusätzliche Sequenzierung des Genlocus A1S_2846 der neuen und alten Mutante 179 zeigte keine Unterschiede bezüglich der Position des Transposons. Insofern bleibt unklar, warum sich die beiden Mutanten in Bezug auf den Motilitätsphänotyp so deutlich unterscheiden. Die Ergebnisse legen aber nahe, dass die Produktion von H₂S in *A. baumannii* nicht unmittelbar im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Fortbewegung steht.

4.3 Charakterisierung des Wachstums auf Minimalmedium

Die SR aus *A. baumannii* reduziert Sulfid (SO_3^{2-}) zu Sulfid (H₂S), welches für die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren in *A. baumannii* benötigt wird. Zur Charakterisierung der klinischen Isolate und der SR-defizienten Mutanten wurde das modifizierte Simmons-Minimalmedium [100] mit Sulfat als einziger Schwefelquelle eingesetzt. Durch die Inaktivierung der β -Untereinheit konnten die klinischen Isolate keinen Schwefel mehr für den Cystein-Methionin-Metabolismus assimilieren und zeigten entsprechend kein Wachstum auf dem Minimalmedium. Durch die Zugabe des H₂S-Donors NaHS oder Cystein zum Simmons-Minimalmedium konnten diese Wachstumsdefekte erfolgreich aufgehoben werden und die SR-defizienten Mutanten waren auf dem Simmons-Minimalmedium wieder kultivierbar. Die Supplementierung kompensiert somit die H₂S-Produktion zur Assimilierung von Schwefel für die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren. Des Weiteren konnten die auftretenden Wachstumsdefekte genetisch komplementiert werden. Durch das Plasmid

pWH1266_SR waren die SR-defizienten Mutanten von *A. baumannii* auf dem Simmons-Minimalmedium wieder kultivierbar. Die Sulfid-Reduktase-Aktivität in den SR-Mutanten wurde demnach rekonstituiert und der Wachstumsdefekt konnte erfolgreich genetisch komplementiert werden. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der Wachstumsversuche auf Minimalmedium darauf schließen, dass die SR die einzige H₂S-produzierende Reaktion für die Schwefelassimilation zur Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren im Stoffwechsel von *A. baumannii* katalysiert.

4.4 Analyse der Biofilmbildung

A. baumannii ist bekannt für die Ausbildung von Biofilmen auf biotischen und abiotischen Oberflächen [45]. Diese verleihen ihnen zum einen Schutz vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus, zum anderen aber auch als Penetrationsbarriere Resistenz gegenüber Antibiotika. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der SR auf die Biofilmbildung der unterschiedlichen klinischen Isolate von *A. baumannii* analysiert. Wie die Ergebnisse zeigen führt eine fehlende Produktion von H₂S zu einer deutlichen Verminderung der Biofilmbildung (ATCC 17978; Isolat 30011). Dieser Defekt könnte zu einer Virulenzabschwächung führen und einen Einfluss auf die Resistenzausprägung gegenüber Antibiotika haben. Hier konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen der Produktion von H₂S und der Ausbildung eines Biofilmes in Bakterien gezeigt werden. Es wäre nun interessant zu prüfen, ob die Zugabe von H₂S bzw. von Cystein hier gleichermaßen Einfluss auf die Biofilmbildung der Mutanten haben könnte oder ob sich hier eine spezifische Rolle von H₂S als Botenstoff abzeichnet. Immerhin wurden die Biofilm-Versuche mit komplexem Medium (LB) durchgeführt, das hinreichende Mengen von Schwefel-haltigen organischen Verbindungen enthält und den SR-Mutanten zu einem normalen Wachstum verhilft.

4.5 Resistenzprüfungen durch Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Produktion von H₂S in Bakterien ist schon sehr lange bekannt [78]. Erst seit kurzem weiß man aber, dass H₂S-generierenden Enzymen auch eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von ROS und der Resistenzausprägung gegenüber Antibiotika zukommt [81]. Bis auf die Arbeiten von Shatalin et al. 2011 bleiben die Untersuchungen zur biologischen Rolle von H₂S aber begrenzt auf die Bedeutung der assimilatorischen H₂S-Produktion zur Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren, sowie der dissimilatorischen H₂S-Produktion als Folge der Nutzung alternativer

Elektronenakzeptoren für die Energiegewinnung. In den Resistenztests dieser Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse wie von Shatalin et al. 2011 ermittelt werden. Die Resistenzprüfungen wurden auf komplexem LB-Medium durchgeführt, das ausreichende Mengen Schwefel-haltiger organischer Verbindungen enthält, um den SR-Mutanten zu einem normalen Wachstum zu verhelfen. Die Inaktivierung der β -Untereinheit der SR in den klinischen Isolaten von *A. baumannii* verursachte dennoch eine verringerte Toleranz gegenüber den eingesetzten Antibiotika. Durch die Supplementierung mit dem H_2S -Donor NaHS konnten diese Effekte wieder kompensiert werden. Das Fehlen der H_2S -Produktion in den klinischen Isolaten von *A. baumannii* verursacht demzufolge eine erhöhte Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Substanzen. Somit ist die SR und die damit verbundene H_2S -Produktion wesentlich an der Resistenzausprägung gegenüber antimikrobiellen Substanzen von *A. baumannii* beteiligt. In Säugern konnte H_2S bereits als dritter gasförmiger Botenstoff, neben Stickstoff- und Kohlenstoffmonoxid, identifiziert werden [82-85]. Weiterhin wurde festgestellt, dass wichtige Einflüsse von H_2S als Signalmolekül über die Sulfhydrierung von Proteinen vermittelt werden [78, 86]. Dabei kommt es in Form von posttranslationalen Modifikationen zur Sulfhydrierung von Cysteinresten, die die Aktivität von Enzymen beeinflussen. In Bakterien ist die Sulfhydrierung bislang noch nicht untersucht worden. Um weitere Hinweise auf die Funktion der assimilatorischen Sulfatreduktion und Produktion von H_2S in Bakterien zu identifizieren, sollte die Möglichkeit der Sulfhydrierung von Proteinen über die Produktion von H_2S mittels Isotopenmarkierung untersucht werden.

4.6 *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Die Experimente in Larven der *Galleria mellonella* Wachsmotten können als Vorstudien zum klassischen *in-vivo* Test im Säugetierorganismus verstanden werden. Durch ein angeborenes Immunsystem sind die Schmetterlingsraupen zu wichtigen Abwehrreaktionen in der Lage. Tatsächlich konnte im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell durch die Inaktivierung der β -Untereinheit (A1S_2846) der SR in den klinischen Isolaten eine Verringerung der Virulenzeigenschaften von *A. baumannii* beobachtet werden. Hier konnten für drei von vier klinischen Isolaten und für Stamm ATCC 17978 sogar signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante identifiziert werden. Als Folge der fehlenden H_2S -Produktion wurde eine Attenuierung der SR-Mutanten ermittelt. Die SR stellt in *A. baumannii* das einzige Enzym zur Synthese von H_2S dar. Bei Säugern sind andere Enzyme für die H_2S -Produktion verantwortlich, daher könnten Hemmstoffe gegen die SR aus *A. baumannii* die

Wirksamkeit gängiger Antibiotika unterstützen und die Virulenzeigenschaften dieses nosokomialen Erregers verringern.

4.7 Rekombinante Herstellung der Sulfit-Reduktase

Die Klonierung eines Expressionskonstruktes pGEX-6P-3_SR für die rekombinante Herstellung der β -Untereinheit (A1S_2846) der SR aus *A. baumannii* konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Nach Transformation in *E. coli* wurde zunächst eine geringere Löslichkeit des Fusionsproteins (GST_SR) festgestellt. Durch eine verringerte Expressionstemperatur konnte das GST_SR als lösliches Fusionsprotein gewonnen werden. Eine Abspaltung des Löslichkeits-vermittelnden GST-Tags vom Fusionsprotein war zunächst nicht möglich. Mit Hilfe von Spaltungsexperimenten wurde der Elutionspuffer der Affinitätschromatographie als limitierender Faktor für die Abspaltung des GST-Tags vom Zielprotein durch die PreScission-Protease ermittelt. Ein Austausch des Elutionspuffers gegen Puffer A verbesserte zwar die Spaltbarkeit, führte aber zu einer verringerten Löslichkeit des GST_SR sowie der abgespaltenen SR. Daher wurde das Fusionsprotein zur Produktion eines polyklonalen Antiserums gegen die SR aus *A. baumannii* eingesetzt. Das fertige *A. baumannii*-SR-Antiserum wurde im Western Blot analysiert und kann für weitere Experimente zur Detektion der β -Untereinheit der SR aus *A. baumannii* verwendet werden. Die rekombinante Herstellung der β -Untereinheit der SR aus *A. baumannii* konnte erfolgreich etabliert werden und kann nun durch weitere Arbeiten funktionell und strukturell analysiert werden. In Folge dessen sollte die α -Untereinheit (A1S_2798) der SR aus *A. baumannii* ebenfalls rekombinant hergestellt werden, um den SR-Komplex aus α - und β -Untereinheit strukturell und funktionell zu untersuchen. Möglicherweise kann durch eine Koexpression beider Untereinheiten auch die Löslichkeit der β -Untereinheit verbessert werden. Das rekombinante Enzym sollte zur Etablierung eines hochdurchsatzfähigen Enzymassays eingesetzt werden. Zusätzlich sollten beide Untereinheiten durch Röntgenkleinwinkelstreuung oder Röntgenkristallographie weiter charakterisiert werden, um so Grundlagen für die Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen gegen die SR in *A. baumannii* zu schaffen.

Literaturverzeichnis

1. Peleg, A.Y., H. Seifert, and D.L. Paterson, *Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(3): p. 538-82.
2. Bergogne-Bérézin, E., *Acinetobacter biology and pathogenesis*. 2008: Springer Verlag.
3. Bergogne-Berezin, E. and K.J. Towner, *Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(2): p. 148-65.
4. Dijkshoorn, L., A. Nemec, and H. Seifert, *An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(12): p. 939-51.
5. Baumann, P., *Isolation of Acinetobacter from soil and water*. J Bacteriol, 1968. **96**(1): p. 39-42.
6. Berlau, J., et al., *Isolation of Acinetobacter spp. including A. baumannii from vegetables: implications for hospital-acquired infections*. J Hosp Infect, 1999. **42**(3): p. 201-4.
7. Seifert, H., et al., *Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2819-25.
8. Munoz-Price, L.S. and R.A. Weinstein, *Acinetobacter infection*. N Engl J Med, 2008. **358**(12): p. 1271-81.
9. Chastre, J. and J.L. Trouillet, *Problem pathogens (Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter)*. Semin Respir Infect, 2000. **15**(4): p. 287-98.
10. Brisou, J. and A.R. Prevot, *[Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group]*. Ann Inst Pasteur (Paris), 1954. **86**(6): p. 722-8.
11. Gilardi, G.L., *Characterization of the oxidase-negative, gram-negative coccobacilli (the Achromobacter-acinetobacter group)*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1969. **35**(4): p. 421-9.
12. Tomaras, A.P., et al., *Molecular basis of Acinetobacter virulence and pathogenicity*. Acinetobacter Molecular Biology, 2008.
13. Scott, P., et al., *An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(12): p. 1577-84.

14. War, C.o.G. and H.I. Diseases, *Gulf War and Health: Volume 5. Infectious Diseases*, ed. A.E. Mitchell, L.B. Sivitz, and R.E. Black. 2007: The National Academies Press.
15. Davis, K.A., et al., *Multidrug-resistant Acinetobacter extremity infections in soldiers*. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(8): p. 1218-24.
16. Boucher, H.W., et al., *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(1): p. 1-12.
17. Talbot, G.H., et al., *Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**(5): p. 657-68.
18. Prashanth, K. and S. Badrinath, *Nosocomial infections due to Acinetobacter species: Clinical findings, risk and prognostic factors*. *Indian J Med Microbiol*, 2006. **24**(1): p. 39-44.
19. Seifert, H. and P. Gerner-Smidt, *Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of Acinetobacter isolates*. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(5): p. 1402-7.
20. Zeana, C., et al., *The epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: does the community represent a reservoir?* *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003. **24**(4): p. 275-9.
21. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Common themes in microbial pathogenicity revisited*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997. **61**(2): p. 136-69.
22. Niemann, H.H., W.D. Schubert, and D.W. Heinz, *Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view*. *Microbes Infect*, 2004. **6**(1): p. 101-12.
23. Soto, G.E. and S.J. Hultgren, *Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(4): p. 1059-71.
24. Braun, G. and M.C. Vidotto, *Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of Acinetobacter baumannii causing urinary tract infection*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004. **99**(8): p. 839-44.
25. Dersch, P., *Molecular and cellular mechanisms of bacterial entry into host cells*. *Contrib Microbiol*, 2003. **10**: p. 183-209.
26. Knapp, S., et al., *Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine Acinetobacter pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **173**(1): p. 122-9.
27. Lee, J.C., et al., *Adherence of Acinetobacter baumannii strains to human bronchial epithelial cells*. *Res Microbiol*, 2006. **157**(4): p. 360-6.
28. Choi, C.H., et al., *Outer membrane protein 38 of Acinetobacter baumannii localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells*. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(8): p. 1127-38.

29. Flemming, H.-C. and J. Wingender, *Biofilme — die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme*. Biologie in unserer Zeit, 2001. **31**(3): p. 169-180.
30. Flemming, H.-C. and J. Wingender, *Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide*. Chemie in unserer Zeit, 2002. **36**(1): p. 30-42.
31. Choong, S. and H. Whitfield, *Biofilms and their role in infections in urology*. BJU International, 2000. **86**(8): p. 935-941.
32. Costerton, J.W., *Overview of microbial biofilms*. J Ind Microbiol, 1995. **15**(3): p. 137-40.
33. Flemming, H.C. and J. Wingender, *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects*. Water Sci Technol, 2001. **43**(6): p. 9-16.
34. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.
35. Fitzpatrick, F., H. Humphreys, and P. O'Gara J, *Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 5): p. 509-10.
36. Stoodley, P., et al., *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure*. J Appl Microbiol, 1998. **85 Suppl 1**: p. 19S-28S.
37. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 187-209.
38. Schneider, R.P. and A. Leis, *Conditioning Films in Aquatic Environments*, in *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. 2003, John Wiley & Sons, Inc.
39. Pratt, L.A. and R. Kolter, *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 285-93.
40. Wimpenny, J.W.T. and R. Colasanti, *A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models*. FEMS Microbiology Ecology, 1997. **22**(1): p. 1-16.
41. Vandevivere, P. and D.L. Kirchman, *Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(10): p. 3280-6.
42. Davis, S.C., et al., *Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(1): p. 23-9.
43. Marti, S., et al., *Growth of Acinetobacter baumannii in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26030.
44. Marti, S., et al., *Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by Acinetobacter species*. BMC Res Notes, 2011. **4**: p. 5.

45. Vidal, R., et al., *Biofilm formation by Acinetobacter baumannii*. Microbios, 1996. **86**(346): p. 49-58.
46. Tomaras, A.P., et al., *Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 12): p. 3473-84.
47. Smith, M.G., et al., *New insights into Acinetobacter baumannii pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis*. Genes Dev, 2007. **21**(5): p. 601-14.
48. Karah, N., et al., *Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of Acinetobacter baumannii*. Drug Resist Updat, 2012.
49. Barker, J. and H. Maxted, *Observations on the growth and movement of Acinetobacter on semi-solid media*. J Med Microbiol, 1975. **8**(3): p. 443-6.
50. Henrichsen, J., *Twitching motility*. Annu Rev Microbiol, 1983. **37**: p. 81-93.
51. Henrichsen, J., *Not gliding but twitching motility of Acinetobacter calcoaceticus*. J Clin Pathol, 1984. **37**(1): p. 102-3.
52. Clemmer, K.M., R.A. Bonomo, and P.N. Rather, *Genetic analysis of surface motility in Acinetobacter baumannii*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 9): p. 2534-44.
53. Eijkelkamp, B.A., et al., *Adherence and motility characteristics of clinical Acinetobacter baumannii isolates*. FEMS Microbiol Lett, 2011. **323**(1): p. 44-51.
54. Skiebe, E., et al., *Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of Acinetobacter baumannii, depends on 1,3-diaminopropane*. Int J Med Microbiol, 2012. **302**(3): p. 117-28.
55. Wall, D. and D. Kaiser, *Type IV pili and cell motility*. Mol Microbiol, 1999. **32**(1): p. 1-10.
56. Mussi, M.A., et al., *The opportunistic human pathogen Acinetobacter baumannii senses and responds to light*. J Bacteriol, 2010. **192**(24): p. 6336-45.
57. Pelicic, V., *Type IV pili: e pluribus unum?* Mol Microbiol, 2008. **68**(4): p. 827-37.
58. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel, *Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment*. Microbiol Rev, 1994. **58**(3): p. 563-602.
59. Wolfgang, M., et al., *PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in piliated Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol, 1998. **29**(1): p. 321-30.
60. Griffith, F., *The Significance of Pneumococcal Types*. J Hyg (Lond), 1928. **27**(2): p. 113-59.
61. Dubnau, D., *Genetic competence in Bacillus subtilis*. Microbiol Rev, 1991. **55**(3): p. 395-424.

62. Havarstein, L.S., R. Hakenbeck, and P. Gaustad, *Natural competence in the genus Streptococcus: evidence that streptococci can change pherotype by interspecies recombinational exchanges*. J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6589-94.
63. Nedenskov-Sorensen, P., G. Bukholm, and K. Bovre, *Natural competence for genetic transformation in Campylobacter pylori*. J Infect Dis, 1990. **161**(2): p. 365-6.
64. Hofreuter, D., et al., *Natural competence for DNA transformation in Helicobacter pylori: identification and genetic characterization of the comB locus*. Mol Microbiol, 1998. **28**(5): p. 1027-38.
65. Dubnau, D., *The regulation of genetic competence in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 1991. **5**(1): p. 11-8.
66. Ansaldi, M. and D. Dubnau, *Diversifying selection at the Bacillus quorum-sensing locus and determinants of modification specificity during synthesis of the ComX pheromone*. J Bacteriol, 2004. **186**(1): p. 15-21.
67. Metzgar, D., et al., *Acinetobacter sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(19): p. 5780-90.
68. Palmen, R., et al., *Physiological characterization of natural transformation in Acinetobacter calcoaceticus*. J Gen Microbiol, 1993. **139**(2): p. 295-305.
69. Ramirez, M.S., et al., *Naturally competent Acinetobacter baumannii clinical isolate as a convenient model for genetic studies*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1488-90.
70. Mussi, M.A., et al., *Horizontal gene transfer and assortative recombination within the Acinetobacter baumannii clinical population provide genetic diversity at the single carO gene, encoding a major outer membrane protein channel*. J Bacteriol, 2011. **193**(18): p. 4736-48.
71. Kaase, M., et al., *NDM-2 carbapenemase in Acinetobacter baumannii from Egypt*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(6): p. 1260-2.
72. Perez, F., et al., *Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(10): p. 3471-84.
73. Higgins, P.G., et al., *Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(4): p. 821-3.
74. Wroblewska, M.M., et al., *Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of Acinetobacter baumannii in a tertiary-care hospital in Poland*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(5): p. 490-6.
75. Fournier, P.E., et al., *Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet, 2006. **2**(1): p. e7.

76. Pfeifer, Y., et al., *Molecular characterization of blaNDM-1 in an Acinetobacter baumannii strain isolated in Germany in 2007*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(9): p. 1998-2001.
77. Toleman, M.A., et al., *blaNDM-1 is a chimera likely constructed in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2773-6.
78. Paul Bd Fau - Snyder, S.H. and S.H. Snyder, *H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012(1471-0080 (Electronic)).
79. Schön, G., *Bakterien : die Welt der kleinsten Lebewesen*. 1999, München: Beck.
80. Kim, B.H. and G.M. Gadd, *Bacterial physiology and metabolism*. 2008: Cambridge University Press Cambridge.
81. Shatalin, K., et al., *H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria*. Science, 2011. **334**(6058): p. 986-90.
82. Blackstone, E., M. Morrison, and M.B. Roth, *H₂S induces a suspended animation-like state in mice*. Science, 2005. **308**(5721): p. 518.
83. Li, L. and P.K. Moore, *Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?* Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(2): p. 84-90.
84. Szabo, C., *Hydrogen sulphide and its therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(11): p. 917-35.
85. Yang, W., et al., *Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms*. J Physiol, 2005. **569**(Pt 2): p. 519-31.
86. Mustafa, A.K., et al., *H₂S signals through protein S-sulfhydration*. Sci Signal, 2009. **2**(96): p. ra72.
87. Dwyer, D.J., et al., *Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis*. Mol Cell, 2012. **46**(5): p. 561-72.
88. Dwyer, D.J., M.A. Kohanski, and J.J. Collins, *Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(5): p. 482-9.
89. Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, and J.J. Collins, *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(6): p. 423-35.
90. Poole, K., *Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria*. Trends Microbiol, 2012. **20**(5): p. 227-34.
91. van der Veen, S. and T. Abee, *Bacterial SOS response: a food safety perspective*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(2): p. 136-42.

92. Hunger, M., et al., *Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in Acinetobacter calcoaceticus and its use for Escherichia coli shuttle plasmids*. Gene, 1990. **87**(1): p. 45-51.
93. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
94. Avery, O.T., C.M. Macleod, and M. McCarty, *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii*. J Exp Med, 1944. **79**(2): p. 137-58.
95. Choi, K.H., A. Kumar, and H.P. Schweizer, *A 10-min method for preparation of highly electrocompetent Pseudomonas aeruginosa cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation*. J Microbiol Methods, 2006. **64**(3): p. 391-7.
96. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
97. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
98. Meyer, T.S. and B.L. Lamberts, *Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips*. Biochim Biophys Acta, 1965. **107**(1): p. 144-5.
99. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
100. Simmons, J.S., *A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi*. J Infect Dis, 1926: p. 209-214.
101. Peleg, A.Y., et al., *Galleria mellonella as a model system to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2605-9.
102. Wang, R., *Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?* FASEB J, 2002. **16**(13): p. 1792-8.
103. Hannig, M., *Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials*. Eur J Oral Sci, 1997. **105**(5 Pt 1): p. 422-33.
104. Hunter, R.C. and D.K. Newman, *A putative ABC transporter, hatABCDE, is among molecular determinants of pyomelanin production in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2010. **192**(22): p. 5962-71.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Gottfried Wilharm für die Themenstellung, die Betreuung und Begutachtung dieser Masterarbeit. Für seine hilfreichen Anregungen sowie wertvollen Hinweise und das Vertrauen in meine Arbeit bin ich sehr dankbar.

Bei Prof. Dr. Michael Steinert bedanke ich mich für die Übernahme der Begutachtung dieser Masterarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Evelyn Skiebe für ihre zuverlässige Unterstützung im Labor und das herzliche Arbeitsklima in unserer kleinen Arbeitsgruppe bedanken.

Ein weiterer Dank gilt den Doktoranden des Robert Koch Instituts Wernigerode, insbesondere Christine Heider, die mir bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen immer mit Rat und Tat zu Seite stand. Vielen Dank!

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid!