

**Untersuchungen zur biologischen
Funktion des trimeren Autotransporter
Adhäsins Ata in *Acinetobacter baumannii***

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

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

**Dissertation
von Marko Weidensdorfer**

Erstgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Volkhard Kempf

Darmstadt 2022

Weidensdorfer, Marko: Untersuchungen zur biologischen Funktion des trimeren
Autotransporter Adhäsins Ata in *Acinetobacter baumannii*
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung auf TUprints: 2022
Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2022

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

Die Liebe und Treue eines Hundes kann man nicht beschreiben, man muss sie erleben!

In stiller Trauer um Merle.

Zusammenfassung

Acinetobacter baumannii ist ein Gram-negatives humanpathogenes Bakterium, welches für eine Vielzahl von nosokomialen Infektionen verantwortlich ist. Das in *A. baumannii* beschriebene Membranprotein Ata gehört zur Familie der trimeren Autotransporter Adhäsine (TAA), die in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet sind und wichtige Virulenzfaktoren darstellen. Unter Verwendung eines markerlos generierten isogenen *ata*-Deletionsstammes sowie komplementierter Kontrollstämme wurde die Funktion von Ata bei der Infektion mit *A. baumannii* untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass die initiale Interaktion von *A. baumannii* an Bestandteile der extrazellulären Matrix durch Ata vermittelt wird. Weiterhin ist die Adhäsion des Bakteriums an humane Endothel- und Epithelzellen, sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* unter dynamischen Flussbedingungen, abhängig von Ata. Das Protein befähigt die Bakterien außerdem zu einer gesteigerten Invasionsrate in humane Zellen, die vermutlich über die Interaktion des TAAs mit β -Integrinen des Wirts gesteuert wird. Während der Infektion von humanen Endothelzellen mit *A. baumannii* bewirkt Ata eine zeitabhängige Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8. Dies führt unter anderem zu einer Ata-abhängigen Rekrutierung bzw. Aktivierung von humanen Immunzellen bzw. Hämozyten in den Larven der Großen Wachsmotte (*G. mellonella*). Ata stimuliert die Caspase 3- und Caspase 7-Aktivität, was zur Apoptose der Wirtszelle führt. Im *in vivo*-Infektionsmodell zeigt der Wildtyp-Stamm im Vergleich zum *ata*-Deletionsstamm eine erhöhte Pathogenität.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten belegen, dass das trimere Autotransporter Adhäsine Ata in *A. baumannii* ein wichtiger multifunktionaler Virulenzfaktor ist und somit maßgeblich zur erfolgreichen Etablierung einer Infektion von *A. baumannii* im menschlichen Körper beiträgt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Inhaltsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	9
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Genus <i>Acinetobacter</i>	2
1.1.1 Morphologie und Physiologie von <i>Acinetobacter</i> spp.....	3
1.1.2 Natürlicher Lebensraum von <i>Acinetobacter</i> spp.....	4
1.3 Klinische Bedeutung von <i>A. baumannii</i>	5
1.2 Virulenzfaktoren und -mechanismen von <i>A. baumannii</i>	5
1.2.1 Resistenz gegenüber Desinfektion, Trockenheit und oxidativem Stress.....	6
1.2.1.1 Trockenresistenz	7
1.2.1.2 Desinfektionsresistenz.....	7
1.2.1.3 Resistenz gegenüber oxidativem Stress.....	7
1.2.2 Biofilmbildung.....	8
1.2.3 Motilität.....	8
1.2.4 Wirtszellinteraktion und -modulation	9
1.2.5 Proteinsekretion	11
1.3 Infektionsmodelle zur Untersuchung der Pathogenität von <i>A. baumannii</i>	11
1.3.1 Limitationen und Grenzen von Tiermodellen	11
1.3.2 Pneumonie-Modelle	12
1.3.3 Haut- und Weichteilgewebe-Modelle	13
1.3.4 Sepsis-Modelle	14
1.3.5 Nicht-Säugetiermodelle.....	14
1.4 Trimere Autotransporter Adhäsine	15
1.4.1 Struktureller Aufbau von trimeren Autotransporter Adhäsinen ..	16
1.4.2 Sekretion und Proteinfaltung von trimeren Autotransporter Adhäsinen	19

1.4.3	TAA von <i>A. baumannii</i> : Das trimere Autotransporter Adhäsion Ata .	21
1.5	Zielsetzung und Fragestellung	23
2.	Material und Methoden	24
2.1	Isolation und Anzucht humaner Zellen	24
2.1.1	Isolation von humanen Nabelschnurendothelzellen	27
2.1.2	Nachweis endothelspezifischer Oberflächenprotein mittels Durchflusszytometrie.....	28
2.2	Kultivierung von Bakterien.....	29
2.2.1	Kultivierung von <i>A. baumannii</i>	29
2.2.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	31
2.3	Deletion und Komplementation der <i>ata</i> -codierenden Sequenz in <i>A. baumannii</i>	32
2.3.1	<i>In silico</i> Analysen von <i>ata</i> in <i>A. baumannii</i>	32
2.3.2	Deletion von <i>ata</i> in <i>A. baumannii</i>	32
2.3.3	Komplementierung der Ata-codierenden Sequenz in <i>A. baumannii</i> Δ <i>ata</i>	36
2.3.4	Wachstumsanalysen von <i>A. baumannii</i>	38
2.3.5	Untersuchung der <i>ata</i> -Expression mittels qRT-PCR	39
2.3.6	Immunologische Untersuchung von Ata.....	42
2.4	Untersuchungen zur Adhärenz von <i>A. baumannii</i> an abiotischen Faktoren und humane Zellen	46
2.4.1	Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an abiotische Faktoren	46
2.4.2	Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an humane Zellen	47
2.4.2.1	Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an humane Zellen unter statischen Infektionsbedingungen.....	47
2.4.2.2	Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an humane Zellen unter dynamischen Infektionsbedingungen.....	49
2.4.2.3	Quantifizierung adhärenter Bakterien mittels qRT-PCR	50
2.5	Etablierung von Adhärenzversuchen mit <i>A. baumannii</i> im Nabelschnurmodell.....	52
2.5.1	Mikro-Computer-Tomografie, Scherkraft-Berechnung und Doppler-Analyse.....	54
2.6	Invasion von <i>A. baumannii</i> in humane Zellen.....	56

2.7	Ata-abhängige Modulation der Wirtszellantwort durch <i>A. baumannii</i>	57
2.7.1	Quantifizierung induzierter humaner Zytokine und Chemokine.	57
2.7.2	Untersuchung der Transmigration humaner Monozyten	58
2.7.3	Bestimmung der Hämozytenaktivität im <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell.....	59
2.8	Untersuchungen zur Pathogenität und Zytotoxizität von <i>A. baumannii</i>	60
2.8.1	Analysen zur Ata-vermittelten Serumresistenz.....	60
2.8.2	Untersuchungen zur Ata-vermittelten Induktion von Apoptose und Nekrose.....	62
2.8.3	<i>In vivo</i> Pathogenität von <i>A. baumannii</i> im <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell.....	65
2.9	Gesamtproteomanalyse infizierter Endothelzellen	66
2.10	Datenanalyse, Bildbearbeitung und statistische Auswertung	68
2.11	Angaben zur wissenschaftlichen Eigenleistung.....	69
3.	Ergebnisse	70
3.1	Nachweis Endothel-spezifischer Oberflächenmoleküle auf isolierten HUVECs.....	70
3.2	Nachweis der erfolgreichen Deletion und Komplementation von <i>ata</i>	72
3.2.1	Expression von <i>ata</i> in <i>A. baumannii</i>	74
3.2.2	Detektion von Ata auf der Oberfläche von <i>A. baumannii</i>	75
3.2.3	Wachstumskontrollen der verschiedenen <i>A. baumannii</i> -Stämme.....	78
3.3	Ata-vermittelte Adhäsion an abiotische und biotische Faktoren ..	80
3.3.1	Ata bindet an Bestandteile der extrazellulären Matrix	80
3.3.2	Fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Nachweis der Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an humane Zellen	82
3.3.3	Quantifizierung adhärenter <i>A. baumannii</i> an humanen Zellen nach einer statischen Infektion.....	84
3.3.4	Nachweis adhärenter <i>A. baumannii</i> auf humanen Zellen nach einer dynamischen Infektion.....	86

3.3.5	Einfluss von $\alpha_4\beta_1$ -Integrinen auf die Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an Endothelzellen.....	89
3.3.6	Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an humanes Nabelschnurendothel im <i>ex vivo</i> Infektionsmodell	91
3.3.7	Vergleich der Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an Endothel- bzw. Epithelzellen <i>in vitro</i> mit Nabelschnurvenenendothel <i>ex vivo</i>	94
3.4	Ata-vermittelte Invasion in humane Endothel- und Epithelzellen.	96
3.5	Ata-vermittelte Modulation der Wirtszellantwort durch <i>A. baumannii</i>	98
3.5.1	Nachweis der Segregation von IL-6 und IL-8 nach der Infektion von HUVECs mit <i>A. baumannii</i>	98
3.5.2	Rekrutierung von Immunzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> durch die Infektion von HUVECs und <i>G. mellonella</i> mit <i>A. baumannii</i>	101
3.6	Ata-vermittelte Resistenz gegenüber dem humanen Komplement-System.....	104
3.6.1	Die Aktivierung des Komplement-Systems durch <i>A. baumannii</i> geschieht über den alternativen Weg	106
3.7	Ata-vermittelte Apoptose in humanen Endothelzellen	108
3.7.1	Die Infektion von humanen Zellen mit <i>A. baumannii</i> führt zu einer Ata-unabhängigen LDH-Freisetzung	109
3.7.2	Ata vermittelt die Induktion von Apoptose in HUVECs.....	110
3.7.3	Die Ata-abhängige Induktion der Apoptose führt zu einer spezifischen Caspase 3- und Caspase 7-Aktivierung	113
3.8	Ata-abhängige Pathogenität von <i>A. baumannii in vivo</i>	114
3.9	Gesamtproteomanalyse infizierter HUVECs	116
4.	Diskussion	122
4.1	Genetische Manipulation von <i>ata</i> in <i>A. baumannii</i> durch homologe Rekombination.....	123
4.2	Die Bindung von <i>A. baumannii</i> an extrazelluläre Matrixproteine ist Ata-abhängig.....	125
4.3	<i>A. baumannii</i> bindet über Ata an eine Vielzahl von humanen Wirtszellen.....	126
4.3.1	Scherkräfte im dynamischen Infektionsprozess haben einen Einfluss auf die Adhäsion von <i>A. baumannii</i>	129

4.3.2	Die Blockierung von α - und β -Integrinen führt zur Reduktion der Adhäsion von <i>A. baumannii</i>	131
4.3.3	Das humane <i>ex vivo</i> Organinfektionsmodell zur Untersuchung der Ata-abhängigen Adhäsion von <i>A. baumannii</i>	132
4.4	<i>A. baumannii</i> zeigt eine Ata-vermittelte Invasion in humane Endothel- und Epithelzellen.....	133
4.5	Die Infektion von humanen Endothelzellen mit <i>A. baumannii</i> führt zu einer inflammatorischen Wirtszellantwort	136
4.6	Ata wirkt inhibierend auf das humane Komplementsystem	139
4.7	<i>A. baumannii</i> induziert eine Ata-abhängige Apoptose über die Caspasen 3 und 7	141
4.8	Untersuchung der <i>A. baumannii</i> -modulierten Wirtszellantwort mittels Gesamtproteomanalyse.....	144
4.9	Das Überleben von <i>G. mellonella</i> bei einer <i>A. baumannii</i> -Infektion ist Ata-abhängig.....	145
4.10	Ata als multifunktionelles Protein	146
Anhang.....		148
Literaturverzeichnis		163
Danksagung		192
Lebenslauf.....		193
Ehrenwörtliche Erklärung		195

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht von <i>Acinetobacter</i> Spezies mit eindeutiger Validierung und assoziiertem Habitat.	3
Tabelle 2. Übersicht bisher etablierter Tierversuchsmodelle und deren Studienziele.	15
Tabelle 3. Auswahl bisher bekannter trimerer Autotransporter Adhäsine in verschiedenen Gram-negativen Bakterien.	18
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten humanen Zellen und entsprechenden Zellkulturmedien zur Anzucht, Aussaat und Ko-Kultivierung mit <i>A. baumannii</i>	25
Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Zellzahlen und Volumina für entsprechende Zellkulturschalen.	26
Tabelle 6. Lasereinstellungen des Durchflusszytometers für die Messung von endothelzellspezifischen Oberflächenmolekülen.....	29
Tabelle 7. In dieser Arbeit verwendete <i>A. baumannii</i>	30
Tabelle 8. In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i>	31
Tabelle 9. Oligonukleotide zur Deletion von <i>ata</i> in <i>A. baumannii</i>	34
Tabelle 10. Temperaturprofil für die Amplifikation der <i>ata</i> -flankierenden Bereiche.	34
Tabelle 11. Übersicht der zur Komplementierung von <i>ata</i> verwendeten Oligonukleotide und Plasmide.....	37
Tabelle 12. Auflistung der zur <i>ata</i> -Expressionsanalyse verwendeten Oligonukleotide und Plasmide.....	39
Tabelle 13. Temperaturprofil der <i>ata</i> -RT- und <i>rpoB</i> -RT-PCR.....	39
Tabelle 14. Temperaturprofil für die reverse Transkription und Amplifikation zur Analyse der <i>ata</i> -Expression.	41
Tabelle 15. Übersicht über die zur Klonierung der Kopfdomäne von <i>Ata</i> verwendeten Oligonukleotide und Plasmide.	42
Tabelle 16. Zusammensetzung eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach Schägger und Jagow.	43

Tabelle 17. Übersicht der zur Untersuchung der Adhärenz von <i>A. baumannii</i> verwendeten extrazellulären Matrixproteine und rekombinanten Oberflächenproteine.	46
Tabelle 18. Übersicht der zur Herstellung interner DNA-Standards für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide und Plasmide.	51
Tabelle 19. Temperaturprofil für die Amplifikation der <i>rpoB</i> -RT- und <i>hmbS</i> -RT-Fragmente mittels qRT-PCR.	51
Tabelle 20. Parameter zur Analyse der Nabelschnurvenenstruktur mittels mikro-CT.	55
Tabelle 21. Einstellung des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite 200pro (Tecan) zur Bestimmung der relativen Fluoreszenz- und Lumineszenzeinheiten.	63
Tabelle 22. Lasereinstellungen für die Quantifizierung von Apoptose und Nekrose in infizierten HUVECs.	64
Tabelle 23. Differenzierung infizierter HUVECs mittels Durchflusszytometrie. .	64
Tabelle 24. Vergleich der Adhäsionsraten von <i>A. baumannii</i> WT an humane Endothel- bzw. Epithelzellen und an Nabelschnurvenenendothel.	96
Tabelle 25. Übersicht der stark regulierten ($-3 \leq$ und ≥ 3 , p-Wert < 0,05) Proteine in den Analysen der einzelnen Vergleichsgruppen.	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Übersicht bekannter Membran-gebundener Virulenzfaktoren und identifizierter Sekretionssysteme in <i>A. baumannii</i>	6
Abbildung 2. Übersicht bekannter Mechanismen der Immunantwort humaner Zellen auf eine Infektion mit <i>A. baumannii</i>	10
Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung des modularen Aufbaus von trimeren Autotransporter Adhäsinen.....	17
Abbildung 4. Translokation von trimeren Autotransporter Adhäsinen über die innere und äußere Membran von Gram-negativen Bakterien.....	21
Abbildung 5. Darstellung des trimeren Autotransporter Adhäsins Ata in <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	22
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Deletion von <i>ata</i> in <i>A. baumannii</i>	33
Abbildung 7. Materialien und Versuchsaufbau zur dynamischen Infektion humaner Zellen mit <i>A. baumannii</i>	50
Abbildung 8. Übersicht zur Präparation und Infektion der Nabelschnurvene.....	54
Abbildung 9. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Hämozyten aus <i>G. mellonella</i>	60
Abbildung 10. Durchflusszytometrische Untersuchung von Endothel-spezifischen Oberflächenmolekülen bei frisch isolierten HUVECs.....	71
Abbildung 11. Nachweis der erfolgreichen Deletion und Komplementation der Ata-codierenden Sequenz in <i>A. baumannii</i>	72
Abbildung 12. Zeitabhängiger Nachweis der <i>ata</i> -Expression in <i>A. baumannii</i>	74
Abbildung 13. Zeitabhängige Induktion und Isolation der heterolog synthetisierten Ata-Kopf-Domäne-6xHis.....	76
Abbildung 14. Nachweis der Oberflächenassemblierung von Ata auf <i>A. baumannii</i>	78
Abbildung 15. Wachstumsanalysen der verschiedenen <i>A. baumannii</i> -Stämme.....	79
Abbildung 16. Nachweis der Ata-abhängigen Bindung von <i>A. baumannii</i> an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an rekombinante endotheliale Adhäsionsmoleküle.....	81

Abbildung 17 <i>A. baumannii</i> bindet Ata-abhängig an die Oberfläche von endothelialen und epithelialen Wirtszellen.	83
Abbildung 18. Quantifizierung adhärenter <i>A. baumannii</i> auf humanen Endothel- und Epithelzellen.	85
Abbildung 19. Nachweis adhärenter Bakterien an humanen Zellen nach dynamischer Infektion.	87
Abbildung 20. Quantifizierung adhärenter Bakterien an humanen Zellen nach dynamischer Infektion.	88
Abbildung 21. Adhäsion von <i>A. baumannii</i> an HUVECs nach spezifischer Neutralisierung von oberflächenassoziierten Rezeptormolekülen.....	90
Abbildung 22. Struktur- und Strömungsanalyse in der Nabelschnurvene.	92
Abbildung 23. Bestimmung der Venendurchmesser und der damit verbundenen Scherkräfte in der Nabelschnurvene.....	93
Abbildung 24. Adhäsionsanalyse von <i>A. baumannii</i> im <i>ex vivo</i> Infektionsmodell.	94
Abbildung 25: Ata-vermittelte Invasion von <i>A. baumannii</i> in humane Endothel- und Epithelzellen.....	97
Abbildung 26. Ata-abhängige Segregation von IL-6 und IL-8 in HUVECs.....	99
Abbildung 27. Ata-vermittelte zeitabhängige Induktion von IL-6 und IL-8 in HUVECs durch die Infektion mit <i>A. baumannii</i>	101
Abbildung 28. Die Infektion von HUVECs mit <i>A. baumannii</i> bewirkt eine Ata-vermittelte Migration von humanen Monozyten.....	102
Abbildung 29. Das Überleben von <i>A. baumannii</i> und die Aktivierung larvaler Immunzellen ist abhängig von Ata.	104
Abbildung 30. Das Vorhandensein von Ata führt zur Resistenz gegenüber normalem humanen Serum.	106
Abbildung 31. Die Inkubation von <i>A. baumannii</i> in NHS führt zur Inaktivierung des klassischen und Lektin-Weges.....	108
Abbildung 32. Die Freisetzung von LDH aus infizierten humanen Endothelzellen ist Ata-unabhängig.	109
Abbildung 33. Durchflusszytometrischer Nachweis der Ata-vermittelten Apoptose-Induktion in HUVECs.	111
Abbildung 34. Übersicht der durchflusszytometrischen Daten zur Ata-vermittelten Apoptose-Induktion in HUVECs.	112

Abbildung 35. Ata-vermittelte Caspase 3- und Caspase 7-Aktivierung in HUVECs.	114
Abbildung 36. Das Überleben von <i>G. mellonella</i> ist abhängig vom Vorhandensein des trimeren Autotransporters Ata.	116
Abbildung 37. Grafische Darstellung der signifikanten Proteininduktionen mittels Volcano-Plot.	118
Abbildung 38. Grafische Zuordnung der detektierten Proteine zu ihrer biologischen Funktion in der Wirtszelle.	120
Abbildung 39. Modell zur Beschreibung der biologischen Funktion von Ata in <i>A. baumannii</i>	129
Abbildung 40. Modell zur Ata-vermittelten Invasion von <i>A. baumannii</i> in die humane Wirtszelle.	135
Abbildung 41. Modell zur Induktion von Zytokinen bzw. Chemokinen durch <i>A. baumannii</i>	139

1. Einleitung

Infektionen durch pathogene Bakterien und deren effektive Behandlung rücken immer mehr in den Fokus der klinischen Grundlagenforschung. Durch die Entdeckung des Penicillins im Jahre 1929 durch Alexander Fleming [1] gelang der bis dahin größte Durchbruch in der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen, dass den Beginn des Zeitalters der Antibiotika markiert. In den Folgejahren wurden zahlreiche neue Substanzen entdeckt oder entwickelt, die erfolgreich zur antimikrobiellen Therapie eingesetzt wurden. Jedoch führte der inadäquate Gebrauch dieser Substanzen zur Resistenzentwicklung bei vielen Bakterien. Im Jahr 2013 veröffentlichte das nationale Zentrum für Infektionskrankheiten der Vereinigten Staaten (*United States Centers for Disease Control, CDC*) zum ersten Mal eine umfangreiche Studie, welche das Auftreten von multiresistenten Bakterien und deren verheerende Folgen verdeutlicht [2].

Von größter Bedeutung sind heutzutage sogenannte nosokomiale Infektionen (engl. *healthcare associated infections*), die bei Patienten auftreten, die sich stationär oder ambulant in medizinischer Behandlung befinden und vor Beginn der Behandlung keine bakterielle Infektion aufwiesen. Hierbei können sich Infektionen im Zusammenhang mit anderen Krankheiten oder sogar erst nach der Entlassung der Patienten aus dem Krankenhaus entwickeln [3]. Vor allem invasive Behandlungsansätze wie beispielsweise Katheter oder Beatmungsmaschinen werden als häufigste Ursache für das Entstehen einer solchen Infektion beobachtet [4]. Nosokomiale Infektionen werden entsprechend ihrer Lokalisation im menschlichen Körper wie folgt unterteilt: (i) zentrale Blutstrominfektionen [5], (ii) Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen [6], (iii) Wundinfektionen [7] und (iv) Beatmungs-assoziierte Lungeninfektionen [8].

Die am häufigsten nachgewiesenen Erreger dieser nosokomialen Infektionen sind pathogene Bakterien. Einige dieser Bakterien sind Bestandteil der natürlichen Flora und verursachen nosokomiale Infektionen primär bei immungeschwächten Patienten. Beispiele hierfür sind *Clostridium difficile*, *Klebsiella* spp. und *Escherichia coli* [9]. *A. baumannii* verursacht 2 % bis 10 % aller noso-

komialen Infektionen [10] und zählt damit zu einem der bedeutsamsten Pathogenen weltweit. Nicht zuletzt rückte diese Spezies in den Fokus der medizinischen Grundlagenforschung, als die Weltgesundheitsorganisation (*World health organisation*, WHO) *A. baumannii* im Februar 2017 auf die Liste der Bakterien setzte, für welche die Entwicklung neuer Antiinfektiva höchste Relevanz hat [11].

1.1 Das Genus *Acinetobacter*

Erste Beschreibungen des Genus *Acinetobacter* gehen auf das Jahr 1911 zurück. Der niederländische Mikrobiologe Willem Beijerinck isolierte ein pathogenes Bakterium aus Erdproben, kultivierte es auf Calcium-Azetat-haltigem Nährboden und benannte es *Micrococcus calcoaceticus* [12]. In den folgenden Jahren war eine eindeutige Klassifizierung des Bakteriums schwierig und verschiedenste Bezeichnungen wie beispielsweise *Achromobacter anitratus*, *Achromobacter mucosus* oder *Alcaligenes haemolysans* kursierten innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft [13]. Erst 43 Jahre nach der ersten Beschreibung dieses Bakteriums wurde es durch Brisou und Prevot im Jahr 1954 erstmals eindeutig klassifiziert [14]. Die Wissenschaftler benannten die Spezies von nun an *Acinetobacter*, welches sich von *akinetos* (griechisch für unbeweglich) ableitet. Basierend auf der Motilität von *Acinetobacter* wurden die Spezies den Achromobacterae zugeschrieben. Die Bakterien sind nicht-pigmentiert, zeichnen sich durch einen saprophytischen Stoffwechsel aus und umfassen sowohl Oxidase-positive als auch -negative Spezies [14]. Drei Jahre später identifizierte Brisou mit *A. anitratum* einen weiteren Vertreter der neu definierten Gattung *Acinetobacter* [15]. Mit der Erscheinung des *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* im Jahr 1974 wurde die Gattung *Acinetobacter* der Familie *Neisseriaceae* zugeordnet [12].

Durch die Entwicklung neuer Methoden zur Speziesidentifizierung in den vergangenen Jahren wurde die Taxonomie der Gattung *Acinetobacter* grundlegend geändert. Heutige Klassifizierungen ordnen die Spezies *Acinetobacter* der Gruppe von γ -Proteobakterien, der Ordnung der Pseudomonadales und der Familie der *Moraxellaceae* zu. Im Kontext der klinischen Relevanz ist hierbei vor allem die Spezies *A. baumannii* zu nennen [13]. Neben diesen besonders klinisch

relevanten Spezies wurden in den vergangenen Jahren eine Vielzahl weiterer *Acinetobacter* spp. beschrieben. Eine Auswahl der bekannten Spezies mit deren natürlichen Habitat ist in folgender Tabelle aufgelistet (**Tabelle 1**).

Tabelle 1. Übersicht von *Acinetobacter* Spezies mit eindeutiger Validierung und assoziiertem Habitat.

Bezeichnung	Ursprung bzw. isoliert aus	Referenz
<i>A. calcoaceticus</i>	Bodenmaterial und Mensch	[16]
<i>A. baumannii</i>	Mensch, Bodenmaterial, Fleisch, Gemüse	[16, 17]
<i>A. haemolyticus</i>	Mensch	[16]
<i>A. junii</i>	Mensch	[16]
<i>A. johnsonii</i>	Mensch, Tier	[16]
<i>A. lwoffii</i>	Mensch, Tier	[16]
<i>A. radioresistens</i>	Mensch, Bodenmaterial, Baumwolle	[16, 18]
<i>A. ursingii</i>	Mensch	[19]
<i>A. schindleri</i>	Mensch	[19]
<i>A. parvus</i>	Mensch, Tier	[20]
<i>A. baylyi</i>	Bodenmaterial, Klärschlamm	[21, 22]
<i>A. bouvetii</i>	Klärschlamm	[21]
<i>A. towneri</i>	Klärschlamm	[21]
<i>A. tandoii</i>	Klärschlamm	[21]
<i>A. grimontii</i>	Klärschlamm	[21]
<i>A. tjernbergiae</i>	Klärschlamm	[21]
<i>A. gerneri</i>	Klärschlamm	[21]

Besonders durch die stetige Weiterentwicklung molekularbiologischer Nachweisverfahren und Genomsequenzierungsmethoden werden immer wieder neue *Acinetobacter*-Spezies identifiziert: In Krankenhausabwässern entdeckte man beispielsweise die Spezies *A. chinensis* [23] und *A. defluvii* [24] und im Jahr 2017 wurde ein *A. indicus*-ähnliches Isolat in Rindern beschrieben [25].

1.1.1 Morphologie und Physiologie von *Acinetobacter* spp.

Vertreter der Gattung *Acinetobacter* haben typischerweise eine kurze, pleomorphe Form mit einer Größe von 1,0 µm bis 2,5 µm während der exponentiellen und eine mehr kokkoide Form in der stationären Wachstumsphase. Hier können sich die Bakterien zu Paaren oder Ketten verschiedener Längen zusammenfügen [13]. Auf Blutagar werden *Acinetobacter*-Kolonien als weiße bis cremefarbene,

glatte oder schleimige (sofern eine Kapsel vorhanden ist) Kolonie mit einem Durchmesser von 1 mm bis 2 mm beschrieben. Werden die Bakterien auf Herellea-Agar kultiviert, so weisen die Kolonien eine lila Farbe auf [12]. Vertreter der Gattung *Acinetobacter* werden als strikt aerobe, motile, Katalase-positive, Indol-negative, Oxidase-negative, Gram-negative und Zitrat-positive Bakterien beschrieben [26, 27]. Der G-C-Gehalt des Genoms beträgt 39 % bis 47 % [28]. Viele *Acinetobacter*-Spezies sind unfähig zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit und wachsen unter Temperaturbedingungen von 33 °C bis 37 °C [12].

1.1.2 Natürlicher Lebensraum von *Acinetobacter* spp.

Eine eindeutige Beschreibung der natürlichen Habitate von *Acinetobacter* spp. ist schwierig, da diese heterogene Gruppe von Bakterien nahezu überall in der Umwelt zu finden ist. Nur wenige Spezies können bestimmten ökologischen Nischen wie beispielsweise Boden, Wasser, Abwasser, Menschen, Nahrungsmitteln oder Tieren zugeschrieben werden [12, 13].

Als Bestandteil der bakteriellen Hautflora des Menschen findet man *Acinetobacter* spp. sowohl auf Schleimhäuten oder in der Speiseröhre als auch in Sekreten des respiratorischen Traktes [29]. In einer breit angelegten Studie von Seifert *et al.* wurden diverse *Acinetobacter* spp. von verschiedenen Bereichen des menschlichen Körpers isoliert [30]. Positive Befunde gab es sowohl im Bereich der Vorhaut, der Nase, der Ohren, des Halses, der Luftröhre, der Bindehaut, der Hände, der Vagina, des Damms, der Axilla, der Leistengegend als auch der Zehenzwischenräume.

Aber auch von Tieren, vor allem von Vögeln und Fischen, konnten Bakterien der Gattung *Acinetobacter* isoliert werden [28]. Außerdem wurden sie in verschiedenen Lebensmitteln wie rohem Gemüse, Früchten und Milchprodukten gefunden [31, 32].

Diese Bakterien können zudem über einen sehr langen Zeitraum von bis zu 4 Monaten unter trockenen Umweltbedingungen überleben [33]. Besonders das humanpathogene Bakterium *A. baumannii* wird häufig von wiederverwendbaren medizinischen Geräten isoliert [34–36].

1.3 Klinische Bedeutung von *A. baumannii*

A. baumannii ist ein opportunistisches Humanpathogen, das vor allem Patienten mit schwerer klinischer Symptomatik infiziert. In den vergangenen Jahren ist es besonders durch das Auftreten neuer Antibiotikaresistenzen zu einer ernstzunehmenden Gefahr in Kliniken geworden. Hierbei können sogar sogenannte pan-resistente Bakterienstämme auftreten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie gegen jedes verfügbare Antibiotikum eine Resistenz aufweisen. In den Vereinigten Staaten und in Europa verursacht *A. baumannii* ca. 2 % der nosokomialen Infektionen, in Asien oder dem mittleren Osten ist der Anteil doppelt so hoch [37, 38]. Obwohl dies im Vergleich zu anderen Gram-negativen Bakterien gering erscheint, so weisen 45 % bis 70 % der isolierten *A. baumannii* einen multiresistenten Charakter auf [39]. Das entspricht einem vierfach höheren Auftreten von Multiresistenzen in *A. baumannii* gegenüber anderen Gram-negativen Spezies wie beispielsweise *K. pneumoniae* oder *P. aeruginosa*.

Entsprechend der Lokalisation der Bakterien auf oder im menschlichen Körper können diverse Krankheitsbilder entstehen. Hierbei treten am häufigsten durch invasive Beatmung hervorgerufene Lungenentzündungen oder Septikämien auf [40]. Weniger häufig sind Infektionen der Haut, der Harnwege oder von post-operativen Wunden zu beobachten [40, 41].

Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten ausgiebig an der Entstehung der Antibiotikaresistenzen und deren Verbreitung bei *A. baumannii* geforscht wurde, so ist der Wissensstand zu Virulenzfaktoren, die den teilweise hochvirulenten Charakter einiger *A. baumannii*-Isolate beschreiben würden, begrenzt. Das bisherige Verständnis der Virulenz von *A. baumannii* lässt eine Persistenz-Resistenz-Strategie der Bakterien vermuten.

1.2 Virulenzfaktoren und -mechanismen von *A. baumannii*

Es wird angenommen, dass zwei besondere Eigenschaften von *A. baumannii* dazu beitragen, dass sich dieser Keim im klinischen Umfeld so stark ausgebreitet hat: Das ist auf der einen Seite die Fähigkeit, dass *A. baumannii* Antibiotikaresistenzen entwickelt und auf der anderen Seite eine hohe Persistenz aufweist [42].

An dieser Stelle soll eine Auswahl bekannter Virulenzfaktoren und -mechanismen von *A. baumannii* beschrieben werden (**Abbildung 1**). Zu den bedeutsamen Faktoren zählen vor allem membranständige Proteine und Lipopolysaccharide wie das Typ-II-Sekretionssystem, das Lipooligosaccharid oder das in dieser Arbeit untersuchte Ata (trimere Autotransporter Adhäsine). Neben den Membranassoziierten Faktoren gibt es auch extrazelluläre Bestandteile des Virulenzsystems von *A. baumannii*. Hier sind besonders die Lipase LipA und das in extrazellulären Vesikeln eingelagerte Protein OmpA zu nennen.

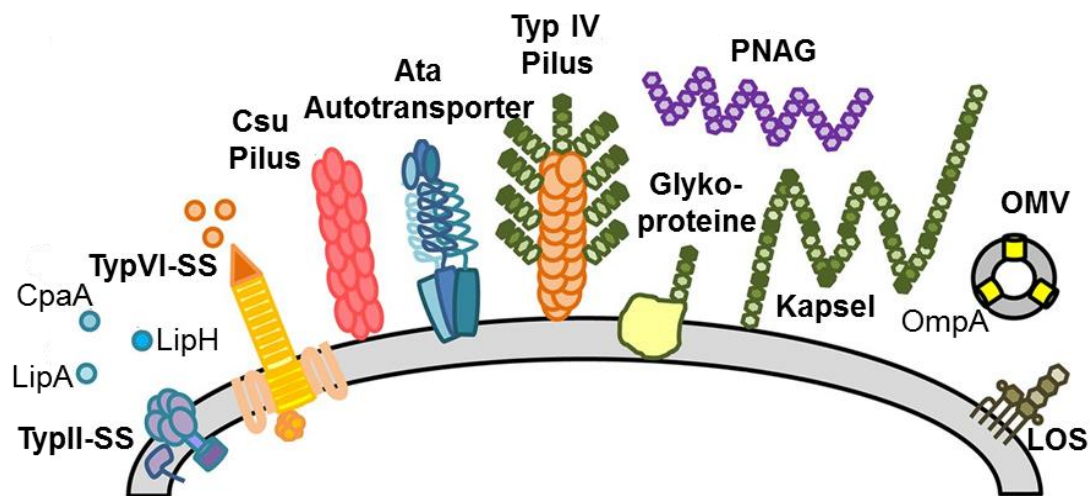


Abbildung 1. Übersicht bekannter Membran-gebundener Virulenzfaktoren und identifizierter Sekretionssysteme in *A. baumannii*. Abkürzungen: TypII-SS = Typ-II-Sekretionssystem, LipA = Lipoyl Synthase, LipH = Lipase spezifisches Chaperon, CpaA = Metalloproteinase, TypVI-SS = TypVI-Sekretionssystem, Csu Pilus = Chaperon-Usher-Pilus, Ata = trimere Autotransporter Adhäsine, PNAG = Poly-N-Acetyl- β -(1-6)-Glucosamin, OmpA = Membranprotein A, OMV = Membranvesikel und LOS = Lipooligosaccharide. Die Abbildung wurde modifiziert nach Weber *et al.*, 2016 [43].

1.2.1 Resistenz gegenüber Desinfektion, Trockenheit und oxidativem Stress

Besonders in Kliniken ist *A. baumannii* längeren Perioden von Trockenheit auf medizinischen Geräten und wiederholten Desinfektionsvorgängen ausgesetzt. Vergleichbar zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzen hat das Bakterium jedoch Strategien entwickelt, damit es unter diesen lebensfeindlichen Bedingungen überleben und sich sogar weiter ausbreiten kann [44].

1.2.1.1 Trockenresistenz

Die Möglichkeit, unter trockenen Bedingungen zu überleben, variiert zwischen einzelnen *A. baumannii*-Stämmen stark. Einige können diesen widrigen Umständen über einen Zeitraum von bis zu 100 Tagen widerstehen [45, 46]. Ein genauer Mechanismus, der zur Trockenresistenz führt, ist jedoch noch nicht bekannt. Von *A. baylyi* weiß man, dass dieser in der Lage ist, eine Hülle aus sich wiederholenden Kohlenhydraten zu bilden, welche den Organismus vor Austrocknung schützt und verhindert, dass vorhandenes Wasser an die Umwelt abgegeben wird [47]. Bei *A. baumannii* wurden ähnliche Biosynthesewege beschrieben, was eine zu *A. baylyi* vergleichbare Strategie nahelegt [48]. Aktuelle Forschungsergebnisse belegen zudem, dass *A. baumannii* organische Verbindungen, die den osmotischen Zustand der Zelle beeinflussen, in Form von Trehalose oder Mannitol synthetisiert. Diese sogenannten kompatiblen Solute verschieben das osmotische Gleichgewicht und wirken somit einer Austrocknung entgegen [49, 50].

1.2.1.2 Desinfektionsresistenz

Das Desinfektionsmittel Chlorhexidin wird häufig in Krankenhäusern oder anderen medizinischen Einrichtungen verwendet. In *A. baumannii* konnte die Efflux-Pumpe Acel identifiziert werden, das Chlorhexidin effizient aus der Zelle befördert und somit der desinfizierenden Wirkung entgegenwirkt [51]. Für das Desinfektionsmittel Ethanol konnte gezeigt werden, dass es in geringen Konzentrationen das Wachstum und die Virulenz von *A. baumannii* sogar fördert [52–54].

1.2.1.3 Resistenz gegenüber oxidativem Stress

A. baumannii reagiert auf oxidativen Stress mit der vermehrten Synthese von Proteinen, welche reaktive Sauerstoffspezies unschädlich machen [55]. Es wurden zudem Mutationen des Katalase codierenden Gens *katG* beschrieben, die zu einer vermehrten Genexpression des Proteins führt [56]. Dies bewirkt sehr hohe Toleranzen gegenüber Wasserstoffperoxid im Bereich von 100 mM bis 320 mM [57].

1.2.2 Biofilmbildung

Als mikrobielle Biofilme bezeichnet man Gemeinschaften von Bakterien die innerhalb einer extrazellulären Matrix eingebettet und somit gegenüber äußeren Einflüssen besonders widerstandsfähig sind [58, 59]. Für *A. baumannii* scheint die Bildung von Biofilmen eine besondere Rolle bei der Interaktion mit seinem Wirtsorganismus zu haben. So bilden sie beispielsweise bei einer Infektion der Haut oder von Wunden aber auch auf medizinischen Geräten wie Trachealtuben oder Polycarbonaten robuste Biofilme [59, 60].

Bisherige Forschungsergebnisse belegen eine Vielzahl von Faktoren, die an der Bildung von Biofilmen sowohl aktiv als auch passiv beteiligt sind. Eine große Anzahl der untersuchten *A. baumannii*-Stämme weist beispielsweise ein *Typ I Chaperone-Usher Pilus* System (membranständige, lineare Fimbrien) namens Csu auf (**Abbildung 1**). Dieses ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Bildung von Biofilmen auf abiotischen und biotischen Oberflächen [61–63]. Außerdem wurde gezeigt, dass *A. baumannii* lange Biofilm-assoziierte Proteine (Bap) bildet [64]. Diese werden über das Typ I Sekretionssystem an die Oberfläche der Bakterien transportiert und führen zur aktiven Biofilmbildung der Bakterien [65]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der maßgeblich an der Bildung von Biofilmen beteiligt ist, stellt die Produktion von Poly- β -1,6-*N*-Acetylglucosamin (PNAG, **Abbildung 1**) dar [66].

1.2.3 Motilität

Bei vielen Bakterien ist die Fähigkeit der Motilität eng mit ihrer Pathogenität verbunden. Paradoxerweise entspricht die Bezeichnung *Acinetobacter* einem unbeweglichen Stäbchen: *A. baumannii*- und *A. nosocomialis*-Stämme sind jedoch zu zwei Formen der bakteriellen Lokomotion befähigt, (i) der Oberflächen-assoziierten Motilität und (ii) der *twitching* Motilität (Flagellen-unabhängige Form der Translokation über feuchte Oberflächen) [67]. Die Form der *twitching*-Motilität ist in *A. baumannii* durch das Vorhandensein eines voll funktionsfähigen Typ IV Pilus (**Abbildung 1**) gewährleistet [68, 69]. Es wurde beobachtet, dass diese Motilität mit der Virulenz einzelner *A. baumannii*-Stämme korreliert [70]. Die Oberflächen-assoziierte Motilität von *A. baumannii* ist vergleichbar mit dem

Schwärmen von *P. aeruginosa* [71], jedoch fehlen *A. baumannii* hierfür die entsprechenden Flagellen. Zudem ist diese Art der Motilität stark von der Synthese von 1,3-Diaminopropan (DAP), dem bakteriellen *quorum sensing* und der Produktion von Lipooligosacchariden (LOS, **Abbildung 1**) abhängig [27, 72, 73]. Dabei können sowohl DAP als auch LOS als Lockstoffe dienen, die eine Oberflächen-assoziierte Motilität in Form von *quorum sensing* hervorrufen.

1.2.4 Wirtszellinteraktion und -modulation

A. baumannii kann mit verschiedenen humanen Wirtszellen interagieren – zum Beispiel mit Epithel- und Endothelzellen [74, 75]. Diese Interaktion wird vor allem durch sogenannte Adhäsine hervorgerufen. Beispiele sind das trimere Autotransporter Adhäsine Ata, der Typ IV Pilus, das Biofilm-assoziierte Protein Bap, das Membranprotein OmpA oder das Fibronectin-bindende Protein FBP [75–78]. Auf der Wirtszelloberfläche können diese Pathogen-assoziierten Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) von Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt werden (**Abbildung 2**). Eines dieser PRRs stellt der Toll-like Rezeptor (TLR) dar. Dieser erkennt spezifisch Lipid A-Strukturen von LOS und initiiert einen komplexen Mechanismus. Es kommt zur Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und des adaptiven Immunsystems, was sich gegen die *A. baumannii*-Infektionen richtet. Obwohl *A. baumannii* vornehmlich als extrazellulär lebender Mikroorganismus beschrieben wird, so ist es ihm möglich über einen Zipper-ähnlichen Invasionsmechanismus in die Wirtszelle einzutreten [79]. Innerhalb der Wirtszelle kann es dann geschützt vor endogenen PRRs in einer Membran-gebundenen Vakuole persistieren. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass der endogene PRR TLR-9 die bakterielle DNA erkennen kann und somit aktiv zur Bekämpfung von *A. baumannii* beiträgt [80]. Ähnliche Effekte werden den intrazellulären NOD-1 und NOD-2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2*) zugeschrieben. Die Aktivierung dieser PRRs führt zur Eindämmung der intrazellulären Proliferation von *A. baumannii* [81]. Dies lässt darauf schließen, dass das Bakterium seiner intrazellulär Membran-gebundenen Vakuole aktiv entkommen kann. Genaue Mechanismen sind jedoch nicht bekannt.

Letzten Endes führt die Erkennung der Pathogen-assoziierten Muster zu einer proinflammatorischen Zytokinfreisetzung in Form des Tumornekrosefaktors (TNF α) und der Interleukine (IL)-6 und IL-8 (**Abbildung 2**) [81, 82].

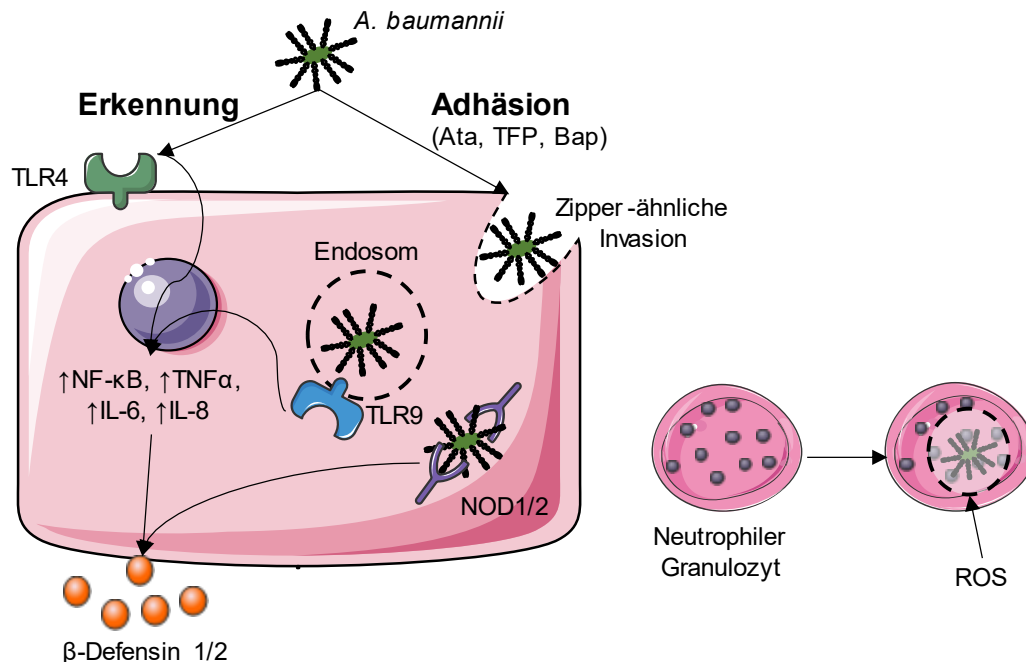


Abbildung 2. Übersicht bekannter Mechanismen der Immunantwort humaner Zellen auf eine Infektion mit *A. baumannii*. Die Wirtszellmodulation kann beispielsweise durch die Interaktion mit dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) oder durch eine Zipper-ähnliche Invasion nach vorangegangener Adhäsion der Bakterien hervorgerufen werden. In der Zelle führt der Stimulus unter anderem zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder IL-8. In Immunzellen kann sich *A. baumannii* durch spezifische Mechanismen vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Harding et al., 2017 [83].

Nach der Detektion der Bakterien durch ihre Wirtszelle können diese antimikrobielle Defensine zur Inhibition des bakteriellen Wachstums freisetzen [82, 84]. Außerdem werden durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen Immunzellen zum Ort der Infektion gelockt. Hierbei spielen neutrophile Granulozyten eine besonders wichtige Rolle [85]. Mechanistisch betrachtet, erfolgt die Elimination von *A. baumannii* durch neutrophile Granulozyten mithilfe reaktiver Sauerstoffspezies [86]. Das kürzlich beschriebene Protein CipA stellt einen weiteren Virulenzfaktor dar. Es bindet Plasminogen, degradiert Fibrinogen und den Komplementfaktor C3b und ermöglicht es somit dem Bakterium das Komplementsystem des Wirtes zu umgehen [87].

1.2.5 Proteinsekretion

A. baumannii kann sekretierte Proteine dafür nutzen, um das Überleben im Wirt positiv zu beeinflussen. Hierfür sind Sekretionssysteme unabdinglich. In den vergangenen Jahren konnte eine Vielzahl dieser Systeme in *A. baumannii* beschrieben werden. Dazu zählen das Typ I, II, IV, V und VI Sekretionssystem [65, 88–93]. Typ VI-Sekretionssysteme sind in *A. baumannii* vor allem in der Konkurrenz mit anderen Bakterien beteiligt [89, 93]. Auch über das Typ II-Sekretionssystem kann *A. baumannii* Effektormoleküle sezernieren [90, 91]. Beispiele für diese Moleküle sind die Lipase LipA und die Metalloprotease CpaA [90]. Der Virulenzfaktor CpaA ermöglicht es *A. baumannii* Lungengewebe effizient zu kolonisieren und sich in andere Organe auszubreiten [94, 95].

1.3 Infektionsmodelle zur Untersuchung der Pathogenität von *A. baumannii*

Bei der Infektion des Menschen mit *A. baumannii* spielen die Fähigkeiten der (i) Bildung von Antibiotikaresistenzen, (ii) Trockenresistenz und Biofilmbildung und (iii) Adhäsion und Invasion eine übergeordnete Rolle. Um die Signifikanz dieser drei Faktoren in Bezug auf die Pathogenität von *A. baumannii* bewerten zu können, bedarf es Infektionsmodellen, die zum menschlichen Körper vergleichbar sind und somit die natürlichen Gegebenheiten einer Infektion mit *A. baumannii* widerspiegeln. Im Folgenden soll eine Übersicht von etablierten Infektionsmodellen dargestellt und erläutert werden, wie diese dazu beigetragen haben, verschiedene Virulenzfaktoren von *A. baumannii* zu bewerten.

1.3.1 Limitationen und Grenzen von Tiermodellen

Zur Untersuchung bakteriell hervorgerufener Infektionserkrankungen sind Versuche in Säugetieren besonders wichtig, denn diese ermöglichen es, sowohl die pathogenen Bakterien als auch die Wirtsantwort zeitgleich zu charakterisieren. Eines der ersten Tiermodelle, welches für *A. baumannii* etabliert wurde, war ein Mausmodell, das die Untersuchung der durch den Erreger hervorgerufenen akuten Pneumonie ermöglichte [96].

Bei der Etablierung neuer Infektionsmodelle steht die detailgetreue Nachahmung der durch *A. baumannii* im menschlichen Körper hervorgerufenen Erkrankung im Tiermodell im Vordergrund. Deshalb ist die Wahl eines geeigneten Tierstammes besonders wichtig. Im Fall von Mausmodellen wurden verschiedene Inzuchtstämme wie C57BL/6, Balb/c oder A/J verwendet [97]. Diese geben unter Laborbedingungen zwar ein homogenes Bild der Infektion wieder, sind aber im seltensten Fall untereinander oder mit dem Infektionsgeschehen im menschlichen Körper vergleichbar. Deswegen wurden neben den bereits genannten Maus-Inzuchtstämmen auch gezielte Züchtungen vorgenommen, die es möglich machen, diese Limitationen zu umgehen. In der Literatur werden besonders häufig die Maus-Stämme CD-1 und Swiss Webster beschrieben [96, 98–101].

Ein weiterer wichtiger und oftmals unterschätzter Faktor ist die Wahl des zu untersuchenden *A. baumannii*-Stammes. Versuche werden oftmals unter Verwendung der beiden Referenzstämme ATCC 19606 und ATCC 17978 durchgeführt. Das Gesamtgenom beider Stämme ist vollständig sequenziert, jedoch fehlen genaue Kenntnisse zum klinischen Hintergrund oder ihrer Epidemiologie. Deswegen ist es sinnvoll, in Tiermodellen Isolate zu verwenden, die eine hohe klinische Bedeutung haben. Betrachtet man aktuelle Studien, so wurden in den meisten Fällen tatsächlich nicht charakterisierte *A. baumannii*-Isolate verwendet, zu welchen es nur wenige oder gar keine epidemiologischen oder mikrobiologischen Daten gibt. Das führt dazu, dass eine Abstraktion der aus den Studien gewonnenen Ergebnisse nur sehr schwierig möglich ist. Denn die verschiedenen Isolate führen beispielsweise zu verschiedenen Mortalitäten, bakteriellen Keimlasten oder inflammatorischen Antworten [102, 103].

1.3.2 Pneumonie-Modelle

Durch *A. baumannii* hervorgerufenen Pneumonien wurden in den vergangenen Jahren hauptsächlich in Mäusen untersucht. In diesen Studien konnten zahlreiche Aspekte der durch die Bakterien verursachten Infektion erforscht werden, u.a. die Mortalität der Mäuse, die Keimlast der Bakterien in verschiedenen Geweben des Wirtes, die Menge freigesetzter Zytokine und die inflammatorische Zellinfiltration in der Lunge. Die Studien zeigen, dass die Infektion mit *A. baumannii* in der Maus zu einem charakteristischen Anstieg spezifischer

inflammatorischer Zytokine in der Lunge und zu typischen histologischen Veränderungen führt [96, 102, 104, 105].

Für viele *A. baumannii*-Stämme ist im Mausmodell die Applikation sehr hoher Keimzahlen notwendig, was die Vergleichbarkeit mit dem Infektionsgeschehen im menschlichen Körper limitiert. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit Mausmodelle etabliert, welche neutropenische Mäuse als Versuchsobjekte verwendeten, um die Empfindlichkeit des Wirtes gegenüber den Bakterien zu erhöhen [96, 98–102, 106–108]. Dadurch konnte die *in vivo* Virulenz verschiedener *A. baumannii*-Stämme erforscht werden [102]. Eine weitere Möglichkeit zur Senkung der initialen Keimlast bei einer Infektion von Mäusen ist die Verwendung von porzinem Muzin [109].

Unter Verwendung transgener Mäuse, die spezifische genetische Veränderungen erfahren haben und sehr gut charakterisiert sind, lässt sich das Infektionsgeschehen auf molekularer Ebene untersuchen. Beispielsweise werden Mäuse, die für CD-14 oder TLR-2 oder -4 defizient sind, hierfür genutzt [104]. Es wurde gezeigt, dass CD-14 und TLR-4 bedeutende molekulare Faktoren auf Seiten des Wirtes bei der Erkennung des bakteriellen LPS sind und somit maßgeblich an der *A. baumannii*-Abwehrreaktion beteiligt sind. Für TLR-2 hingegen wurde beschrieben, dass dieser für die Senkung der Immunaktivität verantwortlich ist [104]. Eine weitere Studie legte die Bedeutung der NADPH-Phagozyt-Oxidase offen. So führte die Deletion des codierenden Genes für dieses Enzym zu einer deutlich höheren Bakterienlast nach der Infektion und somit zu einer erhöhten Mortalität der Mäuse [86].

1.3.3 Haut- und Weichteilgewebe-Modelle

Neben der typischerweise durch *A. baumannii* verursachten Pneumonie stellt die Wundinfektion durch die Bakterien ein weiteres und häufig beobachtetes Krankheitsbild im menschlichen Körper dar. Auch hierfür wurden Nagetier-Versuchsmodelle mit Mäusen und Ratten entwickelt [110–114]. Derartige Tierversuchsmodelle werden vornehmlich zur Untersuchung von Therapieoptionen bei einer durch *A. baumannii* hervorgerufenen Wundinfektion verwendet. Aber auch die

Ausbreitung der Bakterien in andere Bereiche der Tierkörper wurde anhand dieser Modelle erforscht [110, 112, 114].

Neben den Wund- bzw. Hautinfektionsmodellen wurden in der Vergangenheit auch Gewebeeinfektionsmodelle entwickelt. Nach Applikation der Bakterien in den Oberschenkelmuskel der Versuchstiere wurde beispielsweise die Bakterienlast im Muskel, die hämatogene Ausbreitung der Bakterien und die Mortalität untersucht [115, 116]. Es wurde gezeigt, dass die Bakterien ausgehend vom infizierten Muskel unter anderem die Lunge, Leber und Nieren infiltrieren und dort innerhalb von zwei Tagen zu einer 100%igen Mortalität der Tiere führen.

1.3.4 Sepsis-Modelle

Es gibt wenige Versuchsmodelle, die das Infektionsgeschehen bei einer durch *A. baumannii* hervorgerufenen Sepsis simulieren. Eines dieser Modelle beschreibt die intraperitoneale Applikation von *A. baumannii* in Balb/c Mäuse [117]. Ein weiteres Modell ermöglicht die Quantifizierung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Serum der infizierten Tiere [103, 118–120].

Neben den beschriebenen Säugetierversuchsmodellen mit Mäusen, Ratten und Meerschweinchen wurden in der Vergangenheit unter anderem auch Modelle mit Hasen entwickelt. Diese dienten vor allem der Untersuchung von *A. baumannii*-assoziiertes Meningitis oder Endokarditis [121–123].

1.3.5 Nicht-Säugetiermodelle

Um die Pathogenität von *A. baumannii* in einem Nicht-Säugetiermodell zu untersuchen, wurden in einer Studie aus dem Jahr 2009 Larven der Großen Wachsmotte verwendet [124]. Nach der Infektion wurden die Überlebensraten der Larven anhand einer beginnenden Braunfärbung (Melanisierung) des Integuments bestimmt und es konnte beobachtet werden, dass diese abhängig von der initialen Keimlast war.

Neben *G. mellonella* wurden auch die Nematoden *Caenorhabditis elegans* und der Hefepilz *Candida albicans* für Studien zur Pathogenität verschiedener

A. baumannii-Stämme herangezogen [125, 126]. Weiterhin wurde ein Infektionsmodell mit der Amöbe *Dictyostelium discoideum* beschrieben [126].

Letztlich dienen alle bisher entwickelten Tierversuchsmodelle der Erforschung der Pathogenität und Virulenz von *A. baumannii*. In der folgenden Tabelle werden die beschriebenen Tierversuchsmodelle und deren zugrundeliegende Fragestellung noch einmal zusammengefasst (**Tabelle 2**).

Tabelle 2. Übersicht bisher etablierter Tierversuchsmodelle und deren Studienziele.

Infektionsmodell	Spezies	Bestimmbare Parameter	Studienziele
Pneumonie	Maus, Ratte, Meerschweinchen	Überleben, pharmakokinetische und -dynamische Aspekte, Keimlast, Zytokinmenge, histologische Untersuchungen	Optimierung von Antibiotikatherapien, Charakterisierung der Wirtsantwort, Identifizierung bakterieller Virulenzfaktoren
Brandwunden- und Gewebsinfektionen	Maus und Ratte	Überleben, Keimlast, Abszessbildung	Optimierung von Antibiotikatherapien, Identifizierung bakterieller Virulenzfaktoren
Sepsis	Maus und Ratte	Überleben, Keimlast in verschiedenen Geweben, Zytokinmenge im Blutserum	Vergleich der bakteriellen Fitness, Impfstoff-Effizienz, Optimierung von Antibiotikatherapien, Identifizierung bakterieller Virulenzfaktoren
Meningitis	Hase	pharmakokinetische und -dynamische Aspekte, Keimlast, inflammatorische Zellinfiltration, Gehirnödeme	Optimierung von Antibiotikatherapien
Endokarditis	Hase	Überleben, pharmakokinetische und -dynamische Aspekte, Keimlast im Gewebe	Optimierung von Antibiotikatherapien
Nicht-Säugetiermodelle	<i>G. mellonella</i> , <i>C. elegans</i> , <i>D. discoideum</i>	Überleben, Melanisierung, Plaqueformation	Identifizierung von Virulenzfaktoren, Interaktion mit eukaryotischen Zellen

1.4 Trimere Autotransporter Adhäsine

Die Proteinfamilie der Autotransporter ist unter Gram-negativen Bakterien weit verbreitet. Heutzutage sind mehr als 700 verschiedene Typen dieser Membranproteine bekannt, was sie zur umfangreichsten Proteinfamilie unter den Gram-negativen Bakterien macht [127]. In Abhängigkeit von der Spezies haben Autotransporter-Proteine verschiedene biologische Funktionen: Adhärenz, Invasion, Proteolyse, Zytotoxizität, Serumresistenz und viele andere [128]. Alle Vertreter dieser Proteinfamilie teilen zudem einen gemeinsamen Grundaufbau.

Hierzu zählt ein N-terminales Signalpeptid, eine *passenger*-Domäne und eine C-terminale Translokationsdomäne [129]. Der Mechanismus der Verankerung des Proteins in der äußeren Membran des Bakteriums ist stark reguliert.

Als Subfamilie der Autotransporter stellen die trimeren Autotransporter Adhäsine (TAAs) eine bedeutende Gruppe dar. Sie sind durch das Vorhandensein von kurzen trimeren Translokator-domänen gekennzeichnet. Auch trimere Autotransporter Adhäsine haben verschiedenste biologische Funktionen, teilen aber in den meisten Fällen die Fähigkeit der Adhärenz an die Wirtszelle oder an Bestandteile der extrazellulären Matrix [75, 130–133]. Das am besten untersuchte trimere Autotransporter Adhäsine ist YadA von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. Es besteht aus 422 bis 455 Aminosäuren und stellt im Vergleich zu anderen TAAs einen eher kleinen Vertreter dar. Einer der größten Vertreter der TAAs ist BadA von *Bartonella henselae*. Das Protein besteht aus bis zu 3.082 Aminosäuren [134, 135]. In **Tabelle 3** ist eine Auswahl bekannter TAAs verschiedener pathogener Bakterien und deren grundlegende Bedeutung im Krankheitsgeschehen dargestellt.

1.4.1 Struktureller Aufbau von trimeren Autotransporter Adhäsinen

Viele verschiedene TAAs konnten in der Vergangenheit elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Dies führte zu einem guten Verständnis über den Aufbau dieser Proteine. TAAs bestehen aus drei Domänen: (i) der Kopfdomäne, (ii) der Stielfdomäne und (iii) dem Membrananker. Elektronenmikroskopisch ist oftmals eine sogenannte *Lollipop*-Struktur erkennbar (**Abbildung 3**) [136].



Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung des modularen Aufbaus von trimeren Autotransporter Adhäsinen. Grundlegend bestehen trimere Autotransporter Adhäsine aus drei verschiedenen Modulen: (i) Membrananker, (ii) Stieldomäne und (iii) Kopfdomäne. Vor allem die Stieldomäne kann in ihrer Länge zwischen verschiedenen Spezies stark variieren.

Der Membrananker

Der Membrananker befindet sich bei jedem bekannten TAA am C-Terminus des Proteins [136]. Außerdem ist diese Domäne die einzige innerhalb der Proteinfamilie, welche eine konservierte und homologe Sequenz aufweist und somit als allgemeines Charakteristikum der trimeren Autotransporter Adhäsine dient. Der Membrananker besteht stets aus vier Heptaden von linkshändig gewundenen Proteinschrauben (*coiled coils*). Auf diese folgen vier transmembrane β -Faltblätter, die letztlich in einem 12-strängigen β -Zylinder zusammengeführt sind [136]. Der Membrananker ist maßgeblich am Autotransport durch die äußere Membran beteiligt. Studien zeigen, dass die β -Strukturen während der Integration in die äußere Membran an der Bildung einer Pore beteiligt sind, die es dem Protein ermöglicht, sich durch die Membran zu stülpen [137, 138]. Nachdem der Protein-export abgeschlossen ist, falten sich die Proteinfasern des Membranankers und verschließen die Pore über die *coiled coil* Proteinstruktur.

Die Stieldomäne

Diese faserförmige Domäne ist hoch repetitiv und variabel in seiner Länge. Dabei ist sie reich an *coiled coil* Proteinstrukturen. Die Funktion des Stiels besteht darin, der Kopfdomäne den nötigen Abstand zur bakteriellen Membran zu verschaffen und somit näher an den potenziellen Bindungspartner, beispielsweise der eukaryotischen Zelle, zu bringen. Außerdem bietet der Stiel Schutz gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes. So bewirkt beispielsweise die Stieldomäne von YadA aus *Y. enterocolitica* eine Resistenz gegenüber dem humanen Serum [137]. Biochemisch betrachtet, besitzen die *coiled coil* Segmente des Stiels zwei untypische Eigenschaften, die man in dieser Weise nur selten bei anderen Proteinen wiederfindet.

Tabelle 3. Auswahl bisher bekannter trimerer Autotransporter Adhäsine in verschiedenen Gram-negativen Bakterien.

Protein	Spezies	hervorgerufene Erkrankung	Funktion des TAA	Referenz
BadA	<i>Bartonella henselae</i>	Katzenkratzkrankheit	Kollagenbindung, Adhärenz an humane Wirtszellen, Resistenz gegenüber Phagozytose, Aktivierung proangiogenetischer Faktoren	[132], [139], [75], [140]
Cha	<i>Haemophilus sp.</i>	Urogenitale und neonatale respiratorische Infektionen	Adhärenz an humane Wirtszellen	[141],
EibA, EibC, EibD, EibE, EibF	<i>Escherichia coli</i>		Bindung von IgG und IgA, Serumresistenz	[142], [143], [144]
Hia, Hsf	<i>Haemophilus influenzae</i>	Otitis media, Sinusitis, Konjunktivitis, Pneumonie	Adhäsion an humane Wirtszellen	[145]
NadA	<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis	Adhäsion und Invasion an/in humane Wirtszellen	[146]
UspA1, UspA2	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Otitis media, Bronchitis, Sinusitis, Laryngitis	Adhäsion an extrazellulärer Matrix und humane Wirtszellen, Serumresistenz, Biofilmbildung	[147], [148], [149]
VompA, VompC	<i>Bartonella quintana</i>	Fünftagefieber	Kollagenbindung, Autoagglutination	[150]
YadA	<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Gastroenteritis, mesenteriale Lymphadenitis	Adhäsion an extrazelluläre Matrix, Serumresistenz, Resistenz gegenüber Phagozytose, Adhärenz an humane Wirtszellen	[151], [152], [133], [130], [153], [131]

Zum einen findet man den Wechsel von rechtshändigen in linkshändige *Supercoils* wieder, die man in ca. 30 % der beschriebenen TAAs entdeckt hat (z.B. in YadA [136]). Zum anderen findet man zahlreiche Unterbrechungen der Stieldomäne mit kleinen globulären Proteinstrukturen, die dem Stiel seine typische modulare Struktur verleihen [140].

Die Kopfdomäne

Von der Kopfdomäne sind nur wenige hochauflösende Strukturen bekannt. Am Beispiel von YadA ist zu erkennen, dass die Kopfdomäne eine einzelsträngige, linkshändige β -Helix mit einer konservierten NSVAIGXXS Sequenz bildet [154]. Dieses Motiv wurde tatsächlich auch in vielen anderen Kopfdomänen artfremder TAAs gefunden, was darauf schließen lässt, dass es eine wichtige funktionelle und strukturelle Bedeutung hat. Es ist bekannt, dass die Kopfdomäne von YadA maßgeblich an der Bindung von extrazellulären Matrixproteinen beteiligt ist. Zerstört man beispielsweise die Kopfdomänenstruktur durch eine Mutation im NSVAIGXXS Motiv, so geht die Fähigkeit zur Kollagenbindung oder zur Adhärenz an die humane Wirtszelle verloren [155]. Die Verbindung der Kopfdomäne zur Stieldomäne erfolgt über eine kurze und hoch konservierte Sequenz, der sogenannten Halssequenz. Diese Sequenz fungiert als Art Verbindungsglied zwischen den im Durchmesser großen β -Helices der Kopfdomäne und der kleineren *coiled coil* Strukturen der Stieldomäne [154].

1.4.2 Sekretion und Proteinfaltung von trimeren Autotransporter Adhäsinen

In Gram-negativen Bakterien wie *A. baumannii* müssen sekretierte Proteine die Barrieren der inneren und der äußeren Membran überwinden. Hierfür haben Bakterien verschiedene Sekretionssysteme entwickelt. Eines dieser Systeme ist das Typ-V-Sekretionssystem, welches in drei Subtypen, (i) das Typ Va-System, (ii) das Typ Vb-System und (iii) das Typ Vc-System, unterteilt wird. Das Typ Vc-System ist hierbei der Weg, welcher beim Transport von trimeren Autotransporter Adhäsinen genutzt wird. Hierfür bedarf es für den Transport der *passenger*-Domäne durch die äußere Membran der beschriebenen integralen β -Protein-

struktur. Bei trimeren Autotransportern sind drei identische Kopien dieser Proteinstruktur für den erfolgreichen Transport durch die äußere Membran und die Faltung des Proteins notwendig [156].

Die Translokation über die innere Membran geschieht über den Sec-Signalweg (**Abbildung 4**) [157–159]. Hierfür müssen die Proteinbestandteile in ihrer ursprünglichen nicht gefalteten Form vorliegen. Die meisten Autotransporter-Proteine haben ein ca. 20 bis 30 Aminosäuren großes N-terminales Signalpeptid, welches spezifisch am Sec-Protein (transportiert nicht gefaltete Proteine über die zytoplasmatische Membran) bindet. Über das Sec-Protein gelangen die drei identischen Bestandteile des trimeren Autotransporters in das Periplasma. Im nächsten Schritt werden die Proteinbestandteile im Periplasma einer Art Qualitätskontrolle unterzogen. Daran beteiligt sind periplasmatische Proteasen und das Chaperon DegP [160]. Treten beispielsweise Mutationen im Protein auf, die den stabilen Weitertransport und die Einlagerung in die äußere Membran stören würden, so werden die Einzelbestandteile frühzeitig degradiert. Sofern die Einzelbestandteile des Proteins unbeschädigt sind, lagern sich die Aminosäureketten zu einer lockeren trimeren Transportstruktur zusammen. Über diese Transportform kann der trimere Autotransporter mit einem in der äußeren Membran eingelagerten Proteinkomplex, dem Bam-Komplex, über konservierte β -Proteinstrukturen interagieren [161]. Hierdurch wird eine Translokationspore gebildet, durch welche sich der trimere Autotransporter nach außen stülpt und mit Hilfe des C-terminalen Membranankers in der äußeren Membran fixiert wird.

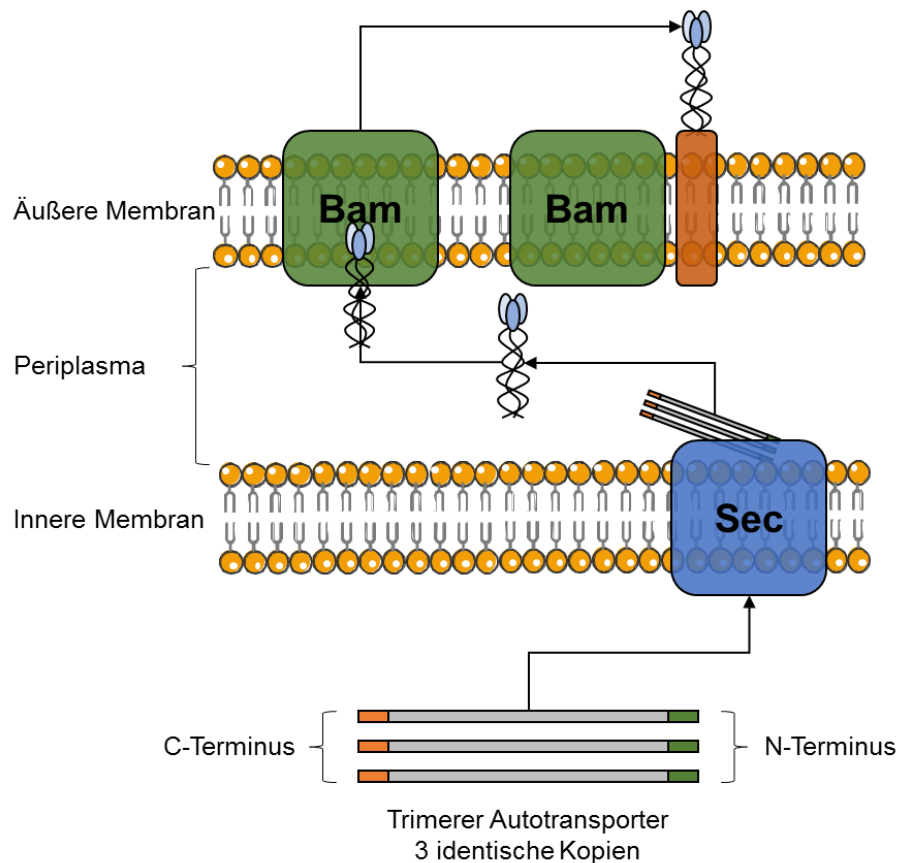


Abbildung 4. Translokation von trimeren Autotransporter Adhäsinen über die innere und äußere Membran von Gram-negativen Bakterien. Die drei Peptide eines trimeren Autotransporters binden über das N-terminale Signalpeptid (grün) an das in der inneren Membran eingebundene Sec-Protein. Hierdurch gelingt der Transport der Proteine in das Periplasma. Nun lagern sich die Aminosäureketten zu lockeren trimeren Proteinstrukturen zusammen und binden über β -Strukturen an den in der äußeren Membran eingebundenen Bam-Komplex. Unter Mitwirkung dieses Komplexes bildet sich in der äußeren Membran eine Pore, durch welche sich das Protein nach außen stülpen kann. Letztlich verschließen die β -Strukturen des trimeren Autotransporter Adhäsins die Pore und verankern das Protein.

1.4.3 TAA von *A. baumannii*: Das trimere Autotransporter Adhäsins Ata

Die erste Beschreibung des trimeren Autotransporter Adhäsins Ata geht auf das Jahr 2012 zurück und bezieht sich auf den Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 17978 [88, 162]. Die Forschergruppe um T. Maira-Litrán identifizierte ein Oberflächenprotein, welches typische Merkmale von trimeren Autotransporter Adhäsinen aufwies: ein N-terminales Signalpeptid, gefolgt von einer oberflächenexponierten *passenger*-Domäne und einer C-terminale Domäne, die vier *coiled coil* β -Proteinstrukturen zeigte. Um den Nachweis für das Vorhandensein eines trimeren Autotransporters zu erhalten, wurde ein Fusionsprotein generiert, bei dem die *passenger*-Domäne durch ein V5-Epitop ersetzt wurde [88]. Durch den Nachweis des V5-Epitops auf der Oberfläche der Bakterien mittels spezifischer monoklonaler Antikörper wurde gezeigt, dass die 101 Aminosäuren

große C-terminale Proteinstruktur in der Lage war, das V5-Epitop in trimerer Form an die Oberfläche von *A. baumannii* zu exportieren. In weiteren Versuchen gelang der Nachweis, dass das identifizierte Protein an der Bindung von extrazellulären Matrixproteinen und an der Biofilmbildung beteiligt ist. Zudem zeigte es einen Einfluss auf die Pathogenität der Bakterien im Mausmodell [88, 162].

Seit dieser ersten Beschreibung wurden keine neuen Studien bezüglich der biologischen Funktion von Ata in *A. baumannii* durchgeführt, sodass weitere funktionelle Erkenntnisse zum Protein fehlen.

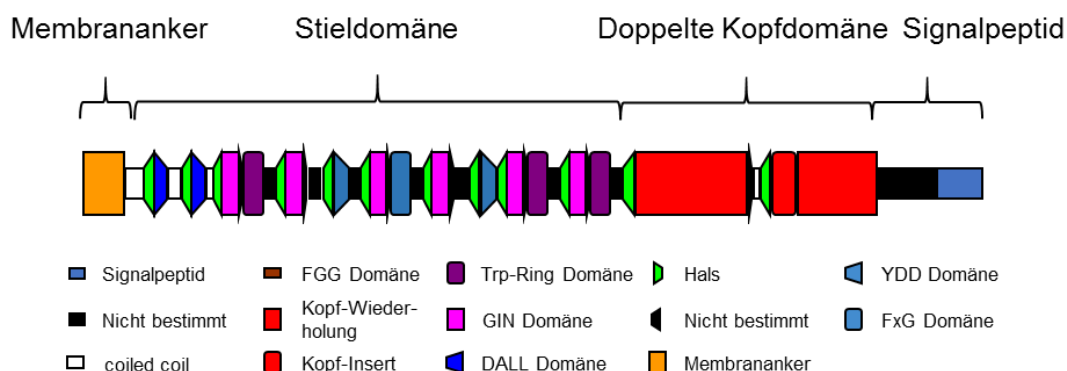


Abbildung 5. Darstellung des trimeren Autotransporter Adhäsin Ata in *A. baumannii* ATCC 19606. Das Protein ist charakterisiert durch ein Signalpeptid, eine doppelte Kopfdomäne und einem repetitiven Stiel. FGG Domäne: Verbindung für coiled-coil Segmente; Trp-Ring Domäne: Variante der Kopf-Domäne; GIN Domäne: transversale Kopfdomäne; DALL Domäne: α/β Verbindung; YDD Domäne: DALL Variante; FxG Domäne: Trp-Ring Variante. Abbildung wurde nach Weidensdorfer *et al.* modifiziert [163].

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde im Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606 ein Gen identifiziert, welches für ein trimeres Autotransporter Adhäsin codiert (Position von 315.815 Bp bis 322.591 Bp, *NCBI Reference Sequence*: NZ_KL810966). Das Protein ist charakterisiert durch ein langes Signalpeptid, eine doppelte Kopfdomäne und einem langen repetitiven Stiel (**Abbildung 5**).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Das pathogene Gram-negative Bakterium *A. baumannii* ist für einen maßgeblichen Anteil nosokomialer Infektionen verantwortlich [10]. Obwohl in den vergangenen Jahren viele neue Erkenntnisse über Epidemiologie und Antibiotikaresistenzen gesammelt wurden, stellt diese Spezies immer noch eine große Gefährdung für den Menschen dar. Weitere grundlegende Kenntnisse zur Virulenz und Pathogenitätsmechanismen von *A. baumannii* sind daher zwingend notwendig.

Das trimere Autotransporter Adhäsin Ata scheint ein wichtiger Virulenzfaktor zu sein, denn aktuelle Studien zeigen das Vorhandensein dieses Proteins in vielen klinischen Isolaten von *A. baumannii* und anderen *Acinetobacter*-Spezies [163, 164]. Zudem demonstrierten erste Immunisierungsversuche von Hasen gegen Ata beeindruckende Erfolge [162].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte in *A. baumannii* ATCC 19606 unter Verwendung eines isogenen *ata*-Deletionsstammes die biologische Funktion des Proteins untersucht werden. Hierfür sollte zunächst ein für *B. henselae* entwickeltes *ex vivo* Infektionsmodell für *A. baumannii* adaptiert werden. Weiterhin sollte die Ata-abhängige Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine und an verschiedene humane Endothel- bzw. Epithelzellen sowie die Invasion in humane Wirtszellen untersucht werden. Außerdem sollte der Fokus auf die wirtszellspezifische Antwort gelegt werden, insbesondere hinsichtlich der Induktion proinflammatorischer Zytokine und der Regulation des programmierten Zelltodes durch *A. baumannii*. Letztlich wurde eine Proteomanalyse infizierter Wirtszellen zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt.

2. Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte in folgenden Geräten durchgeführt: Für 1,5 ml- bzw. 2 ml-Reaktionsgefäße wurde die Kühlzentrifuge Modell 5417R (Eppendorf, Hamburg) und für 15 ml- bzw. 50 ml-Reaktionsgefäße die Multifuge X3 FR (Thermo Fisher, Deutschland) verwendet.

2.1 Isolation und Anzucht humaner Zellen

Die Anzucht von humanen Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Oberflächengröße von 75 cm² oder 175 cm² (Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich) in einem Inkubator der Firma Thermo Fisher bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre unter Verwendung des jeweiligen Zellkulturmediums (**Tabelle 4**). Für die Anzucht von humanen Endothelzellen wurden die Zellkulturflaschen zuvor mit 10 µg/ml Kollagen G (Biochrom, Berlin, Deutschland) gelöst in Phosphat gepufferter Saline (PBS, Gibco, Deutschland) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Am Folgetag wurde diese Lösung entfernt und die Zellkulturflaschen lagerten bis zu Verwendung bei 4 °C. Wurden die humanen Zellen länger als zwei Tage kultiviert, erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums spätestens am zweiten Tag der Inkubation. Sobald ein dichter Zellrasen ersichtlich war, wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierfür wurde zunächst das vorhandene Zellmedium abgenommen und die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA (0,05 % [v/v], Thermo Fisher) für Endothelzellen oder PBS für Epithelzellen gewaschen. Danach erfolgte das Ablösen der Zellen durch Inkubation der adhären Zellen mit Trypsin-EDTA (0,05 % [v/v]) für 15 min bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden danach in den gewünschten Anteilen in frisches Anzucht-Medium überführt. Für Versuche wurden die Zellen am Vortag des Experiments in Zellkulturschalen überführt.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten humanen Zellen und entsprechenden Zellkulturmedien zur Anzucht, Aussaat und Ko-Kultivierung mit *A. baumannii*.

Zellart/ -linie	Referenz	Anzucht	Aussaat	Ko-Kultivierung
HUVEC Nabelschnur-Endothelzellen	diese Arbeit	Endothelzellmedium (Supplement ^{**} , 10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	Endothelzellmedium (Supplement ^{**} , 10 % FCS [*] [v/v])	Endothelzellmedium (Supplement ^{**})
HMEC-1 mikrovaskuläre Endothelzellen	CRL-3234, Promocell	mikrovaskuläres Endothelzellmedium (Supplement ^{**} , 10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	mikrovaskuläres Endothelzellmedium (Supplement ^{**} , 10 % FCS [*] [v/v])	mikrovaskuläres Endothelzellmedium (Supplement ^{**})
HDMEC dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	C-12200, Promocell	mikrovaskuläres Endothelzellmedium (Supplement, 10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	mikrovaskuläres Endothelzellmedium (Supplement ^{**} , 10 % FCS [*] [v/v])	mikrovaskuläres Endothelzellmedium (Supplement ^{**})
A549 alveolare Epithelzellen (Adenokarzinom)	ACC-107, DSMZ	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v])	RPMI-Medium
HeLa zervikale Epithelzellen (Adenokarzinom)	ACC-57, DSMZ	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v])	RPMI-Medium
Hep-G2 hepatische Epithelzellen (Leberzellkarzinom)	ACC-180, DSMZ	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v])	RPMI-Medium
THP-1 leukämische Monozyten	ACC-16, DSMZ	RPMI-Medium (10 % FCS [*] [v/v], Penicillin [100 U/ml]/ Streptomycin [100 U/ml])	entfällt (Suspensionszellen)	RPMI-Medium (2 % FCS [*] [v/v])

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Endothelzellmedien und Supplemente von Promocell, Heidelberg und sämtliche Epithelzellmedien von der Firma Biochrom bezogen. Penicillin und Streptomycin wurden ebenfalls von der Firma Biochrom bezogen. Fetales Kälberserum (FCS, Gibco), ^{*}beinhaltet folgende Substanzen (Endkonzentration im Zellmedium) FCS (0,02 ml/ml)^{*}, endothelialer Wachstumsfaktor (0,004 ml/ml), epidermaler Wachstumsfaktor (0,1 ng/ml), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (1 ng/ml), Insulin-like Wachstumsfaktor (IGF-1), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 165, Ascorbinsäure, Heparin (90 µg/ml), Hydrokortison (1 µg/ml)

Die suspendierten Zellen wurden anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Aus dieser Suspension wurden 100 µl in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 100 µl Trypanblau-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) gemischt. Dies ermöglichte das Unterscheiden von lebenden (keine Färbung) und toten Zellen (blaue Färbung) bei der darauffolgenden Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauer-Zählkammer (InCelligence, Bremen). Hierfür wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension unter das Deckgläschen einer Zählkammer pipettiert und mit Hilfe eines Lichtmikroskops (mit Standard 25 Dunkelfeldkondensator, Firma Carl Zeiss, Jena) lebende Zellen in jeweils 2 Großquadraten gezählt. Mit folgender Formel wurde die Gesamtzellzahl der Suspension bestimmt:

Formel 1. Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.

$$\text{Gesamtzellzahl} = (\text{gezählte Zellen} \times 10.000) \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (500 x g, 5 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde entsprechend der gewünschten Zellzahl in Aussaat-Medium gelöst. Die Zellen wurden nun in Zellkulturschalen und zur über-Nacht-Kultivierung in den Zellinkubator überführt. Folgende Zellzahlen und Volumina wurden für die Kultivierung in den einzelnen Zellkulturschalen (Greiner BioOne) bzw. Durchfluskkammern (Ibidi, Gräfelfing) verwendet (**Tabelle 5**).

Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Zellzahlen und Volumina für entsprechende Zellkulturschalen.

Bezeichnung	Zellzahl/Kavität	Gesamtvolumen
143 cm ² Schale (advanced TC)	5 x 10 ⁶	25 ml
6-Kavitäten	5 x 10 ⁵	2 ml
24-Kavitäten	1 x 10 ⁵	1 ml
96-Kavitäten	1 x 10 ⁴	0,2 ml
µ-Slide I Luer Durchfluskkammer	1 x 10 ⁵	0,2 ml
µ-Slide VI 0.4 Durchfluskkammer	1 x 10 ⁴	0,03 ml

THP-1 Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % [v/v] FCS kultiviert. Sobald die THP-1 Zellen dicht angewachsen waren (Konfluenz von mind. 80 %), wurde 1 ml der Zellsuspension mit frischem Zellmedium gemischt und in eine neue Zellkul-

turflasche überführt. Zur Versuchsverwendung der Zellen wurden diese am Versuchstag einmal in RPMI (2 % FCS [v/v]) gewaschen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte wie bereits beschrieben (vgl. **Formel 1**).

2.1.1 Isolation von humanen Nabelschnurendothelzellen

Zur Isolation von humanen Nabelschnurendothelzellen wurden frische Nabelschnurproben verwendet, die vom Krankenhaus Sachsenhausen (Entbindungsabteilung, Schulstraße 31, 60594 Frankfurt am Main) zu Verfügung gestellt wurden. Die Patienten, die die Nabelschnüre freundlicherweise gespendet hatten, waren vorab über die Verwendung aufgeklärt worden. Ein Ethikantrag wurde zuvor von der zuständigen Ethikkommission bewilligt (4/12, Universitätsklinik, Frankfurt am Main). Nach dem Erhalt der frischen Nabelschnurprobe und sofern diese den Qualitätsansprüchen (rosige Farbe, elastischer Druck, kein strenger Geruch) entsprach, wurde diese sofort zur Isolation der Endothelzellen verwendet. Hierfür wurden beide Enden (ca. 1 cm) der Nabelschnur mit Hilfe eines Skalpell abgeschnitten, um eine glatte Schnittfläche zu erhalten. In dieser Schnittfläche waren eindeutig die Querschnitte der beiden Arterien als auch der Vene zu erkennen. Nun wurde jeweils eine Knopfkanüle in beide Enden der Vene eingeführt und durch einen Kabelbinder fixiert. Die Vene konnte jetzt zur Reinigung von eventuell vorhanden Blutkoagel mit vorgewärmten Endothelzellmedium durchspült werden. Danach wurde eine vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % [v/v]) in die Vene gespritzt, bis diese sich deutlich sichtbar anstaute. Um das Herauslösen der Endothelzellen zu unterstützen, wurde die Vene vorsichtig mit den Fingern massiert und für 15 min bei 37 °C gelagert. Danach wurden die gelösten Zellen mit Anzucht-Medium aus der Vene gespült und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde bei 500 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in Anzucht-Medium gelöst. Danach folgte die Kultivierung der Zellen in Kollagen G beschichteten 75 cm²-Zellkulturflaschen. Am Folgetag wurde das Zellmedium gewechselt und die isolierten Zellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Daraufhin konnten die Zellen einmal expandiert werden, bevor sie zur Langzeitlagerung im flüssigen Stickstoff zu 5×10^5 Zellen/ml überführt wurden. Zur Langzeitlagerung der Zellen

wurde eine 5%ige FCS-Lösung in Dimethylsulfoxid [v/v] (DMSO, Carl Roth) verwendet.

2.1.2 Nachweis endothelspezifischer Oberflächenprotein mittels Durchflusszytometrie

Um die Qualität und Reinheit der isolierten Endothelzellen zu überprüfen, wurden diese mit endothelzellspezifischen Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurde eine Probe der zuvor isolierten, expandierten und eingefrorenen HUVECs aufgetaut und bis zur vollständigen Konfluenz in einer Zellkulturflasche (75 cm²) inkubiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, konnten die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA (0,05 % [v/v]) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden. Die Suspension wurde bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellsediment dreimal in PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert und anschließend auf 1 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 1 ml der Suspension wurde zur Markierung endothelzellspezifischer Oberflächenproteine verwendet: der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (KDR, [165]), der von-Willebrand-Faktor [166] und das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD 31 [167]. Zur Markierung der Oberflächenproteine wurden folgende Antikörper verwendet: Phycoerythrin PE-konjugierter anti-human-KDR (R&D Systems, Minneapolis, USA), Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter anti-human-von-Willebrand-Faktor (OriGene Technologies, Rockville, USA), Alexa 488[®] konjugierter anti-human-CD31 (BD Biosciences, USA). Als Kontrolle dienen folgende Isotyp-Kontrollantikörper: PE konjugierter anti-human-IgG₁ Antikörper (R&D Systems, Klon 97924) und Alexa 488[®] konjugierter anti-human-IgG₂ Antikörper (BD Biosciences, Klon 985028). Zur Markierung der Proteine wurden Zellen durch Inkubation in einer 0,1%igen bovinen Serumalbuminlösung ([w/v], BSA, Thermo Fisher), gelöst in PBS, für 30 min auf Eis blockiert. Somit konnten unspezifische Bindungen der Antikörper im weiteren Verlauf vermieden werden. Die Zellen wurden anschließend dreimal in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe der jeweiligen Antikörper in einer Konzentration von je 10 µl/1 x 10⁶ Zellen. Die Proben wurden 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Jeweils 100 µl der Proben wurden verwendet, um die Ober-

flächenmarkierung der Proteine auf den Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie (Durchflusszytometer BD FACSVerser, BD Bioscience) nachzuweisen. Die Laserkompensation erfolgte automatisiert unter Verwendung der BD FACSuite FC beads (BD Bioscience) und die Lasereinstellungen wurden manuell vorgenommen (**Tabelle 6**).

Tabelle 6. Lasereinstellungen des Durchflusszytometers für die Messung von endothelzellspezifischen Oberflächenmolekülen.

Anzahl aufgenommener Events:	1 x 10 ⁵	
PMT-Spannungen	Min	Max
FSC-A	12.585,77	262.143,00
SSC-A	2.520,88	262,143,00
FITC-A	-98,50	609,04
PE-A	-38,13	1.623,74
PerCP-Cy5.5-A	2,12	22.257,86
PE-Cy7-A	-40,25	6.722,69
APC-A	-31,99	1.557,65
APC-Cy7-A	-34,65	6.502,49
V450-A	40,52	37.878,68
V500-A	35,79	46.098,81

2.2 Kultivierung von Bakterien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden sämtliche Bakterienstämme in *lysogeny broth* (LB, [168]) Flüssigmedium (LB, Carl Roth) oder auf LB-Agar (Carl-Roth) kultiviert. Die Inkubation erfolgte für Flüssigkulturen bei 180 Upm, 37 °C und für Festkulturen in einem Inkubator der Firma Thermo Fisher bei 37 °C.

2.2.1 Kultivierung von *A. baumannii*

Zur Langzeitlagerung von *A. baumannii*-Bakterienstämmen wurden diese zunächst schüttelnd über Nacht in LB-Medium inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils 500 µl der Bakteriensuspension mit 500 µl einer 50%igen [v/v] Glycerinlösung (in LB-Medium) gemischt und bei -80 °C gelagert.

Zur Anzucht von kryokonservierten *A. baumannii* wurden diese mit einer sterilen Impföse auf LB-Agar übertragen und kultiviert. Zur Sicherstellung der Reproduktivität der einzelnen Versuche, erfolgte wöchentlich eine frische Kultivierung der Bakterien.

Zur Selektion von gentechnisch veränderten *A. baumannii* erfolgte die Zugabe von 100 µg/ml Kanamycin (Carl Roth). Im Folgenden sind sämtliche in dieser Arbeit verwendeten *A. baumannii*-Stämme aufgeführt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7. In dieser Arbeit verwendete *A. baumannii*.

Bezeichnung (Abkürzung)	Beschreibung	Resistenzen (vektorkodierend)	Quelle
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 (WT)	Referenzstamm, Wildtyp	-	ATCC 2208 [81, DSM 6974],
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>ata</i> (Δ <i>ata</i>)	markerlose Deletion der <i>ata</i> -codierenden Sequenz (315.815 Bp - 322.591 Bp)	-	diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>ata</i> ::pARKM [Δ <i>ata</i> (p)]	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>ata</i> transformiert mit pARKM, p _{BAD} -Promoter	Kanamycin, Gentamicin	diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>ata</i> ::pARKM_ <i>ata</i> [Δ <i>ata</i> (c)]	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>ata</i> transformiert mit pARKM_ <i>ata</i> , p _{BAD} -Promoter	Kanamycin, Gentamicin	diese Arbeit

Zur Ko-Kultivierung von *A. baumannii* mit humanen Zellen wurde zunächst eine Flüssigkultur aus einer über-Nacht-Kultur auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,05 eingestellt. Die Kultur wurde inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,2 erreicht wurde. Anschließend erfolgte ein erneutes Überimpfen, um ein gleichmäßiges Wachstum von *A. baumannii* zu gewährleisten. Nach weiterer Inkubation bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 wurde die Bakteriensuspension in ein steriles 50 ml-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 7.000 x g für 20 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in PBS oder Ko-Kultivierungsmedium gelöst. Anschließend erfolgte die Messung der OD₆₀₀ und die Bakteriensuspension wurde mit PBS oder Ko-Kultivierungsmedium versetzt, um eine OD₆₀₀ von 0,2 zu erhalten, welches einer Keimzahl von ca. 1x10⁸ Bakterien/ml entspricht. Anhand dieser Suspension wurden Verdünnungsreihen zur Ko-Kultivierung mit humanen Zellen entsprechend der gewünschten Infektionsdosis (MOI, engl. *multiplicity of infection*) hergestellt.

Wurden Transformanten von *A. baumannii* [$\Delta ata(p)$ oder $\Delta ata(c)$] kultiviert, so erfolgte dies unter Zugabe von Kanamycin (100 $\mu\text{g/ml}$). Die Induktion der *ata*-Expression über den p_{BAD} -Promoter in $\Delta ata(c)$ erfolgte kontinuierlich unter Supplementierung mit 0,5 % [w/v] Arabinose (Merck Millipore, Deutschland).

2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Langzeitlagerung von *E. coli* wurden diese, analog zu *A. baumannii*, mit 50%iger [v/v] Glycerinlösung (in LB-Medium) gemischt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für gentechnisch veränderte *E. coli* erfolgte die Kultivierung unter Zugabe von 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. In **Tabelle 8** sind sämtliche in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* aufgeführt.

Tabelle 8. In dieser Arbeit verwendete *E. coli*.

Bezeichnung	Beschreibung	Resistenzen (vektorkodierend)	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 α	Standard-Stamm zur Transformation und Zwischenklonierung von Plasmiden	-	New England BioLabs, Frankfurt am Main Deutschland
<i>E. coli</i> BL21	Standard-Expression-Stamm zur heterologen Synthese von Proteinen	-	New England BioLabs
<i>E. coli</i> WM6026	Donor-Stamm zur Konjugation von Plasmiden in <i>A. baumannii</i>	-	[169]
<i>E. coli</i> _pBIISK_ata_up-/downstream	<i>E. coli</i> DH5 α transformiert mit pBIISK_ata_up-/downstream	Kanamycin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> _pTOPO_rpoB-RT	<i>E. coli</i> DH5 α transformiert mit pTOPO_rpoB-RT	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> _pTOPO_hmbs-RT	<i>E. coli</i> DH5 α transformiert mit pTOPO_hmbs-RT	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> _pTOPO_ata-RT	<i>E. coli</i> DH5 α transformiert mit pTOPO_ata-RT	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> _pET24_ata-Kopf	<i>E. coli</i> BL21 transformiert mit pET24a_ata-Kopf	Kanamycin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> _pARKM	<i>E. coli</i> WM6026 transformiert mit pARKM	Gentamicin, Kanamycin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> _pARKM_ata	<i>E. coli</i> WM6026 transformiert mit pARKM_ata	Gentamicin, Kanamycin	diese Arbeit

Die aufgeführten *E. coli* wurden in dieser Arbeit vornehmlich für Klonierungs-, Protein-Überproduktions- oder Konjugationsversuche und nicht zur Ko-Kultivierung mit humanen Zellen verwendet.

2.3 Deletion und Komplementation der *ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii*

2.3.1 *In silico* Analysen von *ata* in *A. baumannii*

Zur bioinformatischen Untersuchung von *ata* wurde das Referenzgenom von *A. baumannii* ATCC 19606 verwendet [170], welches unter der Referenznummer NZ_KL810966.1 in der Metadatenbank der nationalen medizinischen Bibliothek der Vereinigten Staaten (NCBI) aufgeführt ist. Weiterhin wurde das in Tübingen entwickelte Programm daTAA, das zur Annotation einzelner spezifischer Domänenstrukturen von trimeren Autotransportern verwendet wird, genutzt, um die codierende Sequenz von *ata* in *A. baumannii* zu bestätigen [135].

2.3.2 Deletion von *ata* in *A. baumannii*

Zur markerlosen Deletion der *Ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii* wurde das Prinzip der homologen Rekombination verwendet, das in vorangegangenen Arbeiten bereits erfolgreich durchgeführt wurde (**Abbildung 6**, [171]). Als Grundlage dieser Technik dient die Integration benachbarter homologer Bereiche des zu deletierenden Genes in einen Suizidvektor, der die Sequenz von *sacB* enthält. Dieses Gen codiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose zu einem für Bakterien toxischen Stoff (Levan) umsetzt und somit zum Zelltod führt. Im Deletionsversuch wurde diese Eigenschaft als Segregationsdruck des zuvor in die Bakterienzellen eingebrachten Plasmides verwendet. Dafür wurde zunächst chromosomale DNA aus *A. baumannii* isoliert. Dies erfolgte indem 1 ml einer über Nacht kultivierten Bakteriensuspension in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zunächst bei 16.000 x g zentrifugiert und anschließend mit Hilfe des *QiaAmp DNA mini Kits* (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellervorgaben isoliert wurde (Stand September 2001). Die DNA wurde mit 50 µl *A. dest.* eluiert. Danach wurde die Konzentration der isolierten DNA photometrisch bestimmt. Ausgehend von 50 ng dieser DNA-Probe wurden Fragmente mit einer Größe von ca. 1.500 Bp, die sich vor (*upstream*) und nach (*downstream*) der *Ata*-codierenden Sequenzen befinden, mittels PCR amplifiziert (**Tabelle 9** und **Tabelle 10**).

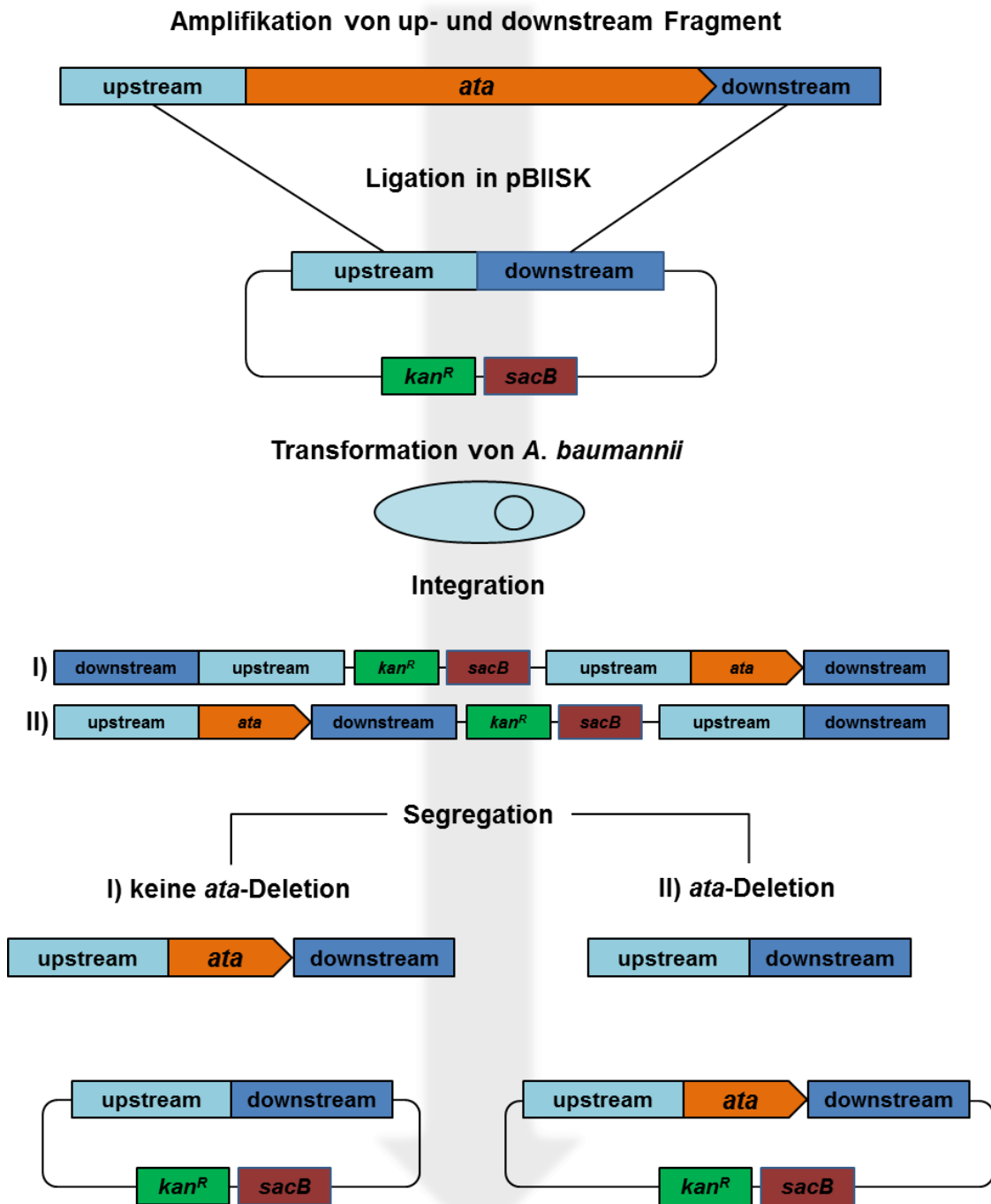


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Deletion von *ata* in *A. baumannii*. Nach erfolgreicher Amplifikation der flankierenden Bereiche (*up-* und *downstream*) von *ata* wurden diese in pBIISK ligiert. Dieses Plasmid wurde daraufhin für die Transformation von *A. baumannii* verwendet, welche im Anschluss durch Selektion auf LB-Agar mit Kanamycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) überprüft wurde. Hierbei war die Integration auf zwei verschiedene Wege möglich (I und II). Nach der Integration erfolgte die Segregation unter Selektion in Saccharose-haltigem Medium [10 % (w/v)]. Der dadurch entstandene Selektionsdruck führte zur Segregation des vorher integrierten Plasmides, wobei entweder (I) keine *ata*-Deletion stattfand oder (II) *ata* erfolgreich deletiert wurde.

Im Folgenden sind die Sequenzen dieser Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 9. Oligonukleotide zur Deletion von *ata* in *A. baumannii*. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Sämtliche Oligonukleotide wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte über Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg.

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Richtung
<i>ata</i> _up_ <i>Pst</i> I_FWD	GAC <u>ACT</u> <u>GCA</u> <u>GCA</u> TTT AGA AAG TAT TCA CGT TGG TTC
<i>ata</i> _up_ <i>Bam</i> HI_REV	GAT <u>CGG</u> <u>ATC</u> <u>CCT</u> TTA TTC ATA AAA CTT CTC AGA C
<i>ata</i> _down_ <i>Bam</i> HI_FWD	GAG <u>AGG</u> <u>ATC</u> <u>CGA</u> AAC TGG TTA GGA GGG CAA TGC TC
<i>ata</i> _down_ <i>Not</i> I_REV	GAC <u>AGC</u> <u>GGC</u> <u>CGC</u> GAT TTC TCC ATG AAT GAA TTA AG
<i>ata</i> _ctrl_FWD	GTC CAA CCA AGC AAA GGA TAG GGC CTT TGA G
<i>ata</i> _ctrl_REV	CTA ACT GAT CTA AAA ATT CAC CAA TTT TTC GG
<i>ata</i> _seq_FWD	GTC GTT GAG TTC GGT ATT TGT CTG AGA AG
<i>ata</i> _seq_REV	TAA TCT CTT TAA TCT GTC AGC AAG GAG AGC

Nachstehend sind die Schritte zur Amplifikation der einzelnen DNA-Fragmente unter Verwendung der HiFi-Polymerase (PCR-Biosystems, London, Vereinigtes Königreich) aufgeführt (**Tabelle 10**).

Tabelle 10. Temperaturprofil für die Amplifikation der *ata*-flankierenden Bereiche.

Amplifikationsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	60	35
Denaturierung	95	15	
Hybridisierung der Oligonukleotide	60-68	15	
Elongation	72	30	
finale Elongation	72	5	

Der Erfolg der Amplifikation wurde über Agarose-Gelelektrophorese bestätigt. Hierzu wurde Agarose in veränderlichen Gewichtsanteilen mit 1-fach TAE-Puffer (1 mM EDTA, 20 mM Eisessig, 40 mM Tris, pH 8,5) vermischt und erhitzt (ca. 88 °C). Das verflüssigte Agarosegemisch wurde in einen Gelträger überführt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die DNA-Proben wurden mit einem 6-fach konzentrierten Ladepuffer (New England BioLabs) versetzt und in die entsprechenden Aussparungen des Agarosegels überführt. Die Proben wurden bei einer Spannung von 120 V für ca. 60 min aufgetrennt und nach Inkubation (30 min) in einer 0,001%igen Ethidiumbromid-Lösung (v/v) durch einen UV-Transilluminator detektiert.

Nach erfolgreicher Amplifikation der beiden Fragmente wurden diese über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben (Stand März 2018) gereinigt. Die Elution erfolgte in 50 µl *A. dest.*. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Im Anschluss daran konnten beide Fragmente mit den Restriktionsenzymen *Pst*I/*Bam*HI oder *Bam*HI/*Not*I entsprechend den Herstellerangaben (New England Biolabs) inkubiert werden. Ebenso wurde das Suizidplasmid pBluescript II SK (+) (pBIISK, Thermo Fisher) mit *Pst*I/*Bam*HI inkubiert. Proteinrückstände und weitere Verunreinigungen der restringierten Fragmente und des Plasmids wurden über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Stand März 2018) entfernt.

Danach wurde zunächst das *upstream*-Fragment in pBIISK ligiert. Hierzu wurden 50 ng des restringierten Vektors und die 3-fache molare Menge des restringierten Fragmentes in einem Ligationsansatz entsprechend den Herstellervorgaben (M0202, T4-DNA Ligase, New England BioLabs) über Nacht bei 15 °C inkubiert. Am Folgetag wurde 1 µl des Ligationsansatzes verwendet, um *E. coli* DH5α zu transformieren. Hierzu wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α (New England BioLabs) auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl des Ligationsansatzes und eine Inkubation von 30 min auf Eis. Die Proben wurden dann für 30 s in einem Heizschüttler bei 45 °C inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium und die Proben wurden zur Regeneration schüttelnd (180 Upm) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Entsprechend der Kanamycin-Resistenz auf pBIISK wurden die Proben zur Selektion auf Kanamycin-haltigen (30 µg/ml) LB-Agar kultiviert. Positive Transformanten wurden am Folgetag isoliert, kultiviert und Plasmid-DNA mit dem *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) entsprechend den Herstellervorgaben (Stand Mai 2009) isoliert. Die Elution erfolgte mit 50 µl *A. dest.* und die erfolgreiche Ligation wurde mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) mit anschließender Gelelektrophorese und Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung über Eurofins) bestätigt.

Wurde die erfolgreiche Ligation des ersten Fragmentes nachgewiesen, so konnte im nächsten Schritt das *upstream*-Fragment in das Plasmid pBIISK_ upstream über *Pst*I und *Bam*HI ligiert werden. Das dadurch erhaltene Plasmid pBIISK_ *ata*_up-/downstream wurde nun in *A. baumannii* transformiert. Hierzu

wurde zunächst 1 ml einer über Nacht inkubierten Bakteriensuspension zentrifugiert und in 200 µl einer 300 mM Saccharose-Lösung 3 x gewaschen. Danach wurden 50 µl dieser Suspension in eine Elektroporationsküvette (2 mm Schichtdicke, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) pipettiert. Mit möglichst geringem Volumen wurde 2 µg des Plasmides pBIISK_ata_up-/downstream in die Küvette überführt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Mit Hilfe des *Gene Pulser II* mit *Pulse Controller Plus* (BioRad) wurde *A. baumannii* mit dem Plasmid transformiert (2,5 kV, 200 Ω und 25 µF). Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium (37 °C) zu den Bakterien gegeben und die Probe wurde für 1 h bei 37 °C schüttelnd (180 Upm) in einem 13 ml-Röhrchen inkubiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter *A. baumannii* wurde die Suspension auf LB-Agar mit Kanamycin (100 µg/ml) kultiviert. Am Folgetag konnten gewachsene Kolonien isoliert, flüssig kultiviert und die Integration des Vektors in das Genom über PCR validiert (*ata_ctrl_FWD/ata_ctrl_REV*) werden. War diese erfolgreich, wurde eine Gegenselektion in LB-Medium mit 10 % Saccharose (w/v, Carl Roth) durchgeführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension verdünnt und auf LB-Agar mit 10 % Saccharose inkubiert, um Einzelkolonien zu erhalten. Diese wurden wiederum auf LB-Agar und LB-Agar mit Kanamycin (100 µg/ml) übertragen, wodurch die erfolgreiche Segregation überprüft wurde. Wuchsen die Kolonien auf LB-Agar, aber nicht auf LB-Agar mit Kanamycin, so konnte davon ausgegangen werden, dass die Segregation des Plasmides und somit die Deletion der *ata*-codierenden Sequenz erfolgreich war. Zur Validierung wurde chromosomale DNA der Klone isoliert und mittels PCR (*ata_ctrl_FWD/ata_ctrl_REV*) und Sequenzierung (*ata_seq_FWD/ata_seq_REV*) überprüft.

2.3.3 Komplementierung der *Ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii* Δ *ata*

Nachdem die *Ata*-codierende Sequenz erfolgreich deletiert wurde, sollte im nächsten Schritt das Gen im Deletionsstamm komplementiert werden. Dies erfolgte, indem das Gen inklusive seiner vorhergesagten ribosomalen Bindestelle (RBS) in einen Expressionsvektor ligiert und dann über Konjugation auf *A. baumannii* Δ *ata* übertragen wurde. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. K. Hori (Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya, Japan) durchgeführt.

In **Tabelle 11** sind die zur Komplementierung verwendeten Oligonukleotide und Plasmide aufgeführt.

Tabelle 11. Übersicht der zur Komplementierung von *ata* verwendeten Oligonukleotide und Plasmide. Unterstrichene Sequenzen markieren die eingefügten Restriktionserkennungsstellen. Sämtliche Oligonukleotide wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte über Eurofins Genomics Germany GmbH.

Oligonukleotide	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Quelle	
Kan_PvuII_FWD	CAG <u>CAG CTG</u> TTG ATC TTT TCT ACG GGG TCT G	diese Arbeit	
Kan_PvuII_REV	CAG <u>CAG CTG</u> CTT AGA AAA ACT CAT CGA GCA TC	diese Arbeit	
<i>ata</i> -in_fusion_FWD	TTG GGC TAG CGA ATT CGT ATT TGT CTG AGA AGT TTT AT	diese Arbeit	
<i>ata</i> -in_fusion_REV	TGG CGG CCG CTC TAG ATT AAT TAA TCA CAC CAC TAA TAC	diese Arbeit	
Vektoren	Beschreibung	Resistenzen	Quelle
pARP3	<i>E. coli</i> - <i>Acinetobacter</i> -Shuttle-Vektor, <i>Acinetobacter</i> -Expressionsvektor, p _{BAD} -Promoter	Ampicillin, Gentamicin	[172]
pET24a	Standard- <i>E. coli</i> -Überproduktionsvektor	Kanamycin	Merck, Deutschland
pARKM	Kanamycin-Resistenz aus pET42a in pARP3	Gentamicin, Kanamycin	diese Arbeit
pARKM_ata	<i>Ata</i> -codierende Sequenz inkl. RBS in pARKM	Gentamicin, Kanamycin	diese Arbeit

Im Einzelnen wurde zunächst das Kanamycin-Resistenzgen (*kan^R*) ausgehend von pET24a über die Oligonukleotide mit *PvuII*-Erkennungssequenzen Kan_PvuII_FWD und Kan_PvuII_REV amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Stand März 2018) aufgereinigt. Daraufhin wurde das Fragment und der Vektors pARP3 jeweils mit *PvuII* (New England BioLabs) inkubiert. Beide Proben wurden in einem Ligationssansatz zusammengeführt (T4-Ligase, New England Biolabs). Mit dem Ligationprodukt wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α transformiert und zur Selektion auf LB-Agar mit Kanamycin (30 µg/ml) inkubiert. Am Folgetag wurden positive Klone ausgewählt, kultiviert, Plasmid-DNA isoliert und mittels RFLP überprüft. Im weiteren Verlauf wurde die *Ata*-codierende Sequenz inkl. RBS ausgehend von isolierter chromosomaler DNA von *A. baumannii* über die Oligonukleotide *ata*-in_fusion_FWD und *ata*-in_fusion_REV amplifiziert. Für die Ligation des *ata*-Fragmentes in pARKM wurde zunächst der Vektor mit *EcoRI/XbaI* (New England BioLabs) inkubiert und über das *In-fusion PCR cloning kit* nach Herstellerangaben (Protokollnummer 121416, Clone Tech, Saint-Germain-en-

Laye, Frankreich) ligiert. Der Ligationsansatz wurde verwendet, um *E. coli* DH5 α zu transformieren. Anschließend erfolgte zur Selektion positiver Klone die Kultivierung auf LB-Agar mit Kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$). Positive Klone wurden ausgewählt, kultiviert, Plasmid-DNA isoliert und mittels RFLP überprüft. Das daraus resultierende Plasmid pARKM_ata und das Kontrollplasmid pARKM wurden verwendet, um *E. coli* WM6026 zu transformieren. Für die Konjugation der Plasmide in *A. baumannii* Δata wurden die DAP-auxotroph wachsenden *E. coli* WM6026 über Nacht in LB-Medium mit Kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$) und 600 μM 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und *A. baumannii* Δata bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} von 0,4) in LB-Medium inkubiert. Daraufhin wurden gleiche Volumina und Zellzahlen der Bakterien *E. coli* WM6026_pARKM mit *A. baumannii* Δata oder *E. coli* WM6026_pARKM_ata mit *A. baumannii* Δata gemischt und auf LB-Agar mit 600 μM DAP für 24 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien von der Platte isoliert, in einer 0,5%igen [w/v] Natriumchlorid-Lösung gelöst und zur Selektion von Transkonjuganten auf LB-Agar mit Kanamycin (100 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Konjugation der Plasmide von *E. coli* auf *A. baumannii* wurden Kolonien ausgewählt, kultiviert, Plasmid-DNA isoliert und mittels RFLP überprüft.

2.3.4 Wachstumsanalysen von *A. baumannii*

Um sicherzustellen, dass die genetische Modifikation der Bakterienstämme keinen Einfluss auf deren Phänotyp hat, wurden Wachstumsversuche in LB-Medium mit oder ohne Arabinose (Induktor für den p_{BAD}-Promotor in pARKM_ata bzw. pARKM) durchgeführt. Hierfür wurden über Nacht kultivierte Bakteriensuspensionen der jeweiligen Stämme in LB-Medium überführt ($\text{OD}_{600} = 0,05$). Die Proben wurden anschließend bei 37 °C schüttelnd (180 Upm) über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. In definierten Zeitabständen wurde 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, in eine Küvette überführt und die OD_{600} bestimmt. Als Referenz diente das jeweilige Kultivierungsmedium.

2.3.5 Untersuchung der *ata*-Expression mittels qRT-PCR

Für die Analyse der *ata*-Expression in den erzeugten *A. baumannii*-Stämmen wurde die Gesamt-RNA der Bakterien isoliert und mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) analysiert. Dies erfolgte mithilfe interner Standards in Form von Plasmiden bekannter Plasmidkopienzahl (**Tabelle 12**).

Tabelle 12. Auflistung der zur *ata*-Expressionsanalyse verwendeten Oligonukleotide und Plasmide. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte über Eurofins Genomics Germany GmbH.

Oligonukleotide	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Quelle	
<i>ata</i> -RT_FWD	ATT CGG TGC TGT TGC ACA AG	diese Arbeit	
<i>ata</i> -RT_REV	CAC CCG GTT TAT TAC CAG AG	diese Arbeit	
<i>rpoB</i> -RT_FWD	GAG TCT AAT GGC GGT GGT TC	diese Arbeit	
<i>rpoB</i> -RT_REV	ATT GCT TCA TCT GCT GGT TG	diese Arbeit	
Vektoren	Beschreibung	Resistenzen	Quelle
pCR™-Blunt II-TOPO (pTOPO)	Standard-Klonierungsvektor zur Ligation von Fragmenten mit glatten Enden	Kanamycin, Zeocin	Thermo Fisher
pTOPO_ <i>rpoB</i> -RT	110 Bp großes Fragment von <i>rpoB</i> in pTOPO ligiert	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit
pTOPO_ <i>ata</i> -RT	110 Bp großes Fragment von <i>ata</i> in pTOPO ligiert	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit

Zur Herstellung der Referenzplasmide wurde 50 ng chromsomalere DNA von *A. baumannii* zur Amplifikation der *ata*-RT- und *rpoB*-RT-Fragmente als Matrize in einer PCR unter Verwendung der HiFi-Polymerase (PCR Biosystems) eingesetzt (**Tabelle 13**).

Tabelle 13. Temperaturprofil der *ata*-RT- und *rpoB*-RT-PCR.

Amplifikationsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	60	35
Denaturierung	95	15	
Hybridisierung der Oligonukleotide	60	15	
Elongation	72	15	
finale Elongation	72	300	

Nach Durchführung der PCR wurden die Proben hinsichtlich ihrer Fragmentgrößen mittels Gelelektrophorese überprüft und über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Stand März 2018) aufgereinigt. Die einzelnen Fragmente wur-

den dann in einer Ligationsreaktion mit pTOPO (*Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit*, Thermo Fisher, nach Herstellernangaben, MAN0000062) eingesetzt und für die Transformation von *E. coli* DH5 α verwendet. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit Kanamycin (30 μ g/ml). Am Folgetag wurden Kolonien ausgewählt, kultiviert, Plasmid-DNA isoliert und mittels RFLP überprüft.

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus *A. baumannii* wurden diese in 100 ml-Erlenmeyerkolben unter Zugabe oder Abwesenheit von Arabinose für Δ ata(p) und Δ ata(c) für 24 h inkubiert. Nach 2, 4, 8 und 24 h wurde jeweils 1 ml der Bakteriensuspension entnommen und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 6.000 x g zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Nachdem sämtliche Proben gesammelt wurden, erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA. Hierzu wurden die Sedimente zunächst in 200 μ l *Max Bacterial Enhancement Reagent* (Thermo Fisher) gelöst und für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert. Darauffolgend wurde 1 ml TRIzol[®]-Lösung (Thermo Fisher) zu den Proben hinzugefügt und die Bakteriensuspension gemischt. Es folgte eine Inkubation der Proben für 5 min bei Raumtemperatur. Zur Phasenseparation wurde 200 μ l eiskaltes Chloroform (Sigma Aldrich) zu den Proben gegeben und diese anschließend für ca. 15 s invertiert. Die Proben wurden danach 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Es bildete sich eine untere rote Phase (Chloroform-Phenol), eine Interphase und eine obere farblose wässrige Phase. Die wässrige Phase (ca. 400 μ l) wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l eiskaltem Isopropanol (Sigma Aldrich) gemischt. Es folgte eine Inkubation der Proben für 10 min bei Raumtemperatur mit anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die RNA mit 1 ml 75%iger [v/v] Ethanol-Lösung gemischt und erneut bei 7.500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das RNA-Sediment im Reaktionsgefäß zum Trocknen bei 60 °C offen in einen Heizblock gestellt. Sobald jegliche Flüssigkeitsrückstände verdampft waren, wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Für die qRT-PCR wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und in 50 μ l RNase-freien Wasser (*DEPC-treated Ultrapure Water*, Thermo Fisher) gelöst. Danach wurde die Konzentration der RNA-Proben photometrisch ermittelt und

mit RNase-freiem Wasser auf eine RNA-Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Jeweils 50 ng der Proben wurden als Vorlage zur Amplifikation der *ata*-RT- und *rpoB*-RT-Fragmente mittels qRT-PCR (*QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit*, Qiagen) verwendet. Zur internen Kalibrierung wurden verschiedene Konzentrationen der Plasmide pTOPO_*ata*-RT ($M = 2,5 \times 10^6$ g/mol) und pTOPO_*rpoB*-RT ($M = 2,24 \times 10^6$ g/mol) mit bekannter Plasmidkopienzahl eingesetzt. Dabei wurde die Plasmidkopienzahl wie folgt errechnet:

Formel 2. Berechnung der Plasmidkopienzahl mit bekannter molaren (M) und Masse (m).

$$\text{Kopienzahl} = \frac{N_A \times m}{M}$$

Hierbei entspricht N_A der Avogadro-Konstante von $6 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, M der molaren Masse der Plasmide in ng/mol und m der Masse der Plasmide in ng. Zur Analyse der Plasmide mittels qRT-PCR wurden jeweils 1 µl der verschiedenen Plasmidmengen im Bereich von 1 bis 1×10^7 Kopien eingesetzt.

Nachfolgend sind die Amplifikationsschritte der qRT-PCR aufgeführt (**Tabelle 14**). Die Reaktion wurde in einem Gerät der Firma Roche (LightCycler® 480 Real-Time PCR-System, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 14. Temperaturprofil für die reverse Transkription und Amplifikation zur Analyse der *ata*-Expression.

Amplifikationsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
reverse Transkription	50	1.800	
initiale Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase	95	900	
Denaturierung	95	15	40
Hybridisierung der Oligonukleotide	60	15	
Elongation	72	15	
Schmelzkurvenanalyse	40 bis 95		

Nach der Reaktion wurde anhand der Schmelzpunktanalyse der beiden amplifizierten Fragmente die Reinheit der Proben überprüft. Zur Ermittlung der C_T -Werte (C_T , *threshold cycle*), die von der Ausgangsmenge der entsprechenden Matrize abhängig sind, wurde der *Fitpoint-Quantification-Modus* des Programmes (LightCycler® 480 Software, Version 1.5) verwendet. Für die Auswertung wurden die C_T -Werte der internen Standardplasmide gegen deren Kopienzahl aufgetragen. Über die daraus erhaltene Formel im Format $y = axe^{bx}$ konnte die

Rückrechnung der C_T -Werte der unbekanntenen Proben in Kopienzahlen erfolgen. Um Aussagen über die *ata*-Expression zu treffen, wurde der prozentuale Anteil der *ata*-Fragmente gegenüber dem Anteil der *rpoB*-Fragmente berechnet.

2.3.6 Immunologische Untersuchung von Ata

Zur Untersuchung der Assemblierung des gebildeten Ata-Proteins auf der Oberfläche von verschiedenen *A. baumannii*-Stämmen wurde ein polyklonaler Antikörper mit einer Reaktivität gegen die Kopfdomäne von Ata verwendet, die zuvor mit Hilfe des daTAA [135] Programmes bestimmt wurde.

Amplifikation und Ligation in pET24a

Die codogene Sequenz der Ata-Kopfdomäne wurde mittels PCR ausgehend von chromosomaler DNA von *A. baumannii* amplifiziert (**Tabelle 15**). Das erhaltene Fragment und der pET24a-Vektor wurden jeweils mit den beiden Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* inkubiert. Beide Ansätze wurden daraufhin unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Stand März 2018) aufgereinigt und zur Ligation des PCR-Fragmentes in pET24a in einer Ligationreaktion (T4-Ligase, New England BioLabs) eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation (15 °C, über Nacht) wurde der Liagtionsansatz für die Transformation von *E. coli* DH5 α verwendet.

Tabelle 15. Übersicht über die zur Klonierung der Kopfdomäne von Ata verwendeten Oligonukleotide und Plasmide. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte über Eurofins Genomics Germany GmbH.

Oligonukleotide	Sequenz in 5' - 3' Richtung		Quelle
<i>ata</i> -Kopf_ <i>NdeI</i> _FWD	ATG <u>CAT ATG</u> AAT AAA GTT TAC AAG GTC ATT TGG		diese Arbeit
<i>ata</i> -Kopf_ <i>XhoI</i> _REV	ACC TTG GCC <u>CTC GAG</u> AAC TGC AAC TG		diese Arbeit
M13_FWD	TGT AAA ACG ACG GCC AGT		Thermo Fisher
M13_REV	CAG GAA ACA GCT ATG AC		Thermo Fisher
Plasmide	Beschreibung	Resistenzen	Quelle
pET24a	Expressionsvektor zur Synthese von Proteinen in <i>E. coli</i> , lac-Promoter	Kanamycin	Thermo Fisher

Am Folgetag wurden Kolonien ausgewählt, kultiviert, Plasmid-DNA isoliert und mittels RFLP überprüft. Das entstandene Plasmid pET24_ata-Kopf wurde zur Transformation von *E. coli* BL21 verwendet. Die Selektion erfolgreicher Transformanten erfolgte durch Kultivierung auf LB-Agar mit Kanamycin (30 µg/ml). Der daraus resultierende Stamm *E. coli*_pET24_ata-Kopf wurde zur Induktion der Synthese der Ata-Kopfdomäne verwendet.

Induktion der Proteinsynthese in E. coli_pET24_ata-Kopf

Für die Induktion der Proteinsynthese der Ata-Kopfdomäne wurde *E. coli*_pET24_ata-Kopf zunächst über Nacht kultiviert und zu 50 ml in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben frisch überimpft ($OD_{600} = 0,05$). Die Bakteriensuspension wurde schüttelnd (180 Upm) bei 37 °C inkubiert bis eine OD_{600} von 1,0 erreicht war. Die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration: 400 µM) diente zur Induktion der Genexpression unter Kontrolle des *lac*-Promoters. Jeweils unmittelbar vor der Induktion und 1, 2 und 3 h nach der Zugabe von IPTG wurden 1 ml-Proben entnommen, zentrifugiert und in Probenauftragspuffer (3-fach konzentriert: 8 % SDS [w/v], 24 % Glycerol [v/v], 100 mM Tris, 4 % β-Mercaptoethanol [v/v], 0,02 % Serva Blau G [w/v], pH 6,8) gelöst. Danach wurde für 15 min bei 95 °C inkubiert und die Probe über eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels nach Schägger und Jagow ist im Folgenden aufgeführt [173].

Tabelle 16. Zusammensetzung eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach Schägger und Jagow [173].

Bezeichnung	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel
3-fach Gelpuffer (3 M Tris, 0,3 % SDS [w/v], pH 8,45)	13,33 ml	4,96 ml
30 % Acrylamid [v/v]	16,67 ml	2,67 ml
87 % Glycerin [v/v]	5 ml	
dest. Wasser	5 ml	12,37 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat [w/v]	0,2 ml	0,125 ml
Tetramethylethyldiamin	0,1 ml	0,05 ml

Trenngel und Sammelgel wurden in einen Gelgießstand der Firma BioRad hergestellt. Sobald das Gel verfestigt war, wurde es zur Auftrennung der Gesamtproteine verwendet (60 V für 20 min, danach 120 V für x min). Hierfür wurde ein Kathodenpuffer (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % SDS [w/v], pH 8,25) und ein

Anodenpuffer (100 mM Tris, pH 8,9) verwendet. Nach der Auftrennung der Gesamtproteine wurden diese durch Coomassie-Blau detektiert [174]. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel in einen Behälter überführt und über Nacht in Coomassie-Färbelösung (50 % Methanol [v/v], 10 % Essigsäure [v/v], 0,5 g Serva Blau R) und zum Entfärben anschließend in Coomassie-Entfärbelösung (33 % Methanol [v/v], 10 % Essigsäure [v/v]) inkubiert (ca. 3 h).

Aufreinigung der Ata-Kopfdomäne

Die Ata-Kopfdomäne wurde über Affinitätschromatografie isoliert. Hierzu wurde die Kultivierung der Bakterien in einem Gesamtvolumen von 1 L vorgenommen und die Proteininduktion nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 durch Zugabe von Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranosid (ITPG, Sigma Aldrich) gestartet. Nach 1 h wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (30 min, 6.000 x g) und das Sediment in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt. Das Bakteriensediment wurde in 2 ml Lyse-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mg/ml Lysozym, eine Spatelspitze DNase [400 Kunitz units/mg, Sigma Aldrich], pH 8,0) gelöst und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden mittels einer Ultraschallbehandlung (6x 30 s) aufgebrochen und die Zelltrümmer durch eine erneute Zentrifugation (30 min, 6.000 x g) von den freigesetzten Proteinen separiert. Das Säulenmaterial (500 µl) zur Affinitätschromatografie (*HisPur Ni-NTA Resin*, Thermo Fisher) wurde in einen Säulenbehälter überführt und 1x mit Lyse-puffer kalibriert, um dieses anschließend mit der Proteinlösung für 1 h bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nicht gebundene Proteine wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und das Säulenmaterial 4x mit jeweils 1 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Danach erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch 1 ml Elutionspuffer (100 mM Imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol). Anschließend wurde die Proteinmenge unter Verwendung des *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben (Protokollnummer 0412.6) bestimmt. Eine Gesamtmenge von 170 µg der isolierten Ata-Kopfdomäne wurde in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und gefärbt. Das sichtbare Protein wurde aus dem Gel herausgeschnitten und zur kommerziellen Immunisierung von zwei Kaninchen (klassisches Immunisie-

rungsprogramm, Eurogentec, Lüttich, Belgien) verwendet. Das genaue Immunsierungsprotokoll ist der Unternehmenswebseite zu entnehmen: <https://secure.eurogentec.com/life-science.html> (abgerufen am 10.11.2019).

Aufbereitung der Seren

Die verschiedenen Seren wurden bei -20 °C gelagert. Jeweils 200 µl des gelieferten Serums (*Large Bleed* vom 16.09.2015, Kaninchen 1424) wurde über das *NAb™ Protein A/G Spin Kit* (Thermo Fisher) entsprechend den Herstellervorgaben (Protokollnummer 1941.4) aufgereinigt. Die Antikörpermenge wurde photometrisch bestimmt (Extinktionskoeffizient von IgG bei 280 nm = 1,36 [175]) und konnte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Immunfluoreszenztest

Der aufbereitete polyklonale Antikörper wurde verwendet, um Ata auf der Oberfläche von *A. baumannii* nachzuweisen. Dafür wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 kultiviert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 15 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal in 10 ml PBS gewaschen und auf eine Keimzahl von 1x10⁸ Bakterien/ml eingestellt. In eine Zellkulturschale (24-Kavitäten) wurden zuvor sterile Deckgläschen überführt und mit einer Kollagen-G-Lösung (10 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur überschichtet. Danach wurde jeweils 1 ml der entsprechenden Bakteriensuspension dazugegeben. Die Proben wurden für 10 min bei 500 x g zentrifugiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben für weitere 2 h offen bei 37 °C getrocknet. Im Anschluss wurden die Proben mit 3,75 % [v/v] Paraformaldehyd (in PBS) für 15 min bei 4 °C fixiert und 3x mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Proben über Nacht mit 5 % [v/v] Ziegen Serum (in PBS mit 0,1 % [v/v] Tween 20 [PBS-T], Thermo Fisher) inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben erneut 3x mit PBS-T gewaschen. Der polyklonale Antikörper gegen die Ata-Kopfdomäne wurde 1:100 in PBS-T verdünnt und zu den Bakterien gegeben. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 3x mit PBS-T gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment-Alexa Flour® 488* konjugiert, 1:1000 in PBS-T, Cell Signalling, Frankfurt am Main) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Proben wurden erneut 3x mit PBS-T gewaschen und es folgte die Inkubation mit einer 300 nM 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur. Die Proben wurden erneut

in PBS-T gewaschen und zur Lagerung mit FluoPrep (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) konserviert. Die Detektion der Antikörpersignale erfolgte über ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 200 mit AxioCam MRm Digital Camera, Jena). Die digitale Bearbeitung wurde mit dem Programm *Visi View* (Visitron Systems, Puchheim) durchgeführt.

2.4 Untersuchungen zur Adhärenz von *A. baumannii* an abiotischen Faktoren und humane Zellen

2.4.1 Adhäsion von *A. baumannii* an abiotische Faktoren

Zur Untersuchung der Adhärenz von *A. baumannii* an abiotische Faktoren wurden Zellkulturschalen über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Proteinlösungen in einer Konzentration von jeweils 100 µg/ml in PBS inkubiert (**Tabelle 17**). Die Proteinlösung wurde nach der über-Nacht-Inkubation verworfen.

Tabelle 17. Übersicht der zur Untersuchung der Adhärenz von *A. baumannii* verwendeten extrazellulären Matrixproteine und rekombinanten Oberflächenproteine.

Bezeichnung	Quelle
humanes Kollagen A	Merck Millipore,
humanes Laminin	Sigma Aldrich
humanes Fibronectin	Merck Millipore
vaskuläres Zelladhäsionsprotein 1 (VCAM-1)	Abcam, Cambridge, UK
interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1)	Abcam
interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 2 (ICAM-2)	Abcam

Die verschiedenen *A. baumannii*-Stämme wurden flüssig kultiviert und mit PBS auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Danach wurde jeweils 1 ml der Bakteriensuspension (1×10^8 Bakterien) in die jeweilige Kavität der Zellkulturschale gegeben und bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellkulturschalen bei 37 °C für 1 h inkubiert und die nicht-adhärenen Bakterien durch dreimaliges Waschen (Auf- und Abpipettieren) mit PBS entfernt. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml einer 0,05%igen [w/v] Kristall-Violett-Lösung (in PBS, Sigma Aldrich). Die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl reinem Ethanol wurde die

Absorption der Lösung in einem Platten-Fotometer (Infinity 200pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 590 nm bestimmt.

2.4.2 Adhäsion von *A. baumannii* an humane Zellen

2.4.2.1 Adhäsion von *A. baumannii* an humane Zellen unter statischen Infektionsbedingungen

Zur Quantifizierung der bakteriellen Adhärenz wurden Endothelzellen (HUVEC, HMEC-1, HDMEC) oder Epithelzellen (A549, Hep-G2, HeLa) in Zellkulturschalen (6-Kavitäten) kultiviert. Zur Inkubation der Bakterien mit den humanen Zellen wurden diese zunächst mit Ko-Kultivierungsmedium gewaschen und die Bakterien-suspensionen im selben Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt (1×10^8 Bakterien/ml, MOI 200). Nach Zugabe der Bakterien-suspension zu den humanen Zellen wurden die Proben für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die infizierten Zellen wurden anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden 3x mit Ko-Kultivierungsmedium gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA (0,05 %, [w/v]) mit anschließender 15-minütiger Inkubation bei 37 °C aus den Zellkulturschalen gelöst. Die infizierten Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 6.000 x g für 15 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 50 µl *A. dest.* gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Weiterhin wurden humane Zellen infiziert, um die Adhäsion von *A. baumannii* fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Hierzu erfolgte die Kultivierung der humanen Zellen in Kulturschalen (24-Kavitäten) in denen sich Deckgläschen (für Endothelzellen mit Kollagen G beschichtet) befanden. Die Inkubation der Zellen mit *A. baumannii* erfolgte wie bereits beschrieben (MOI 200). Die Zellen wurden nach der einstündigen Inkubation 3x mit Ko-Kultivierungsmedium gewaschen und anschließend für 15 min bei 4 °C unter Zugabe von 1 ml 3,75%iger [v/v] PFA-Lösung fixiert. Die Proben wurden 3x mit PBS gewaschen und für 30 min mit einer 0,1%igen [v/v] Triton X-100-Lösung (in PBS, Sigma Aldrich) inkubiert, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Nach 3x Waschen mit PBS wurde 1 ml einer Phalloidin-Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat-Lösung (TRITC-Phalloidin, 0,5 ng/ml in PBS, Sigma Aldrich) zur Färbung des Aktin-Zytoskeletts zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden 3x mit

PBS gewaschen und mit 1 ml einer DAPI-Lösung für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen auf einen Objektträger platziert und mit FluoPrep (BioMérieux) konserviert. Die infizierten Zellen wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Axiovert 200 mit AxioCam MRm Digital Camera, Zeiss). Die digitale Bearbeitung wurde mit dem Programm *Visi View* (Visitron Systems) durchgeführt.

Um potenzielle Liganden von *A. baumannii* auf der Oberfläche von Endothelzellen zu identifizieren, die an der Bindung der Bakterien beteiligt sind, wurden Versuche mit neutralisierenden Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden HUVECs wie beschrieben in Zellkulturschalen (6 Kavitäten) kultiviert. Die Anzucht der verschiedenen *A. baumannii*-Stämme erfolgte wie bereits erwähnt. Vor der Infektion der humanen Endothelzellen wurden diese zunächst mit 10 ng/ml TNF α (gelöst in Zellkulturmedium mit 2 % FCS, PreproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA) für 16 h bei 37 °C inkubiert. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Zellen einen untereinander vergleichbaren Phänotyp im Sinne der Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise VCAM-1 aufweisen. Die Zellen wurden anschließend 3x mit Zellkulturmedium gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung endothelspezifischer Oberflächenrezeptoren, indem die Zellen mit entsprechenden Antikörpern für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden. Hierfür wurden folgende Antikörper verwendet: anti-human IgG (Klon: 679.1Mc7, Endkonzentration: 400 ng/ml, Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA), anti-human α_4 -Integrin (Klon: HP2/1, Endkonzentration: 200 ng/ml, Beckman Coulter) und anti-human β_1 -Integrin (Klon: Lia 1/2, Endkonzentration: 20 μ g/ml, Beckman Coulter), jeweils in Endothelzellmedium mit 2 % [v/v] FCS gelöst. Danach wurden die Zellen erneut 3x mit Zellkulturmedium gewaschen. Durch anschließende Zugabe der Bakterienkultur (MOI 200) wurde die Infektion gestartet. Nach Inkubation bei 37 °C für 1 h wurden nicht-adhärenente Bakterien durch dreimaliges Waschen mit Zellkulturmedium entfernt. Die adhärenente und infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber aus den Kavitäten gelöst, in PBS seriell verdünnt und auf LB-Agar zur Bestimmung der Keimzahl kultiviert.

2.4.2.2 Adhäsion von *A. baumannii* an humane Zellen unter dynamischen Infektionsbedingungen

Zur Untersuchung des Einflusses von Scherkräften auf die Adhärenz von *A. baumannii* an humane Zellen wurde ein dynamischer Infektionsversuch etabliert. Hierzu wurden die Zellen in Durchflussskammern (μ -Slide I Luer, Ibbidi) kultiviert. Die Bakterienkultur wurde auf eine Keimzahl von 2×10^7 Bakterien in 12 ml Ko-Kultivierungsmedium eingestellt (entspricht einer MOI von 200). Die Bakterien-suspension und 20 ml Ko-Kultivierungsmedium wurden jeweils in 20-ml-Spritzen (Braun, Melsungen) überführt. Die Durchflussskammern wurden mit entsprechenden Verbindungsschläuchen an die Spritzen über einen Dreiwegehahn (Braun) angeschlossen und in eine Perfusor-Pumpe (MTS, Schweinfurth) eingespannt (**Abbildung 7 A und B**). Mit einer konstanten Flussrate von 0,2 ml/min (ca. 0,26 dyn/cm²) wurde das Medium für 15 min über die in den Durchflussskammern kultivierten Zellen gespült. Danach wurden die Spritzen mit den Bakterienkulturen mit der Durchflussskammer verbunden und die Infektion fand mit einer konstanten Flussrate von 0,2 ml/min für 60 min statt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit Medium überspült, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Die Flüssigkeit aus der Durchflussskammer wurde mit Hilfe einer Pipette und vorsichtigen Klopfen vollständig entfernt und mit 200 μ l Trypsin-EDTA (0,05 % [w/v]) ersetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurden die infizierten Zellen durch Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für 15 min bei 6.000 x g zentrifugiert und das Zellsediment in 30 μ l *A. dest.* gelöst. Bis zur weiteren Verwendung konnten die infizierten Zellen bei -20 °C gelagert werden.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Zellen zunächst in Durchflussskammern (μ -Slide VI 0.4, Ibbidi) kultiviert. Die Bakterienzahl in 12 ml betrug 2×10^6 Bakterien (entspricht einer MOI von 200). Die Infektion erfolgte wie bereits beschrieben. Nachdem Spülen der Zellen wurden diese mit 200 μ l einer 3,75%igen [w/v] PFA-Lösung fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit 200 μ l Triton X-100 (0,1 % in PBS [v/v]) permeabilisiert, das Aktin-Zytoskelett mit 200 μ l TRITC-Phalloidin und die zelluläre bzw. bakterielle DNA mit 200 μ l einer DAPI-Lösung gefärbt. Durch Zugabe von 200 μ l FluoPrep (BioMérieux) wurden die ge-

färbten Zellen konserviert und konnten dann unter Verwendung eines Konfokal-mikroskops (Konfokales Lasermikroskop A1R, Nikon, Minato, Präfektur Tokio, Japan) untersucht werden.

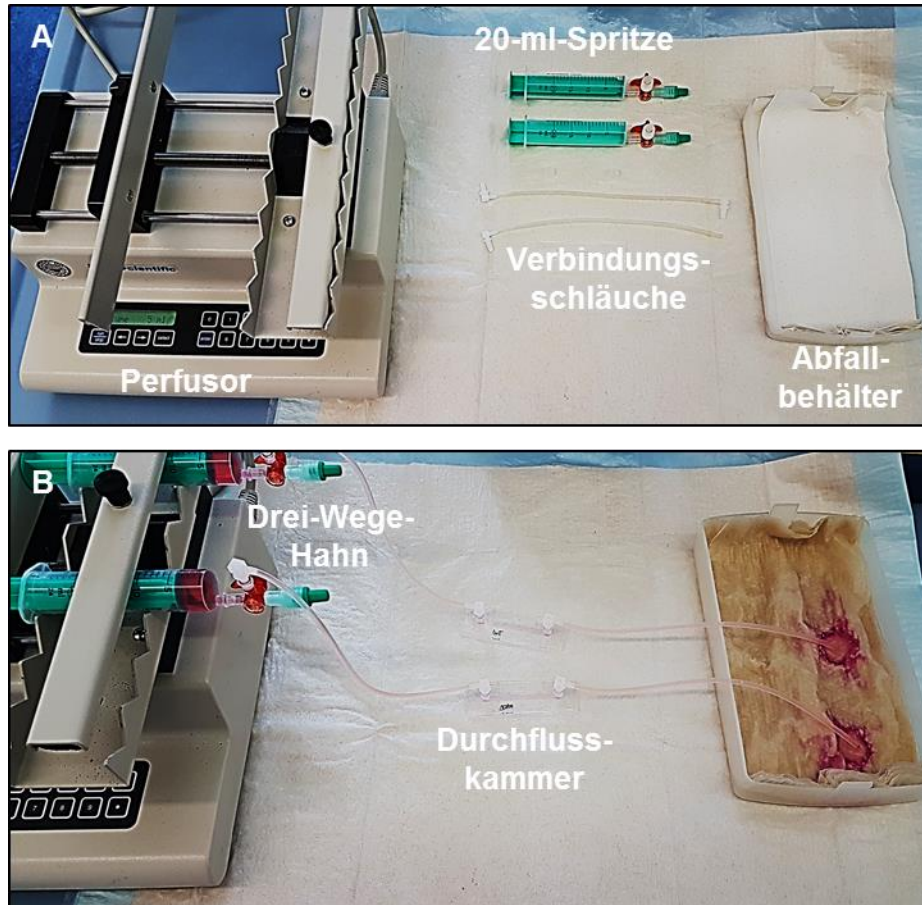


Abbildung 7. Materialien und Versuchsaufbau zur dynamischen Infektion humaner Zellen mit *A. baumannii*. (A) Zur Infektion humaner Zellen mit *A. baumannii* wurde ein dynamisches *in vitro* Infektionsmodell etabliert. Hierfür wurden folgende Materialien benötigt: Perfusor, Verbindungsschläuche, 20 ml-Spritzen und ein Abfallbehälter. (B) Die Spritzen wurden mit einem Drei-Wege-Hahn blasenfrei verschlossen. Über den Drei-Wege-Hahn wurden die Schläuche mit der Durchflusskammer verbunden. Weitere Schläuche führen von der Durchflusskammer in den Abfallbehälter. Die Flussrate des Perfusors wurde auf einen Wert von 0,2 ml/min eingestellt.

2.4.2.3 Quantifizierung adhärenter Bakterien mittels qRT-PCR

Die durch die Infektion der humanen Zellen mit *A. baumannii* gewonnenen Proben der statischen und dynamischen Adhäsionsversuche wurden verwendet, um die Anzahl der adhärenter Bakterien zu bestimmen. Dies geschah, indem bakterien- und humanspezifische (*rpoB* bzw. *hmbs*) Genäquivalente mittels qRT-PCR amplifiziert und die Kopienzahl dann über die C_T -Werte bestimmt wurde. Hierfür wurden zunächst interne DNA-Standards in Form von Plasmiden hergestellt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide und Plasmide sind in **Tabelle 18** aufgeführt.

Tabelle 18. Übersicht der zur Herstellung interner DNA-Standards für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide und Plasmide. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Synthese der Oligonukleotide über Eurofins Genomics Germany GmbH.

Oligonukleotid	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Quelle	
<i>rpoB</i> -RT_FWD	GAG TCT AAT GGC GGT GGT TC	diese Arbeit	
<i>rpoB</i> -RT_REV	ATT GCT TCA TCT GCT GGT TG	diese Arbeit	
<i>hmbs</i> -RT_FWD	TTC CTT CCC TGA AGG GAT TCA CTC AG	Galaxy Diagnostics Incorporated, North Carolina, USA	
<i>hmbs</i> -RT_REV	TTA AGC CCA GCA GCC TAT CTG ACA CCC	Galaxy Diagnostics	
Vektoren	Beschreibung	Resistenzen	Quelle
pCR TM -Blunt II-TOPO (pTOPO)	Standard-Klonierungsvektor zur Ligation von Fragmenten mit glatten Enden	Kanamycin, Zeocin	Thermo Fisher
pTOPO_ <i>rpoB</i> -RT	110 Bp großes Fragment von <i>rpoB</i> in pTOPO ligiert	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit
pTOPO_ <i>hmbs</i> -RT	110 Bp großes Fragment von <i>hmbs</i> in pTOPO ligiert	Kanamycin, Zeocin	diese Arbeit

Das Plasmid pTOPO_*rpoB*-RT lag bereits vor und die Herstellung von pTOPO_*hmbs*-RT erfolgte äquivalent (siehe **2.3.5**). Die molare Masse des Plasmides betrug $2,56 \times 10^6$ g/mol und die Kopienzahl in einem definierten Volumen konnte über die bereits aufgeführte **Formel 2** errechnet werden. Zur Quantifizierung der adhärennten Bakterien wurden jeweils 1 µl der infizierten Proben oder der verschiedenen Plasmidmengen als Vorlage zur Amplifikation der *rpoB*-RT- und *hmbs*-RT-Fragmente mittels qRT-PCR (*QuantiTect SYBR[®] Green RT-PCR Kit, Qiagen*) verwendet (Temperaturprofil, siehe **Tabelle 19**). Es erfolgte keine Zugabe der reversen Transkriptase.

Tabelle 19. Temperaturprofil für die Amplifikation der *rpoB*-RT- und *hmbs*-RT-Fragmente mittels qRT-PCR.

Amplifikationsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
initiale Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase	95	900	40
Denaturierung	95	15	
Hybridisierung der Oligonukleotide	60	15	
Elongation	72	15	
Schmelzkurvenanalyse	40 bis 95		

Die einzelnen C_T-Werte wurden über den *Fitpoint-Quantification-Modus* ermittelt. Zur Kalibrierung wurden die C_T-Werte der internen Standardplasmide gegen deren Kopienzahl aufgetragen. Dadurch konnte die Rückrechnung der Kopienzahlen in den Proben erfolgen. Die Rate der bakteriellen Adhärenz wurde wie in

Formel 3 bestimmt, wobei die Anzahl der Kopien von *hmbs* aufgrund des diploiden Charakters der humanen Zellen halbiert wurde.

Formel 3. Bestimmung der bakteriellen Adhäsionsrate über die Anzahl der Kopien von *rpoB* und *hmbs*.

$$\text{Adhäsionsrate [Bakterien / humane Zelle]} = \frac{\text{Anzahl der Kopien für } rpoB}{\frac{1}{2} \times \text{Anzahl der Kopien für } hmbs}$$

2.5 Etablierung von Adhärenzversuchen mit *A. baumannii* im Nabelschnurmodell

Zur weiteren Analyse der Adhäsion von *A. baumannii* an humane Endothelzellen wurde ein Organinfektionsmodell unter Verwendung menschlicher Nabelschnurvenen etabliert. Dieses Modell wurde in einer vorangegangenen Arbeit für den Modellorganismus *B. henselae* angewendet [176]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode für die Untersuchung des Adhärenzverhaltens von *A. baumannii* angepasst und durch weitere Untersuchungen ergänzt. Die Nabelschnurvenen wurden freundlicherweise vom Krankenhaus Sachsenhausen in Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt (siehe **2.1.1**).

Zur Infektion der Nabelschnurvenen wurden stets frische Proben verwendet. Qualitätskriterien hierfür waren: Die Probe war nicht älter als ein Tag, die Oberfläche war feucht-glänzend und die Farbe erschien blassrosa (**Abbildung 8**). Die Nabelschnur wurde zuerst auf etwa 10 cm Länge mit Hilfe eines Skalpell gekürzt. Hierbei war es wichtig, dass im Querschnitt der Nabelschnur die Vene gut zu erkennen und diese nicht beschädigt war (**Abbildung 8 C**). In beide Enden der Nabelschnurvene wurde eine Knopfkanüle eingeführt und mit Hilfe eines Kabelbinders fixiert (**Abbildung 8 D und E**). Die Knopfkanülen waren mit einem Infusionsschlauch entweder mit einer peristaltischen Pumpe oder dem Abfallbehälter verbunden. Um mögliche Verunreinigungen aus der Nabelschnurvene zu entfernen, wurde diese zunächst mit vorgewärmten Endothelzellmedium für 15 min und einer Flussrate von 0,2 ml/min gespült. Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden über Nacht kultiviert und anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert. Die Bakterien wurden 1x in Endothelzellmedium gewaschen und danach auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt (1 x 10⁸ Bakterien/ml). Um die

Bakterien bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen im Anschluss erkennen zu können, wurden diese vor der Infektion mit dem Lebendzellfarbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) gefärbt. Die Bakterien wurden mit CFSE (Endkonzentration: 10 μM in PBS) für 15 min leicht schüttelnd und lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert. Überschüssiges CFSE wurde durch dreimaliges Waschen der Bakterien mit Endothelzellemedium entfernt (Zentrifugationsschritte: 15 min, 6.000 x g). Danach wurde 1 ml dieser Bakteriensuspension mit 11 ml des vorgewärmten Endothelzellmediums gemischt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt (1×10^8 Bakterien in 12 ml), um diese anschließend mit dem Pumpensystem zu verbinden. Die Infektion des Nabelschnurvenenendothels erfolgte über einen Zeitraum von 1 h bei Raumtemperatur unter konstanten Flussbedingungen von 0,2 ml/min. Anschließend wurden nicht-adhärenente Bakterien durch erneuten Durchfluss von Endothelzellmedium aus der Vene gespült. Sollte eine Quantifizierung der Bakterien erfolgen, wurde die Vene straff-elastisch mit vorgewärmten Trypsin-EDTA (0,05 % [w/v]) befüllt und für ca. 30 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten und infizierten humanen Zellen wurden anschließend aus der Vene gespült, in einem sterilen Gefäß (15 ml-Röhrchen) aufgefangen und zur Quantifizierung mittels qRT-PCR aufbereitet. Zur Weiterverarbeitung der infizierten Vene zur Fluoreszenzmikroskopie erfolgte zunächst die Präparation der Nabelschnurvene. Hierfür wurde umliegendes Gewebe mit einer mikroskopischen Schere vorsichtig entfernt (**Abbildung 8 F**), sodass die Vene deutlich sichtbar war (**Abbildung 7 G**). Diese konnte nun vom umliegenden Gewebe getrennt und in einer Silikonschale fixiert werden, um noch verbleibende Gewebsreste zu entfernen (**Abbildung 8 H**). Anschließend wurde das Präparat in ein steriles 50 ml-Röhrchen überführt und für mindestens 1 h in 3,75%iger PFA-Lösung ([w/v] in PBS) fixiert. Darauf folgte die Färbung des Gewebes und der Bakterien mit TRITC-Phalloidin bzw. DAPI. Die mikroskopische Begutachtung erfolgte an einem Konfokalmikroskop der Firma Nikon.

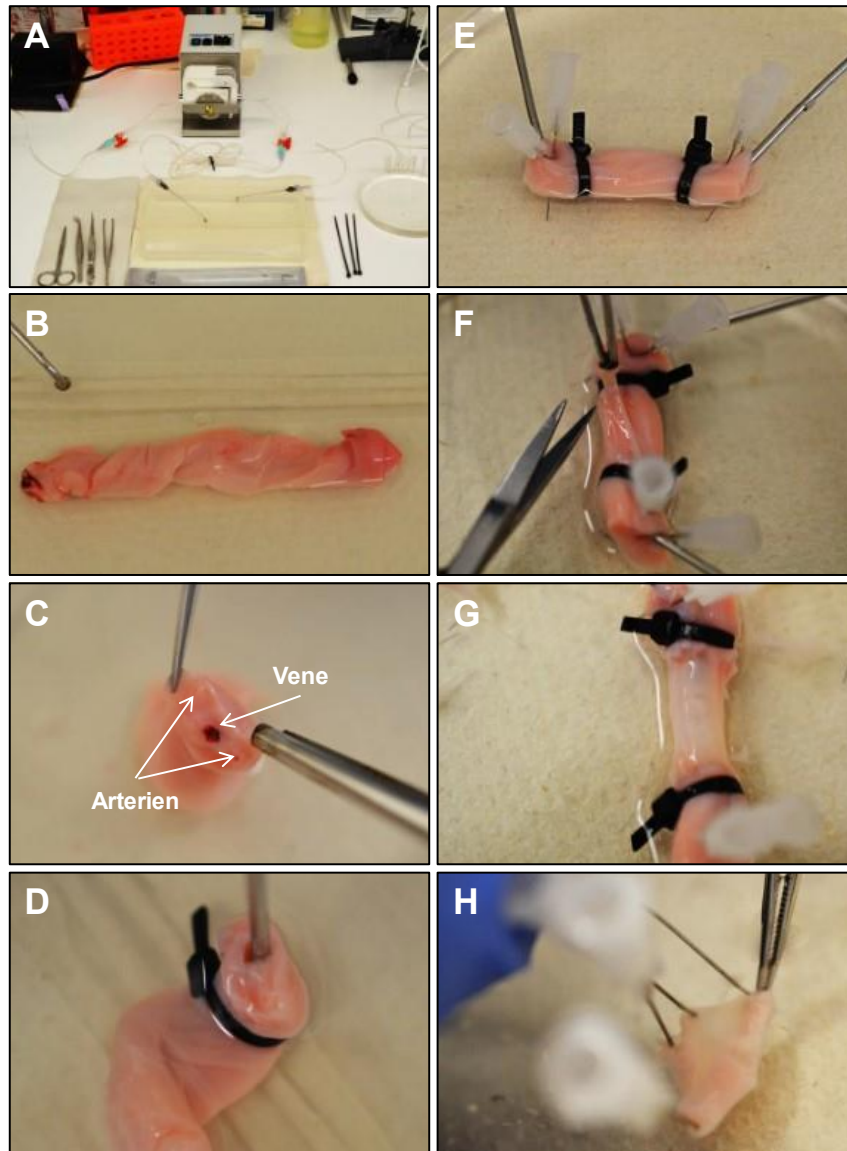


Abbildung 8. Übersicht zur Präparation und Infektion der Nabelschnurvene. (A) Die Übersicht zeigt die verwendeten Geräte und Materialien zur Infektion der Nabelschnurvene: Präparationsbesteck, eine peristaltische Pumpe, Knopfkanülen mit Verbindungsschläuchen, Kabelbinder und Nadeln zur Fixierung der Präparate. (B) Diese Nabelschnurprobe erfüllt die Qualitätskriterien: nicht älter als ein Tag, feucht-glänzende Oberfläche und eine blassrosa Farbe. (C) Im Querschnitt der Nabelschnur sind die Vene und die beiden Arterien zu erkennen. (D+E) Die Vene wurde an beiden Enden mit einer Knopfkanüle verbunden und mit Hilfe von Nadeln in einem Silikonbett fixiert. (F-H) Zur Isolation der Vene wurde das umliegende Gewebe vorsichtig entfernt und das Venengewebe anschließend in PFA fixiert.

2.5.1 Mikro-Computer-Tomografie, Scherkraft-Berechnung und Doppler-Analyse

Um sicherzustellen, dass die untersuchten Venen stets vergleichbare Bedingungen aufwiesen, wurde die Struktur der Venen und die damit verbundene Scherkraft bestimmt. Außerdem wurden die Flussbedingungen unter Verwendung einer Doppler-Analyse untersucht. Die Mikro-Computer-Tomografie (mikro-CT) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Schürmann und Prof. Dr. Ralf P.

Brandes (Universitätsklinik der Goethe-Universität, Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Doppler-Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Doris Fischer (Universitätsklinik der Goethe-Universität, Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Abteilung für Neonatologie, Frankfurt am Main) erarbeitet.

Für mikro-CT-Untersuchungen wurde die Vene zunächst in etwa 10 cm lange Stücke geschnitten, um diese anschließend mit PBS zu spülen. In beide Enden der Vene wurde ein Drei-Wege-Hahn (Braun) eingeführt und mit einem Kabelbinde fixiert. Danach wurde die Vene unter konstanten Druck von 10-15 mmHg mit einem röntgendichten Kontrastmittel (MicroFil®, Flow Tech, Carver, Massachusetts, USA) befüllt. Im Anschluss wurde die Venenstruktur in einem mikro-CT (Skyscan 1176, Bruker mikro-CT, Billerica Massachusetts, USA) untersucht. Hierfür wurden folgenden Einstellungen verwendet (**Tabelle 20**).

Tabelle 20. Parameter zur Analyse der Nabelschnurvenenstruktur mittels mikro-CT.

Parameter	Wert
Spannung	50 kV
Filter	0,5 mm 185 Aluminium-Filter
Stromstärke	500 μ A
Expositionszeit	210 ms
isotope Auflösung	18 μ m
Bilder pro Rotation	3 pro 0,5°
Rotationswinkel	180°

Die somit erhaltenen volumetrischen Daten wurden über das Programm NRecon/InstaRecon CBR Server – Premium Software (Skyscan/InstaRecon, Billerica Massachusetts, USA) bearbeitet. Die Bildanalyse, die Segmentation der mikro-CT-Daten und die Berechnung der Venenstruktur erfolgte unter Verwendung des Programms Imalytics Preclinical Software (Gremse-IT, Aachen). Unterschiede zwischen dem Kontrastmittel und dem Venen-umfassenden Gewebe wurden unter Zuhilfenahme eines Grenzwertes, der sich aus der mittleren Intensität des Kontrastmittels und des Gewebes errechnet, vermindert. Das Lumen der Nabelschnurvene wurde über das *virtual elastic sphere tool* bestimmt [177]. Nachdem die strukturelle Beschaffenheit der Vene erfasst wurde, konnte die Scherkraft (τ) mit **Formel 4** berechnet werden [178].

Formel 4. Berechnung der zu erwartenden Scherkraft bei der Infektion von Nabelschnurvenen mit *A. baumannii*.

$$T = \frac{4 \times \mu \times v}{\pi \times r^3}$$

Hierbei wurden folgende Werte verwendet: Viskosität (μ) = 1.011 mPa x s, Flussrate (v) = $3,3 \times 10^{-9}$ m³/s, Radius der Vene in mm (r).

Um die Flussbedingungen während der Infektion zu untersuchen, wurden Ultraschall-Doppler-Analysen durchgeführt, wozu die Nabelschnur zunächst in einer Silikonschale fixiert und mit der Perfusor-Pumpe über Infusionsschläuche verbunden wurde. Barium-Sulfat (10 % [w/v] in PBS) wurde unter konstanten Flussbedingungen von 0,2 ml/min durch die Vene gespült. Das Strömungsmuster wurde unter Verwendung eines linearen Ultraschallkopfes (L 5-12 MHz) und einem Phillips Envisor Ultraschallgerät (Hamburg) aufgezeichnet.

2.6 Invasion von *A. baumannii* in humane Zellen

Zur Untersuchung der Invasion humaner Zellen durch *A. baumannii* wurden HUVECs und A549-Zellen zunächst in Zellkulturschalen (6 Kavitäten) kultiviert. Nach Anzucht der Bakterienstämme erfolgte die Infektion der Zellen mit *A. baumannii* für 4 h bei 37 °C (MOI 200). Anschließend wurden nicht-adhärenente Bakterien durch 3x Waschen mit dem entsprechenden Zellkulturmedium entfernt. Um extrazelluläre Bakterien abzutöten, wurde entweder Gentamicin (500 µg/ml als Gentamicinsulfat, Sigma Aldrich, Wildtyp und Δata) oder Colistin (10 µg/ml als Colistin-Natrium-Methansulfat, Sigma Aldrich, $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$) zu den Proben gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden 3x mit entsprechendem Zellkulturmedium gewaschen. Um eine Lyse der humanen Zellen hervorzurufen, wurden die Proben mit jeweils 2 ml *A. dest.* versetzt und für circa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die vollständige Lyse wurde mikroskopisch beurteilt. Waren alle Zellen aufgeschlossen, so konnte die Probe in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und in sterilem PBS verdünnt werden. Bei unvollständiger Lyse der Zellen wurden diese durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren weiter prozessiert bis sämtliche Zellen aufgeschlossen waren. Die Keimzahlbestimmung erfolgte durch Inkubation von je 100 µl der Bakteriensuspensionen auf LB-Agar.

Die Effektivität der bakteriellen Invasion wurde wie folgt bestimmt: In jedem Versuch entsprach die ermittelte Keimzahl der Wildtyp-infizierten Probe einer 100%igen Invasionsrate. Entsprechend der ermittelten Keimzahlen aus Δata , $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$ infizierten Zellen, wurde der prozentuale Anteil an invasiven Bakterien gegenüber dem Wildtyp errechnet.

2.7 Ata-abhängige Modulation der Wirtszellantwort durch *A. baumannii*

2.7.1 Quantifizierung induzierter humaner Zytokine und Chemokine

Die Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine während der Infektion humaner Endothelzellen mit *A. baumannii* wurde mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst in Zellkulturschalen (6 Kavitäten) kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 1) bei 37 °C für 14 h infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 8 h und 14 h) wurden die Zellen zusammen mit den Bakterien unter Verwendung eines Zellschabers aus den Kavitäten gelöst und in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mittels Ultraschalles (jeweils 3 x 15 s) aufgeschlossen. Anschließend wurde die relative Induktion von 12 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen untersucht: Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-17 α , IL-8, *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), *Eosinophil Chemotactic Cytokine* (RANTES), *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 α , MIP-1 β , *Macrophage-Derived Chemokine* (MDC) und Eotaxin. Dies erfolgte unter Verwendung des *Multi-Analyte ELISArray Kits (Human TLR-induced Cytokines II: Microbial-induced Multi-Analyte ELISArray Kit*, Qiagen). Die Durchführung der Messung erfolgte nach Herstellerangaben (Stand 08.2011). Die Absorption der einzelnen Proben wurde an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite 200 pro, Tecan) bestimmt. Als Referenz diente eine uninfizierte Probe.

Weiterhin wurden die absoluten Mengen der Interleukine IL-6 und IL-8 bestimmt. Hierfür wurden HUVECs mit *A. baumannii* (MOI 1) infiziert und für die angegebenen Zeitpunkte (2 h, 4 h, 8 h und 14 h) inkubiert. Für jeden Zeitpunkt wurden die Proben mit einem Zellschaber aus den Kavitäten gelöst, lysiert und zur Bestimmung der absoluten Zytokinmenge im IL-6 bzw. IL-8 ELISA Kit der Firma BD

Bioscience verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Katalognummer 550799, Ref.-Nr. 6) Die Absorptionsmessung erfolgte an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät der Firma Tecan (Infinite 200 pro). Als Negativkontrolle wurde eine uninfizierte Zellkulturprobe verwendet.

2.7.2 Untersuchung der Transmigration humaner Monozyten

Um zu untersuchen, ob die durch *A. baumannii* hervorgerufene Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine einen Einfluss auf die Migration von humanen Monozyten (THP-1-Zellen) hat, wurde ein Monozyten-Transmigrations-Assay durchgeführt [179]. Hierfür wurden HUVECs in einer Zellkulturschale (6 Kavitäten) kultiviert und mit den entsprechenden *A. baumannii*-Stämmen für 14 h infiziert (MOI 1). Nach 4 h und 14 h wurden die infizierten Zellen aus den Zellkulturschalen mit einem Zellschaber gelöst, durch Zentrifugation (500 x g, 15 min, 4 °C) sedimentiert und der Überstand unter Verwendung eines Filters (Porengröße: 0,45 µm, Sarstedt, Deutschland) steril filtriert. Als Negativkontrolle diente eine uninfizierte Probe. Um die Migrationsfähigkeit der humanen Monozyten gegenüber den Überständen der infizierten HUVECs zu untersuchen, wurden diese in einem Transwell-Migrations-Assay verwendet. THP-1 Zellen wurden wie beschrieben (2.1) kultiviert und 3x im entsprechenden Zellkulturmedium gewaschen (jeweils 5 min, 500 x g). Daraufhin wurde das Zellsediment in Zellkulturmedium gelöst, um eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml zu erhalten. Weiterhin wurden jeweils 500 µl der steril-filtrierte Überstände der infizierten bzw. uninfizierten HUVECs oder 100 ng/ml des *stromal cell-derived factor 1 α* (SDF-1α; gelöst in Zellkulturmedium, PreproTech) als Positivkontrolle in je eine Kavität einer Zellkulturschale (24 Kavitäten) überführt. Daraufhin wurden die Zellkultureinsätze (ThinCert™, Porengröße: 8 µm, Greiner BioOne) in die Vertiefungen der Zellkulturschale platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zuvor hinzugegebene Flüssigkeit (Überstände der infizierten/uninfizierten HUVECs) die Membran des Zellkultureinsatzes vollständig umschloss. Nun wurden jeweils 500 µl der THP-1-Zellsuspension (5×10^5 Zellen) in die oberen Kompartimente der Zellkultureinsätze gegeben. Die Zellkulturschalen wurden für 16 h bei 37 °C inkubiert und danach die Zellzahl der verbliebenen, nicht-migrierten THP-1 Zellen im oberen Kompartiment bestimmt. Hierfür wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und

Abpipettieren gelöst und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die THP-1 Zellen wurden durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl vorgewärmten Trypsin-EDTA (0,05 %) inkubiert, um eine mögliche Agglutination der Zellen zu vermeiden. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 500 µl Trypanblau-Lösung und die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Kammer (siehe 2.1). Zur Berechnung der Migrationseffizienz wurde der prozentuale Anteil migrierter THP-1 Zellen aus dem oberen in das untere Kompartiment, bezogen auf die initiale Zellzahl von 5×10^5 Zellen im oberen Kompartiment, ermittelt.

2.7.3 Bestimmung der Hämozytenaktivität im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Im *G. mellonella*-Infektionsmodell wurde die Aktivierung spezifischer Immunzellen (Hämozyten) während der Infektion mit *A. baumannii* untersucht. Hierbei bezeichnet der Begriff Hämozyt eine übergeordnete Gruppe von Zellen des angeborenen Immunsystems von Invertebraten, die sich auf verschiedene Zelltypen, wie beispielsweise Prohämozyten und Plasmozyten aufteilen [180]. Durch ihre wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern sind Hämozyten in ihrer Funktion mit Leukozyten höherer Wirbeltiere vergleichbar [181] und eignen sich deshalb, um die Aktivierung des Immunsystems durch die bakterielle Infektion mit *A. baumannii* in einem Nicht-Vertebraten-Infektionsmodell zu untersuchen.

G. mellonella Larven wurden mit einer subletalen Dosis von *A. baumannii* infiziert (1×10^5 Bakterien, siehe 2.8.3). Als Kontrollgruppe dienten Larven, welchen PBS injiziert wurde. Die Larven wurden anschließend über einen Zeitraum von 72 h bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar nach der Injektion, nach 24 h, 48 h und 72 h wurden jeweils 2 Larven entnommen und die Hämolymphe isoliert. Dies erfolgte, indem die Larve zunächst mit einem Skalpell eröffnet wurde. Anschließend wurde die Larve mit der eröffneten Seite nach unten auf ein Röhrchen mit Zellsieb (Porengröße 35 µm, Corning™, Corning, New York, USA) platziert. Die Probe wurde für 15 min bei 500 x g zentrifugiert, um die Hämolymphe mit den darin befindlichen Hämozyten von den festen Bestandteilen der Larve zu separieren. Pro Larve ergaben sich etwa 150 µl Hämolymphe. Hiervon wurden 100 µl mit der gleichen Menge an Trypanblau-Lösung versetzt und gemischt. Die Zellzahl in

10 μl der Hämolymphe-Suspension wurde dann mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Hierbei waren die Hämozyten deutlich durch ihre pralle und kugelige Form zu identifizieren (**Abbildung 9**).

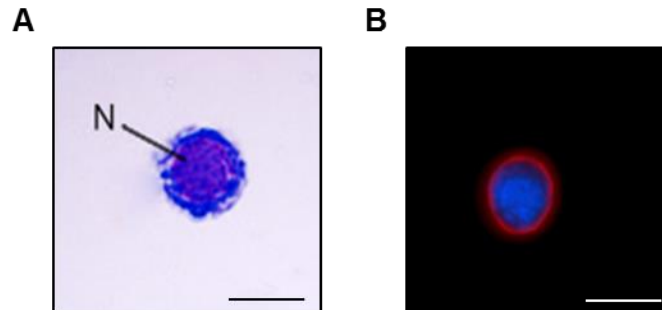


Abbildung 9. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Hämozyten aus *G. mellonella*. **(A)** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Hämozyten. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Hämozyten, der zuvor mit DAPI (blau) und TRITC-Phalloidin (rot) gefärbt wurde. Maßstab: 10 μm . Abbildung modifiziert nach [182].

2.8 Untersuchungen zur Pathogenität und Zytotoxizität von *A. baumannii*

Der Einfluss der *ata*-Expression auf die Pathogenität und Zytotoxizität wurde *in vitro* mit Zellkultur- bzw. Serumversuchen sowie *in vivo* unter Verwendung des *G. mellonella*-Infektionsmodells analysiert.

2.8.1 Analysen zur Ata-vermittelten Serumresistenz

Dem Komplementsystem kommt bei der initialen Abwehr von Pathogenen, aber auch bei der Stimulation der Inflammation eine große Bedeutung zu. Zur Abwehr von pathogenen Bakterien führt die Aktivierung des Komplementsystems zu einer Anlagerung eines Proteinkomplexes, dem sogenannten *Membrane Attack Complex* (MAC), auf der Oberfläche der Bakterien, welches den Schritt der Opsonisierung der Bakterien einleitet [183].

Um zu überprüfen, ob Ata einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivierung bzw. Inhibierung des Komplementsystems hat, wurden *in vitro* Versuche mit humanem Serum durchgeführt. Hierfür wurde *A. baumannii* auf eine OD_{600} von 0,2 (1×10^8 Bakterien/ml) eingestellt. Weiterhin wurde humanes Serum von gesunden Probanden (Ethikantrag 492/13, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) in verschiedenen Konzentrationen (0 % bis 100 % in PBS verdünnt) zu je 200 μl in

sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µl der Bakteriensuspension in die mit den verschiedenen Serumkonzentrationen befüllten Reaktionsgefäßen (1×10^6 Bakterien/200 µl). Die Proben wurden anschließend für 2 h bei 37 °C leicht schüttelnd (300 Upm) inkubiert. Als Negativkontrolle diente hitzeinaktiviertes Serum, welches zuvor für 30 min bei 56 °C inkubiert worden war. Nach der Inkubation wurden die Proben zur Keimzahlbestimmung in PBS verdünnt und auf LB-Agar kultiviert.

Weiterhin wurde überprüft, inwieweit *A. baumannii* einen regulatorischen Einfluss auf die drei verschiedenen Aktivierungsschritte des Komplementsystems hat: (i) der klassische Weg, (ii) der Lektin-Weg und (iii) der alternative Weg [183]. Sowohl der klassische als auch der Lektin-Weg sind strikt vom Vorhandensein zweifach positiv geladener Calcium Ionen (Ca^{2+}) abhängig, wohingegen der Faktor B für die Initialisierung des alternativen Weges wichtig ist [183].

Um den klassischen bzw. den Lektin-Weg zu inhibieren, wurde das humane Serum vor der Inkubation mit den Bakterien zunächst mit Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Magnesiumsalz (Mg-EGTA, Endkonzentration 10 mM, in PBS gelöst, Sigma Aldrich) bei 37 °C inkubiert. Der Zusatz von Mg-EGTA führt zur Komplex-Bildung mit Ca^{2+} und somit zur Inhibierung des klassischen bzw. Lektin-Weges [184]. Um darüber hinaus die Beteiligung des alternativen Weges zu untersuchen, wurde humanes Serum verwendet, welches keinen Faktor B enthielt (*Factor B Depleted Serum*, Quidel, San Diego, Kalifornien, USA). Beide Seren wurden zunächst auf eine Konzentration von 30 % [v/v] mit PBS verdünnt und zu je 200 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei 37 °C inkubiert. Um eine mögliche Interaktion zwischen dem spezifisch inhibierten Komplement und den Bakterien zu untersuchen, wurden diese mit dem humanen Serum inkubiert und zur Keimzahlbestimmung nach 2 h bei 37 °C seriell in PBS verdünnt und auf LB-Agar kultiviert. Die Seruminkubation und Zellzahlbestimmung erfolgte analog zum vorangegangenen Serumversuch. Als Kontrollen dienten hitzeinaktiviertes Serum (Negativkontrolle) und *E. coli* DH5α (sensibel gegenüber dem alternativen Weg [185]).

2.8.2 Untersuchungen zur Ata-vermittelten Induktion von Apoptose und Nekrose

Bestimmung der zeitabhängigen Induktion von Apoptose und Nekrose

Die Induktion von Apoptose und Nekrose in HUVECs wurde zunächst über das *RealTime Glo Annexin V Apoptosis Assay* (Promega) bestimmt. Hierzu wurden die Endothelzellen in einer Zellkulturschale (96 Kavitäten) zu je 1×10^4 Zellen/Kavität kultiviert. *A. baumannii* wurde in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,2 kultiviert und mit HEPES-gepuffertem Endothelzellmedium (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES, Biochrom, Endkonzentration: 10 μ M, pH 7,3) auf eine Keimzahl von 1×10^5 Bakterien/ml (MOI 1) eingestellt. Die Pufferung des Mediums war notwendig, da die spätere Kultivierung der Zellen und Bakterien nicht in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre erfolgte, sondern in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät unter atmosphärischen CO_2 -Bedingungen. Vor der Infektion wurden die HUVECs 3x mit Endothelzellmedium gewaschen, um bereits abgelöste Zellen zu entfernen. Die einzelnen Komponenten des *RealTime Glo Annexin V Apoptosis Assays* wurden nach Herstellerangaben in Endothelzellmedium gelöst (Herstellerhandbuch Stand 09.2017). Als Positivkontrolle diente der Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin (Sigma Aldrich, in Endothelzellmedium gelöst, Endkonzentration: 1 μ M) und als Negativkontrolle eine uninfizierte Probe. Darauf folgend wurden jeweils 100 μ l der entsprechenden Suspensionen zu den humanen Zellen gegeben und mit jeweils 100 μ l der Detektionslösung gemischt. Im Anschluss wurde die Zellkulturschale mit einem sterilen Deckel verschlossen und zur Messung der relativen Fluoreszenz (RFE)- und der relativen Lumineszenzeinheiten (RLE) in das auf 37 °C vorgewärmte Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite 200pro, Tecan) platziert. Die Messung der RFE und RLE erfolgte in einem Zeitintervall von 1 h über einen Zeitraum von 30 h (**Tabelle 21**).

Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die quantitative Analyse von Apoptose und Nekrose erfolgte durch Markierung des Proteins Annexin V, welches sich in viablen, eukaryotischen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet und sich während der Induktion des programmierten Zelltodes auf die Außenseite der Zellmembran verschiebt.

Tabelle 21. Einstellung des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite 200pro (Tecan) zur Bestimmung der relativen Fluoreszenz- und Lumineszenzeinheiten.

Zur Bestimmung der relativen Fluoreszenzeinheiten	
Exzitation	485 nm
Emission	530 nm
Exzitations-Bandweite	9 nm
Emission-Bandweite	20 nm
Verstärkung	50
Anzahl der Blitze	5
Integrationszeit	20 μ s
Zeitverzögerung	0 μ s
Einschwingzeit	0 μ s
Z-Position	18.000 μ m
Zur Bestimmung der relativen Lumineszenzeinheiten	
Attenuation	Automatisch
Integrationszeit	1.000 ms
Einschwingzeit	0 ms

Hier kann es als Apoptosemarker Phosphatidylserine binden [186]. In Verbindung mit einer weiteren Markierung, welche die Integrität der zellulären Membran darstellt, konnte der Grad der Nekrose überprüft werden. Hierzu wurde Propidiumiodid (PI, Sigma Aldrich) verwendet [187]. Dieser Farbstoff gelangt in die Zelle, sobald die Integrität der Zellmembran nachlässt. In der Zelle interkaliert PI mit der DNA und kann als Fluoreszenzsignal gemessen werden. Um die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmen zu können, wurden zunächst jeweils 5×10^5 Zellen/Kavität in Zellkulturschalen (6 Kavitäten) kultiviert. Als Positivkontrolle diente Camptothecin (Endkonzentration: 1 μ M, Sigma Aldrich) und als Negativkontrolle eine uninfierte Probe. Die Infektion erfolgte durch Zugabe der bakteriellen Suspension (MOI 1). Die Proben wurden über einen Zeitraum von 24 h in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 16 h und 24 h wurden die infizierten Zellen aus den Kavitäten der Zellkulturschalen vorsichtig mit einem Zellschaber gelöst und in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min wurden die Endothelzellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte die Rücklösung der Zellen in 500 μ l Annexin V-Bindepuffer (*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit*, BD Bioscience) und die anschließende Markierung der Zellen mit FITC-Annexin V und PI nach Herstellerangaben (556547 Rev.Nr. 5). Als Kontrollen dienten jeweils einfach markierte

(FITC-Annexin V oder PI) und unmarkierte Zellproben. Unmittelbar nach der Inkubation mit FITC-Annexin V und PI wurden die Zellen unter Verwendung eines Durchflusszytometers analysiert. Die Laserkompensation erfolgte automatisiert unter Verwendung der BD FACSuite FC beads (BD Bioscience) und die Lasereinstellungen wurden manuell vorgenommen (**Tabelle 22**).

Tabelle 22. Lasereinstellungen für die Quantifizierung von Apoptose und Nekrose in infizierten HUVECs.

Anzahl aufgenommener Events:		3 x 10 ⁵	
PMT-Spannungen	Min	Max	
FSC-A	12.332,19	262.143,00	
SSC-A	931,29	262.143,00	
FITC-A	-72,56	4.181,07	
PE-A	-71,47	5.036,56	
PerCP-Cy5.5-A	-98,54	262.143,00	
PE-Cy7-A	-119,12	262.143,00	
APC-A	-35,33	114.119,03	
APC-Cy7-A	-51,24	69.737,11	
V450-A	-25,48	262.143,00	
V500-A	-130,11	262.143,00	

Die Differenzierung der Zellen erfolgte aufgrund der jeweiligen FITC-Annexin V- bzw. PI-Signale (**Tabelle 23**).

Tabelle 23. Differenzierung infizierter HUVECs mittels Durchflusszytometrie.

FITC Annexin V	Propidium-Iodid	Zelldifferenzierung
Negativ	Negativ	Lebend
Positiv	Negativ	Frühe Apoptose
Positiv	Positiv	Späte Apoptose
Negativ	Positiv	Nekrose

Nachweis der Caspase-3- und Caspase-7-Aktivität in infizierten HUVECs

Zur Differenzierung zwischen einer Caspase-abhängigen und -unabhängigen Apoptoseinduktion wurde die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 untersucht. Hierfür wurden HUVECs zunächst zu je 1 x 10⁴ Zellen/Kavität in einer Zellkulturschale (96 Kavitäten) kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 1) infiziert. Als Positivkontrolle diente Camptothecin (Endkonzentration: 1 µM) und als Negativkontrolle eine uninfizierte Probe. Die so behandelten HUVECs wurden über einen Zeitraum von 24 h in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C gelagert und nach 8 h,

16 h und 24 h Proben entnommen. Die spezifische Bestimmung der Caspase-3- und Caspase-7-Aktivität erfolgte unter Verwendung des *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay (Promega). Hierzu wurde das Nachweisreagenz nach Herstellerangaben (Stand 07.2017) mit Endothelzellmedium gemischt und zu den Proben gegeben. Nach Inkubation der Proben für 30 min bei 37 °C wurde die relative Lumineszenz der Proben bestimmt. Dies erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite 200pro, Tecan). Hierfür wurden folgende Einstellungen verwendet; Attenuation: automatisch; Integrationszeit: 1.000 ms; Einschwingzeit: 0 ms.

2.8.3 *In vivo* Pathogenität von *A. baumannii* im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Die Untersuchung der Pathogenität von *A. baumannii* in Abhängigkeit der Expression von *ata* erfolgte unter Verwendung des Invertebraten-Infektionsmodells *G. mellonella*. Hierfür wurden Larven von *G. mellonella* mit verschiedenen Keimzahlen von *A. baumannii* injiziert und das Überleben der Larven dokumentiert. Verschiedene Studien zeigen, dass *G. mellonella* ein geeignetes Untersuchungsobjekt zur Beurteilung der *in vivo* Pathogenität von *A. baumannii* und auch anderer Bakterien darstellt [188–190]. Der Bezug der Larven erfolgte über UK Waxworms, Sheffield, Großbritannien. Nach Erhalt der Larven wurden diese sofort begutachtet, bereits kranke oder tote Tiere wurden entfernt und gesunde Tiere in eine sterile Petrischale überführt. Stichprobenartig wurden Larven entnommen, homogenisiert und auf Schafblut-Agar (Oxoid, Wesel) kultiviert, um mögliche bakterielle Kontaminationen zu beurteilen. Zur Versuchsvorbereitung wurde das Gewicht der Larven bestimmt und Tiere von 200 mg bis 250 mg wurden zu je 10 Stück auf sterile Petrischalen aufgeteilt. Für die Infektion der Larven wurden Bakteriensuspensionen von *A. baumannii* in PBS mit verschiedenen Keimzahlen hergestellt (3×10^8 bis 3×10^{10} Bakterien/ml). Unter Verwendung einer 10 µl-Präzisionsspritze wurden jeweils 10 µl der entsprechenden Bakteriensuspension in die letzten linken Bauchfüßchen der Larven injiziert. Als Kontrollgruppen dienten Larven, die entweder mit jeweils 10 µl steriler PBS-Lösung injiziert wurden oder gar nicht behandelt waren. Die Larven wurden in Petrischalen bei 37 °C über einen Zeitraum von 72 h gelagert und alle 24 h begutachtet. Da sich kranke oder tote Larven durch eine erhöhte Melanineinlagerung braun bis schwarz verfärben und zudem einen fehlenden Bewegungsreiz

aufweisen, erfolgte die Sortierung lebender und toter Larven phänotypisch. Nach 72 h wurden Überlebenskurven von *G. mellonella* erstellt. Als Pathogenitätsindikator wurde die mediane letale Dosis (LD₅₀) bestimmt, bei welcher durchschnittlich 50 % der Larven starben. Der LD₅₀-Wert einer jeden Gruppe wurde grafisch ermittelt, indem die Mortalitätsraten [%] gegen die injizierte Bakteriendosis pro Larve (als log₁₀) aufgetragen wurde.

2.9 Gesamtproteomanalyse infizierter Endothelzellen

Für die Gesamtproteomanalyse wurden HUVECs zu je 5×10^6 Zellen in Zellkulturschalen (143 cm²) kultiviert und mit *A. baumannii* für 14 h infiziert (MOI 1). Nach erfolgter Inkubation wurde der Überstand dekantiert, die infizierten Zellen unter Verwendung eines Zellschabers aus den Zellkulturschalen gelöst und in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden im Anschluss bei 400 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 0,5 ml Extraktionspuffer (10 % SDS [w/v], 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,6) gelöst. Weiterhin wurden die Proben für 30 s sonifiziert und für 15 min bei 95 °C in einem Heizschüttler inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation der Proben für 30 min bei 20.000 x g. Der Überstand wurde in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinmenge in den Proben wurde unter Verwendung des *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben (Protokollnummer 0412.6) bestimmt. Ausgehend hiervon wurden 150 µg Gesamtprotein mit entsprechenden Volumina Probenpuffer (4 % [w/v] SDS, 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1 M DTT', pH 7,6) und anschließend mit 200 µl Ladepuffer (8 M Urea, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5) gemischt. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinproben erfolgte durch Frau Dr. Ilka Wittig (Functional Proteomics, SFB 815 Core Unit, Medizinische Fakultät, Goethe Universität, Frankfurt am Main). Hierfür wurde das Proteingemisch zunächst auf einen Spin-Filter (Porengröße 30 kDa, Microcon, Sigma Aldrich) gegeben. Danach erfolgte die Präparation der Proben nach dem *filter aided sample preparation protocol (FASP)* [191]). Die Proben wurden danach über Nacht tryptisch verdaut (Reinheitsgrad: Sequenzierung, Promega), um anschließend nach dem Protokoll von Kulak NA *et al.*, 2014 weiter behandelt zu werden [192]. Die angesäuerten Peptide (Endkonzentration 0,1 % [v/v] in Trifluoressigsäure) wurden darauffolgend

unter Verwendung von *multi-stop* und *multi-go* Tips (C18 mit starker Kationen Austauschaffinität, Stage Tips, Affinisep, Petit-Couronne, Frankreich) fraktioniert und zu je 4 Fraktionen in Mikrotiterplatten eluiert. Die Peptide wurden getrocknet und in 1 % [v/v] Acetonitril und 0,1 % [v/v] Ameisensäure gelöst. Zur weiteren Analyse wurde eine Flüssig-Chromatografie/Massenspektrometrie durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung des Thermo Scientific™ Q Exactive Plus (Thermo Fisher), welches mit einer *ultra-high performance* Flüssig-Chromatografie-Einheit (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher) und einer Nanospray Flex Ion-Source (Thermo Fisher) ausgestattet war. Hierfür wurden die Peptidlösungen zunächst auf eine C18 *reversed-phase* Säule (Thermo Fisher) geladen und im Anschluss durch eine 2,4 µm Reprosil C18 Resin-Säule (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch) über einen Gradienten (von anfänglich 4 % [v/v] Acetonitril und 0,1 % [v/v] Ameisensäure bis 99 % [v/v] Acetonitril und 0,1 % [v/v] Ameisensäure, Zeitraum: 90 min, Flussrate: 400 nl/min) separiert. Es folgte eine zweite Separation mit einem Gradienten bis zu 60 % [v/v] Acetonitril und 0,1 % [v/v] Ameisensäure für weitere 15 min. Die Proben wurden im Anschluss massenspektrometrisch untersucht. Der Analysebereich lag zwischen 300 und 2.000 m/z mit einer Auflösung von 70.000 und einer automatischen *gain* Kontrolle (AGC) von 3×10^6 (absolute Ionenanzahl, maximale Ioneninjektionszeit von 160 ms). Zur weiteren Analyse wurden nur höher geladene Ionen ($> 2^+$) verwendet. Die Auflösung lag hier bei 17.500. Das *isolation window* betrug 2 m/z und die AGC mit einer maximalen Ioneninjektionszeit von 150 ms waren 1×10^5 Ionen.

Die Auswertung erfolgte über *MaxQuant* (v1.6.0.1). Die Proteinidentifikation erfolgte über die *human reference proteome database* von UniProtKB mit 71.785 Einträgen (2/2018). Die Enzymspezifität wurde an Trypsin angeglichen. Acetylierungen (+42,01) am N-Terminus und Methionin-Oxidationen (+15,99) wurden als variable und Carbamidomethylierung (+57,02) an Cystein als festgesetzte Modifikationen beurteilt. Die *false discovery rate* (FDR) für die Identifikation der Proteine und Peptide betrug 1 %. Die Daten wurden weiterhin mit *Perseus* (v.1.5.6.0) analysiert. Verunreinigungen und sich wiederholende Identifikationen wurden nicht berücksichtigt. Nur Proteinidentifizierungen, die mindestens 4 valide Bestimmungen in mindestens einer Gruppe zeigten, wurden weiter untersucht. Um die Proteom-Remodulierung nach der Infektion der humanen Zellen mit

A. baumannii zu beurteilen, wurden nur humane Proteine in der Analyse berücksichtigt. Zur statistischen Analyse wurde der Students t-Test verwendet.

Die von Frau Dr. Ilka Wittig zur Verfügung gestellte Datenmatrix (WT versus uninferiert, Δ *ata* versus uninferiert und WT versus Δ *ata*) wurde zur bioinformatischen Analyse der negativ oder positiv induzierten Proteine verwendet. Um die Komplexität der Daten zu verringern, wurden zunächst sämtliche Daten mit einem p-Wert $> 0,5$ von der Auswertung ausgeschlossen. Weiterhin erfolgte eine Reduktion der Daten, indem nur Proteine betrachtet wurden, deren negative Induktion ≤ -3 oder deren positive Induktion ≥ 3 war. Eine Übersicht der Daten ist im Anhang dieser Arbeit einzusehen (**Anhang 2** und **Anhang 3**). Diese reduzierte Datenmatrix wurde verwendet, um die biologische Funktion der einzelnen Proteine mittels des PANTHER Klassifikationssystems zu bestimmen (PANTHER v 14.1, <http://www.pantherdb.org/>). Weiterhin wurden unter Berücksichtigung der einzelnen Proteininduktionsraten Signalweg-Analysen mittels der Reactome Pathway Datenbank vorgenommen [193].

2.10 Datenanalyse, Bildbearbeitung und statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Datenanalysen und grafischen Darstellungen unter Verwendung von *Microsoft Office 365* und dem Tabellenkalkulationsprogramm *Excel 2016 MSO* (Version 1807) oder dem Präsentationsprogramm *PowerPoint 2016 MSO* (Version 1807) durchgeführt. Die Aufzeichnung durchflusszytometrischer Daten erfolgte durch das Programm *FACSuite* der Firma BD Bioscience. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm *FlowJo* Version 10.5 (FlowJo, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Die Aufzeichnung von qRT-PCR-Daten und die Berechnung der C_T -Werte erfolgte mit der *LightCycler® 480 Software*, Version 1.5 (Roche, Deutschland).

Bildbearbeitungen wurden mit *Adobe® Photoshop® CS6* Version 13.0.1 x32 (Adobe, Dublin, Irland) durchgeführt.

Für Versuche mit einer Versuchsanzahl gleich drei wurde die Standardabweichung (SD) berechnet. Für Versuche mit einer Versuchsanzahl größer drei wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt. Signifikanzniveaus wurden

über den *Student's t-Test* berechnet. Die Signifikanz bei nicht-parametrische Datensätzen wurde über den Log-Rank-Test bestimmt. In beiden Fällen wurden p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt. Zur Analyse der LD₅₀-Werte wurde die Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet.

2.11 Angaben zur wissenschaftlichen Eigenleistung

Die unter **2.3.3** beschriebene Komplementation der *ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii* Δ *ata* wurde durch Dr. Masahito Ishikawa und Prof. Katsutoshi Hori (Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya, Japan) durchgeführt. Die in **Abbildung 17 B** aufgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstammen aus der Arbeit von Jürgen Berger und Dr. Katharina Hipp (Electron Microscopy Facility, Max Planck Institut für Biologie, Tübingen, Deutschland), die die zur Verfügung gestellten Proben aufbereitet und mittels Raster-Elektronenmikroskopie untersucht haben. Die Analyse der Nabelschnurvenenstruktur mittels Mikro-Computer-Tomografie (**2.5.1**) wurde von Dr. Christoph Schürmann und Prof. Ralf P. Brandes (Universitätsklinik der Goethe-Universität, Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Die ebenso in Abschnitt **2.5.1** beschriebenen Doppler-Analysen gehen aus der Arbeit von Dr. Doris Fischer (Universitätsklinik der Goethe-Universität, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Neonatologie, Frankfurt am Main, Deutschland) hervor. Die unter **2.9** genannte Aufbereitung der zur Verfügung gestellten Proben und Untersuchung mittels Massenspektrometrie wurde von Dr. Ilka Wittig (Universitätsklinik der Goethe-Universität, Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Alle weiteren Versuche wurden in Eigenleistung erbracht.

3. Ergebnisse

A. baumannii zeichnet sich durch seine außergewöhnliche Persistenz und Virulenz aus. In Gram-negativen Bakterien wie *Bartonella* spp. oder *Yersinia* spp. sind Vertreter der trimeren Autotransporter wichtige Virulenzfaktoren [130–132, 140, 153]. Auch das im Jahr 2012 in *A. baumannii* beschriebene Protein Ata gehört zur Familie der trimeren Autotransporter [88]. Charakteristisch für trimere Autotransporter ist, dass sie beim Infektionsgeschehen wichtige Funktionen ausüben: Hierzu zählen neben der initialen Adhäsion auch die Invasion der Bakterien in die Wirtszelle aber auch die Inhibierung des Komplementsystems oder die Induktion spezifischer Wirtszellantworten in Form der Freisetzung inflammatorischer oder proangiogener Effektormoleküle [130, 132, 140, 153]. Es ist davon auszugehen, dass Ata ebensolche Funktionen während des Infektionsgeschehens erfüllt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Aspekte untersucht, die wichtig bei der Etablierung einer Infektion durch *A. baumannii* sind. Unter Verwendung des Referenzstammes *A. baumannii* ATCC 19606 (WT), eines isogenen *ata*-Deletions-Stammes (Δata) und eines komplementierten Stammes ($\Delta ata(c)$) mit entsprechender Leervektor-Kontrolle ($\Delta ata(p)$) wurden Versuche etabliert, welche die Funktion von Ata bei Infektionen untersuchen sollten. Die Versuchsansätze wurden sowohl *in vitro*, unter Verwendung humaner Endothel- und Epithelzellen bzw. humanen Serum, als auch *in vivo*, unter Verwendung des *G. mellonella* Infektionsmodells, durchgeführt.

3.1 Nachweis Endothel-spezifischer Oberflächenmoleküle auf isolierten HUVECs

Zur Untersuchung der Eigenschaften von Ata wurden *in vitro* Versuche mit humanen Zellen durchgeführt. Ein Großteil dieser Zellen wurde kommerziell erworben (**Tabelle 4**). Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen wurden jedoch frisch isoliert, weshalb es wichtig war, zunächst die Reinheit der isolierten Zellen zu überprüfen (**Abbildung 10**).

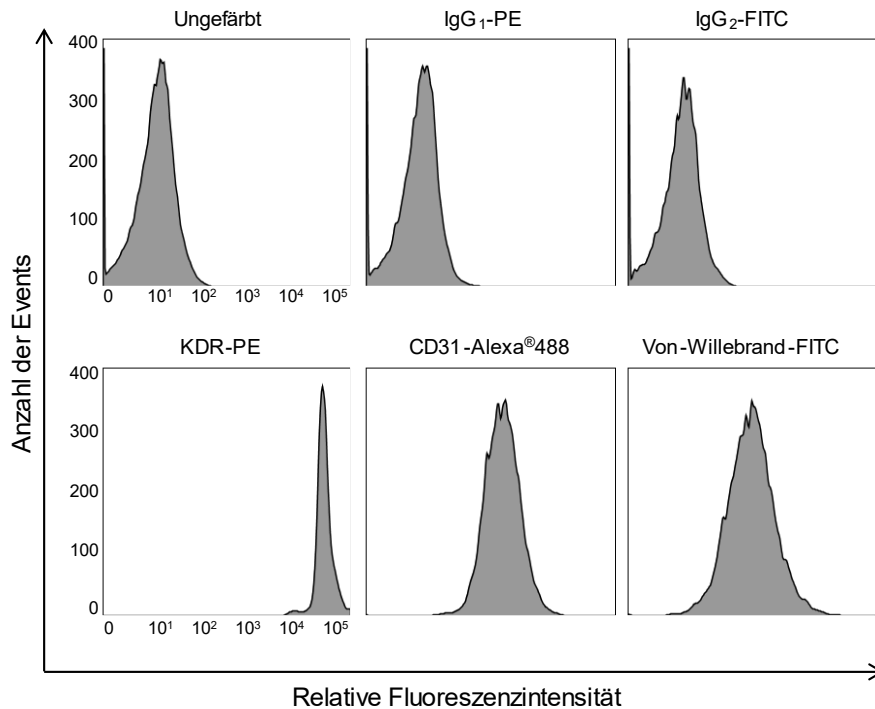


Abbildung 10. Durchflusszytometrische Untersuchung von Endothel-spezifischen Oberflächenmolekülen bei frisch isolierten HUVECs. Eine Stichprobe der eingefrorenen Zellen wurde aufgetaut und bis zur vollständigen Konfluenz bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden abgelöst, mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht.

Hierfür wurde in einer Stichprobe ein Aliquot der zuvor isolierten, expandierten und eingefrorenen Zellen aufgetaut und bis zur vollständigen Konfluenz bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin aus den Zellkulturflaschen gelöst, gewaschen und mit Endothel-spezifischen Antikörpern (KDR, CD31 und von-Willebrand-Faktor) markiert. Das Vorhandensein der Oberflächenproteine wurde im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

In der Probe ohne Antikörper (ungefärbt) zeigte sich ein Signal mit geringer relativer Fluoreszenzintensität (RFI), welches als Referenz für die weiteren Messungen diente. Unspezifische Bindungen der Antikörper wurden ausgeschlossen, da die mit IgG₁-PE und IgG₂-FITC inkubierten Zellen ein vergleichbares Signal im linken Bereich des Histogramms zeigten. Bei den weiteren drei Proben zeigte sich eine eindeutige Verschiebung des RFI-Signals nach rechts, was eine Zunahme der Signalstärke bedeutet. Durch die Zunahmen des RFI-Signals bei den spezifisch markierten Endothelzellen konnte das Vorhandensein der beschriebenen Oberflächenproteine eindeutig nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die isolierten HUVECs eine Reinkultur und somit für weitere Versuchszwecke geeignet waren.

3.2 Nachweis der erfolgreichen Deletion und Komplementation von *ata*

Zur Deletion der *Ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii* wurden die 1.500 Bp große flankierende Bereiche vor und nach dem Gen mittels PCR amplifiziert und über spezifische Restriktionsschnittstellen in den Suizid-Vektor pBIISK kloniert. Dieser Vektor wurde im Anschluss genutzt, um *A. baumannii* zu transformieren. Über mehrere Schritte der Selektion auf Kanamycin- und Saccharose-haltigem Medium konnte die *Ata*-codierende Sequenz deletiert werden (**Abbildung 11**).

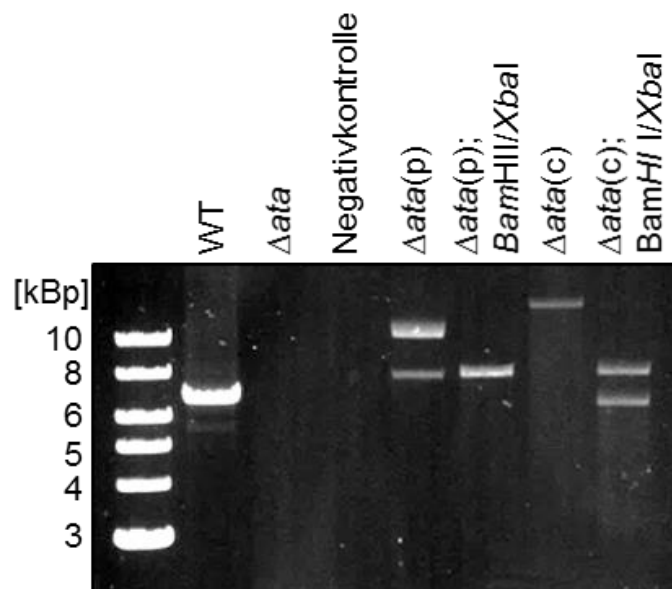


Abbildung 11. Nachweis der erfolgreichen Deletion und Komplementation der *Ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii*. Das Vorhandensein von *ata* wurde mittels PCR überprüft und im Agarosegel visualisiert. WT und Δata : amplifiziertes *ata*-Fragment aus isolierter genomischer DNA. $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$: isolierte Plasmide pARKM und pARKM_*ata* unbehandelt oder mit *Bam*HI/*Xba*I inkubiert. Als Größenstandard diente der 1 kb Größenstandard der Firma New England BioLabs.

Nach der Isolation von genomischer DNA aus WT und Δata konnte über eine PCR das Vorhandensein des 6.777 Bp großen Fragments der *Ata*-codierenden Sequenz bei WT eindeutig nachgewiesen werden (**Abbildung 11**, WT). Dieses Fragment fehlte bei Δata (**Abbildung 11**, Δata), was die erfolgreiche Deletion der *Ata*-codierenden Sequenz bestätigt. Als Reinheitskontrolle der PCR wurde ein Ansatz ohne DNA verwendet. Auch hier zeigte sich in der gelelektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel kein Fragment, sodass eventuelle Verunreinigungen auszuschließen waren. Das schwache Signal unterhalb des 6.777 Bp großen Fragmentes bei WT scheint das *ata*-Amplifikat in veränderter Konformation zu

sein und wurde nicht als ein unspezifisches Produkt der PCR betrachtet, da es bei Δata nicht nachweisbar war.

Nach der erfolgreichen Deletion von *ata* in *A. baumannii* sollte das Gen über einen Expressionsvektor *in trans* komplementiert werden. Hierzu wurde zunächst das Kanamycin-Resistenzgen aus pET42a über eine PCR amplifiziert und mittels *PvuII*-Schnittstellen in pARP3 kloniert. Dieses Plasmid wurde als pARKM bezeichnet und diente im weiteren Verlauf als Leervektorkontrolle. Über eine *in-fusion*-Klonierung konnte die *Ata*-codierende Sequenz inklusive ihrer ribosomalen Bindestelle in pARKM kloniert werden. Das daraus resultierende Plasmid pARKM_ata und der Leervektor pARKM wurden anschließend zur Transformation von *E. coli* WM6026 genutzt, welcher wiederum als Donor im Konjugationsversuch mit *A. baumannii* Δata diente. Nach erfolgreicher Konjugation wurden die beiden Stämme $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$ verwendet, um Plasmid-DNA zu isolieren und pARKM bzw. pARKM_ata über RFLP unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xba*I zu untersuchen (**Abbildung 11**). Im unbehandelten Zustand zeigten sich für $\Delta ata(p)$ zwei Fragmente mit einer Größe von 7.556 Bp und ca. 10.000 Bp, wobei das kleinere Fragment der erwarteten Größe von pARKM entsprach. Beim größeren Fragment handelt es sich vermutlich um eine relaxierte Konformation des Plasmides, welches eine verminderte Migration im Agarosegel aufweist (**Abbildung 11**, $\Delta ata(p)$). Im unbehandelten Zustand von $\Delta ata(c)$ konnte im Agarosegel ein Fragment mit einer Größe von ca. 14.333 Bp nachgewiesen werden (**Abbildung 11**, $\Delta ata(c)$), was der erwarteten Größe von pARKM_ata entsprach. Wurden die Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I inkubiert, so konnte die erfolgreiche Klonierung der *Ata*-codierenden Sequenz in pARKM_ata nachgewiesen werden (**Abbildung 11**, $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$; *Bam*HI/*Xba*I). Nach Inkubation von pARKM mit den Restriktionsenzymen war ein Fragment mit einer Größe von 7.556 Bp erkennbar. Dies entsprach der linearisierten Form des Plasmides. Bei pARKM_ata zeigten sich zwei Fragmente, die mit der linearisierten Form des Ausgangsplasmides (7.556 Bp) und der *Ata*-codierenden Sequenz (6.777 Bp) übereinstimmten. Somit konnte über PCR- und RFLP sowohl die erfolgreiche Deletion von *ata* als auch die Komplementation des Genes in Δata nachgewiesen werden.

Zur weiteren Validierung der *ata*-Deletion wurde genomische DNA von WT und Δ *ata* isoliert und unter Verwendung von *ata*_seq_FWD/*ata*_seq_REV sequenziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch hier bestätigte sich die erfolgreiche Deletion des Genes.

3.2.1 Expression von *ata* in *A. baumannii*

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass das Gen sowohl in WT als auch in Δ *ata*(c) transkribiert wird. Hierfür wurden die entsprechenden *A. baumannii*-Stämme in LB-Medium über einen Zeitraum von 24 h kultiviert. Für die Induktion der Expression von *ata* in Δ *ata*(c) erfolgte die Zugabe von 0,5 % [w/v] Arabinose. Nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h wurden Proben entnommen und die Gesamt-RNA der Bakterien isoliert. Diese wurde verwendet, um mittels qRT-PCR *ata*-Transkripte zu amplifizieren und somit Aussagen über die Expression des Gens zu treffen (**Abbildung 12**).

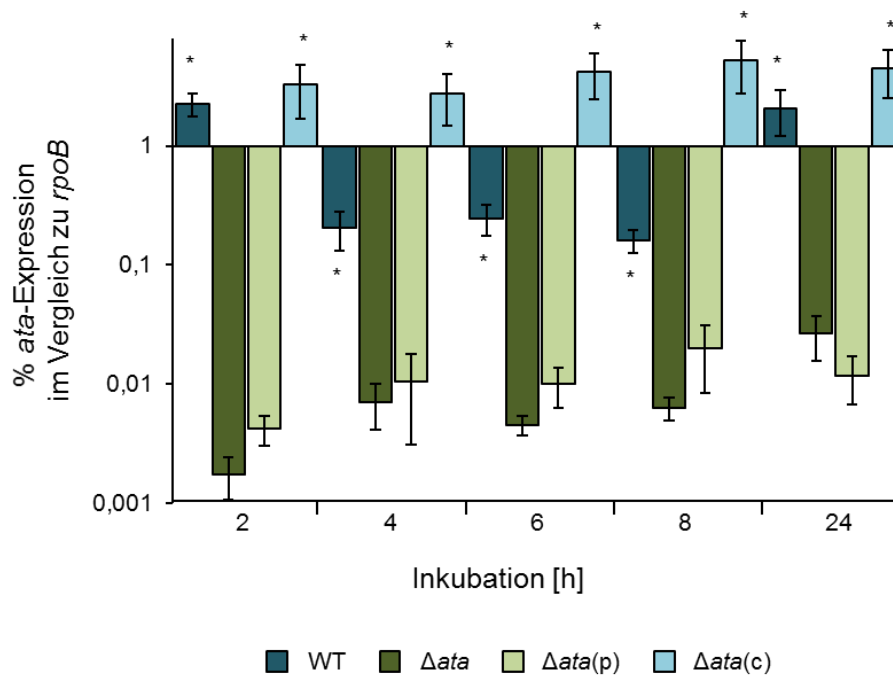


Abbildung 12. Zeitabhängiger Nachweis der *ata*-Expression in *A. baumannii*. Die Bakterienstämme wurden in LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Für die Induktion der *ata*-Expression in Δ *ata*(c) bzw. als Kontrolle in Δ *ata*(p) erfolgte die Zugabe von 0,5 % Arabinose (w/v). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. *ata*-Transkripte wurden daraufhin in der isolierten RNA durch eine qRT-PCR analysiert. Die Anzahl der nachgewiesenen *ata*-Transkripte wurde den der *rpoB*-Transkripten (Referenzgen) gegenübergestellt. (*) bezieht sich auf WT bzw. Δ *ata*(c) gegenüber Δ *ata* bzw. Δ *ata*(p) und kennzeichnet signifikante Unterschiede in der Expression von *ata* mit einem p-Wert $\leq 0,05$. n = 3 in Doppelbestimmung.

In der Analyse zeigte sich eine deutliche Expression von *ata* bei WT ($2,26 \pm 0,5$ %) und $\Delta ata(c)$ ($3,27 \pm 1,6$ %) nach 2 h. Dem gegenüber konnte nur eine sehr geringe Expression des Genes für Δata ($0,002 \pm 0,0007$ %) und $\Delta ata(p)$ ($0,004 \pm 0,001$ %) nachgewiesen werden, die wahrscheinlich auf Kontaminationen zurückzuführen war. Nach weiterer Inkubation der Proben über einen Zeitraum von 4 h, 6 h und 8 h war keine (sehr geringe) *ata*-Expression bei WT, Δata und $\Delta ata(p)$ nachweisbar. Hier betrug die jeweiligen Expressionsraten im Durchschnitt 0,2 % für WT, 0,006 % für Δata und 0,01 % für $\Delta ata(p)$. Für die Probe $\Delta ata(c)$, die sich unter kontinuierlichem Einfluss von Arabinose befand und somit eine stetige *ata*-Expression vermuten ließ, konnten zu den jeweiligen Zeitpunkten gleichbleibende *ata*-Transkriptmengen gefunden werden: $2,7 \pm 1,2$ % (4 h), $4,2 \pm 1,7$ % (6 h) und $5,2 \pm 2,4$ % (8 h). Nach einem Zeitraum von 24 h erschien das Transkriptmuster bei den untersuchten Proben wie nach einer Inkubationszeit von 2 h. WT und $\Delta ata(c)$ zeigten eine deutliche Expression von *ata* (WT: $2,1 \pm 0,9$ %; $\Delta ata(c)$: $4,5 \pm 1,9$ %) und für Δata bzw. $\Delta ata(p)$ konnten keine *ata*-Transkripte nachgewiesen werden (Δata : $0,02 \pm 0,01$ %; $\Delta ata(p)$: $0,01 \pm 0,005$ %). Im Versuch zeigte sich durch eine erhöhte Transkriptmenge nach 2 h und 24 h bei WT, dass die *ata*-Expression wohlmöglich von der Wachstumsphase des Bakteriums abhängig ist. Wie erwartet, konnten keine Transkripte für Δata und $\Delta ata(p)$ nachgewiesen werden, was die erfolgreiche Deletion des Genes auch auf mRNA-Ebene verifizierte. Für $\Delta ata(c)$ konnte über den gesamten Zeitraum von 24 h eine gleichbleibende Transkriptmenge bestimmt werden, was die Funktionalität des p_{BAD} -Promotors bestätigte. Als Kontrolle der Arabinose-abhängigen Induktion wurden Proben von $\Delta ata(c)$ ohne die Zugabe von Arabinose inkubiert und analysiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Hier zeigten sich nur sehr geringfügige *ata*-Transkriptmengen $\leq 0,5\%$, die mit einer Hintergrundaktivität des p_{BAD} -Promotors zu erklären waren.

3.2.2 Detektion von Ata auf der Oberfläche von *A. baumannii*

Nach der erfolgreichen Deletion und Komplementation der *Ata*-codierenden Sequenz in *A. baumannii* wurde die Oberflächenassemblierung des Proteins immunologisch untersucht.

Heterologe Expression der Ata-Kopfdomäne in E. coli und Immunisierung von Kaninchen zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers

Zur Gewinnung eines Antikörpers gegen Ata wurde die Sequenz, welche die vorhergesagte Kopfdomäne des Proteins umfasst, mittels PCR amplifiziert und über Restriktionsschnittstellen in den *E. coli*-Expressionsvektor pET24a kloniert. Das dadurch entstandene Plasmid pET24_ata-Kopf wurde verwendet, um *E. coli* BL21 DE3 zu transformieren. Daraufhin wurde die Expression des heterologen Proteins in *E. coli* BL21 DE3 untersucht (**Abbildung 13**).

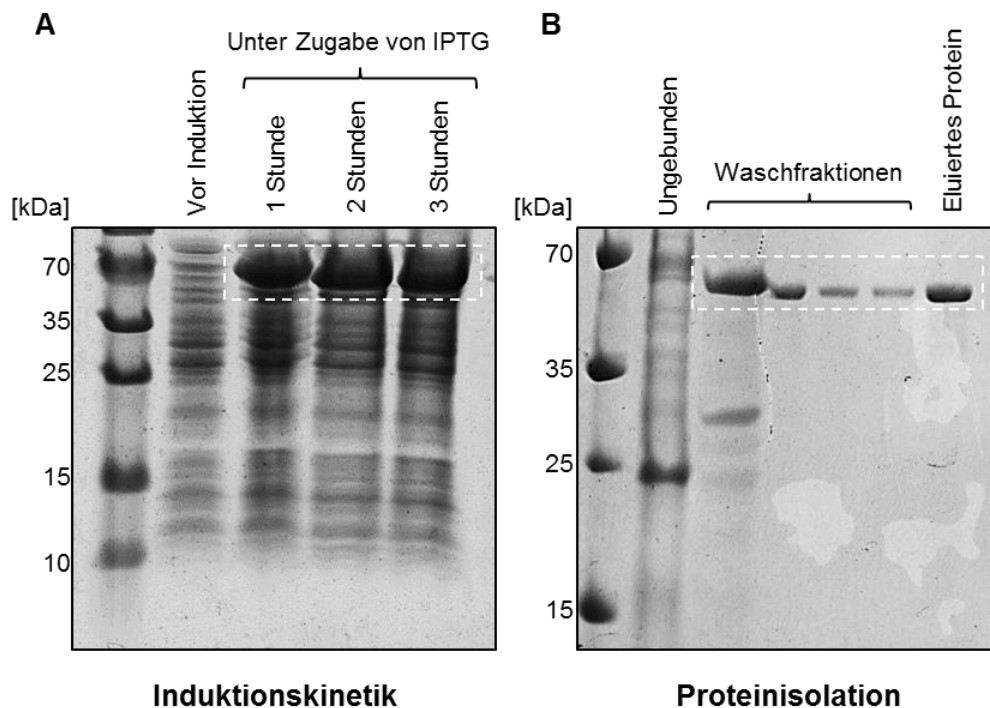


Abbildung 13. Zeitabhängige Induktion und Isolation der heterolog synthetisierten Ata-Kopf-Domäne-6xHis. (A) *E. coli* BL21_pET24_ata-Kopf wurde in LB-Medium kultiviert und nach Erreichen einer OD_{600} von 1,0 IPTG zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde für 3 h weiter inkubiert und stündlich erfolgte eine Probenentnahme. Das Gesamtprotein wurde in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung aufgetrennt. (B) Zur Isolation der Ata-Kopf-Domäne wurde *E. coli* BL21_pET24_ata-Kopf flüssig kultiviert. Die Proteinsynthese wurde durch IPTG (Endkonzentration 400 μ M) induziert. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte über eine Ultraschallbehandlung. Die Ata-Kopfdomäne wurde mittels einer Affinitätschromatografie isoliert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die weiß gestrichelten Rechtecke markieren die Ata-Kopf-Domäne-6xHis. Als Größenstandard diente der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder der Firma BioRad.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel separiert (**Abbildung 13 A**). Vor der Induktion zeigte sich in der entnommenen Probe eine Reihe von Proteinen, die nicht genauer beschrieben werden konnten. Nach Zugabe von IPTG war ein deutliches Proteinsignal erkennbar, welches der Ata-Kopf-Domäne-6xHis (erwartete Größe 68 kDa) entsprach. Das Signal war bereits nach 1 h Inkubation stark ausgeprägt

und veränderte sich über einen Zeitraum von 2 h bzw. 3 h in seiner Intensität nicht. Dementsprechend wurde für die darauffolgende Isolation des Proteins über Affinitätschromatografie ein Induktionszeitraum von 1 h gewählt (**Abbildung 13 B**). In der Durchflussprobe nach der ersten Inkubation der Proteinlösung mit dem Säulenmaterial zeigten sich in der SDS-PAGE verschieden große Proteinfragmente, die nicht gebundene Proteine darstellten. Die Probensäule wurde daraufhin 4x mit Waschpuffer gewaschen. Im Durchfluss zeigte sich in der SDS-PAGE ein Proteinsignal, welches der Größe der Ata-Kopf-Domäne-6xHis entsprach und zusätzlich weitere Verunreinigungen im Größenbereich von ≤ 35 kDa. Durch wiederholtes Waschen der Probensäule waren keine Proteinverunreinigungen mehr nachweisbar, sodass die heterolog produzierte Ata-Kopf-Domäne-6xHis durch eine Inkubation mit dem Elutionspuffer vom Säulenmaterial gelöst werden konnte. Im denaturierenden SDS-Gel zeigte sich ein deutliches und einzelnes Signal im Bereich von 68 kDa. Verunreinigungen waren nicht mehr nachweisbar, sodass das Protein zu je 170 μg für die kommerzielle Immunisierung von Kaninchen verwendet werden konnte (siehe **2.3.6**).

Immunologischer Nachweis von Ata auf A. baumannii

Die von der Immunisierung der Kaninchen erhaltenen Seren wurden über ein Protein A/G-Kit aufgereinigt und zum immunologischen Nachweis von Ata auf der Oberfläche der einzelnen *A. baumannii*-Stämme verwendet. Dazu wurden die Bakterienstämme in LB-Medium für 2 h bei 37 °C kultiviert.

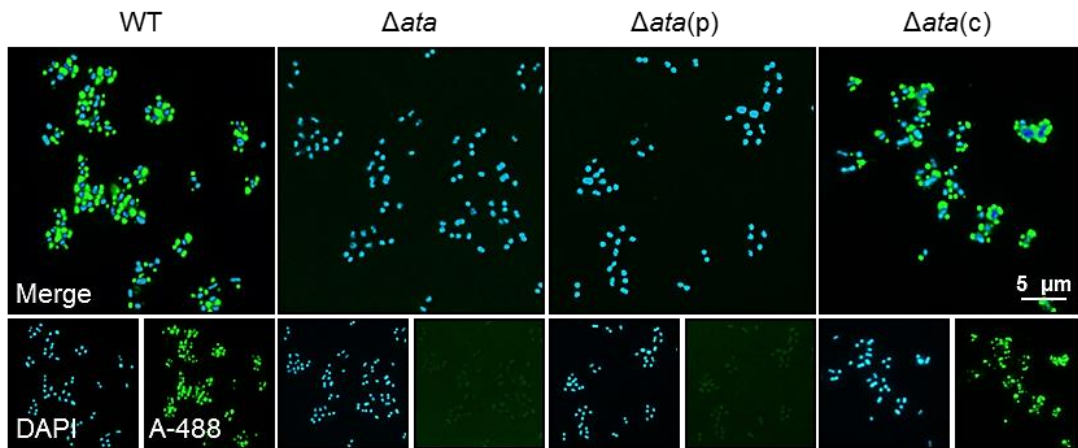


Abbildung 14. Nachweis der Oberflächenassemblierung von Ata auf *A. baumannii*. Die Bakterien wurden in LB-Medium inkubiert und zur Induktion der *ata*-Expression in $\Delta ata(c)$ erfolgte die Zugabe von 0,5 % Arabinose (w/v). Nachdem eine OD_{600} von 0,2 erreicht war, wurden die Bakterien zentrifugiert, in PBS gewaschen, auf einem Deckgläschen fixiert und mit Ziegenserum blockiert. Der immunologische Nachweis von Ata erfolgte durch Zugabe des polyklonalen Antikörpers, der im Weiteren unter Verwendung eines Alexa[®]488-konjugierten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Die bakterielle DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

Durch Zugabe von 0,5 % [w/v] Arabinose erfolgte die Induktion der *ata*-Expression in $\Delta ata(c)$. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen, blockiert und mit den polyklonalen anti-Ata-Kopf-Antikörpern inkubiert. Die Proben wurden danach fluoreszenzmikroskopisch untersucht (**Abbildung 14**). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Proben konnte die Assemblierung von Ata auf der Oberfläche von WT und $\Delta ata(c)$ bestätigt werden. Hier zeigte sich ein eindeutiger saumartiger Rand, welcher die Bakterien umgibt. Dieser Saum konnte nicht bei Δata und $\Delta ata(p)$ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen in Verbindung mit den zuvor erhalten Daten (PCR, RFLP und qRT-PCR), dass sowohl die Deletion von *ata* als auch dessen Komplementierung erfolgreich war. Weiterhin wurde bestätigt, dass die genetische Manipulation des Stammes $\Delta ata(c)$ zu einer zum WT vergleichbaren Ata-Synthese führt.

3.2.3 Wachstumskontrollen der verschiedenen *A. baumannii*-Stämme

Da unterschiedliche Wachstumsphänotypen der generierten *A. baumannii*-Stämme einen erheblichen Einfluss auf die Durchführung und vor allem Ergebnisse weiterer Versuche haben können, wurde das Wachstumsverhalten der Stämme untersucht (**Abbildung 15**).

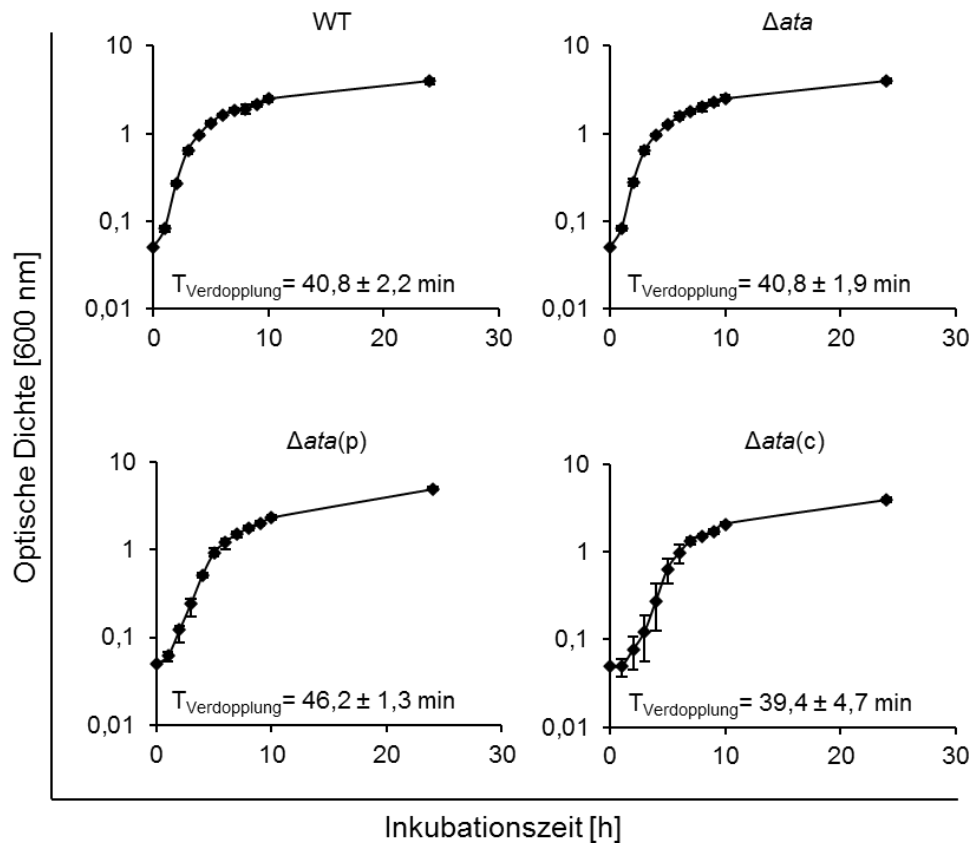


Abbildung 15. Wachstumsanalysen der verschiedenen *A. baumannii*-Stämme. Die Bakterienstämme wurden in LB-Medium (mit 0,5 % Arabinose [w/v] für $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Über den linearen Bereich der Wachstumskurven wurde für jeden untersuchten Stamm die Verdopplungszeit $T_{\text{Verdopplung}}$ ermittelt. $n = 3$ in Doppelbestimmung.

Hierfür wurden die einzelnen *A. baumannii*-Stämme in LB-Medium über einen Zeitraum von 24 h kultiviert. Zur Induktion der *ata*-Expression in $\Delta ata(c)$ und zur Kontrolle in $\Delta ata(p)$ erfolgte die Zugabe von 0,5 % [w/v] Arabinose. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden aus der Bakteriensuspension Proben entnommen und die optische Dichte bei 600 nm photmetrisch gemessen. Hierbei zeigte sich bei allen untersuchten *A. baumannii* eine sehr kurz andauernde lag-Phase von ca. 1 h. Dem folgend war ein exponentielles Wachstum der Bakterien im Bereich von 1 h bis 6 h und ein stationäres Wachstum nach 6 h zu erkennen. Ebenso vergleichbar war die finale optische Dichte der analysierten Bakterienstämme, die im Durchschnitt einen Wert von $4,2 \pm 0,5$ annahm. Weiterhin wurden im Bereich des exponentiellen Wachstums die spezifischen Verdopplungszeiten der einzelnen *A. baumannii* bestimmt. Hierbei ergaben sich folgende Werte: WT, $40,8 \pm 2,2$ min; Δata , $40,8 \pm 1,9$ min; $\Delta ata(p)$, $46,2 \pm 1,3$ min; $\Delta ata(c)$, $39,4 \pm 4,7$ min. Mit Ausnahme von $\Delta ata(p)$ war im Vergleich der einzelnen Verdopplungszeiten untereinander kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben

zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass weder die Deletion von *ata* noch dessen Komplementierung zu einem relevanten veränderten Wachstumsverhalten der Stämme geführt hat.

Zusammenfassend wurde bestätigt, dass die *Ata*-codierende Sequenz in *A. baumannii* erfolgreich deletiert wurde. Es wurde gezeigt, dass die Transformation von *A. baumannii* Δ *ata* mit dem Expressionsvektor pARKM_*ata* zur Komplementation des Stammes mit vergleichbarer Transkriptmenge von *ata* führte und dass das *Ata*-Protein sowohl bei WT als auch bei Δ *ata*(c) oberflächenlokalisiert und nicht bei Δ *ata* bzw. Δ *ata*(p) vorzufinden war. Im Vergleich des Wachstumsverhaltens der einzelnen *A. baumannii* zeigten sich keine relevanten Unterschiede, sodass diese zur weiteren Charakterisierung von *Ata* verwendet werden konnten.

3.3 *Ata*-vermittelte Adhäsion an abiotische und biotische Faktoren

Zur Etablierung von Infektionen im Menschen durch pathogene Bakterien stellt die Adhäsion an Wirtszellen einen initialen Schritt dar. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche etabliert, welche die Analyse der Interaktion von *Ata*-produzierenden und -nichtproduzierenden *A. baumannii* mit abiotischen und biotischen Faktoren erlaubt.

3.3.1 *Ata* bindet an Bestandteile der extrazellulären Matrix

Eine vorangegangene Studie konnte zeigen, dass *Ata* extrazelluläre Matrix Proteine wie beispielsweise Kollagen und Laminin bindet [88]. Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Stämme *A. baumannii* WT und *A. baumannii* Δ *ata* sollten diese Ergebnisse verifiziert werden. Hierzu wurden Proteinlösungen mit humanen Kollagen A, Laminin, Fibronectin, VCAM-1, ICAM-1 und ICAM-2 verwendet, um die Oberfläche von Zellkulturschalen zu beschichten. Danach erfolgte die Zugabe der verschiedenen Bakteriensuspensionen und die Inkubation der Proben. Nach mehrmaligem Waschen der Proben wurden adhärenente Bakterien mit Kristallviolett gefärbt und mit Ethanol gelöst.

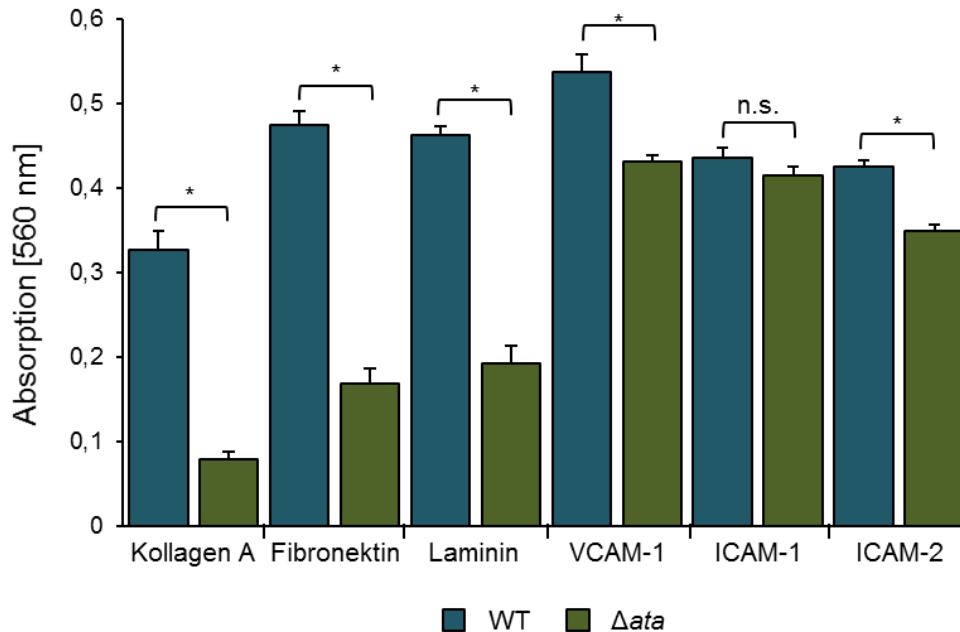


Abbildung 16. Nachweis der Ata-abhängigen Bindung von *A. baumannii* an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an rekombinante endotheliale Adhäsionsmoleküle. Zellkulturschalen wurden mit jeweils 100 µg der in PBS gelösten Proteine beschichtet. Danach erfolgte die Zugabe der Bakteriensuspension (1×10^6) und die Inkubation bei 37 °C für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die adhärenenten Bakterien durch Zugabe einer Kristallviolett-Lösung gefärbt und mit Ethanol gelöst. Die Absorption der Suspension wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. (*) weist auf einen signifikanten Unterschied hin. (n.s.) weist auf keinen signifikanten Unterschied hin. n = 3 in Doppelbestimmung.

Über Absorptionsmessungen der Proben wurde die Effizienz der Bindung von *A. baumannii* an die verschieden beschichteten Oberflächen ermittelt (**Abbildung 16**).

Im Versuch zeigte sich eine Bindung der Bakterien an jedes getestete Substrat. Bei Kollagen A betrug die Absorption für WT $0,33 \pm 0,02$. Dem gegenüber war die Bindung von Δata um den Faktor 4 reduziert ($0,08 \pm 0,01$). Bei Fibronectin stieg die Absorption für WT auf einen Wert von $0,47 \pm 0,02$ an, wobei auch hier die Adhäsion von Δata reduziert war ($0,17 \pm 0,02$). Bei Laminin waren vergleichbare Effekte zu erkennen: Hier betrug die gemessene Absorption für WT $0,46 \pm 0,01$ und für Δata $0,19 \pm 0,02$. Im Durchschnitt war für Kollagen A, Fibronectin und Laminin ein Verlust der Bindungseffizienz bei Δata gegenüber WT von $67 \pm 7 \%$ zu erkennen. Bei den getesteten rekombinanten endothelialen Adhäsionsmoleküle wurde für VCAM-1 eine maximale Absorption für WT von $0,54 \pm 0,02$ bestimmt. Für Δata zeigte sich ein Verlust der Adhäsionsfähigkeit von 25 % auf einen Wert von $0,43 \pm 0,01$. Dieser Effekt war auch bei ICAM-2 (WT: $0,43 \pm 0,01$; Δata : $0,35 \pm 0,01$) aber nicht bei ICAM-1 (WT: $0,44 \pm 0,02$; Δata : $0,43 \pm 0,01$) nachweisbar. Im Versuch zeigte sich ein Adhäsionsverlust der

Bakterien durch die Deletion von *ata* bei 5 von 6 untersuchten Molekülen. Dieser Verlust war bei Kollagen A, Fibronectin und Laminin stärker ausgeprägt als bei VCAM-1 und ICAM-2. Bei VCAM-1 und ICAM-2 war die Adhäsion der Bakterien im Vergleich zu den untersuchten extrazellulären Matrixproteinen jedoch grundlegend höher. Diese Daten deuten darauf hin, dass *Ata* sowohl für die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine als auch an rekombinante endotheliale Adhäsionsmoleküle wichtig ist. Besonders die Bindung von *A. baumannii* an endotheliale Oberflächenproteine könnte ein Indiz auf mögliche Bindungspartner des Bakteriums an der Wirtszelle sein.

3.3.2 Fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Nachweis der Adhäsion von *A. baumannii* an humane Zellen

Nachdem bestätigt wurde, dass *A. baumannii* *Ata*-abhängig an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an endotheliale Adhäsionsmoleküle bindet, wurde im nächsten Schritt die Adhäsion der Bakterien an humanen Endothel- bzw. Epithelzellen untersucht. Hierfür wurden *in vitro* Infektionsversuche durchgeführt und adhärente Bakterien zunächst durch fluoreszenz- bzw. auch elektronenmikroskopische Methoden untersucht (**Abbildung 17**). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse waren adhärente *A. baumannii* sowohl auf den Endothelzellen als auch auf den Epithelzellen (**Abbildung 17 A**) zu beobachten, wobei die Anzahl der Bakterien für WT stets größer war als für Δ *ata*.

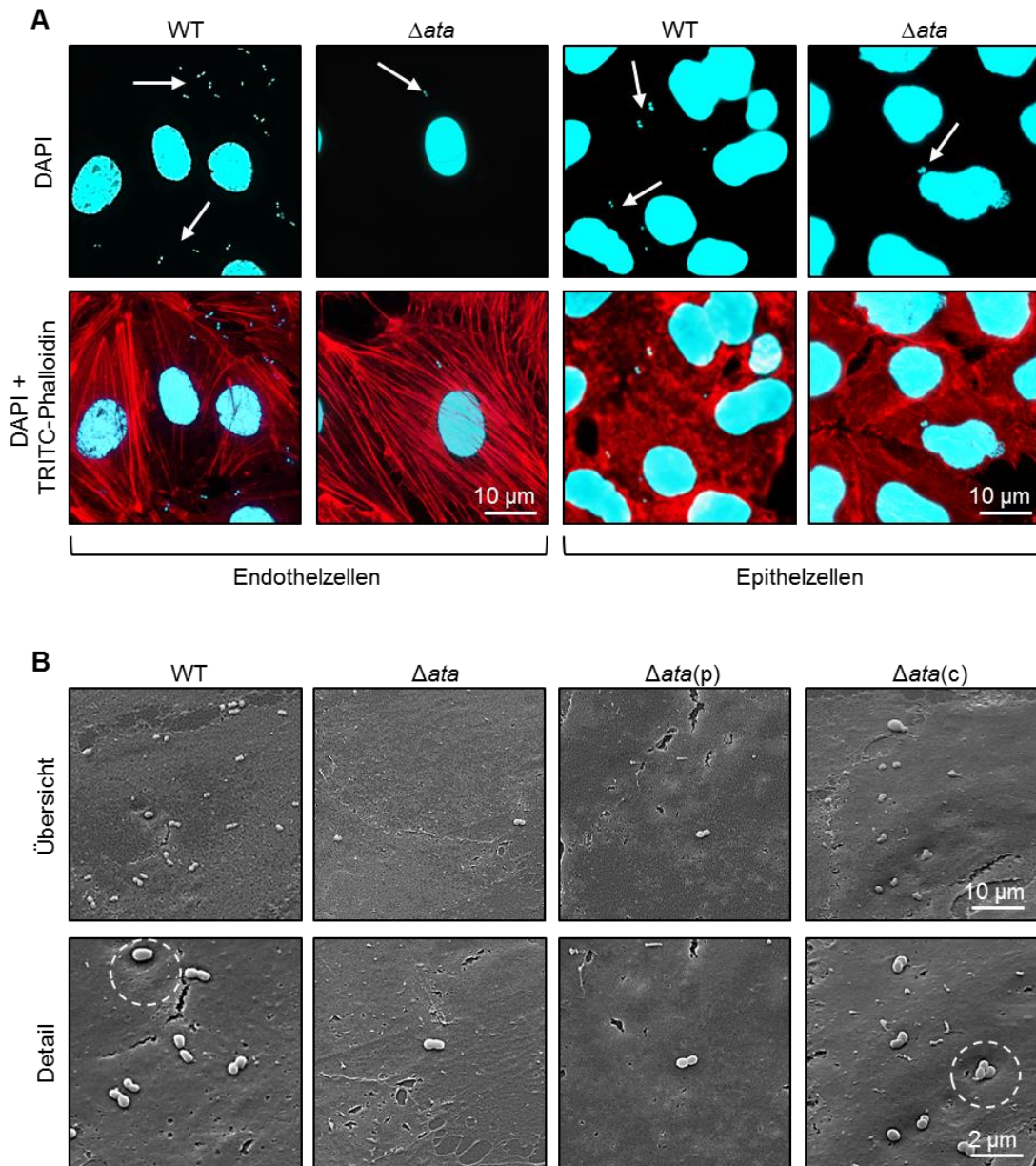


Abbildung 17. *A. baumannii* bindet Ata-abhängig an die Oberfläche von endothelialen und epithelialen Wirtszellen. (A) Endothel- (HDMEC) und Epithelzellen (A549) wurden in Zellkulturschalen (24 Kavitäten) auf Deckgläsern kultiviert und mit den entsprechenden Bakterienstämmen inkubiert (MOI 200). Das Aktin-Zytoskelett und die DNA wurden mit TRITC-Phalloidin (rot) bzw. DAPI (blau) gefärbt. Die Pfeile markieren adhärenente Bakterien. Maßstab: 10 μm . **(B)** Endothelzellen (HUVEC) wurden kultiviert und mit *A. baumannii* für 1 h infiziert (MOI = 200). Nicht-adhärenente Bakterien wurden durch 3 x Waschen entfernt. Die Proben wurden mit 2,5 % [v/v] Glutaraldehyd fixiert und mittels Raster-Elektronenmikroskopie untersucht. Die gestrichelten Kreise deuten auf Bakterien hin, die sich auf der Oberfläche der Wirtszelle in kleinen Membranvertiefungen befinden. Maßstab: 2 μm .

Dies deutete auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Ata und der Adhäsionsfähigkeit von *A. baumannii* an die Wirtszellen hin. Weiterhin zeigte sich im Vergleich der beiden humanen Zelltypen, dass die Bindung von WT an Endothelzellen (hier HDMEC) ausgeprägter war als an Epithelzellen (hier A549), was auf eine erhöhte Affinität der Bakterien gegenüber Endothelzellen hinweisen könnte. Zusätzlich zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen

wurden infizierte HUVECs elektronenmikroskopisch analysiert (**Abbildung 17 B**). Hierbei bestätigten sich die zuvor gemachten Ergebnisse: Bei jeder untersuchten Probe konnte das Vorhandensein der Bakterien nachgewiesen werden und hierbei war die Bindung von WT stärker ausgeprägt als von Δata . Durch die Inkubation der humanen Zellen mit $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$ wurde zudem bewiesen, dass das Vorhandensein von Ata unmittelbar mit der Bindung der Bakterien korreliert. Durch die Komplementation von *ata* in $\Delta ata(c)$ konnte der WT-Phänotyp wiederhergestellt werden. Weiterhin zeigte sich, dass *ata*-exprimierende *A. baumannii* auf der Oberfläche der Wirtszelle Membrandeformierungen hervorrufen, die in Form von Vertiefungen ersichtlich waren. Diese Beobachtung könnte eine frühe Phase der Invasion der Bakterien in die Endothelzelle darstellen (**Abbildung 17 B**, gestrichelte Kreise).

3.3.3 Quantifizierung adhärenter *A. baumannii* an humanen Zellen nach einer statischen Infektion

Durch die mikroskopischen Analysen wurde bestätigt, dass *A. baumannii* Ata-abhängig an humane Zellen adhäriert. Zur Untersuchung zellspezifischer Effekte wurden Infektionsversuche mit verschiedenen Endothel- (HUVEC, HDMEC, HMEC-1) bzw. Epithelzellen (A549, HepG-2, HeLa) durchgeführt und adhärenente Bakterien mittels qRT-PCR quantifiziert (**Abbildung 18**). Hierdurch konnten die zuvor gemachten Ergebnisse bestätigt werden. Für HUVECs ergaben sich folgende Adhäsionsraten: WT, $4,4 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle; Δata , $0,4 \pm 0,05$ Bakterien/Zelle; $\Delta ata(p)$, $0,03 \pm 0,01$ Bakterien/Zelle und $\Delta ata(c)$, $6,9 \pm 1,9$ Bakterien/Zelle. Im Vergleich der Adhäsion zwischen WT und Δata zeigte sich eine 10-fach höhere Adhäsion von *ata*-exprimierenden *A. baumannii*, was ein deutlicher Hinweis auf die Ata-vermittelte Adhäsion der Bakterien war.

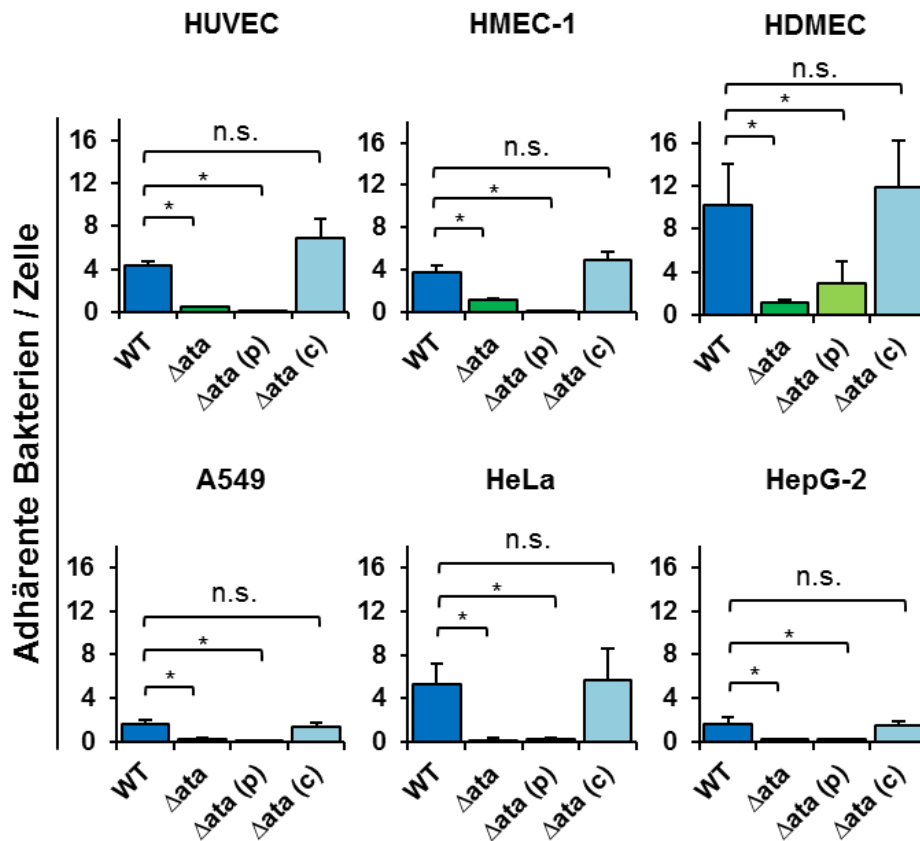


Abbildung 18. Quantifizierung adhärenter *A. baumannii* auf humanen Endothel- und Epithelzellen. Humane Endothel- und Epithelzellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 200) für 1 h inkubiert. Nach der Infektion wurden die Proben 3x mit dem entsprechenden Zellkulturmedium gewaschen und nicht adhärenente Bakterien entfernt. Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber aus den Kavitäten gelöst und 1 μ l der gelösten Zellen wurde zur Quantifizierung mittels qRT-PCR eingesetzt. Die Bindungsraten stellen den Quotienten von *rpoB*/(0,5 x *hmbS*) dar. (*) weist auf einen signifikanten Unterschied hin. (n.s.) weist auf keinen signifikanten Unterschied hin. n = 3 in 6-facher Bestimmung.

Durch die Komplementation von *ata* in *A. baumannii* Δ ata wurde der Einfluss des trimeren Autotransporters bei der Adhäsion an humane Zellen bestätigt. Hier ist zu erkennen, dass das Adhäsionsverhalten der Bakterien mit dem WT vergleichbar war, wohingegen die Leervektorkontrolle Δ ata(p) keine erhöhte Adhärenz aufwies. Es zeigte sich eine 20-fach höhere Adhäsion von Δ ata(c) gegenüber Δ ata(p). Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Zelllinie HMEC-1 gemacht. Mit einer Adhäsionsrate von $3,7 \pm 0,8$ Bakterien/Zelle für WT war diese 4-fach höher als für Δ ata mit $1,2 \pm 0,2$ Bakterien/Zelle. Für Δ ata(p) wurden $0,01 \pm 0,01$ Bakterien/Zelle und für Δ ata(c): $4,9 \pm 0,8$ Bakterien/Zelle nachgewiesen. Im Vergleich zu HUVEC und HMEC-1 wurde für HDMEC eine 2-fach höhere Adhäsionsrate für WT ermittelt ($10,0 \pm 3,9$ Bakterien/Zelle). Demgegenüber waren für Δ ata und Δ ata(p) die Adhäsionsraten reduziert ($1,2 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle bzw. $3,0 \pm 2,0$

Bakterien/Zelle). Für $\Delta ata(c)$ wurde eine zum WT vergleichbare Adhäsionsrate von $11,2 \pm 4,4$ Bakterien/Zelle berechnet. Zusätzlich zu den Adhäsionsversuchen von *A. baumannii* an Endothelzellen wurde die Adhärenz der Bakterien an humanen Epithelzellen analysiert. Hier war die Adhäsionsfähigkeit gegenüber den humanen Endothelzellen bei A549 (WT: $1,7 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle) und bei HepG-2 (WT: $1,7 \pm 0,6$ Bakterien/Zelle) reduziert. Diese Ergebnisse belegen die zuvor gemachten Beobachtungen, dass *A. baumannii* gegenüber Endothelzellen eine höhere Affinität aufweist als bei Epithelzellen. Durch die Infektion der Zellen mit Δata wurde weiterhin gezeigt, dass der trimere Autotransporter auch bei der Adhäsion an Epithelzellen eine entscheidende Rolle spielt: Bei A549 reduzierte sich die Anzahl adhärenter Bakterien auf $0,3 \pm 0,07$ Bakterien/Zelle und für HepG-2 auf $0,18 \pm 0,05$ Bakterien/Zelle. Vergleichbare Resultate wurden auch für die Kontrollstämme $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$ gemacht (A549: $0,01 \pm 0,01$ Bakterien/Zelle und $1,4 \pm 0,4$ Bakterien/Zelle, HepG-2: $0,2 \pm 0,09$ Bakterien/Zelle und $1,5 \pm 0,4$ Bakterien/Zelle). Im Gegensatz zu A549- und HepG-2-Zellen zeigten sich bei HeLa-Zellen vergleichbare Adhäsionsraten wie für Endothelzellen (WT: $5,3 \pm 1,9$ Bakterien/Zelle; Δata : $0,2 \pm 0,2$ Bakterien/Zelle; $\Delta ata(p)$: $0,3 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle; $\Delta ata(c)$: $5,7 \pm 2,9$ Bakterien/Zellen).

3.3.4 Nachweis adhärenter *A. baumannii* auf humanen Zellen nach einer dynamischen Infektion

Nachdem die Ata-abhängige Adhäsion von *A. baumannii* an humane Zelle unter statischen Infektionsbedingungen nachgewiesen wurde, sollte im nächsten Schritt der Einfluss von Scherkräften, die den im menschlichen Körper vorhandenen Blutstrom entsprechen, untersucht werden. Dafür wurden humane Zellen in Durchfluskkammern kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 200) für 1 h unter konstanten Flussbedingungen von 0,2 ml/min infiziert. Danach erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der infizierten Zellen (**Abbildung 19**) und die Quantifizierung adhärenter Bakterien mittels qRT-PCR (**Abbildung 20**).

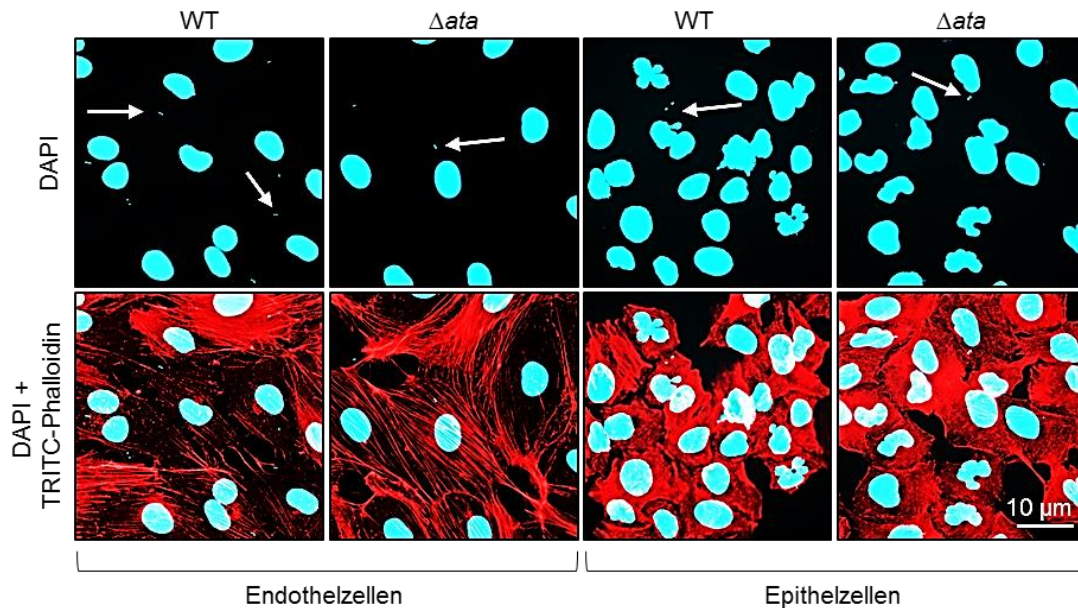


Abbildung 19. Nachweis adhärenter Bakterien an humanen Zellen nach dynamischer Infektion. Endothel- und Epithelzellen wurden in Durchflusskammern kultiviert und für 1 h mit *A. baumannii* (MOI 200) unter konstanten Flussbedingungen von 0,2 ml/min infiziert. Nicht adhärenere Bakterien wurden mit entsprechendem Zellkulturmedium für 15 min bei 0,2 ml/min entfernt. Die Proben wurden anschließend in 3,75 % [w/v] PFA fixiert und mit DAPI (blau) bzw. TRITC-Phalloidin (rot) gefärbt. Im Anschluss erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse. Die weißen Pfeile deuten auf adhärenere Bakterien hin. Maßstab: 10 μ m.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse war zu erkennen, dass die Adhäsion der Bakterien (WT und Δ *ata*) im Vergleich zur statischen Infektion unter dynamischen Infektionsbedingungen stark gesunken war (vgl. **Abbildung 17**). Zwischen den beiden Zelltypen konnte festgestellt werden, dass die Affinität der *ata*-exprimierenden Bakterien zu Endothelzellen größer war als gegenüber Epithelzellen. Ebenso wurde im Vergleich zwischen WT und Δ *ata* eine erhöhte Adhärenz bei WT festgestellt, was wiederum auf die wichtige Rolle von *Ata* bei der Adhäsion an humane Zellen hindeutet. Weiterhin stellte sich heraus, dass das Vorhandensein bakterieller Agglomerate nicht mehr nachweisbar war.

Um weitere Aussagen treffen zu können, wurden die adhärenenten Bakterien nach dynamischer Infektion der humanen Zellen mittels qRT-PCR quantifiziert (**Abbildung 20**). Hierbei zeigte sich im Vergleich zur statischen Infektion, dass die Adhäsionsraten nach der dynamischen Infektion bei Endothelzellen im Durchschnitt um ca. 80 % und bei Epithelzellen um ca. 30 % abgesunken waren (vgl. **Abbildung 18**). Für HUVECs zeigten sich folgende Bindungsraten: WT, $1,2 \pm 0,7$ Bakterien/Zelle; Δ *ata*, $0,2 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle; Δ *ata*(p), $0,2 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle und Δ *ata*(c), $1,1 \pm 0,7$ Bakterien/Zelle.

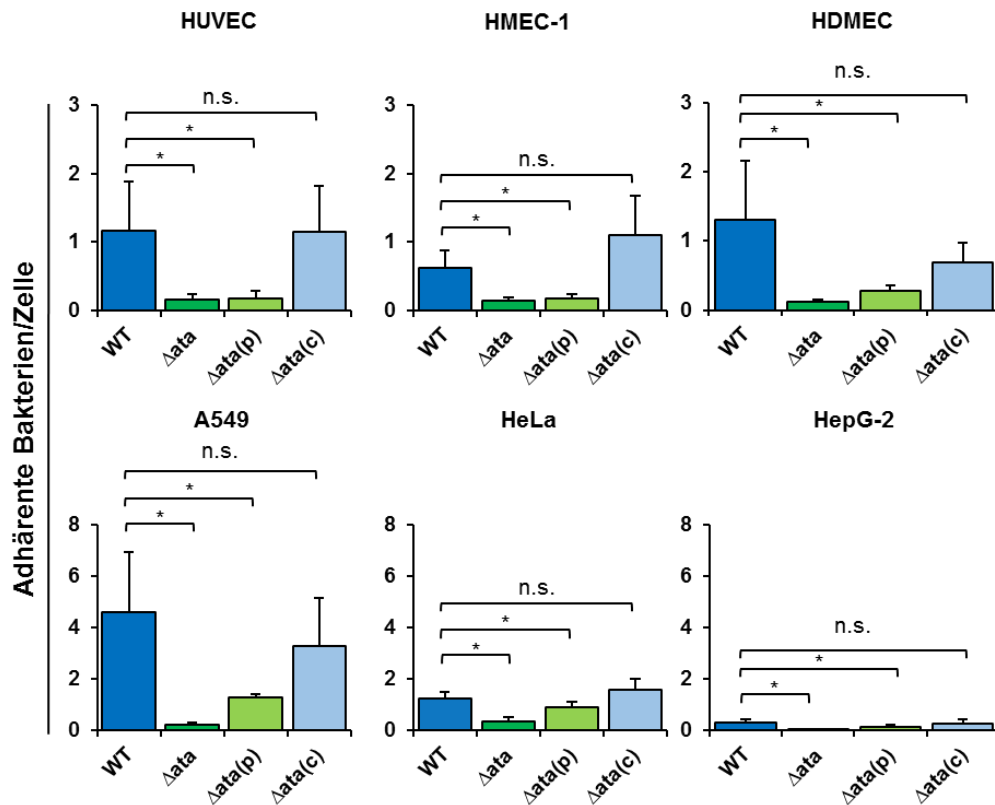


Abbildung 20. Quantifizierung adhärenter Bakterien an humanen Zellen nach dynamischer Infektion. Endothel- und Epithelzellen wurden in Durchflusskammern kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 200) infiziert. Nicht adhärende Bakterien wurden durch 15-minütiges Spülen mit entsprechendem Zellkulturmedium entfernt. Die Proben wurden anschließend aus der Durchflusskammer gelöst und mittels qRT-PCR quantifiziert. (*) weist auf einen signifikanten Unterschied hin. (n.s.) weist auf keinen signifikanten Unterschied hin. n = 3 in 6-facher Bestimmung

Für HMEC-1 und HDMEC konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden: Es wurden Bindungsraten für WT von $0,6 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle bzw. $1,3 \pm 0,9$ Bakterien/Zelle und für Δ ata von $0,2 \pm 0,01$ Bakterien/Zelle bzw. $0,1 \pm 0,01$ Bakterien/Zelle ermittelt. Bei den Kontrollstämmen zeigten sich folgende Adhäsionsraten: Δ ata(p), $0,2 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle (HMEC-1) und $0,3 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle (HDMEC); Δ ata(c), $1,1 \pm 0,6$ Bakterien/Zelle (HMEC-1) und $0,7 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle (HDMEC). Nach dynamischer Infektion der verschiedenen Epithelzellen waren die Adhäsionsraten der Bakterien an HeLa und HepG-2 gegenüber der statischen Infektion stark vermindert. Demgegenüber erschien die Adhäsion von *A. baumannii* an A549 leicht erhöht zu sein (vgl. **Abbildung 18**). Für jede untersuchte Zelllinie wurden signifikante Unterschiede zwischen WT und Δ ata bzw. zwischen Δ ata(p) und Δ ata(c) beobachtet. Bei A549 zeigten sich nach der Infektion mit WT $4,6 \pm 2,3$ Bakterien/Zelle, für Δ ata $0,2 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle, für Δ ata(p) $1,3 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle und für Δ ata(c) $3,3 \pm 1,9$ Bakterien/Zelle. Für HeLa wurden für WT $1,2 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle, für Δ ata $0,4 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle,

für $\Delta ata(p)$ $0,9 \pm 0,2$ Bakterien/Zelle und für $\Delta ata(c)$ $1,6 \pm 0,4$ Bakterien/Zelle ermittelt. Unter Verwendung von HepG-2 sank die Adhäsionsrate für jeden Bakterienstamm unter einen Wert von 1 Bakterium/Zelle. Hier wurden lediglich $0,3 \pm 0,1$ Bakterien/Zelle für WT und $0,01 \pm 0,01$ Bakterien/Zelle für Δata berechnet. Die Kontrollstämme ergaben analoge Ergebnisse.

Zusammenfassend war die Bindung der Bakterien unter dynamischen Infektionsbedingungen gegenüber den statischen Infektionsversuchen mit Ausnahme für A594-Zellen stark gesunken. Die Adhärenz *ata*-exprimierender *A. baumannii* war wie bei den statischen Adhäsionsversuchen stets höher als die Adhärenz von nicht-*ata*-exprimierenden *A. baumannii*. Das Phänomen der erhöhten Adhärenz der Bakterien an A549 lässt mutmaßen, dass sich die Zellen durch die wirkenden Scherkräfte morphologischen Veränderungen unterziehen, welche wiederum die Bindung von *A. baumannii* begünstigt.

3.3.5 Einfluss von α_4/β_1 -Integrinen auf die Adhäsion von *A. baumannii* an Endothelzellen

Nachdem der Einfluss von *Ata* auf die Adhärenz an humane Zellen sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Infektionsbedingungen eindeutig gezeigt wurde, sollte nun die Rolle spezifischer Oberflächenmoleküle auf humanen Zellen bei der Bindung von *A. baumannii* untersucht werden. Hierfür wurden Endothelzellen zunächst mit TNF α und anschließend mit neutralisierenden Antikörpern gegen α_4 - bzw. β_1 -Integrinen inkubiert. Durch die TNF α -Stimulation wurde eine gleichmäßige und vergleichbare Expression der α_4 - bzw. β_1 -Integrine erreicht. Danach erfolgte die Infektion der humanen Zellen mit *A. baumannii* mit darauffolgender KBE-Bestimmung (**Abbildung 21**).

Zuvor wurde die erfolgreiche Blockierung der Oberflächenrezeptoren fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Im durchgeführten Adhäsionsversuch zeigten sich in der unbehandelten Probe die Ergebnisse der vorangegangenen statischen Adhäsionsversuche: Die Adhäsionsraten von WT und $\Delta ata(c)$ waren gegenüber Δata und $\Delta ata(p)$ stark erhöht. Bei der anti-IgG-Kontrolle zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Die Adhäsion von WT und $\Delta ata(c)$ war doppelt so hoch wie die Adhäsion von Δata und $\Delta ata(p)$, wobei

jeweils WT ($7,3 \pm 1,2 \times 10^6$ Bakterien) und $\Delta ata(c)$ ($7,1 \pm 2,1 \times 10^6$ Bakterien) bzw. Δata ($2,9 \pm 0,4 \times 10^6$ Bakterien) und $\Delta ata(p)$ ($3,4 \pm 0,2 \times 10^6$ Bakterien) ähnliche Adhäsionseffizienzen zeigten. Waren die oberflächenassoziierte α_4 Integrine inhibiert, reduzierte sich die Anzahl adhärenter *ata*-exprimierender *A. baumannii* um ca. 50 %. Dies zeigten die ermittelten KBEs für WT von $2,9 \pm 1,3 \times 10^6$ Bakterien und für $\Delta ata(c)$ von $2,8 \pm 1,7 \times 10^6$ Bakterien. Damit war die Adhäsionseffizienz auf das Niveau von Δata ($3,2 \pm 1,2 \times 10^6$ Bakterien) und $\Delta ata(p)$ ($2,4 \pm 0,7 \times 10^6$ Bakterien) gesunken. Vergleichbare Effekte zeigten sich nach Inhibition von β_1 Integrinen. Auch hier sank die Adhäsionseffizienz von *ata*-exprimierenden *A. baumannii* auf das Niveau von Δata ($2,4 \pm 0,9 \times 10^6$ Bakterien) und $\Delta ata(p)$ ($3,1 \pm 1,2 \times 10^6$ Bakterien).

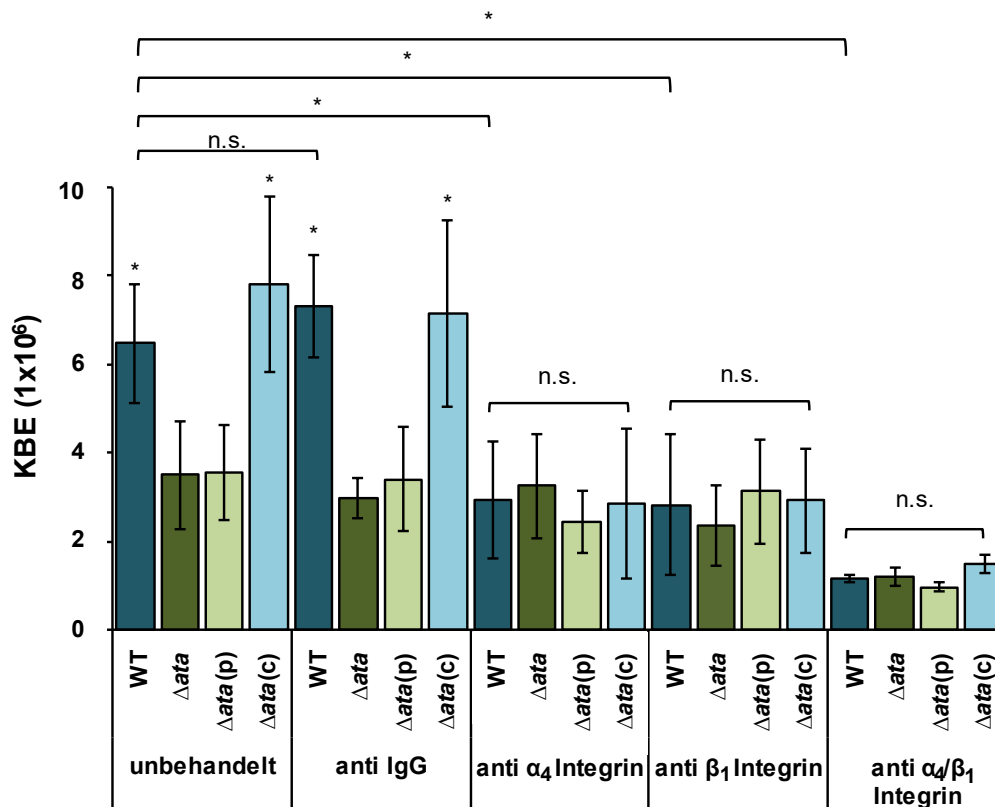


Abbildung 21. Adhäsion von *A. baumannii* an HUVECs nach spezifischer Neutralisierung von oberflächenassoziierten Rezeptormolekülen. Humane Endothelzellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert und anschließend mit TNF α stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen α_4 - und β_1 -Integrine inkubiert. Als Kontrollen dienten eine unbehandelte und eine mit anti-IgG behandelte Probe. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit *A. baumannii* (1×10^8 Bakterien/ml) infiziert. Nicht adhärenente Zellen wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und die infizierten Zellproben durch Zugabe von 2 ml *A. dest.* lysiert. Die Proben wurden verdünnt und auf LB-Agar kultiviert. (*) weist auf einen signifikanten Unterschied hin, wenn nicht gekennzeichnet, bezieht sich (*) auf WT bzw. $\Delta ata(c)$ vs. Δata bzw. $\Delta ata(p)$. (n.s.) weist auf keinen signifikanten Unterschied hin. n = 3 in Doppelbestimmung.

Eine weitere Senkung der Adhäsionsraten wurde nach Blockierung beider Oberflächenrezeptoren (α_4 - und β_1 -Integrine) für alle untersuchten Stämme beobachtet. Die ermittelten KBEs für WT betragen $1,2 \pm 0,09 \times 10^6$ Bakterien und für $\Delta ata(c)$ $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ Bakterien. Die Anzahl adhärenter Bakterien sank im Vergleich zu den anderen drei Versuchsansätzen um ca. 50 % auf $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$ Bakterien für Δata und $0,9 \pm 0,01 \times 10^6$ Bakterien für $\Delta ata(p)$.

Sowohl das oberflächenassoziierte α_4 -Integrin als auch β_1 -Integrin könnte ein potenzieller Ligand für die Adhäsion von *A. baumannii* an humane Endothelzellen darstellen.

3.3.6 Adhäsion von *A. baumannii* an humanes Nabelschnurendothel im *ex vivo* Infektionsmodell

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Ata-vermittelte Adhäsion von *A. baumannii* an humane Endothel- und Epithelzellen *in vitro* untersucht, sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Infektionsbedingungen. Um die gesammelten Erkenntnisse in ihrer Komplexität auf die gegebenen Bedingungen im menschlichen Organismus noch besser übertragen zu können, wurden im nächsten Schritt Adhäsionsversuche im *ex vivo* Infektionsmodell mit humanen Nabelschnurvenen etabliert.

Um möglichst vergleichbare Infektionsbedingungen beim Versuchsablauf zu erhalten, wurden zunächst die Struktur der Nabelschnurvene und die Strömungsverhältnisse in der Vene während einer Infektion untersucht. Dies diente zur Sicherstellung, dass die Venenstruktur über den gesamten Bereich gleichmäßig und die Durchmesser der Venen in den Einzelversuchen vergleichbar waren. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Scherkräfte während der Infektionsdauer konstant waren. Außerdem wurde mit der Ultraschall- bzw. Doppler-Analysen das Strömungsverhalten der Bakteriensuspension untersucht.

Für die Strukturanalyse wurden Nabelschnüre stichprobenartig ausgewählt und die Vene mit einem röntgendichten Kontrastmittel unter konstantem Druck befüllt. Danach erfolgte die bildliche Darstellung der Venenstruktur mittels mikro-CT (**Abbildung 22 A**). Zur Analyse des Flussverhaltens in der Nabelschnurvene wurde eine 10%ige Bariumsulfat-Lösung unter einem konstanten Fluss von

0,2 ml/min durch die Vene gespült und das Strömungsverhalten dieser Lösung unter Verwendung eines Ultraschallgerätes aufgezeichnet (**Abbildung 22 B**).

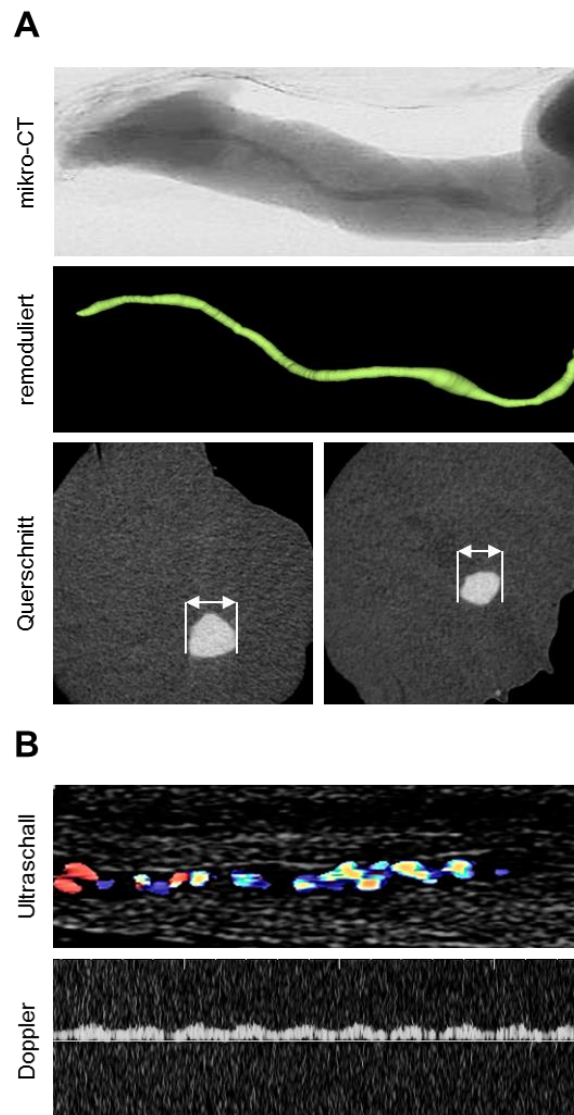


Abbildung 22. Struktur- und Strömungsanalyse in der Nabelschnurvene. (A) Für mikro-CT-Untersuchungen wurden Nabelschnurvenen unter konstanten Druck von 10-15 mmHg mit einem röntgendichten Kontrastmittel befüllt. Im Anschluss wurde die Venenstruktur mittels mikro-CT aufgezeichnet. Die dargestellten Querschnitte sind exemplarisch und weisen einen Durchmesser von 1,3 mm (links) bzw. 0,9 mm (rechts) auf. **(B)** Für Ultraschall-Doppler-Analysen wurden die Venen der Nabelschnüre unter konstanten Flussbedingungen (0,2 ml/min) mit Barium-Sulfat (10 % [w/v] in PBS) durchspült und die Strömungsmuster mittels eines linearen Ultraschallkopfes (L 5-12 MHz) und dem Phillips Envisor Ultraschall Gerät aufgezeichnet.

Im mikro-CT zeigte sich eine perforationsfreie röntgendichte Struktur über die gesamte Länge der untersuchten Nabelschnur, die eindeutig als Venenstruktur gedeutet werden konnte (**Abbildung 22 A**). Über die computergestützte Remodulierung der gewonnenen Daten wurde eine gleichförmige Venenstruktur nachgewiesen. Weiterhin zeigten sich im Querschnitt der untersuchten Nabelschnurvenen vergleichbare Werte (1,3 mm bzw. 0,9 mm) in den hier dargestellten Proben.

Über die Gesamtheit der untersuchten Nabelschnurproben ergab sich ein mittlerer Durchmesser der Nabelschnurvenen von $3,9 \pm 0,6$ mm. Hieraus resultierten mittlere Scherkräfte bei einem konstanten Fluss von $0,2$ ml/min von $0,49 \pm 0,19$ dyn/cm² (**Abbildung 23**).

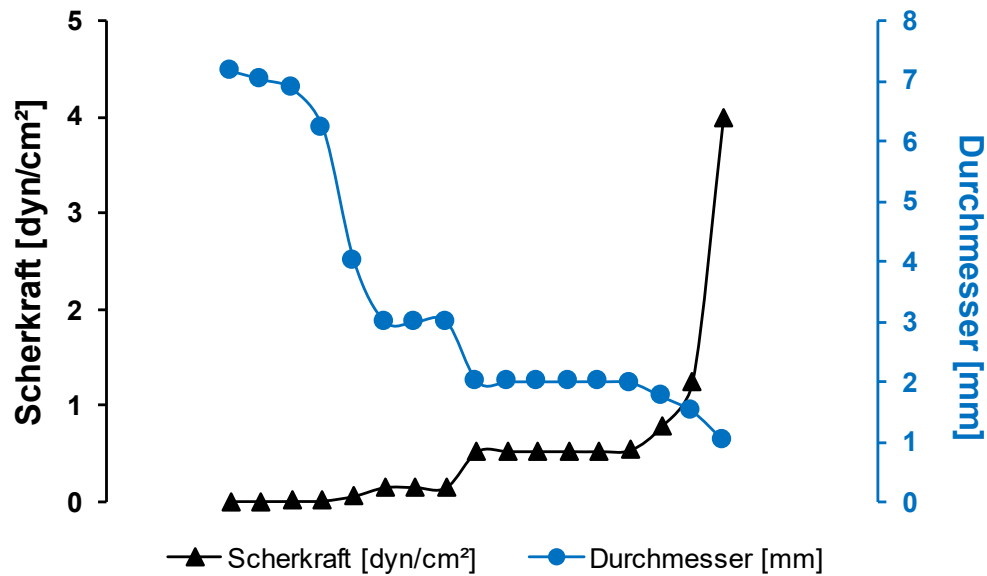


Abbildung 23. Bestimmung der Venendurchmesser und der damit verbundenen Scherkräfte in der Nabelschnurvene. Entsprechend den Daten aus der mikro-CT-Analyse wurden die Durchmesser der einzelnen Nabelschnurvenen bestimmt (blau). Die hieraus resultierenden Scherkräfte wurden über Formel 4 ermittelt. Die Symbole ▲ und ● kennzeichnen die jeweils einzelnen Proben.

In der Ultraschall- und Doppler-Analyse zeigte sich eine turbulenzarme und somit fast laminare Strömung (**Abbildung 22 B**). Dies ist zum einen durch die Farbcodierung in der Ultraschallanalyse und zum anderen über gleichmäßige Verteilung des Dopplersignales erkennbar.

Die gewonnenen Daten zur Venenstruktur und zum Strömungsverhalten in der Vene waren reproduzierbar und untereinander vergleichbar, sodass die Adhäsionsversuche mit *A. baumannii* im *ex vivo* Nabelschnurmodell durchgeführt werden konnten (**Abbildung 24**).

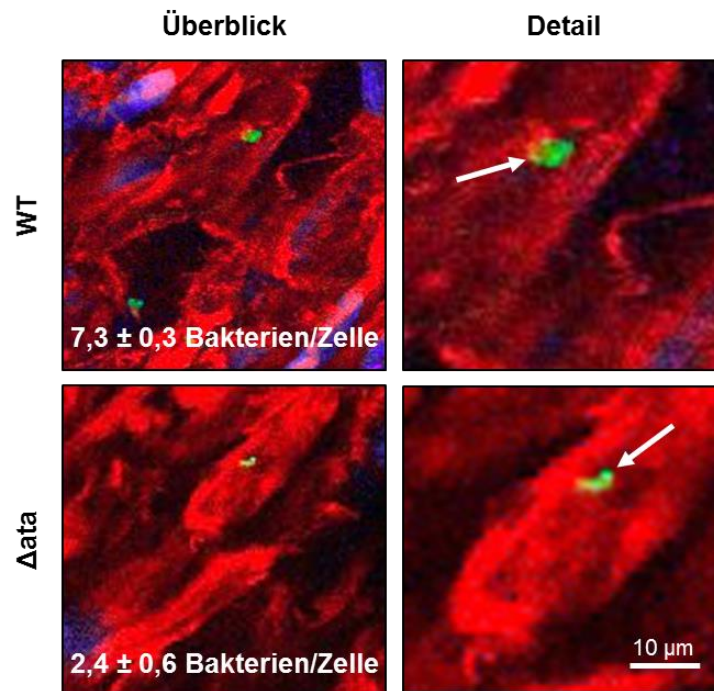


Abbildung 24. Adhäsionsanalyse von *A. baumannii* im *ex vivo* Infektionsmodell. Die gespülte Nabelschnurvene wurde mit CFSE-gefärbten *A. baumannii* (grün) infiziert (Flussrate von 0,2 ml/min für 1 h). Nicht-adhärenente Bakterien wurden durch erneutes Spülen der Vene mit Endothelzellmedium gelöst. Für die Mikroskopie wurde die Vene vom umliegenden Gewebe isoliert, in PFA fixiert und mit TRITC-Phalloidin (rot) bzw. DAPI (blau) gefärbt. Die Adhäsion der Bakterien wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Bildausschnitte sind exemplarisch. Pfeile deuten auf adhärenente, teils Agglomerat-bildende, *A. baumannii*. Maßstab: 10 μ m

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des infizierten Nabelschnurvenenendothels waren adhärenente *A. baumannii* durch ihre CFSE-Markierung gut nachweisbar (**Abbildung 24**). Es waren deutlich mehr WT-Bakterien adhärenent als für Δ ata beobachtet wurde. Zudem zeigte sich, dass die Bakterien vermehrt in Agglomeraten vorliegen und sich im Gegensatz zur *in vitro* Analyse nicht gleichmäßig als Einzelzellen verteilen. Die mikroskopischen Beobachtungen wurden mittels qRT-PCR bestätigt: Hier zeigten sich durchschnittlich doppelt so viele adhärenente Bakterien nach einer WT-Infektion als bei einer Δ ata-Behandlung. Für WT wurden $7,3 \pm 0,3$ Bakterien/Zelle und für Δ ata $2,4 \pm 0,6$ Bakterien/Zelle nachgewiesen.

3.3.7 Vergleich der Adhäsion von *A. baumannii* an Endothel- bzw. Epithelzellen *in vitro* mit Nabelschnurvenenendothel *ex vivo*

In den zuvor durchgeführten Versuchen zur Adhäsion von *A. baumannii* an humane Zellen wurde gezeigt, dass die Bakterien mit humanen Endothel- und

Epithelzellen Ata-abhängig interagieren. In jedem Versuch war die Anzahl adhärenter Bakterien bei *ata*-exprimierenden *A. baumannii* (WT und $\Delta ata(c)$) höher als bei den Vergleichsgruppen (Δata und $\Delta ata(p)$). In der Gegenüberstellung der einzelnen Adhäsionsraten von *A. baumannii* an die verschiedenen humanen Zellen unter den verschiedenen Infektionsbedingungen (statisch vs. dynamisch und *in vitro* vs. *ex vivo*) zeigten sich folgende Beobachtungen (**Tabelle 24**): Unter statischen Infektionsbedingungen war die Adhärenz von *A. baumannii* an Endothelzellen (HUVEC, HMEC-1 und HEMC) höher als an Epithelzellen (A549, HeLa und HepG2). Demgegenüber war die Adhäsion der Bakterien an humane Endothel- bzw. Epithelzellen bei dynamischen Infektionsbedingungen untereinander vergleichbar. Eine Ausnahme bildete hier die Adhärenz an A549-Zellen, die im Vergleich zu den anderen Zelltypen deutlich höher war und wohl-möglich mit der unterschiedlichen Ausprägung membranständiger Moleküle, die für die bakterielle Adhäsion wichtig sind, zu begründen war. Im Allgemeinen sinkt jedoch die Adhäsionsrate von *A. baumannii* an die humanen Zellen von statischen zu dynamischen Infektionsbedingungen um durchschnittlich 80 %. Unter *ex vivo* Infektionsbedingungen war die Adhäsionsrate von *A. baumannii* stets höher als nach der Infektion von HUVECs unter *in vitro* Bedingungen (Anstieg um 65 %). Besonders deutlich war dies im Vergleich der dynamischen *in vitro* Infektion und der Nabelschnurinfektion, wo die Adhäsionsrate um 508 % anstieg. Weiterhin zeigte das *ex vivo* Infektionsmodell im Vergleich zu den *in vitro* Infektionen eine Zunahme der Adhäsion, die vermuten ließ, dass die Interaktion zwischen *A. baumannii* und dem menschlichen Gewebe (Nabelschnurvene) deutlich stärker war als durch die *in vitro* Ansätze zu vermuten.

Tabelle 24. Vergleich der Adhäsionsraten von *A. baumannii* WT an humane Endothel- bzw. Epithelzellen und an Nabelschnurvenenendothel.

		Bakterien/Zelle		
Zellart	statisch		dynamisch	
<i>in vitro</i>	HUVEC	4,4 ± 0,3	- 72 %	1,2 ± 0,7
	HMEC-1	3,7 ± 0,8	- 83 %	0,6 ± 0,3
	HDMEC	10 ± 3,9	- 87 %	1,3 ± 0,9
	A549	1,7 ± 0,3	+ 170 %	4,6 ± 2,3
	HeLa	5,3 ± 1,9	- 77 %	1,2 ± 0,3
	HepG-2	1,7 ± 0,6	- 82 %	0,3 ± 0,1
		HUVEC		Nabelschnur
<i>ex vivo</i>	statisch	4,4 ± 0,3	+ 65 %	7,3 ± 0,3
	dynamisch	1,2 ± 0,7	+ 508 %	

3.4 Ata-vermittelte Invasion in humane Endothel- und Epithelzellen

Nachdem die Adhäsionsfähigkeit von *A. baumannii* an humane Endothel- und Epithelzellen untersucht wurde, sollte im weiteren Verlauf die Ata-abhängige Invasion der Bakterien in die Wirtszelle analysiert werden. Obwohl *A. baumannii* typischerweise nicht als intrazellulär vorliegendes Bakterium beschrieben wird, zeigte eine vorangegangenen Studie, dass die Bakterien intrazellulär in Epithelzellen vorliegen können [79]. Genaue Kenntnisse darüber, welche Mechanismen bzw. welche Proteine bei der Invasion von *A. baumannii* in die humanen Wirtszellen beteiligt sind, fehlen jedoch.

Um eine Ata-abhängige Invasion der Bakterien in Endothel- und Epithelzellen zu untersuchen, wurde ein Zellkulturmodell etabliert. Hierzu wurden die entsprechenden Wirtszellen in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* über einen Zeitraum von 4 h inkubiert. Nicht-adhärenente Bakterien wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und extrazelluläre *A. baumannii* durch eine zweistündige Inkubation mit Gentamicin oder Colistin abgetötet. Nach der Lyse der humanen Zellen erfolgte die KBE-Bestimmung der intrazellulär vorliegenden *A. baumannii* (**Abbildung 25**). Für WT wurden hierbei folgende Ergebnisse bestimmt: HUVEC, $1,7 \pm 0,47 \times 10^4$ Bakterien und für A549, $2,8 \pm 0,56 \times 10^4$ Bakterien. Dies entsprach einem prozentualen Anteil der initialen Bakterienzahl von 3,08 % für HUVECs bzw. 2,9 % für A549. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem Kontrollstamm $\Delta ata(c)$ erzielt: Die Zahl der invasiven *A. baumannii* für HUVECs war $2,6 \pm 0,45 \times 10^4$ Bakterien und für A549 $2,1 \pm 0,55 \times 10^4$ Bakterien.

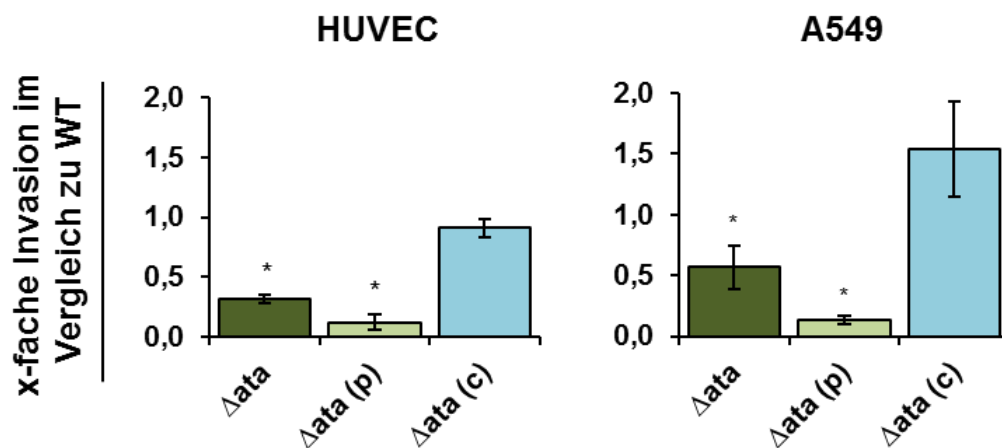


Abbildung 25: Ata-vermittelte Invasion von *A. baumannii* in humane Endothel- und Epithelzellen. Humane Endothel- oder Epithelzellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 200) infiziert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben mit 2 ml einer Gentamicin- (500 $\mu\text{g/ml}$ für WT und Δata) bzw. Colistin- (10 $\mu\text{g/ml}$ für $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$) Lösung inkubiert. Die Proben wurden erneut gewaschen, lysiert und auf LB-Agar kultiviert. Zur Auswertung wurde die Invasionseffizienz von WT als 100 % (1) gesetzt. Sterne (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede der Kontrollstämme gegenüber dem WT ($p < 0,05$). $n = 3$ in Doppelbestimmung.

Im Vergleich zu WT wurden für die Kontrollstämmen Δata und $\Delta ata(p)$ geringere Keimzahlen bestimmt. Diese betragen $4,6 \pm 0,97 \times 10^3$ Bakterien (HUVEC) bzw. $1,9 \pm 0,69 \times 10^4$ Bakterien (A549) für Δata und $3,5 \pm 2,2 \times 10^3$ Bakterien (HUVEC) bzw. $1,8 \pm 0,50 \times 10^3$ Bakterien (A549) für $\Delta ata(p)$. Der Nachweis der intrazellulär vorliegenden Bakterien zeigt eindeutig auf, dass *A. baumannii* in Wirtszellen ein-

wandern kann. Die Unterschiede der Invasionsraten zwischen *ata*-exprimierenden und nicht-*ata*-exprimierenden Stämmen deuteten außerdem darauf hin, dass der Invasionsmechanismus von der Adhäsionsrate der Bakterien an die Wirtszelle abhängig war. Die Anzahl der intrazellulär vorliegenden *A. baumannii* bei HUVECs war für die Kontrollstämme Δata und $\Delta ata(p)$ um 70 % bzw. 90 % gegenüber dem WT reduziert. Wohingegen die Invasion von $\Delta ata(c)$ mit dem des WTs vergleichbar ist. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach der Infektion der A549-Zellen: Für Δata wurde eine Reduktion der Invasion von 45 % und für $\Delta ata(p)$ von 85 % beobachtet. Auch hier zeigte sich ein vergleichbarer Phänotyp von $\Delta ata(c)$ gegenüber WT, sodass die Invasionseffizienz nicht beeinflusst war. Die Ergebnisse zur Invasion von *A. baumannii* in humane Endothel- und Epithelzellen lassen darauf schließen, dass dieser in die Wirtszellen eindringen kann und dass der Mechanismus der Invasion zumindest in Teilen vom trimeren Autotransporter Adhäsine Ata abhängig war, da dieser die bakterielle Adhäsion an die Wirtszelle beeinflusst.

3.5 Ata-vermittelte Modulation der Wirtszellantwort durch *A. baumannii*

Durch die Infektionsversuche von *A. baumannii* mit humanen Endothel- bzw. Epithelzellen wurde gezeigt, dass Ata eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion der Bakterien und sekundär bei der Invasion zukommt. Dieser Effekt war bei Endothelzellen besonders deutlich. Deshalb wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich die Ata-abhängige Interaktion von *A. baumannii* mit Endothelzellen (HUVECs) auf deren intrazelluläre Signalwege und daraus ableitend auf deren spezifische Wirtszellantwort auswirkt.

3.5.1 Nachweis der Segregation von IL-6 und IL-8 nach der Infektion von HUVECs mit *A. baumannii*

Die Modulation der Wirtszellantwort wurde zunächst durch die Quantifizierung von freigesetzten inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen untersucht. Hierzu wurden HUVECs in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 1) infiziert. Nach einem frühen (4 h) und einem späten (14 h) Zeitpunkt der

Infektion wurden die HUVECs hinsichtlich der Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine mittels ELISA analysiert (**Abbildung 26**). Es zeigte sich eine spezifische Induktion verschiedener Zytokine bzw. Chemokine sowohl nach 4 h als auch nach 14 h Inkubation. Im frühen Infektionsstadium (4 h) war eine gegenüber der uninfizierten Kontrolle signifikante Induktion von IL-8 und MIP-1 α zu erkennen, wobei die relative Induktion von IL-8 mit $20,33 \pm 1,36$ für WT und $4,48 \pm 2,05$ für Δata deutlich höher war als für MIP-1 α ($2,11 \pm 0,88$ für WT und $3,55 \pm 3,25$ für Δata).

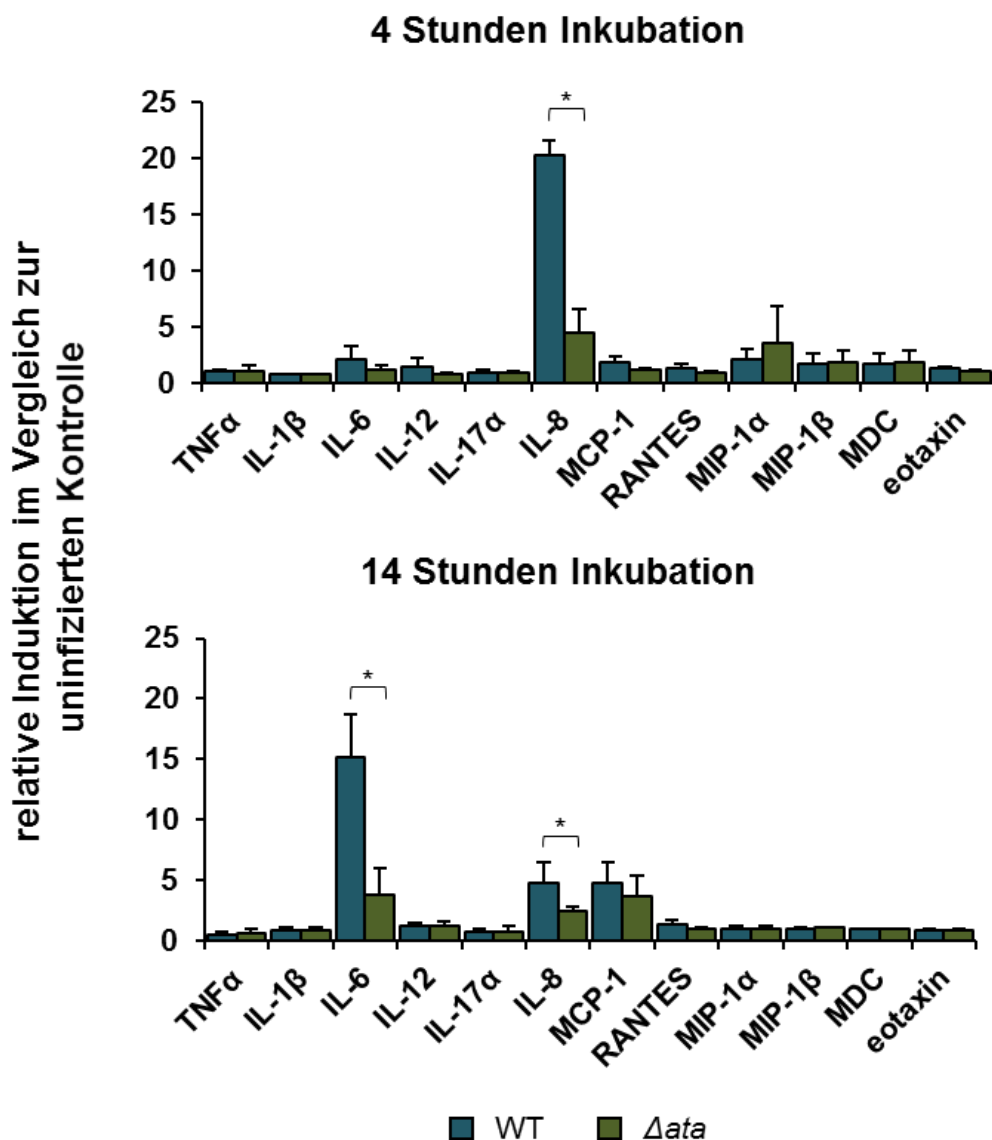


Abbildung 26. Ata-abhängige Segregation von IL-6 und IL-8 in HUVECs. HUVECs wurden in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 1) inkubiert. Die Zellen wurden danach aus den Kavitäten gelöst, mittels Ultraschalles aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung der relativen Zytokin- bzw. Chemokinmenge verwendet. (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede des Kontrollstammes Δata gegenüber WT ($p < 0,05$). $n = 3$ in Doppelbestimmung.

Alle anderen untersuchten Zytokine bzw. Chemokine zeigten nach 4 h Inkubation einen im Vergleich zu IL-8 und MIP-1 α geringen Anstieg. Nach 14-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit den jeweiligen *A. baumannii* Stämmen zeigte sich wiederum eine spezifische Induktion verschiedener Zytokine und Chemokine. So wurde eine gegenüber der unifizierten Kontrolle signifikante Induktion von IL-6, IL-8 und MCP-1 beobachtet. Für IL-6 ergaben sich eine relative Induktion für WT von $15,12 \pm 3,51$ und für Δata von $3,77 \pm 2,27$. Dabei waren die Unterschiede in der IL-6-Induktion zwischen WT und Δata statistisch signifikant. Auch für IL-8 wurden signifikante Unterschiede ermittelt. Für WT betrug die relative Induktion $4,82 \pm 1,73$ und für Δata $2,46 \pm 0,34$, wobei die Werte gegenüber der 4-stündigen Inkubation deutlich niedriger waren. Für MCP-1 wurde kein signifikanter Unterschied in der relativen Induktion zwischen WT ($4,79 \pm 1,65$) und Δata ($3,65 \pm 1,77$) beobachtet.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzliche Infektionsversuche durchgeführt, um die absolute IL-6- bzw. IL-8-Menge mittels ELISA zu bestimmen. Dies erfolgte, indem die Endothelzellen mit den verschiedenen *A. baumannii*-Stämmen (WT, Δata , $\Delta ata(p)$ und $\Delta ata(c)$) inkubiert wurden. Die Infektion der HUVECs erfolgte über einen Zeitraum von 14 h, wobei Proben in zuvor bestimmten Zeitintervallen zur Quantifizierung der Zytokine entnommen wurden (**Abbildung 27**). Sowohl für IL-6 als auch für IL-8 zeigte sich eine Ata- und Zeit-abhängige Induktion, die mit den zuvor ermittelten Ergebnissen vergleichbar ist. Für IL-6 war eine stetige Zunahme der Zytokinmenge bis zu einem Zeitpunkt von 14 h mit einem Maximum von $1.158,57 \pm 106,19$ pg/ml für WT bzw. $1.551,96 \pm 80,08$ pg/ml für $\Delta ata(c)$ nachweisbar. Im Vergleich hierzu war die Menge an IL-6 bei HUVECs, die mit *ata* deletierten *A. baumannii*-Stämmen infiziert wurden, signifikant geringer. Für Δata wurde nach 14 h ein Wert von $140,02 \pm 14,85$ pg/ml und für $\Delta ata(p)$ von $64,75 \pm 30,91$ pg/ml ermittelt. Auch für IL-8 zeigte sich wie bei den Versuchen zuvor eine stetige Zunahme der IL-8-Menge über einen Zeitraum von 2 h bis 8 h und einem maximalen Wert von $2.315,19 \pm 2,08$ pg/ml für WT bzw. von $3.549,63 \pm 44,64$ pg/ml für $\Delta ata(c)$ nach 8 h.

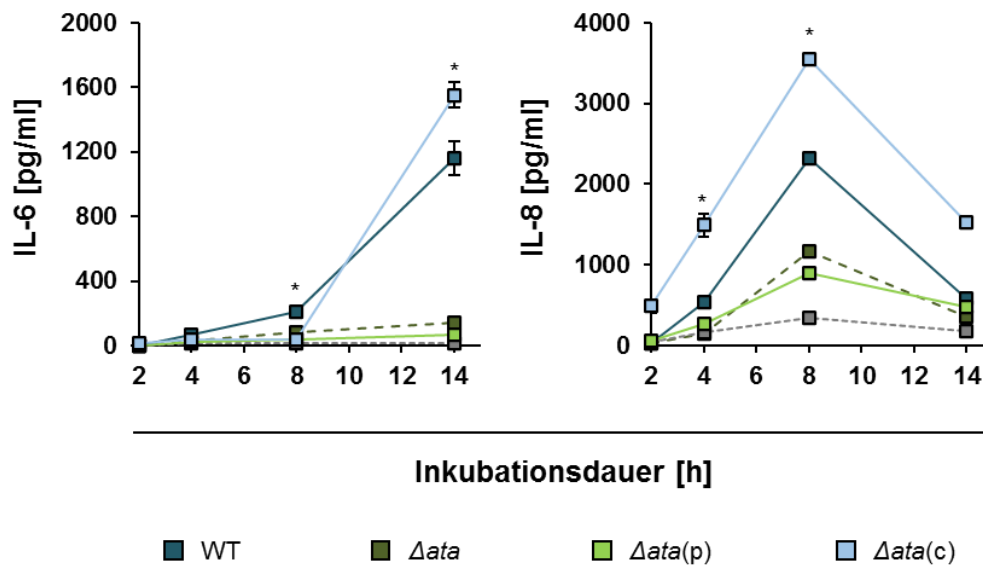


Abbildung 27. Ata-vermittelte zeitabhängige Induktion von IL-6 und IL-8 in HUVECs durch die Infektion mit *A. baumannii*. Endothelzellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* (MOI 1) infiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Proben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand zur Quantifizierung von IL-6 und IL-8 verwendet. (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen WT und Δata bzw. zwischen $\Delta ata(c)$ und $\Delta ata(p)$ ($p < 0,05$). $n = 3$ in Doppelbestimmung.

Demgegenüber waren die sezernierten IL-8-Menge von HUVECs, die mit Ata-defizienten Bakterien infiziert worden waren, signifikant geringer (Δata $1.166,41 \pm 18,24$ pg/ml und für $\Delta ata(p)$ $898,47 \pm 79,29$ pg/ml). Nach 8 h fielen die IL-8-Mengen wieder ab und erreichten nach 14 h einen Wert, der mit den IL-8-Konzentrationen nach 4 h vergleichbar war. Somit konnte auch für IL-8 eine Ata- und Zeit-abhängige Induktion beobachtet werden.

3.5.2 Rekrutierung von Immunzellen *in vitro* und *in vivo* durch die Infektion von HUVECs und *G. mellonella* mit *A. baumannii*

Nachdem gezeigt wurde, dass *A. baumannii* über einen Ata-abhängigen Mechanismus die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 in HUVECs induziert, war es von großem Interesse, welche Auswirkungen die Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine hat. Sowohl IL-6 als auch IL-8 haben diverse Funktionen im menschlichen Körper, sind aber beide grundsätzlich an der Aktivierung des Immunsystems beteiligt [194, 195]. Zur *in vitro* Analyse wurde aus diesem Grund ein Mo-

nozyten-Transmigrations-Assay etabliert, um die Rekrutierung dieser Immunzellen, die vor allem nach bakteriellen Infektionen aktiviert werden [196], zu untersuchen (**Abbildung 28**).

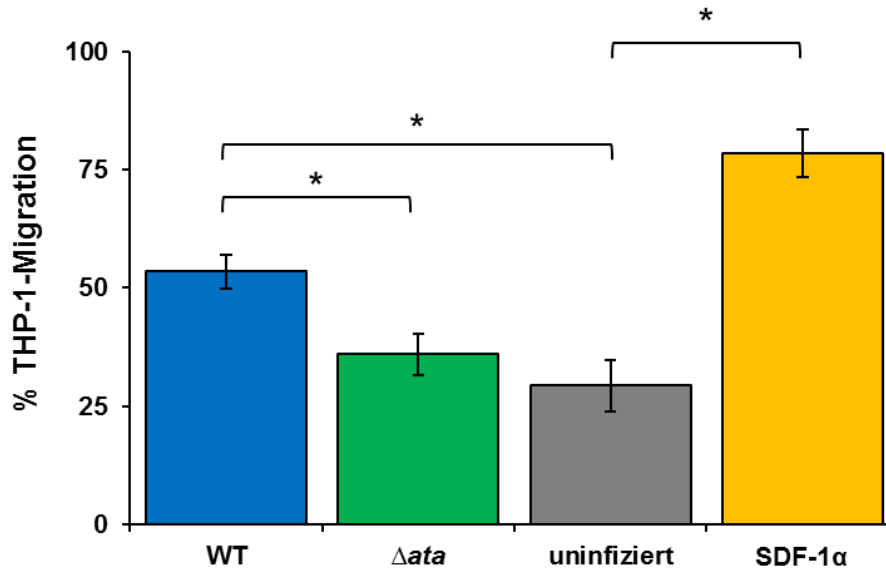


Abbildung 28. Die Infektion von HUVECs mit *A. baumannii* bewirkt eine Ata-vermittelte Migration von humanen Monozyten. HUVECs wurden mit *A. baumannii*-Stämmen infiziert (MOI 1) und der Überstand nach 4 bzw. 14 h steril filtriert. THP-1-Zellen wurden zu je 5×10^4 Zellen in die obere Transwellkammer pipettiert und in die untere Transwellkammer die Proben der infizierten bzw. uninfizierten HUVECs bzw. eine Lösung von 100 ng/ml SDF-1 α zu je 500 μ l. Danach erfolgte die Inkubation der Proben über einen Zeitraum von 16 h. Im Anschluss wurden diese in ein Reaktionsgefäß überführt und die migrierten THP-1-Zellen mit Trypan-Blau gefärbt. Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch bestimmt. (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den gekennzeichneten Proben ($p < 0,05$). $n = 3$ in Doppelbestimmung.

Hierfür wurden humane Monozyten (THP-1) verwendet. Für die Monozyten-Attraktion wurde der Überstand von zuvor mit *A. baumannii* infizierten oder uninfizierten (Negativkontrolle) HUVECs verwendet. Als Positivkontrolle diente SDF-1 α in einer Konzentration von 100 ng/ml. Zur Untersuchung der Transmigration wurden THP-1-Zellen in den oberen Bereich eines Zellkulturplatteneinsatzes mit porösem Boden (Porengröße: 8 μ m) überführt und in eine Zellkulturschale (24 Kavitäten), in welche zuvor die entsprechenden Überstände bzw. die Positivkontrolle vorgelegt wurde, platziert. Nach Inkubation der Proben über einen Zeitraum von 16 h wurden die THP-1-Zellen, die durch die Membranporen migriert waren, durch Trypan-Blau angefärbt und unter Verwendung eines Lichtmikroskops gezählt (**Abbildung 28**). Im Versuch zeigte sich eine THP-1-Migration für den Überstand von WT-infizierten HUVECs von 53 ± 4 %. Wurden die Endothelzellen zuvor mit Δ ata infiziert, so betrug die THP-1-Migration 36 ± 4 %. Dieser Unterschied war im Vergleich zu WT behandelten HUVECs signifikant niedriger und auf dem Niveau der uninfizierten Probe mit einer THP-1-Migration von 29 ± 6 %. Dies lässt

darauf schließen, dass durch die Ata-vermittelte Infektion der HUVECs spezifische Signalstoffe, z.B. die zuvor detektierten Interleukine 6 und 8, von der Wirtszelle sezerniert werden und somit zu einer Ata-abhängigen Migration der THP-1-Zellen führen. Die Positivkontrolle (Chemokin SDF-1 α) zeigte die stärkste Migration der THP-1-Zellen mit einem Wert von 79 ± 5 %.

Um diese Beobachtungen auf ein *in vivo* Modell zu übertragen, wurde die Aktivierung von Hämozyten in den Larven von *G. mellonella* untersucht. Dabei stellen Hämozyten einen vergleichbaren Zelltyp zu den Phagozyten dar, indem sie in ihrer Funktion in den Larven der von THP-1-Zellen im Menschen gleichen [181]. Um die Aktivierung dieser Zellen zu untersuchen, wurden subletale Dosen der entsprechenden *A. baumannii*-Stämme in die Larve injiziert. Daraufhin wurde sowohl das Überleben der Bakterien in der Larve als auch die Anzahl aktivierter Hämozyten quantifiziert (**Abbildung 29**). Im Versuch zeigte sich eine starke Abhängigkeit zwischen dem Überleben der Bakterien und dem Vorhandensein von Ata (**Abbildung 29 A**). Demnach sank bei Δata die Überlebensrate bereits nach 24 h auf einen Wert von $4,98 \pm 3,02$ %. Demgegenüber reduzierte sich der Anteil überlebender WT-Bakterien auf $52,05 \pm 22,46$ %. Im weiteren Verlauf näherten sich die Überlebensraten beider *A. baumannii*-Stämme an. So betrug der Anteil vitaler Bakterien nach 48 h für WT $2,73 \pm 2,29$ % und für Δata $0,16 \pm 0,11$ % und nach 72 h für WT $3,44 \pm 3,57$ % und für Δata $0,11 \pm 0,11$ %. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Vorhandensein des trimeren Autotransporters zumindest in einem frühen Stadium der Infektion einen Überlebensvorteil für *A. baumannii* schafft. Um im nächsten Schritt zu untersuchen, inwieweit sich die Infektion der Larven mit *A. baumannii* auf die Aktivierung des larvalen Immunsystems auswirkt, wurde die Hämozytenzahl infizierter *G. mellonella*-Larven bestimmt (**Abbildung 29 B**). Auch hier stellten sich signifikante Unterschiede zwischen WT- und Δata -infizierten Larven dar. Für beide Gruppen zeigte sich zunächst eine Zunahme der Hämozytenzahl nach 24 h, die über einen Zeitraum bis 48 h annähernd konstant war. Danach sank die Anzahl der Hämozyten bis zu einem Zeitpunkt von 72 h deutlich. Im Vergleich zwischen WT und Δata war die Hämozytenzahl bei WT stets höher. So wurden nach einer Inkubation von 24 h bzw. 48 h bei WT $3,2 \pm 0,32 \times 10^4$ bzw. $3,1 \pm 0,69 \times 10^4$ Hämozyten und bei Δata $1,2 \pm 0,16 \times 10^4$ bzw. $8,8 \pm 5,1 \times 10^3$ Hämozyten gezählt.

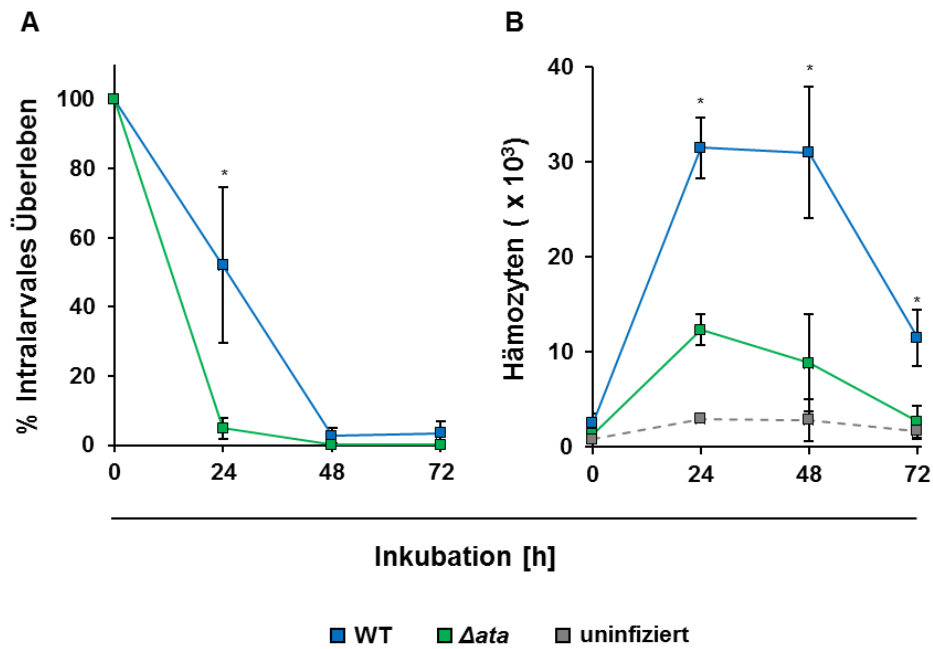


Abbildung 29. Das Überleben von *A. baumannii* und die Aktivierung larvaler Immunzellen ist abhängig von *Ata*. Es wurden jeweils subletale Dosen von je 10 μ l einer *A. baumannii*-Suspensionen (1×10^7 Bakterien/ml) in die Larve injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Larven homogenisiert und die Keimzahl (A) bzw. die Anzahl der Hämozyten (B) bestimmt. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen WT und Δata . n = 3 in 3-facher Bestimmung.

Nach 72 h sank die Hämozytenzahl bei beiden Gruppen auf einen Wert von $1,2 \pm 0,29 \times 10^4$ Hämozyten (WT) und $2,7 \pm 1,6 \times 10^3$ Hämozyten (Δata). Für die uninfizierte Kontrolle wurden über den gesamten Versuchszeitraum konstante Werte beobachtet ($8,3 \times 10^2$ bis 3×10^3 Hämozyten). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Infektion der Larven zu einer Stimulierung des Immunsystems führt und dass diese Stimulierung in Abhängigkeit von *Ata* verschieden stark ausgeprägt ist. Dies ist analog zu den Infektionsversuchen mit Endothelzellen, bei denen die Infektion zu einer Stimulierung der Immunantwort im Sinne der IL-6- und IL-8-Freisetzung *Ata*-abhängig war. Beide Versuchsansätze weisen auf eine wichtige Rolle des trimeren Autotransporters bei der Aktivierung der Immunantwort in der Wirtszelle hin.

3.6 *Ata*-vermittelte Resistenz gegenüber dem humanen Komplement-System

Im weiteren Verlauf wurde die die Aktivierung des menschlichen Komplementsystems untersucht. Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immun-

systems und umfasst eine Reihe von verschiedenen frei löslichen oder oberflächengebundenen Plasmaproteinen, die sich im Zuge einer Immunantwort auf der Oberfläche von Mikroorganismen anlagern und zur Opsonisierung der Pathogenen führen [87, 183, 185]. Die Aktivierung des Komplement-Systems kann im Wesentlichen über drei verschiedene Wege erfolgen: dem klassischen Weg, dem Lektin-Weg und dem alternativen Weg [183]. Es stellt somit ein bedeutsames und effektives erstes Abwehrsystem dar, welches den menschlichen Körper vor ernsthaften Infektionen mit pathogenen Bakterien schützen soll.

Frühere Studien zeigten, dass *A. baumannii* eine Resistenz gegenüber dem Komplementsystem aufweist [87, 197, 198]. Molekulare Mechanismen hierzu sind jedoch weitestgehend unbekannt. Da Ata die Adhäsion von *A. baumannii* an abiotische und biotische Faktoren vermittelt, wurde vermutet, dass Ata auch Bestandteile des Komplement-Systems binden kann und somit zu einer Komplementresistenz führen könnte.

Um dieses zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumsversuche von *A. baumannii* in verschiedenen Konzentrationen (0 % bis 100 %) von normalem humanem Serum (NHS) durchgeführt. Die Bakterien wurden zu je 1×10^6 Bakterien pro Versuchsansatz in jeweils 200 μ l NHS über einen Zeitraum von 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der KBE auf LB-Agar. Als Negativkontrolle diente ein Versuchsansatz, in welchem die Bakterien in PBS inkubiert wurden (**Abbildung 30**). Im Versuch zeigte sich ein von der verwendeten Serumkonzentration abhängiges Wachstum beider Bakterienstämme (WT und Δ ata). Für beide Stämme wurde zunächst ein Wachstumsanstieg bei einer NHS-Konzentration von 10 % beobachtet (WT: $566,5 \pm 172,6$ % und Δ ata: $626,0 \pm 232,7$ %). Mit steigender NHS-Konzentration zeigte sich im Verlauf eine Reduktion des bakteriellen Wachstums. So sank dieses bei 20 % NHS für WT auf einen Wert von $266,5 \pm 151,2$ % und für Δ ata auf einen Wert von $168,3 \pm 151,5$ %. Geringe NHS-Mengen scheinen das Wachstum von *A. baumannii* zu fördern. Ab einer NHS-Konzentration von > 20 % sank das bakterielle Wachstum deutlich, wobei dieser Effekt bei Δ ata signifikant stärker ausgeprägt war als bei WT. So war das Wachstum von WT bei 30 % NHS nicht beeinflusst ($96,1 \pm 18,1$ %), wohingegen das Wachstum von Δ ata bereits auf einen Wert von $11,0 \pm 8,5$ %

sank. Mit zunehmender NHS-Menge im Versuchsansatz nahm auch das Wachstum von WT ab und betrug bei 40 % NHS $8,9 \pm 1,2$ % (im Vergleich Δata $1,0 \pm 0,7$ %). Mit weiter steigenden NHS-Konzentrationen glichen sich die Werte für das Wachstum von WT und Δata an, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kontrollstämmen ab 50 % NHS beobachtet werden konnten.

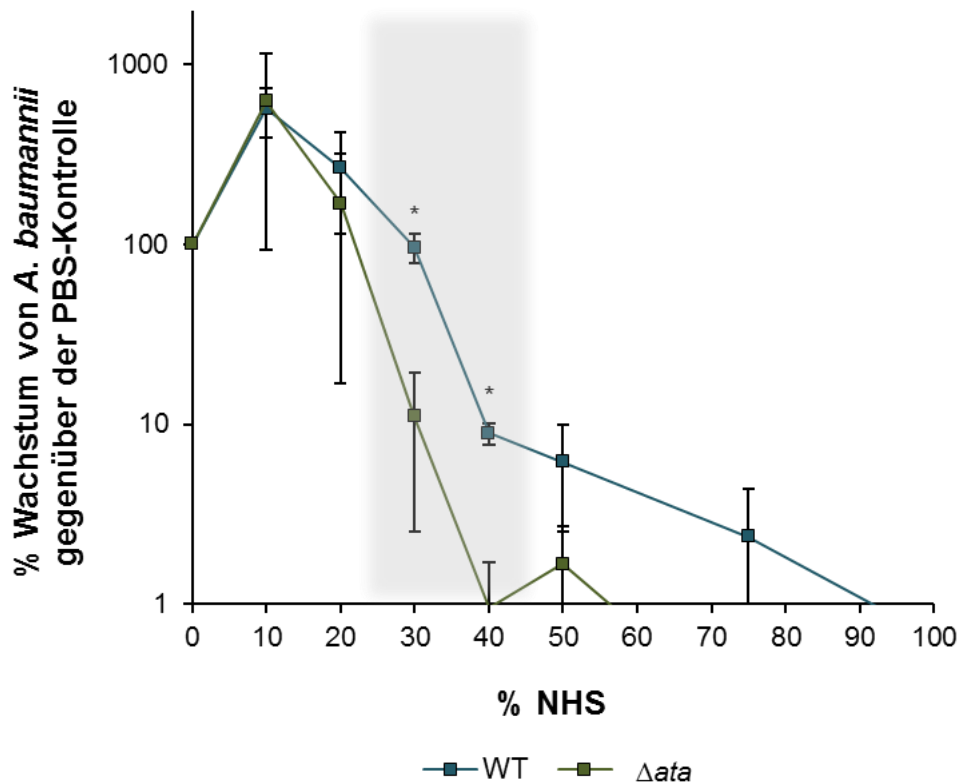


Abbildung 30. Das Vorhandensein von *Ata* führt zur Resistenz gegenüber normalem humanem Serum. Die verschiedenen NHS-Lösungen wurden zu je 200 μ l überführt und jeweils 10 μ l der Bakteriensuspension (1×10^6 Bakterien/Versuchsansatz) zugegeben. Die Proben wurden im Anschluss für 2 h inkubiert und daraufhin die KBE bestimmt. Der grau markierte Bereich in der Grafik deutet auf die NHS-Konzentrationen hin, bei dem die größten Unterschiede im Wachstum von WT und Δata beobachtet wurden. (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen WT und Δata ($p < 0,05$). $n = 4$ in Doppelbestimmung.

Zusammenfassend war zu erkennen, dass bei NHS-Konzentrationen von 20 % bis 40 % NHS deutliche Wachstumsunterschiede zwischen WT und Δata nachweisbar waren, die eindeutig darauf hinweisen, dass das Vorhandensein von *Ata* einen Fitnessvorteil der Bakterien im humanen Serum bewirkt.

3.6.1 Die Aktivierung des Komplement-Systems durch *A. baumannii* geschieht über den alternativen Weg

Nachdem im vorangegangenen Versuch gezeigt wurde, dass das Wachstum von *A. baumannii* in NHS *Ata*-abhängig war, sollte im nächsten Schritt untersucht

werden, über welchen der drei Kaskaden (klassischer Weg, Lektin-Weg und alternativer Weg) die Interaktion mit dem Komplement-Systems erfolgt. Dies geschah unter Beobachtung des bakteriellen Wachstums bei einer NHS-Konzentration von 30 % und unter spezifischer Blockierung der initialen Aktivierungsschritte der einzelnen Wege (vgl. **2.8.1**). Zur Inhibition des klassischen Weges bzw. des Lektin-Weges wurde dem NHS Magnesium-EGTA beigemischt, welches die zweifach positiv geladenen Calcium-Ionen chelatiert und somit die Initialisierung beider Wege blockiert. Um die Beteiligung des alternativen Weges zu untersuchen, wurde NHS verwendet, in welchem Faktor B, der zur Aktivierung dieses Weges benötigt wird, depletiert war. Die Untersuchung des bakteriellen Wachstums erfolgte, indem jeweils 1×10^6 Bakterien in 200 μ l der entsprechenden Versuchsansätze über einen Zeitraum von 2 h bei 37 °C inkubiert wurden. Danach wurde die Anzahl vitaler Bakterien durch Bestimmung der KBE auf LB-Agar ermittelt. Als Kontrollansätze dienten Bakterien, die in PBS und in hitzeinaktiviertem NHS inkubiert wurden. Außerdem wurde als Positivkontrolle *E. coli* DH5 α untersucht, der gegenüber dem alternativen Weg sensibel ist ([199], **Abbildung 31**). Um auszuschließen, dass Komplement-unspezifische Faktoren das Wachstum der Bakterien beeinflussen, wurden diese in 30 % hitzeinaktivierten NHS inkubiert. Hier zeigte sich eine starke Zunahme des bakteriellen Wachstums.

Für die einzelnen Bakterienstämme wurden folgende Werte ermittelt: WT, $14.764,2 \pm 659,1$ %; Δ ata, $8.272,9 \pm 3.617,7$ % und DH5 α , $17.372,5 \pm 2.664,2$ %. Komplement-unspezifische Faktoren konnten somit ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde das Wachstum der Bakterien in 30 % NHS untersucht. Hier zeigte sich ein gegenüber Δ ata ($17,4 \pm 2,3$ %) signifikant stärkeres Wachstum von WT ($73,7 \pm 23,5$ %). Für den Kontrollstamm *E. coli* DH5 α wurde unter diesen Bedingungen kein Wachstum beobachtet. Nach Blockierung des klassischen Weges sank das Wachstum von WT und Δ ata, wobei keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden: $0,9 \pm 0,6$ % (WT) und $0,9 \pm 0,3$ % (Δ ata). Auch hier konnte für den Kontrollstamm DH5 α kein Wachstum beschrieben werden. Nach Inkubation der Bakterienstämme in 30 % NHS, in welchem der Faktor B depletiert war, zeigten alle Proben ein deutlich über der PBS-Kontrolle liegendes Wachstum. Für WT wurde ein Wachstum von $121,8 \pm 13,4$ % und für Δ ata $219,0 \pm 10,5$ % beschrieben. Auch der Kontrollstamm DH5 α zeigte ein vermehrtes

Wachstum gegenüber der PBS-Kontrolle von $101,2 \pm 10,4$ %. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich mutmaßen, dass *A. baumannii* gegenüber dem alternativen Weg sensibel ist und somit wohlmöglich den klassischen bzw. Lektin-Weg inhibiert.

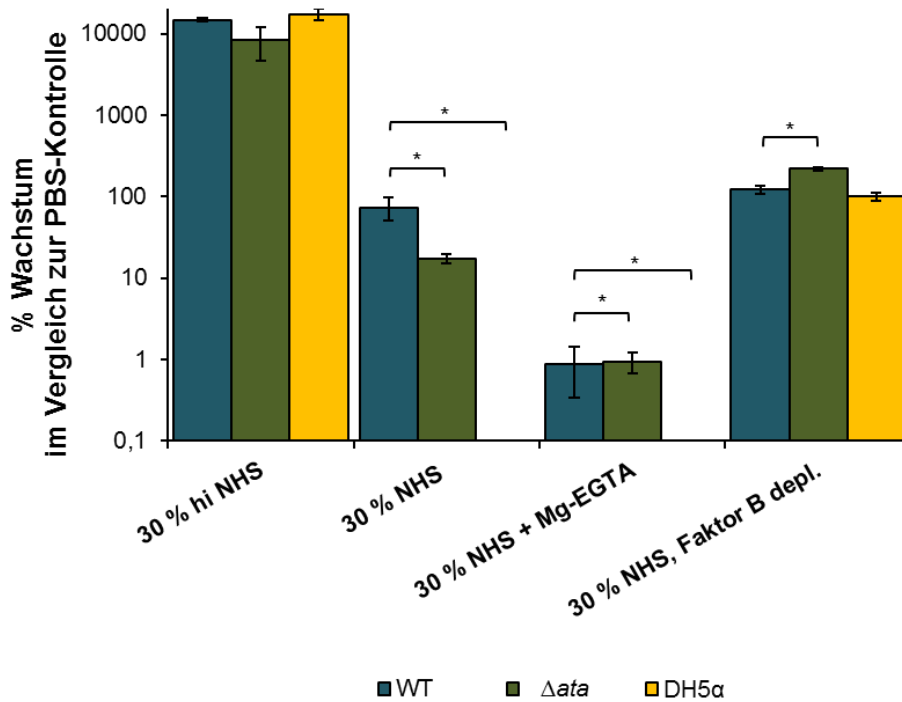


Abbildung 31. Die Inkubation von *A. baumannii* in NHS führt zur Inaktivierung des klassischen und Lektin-Weges.

Die verschiedenen NHS-Proben wurden zu je 200 μ l in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von jeweils 10 μ l der Bakteriensuspension (1×10^6 Bakterien). Die Proben wurden bei 37 °C über einen Zeitraum von 2 h inkubiert. Zur Beurteilung des bakteriellen Wachstums wurden die Proben auf LB-Agar kultiviert und die KBE bestimmt. (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen WT und Δata bzw. *E. coli* DH5 α ($p < 0,05$). $n = 3$ in Doppelbestimmung.

3.7 Ata-vermittelte Apoptose in humanen Endothelzellen

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die *A. baumannii*-Infektion auf die Viabilität der Wirtszelle hat. Hierfür wurden Versuchsansätze verfolgt, die die Zellmembranpermeabilität (LDH-Freisetzung), die Induktion von Apoptose und das Überleben von *G. mellonella* adressieren.

3.7.1 Die Infektion von humanen Zellen mit *A. baumannii* führt zu einer Ata-unabhängigen LDH-Freisetzung

Um zu untersuchen, wie sich die Infektion von humanen Zellen durch *A. baumannii* auf deren Zellmembranpermeabilität und somit auf eine ungerichtete Lyse der Wirtszelle auswirkt, wurde freigesetztes LDH bestimmt. Hierfür wurden HUVECs mit *A. baumannii* für 30 h inkubiert (MOI 200) und die LDH-Aktivität im Überstand der infizierten Zellen photometrisch bestimmen (**Abbildung 32**).

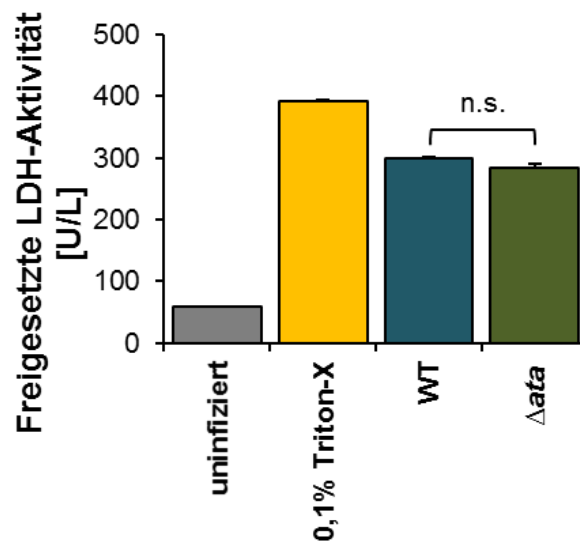


Abbildung 32. Die Freisetzung von LDH aus infizierten humanen Endothelzellen ist Ata-unabhängig. HUVECs wurden in Zellkulturschalen kultiviert und im Anschluss mit *A. baumannii* für 30 h infiziert (MOI 200). Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Probe und als Positivkontrolle eine mit Triton-X 100 (Endkonzentration 0,1 % (v/v)) versetzte Probe. Der Probenüberstand wurde abgenommen, steril-filtrierte und die LDH-Menge photometrisch bestimmt. (n.s.) kennzeichnet nicht signifikante Unterschiede zwischen WT und Δ ata ($p > 0,05$). $n = 3$ in Doppelbestimmung.

Im Versuch zeigte sich gegenüber der uninfizierten Kontrolle eine starke Erhöhung der freigesetzten LDH bei WT und Δ ata. Mit einem Wert von $300,5 \pm 9,9$ U/L für WT bzw. $284,3 \pm 12,6$ U/L für Δ ata waren die gemessenen Werte 6-fach höher als bei der uninfizierten Probe ($58,5 \pm 10,6$ U/L). Der höchste Wert wurde für die Positivkontrolle (Triton-X 100) ermittelt. Hier betrug die Aktivität der freigesetzten LDH $391,5 \pm 1,8$ U/L. Diese Ergebnisse wurden auch lichtmikroskopisch beobachtet (Daten nicht gezeigt). Hierbei waren Beschädigungen der Wirtszellmembran deutlich zu sehen. Im Vergleich zwischen den ermittelten LDH-Werten von WT- und Δ ata-behandelten HUVECs wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, was darauf hindeutet, dass der trimere Autotransporter Ata keinen direkten Einfluss auf die Lyse der humanen Endothelzellen hat.

3.7.2 Ata vermittelt die Induktion von Apoptose in HUVECs

Nachdem gezeigt wurde, dass Ata keinen Einfluss auf die Membranpermeabilität der Wirtszelle hat, wurde eine Ata-vermittelte Induktion von Apoptose und Nekrose untersucht. Ein Zusammenhang zwischen einer *A. baumannii*-Infektion und der Induktion von Apoptose bei humanen Wirtszellen konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden [200, 201]. Von anderen Gram-negativen Spezies ist bekannt, dass dessen trimere Autotransporter Adhäsine für die Induktion des Zelltodes (mit-)verantwortlich sind [202, 203].

Unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Apoptose-Nekrose Assays wurde zunächst bestimmt, zu welchem Zeitpunkt eine Apoptose bzw. Nekrose bei den infizierten HUVECs nachweisbar war. Hierfür wurden die Zellen in einer Zellkulturschale (96 Kavitäten) kultiviert und mit *A. baumannii* infiziert (MOI 1). Die Proben wurden über einen Zeitraum von 30 h bei 37 °C in einem Plattenlesegerät inkubiert. Über die Messung der relativen Fluoreszenz- und Lumineszenzeinheiten wurde der Grad der Apoptose bzw. Nekrose detektiert. Im Versuch zeigte sich eine eindeutige Induktion des programmierten Zelltodes für WT- und Δ ata-behandelte HUVECs, wobei für WT bereits nach 10 h Inkubation ein Apoptose-Signal sichtbar war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung der Nekrose: Erste Signale für eine Nekrose bei WT-infizierten HUVECs waren nach ca. 13 h zu beobachten. Wohingegen die Induktion der Nekrose für Δ ata nach ca. 23 h erkennbar war.

Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass die Infektion von HUVECs mit *A. baumannii* zu einer Induktion von Apoptose und Nekrose führt. Eine genaue Quantifizierung der apoptotischen und nekrotischen Zellen war in diesem Versuch jedoch nicht möglich, weshalb im nächsten Schritt durchflusszytometrische Versuche unternommen wurden. Hierfür wurden HUVECs in Zellkulturschalen (6 Kavitäten) kultiviert und mit den jeweiligen *A. baumannii*-Stämmen (WT, Δ ata, Δ ata(p), Δ ata(c)) über einen Zeitraum von 16 h bei 37 °C infiziert. Als Kontrollen dienten uninfizierte und mit dem Chemotherapeutikum Camptothecin (Endkonzentration: 1 μ M) behandelte HUVECs. Nach erfolgter Infektion wurden die Zellen aus den Kavitäten gelöst und mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht

(**Abbildung 33**). Hier zeigte sich eine deutliche Apoptose-Induktion bei WT und $\Delta ata(c)$. Im dargestellten exemplarischen Beispiel betrug der Anteil an apoptotischen Zellen für WT 32,7 % und für $\Delta ata(c)$ 62,7 %. Im Vergleich zu den *ata*-exprimierenden *A. baumannii*-Stämmen war der Grad der Apoptose bei Δata und $\Delta ata(p)$ signifikant reduziert. Für Δata betrug der Anteil an apoptotischen Zellen 13,4 % und für $\Delta ata(p)$ 14,0 %, was dafürspricht, dass Ata einen Einfluss auf die Induktion der Apoptose in HUVECs hat. In den Kontrollgruppen zeigten sich für die uninfizierte Probe ein Anteil apoptotischer Zellen von 1,6 % und in der mit Camptothecin behandelten Probe ein Anteil von 33,0 %.

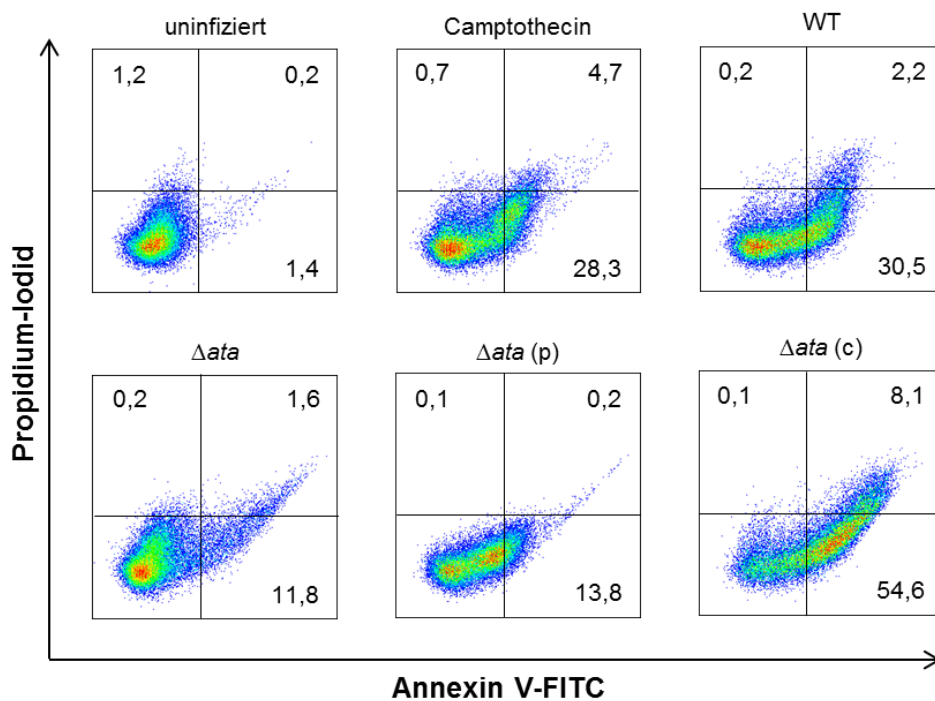


Abbildung 33. Durchflusszytometrischer Nachweis der Ata-vermittelten Apoptose-Induktion in HUVECs. Die in der Abbildung gezeigten Daten sind exemplarisch. HUVECs wurden in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* für 16 h bei 37°C infiziert (MOI 1). Als Negativkontrolle diente eine uninfizierte Probe, wohingegen eine mit Camptothecin behandelte Probe als Positivkontrolle diente. Nach erfolgter Infektion wurden die Zellen gelöst, zentrifugiert und das Zellsediment in 500 μ l Annexin V-Bindpuffer gelöst. Die Proben wurden mit der Annexin V-FITC-Lösung und Propidium-Iodid-Lösung behandelt und durchflusszytometrisch analysiert.

Zum besseren Vergleich der durchflusszytometrischen Daten wurden die Ergebnisse aus allen Versuchen in einem Balkendiagramm zusammengeführt (**Abbildung 34**).

Wie im Beispiel gezeigt (**Abbildung 33**), waren in der uninfizierten Probe nahezu keine apoptotischen Zellen nachweisbar. Hier betrug der relative Anteil der Zellen mit Apoptose $1,75 \pm 0,25$ % und mit Nekrose $0,63 \pm 0,58$ %. Demgegenüber betrug der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in der Positivkontrolle

20,15 ± 10,5 % bzw. 0,33 ± 0,33 %. Die höchsten Werte in der Apoptose-Induktion wurden für WT und $\Delta ata(c)$ beobachtet. Für WT betrug der Anteil an Apoptose 25,0 ± 8,23 % und der Anteil an Nekrose 0,18 ± 0,17 %, während für $\Delta ata(c)$ eine Apoptoserate von 37,84 ± 10,48 % und eine Nekroserate von 4,98 ± 0,91 % ermittelt wurde. Demgegenüber stehen die Werte von Δata und $\Delta ata(p)$, die signifikant weniger Apoptose (Δata : 5,56 ± 3,12 %; $\Delta ata(p)$: 5,96 ± 2,51 %) induzierten. Der Anteil an Nekrose war vergleichbar mit den WT- bzw. $\Delta ata(c)$ -behandelten Proben und betrug für Δata 1,47 ± 1,36 % und für $\Delta ata(p)$ 0,04 ± 0,01 %.

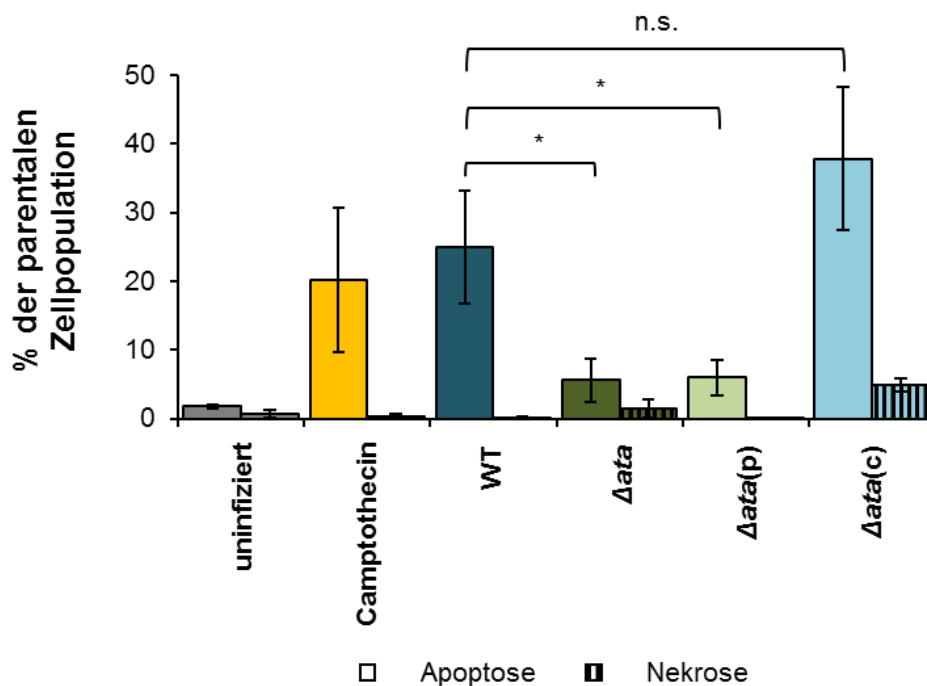


Abbildung 34. Übersicht der durchflusszytometrischen Daten zur Ata-vermittelten Apoptose-Induktion in HUVECs. In der Abbildung ist eine Übersicht der durchflusszytometrischen Daten ($n = 3$) zur Apoptose-Induktion in HUVECs dargestellt. (*) verweisen auf signifikante Unterschiede zwischen den gekennzeichneten Gruppen ($p < 0,05$). $n = 3$ in 3-facher Bestimmung.

Im Versuch zeigten sich signifikante Unterschiede in der Apoptose-Induktion zwischen *ata*-exprimierenden und nicht-*ata*-exprimierenden *A. baumannii*-Stämmen. WT und $\Delta ata(c)$ infizierte HUVECs wiesen einen durchschnittlich 6-fach höheren Anteil an apoptotischen Zellen als Δata bzw. $\Delta ata(p)$ infizierte HUVECs auf. Es ist davon auszugehen, dass *Ata* maßgeblich an der Induktion der Apoptose in HUVECs beteiligt ist. Im Falle der Nekrose-Induktion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden, wobei diese Ergebnisse die Beobachtungen aus den Versuchen zur Zell-

membranpermeabilität (LDH-Assay) stützen. Es ist anzunehmen, dass Schädigungen der Wirtszellmembran und die damit einhergehende Lyse der Wirtszelle primär nicht von Ata abhängig sind.

3.7.3 Die Ata-abhängige Induktion der Apoptose führt zu einer spezifischen Caspase 3- und Caspase 7-Aktivierung

Die Induktion des programmierten Zelltodes in der Wirtszelle ist durch einen komplexen Mechanismus fein abgestimmter molekularer Prozesse reguliert. Hierbei kann der programmierte Zelltod über einen Caspase-abhängigen und/oder einen Caspase-unabhängigen Signalweg aktiviert werden [204–206]. Eine Aktivierung der zentralen Caspase 3 durch *A. baumannii* konnte bereits in einer früheren Studie nachgewiesen werden [201]. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Ata-abhängige Induktion der Apoptose bei HUVECs durch Caspasen vermittelt wird. Hierfür wurde ein Versuch etabliert, der die Aktivität von zwei zentralen Caspasen, der Caspase 3 und der Caspase 7, untersucht. Dazu wurden HUVECs in Zellkulturschalen kultiviert (6 Kavitäten) und mit den entsprechenden *A. baumannii*-Stämmen über einen Zeitraum von 16 h bei 37 °C infiziert (MOI 1). Danach wurde die Caspase 3- bzw. Caspase 7-Aktivität unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Assays luminometrisch bestimmt (**Abbildung 35**). Im Versuch zeigten sich nach 8 h Inkubation zunächst keine signifikanten Steigerungen der Caspase-Aktivitäten in jeder Gruppe. Die durchschnittliche Lumineszenz-Intensität (RLU) betrug $5,2 \pm 3,3 \times 10^4$. Nach einem Inkubationszeitraum von 16 h und der somit einhergehenden Apoptose-Induktion stiegen die Caspase-Aktivitäten für WT und $\Delta ata(c)$ ($6,1 \pm 0,92 \times 10^5$ bzw. $4,9 \pm 0,17 \times 10^5$) deutlich. Demgegenüber blieben die Caspase-Aktivitäten für Δata und $\Delta ata(p)$ auf einem konstant niedrigen Niveau von $1,3 \pm 0,39 \times 10^5$ (Δata) und $9,2 \pm 4,8 \times 10^4$ ($\Delta ata(p)$). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Aktivierung der beiden Effektor-Caspasen 3 und 7 vom Vorhandensein des trimeren Autotransporters Ata abhängig ist.

Nach weiterer Inkubation (24 h) sanken die Aktivitäten der beiden Caspasen in jeder Gruppe auf das Ausgangsniveau nach 8 h. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 fand zeitgleich mit der Induktion der Apoptose in den HUVECs statt. Au-

ßerdem zeigte sich, dass die Aktivierung der beiden Caspasen mit dem Vorhandensein von Ata korrelierte. Dies impliziert, dass Ata über einen selektiven Signalweg die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert und somit zur Induktion der Apoptose in HUVECs beiträgt.

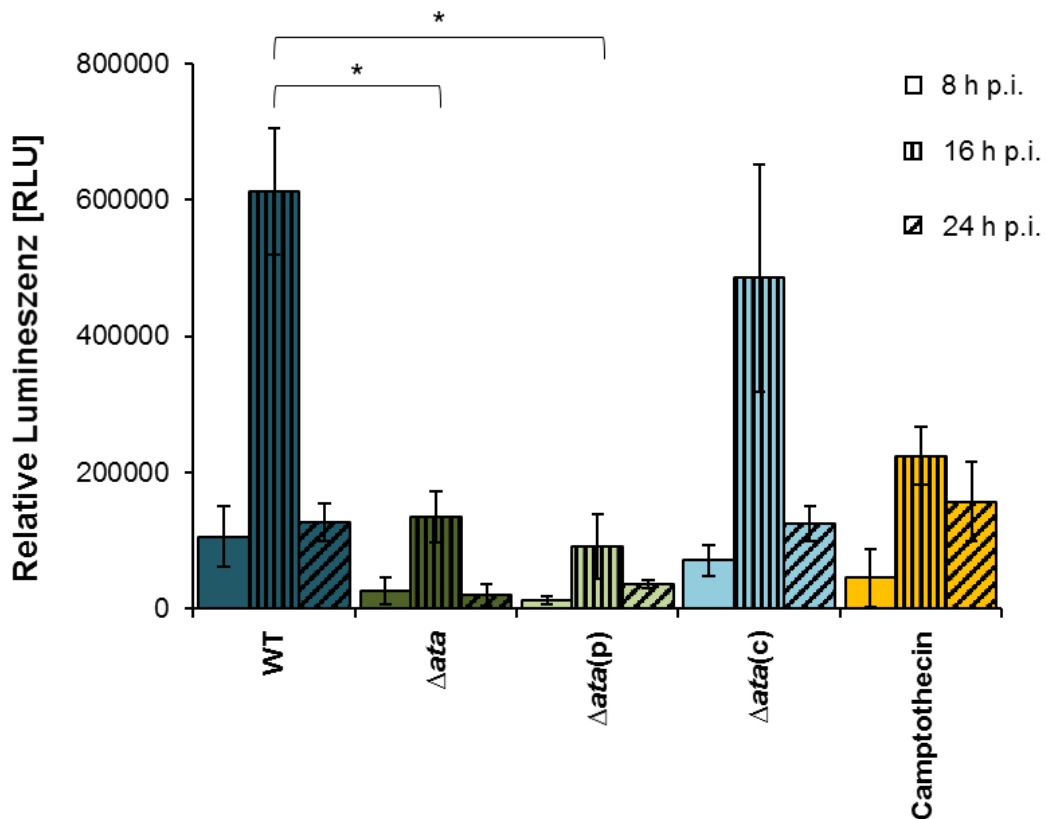


Abbildung 35. Ata-vermittelte Caspase 3- und Caspase 7-Aktivierung in HUVECs. HUVECs wurden in Zellkulturschalen kultiviert und mit den jeweiligen *A. baumannii*-Stämmen (MOI 1) infiziert. Daraufhin wurde die Caspase 3- bzw. Caspase 7-Aktivität unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Assays bestimmt. Als Positivkontrolle diente eine mit Camptothecin behandelte Probe. (*) verweisen auf signifikante Unterschiede zwischen den gekennzeichneten Gruppen ($p < 0,05$). $n = 4$ in Einfachbestimmung.

3.8 Ata-abhängige Pathogenität von *A. baumannii* in vivo

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Ata in *A. baumannii* im Zusammenhang mit der Apoptose der Wirtszelle steht. Hierbei führte die Infektion von HUVECs bzw. A549-Zellen zu einer Ata-unabhängig Freisetzung von LDH und zu einer spezifischen Ata-abhängigen Apoptose-Induktion bei HUVECs, die zudem mit einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 einherging.

Um diese Beobachtungen im nächsten Schritt möglichst realistisch auf ein *in vivo*-Modell zu übertragen, wurden Larven von *G. mellonella* herangezogen mit *A. baumannii* infiziert und über einen Zeitraum von 72 h beobachtet (**Abbildung 36**).

Im Versuch zeigte sich, dass die Infektion der Larven mit *A. baumannii* zum dosis- und zeitabhängigen Tod führt. Am Beispiel von WT-infizierten Larven war eine erhöhte Sterberate der Larven, die mit einer initialen Keimzahl von 3×10^7 Bakterien injiziert wurden, zu beobachten: Einen Tag nach Infektion wurde eine prozentuale Überlebensrate von $5,0 \pm 4,9$ % beobachtet. Mit einer niedrigeren initialen Keimzahl stieg die Überlebensrate im selben Zeitraum auf $42,9 \pm 5,9$ % (3×10^6 Bakterien) und $92,9 \pm 3,0$ % (3×10^5 Bakterien). Nach 48 h Inkubation und einer initialen Bakterienzahl von 3×10^7 konnten keine lebenden Larven mehr beobachtet werden. Auch für die beiden anderen Gruppen (3×10^6 bzw. 3×10^5 Bakterien) sank die Anzahl überlebender Larven: $32,9 \pm 5,6$ % (3×10^6 Bakterien) und $82,9 \pm 4,5$ % (3×10^5 Bakterien). Nach 72 h erreichten beide Gruppen (3×10^6 bzw. 3×10^5 Bakterien) letztlich ein Minimum der überlebenden Larven von $25,7 \pm 5,2$ % bzw. $77,1 \pm 5,0$ % (2×10^5 Bakterien). Für die mit Δata infizierten Gruppen wurde ein vergleichbarer Verlauf der Überlebensraten beobachtet. In der Kontrollgruppe, also den Larven, die mit PBS behandelte wurden, blieb die Anzahl der lebenden Larven über den gesamten Beobachtungszeitraum bei 100 %. Die Deletion von *ata* führte zu einer Attenuierung der Virulenz im Vergleich zum WT. Bei einer initialen Bakterienzahl von 3×10^7 führte die Infektion der Larven zu einer Überlebensrate in der WT-Gruppe nach 24 h von $5,0 \pm 4,9$ %, während diese in der Δata -Gruppe noch $27,5 \pm 7,0$ % betrug. Nach 48 h waren in der WT-Gruppe alle Larven tot, wohingegen in der Δata -Gruppe noch $17,5 \pm 6,0$ % der Larven lebten.

Anhand der Ergebnisse kann drauf geschlossen werden, dass neben der Dosis- und Zeitabhängigkeit auch das Vorhandensein von *Ata* einen direkten Einfluss auf das Überleben der Larven von *G. mellonella* haben. Das Vorhandensein des trimeren Autotransporters in *A. baumannii* trägt somit maßgeblich zur Pathogenität des Bakteriums bei.

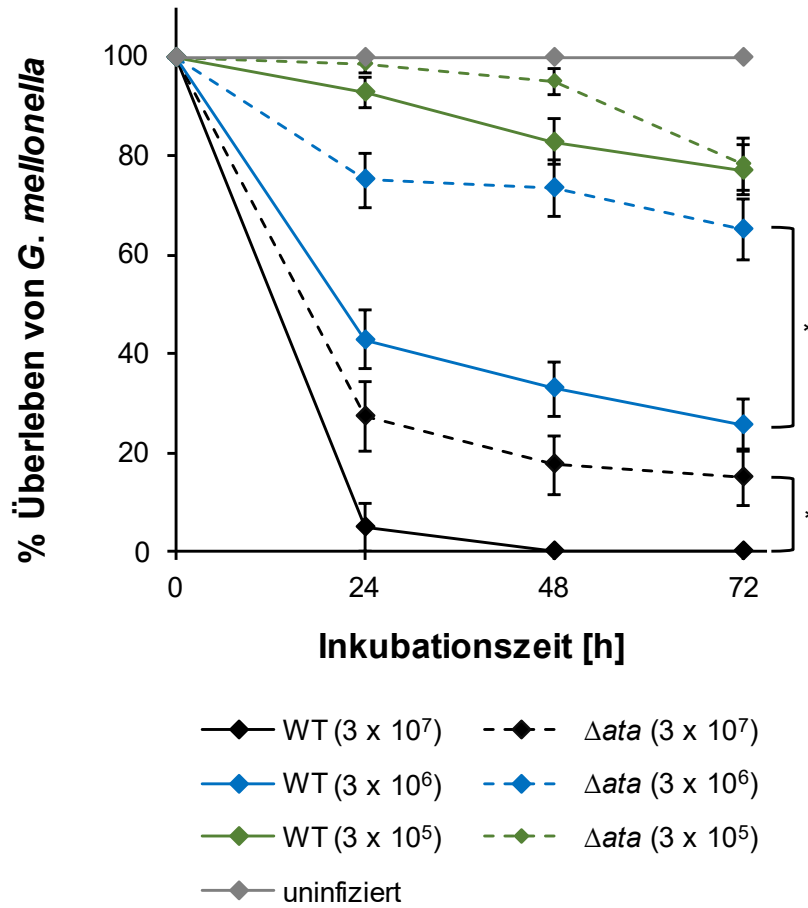


Abbildung 36. Das Überleben von *G. mellonella* ist abhängig vom Vorhandensein des trimeren Autotransporters *Ata*. Larven wurden zu je 10 Stück in Gruppen zusammengefasst und mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen (3×10^7 Bakterien, 3×10^6 Bakterien und 3×10^5 Bakterien) infiziert. Im zeitlichen Intervall von 24 h wurde sowohl der Grad der Melanisierung als auch die Motilität als Indikatoren der Vitalität der Larven bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten Larven, die mit sterilem PBS behandelt wurden. (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen WT und Δata in der Viabilität der Larven über den gesamten Versuchszeitraum ($p < 0,05$). $n = 5$ in 4-facher Bestimmung.

3.9 Gesamtproteomanalyse infizierter HUVECs

In den bisherigen Abschnitten dieser Arbeit wurden verschiedenen Aspekte einer durch *A. baumannii* hervorgerufenen Infektion untersucht. Hierzu zählen unter anderem die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle, die Invasion der Wirtszelle sowie das Hervorrufen einer Entzündung bzw. die Einleitung von Apoptose. Hierbei wurde beobachtet, dass dem trimeren Autotransporter *Ata* eine bedeutsame Rolle zukommt, indem dieser beispielsweise die Interleukine IL-6 und IL-8 induziert. Die Komplexität der Signalwege in der Wirtszelle stellt jedoch eine Herausforderung für weitere Untersuchungen dar. Aus diesem Grund wurde eine Gesamtproteomanalyse infizierter HUVECs durchgeführt, die es ermöglichte, eine

detaillierte Momentaufnahme der Vorgänge im Wirt auf Ebene der regulierten Proteine zu erhalten.

Tabelle 25. Übersicht der stark regulierten ($-3 \leq$ und ≥ 3 , p-Wert $< 0,05$) Proteine in den Analysen der einzelnen Vergleichsgruppen. Orange markiert = negativ reguliert, grün markiert = positiv reguliert. In Klammern sind ist der engl. Proteinname aufgeführt (aus <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>).

WT vs. uninferiert		Δ ata vs. uninferiert		WT vs. Δ ata	
Protein, Abkürzung	x-fache Induktion	Protein, Abkürzung	x-fache Induktion	Protein, Abkürzung	x-fache Induktion
VCAM-1 (<i>vascular cell adhesion protein 1</i>)	+ 34,74	VCAM1 (<i>vascular cell adhesion protein 1</i>)	+ 39,84	CCDC88C (<i>coiled-coil domain containing 88C</i>)	+ 9,25
MYL6B (<i>myosin light chain 6B</i>)	+ 32,33	MYL6B (<i>myosin light chain 6B</i>)	+ 28,74	BRD8 (<i>bromodomain containing 8</i>)	+ 6,98
SELE (<i>selectin E</i>)	+ 14,2	SELE (<i>selectin E</i>)	+ 15,71	JAK1 (<i>Janus kinase 1</i>)	+ 5,69
SNX18 (<i>sorting nexin 18</i>)	- 13,68	ANGPTL4 (<i>angiopoietin like 4</i>)	+ 12,26	MRPL3 (<i>mitochondrial ribosomal protein L3</i>)	+ 5,26
HLA-C (<i>major histocompatibility complex, class I, C</i>)	- 14,54	DAP (<i>death associated protein</i>)	+ 11,49	HMGCL (<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase</i>)	- 4,24
MDK (<i>midkine</i>)	- 14,92	SRGN (<i>serglycin</i>)	- 11,26	AGA (<i>aspartylglucosaminidase</i>)	- 4,33
MRFAP1 (<i>Morf4 family associated protein 1</i>)	- 15,25	CHST14 (<i>carbohydrate sulfotransferase 14</i>)	- 11,35	LTBP4 (<i>latent transforming growth factor beta binding protein 4</i>)	- 4,48
ROBO4 (<i>roundabout guidance receptor 4</i>)	- 16,18	HMGCS1 (<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1</i>)	- 14,48	AIF1L (<i>allograft inflammatory factor 1 like</i>)	- 12,25
CCDC88C (<i>coiled-coil domain containing 88C</i>)	- 16,66	ROBO4 (<i>roundabout guidance receptor 4</i>)	- 15,78		
SOX18 (<i>SRY-box transcription factor 18</i>)	- 18,37	SGCB (<i>sarcoglycan beta</i>)	- 15,83		
SGCB (<i>sarcoglycan beta</i>)	- 20,65	PPP1R13B (<i>protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B</i>)	- 19,00		
PPP1R13B (<i>protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B</i>)	- 21,44	AIF1L (<i>allograft inflammatory factor 1 like</i>)	- 19,14		
CHST14 (<i>carbohydrate sulfotransferase 14</i>)	- 26,39	TSC2 (<i>TSC complex subunit 2</i>)	- 20,05		
BGN (<i>biglycan</i>)	- 51,88	UBL5 (<i>ubiquitin like 5</i>)	- 69,34		
UBL5 (<i>ubiquitin like 5</i>)	- 60,45	BGN (<i>biglycan</i>)	- 78,79		

Dafür wurden humane Endothelzellen in Zellkulturschalen kultiviert und mit *A. baumannii* (WT und Δafa) oder unbehandelt über einen Zeitraum von 14 h infiziert. Die Proben wurden im Anschluss verwendet, um mittels Flüssigchromatografie und Massenspektrometrie die Proteinexpression in Wirtszellen zu untersuchen.

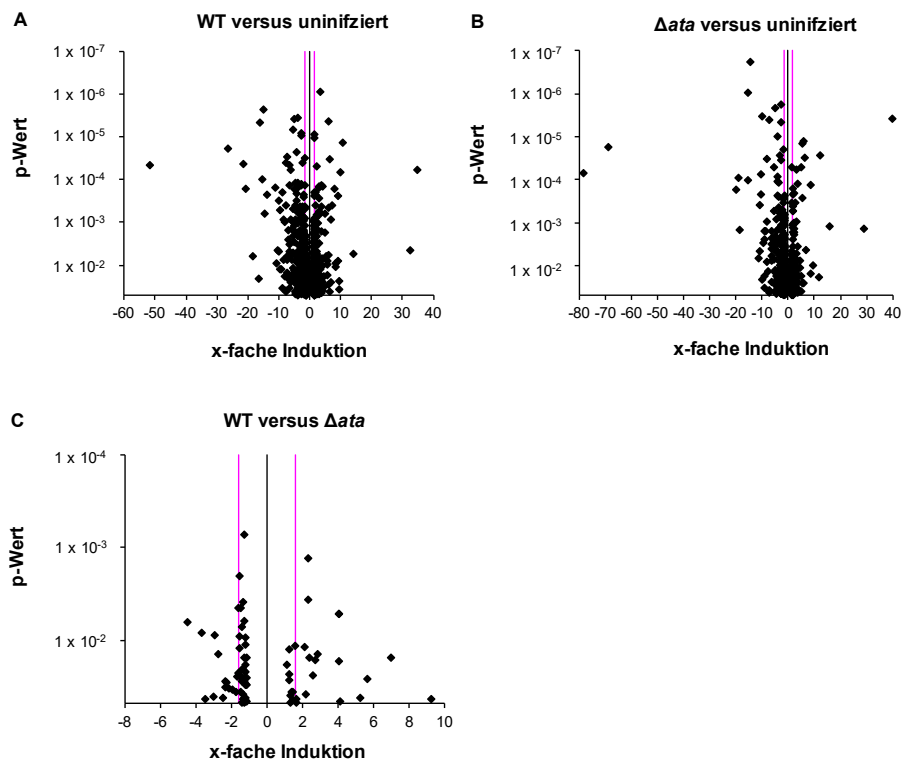


Abbildung 37. Grafische Darstellung der signifikanten Proteininduktionen mittels Volcano-Plot. Die Datensätze zur Proteininduktion mit einem $p\text{-Wert} \leq 0,05$ wurden mittels Volcano-Plot in Abhängigkeit der x-fachen Induktion grafisch dargestellt. Als Grenzbereich der x-fachen Induktion wurden die Werte -3 und 3 gewählt (in den Grafiken als magentafarbene Linien erkennbar). Grafische Darstellung der x-fachen Induktion in Abhängigkeit der p-Werte für die Gruppen WT versus uninifiziert (A), Δafa versus uninifiziert (B) und WT versus Δafa (C).

Nach der bioinformatischen Analyse der gewonnenen Daten ergab sich ein Datensatz mit 4.956 Einträgen, welche alle identifizierten Proteine beinhaltete. Um die Komplexität dieser Daten zu minimieren, wurden diese zunächst nach p-Wert und x-facher Induktion sortiert. Hierbei wurden nur Daten berücksichtigt, deren $p\text{-Wert} \leq 0,05$ war und für welche die x-fache Induktion im Bereich $-3 \leq x \leq 3$ lag. Zur Visualisierung der induzierten Proteine in Abhängigkeit ihrer Signifikanz wurden Volcano-Plots erstellt (**Abbildung 37**). Für die Gruppe WT versus uninifiziert betrug die Anzahl der zu berücksichtigten, stark regulierten Proteine 181. Der Großteil der detektierten Proteine befindet sich im Bereich der x-fachen Induktion von -10 bis 10. Darüber hinaus wurden aber auch Proteine nachgewiesen,

die > 10-fach reguliert waren (**Tabelle 25**). Für die Gruppe Δata versus uninfiziert reduzierte sich die Anzahl der signifikanten Proteine deren Induktion kleiner als -3 und größer als 3 war auf 146 (**Abbildung 37 B**). Letztlich wurden analog die 17 stark regulierten Proteine der Gruppe WT versus Δata dargestellt, wobei die Mehrheit – 4-fach bis 4-fach induziert waren (**Abbildung 37 C**). Darüber hinaus wurden aber auch 5 Proteine identifiziert, deren x-fache Induktion unter -4 bzw. über 4 lag (**Tabelle 25**).

Im weiteren Verlauf wurden die Proteine hinsichtlich ihrer biologischen Funktion untersucht. Dies erfolgte unter Verwendung der Analysesoftware PANTHER Classification System (**Abbildung 38**). Für die beiden Gruppen WT versus uninfiziert und Δata versus uninfiziert konnte die biologische Funktion der regulierten Proteine in 12 verschiedene Gruppen eingeteilt werden. In beiden Gruppen war die Anzahl der positiv regulierten Proteine höher als die Anzahl der negativ regulierten Proteine. Anhand der Anzahl induzierter Proteine war zu erkennen, dass folgende biologische Funktionen besonders stark reguliert waren: Zellorganisation/Biogenese, zelluläre Prozesse, Regulation und Stoffwechsel. Demgegenüber waren alle anderen biologischen Funktionen nur mäßig bis wenig beeinflusst.

Auffällig ist, dass die Lokomotion und Migration der Wirtszellen ausschließlich negativ reguliert waren. Für die Gruppe WT versus Δata reduzierte sich die Anzahl der gefundenen Gruppen zur biologischen Funktion von 12 auf 4: Adhäsion, Zellstrukturierung, Regulation und Stoffwechsel.

Um festzustellen, ob es eine Häufung von Proteinen gibt, die einem bestimmten Signalweg zugeordnet werden können, wurden die Datensätze mithilfe der Software Reactome (<https://reactome.org/>) untersucht. In der Gruppe WT versus uninfiziert wurde eine Häufung von Proteinen in den Signalwegen, die zur Aktivierung verschiedener Immunantworten führen, erkannt (**Anhang 4** und **Anhang 5**). Hierzu zählen u.a. die IL-4-, IL-10-, IL-13 Signalwege und die, welche die Struktur der extrazellulären Matrix beeinflussen. Demgegenüber wurden Häufungen der induzierten Proteine im Interferon-Signalweg und auf transkriptioneller bzw. translationaler Ebene gefunden. In der Gruppe Δata versus uninfiziert wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht (**Anhang 6** und **Anhang 7**).

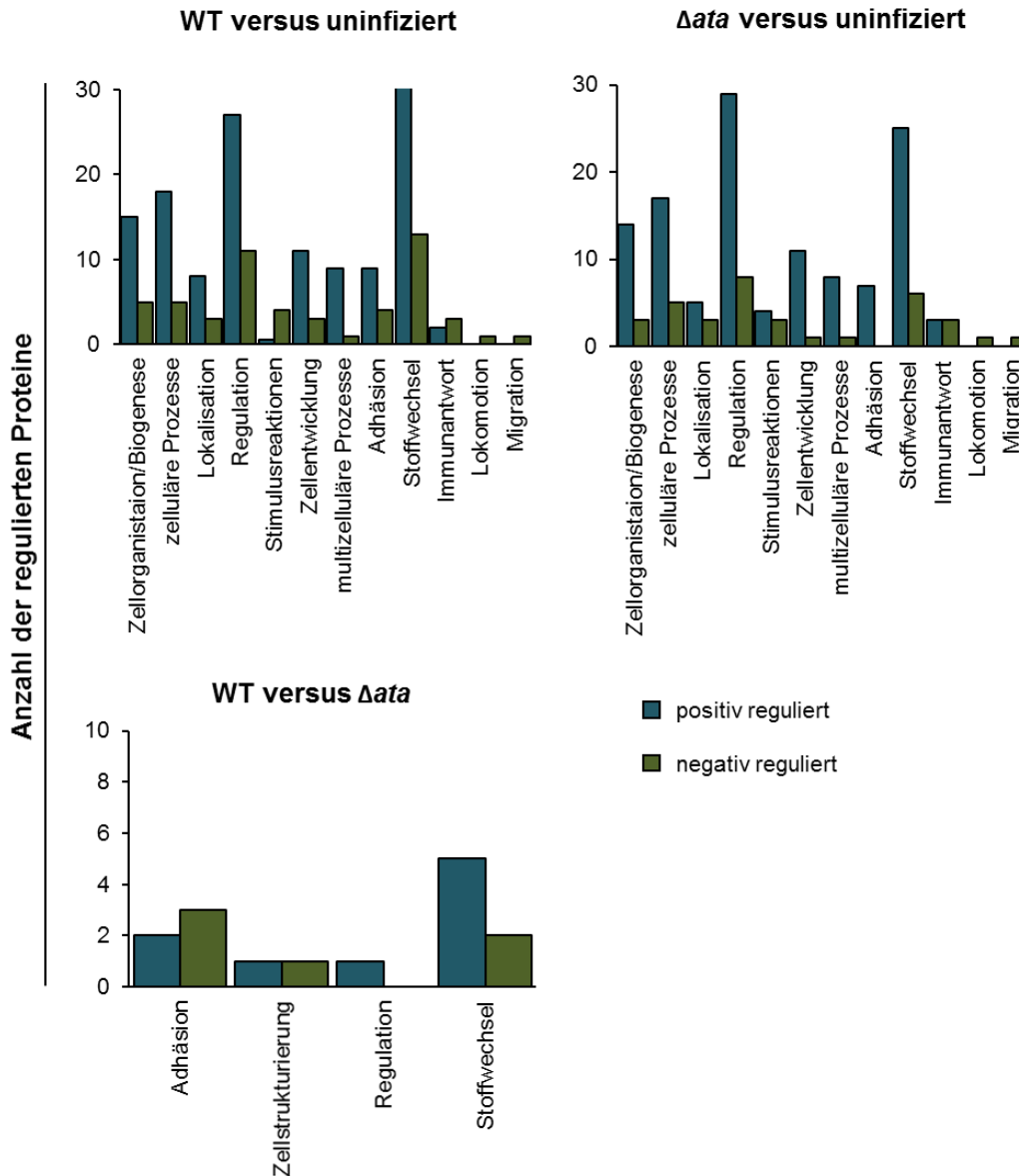


Abbildung 38. Grafische Zuordnung der detektierten Proteine zu ihrer biologischen Funktion in der Wirtszelle. Die positiv und negativ regulierten Proteine wurden hinsichtlich ihrer biologischen Funktion mithilfe der Analyse-Software (<http://www.pantherdb.org/>) untersucht.

Eine Beteiligung des IL-13-Signalweges konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurden auch in dieser Gruppe Signale betreffend der extrazellulären Matrix, die vergleichbar mit der Gruppe WT versus uninfiziert waren, gefunden. Auch die Infektion von HUVECs mit *Δata* lässt auf eine Beteiligung der Interferon-Signalwegen schließen und hatte Einfluss auf Transkription bzw. Translation. Bei der Betrachtung der regulierten Proteine in der Gruppe WT versus *Δata* hatte das Vorhandensein des trimeren Autotransporter Adhäsins Ata einen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort. Dies zeigte sich in der Häufung regulierter Proteine in verschiedenen Interleukin-Signalwegen (**Anhang 8** und

Anhang 9). Besonders der IL-6-Weg ist von großem Interesse, da es die Ergebnisse der Versuche zur Zytokininduktion in HUVECs bestätigen könnte. Aber auch die Signale in den MAPK1- und MAPK3-Wegen sind für vorangegangene Ergebnisse, nämlich die Induktion der Apoptose durch Ata, von großem Interesse, da diese Signalwege mit dem programmierten Zelltod in der Wirtszelle in Verbindung stehen.

Letztlich wurden anhand der Daten aus der Proteomanalyse Rückschlüsse auf bereits gewonnene Erkenntnisse zum Infektionsgeschehen in HUVECs gemacht. Sowohl die Ata-abhängige Stimulation der Immunantwort als auch die Ata-abhängige Induktion der Apoptose konnten durch die Proteomanalyse bestätigt werden. Außerdem zeigte sich für beide Bakterienstämme (WT und Δata) eine Beeinflussung der extrazellulären Matrix, die im Kontext der Interaktion der Bakterien mit Kollagen, Laminin, Fibronectin, VCAM-1, ICAM-1 und ICAM-2 steht.

4. Diskussion

Das Gram-negative und human pathogene Bakterium *A. baumannii* kann vor allem bei Intensiv-Patienten eine Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen wie beispielsweise Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Sepsen oder Wundinfektionen hervorrufen. *A. baumannii* verursacht global ca. 10 % aller nosokomial erworbener Infektionen [10, 28, 207]. Seit den 1980ern wurden drei epidemisch bedeutsame *A. baumannii*-Linien beschrieben, die den internationalen Komplexen I, II und III angehören [208]. Vertreter dieser drei internationalen Komplexe sind unter anderem durch ihre ausgeprägten Antibiotikaresistenzen gekennzeichnet.

Die Erforschung der epidemiologischen Aspekte und der Antibiotikaresistenzmechanismen von *A. baumannii* führte zu wichtigen Erkenntnissen in den vergangenen Jahren. Studien, die die Pathogenität und Virulenz verschiedener *A. baumannii*-Stämme untersuchen, sind jedoch limitiert. Das hat zur Folge, dass molekulare und genetische Aspekte hierzu nur lückenhaft nachzuvollziehen sind. Heutzutage sind nur wenige Virulenzfaktoren von *A. baumannii* bekannt, von denen eine wichtige Rolle bei der Infektion des menschlichen Körpers belegt ist. Hierzu zählen beispielsweise das Membranprotein OmpA, das für die Adhärenz, Invasion und Induktion von Apoptose in Epithelzellen wichtig ist, oder die Phospholipasen C und D, die einen direkten Einfluss auf die Pathogenität von *A. baumannii* haben [52, 171, 200, 209].

Vertreter der Proteinfamilie der trimeren Autotransporter stellen bei anderen Gram-negativen Bakterien wichtige Virulenzfaktoren dar. Eines dieser TAAs, der *Acinetobacter* trimere Autotransport Ata, wurde im Jahr 2012 erstmals bei *A. baumannii* beschrieben [88, 162]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Membranprotein an der Bindung verschiedener extrazellulärer Matrixproteine beteiligt ist und zu einer erhöhten Pathogenität im Maus-Infektionsmodell führt. Dies sind allesamt Eigenschaften, die von anderen TAAs bekannt sind. So korreliert beispielsweise das Vorhandensein von YadA, dem trimeren Autotransporter von *Y. enterocolitica*, mit der Virulenz, Adhäsionsfähigkeit und Wirtszellmodulation [133, 152, 155, 210, 211]. Für das TAA von *B. henselae*, BadA, konnte gezeigt werden, dass es sowohl die Adhäsion an die endotheliale

Wirtszelle vermittelt als auch an der Induktion angiogenetischer Signalstoffe beteiligt ist [75, 139, 212]. Dies lässt vermuten, dass auch Ata in *A. baumannii* einen bedeutsamen Virulenzfaktor beim Infektionsgeschehen im Menschen darstellt, zu dem aber noch wenig bekannt ist

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die biologische Funktion des Membranproteins im Hinblick auf das Infektionsgeschehen unter folgenden Aspekten untersucht: Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine und humane Wirtszellen, Invasion in humane Wirtszellen, Induktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine, Regulation der Apoptoseinduktion, Stimulation der Immunantwort und Virulenz im *G. mellonella*-Infektionsmodell. Zudem wurde eine Gesamtproteomanalyse von infizierten humanen Endothelzellen vorgenommen.

4.1 Genetische Manipulation von *ata* in *A. baumannii* durch homologe Rekombination

Die Grundlage für die durchgeführten *gain*- und *loss-of-function* Versuche im Rahmen dieser Arbeit war zunächst die erfolgreiche Deletion der Ata-kodierenden Sequenz in *A. baumannii* ATCC 19606. Es war zu vermuten, dass die Größe des Genes von 6.777 Bp und die darin enthaltenen repetitiven Nukleotidsequenzen die erfolgreiche Deletion negativ beeinflussen. In einer früheren Studie wurde das intakte *ata*-Gen in *A. baumannii* über homologe Rekombination durch ein nicht intaktes *ata*-Gen (mit Leserasterfehler) ersetzt [88]. Innerhalb des Leserasters befand sich ein Kanamycin-Resistenzgen, welches zusammen mit den inserierten Nukleotiden im Genom von *A. baumannii* verbleibt und somit zu einer zusätzlichen Antibiotikaresistenz führt. Diese kann vor allem bei bereits multiresistenten Bakterien und für die weitere Versuchsplanung hinderlich sein. Für *A. baumannii* und anderen *Acinetobacter*-Spezies wurde deshalb eine markerlose Deletionsmethode auf Grundlage der homologen Rekombination entwickelt [49, 171]. Der Vorteil an dieser Methode ist, dass keine zusätzliche Antibiotikaresistenz im Genom von *A. baumannii* verbleibt. Auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Deletion von *ata* in *A. baumannii* ATCC 19606 wurde die Methode der markerlosen homologen Rekombination angewendet.

Als Kontrolle der Deletion und Komplementation wurden *ata*-Expressionsanalysen durchgeführt. Hierdurch konnte die Menge an *ata*-Transkripten im WT nachgewiesen werden (**Abbildung 12**). Eine *ata*-mRNA-Expression konnte mittels qRT-PCR für die Zeitpunkte 2 h und 24 h erbracht werden. Ergebnisse zum zeitabhängigen Nachweis von Ata wurden auch schon in einer früheren Studie veröffentlicht. Mittels Durchflusszytometrie wurde hier die Assemblierung des Proteins auf der Bakterienoberfläche bestimmt und es konnte gezeigt werden, dass die Signalstärke während der frühen Wachstumsphase am größten war und mit zunehmender Inkubationsdauer wieder sank [88]. Dies steht im Widerspruch zu den *ata*-mRNA-Expressionsergebnisse dieser Arbeit, die gezeigt haben, dass *ata* in einer frühen (2 h) und einer späten Phase exprimiert wird. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die verwendeten Nachweismethoden sein, die auf der einen Seite Protein und auf der anderen Seite mRNA detektieren.

Um zu untersuchen, ob die Deletion und Komplementation von *ata* einen Einfluss auf den Wachstumsphänotyp von *A. baumannii* hat, wurden Wachstumsversuche durchgeführt (**Abbildung 15**). Im Vergleich zum WT zeigte sich ein annähernd gleiches Wachstumsverhalten bei allen *A. baumannii*-Stämmen, welches von einer sehr kurzen lag-Phase von ca. 1 h und einer finale OD₆₀₀ von ca. 4,0 charakterisiert war. Vergleichbare Wachstumsphänotypen wurden auch für *A. baumannii* ATCC 17978 beschrieben [213]. Das Wachstum der Bakterien war durch eine kurzandauernde lag-Phase von ca. 1 h bestimmt. Die finale OD₆₀₀ war jedoch niedriger als für *A. baumannii* ATCC 19606. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass in dieser Studie Müller-Hinton-Medium anstelle von LB-Medium verwendet wurde. In einer weiteren Studie wurde ebenfalls das Wachstumsverhalten verschiedener *A. baumannii*-Stämme in eisenfreien Komplexmedium untersucht (TSBD) [45]. Die Verdopplungszeiten der untersuchten Bakterienstämme betragen 40 min für die klinischen Stämme (u.a. ATCC 17978) und 100 min für den antibiotikasensiblen SDF-Stamm. In der vorliegenden Arbeit wurden Verdopplungszeiten im Bereich von $39,38 \pm 4,72$ min (Δ *ata*(c)) bis $46,15 \pm 1,29$ min (Δ *ata*(p)) ermittelt. Im Kontext der aufgeführten Vergleichsstudien ergeben sich nur geringfügige Abweichungen, die vor allem durch die unterschiedliche Verwendung des Kulturmediums zu begründen sind.

4.2 Die Bindung von *A. baumannii* an extrazelluläre Matrixproteine ist Ata-abhängig

Ein wichtiger Schritt in der erfolgreichen Etablierung einer bakteriellen Infektion stellt die initiale Adhäsion an die Wirtszelle dar [214–216]. Dabei kann der Kontakt vom Bakterium zur Zelle über die Bindung an die eukaryotische extrazelluläre Matrix erleichtert werden. Bakterien haben hierfür spezielle Adhäsionsmoleküle (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) entwickelt, die spezifisch diese Bestandteile im extrazellulären Milieu erkennen und daran binden [217].

In einer vorangegangenen Studie wurden 78 verschiedene *A. baumannii*-Stämme hinsichtlich ihrer Interaktion mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix untersucht [218]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der untersuchten Stämme mit extrazellulären Matrixproteinen interagiert. In einer weiteren Studie wurde die Interaktion von *A. baumannii* mit Fibronectin untersucht [78]. Hierbei wurden drei potenzielle Membranproteine identifiziert, die wahrscheinlich an der Bindung von Fibronectin beteiligt sind bzw. die Bindung der Bakterien über Fibronectin an die humane Wirtszelle (hier A549-Zellen) unterstützt. Im Hinblick auf den trimeren Autotransporter Ata zeigte die Studie von L.V. Bentancor *et al.*, 2012, dass das Protein eine Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen bindet [88]. Mittels ELISA wurde die Bindung von Ata an Kollagen I, III, IV, V und Laminin nachgewiesen. Im gleichen Jahr identifizierte eine japanische Arbeitsgruppe einen trimeren Autotransporter, AtaA, im nicht pathogenen Stamm *Acinetobacter* sp. Tol 5 [172]. Die Autoren konnten zeigen, dass die Bindung des Bakteriums an Kollagen I maßgeblich durch das Vorhandensein von AtaA bestimmt ist. Für die TAAs anderer Gram-negative Bakterien gibt es vergleichbare Beobachtungen. So bindet YadA von *Y. enterocolitica* an eine Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin [219, 220]. Das TAA von *B. henselae* bzw. *B. quintana*, BadA, bindet ebenso an Kollagen, Laminin, Fibronectin, Hyaluronsäure und Vitronectin [220]. Auch die TAAs anderer Bakterienspezies wie *N. meningitidis* (NhhA) oder *P. mirabilis* (AipA) binden an extrazelluläre Matrixkomponenten [146, 221]. In diesem Kontext wurden die Adhäsionsfähigkeiten von *A. baumannii* ATCC 19606 und Δ ata gegenüber Kollagen, Laminin und Fibronectin untersucht (**Abbildung 16**). Es wurde gezeigt,

dass *A. baumannii* Ata-abhängig an Kollagen, Laminin und Fibronectin bindet. Im Weiteren wurde die Bindung von WT und Δ ata an interzelluläre Adhäsionsmoleküle getestet (**Abbildung 16**). Frühere Studien zeigten bereits, dass NadA von *N. meningitidis* an β_1 -Integrine oder UspA1 von *Moraxella catarrhalis* an CEACAM1 bindet [148, 222]. Die interzellulären Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und ICAM-2 sind die natürlichen Liganden der oberflächenassoziierten Integrine. Lässt sich die Bindung der Bakterien an diese Moleküle nachweisen, so kann man vermuten, dass Integrine eine entscheidende Rolle bei der Interaktion der Bakterien mit den humanen Zellen haben. Für *A. baumannii* wurde eine Bindung an VCAM-1, ICAM-1 und ICAM-2 beobachtet, wobei der Einfluss von Ata nur geringfügig zu erkennen und ausschließlich für VCAM-1 bzw. ICAM-2 zu beobachten war. Die Interaktion des Bakteriums mit den interzellulären Adhäsionsmolekülen lässt jedoch Rückschlüsse zu, dass diese für eine Bindung von *A. baumannii* wichtig sein könnten. Nähere Untersuchungen hierzu sind demnach unabdingbar.

4.3 *A. baumannii* bindet über Ata an eine Vielzahl von humanen Wirtszellen

In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass *A. baumannii* an humane Epithelzellen bindet [67, 74, 76, 79, 223] und mit anderen humanen Wirtszellen wie beispielsweise dendritischen Zellen interagiert [74]. Das Auftreten von *A. baumannii*-assoziierten Blutstrom- oder Wundinfektionen [224–226] lässt jedoch vermuten, dass das Bakterium neben Epithelzellen auch mit humanen Endothelzellen interagiert. Hierzu sind noch keine Studien bekannt. Weiterhin sind Adhäsine, die eine Bindung an humane Wirtszellen vermitteln in der Literatur nur wenig beschrieben. Für das Membranprotein OmpA wurde gezeigt, dass es an der Bindung von *A. baumannii* an Epithelzellen beteiligt ist [76]. Ein weiteres bekanntes Adhäsionsprotein von *A. baumannii* ist das Biofilm-assoziierte Protein Bap, welches ebenso wie OmpA die Bindung der Bakterien an Epithelzellen unterstützt [223]. Weiterhin vermitteln zwei Fibronectin-bindenden Proteine, der TonB-abhängige Kupferrezeptor und das 34 kDa Membranprotein OMP34 von *A. baumannii* die Adhäsion der Bakterien an humane Zellen [78]. Von trimeren Autotransporter Adhäsinen anderer Gram-negativer Bakterien ist bekannt, dass

diese maßgeblich für die Wirtszelladhäsion verantwortlich sind. Beispielsweise vermittelt BadA (*B. henselae*) die Bindung an Endothelzellen [132, 220] und YadA von *Yersinia* sp. an Hep-2-Epithelzellen [130, 219].

Im Hinblick auf die biologische Funktion von Ata gibt es keine Kenntnisse darüber, inwieweit das Protein an der Adhäsion von *A. baumannii* an humane Wirtszellen beteiligt ist. Zudem fehlen vergleichende Studien zur Bindungseffizienz von *A. baumannii* an humane Zellen unterschiedlichsten Ursprungs. Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Ata-vermittelten Adhärenz von *A. baumannii* an humane Epithel- und Endothelzellen, wodurch es zum ersten Mal möglich war, die Adhäsionsfähigkeit der Bakterien sowohl in Abhängigkeit von Ata als auch in Abhängigkeit verschiedener humaner Wirtszelltypen (HUVECS, HMEC-1, HDMEC, A549, HeLa bzw. HepG-2) zu analysieren. Die Ata-abhängige Adhäsion von *A. baumannii* an Endothel- und Epithelzellen konnte zunächst qualitativ mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie beobachtet (**Abbildung 17**) und danach mittels qRT-PCR quantifiziert werden (**Abbildung 18**), wobei die Adhäsionsraten von WT an Endothelzellen durchschnittlich 5x höher als für Epithelzellen waren. Lediglich für HeLa-Zellen wurde eine zu den Endothelzellen vergleichbare Adhäsionsrate beschrieben. In einer früheren Studie wurden verschiedene *A. baumannii*-Stämme hinsichtlich ihrer Adhäsionsrate an humane Lungenepithelzellen (NCI-H292) mikroskopisch untersucht [74]. Dabei wiesen die verschiedenen Bakterienstämme Bindungsraten von 1,42 bis 8,56 Bakterien/Zelle auf, wobei ein Großteil der untersuchten Stämme geringe Adhäsionseffizienzen von weniger als 3,0 Bakterien/Zelle zeigten, sodass diese Ergebnisse vergleichbar mit den in dieser Arbeit bestimmten Adhäsionsraten an humane Epithelzellen sind. Ein Vergleich zu Studiendaten hinsichtlich der Adhäsion von *A. baumannii* an Endothelzellen ist aufgrund fehlender Untersuchungen nicht möglich, jedoch wurde das Phänomen der unterschiedlichen Adhäsionsraten bei Endothel- und Epithelzellen auch bei *N. meningitidis* beobachtet. In einer Studie wurde die Bindung der Bakterien in Abhängigkeit der Expression verschiedener Pili untersucht [227]. Dabei adhärten die Bakterien mit einer stark erhöhten Präferenz an Endothelzellen mit einer Adhäsionsrate von ca. 50 Bakterien/Zelle. Demgegenüber war die Adhäsion an Epithelzellen vermindert und be-

trug 10-20 Bakterien/Zelle. Dies impliziert, dass es bestimmte Mechanismen geben muss, die einen Zelltropismus bedingen. Dieser Zelltropismus wäre auch für *A. baumannii* denkbar.

Im Hinblick auf die Rolle von Ata bei der Adhäsion der Bakterien zeigte sich bei den Ata-defizienten Stämmen Δata und $\Delta ata(p)$ bei jeder untersuchten humanen Zelle eine Verminderung der Adhärenz. Bei HUVECs verringerte sich beispielsweise die Anzahl der adhärenenten Bakterien um das 11-fache. Außerdem wurde gezeigt, dass die Adhäsionsrate von WT durch Komplementation von *ata* in $\Delta ata(c)$ wiederhergestellt werden konnte, sodass die Ergebnisse eindeutig auf die Funktion von Ata als Adhäsionsmolekül bei der Interaktion von *A. baumannii* mit humanen Zellen zurückzuführen sind.

Nach den ersten Erkenntnissen zu den Adhäsionsfähigkeiten von *A. baumannii* lässt sich folgendes Modell beschreiben (**Abbildung 39**): Demzufolge gelangt das Bakterium über verschiedene Möglichkeiten wie beispielsweise Wunden oder Kathetereinstichstellen in den menschlichen Körper. Unter anderem kann es sich durch den Blutstrom im Körper ausbreiten, um dann über Ata mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix zu interagieren. Nach der initialen Bindung erfolgt die Adhäsion an die Wirtszelle, die wahrscheinlich über oberflächenassoziierte Proteine (bspw. Integrine) stattfindet. *A. baumannii* zeigt hierbei eine höhere Affinität zu Endothelzellen als zu Epithelzellen.

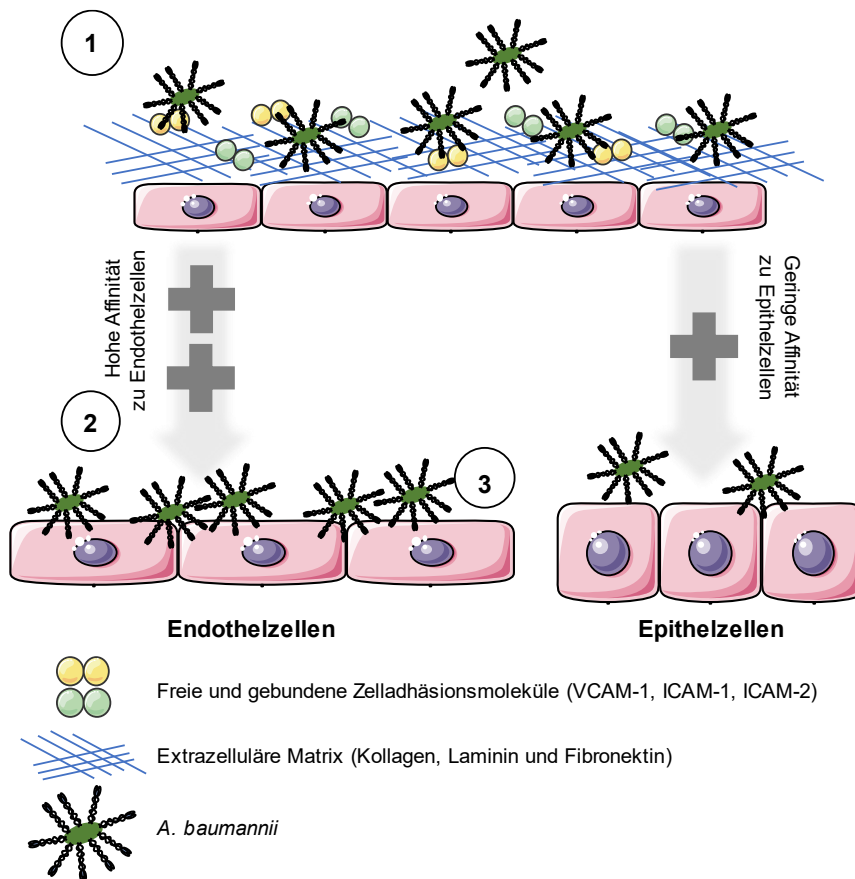


Abbildung 39. Modell zur Beschreibung der biologischen Funktion von Ata in *A. baumannii*. (1) Nachdem das Bakterium über Ata einen ersten Kontakt zur extrazellulären Matrix der Wirtszelle aufbauen konnte, gelangt es zur Wirtszelloberfläche. (2) Hierbei zeigt *A. baumannii* im Vergleich zu Epithelzellen eine erhöhte Präferenz gegenüber Endothelzellen. (3) An der Oberfläche der Zellen bindet das Bakterium über Ata an noch nicht bekannte Liganden.

4.3.1 Scherkräfte im dynamischen Infektionsprozess haben einen Einfluss auf die Adhäsion von *A. baumannii*

Bei einer Blutstrominfektion beeinflussen die Strömungsverhältnisse in den Gefäßen die Adhäsionsfähigkeit der Bakterien, da diese die physikalische Barriere der Blutströmung überwinden müssen [228]. Um die Auswirkungen dieser Scherkräfte bei der Etablierung einer bakteriellen Infektion zu beurteilen, bedarf es an *in vitro* Modellen, die eine Infektion unter Flussbedingungen erlauben. In diesem Zusammenhang wurde im Jahr 2011 ein Infektionsmodell etabliert, welches es ermöglichte die TAA-abhängige Adhärenz von beispielsweise *B. henselae* an humane Endothelzellen unter Flussbedingungen zu untersuchen [220]. Hierfür wurde eine Durchflusszellkammer verwendet, in welcher die Kultivierung der humanen Zellen und auch deren Infektion mit den Bakterien stattfand. Weiterhin entwickelten Forscher ein *in vivo* Infektionsmodell, welches zur Nachahmung von Blutstrominfektionen in Mäusen dient [228]. In dieser Arbeit wurde das Modell

nach Müller *et al.* [220] für die Infektion von humanen Zellen mit *A. baumannii* adaptiert. Die Infektion der Wirtszellen erfolgte unter einer konstanten Flussrate von 0,2 ml/min, was einem Scherdruck von ca. 0,26 dyn/cm² entspricht. Im menschlichen Körper variiert der Scherdruck je nach Gefäß. So beträgt dieser Wert in Venen ca. 2 dyn/cm² und in Arterien ca. 6 dyn/cm², kann aber auch in Kapillargefäßen auf bis zu 0,004 dyn/cm² sinken [229]. Der Scherdruck von 0,26 dyn/cm², der für die Infektion der Zellen in dieser Arbeit verwendet wurde, entspricht den physiologischen Bedingungen in feinen Kapillargefäßen. In der Studie von 2011 wurde unter anderem die TAA-abhängige Adhäsionsfähigkeit von *B. henselae* (BadA), *B. quintana* (BadA) und *Y. enterocolitica* (YadA) unter dynamischen Infektionsbedingungen untersucht [220]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der adhärenenten Bakterien im Vergleich zur statischen *in vitro* Infektion von humanen Zellen stark vermindert war. Für *B. henselae* wurden 50 Bakterien/Zelle unter statischen Infektionsbedingungen beschrieben, die sich auf ca. 3 Bakterien/Zelle unter Flussbedingungen reduzierten. Zudem war der Unterschied zwischen der Anzahl von adhärenenten *badA*-exprimierenden und nicht-exprimierenden Bakterien weitaus größer als unter statischen Infektionsbedingungen [220]. Die vorhandenen Scherkräfte könnten die Bildung von bakteriellen Agglomeraten hemmen und somit zur Reduktion der gebundenen Bakterien beitragen. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die dynamische Infektion von Endothelzellen und Epithelzellen mit *A. baumannii* beobachtet (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Fluoreszenzmikroskopisch war im Vergleich zur statischen Infektion eine deutliche, Ata-unabhängige Abnahme von adhärenenten Bakterien zu erkennen. Im Vergleich zur statischen Infektion zeigte sich eine Abnahme der Adhärenz bei allen getesteten humanen Wirtszellen. Lediglich bei der dynamischen Infektion von A549 erhöhte sich die Anzahl der adhärenenten Bakterien im Vergleich zur statischen Infektion. Eine Ursache hierfür könnten morphologische Veränderungen der Wirtszelle sein. Es ist bekannt, dass durch Scherkräfte verschiedenste molekulare Mechanismen induziert werden, die dadurch den Phänotyp von humanen Zellen beeinflussen [230]. Diese morphologischen Veränderungen könnten wiederum einen Einfluss auf die Adhäsionsraten der Bakterien haben, da unter anderem bestimmte Oberflächen-assoziierte Proteine der Wirtszelle, die wiederum für die Adhäsion der Bakterien wichtig sind, reguliert werden.

Der signifikante, Ata-abhängige Unterschied in der Anzahl der gebundenen Bakterien war nichtsdestotrotz für jeden humanen Zelltyp erkennbar, sodass der trimerer Autotransporter auch unter dynamischen Infektionsbedingungen maßgeblich an der Adhäsion von *A. baumannii* beteiligt ist.

4.3.2 Die Blockierung von α - und β -Integrinen führt zur Reduktion der Adhäsion von *A. baumannii*

Integrine, die wichtig für den Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakt sind, stellen für pathogene Bakterien eine Möglichkeit der Bindung an humane Wirtszellen dar. Dies kann über eine direkte Bindung des Integrins erfolgen [231–233] oder indirekt über einer Brückenbindung mit extrazellulären Matrixproteinen [222, 234, 235]. Interessanterweise wurde eine Bindung von *A. baumannii* an die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und ICAM-2 beobachtet (**Abbildung 16**). Die Rezeptoren dieser Moleküle auf der Zelloberfläche sind Integrine. VCAM-1 bindet an das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin und ICAM-1/2 binden an das $\alpha_L\beta_2$ -Integrin. Für den trimeren Autotransporter YadA von *Yersinia* sp. ist bekannt, dass dieser über eine Fibronectin-Integrin-Brückenbindung an humane Wirtszellen adhärirt [219, 236]. Ein ähnliche Funktion wurde auch NadA aus *N. meningitidis* zugeschrieben [222]. Es bestand also der Verdacht, dass auch *A. baumannii* durch Ata über einen vergleichbaren Mechanismus an die Wirtszelle bindet. Aus diesem Grund wurden Adhäsionsversuche mit Integrin α_4 - und β_1 -neutralisierenden Antikörpern durchgeführt (**Abbildung 21**). Dabei zeigte sich, dass sich die Adhäsionsfähigkeit von WT bei blockierten α_4 -bzw. β_1 -Integrinen um ca. die Hälfte reduziert und somit auf das Niveau von Δata sinkt. Bei der Inhibition beider Integrine zeigte sich eine weitere Reduktion der bakteriellen Adhärenz. Demnach könnten sowohl das α_4 -Integrin als auch das β_1 -Integrin im Zusammenhang mit der Ata-vermittelten Adhäsion von *A. baumannii* an die Wirtszelle stehen. Die gleichzeitige Inhibition von $\alpha_4\beta_1$ -Integrin reduzierte die Adhäsion nicht nur beim WT sondern auch bei Δata , was auf weitere Adhäsine von *A. baumannii* hindeutet, die mit Integrinen wechselwirken.

Letztlich wurde gezeigt, dass die Blockierung der oberflächenassoziierten Integrine α_4 und β_1 zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsionsfähigkeit bei

A. baumannii führt und dass dieses Phänomen höchstwahrscheinlich auf der Interaktion von Ata mit den entsprechenden Integrinen beruht. Im Kontext des bisherigen Wissensstandes zur Interaktion von trimeren Autotransportern wie YadA und NadA mit Integrinen, stellen die gemachten Beobachtungen also einen interessanten Ansatz für weitere Forschungsarbeiten dar.

4.3.3 Das humane *ex vivo* Organinfektionsmodell zur Untersuchung der Ata-abhängigen Adhäsion von *A. baumannii*

Nach Analyse der Ata-vermittelten Adhäsion, sollte im nächsten Schritt die Interaktion des Bakteriums mit humanem Gewebe untersucht werden. Hierfür wurde ein neuartiges humanes *ex vivo* Infektionsmodell unter Verwendung von menschlichen Nabelschnurvenen entwickelt, welches eine Infektion unter dynamischen und somit sehr naturnahen Bedingungen ermöglicht. Obwohl zellkulturbasierte statische und dynamische Infektionsmodelle heutzutage in der zellulären Mikrobiologie und Pathogenitätsforschung eine breite Akzeptanz genießen, so spiegeln diese die natürlichen Bedingungen nur teilweise wider. Die dynamischen *in vitro* Adhäsionsversuche sind auf eine Zelllinie limitiert, die zudem in einer künstlichen Umgebung (Zellkulturschalen etc.) kultiviert wird. Dies führt zum Fehlen der natürlichen Gewebekomplexität wie beispielsweise der ausgeprägten Zell-Zell-Adhäsion, der extrazellulären Matrix, dem Gemisch verschiedener Zellarten im Gewebe oder der Elastizität von menschlichen Gefäßen. Bei der Kultivierung der humanen Zellen *in vitro* werden unter anderem Wachstumsfaktoren wie fetales Kälberserum oder Wachstumshormone eingesetzt. Zudem werden die Zellkulturen häufig mehrmals passagiert. Es ist davon auszugehen, dass beides zu morphologischen Änderungen der Zellen führen kann, die die spezifischen Charakteristika der Zelllinie beeinflussen.

Zwar gibt es Studien, die beispielsweise das Infektionsgeschehen von Spirochäten im lebenden Wirt in Echtzeit beobachten [237], jedoch sind diese Methoden sehr arbeitsaufwändig und meist an den murinen Wirt gebunden. Dies macht wiederum den Transfer der Ergebnisse zum menschlichen Körper schwierig. Das zeigte unter anderem eine Studie aus dem Jahr 2013, in welcher die inflammatorische Wirtsantwort auf verschiedene Stimuli sowohl bei der Maus als auch beim Menschen untersucht wurde [238]. Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse

fürten die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass das Mausmodell die menschlichen Gegebenheiten nur in einem sehr geringen Umfang nachbilden kann.

Um diese Limitationen zu überwinden, wurden in der vorliegenden Arbeit menschliche Nabelschnurvenen verwendet, um diese mit *A. baumannii* zu infizieren und Aussagen über die Ata-abhängige Adhäsion zu erhalten. Die Infektion erfolgte bei durchschnittlich $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ unter laminaren Flussbedingungen, was mittels mikro-CT und Doppler-Untersuchungen verifiziert wurde (**Abbildung 23**). Diese Strömungsverhältnisse lassen sich auf den menschlichen Körper gut übertragen und ähneln den Scherkräften in den feinen Kapillargefäßen [229]. Außerdem bietet die Verwendung von humanen Nabelschnurvenen weitere Vorteile: (1) Die Beschaffung des Arbeitsmaterials (Nabelschnüre) ist in Deutschland mit 690 Entbindungsstationen gegeben (Stand 2016, [239]). (2) Durch die laminare Struktur der Vene ermöglicht das Gefäß unter Versuchsbedingungen eine konstante Flussrate und Scherkraft (**Abbildung 22**). (3) Die Verwendung von menschlichen Nabelschnurvenen ist nach Aufklärung der Spenderin ethisch unbedenklich. (4) Letztlich reduziert das Modell die Verwendung von Tierversuchen (Auszeichnung mit dem Felix-Wankel-Tierschutzpreis im Jahr 2017, [240]).

Im Vergleich zum dynamischen *in vitro* Infektionsmodell waren die beobachteten Adhäsionsraten im *ex vivo* Modell ca. 6-fach höher. Dies ist wohlmöglich mit dem Vorhandensein von zusätzlichen physiologischen Bindungspartnern zu erklären.

Zusammenfassend betrachtet, stellt das entwickelte *ex vivo* Organinfektionsmodell ein vielversprechendes und nützliches Werkzeug für die Untersuchung der Adhäsion verschiedenster pathogener Bakterien dar. Es wäre denkbar, dass Modell weiterzuentwickeln und auch zur Untersuchung der Wirtszellantwort zu verwenden.

4.4 *A. baumannii* zeigt eine Ata-vermittelte Invasion in humane Endothel- und Epithelzellen

Die Möglichkeit der Invasion von pathogenen Bakterien in ihre Wirtszelle stellt einen wichtigen Mechanismus bei der Etablierung einer erfolgreichen Infektion

dar. Die Aufnahme der Bakterien in die Zelle kann u.a. mittels Phagozytose stattfinden [241]. In der Zelle kann sich das Bakterium replizieren oder über Aktin-basierten Mechanismen von Zelle zu Zelle ausbreiten [242].

In der Literatur sind zahlreiche Virulenzfaktoren verschiedenster Bakterien-spezies beschrieben, die die passive oder aktive Aufnahme der Erreger in die Zelle vermitteln. So wurde beispielsweise für *Listeria monocytogenes* das Protein InlA beschrieben, welches mit humanen E-Cadherinen interagiert und somit zur Invasion des Bakteriums beiträgt [243]. Bei *Salmonella sp.* übernimmt das Typ-III-Sekretionssystem diese Funktion: Durch die Injektion von Effektorproteinen in die Wirtszelle durch das Typ-III-Sekretionssystem wird eine dauerhafte Verbindung zwischen dem bakteriellen und eukaryotischen Zytoplasma hergestellt [244]. *Y. pseudotuberculosis* hingegen gelangt in die Wirtszelle über einen Zipper-Mechanismus. Das Membranprotein Invasin bindet an β_1 -Integrine der humanen Zelle, was zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts führt und somit zu Aufnahme des Bakteriums [245, 246].

Von *A. baumannii* weiß man, dass dieser in humane Epithelzellen invadieren kann [79, 209, 247, 248], aber nur wenige Virulenzfaktoren sind bekannt, die am Invasionsmechanismus beteiligt sind. Hierzu zählen das Membranprotein OmpA, die Phospholipase D und der Transkriptionsfaktor EB [79, 171, 209, 248]. In anderen Spezies konnte gezeigt werden, dass auch trimere Autotransporter an der Invasion der jeweiligen Bakterien beteiligt sind. Beispielsweise in *P. mirabilis* wurden diesbezüglich die beiden TAAs AipA und TaaP identifiziert [221].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ata-abhängige Invasion von *A. baumannii* in humane Endothel- und Epithelzellen analysiert (**Abbildung 25**). Es zeigten sich Invasionsraten von 3,1 % für HUVECs und 2,9 % für A549. Dabei gilt zu bedenken, dass die erhöhten Invasionsraten auf die erhöhte Adhärenz des WT ganz oder zumindest zum Teil zurückzuführen sind. Im Vergleich zu einer anderen Studie, in welcher die Invasion in NCI-H292-Zellen untersucht wurde, sind die Werte für die WT-Invasion in A549 um ein dreifaches höher [79]. Dies ist wohlmöglich durch die unterschiedlichen Zelltypen zu begründen. Vergleichsdaten zur Invasion von *A. baumannii* in Endothelzellen sind nicht vorhanden. Der Versuch stellt somit die Erstbeschreibung von intrazelluläre vorliegenden

A. baumannii in HUVECs dar. Zusätzlich wird diese These durch die Muldenbildung von *A. baumannii* auf den humanen Zellen, die elektronenmikroskopisch zu erkennen ist, gestützt (**Abbildung 17**). Diese Beobachtung könnte ein frühes Stadium im Invasionsgeschehen kennzeichnen, da es an die Einstülpung der Zellmembran bei der Aufnahme von *Y. pseudotuberculosis* erinnert [151]. Somit könnte Ata bei der Invasion in die humane Wirtszelle eine YadA-ähnliche Funktion einnehmen. YadA bei *Y. pseudotuberculosis* vermittelt über eine direkte Interaktion mit Fibronektin (*Bridging*) die Invasion in die humane Wirtszelle [151]. Diese erfolgt unabhängig vom Invasin des Bakteriums, was vornehmlich die Invasion in die Wirtszelle steuert [151]. Die Aktivierung der β_1 -Integrin-gesteuerten Kaskade führt zur Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und somit zur Aufnahme der Bakterien in das Zellinnere. Da auch *A. baumannii* über Ata an Fibronektin und an das β_1 -Integrin bindet, wäre ein vergleichbarer Invasionsmechanismus für *A. baumannii* denkbar - nähere Untersuchungen zur Aufklärung sind jedoch noch ausstehend.

In diesem Kontext wäre ein hypothetisches Modell zur Funktionsweise von Ata bei der Infektion menschlicher Zellen durch *A. baumannii*: Nach dem initialen Kontakt zum Wirt über Bestandteile der extrazellulären Matrix adhärert *A. baumannii* wohlmöglich über eine Interaktion mit Zelloberflächen-assoziierten Integrinen.

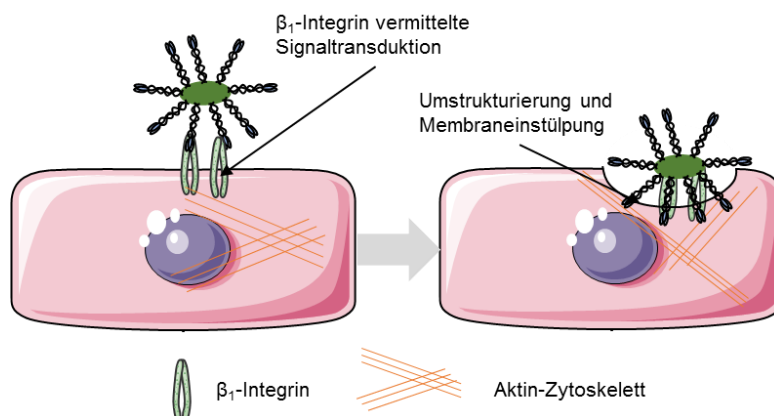


Abbildung 40. Modell zur Ata-vermittelten Invasion von *A. baumannii* in die humane Wirtszelle. Nach der initialen Adhäsion des Bakteriums an die humane Zelle interagiert Ata über einen YadA-ähnlichen Mechanismus mit β_1 -Integrinen auf der Oberfläche der Wirtszelle. Dadurch wird eine Signaltransduktion hin zum Aktin-Zytoskelett gestartet, die zu dessen Umstrukturierung führt. Hierdurch kommt es zur Membraneinstülpung und somit zur Aufnahme des Bakteriums in die Zelle.

Über einen *Bridging*-Mechanismus zwischen Fibronectin und β_1 -Integrinen kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, die die intrazelluläre Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zur Folge hat und somit zur teilweisen Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle beiträgt (**Abbildung 40**).

4.5 Die Infektion von humanen Endothelzellen mit *A. baumannii* führt zu einer inflammatorischen Wirtszellantwort

Werden humane Zellen von Bakterien infiziert, sezernieren diese inflammatorischen Zytokine und Chemokine [249]. Diese Botenstoffe werden von einer Vielzahl von Zelltypen produziert und nehmen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, bei der interzellulären Kommunikation oder Zellmigration ein [250]. Zu den wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokinen zählen IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 und TGF- β [251].

Bakterielle Infektionen führen häufig zu speziesspezifischen Zytokinmuster, die durch die betroffenen Zellen freigesetzt werden. So führt eine Infektion von HUVECs mit *Bartonella sp.* zur Induktion von TNF- α , IL-6, VEGF und HIF-1 α [139, 140, 252]. Demgegenüber zeigt *Yersinia sp.* eine spezifische YadA-abhängige Induktion von IL-8 in Epithelzellen [155, 253]. In *A. baumannii* führt die Infektion von Epithelzellen zu einer Produktion von IL-6 und IL-8 [61]. Weiterhin ist bekannt, dass Membranvesikel von *A. baumannii* zur Ausschüttung von IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α und MCP-1 führen [254]. Aufgrund der Größe von Ata und der damit verbundenen Immundominanz auf der bakteriellen Oberfläche war davon auszugehen, dass auch Ata an der Induktion von inflammatorischen Zytokinen beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde die Konzentration von zwölf Zytokinen und Chemokinen nach der Infektion von humanen Endothelzellen bestimmt (**Abbildung 26**).

Ata vermittelte, ähnlich wie BadA und YadA, eine zeitabhängige Induktion von IL-6 und IL-8 in Endothelzellen. Hierbei erfolgte die Sekretion von IL-6 zu einem späten Zeitpunkt (Maximum nach 14 h) der Infektion, wohingegen IL-8 sehr viel früher (8 h) ausgeschüttet wurde (**Abbildung 27**). Der genaue Mechanismus der

Interleukin-Induktion ist jedoch noch nicht bekannt, sodass weitere Studien diesbezüglich notwendig sind. Da die Induktion dieser beiden Interleukine hauptsächlich über Toll-like Rezeptoren aktiviert wird [255], ist zu vermuten, dass auch Ata über einen vergleichbaren Mechanismus wirkt.

Physiologisch betrachtet, ist die Ausschüttung von Interleukinen von entscheidender Bedeutung in der Immunantwort der Zelle gegen beispielsweise eingedrungene pathogene Bakterien. Ein Anstieg der IL-6-Konzentration führt zur Rekrutierung von mononuklearen Immunzellen wie B-, T- und NK-Zellen [256]. In vergleichbarer Weise wirkt IL-8, das unter anderem für die Aktivierung von Immunzellen (neutrophilen Granulozyten) verantwortlich ist [257]. Da Ata die Induktion dieser beiden Interleukine steuert, wurde weiter die Aktivierung von Immunzellen durch ein THP-1-Migrationsassay untersucht (**Abbildung 28**). Makrophagen (ausdifferenzierte Monozyten) spielen neben neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle in der frühen Immunantwort des Wirts bei einer *A. baumannii*-Infektion [258]. THP-1-Monozyten sind dafür bekannt, nach beispielsweise Toll-like Rezeptor-vermittelten Stimuli durch pathogene Bakterien rasch aktiviert zu werden, was wiederum zur Migration der Zellen zum Infektionssort führt [259]. Eine Monozyten-Aktivierung in Folge einer *A. baumannii*-Infektion wurde bereits in früheren Studien gezeigt. So konnte beobachtet werden, dass das LPS von *A. baumannii* über einen Toll-like Rezeptor 4 vermittelten Mechanismus zu einer Stimulation der Immunzellen führt [260]. Interessanterweise, konnte auch für den trimere Autotransporter Apa2 von *Actinobacillus pleuropneumoniae* ein Zusammenhang mit der Aktivierung von Immunzellen beschrieben werden. Die Kopfdomäne des Proteins führt zu einer Stimulation von Knochenmarks-assoziierten Neutrophilen in der Maus [261]. Zur Untersuchung der THP-1-Migration wurden in der vorliegenden Arbeit HUVECs mit WT und Δ ata über einen Zeitraum von 14 h inkubiert und der Überstand der infizierten Zellen als Chemoattraktans zur Untersuchung der THP-1-Migration verwendet. Die erhöhte Migrationsrate bei WT-infizierten HUVECs lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein von Ata nicht nur zu einer spezifischen IL-6- bzw. IL-8-Induktion führt, sondern darüber hinaus auch die Aktivierung von THP-1-Zellen stimuliert. Es ist davon auszugehen, dass neben den durch Ata induzierten Interleukinen auch andere Signalstoffe von den Endothelzellen freigegeben werden. Ein Indiz dafür könnten die geringfügig erhöhte Menge an MIP-1 α sein, die nach

einer vierstündigen Inkubation von HUVECs mit *A. baumannii* detektiert wurde (**Abbildung 26**).

Zur Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse zur THP-1-Aktivierung wurde ein *in vivo* Versuch unter Verwendung von *G. mellonella* durchgeführt. Die Larven besitzen eine zu den menschlichen Phagozyten vergleichbare Zellart, die Hämözyten [181]. Durch den Nachweis der Hämözytenaktivierung in der Larve lassen sich Rückschlüsse auf die Immunantwort ziehen. Dies konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden [262, 263]. Zudem eignet sich das *G. mellonella*-Infektionsmodell gut zur Untersuchung von *A. baumannii*-Infektionen [124].

In einem ersten Versuch wurde das Überleben von *A. baumannii* WT und Δ ata in der Larve von *G. mellonella* untersucht (**Abbildung 29 A**). Hierbei zeigten sich signifikant unterschiedliche Überlebensraten zwischen den beiden Bakterienstämmen. Das Überleben von WT war stets höher als von Δ ata. Es ist davon auszugehen, dass Ata einen Überlebensvorteil der Bakterien in der Larve bietet. Denkbar wäre eine Maskierung der Bakterien durch Ata, um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. In diesem Zusammenhang wurde auch für BadA von *B. henselae* und YadA von *Y. enterocolitica* beschrieben, dass diese TAAs in der Lage sind das Immunsystem zu umgehen bzw. eine Resistenz gegen das humane Komplementsystem und Phagozytose zu vermitteln [131, 133, 140, 151, 152, 155, 210, 211].

Im Weiteren wurde die Aktivierung der Hämözyten in *G. mellonella* untersucht (**Abbildung 29 B**). Hierbei zeigte sich ein Anstieg der Hämözytenzahl sowohl für WT als auch für Δ ata nach 24 h, die bis 48 h annähernd konstant und stets höher für WT war. Erst nach 72 h war ein Rückgang der Zellzahl zu beobachten. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Ata und der Anzahl an Hämözyten in der Larve beobachtet werden. Es ist zu spekulieren, ob der Anstieg der Hämözytenzahl direkt durch Ata verursacht wird oder ob die potenzielle Funktion von Ata als Phagozytose-inhibierendes Protein dafür verantwortlich ist. Physiologisch betrachtet ist die zweite Option plausibel. Zum einen zeigten beide Stämme eine Erhöhung der Hämözytenzahl und zum anderen war der Verlauf der Kurven von WT und Δ ata, ungeachtet dessen, dass die Einzelwerte unterschiedlich waren, identisch. Es ist somit davon auszugehen, dass die

Hämozytenzahl, bedingt durch die protektive Eigenschaft von Ata, bei WT höher war als bei Δata . Die durch die Hämozyten hervorgerufene Phagozytose wird durch das Fehlen von Ata beim Deletionsstamm begünstigt, wohingegen eine größere Anzahl von Phagozyten zur erfolgreichen Bekämpfung von WT erforderlich sind. Diese Hypothese wird vor allem im Hinblick auf die stark verringerte Viabilität von Δata in *G. mellonella* bekräftigt.

Ata vermittelt neben der initialen Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und Wirtszelle auch die teilweise Invasion der Bakterien über einen YadA-ähnlichen β_1 -Integrin gesteuerten Mechanismus. Nach persistierender Infektion über einen Zeitraum von bis zu 14 h stimuliert *A. baumannii* über Ata die Ausschüttung von IL-6 und IL-8. Zudem wird ein Anstieg von MIP-1 α beobachtet. Die Sekretion der Zytokine und Chemokine wirkt auf die Rekrutierung von humanen Immunzellen (THP-1 und Phagozyten). Es ist zu vermuten, dass der trimere Autotransporter eine Resistenz gegenüber phagozytischen Zellen vermittelt und somit eine erhöhte Viabilität *in vivo* bezweckt (**Abbildung 41**).

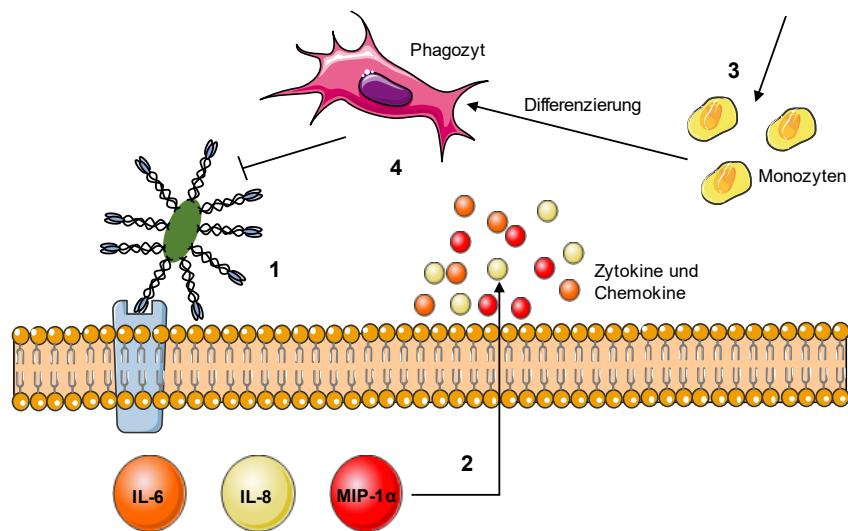


Abbildung 41. Modell zur Induktion von Zytokinen bzw. Chemokinen durch *A. baumannii*. (1) Das Bakterium bindet an die humane Wirtszelle und induziert über einen Toll-like-Rezeptor-gesteuerten Mechanismus die Synthese inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-6, IL-8 und MIP-1 α . (2) Die synthetisierten Proteine werden segregiert und führen (3) zur Migration von Monozyten. (4) Am Ort der Infektion differenzieren die Monozyten zu Phagozyten.

4.6 Ata wirkt inhibierend auf das humane Komplementsystem

Im Zusammenhang der zuvor beschriebenen Beobachtungen konnte für *A. baumannii* eine Ata-vermittelte Serumresistenz der Bakterien gezeigt werden

(**Abbildung 30**). Das humane Komplementsystem spielt in der primären Immunabwehr von Pathogenen eine entscheidende Rolle. Es besteht aus einer Vielzahl von Proteinfaktoren, die über bestimmte Erkennungsmuster auf der Oberfläche der eingedrungenen Pathogenen binden. Hierdurch wird die Komplement-Kaskade aktiviert und führt dazu, dass die Erreger opsoniert und schließlich eliminiert werden [183]. In einer früheren Studie wurden diverse *A. baumannii*-Stämme hinsichtlich ihrer Serumresistenz untersucht, wobei sich sowohl serumsensible als auch serumresistente Stämme zeigten [198]. Durch Verwendung von Faktor-C2-depletierten Serum konnte demonstriert werden, dass die Aktivierung des Komplementsystems durch *Acinetobacter* über den alternativen Weg geschieht, was durch andere experimentelle Modelle verifiziert werden konnte [197]. Die molekularen Mechanismen der Komplementresistenz sind weitestgehend unbekannt. Es konnte die Bindung von Faktor H an der Oberfläche der Bakterien sowie die Bindung von Plasminogen über das Membranprotein CipA demonstriert werden, was letztlich zu einer Serumresistenz führt [87, 197].

Für *A. baumannii* ATCC 19606 wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der Erreger durch das Vorhandensein von Ata eine erhöhte Viabilität im humanen Serum aufweist. Es wurde beobachtet, dass eine Konzentration von 30 % NHS nur einen geringen Einfluss auf das Überleben des WT-Stammes hat. Dies entspricht in etwa den Daten aus einer früheren Studie, in welcher ebenfalls das Überleben von *A. baumannii* ATCC 19606 in NHS in Abhängigkeit des Plasminogen-bindenden Proteins CipA untersucht wurde [87]. Die Autoren detektierten eine Überlebensrate von *A. baumannii* ATCC 19606 von ca. 75 % bei einer NHS-Konzentration von 30 %, die beim CipA-defizienten Stamm auf < 1 % sank. [87] Auch bei Δ ata reduzierte sich die Viabilität bei einer NHS-Konzentration von 30 % auf 11,0 %. Dies lässt darauf schließen, dass Ata eine Resistenz gegenüber humanem Serum bewirkt, was durch die TAA-vermittelte Serumresistenz anderer Spezies gestützt wird. So bewirkt beispielsweise YadA bei *Yersinia sp.* durch die Bindung von Faktor C3b eine Serumresistenz [153, 264] und UspA1 von *M. catarrhalis* bindet ähnlich wie CipA Plasminogen und vermittelt somit eine Resistenz gegenüber dem humanen Komplementsystem [265].

Vorangegangene Studien untersuchten auch die Beteiligung der verschiedenen Komplement-Aktivierungswege. Es konnte gezeigt werden, dass die Bakterien

Faktor H auf ihrer Oberfläche binden [198]. Dieses Glykoprotein spielt als negativ-regulierender Faktor eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der alternativen Komplementkaskade. Weiterhin wurde die C3-Deposition und -Spaltung auf den verwendeten *A. baumannii* Isolaten untersucht, wobei C3 einen weiteren wichtigen Regulator bei der Aktivierung des Komplementsystems darstellt. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass im Gegensatz zu serumsensiblen Stämmen C3 auf serum-resistenten Stämmen weder abgelagert noch gespalten wird [198]. Demzufolge inhibieren serum-resistente *A. baumannii* die Aktivierung des alternativen Weges an einem primären Schritt: Entweder indem die Bakterien die C3-Deposition auf ihrer Oberfläche verhindern oder indem sie die C3-Konvertase, die für die Spaltung von C3 verantwortlich ist, inhibieren [198]. Im Kontext dieser Erkenntnisse zur Serumresistenz von *A. baumannii* wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Beteiligung des alternativen Komplementweges untersucht (**Abbildung 31**). Durch die Verwendung von Mg-EGTA-behandelten und Faktor-B-depletierten NHS konnte gezeigt werden, dass das Überleben von *A. baumannii* vom alternativen Weg abhängig ist. So zeigte sich eine Reduktion des Überlebens beider Bakterienstämme auf unter 1 % bei inhibiertem klassischem bzw. Lektin-Weg. Demgegenüber konnte eine 100%ige Überlebensrate von WT und Δata nach Inaktivierung des alternativen Weges nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen, die zur Inaktivierung des alternativen Weges führen, sind unklar. Es wäre denkbar, dass Ata ähnlich wie YadA C3b bindet [153, 264] und somit zur Resistenz gegenüber dem humanen Komplementsystem beiträgt – hierfür sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

4.7 *A. baumannii* induziert eine Ata-abhängige Apoptose über die Caspasen 3 und 7

Bakterielle Infektionen können zur Aktivierung des programmierten Zelltodes im Wirt führen, wodurch Bakterien beispielsweise Immunzellen des Wirts zerstören und sich damit das eigene Überleben im menschlichen Körper sichern [266]. Beim Zelltod unterscheidet man zwischen Apoptose, Nekrose, Onkose, Pyroptose und Autophagie [267]. Durch die Apoptose wird die Zelle daran gehindert zu wachsen und sich zu teilen, was letztlich im Zelltod endet. Die Induktion der Apoptose kann über zwei Aktivierungsschritte verlaufen: den intrinsischen und

den extrinsischen Weg [268, 269]. Dabei ist die Apoptose streng reguliert und wird unter anderem über Cystein-Aspartam-Proteasen (Caspasen) gesteuert. Man unterscheidet zwischen initialen und ausführenden Caspasen [204]. Hierbei spielen die Caspasen 8 und 9, als initiale Caspasen, und die Caspasen 3, 6 und 7, als ausführende Caspasen eine wichtige Rolle. Über verschiedene Schritte wird unter anderem durch die Aktivierung dieser Caspasen die DNA-Fragmentierung initiiert, was am Ende zum Tod der Zelle führt [270, 271]. Anders als die Apoptose stellt die Nekrose eine eher unkontrollierte Form des Zelltodes dar, die beispielsweise durch eine Hypoxie und Inflammation induziert wird. Der Prozess wird oftmals durch eine Stimulation verschiedener pro-inflammatorischer Faktoren wie NF κ B begünstigt. Die Nekrose endet in einer Ruptur der Zellmembran und dem Austritt des Zellinneren in die Umgebung.

Zur Bestimmung der Nekrose eignet sich die Aktivitätsmessung der durch die Zerstörung der Zellmembran freigesetzten Laktat-Dehydrogenase [272]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bestimmt, inwieweit eine *A. baumannii*-Infektion zur Induktion einer Ata-abhängigen Nekrose bei Endothelzellen führt (**Abbildung 32**). Nach der Inkubation von HUVECs mit WT und Δ ata zeigte sich eine erhöhte Aktivität der freigesetzten LDH im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollprobe, was in erster Linie darauf hindeutet, dass eine *A. baumannii*-Infektion grundlegend zur Beschädigung der Wirtszellmembran führt. Auch wenn die Ergebnisse nur begrenzt auf *A. baumannii* übertragbar sind, konnten ähnliche Beobachtungen auch für andere Spezies gemacht werden: So führt beispielsweise eine Infektion von J774 Makrophagen mit *Shigella sp.* zu einer Induktion von Nekrose [273]. Diese wird wahrscheinlich durch *Shigella*-Toxine verursacht [274, 275]. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines trimeren Autotransporters und der Induktion der Nekrose wurde bisher nicht beschrieben. Auch im hier durchgeführten Versuch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Δ ata in der Aktivität der freigesetzten LDH. Es ist davon auszugehen, dass Ata keinen Einfluss auf die Induktion der Nekrose in HUVECs hat.

Es sind zahlreiche bakterielle Virulenzfaktoren untersucht worden, von denen man weiß, dass sie an der Induktion des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Beispielsweise führt das α -Hämolysin von *E. coli* zur Apoptose in Immunzellen

[276], während die *Yersinia outer proteins* (Yops) von Yersinien eine Apoptose in Makrophagen hervorrufen [277, 278]. Für *A. baumannii* konnte sowohl eine Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion nach Infektion humaner Epithelzellen demonstriert werden [200, 201, 279, 280], wobei nur wenig über die molekularen Mechanismen der Apoptose-induktion durch *A. baumannii* bekannt ist. Ein Zusammenhang zwischen Apoptose und trimeren Autotransporter Adhäsinen anderer Spezies wurde bisher nur vereinzelt beobachtet. Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das TAA Adh von *A. pleuropneumoniae* über eine olfaktorische Rezeptorkopplung zur Aktivierung von p38 führt und somit den programmierten Zelltod induziert [203]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *A. baumannii* nicht nur wie in den vorangegangenen Studien in Epithelzellen, sondern auch in Endothelzellen Apoptose induziert. Zudem wurde beobachtet, dass das Vorhandensein von Ata mit dem Ausmaß der induzierten Apoptose korreliert (**Abbildung 33** und **Abbildung 34**). Für WT und $\Delta ata(c)$ zeigten sich prozentuale Anteile von apoptotischen Zellen von durchschnittlich 31,42 %. Im Vergleich zu einer früheren Studie aus dem Jahr 2012 sind die ermittelten Werte für die Anzahl apoptotischer Zellen geringer. In der Studie wurden Werte von 27,3 % bis 68,4 % ermittelt [280]. Jedoch erfolgte hier die Untersuchung der Apoptoseinduktion mit anderen, klinischen *A. baumannii*-Isolaten und anderen humanen Zellen (Hep-2-Zellen), sodass der Unterschied der Werte darin begründet sein könnte. Um den molekularen Mechanismus der *A. baumannii* induzierten Apoptose weiter zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in HUVECs gemessen (**Abbildung 35**). Nach 8 h Inkubation wurde kein nennenswerter Anstieg der Enzymaktivitäten beobachtet. Nach 16 h hingegen, also zum Zeitpunkt der maximalen Apoptoseinduktion, zeigte sich im Gegensatz zu Ata-Mutanten ein Anstieg der relativen Caspase 3/7-Signale für WT und $\Delta ata(c)$. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Caspaseaktivierung durch *A. baumannii* ebenfalls Ata-abhängig ist und somit zur Induktion der Apoptose in HUVECs führt. Über welche Rezeptoren und Wege die Aktivierung der Caspasen letztlich induziert wird, konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht bestimmt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.8 Untersuchung der *A. baumannii*-modulierten Wirtszellantwort mittels Gesamtproteomanalyse

Anhand der vorangegangenen Beschreibungen wird deutlich, dass die biologische Funktion von Ata nicht auf einen einzigen Mechanismus oder Signalweg eingegrenzt werden kann. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die molekularen Mechanismen, welche die Modulation der Wirtszellantwort durch *A. baumannii* steuern, sehr komplex sind. Diese Komplexität lässt sich nicht durch Einzelversuche entschlüsseln und bedarf deshalb einer systematischen Proteomanalyse. In vergangenen Studien konnte durch Proteomanalysen gezeigt werden, dass das Bakterium beispielsweise während verschiedenen Wachstumsphasen Membranvesikel sezerniert und das daran 132 verschiedene Proteine beteiligt sind [281]. Eine weitere Studie untersuchte die Veränderungen im Bakterien-Proteom während der Inkubation in einer bronchoalveolären Lavage, die von zuvor infizierten Ratten stammte [282]. Hierbei wurden 179 regulierte Proteine, unter anderem der Virulenzfaktor OmpA, identifiziert. Proteomuntersuchungen der Wirtszelle, während einer *A. baumannii*-Infektion sind jedoch noch nicht beschrieben. Da hierzu keine Daten bekannt sind und um die bisherigen Ergebnisse zur biologischen Funktion von Ata zu bestätigen, wurde eine Gesamtproteomanalyse von infizierten HUVECs durchgeführt (**Abbildung 37** und **Abbildung 38**).

Die Analyse der infizierten Zellen mittels Flüssigchromatografie und Massenspektrometrie führte zum Nachweis von 4.956 Wirtszellproteinen, die sowohl negativ als auch positiv reguliert waren. Die Infektion der HUVECs mit Δata führte vermehrt zu einer verminderten Proteinexpression. Demgegenüber sind die identifizierten Proteine nach einer WT-Infektion gleichermaßen negativ und positiv reguliert. Dies lässt im ersten Schritt erkennen, dass die Signalwirkung von Ata in *A. baumannii* zu spezifischen Aktivierungsmustern in HUVECs führt. Von besonderer Bedeutung sind jedoch die Ergebnisse in der Vergleichsgruppe WT vs. Δata . Hier zeigten sich in der Analyse 17 Proteine, die signifikant negativ oder positiv reguliert waren (**Abbildung 37 C** und **Anhang 9**). Hinsichtlich ihrer biologischen Funktion konnten die Proteine in die folgenden Gruppen unterteilt werden: (i) Adhäsion, (ii) Zellstrukturierung, (iii) Regulation und (iv) Stoffwechsel (**Abbildung 38**). Der Anteil der Stoffwechsel-assoziierten Proteine war dabei am

höchsten, was darin zu begründen ist, dass die Wirtszelle durch die bakterielle Infektion in eine Stresssituation gelangt und deshalb den Zellstoffwechsel aktiviert [283, 284]. Dieses Phänomen wird auch als *acute-phase response* (APR) bezeichnet. Der Anteil an regulierten Adhäsions-assoziierten Proteinen war am zweithöchsten, was einen Rückschluss auf die Interaktion von *A. baumannii* mit dem Wirt vermuten lässt. Erst in einer weiteren Analyse wurden auch verschiedene Stoffwechselwege identifiziert, die eindeutig auf das Vorhandensein von Ata bei der Infektion mit *A. baumannii* zurückzuführen sind. Hierzu zählen Interleukin-Signalwege, unter anderem der IL-6-Signalweg. Hierfür wurde bereits anhand der ELISA-Versuche gezeigt, dass die Induktion von IL-6 Ata-abhängig und erst zu einem späten Zeitpunkt (14 h) nachweisbar war. Dieses Ergebnis konnte anhand der Proteomanalyse bestätigt werden. Für die anderen Interleukin-Signalwege, die im Rahmen der Proteomanalyse nachgewiesen worden, können kaum Referenzen herangezogen werden. So wurde beispielsweise für IL-9 gezeigt, dass dieses Interleukin nach der Infektion von Mäusen mit *A. baumannii* nachweisbar war [285]. Die gewonnenen Daten zeigen auch, dass der MAPK1- und der MAPK3-Signalweg Ata-abhängig aktiviert wird. Beide Signalwege sind maßgeblich an der Zellproliferation und dem Zellwachstum beteiligt, regulieren aber auch den programmierten Zelltod [286]. Eine MAPK-Aktivierung durch *A. baumannii* konnte bereits in früheren Studien beschrieben werden [84, 287]. Es wurde gezeigt, dass OmpA in HeLa-Zellen eine MAPK-aktivierte Autophagie induziert [287]. Aufgrund der Tatsache, dass eine Ata-vermittelte und Caspase 3/7-abhängige Apoptose in HUVECs gezeigt wurde, ist zu vermuten, dass die MAPK1/3-Aktivierung in Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod steht [288].

4.9 Das Überleben von *G. mellonella* bei einer *A. baumannii*-Infektion ist Ata-abhängig

Anhand der bisherigen Erkenntnisse zur biologischen Funktion von Ata in *A. baumannii* ist davon auszugehen, dass dieses Protein einen wichtigen Virulenzfaktor mit multifunktionellen Eigenschaften darstellt. Um zu überprüfen, inwieweit sich das Vorhandensein des Proteins auf die Pathogenität des Bakteriums auswirkt, wurden Larven der Großen Wachsmotte mit den verschiedenen

Bakterien-Stämmen infiziert (**Abbildung 36**). Es wurde beobachtet, dass das Überleben von *G. mellonella* zum einen von der initialen Bakteriendosis und der Zeit der Inkubation abhängig ist und zum anderen aber auch vom Vorhandensein von Ata. Die Bedeutung von Ata als Virulenzfaktor wurde bereits in früheren Studien gezeigt [88, 162]. Im Mausmodell wurde beobachtet, dass das Vorhandensein von Ata maßgeblich zum Sterben der Versuchstiere führt. Eine Infektion mit WT-Bakterien führte zu einer 40%igen Mortalität der Mäuse 24 h *post infectionem*, während das Überleben der Versuchstiere nach Infektion mit dem *ata*-Deletionsstamm nicht beeinflusst war [88]. Zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit gemachten *in vivo*-Versuchen weist dies eindeutig darauf hin, dass der trimere Autotransporter Ata ein entscheidender Virulenzfaktor für *A. baumannii in vivo* ist.

4.10 Ata als multifunktionelles Protein

Die Proteinfamilie der trimeren Autotransporter Adhäsine umfasst eine Vielzahl von Vertretern verschiedenster Gram-negativer Bakterien (**Tabelle 3**). Der wohl bekannteste und am besten untersuchte Vertreter ist YadA von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* [130, 133, 136, 137, 152, 154, 161, 211, 219, 264, 289]. Weitere Beispiele für trimere Autotransporter sind Cha von *Haemophilus sp.*, NadA von *N. meningitidis*, BadA von *B. henselae* oder UspA1/2 von *M. ctarrhalis* [37, 134, 141, 146–148].

Alle Vertreter der trimeren Autotransporter Adhäsine teilen eine gemeinsame Eigenschaft: Sie befähigen die Bakterien zur Adhäsion an abiotische und biotische Oberflächen [133, 146, 147, 219, 220]. Zudem weisen die einzelnen TAAs spezifische Funktionen auf. Sie wirken beispielsweise an der Invasion der Bakterien in die humane Wirtszelle [221, 289], stimulieren die Immunantwort [155], vermitteln eine Resistenz gegenüber dem humanen Komplementsystem [264], regulieren angiogene Prozesse [290] oder induzieren die Apoptose in der infizierten Wirtszelle [202, 277]. Die TAAs können als multifunktionelle Proteine beschrieben werden.

Auch Ata, das trimere Autotransporter Adhäsine von *A. baumannii* reiht sich in die zuvor gemachte Auflistung der TAAs als multifunktionelles Protein ein. Anhand

der hier durchgeführten *gain and loss of function* Experimente konnte gezeigt werden, dass Ata verschiedene Funktionen während der Infektion des menschlichen Körpers wahrnimmt: (1) Ata vermittelt die Adhäsion an abiotische (Kollagen, Fibronectin, VCAM-1, ICAM-1) und biotische Faktoren (humane Epithel- und Endothelzellen). (2) Ata ist an der Invasion von *A. baumannii* in humane Epithel- und Endothelzellen beteiligt. (3) Ata stimuliert die Induktion von IL-6 und IL-8 in humanen Endothelzellen (HUVECs). (4) Ata begünstigt das Überleben in humanem Serum, indem es mutmaßlich die Aktivierung des alternativen Komplementweges inhibiert. (5) Ata trägt maßgeblich zur Induktion der Apoptose in humanen Endothelzellen (HUVECs) bei, wobei es die Aktivität der beiden Caspasen 3 und 7 positiv beeinflusst. (6) Die Deletion von Ata führt zu einer reduzierten Virulenz *in vivo*. Es ist wichtig anzumerken, dass alle beschriebenen Effekte zumindest teilweise auf den Adhäsionsverlust des Ata-Deletionsstammes zurückzuführen sind.

Aufgrund der Vielzahl an biologischen Funktionen der einzelnen TAAs kann davon ausgegangen werden, dass auch für Ata in *A. baumannii* zukünftig weitere charakteristische Beobachtungen gemacht werden.

Anhang

Anhang 1. Liste der Proteine zur Proteomanalyse WT versus unifiziert.

Bezeichnung	p-Wert (< 0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
VCAM1	0,000058	34,7
MYL6B	0,004500	32,3
SELE	0,005603	14,2
ANGPTL4	0,000013	10,8
PTGS2	0,000065	10,0
DAP	0,023331	9,6
HERC2	0,035906	9,5
TMCO1	0,008143	9,1
SPNS1	0,000233	9,1
MGP	0,010646	8,5
COL3A1	0,008981	8,4
CXCL8	0,000157	8,1
DNAJB9	0,000391	7,1
TMEM243	0,000851	7,0
FAM162A	0,025698	6,8
ZNF148	0,041693	6,4
ICAM1	0,000032	6,4
EFEMP1	0,000004	6,2
TNFSF4	0,005971	6,1
NFIL3	0,000452	6,0
HSD17B12	0,028872	5,9
ITPRIP	0,008066	5,8
TMEM87A	0,017426	5,8
INSR	0,009606	5,7
ELF2	0,006129	5,2
LTBP4	0,001745	4,8
KLHDC4	0,000635	4,8
ZNF395	0,018477	4,4
PIGS	0,032061	4,4
TRIM4	0,007147	4,3
TCOF1	0,025057	4,3
NUP93	0,019453	4,1
LOXHD1	0,000143	4,1
PRC1	0,010465	4,1
ANXA6	0,038314	4,0
CD47	0,046050	3,9
SAMHD1	0,001580	3,9

Bezeichnung	p-Wert (< 0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
SUDS3	0,024124	3,9
UCK2	0,010508	3,8
LTBP1	0,000130	3,7
SNUPN	0,007054	3,7
PATZ1	0,000431	3,7
RDH13	0,029463	3,6
EEFSEC	0,045476	3,5
MASTL	0,039217	3,4
CEBPD	0,012562	3,3
KDM4A	0,000001	3,3
BRI3BP	0,026403	3,3
WRNIP1	0,003138	3,2
ECT2	0,015752	3,2
LRRC8D	0,000144	3,2
COL4A2	0,000555	3,1
RNF126	0,000278	3,0
NPAT	0,035703	3,0
HGH1	0,000154	3,0
BTF3	0,025958	-3,0
NFATC2	0,001527	-3,0
RNF181	0,020533	-3,1
MLLT11	0,009293	-3,1
MORF4L1	0,013959	-3,1
TRMT112	0,034595	-3,1
AIM1	0,000815	-3,1
DENND4A	0,003204	-3,1
AEBP1	0,015657	-3,2
FAM114A1	0,000132	-3,2
CYR61	0,002013	-3,2
KIAA0101	0,000421	-3,2
PCDH1	0,020224	-3,3
CCDC130	0,003570	-3,3
GPX4	0,004478	-3,4
ADAMTS4	0,035685	-3,4
NDFIP1	0,022053	-3,4
ALKBH7	0,005818	-3,5
NMT2	0,053547	-3,5
ATF6	0,018362	-3,6
RWDD1	0,020167	-3,7
DKK3	0,009133	-3,7
OSBPL10	0,023927	-3,7
CLU	0,001014	-3,7

Bezeichnung	p-Wert (< 0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
NEU1	0,019742	-3,7
LRP10	0,020316	-3,7
CCDC25	0,024030	-3,7
NID2	0,049324	-3,8
NARS	0,035290	-3,8
SPARC	0,000118	-3,8
NID1	0,012788	-3,8
RIN2	0,038077	-3,8
WIPF2	0,002137	-3,8
MMP2	0,000588	-3,8
GKAP1	0,000463	-3,8
HSPG2	0,000003	-3,9
SH3BP4	0,013788	-4,0
TP53I3	0,015580	-4,0
CDC42EP3	0,000914	-4,0
SAMD9	0,006990	-4,0
SH3TC1	0,020482	-4,1
MMP24OS	0,000211	-4,1
GATA3	0,006079	-4,1
TDRKH	0,018567	-4,1
HOXA5	0,028572	-4,1
C20orf27	0,008260	-4,1
VASH1	0,017175	-4,2
ERAL1	0,025136	-4,2
USP11	0,042318	-4,2
SIRT5	0,000166	-4,3
ZFAND5	0,000301	-4,4
APLP2	0,001736	-4,4
CDKN1A	0,000022	-4,4
TPM3	0,047191	-4,4
LAMB2	0,000121	-4,6
TACC2	0,000835	-4,6
ARHGEF18	0,042923	-4,6
VPS37B	0,000406	-4,8
ZNF346	0,043254	-4,8
KIT	0,000163	-4,8
FAM32A	0,013567	-4,9
SCN5A	0,023893	-4,9
FABP4	0,002825	-4,9
CDC42EP5	0,001146	-5,1
KDR	0,000004	-5,1
ATF6B	0,002137	-5,2

Bezeichnung	p-Wert (< 0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
AVEN	0,011896	-5,2
BAD	0,016138	-5,2
APP	0,000007	-5,2
SRPX	0,053467	-5,2
PTGES3	0,001541	-5,3
CD109	0,000476	-5,5
LSM7	0,016703	-5,5
PDCD1LG2	0,005023	-5,6
TFPI2	0,005440	-5,6
SUSD1	0,000906	-5,7
ARMC10	0,052006	-5,8
SH3BP5	0,050853	-5,8
UBXN7	0,007545	-5,9
TIE1	0,001401	-6,0
CST3	0,000832	-6,0
FASTKD5	0,024866	-6,1
IGFBP4	0,000058	-6,2
ACVRL1	0,000135	-6,6
HECTD3	0,019629	-6,6
AFF4	0,003315	-6,6
HLA-C	0,034421	-6,6
CTGF	0,004862	-6,7
MED26	0,000045	-6,7
RNASE1	0,001521	-7,0
PFKL	0,002604	-7,0
PLCB3	0,020388	-7,0
SH2D3C	0,006351	-7,2
IGFBP2	0,000029	-7,3
GPR116	0,014633	-7,3
SOX7	0,007300	-7,5
NAP1L1	0,038867	-7,5
SNRPN	0,042203	-7,6
IGFBP7	0,000040	-7,6
EEF2K	0,000389	-7,8
RABAC1	0,018788	-7,9
PPP6R2	0,000970	-8,3
NCK2	0,007378	-8,4
HIST1H2BC	0,000841	-8,6
ANP32B	0,034442	-8,6
SRGN	0,000201	-8,7
OXLD1	0,012204	-9,1
JAK1	0,012693	-9,5

Bezeichnung	p-Wert (<0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
ARAP3	0,000507	-9,6
HMGCS1	0,000302	-9,8
TSC2	0,004833	-10,1
HMGCR	0,004485	-10,3
C15orf40	0,008790	-10,9
FYTTD1	0,000150	-11,2
SNX18	0,000223	-13,7
HLA-C	0,000607	-14,5
MDK	0,000002	-14,9
MRFAP1	0,000096	-15,2
ROBO4	0,000004	-16,2
CCDC88C	0,021441	-16,7
SOX18	0,006265	-18,4
SGCB	0,000166	-20,6
PPP1R13B	0,000042	-21,4
CHST14	0,000018	-26,4
BGN	0,000044	-51,9
UBL5	0,000203	-60,4

Anhang 2: Liste der Proteine zur Proteomanalyse *Delta* versus uniniziert.

Bezeichnung	p-Wert (<0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
VCAM1	0,000004	39,8
MYL6B	0,001371	28,7
SELE	0,001227	15,7
ANGPTL4	0,000027	12,3
DAP	0,018720	11,5
MGP	0,010045	9,2
PTGS2	0,000132	8,6
COL3A1	0,015124	8,5
BCL2L13	0,004200	6,7
ICAM1	0,000032	6,0
ANO10	0,025910	5,8
CXCL8	0,000013	5,8
NFIL3	0,000275	5,4
EFEMP1	0,000015	5,3
NACC2	0,025299	5,2
LOXHD1	0,000051	5,0
SDHAF4	0,017180	4,9
SLC2A1	0,039201	4,9
BNIP3	0,007457	4,5
PRC1	0,010946	4,4

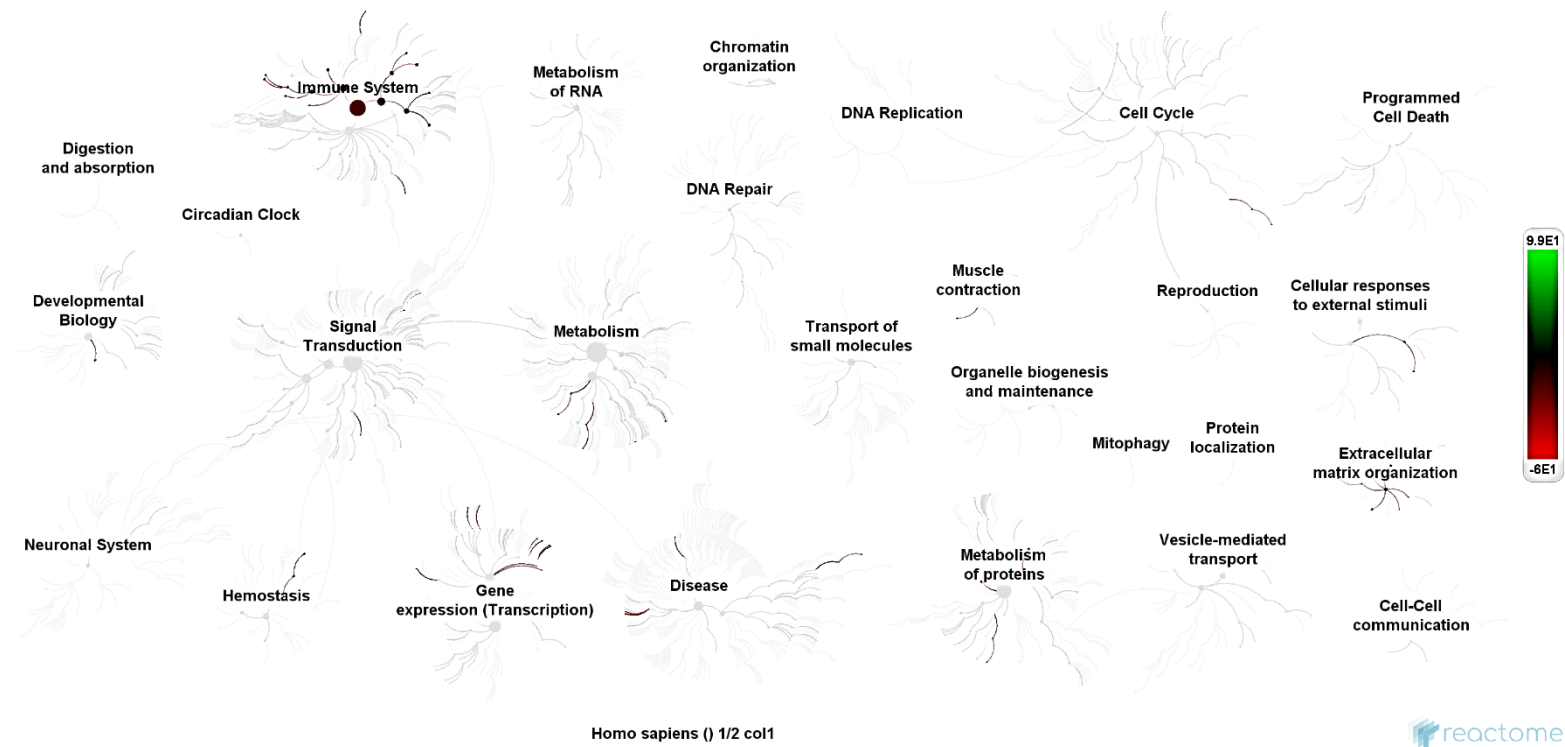
Bezeichnung	p-Wert (<0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
SPNS1	0,038398	4,4
DHCR7	0,036713	3,7
UCK2	0,035767	3,7
DNAJB9	0,003610	3,6
SGOL2	0,016663	3,6
ITPRIP	0,039739	3,5
LTBP1	0,000123	3,5
GTSE1	0,025466	3,5
C11orf30	0,023811	3,4
ATN1	0,040860	3,3
CEBPD	0,012982	3,2
STIL	0,007169	3,2
KLHDC4	0,010087	3,0
COL4A2	0,007455	3,0
KDM4A	0,000060	3,0
LRP10	0,012747	-3,0
MAP3K11	0,044937	-3,0
GKAP1	0,000772	-3,0
IST1	0,043453	-3,0
WIPF2	0,003319	-3,0
PCDH1	0,047314	-3,0
MORF4L2	0,000005	-3,1
ATF6B	0,017648	-3,1
AIM1	0,002849	-3,1
TDRKH	0,019979	-3,1
ZMYM3	0,043121	-3,1
FRMD4A	0,028121	-3,1
NFATC2	0,006218	-3,2
FAM60A	0,002291	-3,2
KIAA0101	0,000614	-3,2
RIN2	0,015335	-3,2
CDKN1A	0,005407	-3,2
LRP11	0,000757	-3,2
GAB1	0,007925	-3,3
NPDC1	0,000028	-3,3
VAC14	0,035259	-3,4
MMP24OS	0,000243	-3,5
SUSD1	0,017582	-3,5
CD109	0,009892	-3,6
MMP14	0,032715	-3,6
C11orf31	0,033329	-3,6
MTRF1	0,017788	-3,7

Bezeichnung	p-Wert (<0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
ZFAND5	0,000440	-3,7
TNFRSF10C	0,000116	-3,7
LIMCH1	0,051469	-3,8
PFKL	0,052526	-3,8
VPS37B	0,020711	-3,8
SPARC	0,000247	-3,8
CCDC25	0,016832	-3,9
RWDD1	0,025692	-3,9
FABP4	0,018138	-3,9
MVB12A	0,049197	-4,0
PHC2	0,001398	-4,0
MED26	0,039036	-4,1
CYR61	0,000084	-4,1
LAMB2	0,000109	-4,1
HSPG2	0,000010	-4,1
CLU	0,001492	-4,1
PLAT	0,019069	-4,2
TMEM9	0,032673	-4,2
CDC42EP3	0,000234	-4,2
MLLT11	0,002876	-4,2
SH2D3C	0,013839	-4,3
GATA3	0,004716	-4,4
NID2	0,021660	-4,5
POLR2B	0,029123	-4,6
N4BP3	0,048699	-4,7
TIE1	0,000854	-4,7
VASH1	0,029553	-4,8
GRWD1	0,043363	-4,8
UBXN7	0,026612	-4,9
GLIPR1	0,049671	-4,9
NID1	0,004840	-4,9
SOX7	0,036280	-4,9
SH3TC1	0,017509	-4,9
RNF187	0,002597	-5,3
KIT	0,002045	-5,3
FRMD6	0,025769	-5,3
CST3	0,000002	-5,3
RABAC1	0,048413	-5,3
ATF6	0,003462	-5,3
PDCD1LG2	0,012963	-5,3
HLA-E	0,038950	-5,3
GBF1	0,014583	-5,4

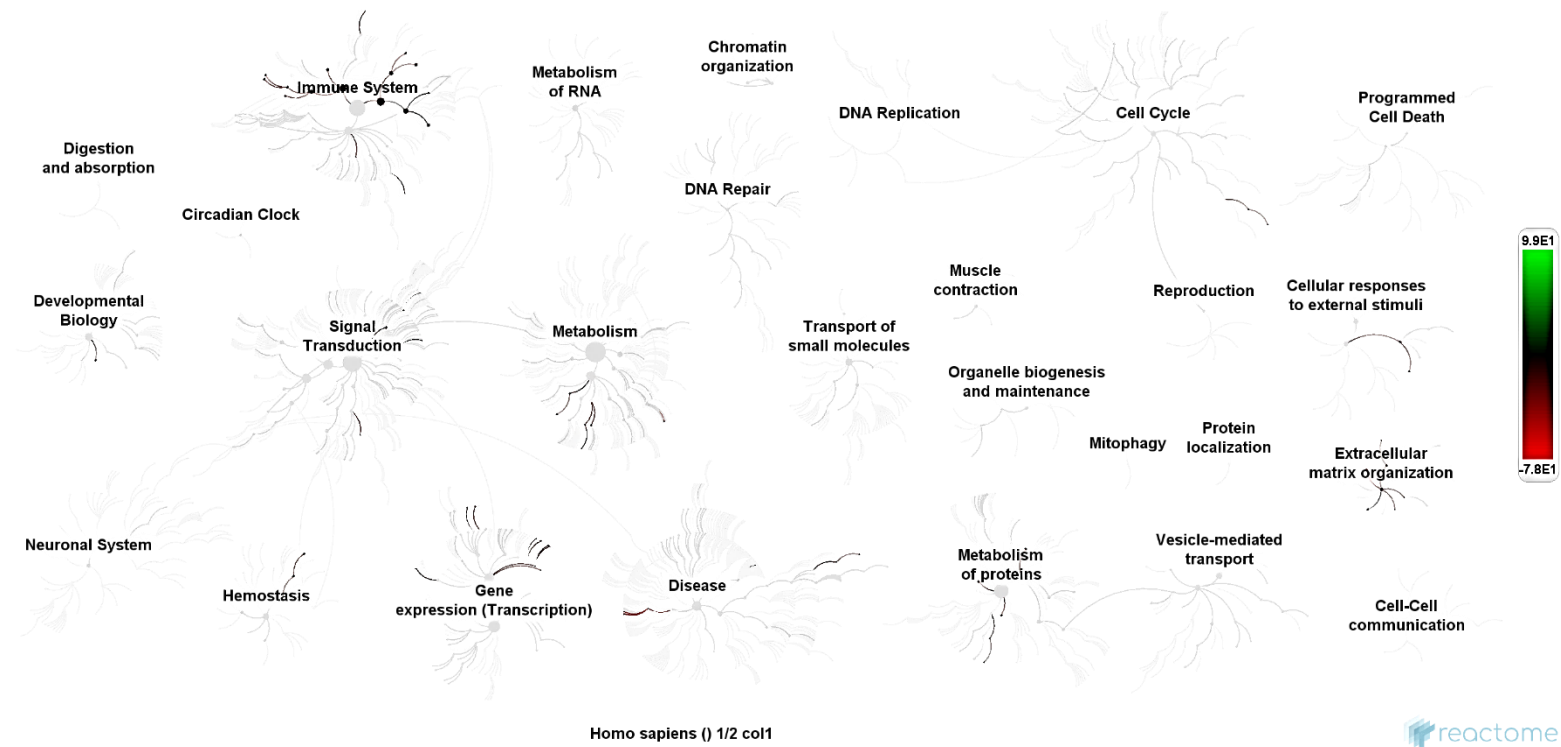
Bezeichnung	p-Wert (<0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
CCNL2	0,025459	-5,5
FAM32A	0,006986	-5,6
SRPX	0,054058	-5,7
APLP2	0,000052	-5,7
IGFBP4	0,000546	-5,8
CCPG1	0,002873	-5,8
OXLD1	0,007440	-6,3
MMP2	0,001571	-6,3
FYTTD1	0,002309	-6,4
AFF4	0,003213	-6,4
DKK3	0,003985	-6,6
GPR116	0,023373	-6,6
ARAP3	0,005817	-6,7
APP	0,000004	-7,3
MEA1	0,036632	-7,4
SNX18	0,042567	-7,5
DKFZp781M17165	0,040038	-7,6
CTGF	0,013437	-8,0
RNASE1	0,000921	-8,3
ACVRL1	0,000034	-8,5
IGFBP2	0,008119	-8,6
MRFAP1	0,001586	-8,9
PLCB3	0,031604	-9,1
IGFBP7	0,001593	-9,2
KDR	0,002441	-9,4
HMGCR	0,017371	-9,5
ARMC10	0,002897	-9,5
SOX18	0,021009	-10,0
MDK	0,000003	-10,3
EEF2K	0,000224	-10,5
HLA-C	0,000078	-10,6
HIST1H2BC	0,004475	-10,9
SRGN	0,000388	-11,3
CHST14	0,006770	-11,4
HMGCS1	0,000000	-14,5
ROBO4	0,000001	-15,8
SGCB	0,000102	-15,8
PPP1R13B	0,001474	-19,0
AIF1L	0,000093	-19,1
TSC2	0,000168	-20,1
UBL5	0,000018	-69,3
BGN	0,000072	-78,8

Anhang 3. Liste der Proteine zur Proteomanalyse WT versus Δ ata.

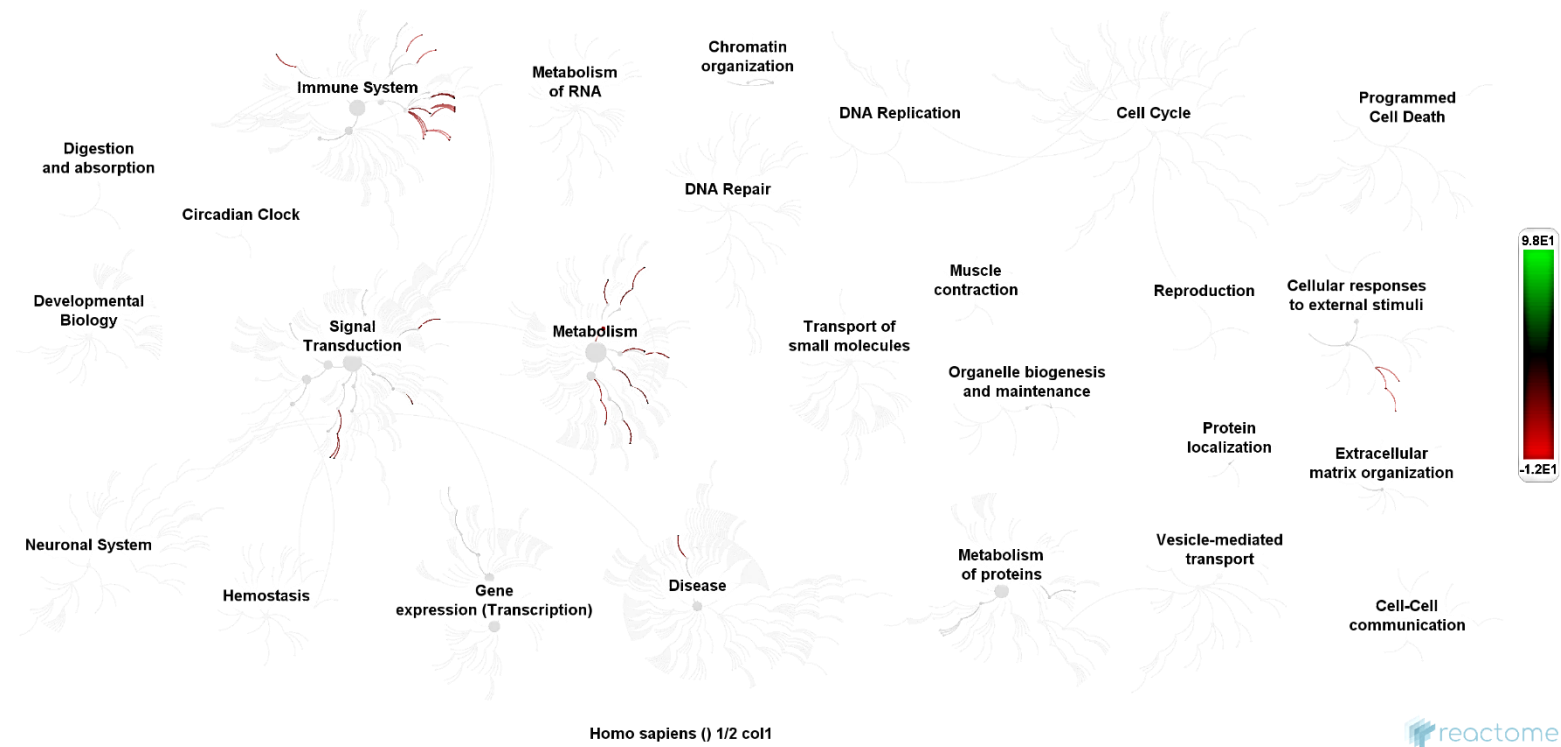
Bezeichnung	p-Wert (<0,05)	x-fache Induktion ($\leq -3, \geq 3$)
CCDC88C	0,043	9,2
BRD8	0,015	7,0
JAK1	0,026	5,7
MRPL3	0,042	5,3
UGP2	0,045	4,1
C20orf27	0,005	4,1
SIRT5	0,005	4,1
PTGES3	0,017	4,0
RSRC1	0,054	3,2
USP28	0,040	-3,0
TMEM243	0,050	-3,2
RICTOR	0,043	-3,5
ALDH4A1	0,008	-3,6
HMGCL	0,054	-4,2
AGA	0,048	-4,3
LTBP4	0,006	-4,5
AIF1L	0,002	-12,2



Anhang 4. Übersicht der aktivierten Stoffwechsel- und Signalwege in WT infizierten HUVECs. Die Untersuchung der durch die Infektion mit *A. baumannii* WT aktivierten Stoffwechsel- und Signalwege in HUVECs erfolgte unter Verwendung der Analyse-Software Reactome (<https://reactome.org/>). Hierzu wurden die reduzierten Daten der Proteomanalyse unter Berücksichtigung der entsprechenden positiven bzw. negativen Regulation für die Auswertung verwendet. Die Farbskala an der rechten Seite und die Färbung der einzelnen Stoffwechsel- bzw. Signalwege dient als Indikator der Signifikanz. Hierbei sind nicht signifikante Wege grün und stark signifikante Weg rot gekennzeichnet.



Anhang 6. Übersicht der aktivierten Stoffwechsel- und Signalwege in Δ ata infizierten HUVECs. Die Untersuchung der durch die Infektion mit *A. baumannii* Δ ata aktivierten Stoffwechsel- und Signalwege in HUVECs erfolgte unter Verwendung der Analyse-Software Reactome (<https://reactome.org/>). Hierzu wurden die reduzierten Daten der Proteomanalyse unter Berücksichtigung der entsprechenden positiven bzw. negativen Regulation für die Auswertung verwendet. Die Farbskala an der rechten Seite und die Färbung der einzelnen Stoffwechsel- bzw. Signalwege dient als Indikator der Signifikanz. Hierbei sind nicht signifikante Wege grün und stark signifikante Wege rot gekennzeichnet.



Anhang 8. Übersicht der aktivierten Stoffwechsel- und Signalwege in infizierten HUVECs im Vergleich WT versus Δ ata. Die Untersuchung der durch die Infektion mit *A. baumannii* aktivierten Stoffwechsel- und Signalwege in HUVECs erfolgte unter Verwendung der Analyse-Software Reactome (<https://reactome.org/>). Hierzu wurden die reduzierten Daten der Proteomanalyse unter Berücksichtigung der entsprechenden positiven bzw. negativen Regulation für die Auswertung verwendet. Die Farbskala an der rechten Seite und die Färbung der einzelnen Stoffwechsel- bzw. Signalwege dient als Indikator der Signifikanz. Hierbei sind nicht signifikante Wege grün und stark signifikante Weg rot gekennzeichnet.

Anhang 9. Übersicht der Proteine von aktivierten Stoffwechsel- bzw. Signalwegen in infizierten HUVECs: Vergleich zwischen WT und Δ ata.

detektierte Proteine	Stoffwechsel- bzw. Signalweg
ALDH4A1	Prolin-Katabolismus
CCDC88C	Negative Regulation des TCF-abhängigen DVL-Signalweges
HMGCL	Keton-Körper Metabolismus Synthese von Keton-Körpern
JAK1	Interleukin-2 Signalweg Interleukin-6 Signalweg Interleukin-9 Signalweg Interleukin-15 Signalweg Interleukin-21 Signalweg Interleukin-27 Signalweg Interleukin-39 Signalweg MAPK1 (ERK1) Aktivierung MAPK1 (ERK2) Aktivierung Regulation des IFNG-Signalweges
PTGES3	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor Signalweg Attenuationsphase HSF1 Aktivierung Synthese von Prostaglandin (PG) und Thromboxan (TX)
UGP2	Bildung des aktiven Cofaktors UDP-Glucuronat Glykogensynthese

Literaturverzeichnis

1. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol. 1929;10:226–36.00
2. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. 01.01.2018. <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>. Abgerufen am 10. September 2018.
3. World Health Organization. WHO | The burden of health care-associated infection worldwide. http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/. Abgerufen am 10. September 2018.
4. Types of healthcare-associated infections | HAI | CDC. 01.01.2017. <https://www.cdc.gov/HAI/infectionTypes.html>. Abgerufen am 10. September 2018.
5. Vital signs: central line-associated blood stream infections-United States, 2001, 2008, and 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011;60:243–8.
6. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents. 2001;17:299–303.
7. Anderson DJ. Surgical site infections. Infect Dis Clin North Am. 2011;25:135–53.
8. Hunter JD. Ventilator associated pneumonia. BMJ. 2012;344:e3325.
9. Most common healthcare-associated infections: 25 bacteria, viruses causing HAIs. 10.09.2018. <https://www.beckershospitalreview.com/quality/most-common-healthcare-associated-infections-25-bacteria-viruses-causing-hais.html>. Abgerufen am 10. September 2018.
10. Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect. 2005;11:868–73.
11. Tacconelli E. WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.
12. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS und Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. Microbes Environ. 2011;26:101–12.

13. Jung J und Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99:2533–48.
14. Brisou J und Prevot AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1954;86:722–8.
15. Brisou J. Classification of *Pseudomonadaceae*. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1957;93:397–404.
16. Tjernberg I und Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Apmis.* 1989;97:595–605.
17. Houang ETS, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC und Cheng AFB. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* 2001;39:228–34.
18. Nishimura Y, Ino T und Iizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from cotton and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1988;38:209–11.
19. Nemeč A, Baere T de, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ und Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1891–9.
20. Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, Baere T de, Janssens D, van der Reijden TJK, Jezek, P und Vaneechoutte, M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:1563–7.
21. Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V und Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:953–63.
22. Vaneechoutte M, Young DM, Ornston LN, Baere T de, Nemeč A, van der Reijden T, Carr E, Tjernberg I und Dijkshoorn L. Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:932–6.
23. Hu Y, Feng Y, Qin J, Zhang X und Zong Z. *Acinetobacter chinensis*, a novel *Acinetobacter* species, carrying *bla*NDM-1, recovered from hospital sewage. *J Microbiol.* 2019;57:350–5.

24. Hu Y, Feng Y, Zhang X und Zong Z. *Acinetobacter defluvii* sp. nov., recovered from hospital sewage. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67:1709–13.
25. Klotz P, Göttig S, Leidner U, Semmler T, Scheufen S und Ewers C. Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates. *PLoS ONE.* 2017;12:e0171986.
26. Kurcik-Trajkovska B. *Acinetobacter* spp. - A serious enemy threatening hospitals worldwide. *Macedonian Journal of Medical Sciences.* 2009;2:157–62.
27. Skiebe E, Berardinis V de, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, Hammer B, Zimmermann O, Ziesing S, Wichelhaus TA, Hunfeld K-P, Borgmann S, Gröbner S, Higgins PG, Seifert H, Busse H-J, Witte W, Pfeifer Y und Wilharm G. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol.* 2012;302:117–28.
28. Peleg AY, Seifert H und Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews.* 2008;21:538–82.
29. Munoz-Price LS und Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med.* 2008;358:1271–81.
30. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I und Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2819–25.
31. Carvalheira A, Silva J und Teixeira P. Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp. *Food Microbiol.* 2017;64:119–25.
32. Vaz-Moreira I, Novo A, Hantsis-Zacharov E, Lopes AR, Gomila M, Nunes OC, Manaia CM und Halpern M. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61:2837–43.
33. Wendt C, Dietze B, Dietz E und Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1394–7.
34. Beggs CB, Kerr KG, Snelling AM und Sleight PA. *Acinetobacter* spp. and the clinical environment. *Indoor and Built Environment.* 2006;15:19–24.
35. Bernards AT, Harinck HIJ, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK und van den Broek PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:1002–4.

36. Huang C-H, Lee C-L, Lin AC-M, Chen W-Y, Teng P-C, Lee S-H, Hsieh Y-J und Jang T-N. Different strains of *Acinetobacter baumannii* spreading in an intensive care unit. *Journal of Acute Medicine*. 2011;1:5–10.
37. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF und Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47:317–23.
38. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE und Fridkinet SK. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370:1198–208.
39. Giammanco A, Calà C, Fasciana T und Dowzicky MJ. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *mSphere* 2017.
40. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B und Fridkin S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:1–14.
41. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR und Sievert DM. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37:1288–301.
42. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X und Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol* 2012.
43. Weber BS, Harding CM und Feldman MF. Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. *J Bacteriol*. 2015;198:880–7.
44. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B und Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017;30:409–47.

45. Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A und Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS ONE. 2011;6:e22674.
46. Giannouli M, Antunes LCS, Marchetti V, Triassi M, Visca P und Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. BMC Infect Dis. 2013;13:282.
47. Ophir T und Gutnick DL. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl Environ Microbiol. 1994;60:740–5.
48. Scott NE, Kinsella RL, Edwards AVG, Larsen MR, Dutta S, Saba J, Foster LJ und Feldmann MF. Diversity within the O-linked protein glycosylation systems of *Acinetobacter* species. Mol Cell Proteomics. 2014;13:2354–70.
49. Zeidler S, Hubloher J, König P, Ngu ND, Scholz A, Averhoff B und Müller V. Salt induction and activation of MtlD, the key enzyme in the synthesis of the compatible solute mannitol in *Acinetobacter baumannii*. Microbiologyopen. 2018:e00614.
50. Zeidler S, Hubloher J, Schabacker K, Lamosa P, Santos H und Müller V. Trehalose, a temperature- and salt-induced solute with implications in pathobiology of *Acinetobacter baumannii*. Environ Microbiol. 2017;19:5088–99.
51. Hassan KA, Jackson SM, Penesyan A, Patching SG, Tetu SG, Eijkelkamp BA, Brown MH, Henderson PJF und Paulsen IT. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:20254–9.
52. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S und Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. PLoS Pathog. 2010;6:e1000834.
53. Nwugo CC, Arivett BA, Zimble DL, Gaddy JA, Richards AM und Actis LA. Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE. 2012;7:e51936.
54. Smith MG, Des Etages SG und Snyder M. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. Mol Cell Biol. 2004;24:3874–84.

-
55. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya Ó und Bou G. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res. 2014;13:460–76.
 56. Wright MS, Mountain S, Beeri K und Adams MD. Assessment of insertion sequence mobilization as an adaptive response to oxidative stress in *Acinetobacter baumannii* Using IS-seq. J Bacteriol 2017.
 57. Derecho I, McCoy KB, Vaishampayan P, Venkateswaran K und Mogul R. Characterization of hydrogen peroxide-resistant *Acinetobacter* species isolated during the Mars Phoenix spacecraft assembly. Astrobiology. 2014;14:837–47.
 58. Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B und Xi C. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. Am J Infect Control. 2016;44:e65-71.
 59. Greene C, Wu J, Rickard AH und Xi C. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. Lett Appl Microbiol. 2016;63:233–9.
 60. Thompson MG, Black CC, Pavlicek RL, Honnold CL, Wise MC, Alamneh YA, Moon JK, Kessler JL, Si Y, Williams R, Yildirim S, Kirkup Jr. BC, Green RK, Hall ER, Palys TJ, Zurawski DV. Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:1332–42.
 61. Breij A de, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, Actis L, Nibbering P und Dijkshoorn L. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. Res Microbiol. 2009;160:213–8.
 62. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE und Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology (Reading, Engl). 2003;149:3473–84.
 63. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA und Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii*

- that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2008;154:3398–409.
64. Loehfelm TW, Luke NR und Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol*. 2008;190:1036–44.
65. Harding CM, Pulido MR, Di Venanzio G, Kinsella RL, Webb AI, Scott NE, Pachón J und Feldman MF. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. *J Biol Chem*. 2017;292:9075–87.
66. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB und Maira-Litrán T. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol*. 2009;191:5953–63.
67. Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT und Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;323:44–51.
68. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA und Munson RS. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* 2013.
69. Wilharm G, Piesker J, Laue M und Skiebe E. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol*. 2013;195:4146–53.
70. Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Elbourne LDH, Paulsen IT und Brown MH. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun*. 2013;81:2574–83.
71. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:634–44.
72. Clemmer KM, Bonomo RA und Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*. 2011;157:2534–44.
73. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW und Zurawski DV. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol*. 2012;50:434–43.

-
74. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J und Dijkshoorn L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol.* 2006;157:360–6.
 75. Weidensdorfer M, Chae JI, Makobe C, Stahl J, Averhoff B, Müller V, Schürmann C, Brandes RP, Wilharm G, Ballhorn W, Christ S, Linke D, Fischer D, Göttig S, Kempf VAJ. Analysis of endothelial adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* using a dynamic human *ex vivo* infection model. *Infect. Immun.* 2016;84:711–22.
 76. Gaddy JA, Tomaras AP und Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2009;77:3150–60.
 77. Piepenbrink KH, Lillehoj E, Harding CM, Labonte JW, Zuo X, Rapp CA, Munson Jr RS, Goldblum SE, Feldman MF, Gray JJ, Sundberg EJ. Structural diversity in the type IV pili of multidrug-resistant *Acinetobacter*. *J Biol Chem.* 2016;291:22924–35.
 78. Smani Y, McConnell MJ und Pachón J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS ONE.* 2012;7:e33073.
 79. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI und Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2008;8:216.
 80. Noto MJ, Boyd KL, Burns WJ, Varga MG, Peek RM und Skaar EP. Toll-like receptor 9 contributes to defense against *Acinetobacter baumannii* infection. *Infect Immun.* 2015;83:4134–41.
 81. Bist P, Dikshit N, Koh TH, Mortellaro A, Tan TT und Sukumaran B. The Nod1, Nod2, and Rip2 axis contributes to host immune defense against intracellular *Acinetobacter baumannii* infection. *Infect Immun.* 2014;82:1112–22.
 82. March C, Regueiro V, Llobet E, Moranta D, Morey P, Garmendia J, Bengoechea JA. Dissection of host cell signal transduction during *Acinetobacter baumannii*-triggered inflammatory response. *PLoS ONE.* 2010;5:e10033. doi:10.1371/journal.pone.0010033.

83. Harding CM, Hennon SW und Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16:91–102.
84. Feng Z, Jia X, Adams MD, Ghosh SK, Bonomo RA und Weinberg A. Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infect Immun.* 2014;82:4458–65.
85. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulias X, Cerqueira GM, Schulze KE, Maifiah MHM, Li J, Creek DJ, Lieschke GJ und Peleg AY. *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:9599–604.
86. Qiu H, KuoLee R, Harris G und Chen W. Role of NADPH phagocyte oxidase in host defense against acute respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in mice. *Infect Immun.* 2009;77:1015–21.
87. Koenigs A, Stahl J, Averhoff B, Göttig S, Wichelhaus TA, Wallich R, Zipfel PF und Kraiczy P. CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. *J Infect Dis.* 2016;213:1388–99.
88. Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB und Maira-Li-trán T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2012;194:3950–60.
89. Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN und Munson RS. *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE.* 2013;8:e59388.
90. Harding CM, Kinsella RL, Palmer LD, Skaar EP und Feldman MF. Medically relevant *Acinetobacter* species require a type II secretion system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005391.
91. Johnson TL, Waack U, Smith S, Mobley H und Sandkvist M. *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and *in vivo* fitness. *J Bacteriol.* 2015;198:711–9.
92. Liu C-C, Kuo H-Y, Tang CY, Chang K-C und Liou M-L. Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics.* 2014;104:215–23.

93. Weber BS, Miyata ST, Iwashkiw JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki S und Feldman MF. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. PLoS ONE. 2013;8:e55142.
94. Kinsella RL, Lopez J, Palmer LD, Salinas ND, Skaar EP, Tolia NH und Feldman MF. Defining the interaction of the protease CpaA with its type II secretion chaperone CpaB and its contribution to virulence in *Acinetobacter* species. J Biol Chem. 2017;292:19628–38.
95. Tilley D, Law R, Warren S, Samis JA und Kumar A. CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. FEMS Microbiol Lett. 2014;356:53–61.
96. Joly-Guillou ML, Wolff M, Pocidalo JJ, Walker F und Carbon C. Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:345–51.
97. Harris G, Kuo Lee R, Lam CK, Kanzaki G, Patel GB, Xu HH und Chen W. A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3601–13.
98. Braunstein A, Papo N und Shai Y. *In vitro* activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its dl amino acid analog in mice infected with bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:3127–9.
99. Crandon JL, Kim A und Nicolau DP. Comparison of tigecycline penetration into the epithelial lining fluid of infected and uninfected murine lungs. J Antimicrob Chemother. 2009;64:837–9.
100. Koomanachai P, Kim A und Nicolau DP. Pharmacodynamic evaluation of tigecycline against *Acinetobacter baumannii* in a murine pneumonia model. J Antimicrob Chemother. 2009;63:982–7.
101. Song JY, Cheong HJ, Lee J, Sung AK und Kim WJ. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. Int J Antimicrob Agents. 2009;33:33–9.
102. Eveillard M, Soltner C, Kempf M, Saint-André J-P, Lemarié C, Randriarivelo C, Seifert H, Wolff M, Joly-Guillou ML. The virulence variability of

- different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. J Infect. 2010;60:154–61.
103. McConnell MJ, Domínguez-Herrera J, Smani Y, López-Rojas R, Docobo-Pérez F und Pachón J. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Infect Immun. 2011;79:518–26.
104. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, Akira S und van der Poll T. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173:122–9.
105. Qiu H, KuoLee R, Harris G und Chen W. High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. Microbes and Infection. 2009;11:946–55.
106. Joly-Guillou ML, Wolff M, Farinotti R, Bryskier A und Carbon C. *In vivo* activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. J Antimicrob Chemother. 2000;46:827–30.
107. Wolff M, Joly-Guillou M-L, Farinotti R und Carbon C. *In vivo* efficacies of combinations of β -lactams, β -lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1406–11.
108. Yuan Z, Ledesma KR, Singh R, Hou J, Prince RA und Tam VH. Quantitative assessment of combination antimicrobial therapy against multidrug-resistant bacteria in a murine pneumonia model. J Infect Dis. 2010;201:889–97.
109. Olitzki L. Mucin as a resistance-lowering substance. Bacteriol Rev. 1948;12:149–72.
110. Dai T, Tegos GP, Lu Z, Huang L, Zhiyentayev T, Franklin MJ, Baer DG und Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:3929–34.
111. DeLeon K, Balldin F, Watters C, Hamood A, Griswold J, Sreedharan S und Rumbaugh KP. Gallium maltolate treatment eradicates *Pseudomonas*

- aeruginosa* infection in thermally injured mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1331–7.
112. Shankar R, He L-K, Szilagy A, Muthu K, Gamelli RL, Filutowicz M, Wendt JL, Suzuki H und Dominguez M. A novel antibacterial gene transfer treatment for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced burn sepsis. *J Burn Care Res.* 2007;28:6–12.
113. Thomas-Virnig CL, Centanni JM, Johnston CE, He L-K, Schlosser SJ, van Winkle KF, Chen R, Gibson AL, Szilagy A, Li L, Shankar R, Allen-Hoffmann BL. Inhibition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by nonviral expression of hCAP-18 in a bioengineered human skin tissue. *Mol Ther.* 2009;17:562–9.
114. Uygur F, Oncül O, Evinç R, Diktas H, Acar A und Ulkür E. Effects of three different topical antibacterial dressings on *Acinetobacter baumannii*-contaminated full-thickness burns in rats. *Burns.* 2009;35:270–3.
115. Dijkshoorn L, Brouwer CPJM, Bogaards SJP, Nemec A, van den Broek PJ und Nibbering PH. The synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin, hLF(1-11), is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4919–21.
116. Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M, Tsaganos T, Dontas I, Koutoukas P, Baziaka F, Giamarellou H, Perrea D. Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29:51–5.
117. Ko W-C, Lee H-C, Chiang S-R, Yan J-J, Wu J-J, Lu C-L und Chuang Y-C. *In vitro* and *in vivo* activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:393–5.
118. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J und Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun.* 2012;80:1015–24.

119. López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Peréz F, Smani Y, Fernández-Reyes M, Rivas L, Pachón J. Impaired virulence and *in vivo* fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis*. 2011;203:545–8.
120. McConnell MJ und Pachón J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. *Vaccine*. 2010;29:1–5.
121. Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Jiménez-Mejías ME, García-Curiel A, Pichardo C, Jiménez L und Pachón J. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:1165–72.
122. Rodríguez-Hernández MJ, Cuberos L, Pichardo C, Caballero FJ, Moreno I, Jiménez-Mejías ME, García-Curiel A und Pachón J. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:479–82.
123. Rodríguez-Hernández M-J, Jiménez-Mejías ME, Pichardo C, Cuberos L, García-Curiel A und Pachón J. Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:581–4.
124. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC und Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:2605–9.
125. Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, Eliopoulos GM, Moellering RC und Mylonakis E. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14585–90.
126. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M und Snyder M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev*. 2007;21:601–14.
127. Pallen MJ, Chaudhuri RR und Henderson IR. Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:519–27.

128. Henderson IR und Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001;69:1231–43.
129. Desvaux M, Parham NJ und Henderson IR. Type V protein secretion: simplicity gone away? *Curr Issues Mol Biol.* 2004;6:111–24.
130. Bliska JB, Copass MC und Falkow S. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 1993;61:3914–21.
131. El Tahir Y und Skurnik M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol.* 2001;291:209–18.
132. Kaiser PO, Riess T, Wagner CL, Linke D, Lupas AN, Schwarz H, Radatz G, Schäfer A, Kempf VAJ. The head of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*. *Cell Microbiol.* 2008;10:2223–34.
133. Terti R, Skurnik M, Vartio T und Kuusela P. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect. Immun.* 1992;60:3021–4.
134. Szczesny P, Linke D, Ursinus A, Bär K, Schwarz H, Riess TM, Kempf VAJ, Lupas AN, Martin J, Zeth K. Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000119.
135. Szczesny P und Lupas A. Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins--daTAA. *Bioinformatics.* 2008;24:1251–6.
136. Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A und Heesemann J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* 2000;19:5989–99.
137. Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H und Heesemann J. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol.* 2003;185:3735–44.
138. Surana NK, Cutter D, Barenkamp SJ und St Geme JW. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem.* 2004;279:14679–85.
139. Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T und Autenrieth IB. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol.* 2001;3:623–32.

140. Riess T, Andersson SGE, Lupas A, Schaller M, Schäfer A, Kyme P, Martin J, Wälzlein J-H, Eehalt U, Lindroos H, Schirle M, Nordheim A, Autenrieth IB und Kempf VAJ. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med.* 2004;200:1267–78.
141. Sheets AJ, Grass SA, Miller SE und St Geme JW. Identification of a novel trimeric autotransporter adhesin in the cryptic genospecies of *Haemophilus*. *J Bacteriol.* 2008;190:4313–20.
142. Sandt CH und Hill CW. Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the EibF cell surface protein of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001;69:7293–303.
143. Sandt CH und Hill CW. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2000;68:2205–14.
144. Lu Y, Iyoda S, Satou H, Satou H, Itoh K, Saitoh T und Watanabe H. A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2006;74:5747–55.
145. Spahich NA und St Geme JW. Structure and function of the *Haemophilus influenzae* autotransporters. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011;1:5.
146. Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F, Ciucchi L, Masignani V, Taddei A, Rappuoli R, Pizza M und Aricò B. *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2005;55:687–98.
147. Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH und Hansen EJ. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol.* 2000;182:1364–73.
148. Connors R, Hill DJ, Borodina E, Agnew C, Daniell SJ, Burton NM, Sessions RB, Clarke AR, Catto LE, Lammie D, Wess T, Brady RL und Virjiet M. The *Moraxella* adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil. *EMBO J.* 2008;27:1779–89.
149. Pearson MM, Laurence CA, Guinn SE und Hansen EJ. Biofilm formation by *Moraxella catarrhalis* in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin. *Infect. Immun.* 2006;74:1588–96.

150. Zhang P, Chomel BB, Schau MK, Goo JS, Droz S, Kelminson KL, George SS, Lerche NW und Koehler JE. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:13630–5.
151. Eitel J und Dersch P. The YadA Protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. Infect. Immun. 2002;70:4880–91.
152. Tahir YE, Kuusela P und Skurnik M. Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. Mol Microbiol. 2000;37:192–206.
153. China B, Sory MP, N'Guyen BT, Bruyere MD und Cornelis GR. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. Infect. Immun. 1993;61:3129–36.
154. Nummelin H, Merckel MC, Leo JC, Lankinen H, Skurnik M und Goldman A. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. EMBO J. 2004;23:701–11. doi:10.1038/sj.emboj.7600100.
155. Schmid Y, Grassl GA, Buhler OT, Skurnik M, Autenrieth IB und Bohn E. *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. Infect. Immun. 2004;72:6780–9.
156. Dautin N und Bernstein HD. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. Annu. Rev. Microbiol. 2007;61:89–112.
157. Brandon LD und Goldberg MB. Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. J Bacteriol. 2001;183:951–8.
158. Peterson JH, Szabady RL und Bernstein HD. An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex. J Biol Chem. 2006;281:9038–48.
159. Sijbrandi R, Urbanus ML, Hagen-Jongman CM ten, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR und Luirink J. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. J Biol Chem. 2003;278:4654–9.

-
160. Grosskinsky U, Schütz M, Fritz M, Schmid Y, Lamparter MC, Szczesny P, Lupas AN, Autenrieth IB und Linke D. A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A auto-transport. *J Bacteriol.* 2007;189:9011–9.
161. Lehr U, Schütz M, Oberhettinger P, Ruiz-Perez F, Donald JW, Palmer T, Linke D, Henderson IR und Autenrieth IB. C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA. *Mol Microbiol.* 2010;78:932–46.
162. Bentancor LV, Routray A, Bozkurt-Guzel C, Camacho-Peiro A, Pier GB und Maira-Litrán T. Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect Immun.* 2012;80:3381–8.
163. Weidensdorfer M, Ishikawa M, Hori K, Linke D, Djahanschiri B, Iruegas R, Ebersberger I, Riedel-Christ S, Enders G, Leukert L, Kraiczky P, Rothweiler F, Cinatl J, Berger J, Hipp K, Kempf VAJ und Göttig S. The *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin Ata controls key virulence traits of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence.* 2019;10:68–81.
164. Koiwai K, Hartmann MD, Linke D, Lupas AN und Hori K. Structural basis for toughness and flexibility in the C-terminal passenger domain of an *Acinetobacter* Trimeric Autotransporter Adhesin. *J Biol Chem.* 2016;291:3705–24.
165. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D und Böhlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1992;187:1579–86.
166. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian P und Mignatti P. Expression of von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 2000;85:281–8.
167. Liu L und Shi G-P. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2012;94:3–5.

168. Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol.* 2004;186:595–600.
169. Kouzuma A, Meng X-Y, Kimura N, Hashimoto K und Watanabe K. Disruption of the putative cell surface polysaccharide biosynthesis gene SO3177 in *Shewanella oneidensis* MR-1 enhances adhesion to electrodes and current generation in microbial fuel cells. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:4151–7.
170. Davenport KW, Daligault HE, Minogue TD, Bruce DC, Chain PSG, Coyne SR, Jaissle JG, Koroleva GI, Ladner JT, Li P-E, Palacios GF, Scholz MB, Teshima H und Johnson SL. Draft genome assembly of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *Genome Announc* 2014.
171. Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLoS ONE.* 2015;10:e0138360.
172. Ishikawa M, Nakatani H und Hori K. AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from *Acinetobacter* sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces. *PLoS ONE.* 2012;7:e48830.
173. Schägger H und Jagow G von. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry.* 1987;166:368–79.
174. Weber K und Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1969;244:4406–12.
175. Johnstone A und Thorpe R. *Immunochemistry in practice.* 3rd ed. Cambridge, Mass.: Blackwell Science; 1996.
176. Weidensdorfer M. Etablierung eines neuartigen *ex vivo* Organinfektionsmodells zur Analyse der Adhärenz von *Bartonella henselae* unter Verwendung menschlicher Nabelschnurvenen [Masterarbeit]. Darmstadt: TU Darmstadt; 07/2014.
177. Gremse F, Grouls C, Palmowski M, Lammers T, Vries A de, Grüll H, Das M, Mühlenbruch G, Akhtar S, Schober A und Kiessling F. Virtual elastic sphere processing enables reproducible quantification of vessel stenosis at CT and MR angiography. *Radiology.* 2011;260:709–17.

178. Malek AM, Alper SL und Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. 1999;282:2035–42.
179. Zaitseva L, Murray MY, Shafat MS, Lawes MJ, MacEwan DJ, Bowles KM und Rushworth SA. Ibrutinib inhibits SDF1/CXCR4 mediated migration in AML. *Oncotarget*. 2014;5:9930–8.
180. Ratcliffe NA und Gagen SJ. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*. 1977;9:73–85.
181. Ratcliffe NA. Cellular defense responses of insects: unresolved problems. In: Beckage NE, Thompson SN, Federici BA, editors. *Parasites*. San Diego: Academic Press, Inc; 1993. p. 267–304.
182. Arteaga Blanco LA, Crispim JS, Fernandes KM, Oliveira LL de, Pereira MF, Bazzolli DMS und Martins GF. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell Tissue Res*. 2017;370:153–68.
183. Sarma JV und Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343:227–35.
184. Schifferli JA, Bartolotti SR und Peters DK. Inhibition of immune precipitation by complement. *Clin Exp Immunol*. 1980;42:387–94.
185. Li K, Sacks SH und Sheerin NS. The classical complement pathway plays a critical role in the opsonisation of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Immunol*. 2008;45:954–62.
186. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H und Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods*. 1995;184:39–51.
187. Riccardi C und Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1:1458 EP.
188. Hornsey M, Phee L, Longshaw C und Wareham DW. *In vivo* efficacy of telavancin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:285–7.
189. Hornsey M und Wareham DW. *In vivo* efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:3534–7.

-
190. Tsai CJ-Y, Loh JMS und Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7:214–29.
191. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N und Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6:359–62.
192. Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N und Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods*. 2014;11:319–24.
193. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, Haw R, Jassal B, Korninger F, May B, Milacic M, Roca CD, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Viteri G, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H und D'Eustachio P. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D649-D655.
194. Clahsen T und Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1521–9.
195. Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL und Murphy WJ. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1996;97:1931–41.
196. Yona S und Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*. 2010;17:53–9.
197. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin J-H, Kim JM, Lee YC, Seol SY, Cho DT und Lee JC. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;301:224–31.
198. King LB, Swiatlo E, Swiatlo A und McDaniel LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;55:414–21.
199. Abreu AG und Barbosa AS. How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing. *Front Immunol*. 2017;8:452.

-
200. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK und Lee JC. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2005;7:1127–38.
201. Lee JC, Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Park JC und Cho JW. Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;109:679–84.
202. Sjölander M, Altenbacher G, Hagner M, Sun W, Schedin-Weiss S und Sjölander H. Meningococcal outer membrane protein NhhA triggers apoptosis in macrophages. *PLoS ONE.* 2012;7:e29586.
203. Wang L, Qin W, Zhang J, Bao C, Zhang H, Che Y, Sun C, Gu J, Feng X, Du C, Han W, Langford Richard P und Lei L. Adh enhances *Actinobacillus pleuropneumoniae* pathogenicity by binding to OR5M11 and activating p38 which induces apoptosis of PAMs and IL-8 release. *Sci Rep.* 2016;6:24058.
204. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516.
205. Riedl SJ und Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2004;5:897.
206. Weinrauch Y und Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:155–87.
207. Dijkshoorn L, Nemec A und Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:939–51.
208. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L und Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE.* 2010;5:e10034.
209. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP und Dunman PM. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun.* 2010;78:1952–62.
210. Heesemann J und Grütter L. Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;40:37–41.

211. Tamm A, Tarkkanen AM, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P und Skurnik M. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*. 1993;10:995–1011.
212. Kempf VAJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation*. 2005;111:1054–62.
213. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT und Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*. 2011;12:126.
214. Hori K und Matsumoto S. Bacterial adhesion: from mechanism to control: Invited Review Issue 2010. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;48:424–34.
215. Krachler AM und Orth K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*. 2013;4:284–94.
216. Stones DH und Krachler AM. Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization. *Biochem Soc Trans*. 2016;44:1571–80.
217. Chagnot C, Listrat A, Astruc T und Desvaux M. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cell Microbiol*. 2012;14:1687–96.
218. KÖLjalg S, Vuopio-Varkila J, Lyytikäinen O, Mikelsaar M und Wadström T. Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*. *Apmis*. 1996;104:659–65.
219. Heise T und Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:3375–80.
220. Müller NF, Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, Riess T, Schäfer A, Eble JA und Kempf VAJ. Trimeric autotransporter adhesin-dependent adherence of *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Yersinia enterocolitica* to matrix components and endothelial cells under static and dynamic flow conditions. *Infect Immun*. 2011;79:2544–53.

-
221. Alamuri P, Löwer M, Hiss JA, Himpf SD, Schneider G und Mobley HLT. Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*. *Infect Immun*. 2010;78:4882–94.
222. Nägele V, Heesemann J, Schielke S, Jiménez-Soto LF, Kurzai O und Ackermann N. *Neisseria meningitidis* adhesin NadA targets beta1 integrins: functional similarity to *Yersinia invasin*. *J Biol Chem*. 2011;286:20536–46.
223. Brossard KA und Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2012;80:228–33.
224. Gaynes R und Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41:848–54.
225. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP und Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39:309–17.
226. Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, Wenzel RP und Seifert H. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect*. 2012;64:282–90.
227. Virji M, Alexandrescu C, Ferguson DJ, Saunders JR und Moxon ER. Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol*. 1992;6:1271–9.
228. Claes J, Liesenborghs L, Lox M, Verhamme P, Vanassche T und Peetermans M. *In vitro* and *in vivo* model to study bacterial adhesion to the vessel wall under flow conditions. *J Vis Exp*. 2015:e52862.
229. Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF und Gaehtgens P. Resistance to blood flow in microvessels *in vivo*. *Circ Res*. 1994;75:904–15.
230. Rizvi I, Gurkan UA, Tasoglu S, Alagic N, Celli JP, Mensah LB, Mai Z, Demirci U und Hasan T. Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E1974-83.

-
231. Isberg RR und Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*. 1990;60:861–71.
232. Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, Sewald N, König W und Backert S. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*. 2007;449:862–6.
233. Watarai M, Funato S und Sasakawa C. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med*. 1996;183:991–9.
234. Hauck CR und Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:5–11.
235. Truttmann MC, Misselwitz B, Huser S, Hardt W-D, Critchley DR und Dehio C. *Bartonella henselae* engages inside-out and outside-in signaling by integrin $\beta 1$ and talin1 during invasome-mediated bacterial uptake. *J Cell Sci*. 2011;124:3591–602.
236. Hudson KJ, Bliska JB und Bouton AH. Distinct mechanisms of integrin binding by *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins determine the phagocytic response of host macrophages. *Cell Microbiol*. 2005;7:1474–89.
237. Moriarty TJ, Norman MU, Colarusso P, Bankhead T, Kubes P und Chaconas G. Real-time high resolution 3D imaging of the Lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000090.
238. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:3507–12.
239. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Ärzteblatt RD. Zahl der Entbindungsstationen und Geburtshäuser rückläufig. 2018. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/94968/Zahl-der-Entbindungsstationen-und-Geburtshaeuser-ruecklaeufig>. Abgerufen am 22. Juli 2019.
240. Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreis. 28.03.2019. http://www.felix-wankel-forschungspreis.de/preistraeger_fwtfp.html. Abgerufen am 22. Juli 2019.

-
241. Cossart P und Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. 2004;304:242–8.
242. Frischknecht F und Way M. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*. 2001;11:30–8.
243. Cossart P, Pizarro-Cerdá J und Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol*. 2003;13:23–31.
244. Galán JE. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:53–86.
245. Isberg RR und Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci*. 2001;114:21–8.
246. Leong JM, Fournier RS und Isberg RR. Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J*. 1990;9:1979–89.
247. Ambrosi C, Scribano D, Aleandri M, Zagaglia C, Di Francesco L, Putignani L und Palamara AT. *Acinetobacter baumannii* Virulence Traits: A Comparative Study of a Novel Sequence Type with Other Italian Endemic International Clones. *Front Microbiol*. 2017;8:1977.
248. Parra-Millán R, Guerrero-Gómez D, Ayerbe-Algaba R, Pachón-Ibáñez ME, Miranda-Vizueté A, Pachón J und Smani Y. Intracellular trafficking and persistence of *Acinetobacter baumannii* requires transcription factor EB. *mSphere* 2018. doi:10.1128/mSphere.00106-18.
249. van Deuren M, Dofferhoff AS und van der Meer JW. Cytokines and the response to infection. *J Pathol*. 1992;168:349–56.
250. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E und Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest*. 1995;95:55–65.
251. Opal SM und DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117:1162–72.
252. Carla Liberto M, Matera G, Lamberti AG, Barreca GS, Quirino A und Focà A. *In vitro Bartonella quintana* infection modulates the programmed cell death and inflammatory reaction of endothelial cells. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003;45:107–15.

-
253. Schulte R und Autenrieth IB. *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect Immun*. 1998;66:1216–24.
254. Jun SH, Lee JH, Kim BR, Kim SI, Park TI, Lee JC und Lee YC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS ONE*. 2013;8:e71751.
255. Akira S und Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499–511.
256. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D und Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878–88.
257. Talbott H, Delaney A, Zhang P, Yu Y, Cushman RA, Cupp AS, Hou X und Davis JS. Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion. *Reproduction*. 2014;148:21–31.
258. Qiu H, KuoLee R, Harris G, van Rooijen N, Patel GB und Chen W. Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS ONE*. 2012;7:e40019.
259. Auffray C, Sieweke MH und Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669–92.
260. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M und Poxton IR. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol*. 2007;56:165–71.
261. Qin W, Wang L, Zhai R, Ma Q, Liu J, Bao C, Suna D, Zhang H, Sun C, Feng X, Gu J, Du C, Han W, Langford PR und Lei L. Apa2H1, the first head domain of Apa2 trimeric autotransporter adhesin, activates mouse bone marrow-derived dendritic cells and immunization with Apa2H1 protects against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Mol Immunol*. 2017;81:108–17.
262. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JBE und Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010;1:475–82.

-
263. Tomiotto-Pellissier F, Cataneo AHD, Orsini TM, Thomazelli APFDS, Dalevedo GA, Oliveira AG de, Panagio LA, Costa IN, Conchon-Costa I, Pavanelli WR und Almeida RS. *Galleria mellonella* hemocytes: a novel phagocytic assay for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. J Microbiol Methods. 2016;131:45–50.
264. Schindler MKH, Schütz MS, Mühlenkamp MC, Rooijackers SHM, Hallström T, Zipfel PF und Autenrieth IB. *Yersinia enterocolitica* YadA mediates complement evasion by recruitment and inactivation of C3 products. J Immunol. 2012;189:4900–8.
265. Singh B, Al-Jubair T, Voraganti C, Andersson T, Mukherjee O, Su Y-C, Zipfel P und Riesbeck K. *Moraxella catarrhalis* binds plasminogen to evade host innate immunity. Infect Immun. 2015;83:3458–69.
266. Hossain Z. Mechanism of host cell death in response to bacterial infections. J Clin Cell Immunol 2012.
267. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int. 2019;43:582–92.
268. Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? J Clin Invest. 2004;114:23–7.
269. Igney FH und Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2002;2:277–88.
270. Martinvalet D, Zhu P und Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity. 2005;22:355–70.
271. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG und Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat Rev Immunol. 2014;14:166–80.
272. Chan FK-M, Moriwaki K und Rosa MJ de. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. Methods Mol Biol. 2013;979:65–70.
273. Nonaka T, Kuwabara T, Mimuro H, Kuwae A und Imajoh-Ohmi S. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. Microbiology (Reading, Engl). 2003;149:2513–27.
274. Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD und Samuel JE. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. Infect. Immun. 1993;61:3392–402.

-
275. Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE und O'Brien AD. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect. Immun.* 1990;58:3959–65.
276. Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK und Billings PC. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem.* 1997;272:30463–9.
277. Mills SD, Boland A, Sory M-P, van der Smissen P, Kerbouch C, Finlay BB und Cornelis GR. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12638–43.
278. Monack DM, Meccas J, Ghori N und Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10385–90.
279. Jin JS, Kwon S-O, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI und Lee JC. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS ONE.* 2011;6:e17027.
280. Krzywińska S, Frąckowiak H und Kaznowski A. *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. *Current Microbiology.* 2012;65:319–29.
281. Kwon S-O, Gho YS, Lee JC und Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;297:150–6.
282. Méndez JA, Mateos J, Beceiro A, Lopez M, Tomás M, Poza M und Bou G. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways. *BMC Genomics.* 2015;16:422.
283. Beisel WR. Magnitude of the host nutritional responses to infection. *Am J Clin Nutr.* 1977;30:1236–47.
284. Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR und Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid

- and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004;45:1169–96.
285. Harris G, KuoLee R, Xu HH und Chen W. Acute intraperitoneal infection with a hypervirulent *Acinetobacter baumannii* isolate in mice. *Sci Rep.* 2019;9:6538.
286. Zhang W und Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research.* 2002;12:9–18.
287. An Z, Huang X, Zheng C und Ding W. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces HeLa cell autophagy via MAPK/JNK signaling pathway. *Int J Med Microbiol.* 2019;309:97–107.
288. Upadhy D, Ogata M und Reneker LW. MAPK1 is required for establishing the pattern of cell proliferation and for cell survival during lens development. *Development.* 2013;140:1573–82.
289. Uliczka F, Kornprobst T, Eitel J, Schneider D und Dersch P. Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase. *Cell Microbiol.* 2009;11:1782–801.
290. O'Rourke F, Mändle T, Urbich C, Dimmeler S, Michaelis UR, Brandes RP, Flötenmeyer M, Döring C, Hansmann M-L, Lauber K, Ballhorn W und Kempf VAJ. Reprogramming of myeloid angiogenic cells by *Bartonella henselae* leads to microenvironmental regulation of pathological angiogenesis. *Cell Microbiol.* 2015;17:1447–63.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. Stephan Göttig, Herrn Prof. Dr. Volkhard Kempf und Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer für die hervorragende Betreuung und Geduld bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Manuela Tietgen bedanken, die mich auf meinem Weg mit produktiven Gesprächen und lieben Worten begleitet hat.

Bei dieser Gelegenheit muss ich zudem allen früheren und jetzigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt für ihre Hilfsbereitschaft und für ihren Beitrag zum sehr guten Arbeitsklima Danke sagen. Ein besonderer Dank geht an Denia Frank, Sara Riedel-Christ und Wibke Ballhorn, die meine Arbeit durch ihre Unterstützung besonders geprägt haben.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Gabriela Weidensdorfer und meinem Partner Robert Joestel, und meinen Freunden danke ich für ihre stetigen Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Weidensdorfer
Vorname	Marko
Akademischer Grad	Master of Science (M. Sc.)



Akademischer Werdegang

09/2014 bis 10/2018 **Institut für medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums der
Goethe Universität, Frankfurt am Main**

Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand

Thema der Dissertation

Untersuchungen zur biologischen Funktion des trimeren
Autotransporter Adhäsins Ata in *Acinetobacter baumannii*

2012 bis 2014

Technische Universität, Darmstadt

Masterstudiengang Technische Biologie

Spezialisierungen: Pflanzenbiotechnologie, technische
Genetik, Mikrobiologie, medizinische Entwicklungs-
biologie

2009 bis 2012

Goethe Universität, Frankfurt am Main

Bachelorstudiengang Biowissenschaften

Spezialisierungen: molekulare Mikrobiologie, molekulare
Pflanzenphysiologie, Genetik, Molekularbiologie

Publikationen und Teilnahme an Fachkongressen

Tietgen, Manuela, ..., **M. Weidensdorfer**, ... *et al.* "Identification of the novel class D β -lactamase OXA-679 involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter calcoaceticus*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2019).

M. Weidensdorfer et al. "The *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin Ata controls key virulence traits of *Acinetobacter baumannii*." *Virulence* 10.1 (2019): 68-81.

M. Weidensdorfer et al. "Analysis of endothelial adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* using a dynamic human *ex vivo* infection model." *Infection and Immunity* 84.3 (2016): 711-722.

2015, 10th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, Athen

M. Weidensdorfer et al. "Functional analysis of *Acinetobacter baumannii* trimeric autotransporter adhesin (Ata)", Vortrag

2015, 67. Jahrestagung der DGHM, Münster

M. Weidensdorfer et al. "The *Acinetobacter baumannii* trimeric autotransporter adhesin Ata and its linkage to adhesion, invasion and pathogenicity", Vortrag

2016, 26th ECCMID, Amsterdam

M. Weidensdorfer et al. "Analysis of endothelial adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* using a dynamic human *ex vivo* infection model", ePosterpräsentation

2016, 68. Jahrestagung der DGHM, Ulm

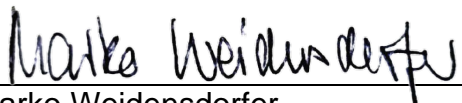
M. Weidensdorfer et al. "Insights into the biological function of the trimeric autotransporter adhesin (Ata) of *Acinetobacter baumannii*", Vortrag

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Brand-Erbisdorf, den 23. September 2022



Marko Weidensdorfer