# Analyse der Interaktion von *Acinetobacter baumannii* mit humanen epithelialen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm



vorgelegt von Dipl.-Biol. Anke Lübeck aus Heessen (Westfalen)

Ulm, Februar 2008

# Analyse der Interaktion von *Acinetobacter baumannii* mit humanen epithelialen Zellen

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

> vorgelegt von Dipl.-Biol. Anke Lübeck aus Heessen (Westfalen)

> > Ulm, Februar 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter Anleitung von Frau HD. Dr. Ulrike Gerischer und Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns angefertigt.

amtierender Dekan: Prof. Dr. K. D. Spindler Erstgutachter: HD. Dr. U. Gerischer Zweitgutachter: Prof. Dr. B. J. Eikmanns Tag der Promotionsprüfung: 18. April 2008

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, Februar 2008

A. Lie Ceck

Anke Lübeck

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat. (J. W. von Goethe, Italienische Reise, 16.03.1787)

## Inhaltsverzeichnis

I.		Einleitung	1
II.		Material und Methoden	7
	1.	Kits, Enzyme, Oligonukleotide, Proteine, Antikörper	7
	1.1	Kits	7
	1.2	Enzyme	7
	1.3	Oligonukleotide	8
	1.4	Proteine	8
	1.5	Antikörper	8
	2.	Plasmide	9
	3.	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	9
	4.	Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien	12
	4.1	Kultivierung von E. coli	12
	4.2	Kultivierung von S. agalactiae	12
	4.3	Kultivierung von Acinetobacter sp.	13
	4.4	Kultivierung von P. fluorescens	14
	4.5	Kultivierung von A549- und HEp2-Zellen	15
	5.	Trübungsmessung	17
	6.	Molekulargenetische Methoden	18
	6.1	Präparation genomischer DNA mittels CTAB	18
	6.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli mittels alkalische Lyse	19
	6.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Acinetobacter sp.	21
	6.4	Phenol-Chloroform / Isoamyl-Extraktion	22
	6.5	Alkoholische Fällung von DNA	22
	6.6	Agarosegelelektrophorese	23
	6.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	24

7.	Übertragung von DNA in Zellen	26
7.1	Konjugation von Plasmiden aus E. coli S17-1 in P. fluorescens und Acinetobacter sp.	26
7.2	Tn-Mutagenese mit P. fluorescens und Acinetobacter sp	27
8.	Southern Blot Analyse	28
8.1	Southern Blot Transfer	28
8.2	Southern-Hybridisierung	29
8.3	Detektion durch Chemilumineszenz	30
9.	Enzymatische Modifikation von DNA	31
9.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	31
10.	Proteinbindungsstudien	32
10.1	Bindung FITC-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine	32
10.2	Bindung Kristallviolett-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine	35
11.	Isolierung und Nachweis bakterieller Proteine	36
11.1	Herstellung von Proteinfraktionen aus A. baumannii	36
11.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
11.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen über eine colloidale Coomassie- Färbung	40
11.4	Western Blot	40
12.	Adhärenz und Invasion	42
12.1	Vorbereitung der Zellen für Adhärenz- und Invasionsversuche	43
12.2	Vorbereitung der Bakterienstämme für Adhärenz- und Invasionsversuche	44
12.3	Adhärenztest	44
12.4	Invasionstest	45
12.5	Auswertung	45
12.6	Adhärenzexperimente mit vorbehandelten Bakterien	46
12.7	Adhärenzexperimente mit inhibierenden Antikörpern	47
12.8	Verifizierung der Adhärenzexperimente am Rasterelektronenmikroskop	48
13.	Kapselfärbung nach Maneval	48
14.	Analyse der Biofilmbildung	49

III.		Ergebnisse	51
	1.	Analyse und Quantifizierung des Adhärenzverhaltens ausgewählter A. baumannü- Stämme an unterschiedliche eukaryotische Zelllinien	51
	1.1	Etablierung	52
	1.2	Bindung von <i>A. baumannii</i> an die humane Lungenepithelzelllinie A549 und an die Rachenepithelzelllinie HEp2	59
	1.3	Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf das Adhärenzvermögen von A. baumannii	62
	1.4	Elektronenmikroskopische Verifizierung der Adhärenz von A. baumannii an die eukaryotische Zelllinie A549	63
	2.	Analyse des Invasionsverhaltens ausgewählter A. baumannii-Stämme	65
	2.1	Etablierung	66
	2.2	Analyse des Invasionsverhaltens ausgewählter <i>A. baumannii-</i> Stämme in die eukaryotische Zelllinie A549	69
	3.	Charakterisierung bakterieller Adhäsine	71
	3.1	Adhärenzexperimente mit enzymatisch, bzw. chemisch vorbehandelten Bakterien an die humane Lungenepithelzelllinie A549	71
	3.2	Untersuchung der Bedeutung von extrazellulären Matrixproteinen für den Adhärenzmechanismus von A. baumannii	73
	3.2.1	β <sub>1</sub> -Integrin gekoppelte Matrixproteine	74
	3.2.2	Analyse der Bindung von A. baumannii an humanes Fibrinogen	74
	4.	Lichtmikroskopischer Kapselnachweis ausgewählter A. baumannii-Isolate	83
	5.	Transposonmutagenese zur Identifikation der an der Adhärenz von <i>A. baumannii</i> beteiligten Komponenten	86
	5.1	Bestimmung der Konjugationseffizienz	87
	5.2	Kolonie-PCR zum Nachweis der Transposonkassette in den Rezipienten	89
	5.3	Southern Blot-Analyse zur Bestätigung der chromosomalen Insertion der Transposonkassette	90
	6.	Analyse der Biofilmbildung von A. baumannii ATCC 19606 und verschiedenen klinischen Isolaten	93

IV.		Diskussion	97
V.		Zusammenfassung	109
		Summary	111
VI.		Literaturverzeichnis	113
VII.		Anhang	121
	1.	Material und Chemikalien	121
	1.1	Chemikalien	121
	1.2	Geräte und Materialien	127
	2.	Abkürzungen	132
	3.	Tabellarische Übersicht über die Stammsammlung von Herrn Prof. H. Seifert	135
	4.	Absorptionsspektrum von Kristallviolett	138
		Tagungsbeiträge	139
		Lebenslauf	140
		Danksagung	142

## I. Einleitung

In den vergangenen Jahren ist *Acinetobacter* sp. in verschiedenen Ländern zu einem Problemkeim geworden. Sowohl in den USA, als auch in Frankreich, Deutschland und England haben nosokomiale Infektionen mit diesen Keimen zugenommen, wobei die Einführung der Breitspektrum-Antibiotika wahrscheinlich eine wesentliche Rolle gespielt hat (Dijkshoorn, et al., 2007).

Spezies der Gattung *Acinetobacter* (von griech. akinētos = unbeweglich, baktron = Stab) werden als nicht-fermentative, gram-negative, kokkoide Stäbchenbakterien beschrieben. Phylogenetisch stehen sie der Gruppe der Pseudomonaden sehr nahe und bilden eine gemeinsame Untergruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien (Vaneechoutte et al., 2007).

Die Zellen sind Oxidase-negativ, Katalase-positiv, sporenlos und unbegeißelt. Sie wachsen strikt aerob und zeichnen sich durch eine hohe metabolische Diversität an Kohlenstoff- und Energiequellen aus (Bergogne-Bérézin, et al., 1996).

Die Bakterien zeigen ubiquitäres Vorkommen. Man kann sie u.a. aus Boden, Trinkwasser, Oberflächengewässern und verschiedenen Nahrungsmitteln isolieren, sie werden aber auch als Kommensalen der menschlichen Haut beschrieben. Es wird vermutet, dass bis zu 25 % der Bevölkerung *Acinetobacter* sp. als Bestandteil ihrer Hautflora, insbesondere im Bereich der Achselhöhlen, der Inguinalregion, sowie im Interdigitalbereich der Füße beherbergen. Bei hospitalisierten Patienten kann die Trägerrate allerdings bedeutend höher ausfallen (Chastre, et al., 2000).

Die Taxonomie hat in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte gemacht und unterscheidet heute über 32 verschiedene Spezies, davon werden 15 namentlich genannt, weitere 17 Spezies grenzen sich genomisch von den anderen ab; ihnen wurde bisher jedoch noch kein Name zugeteilt (Dijkshoorn, et al., 2007). *A. baumannii* wird nur selten auf der Haut gefunden und wenn, dann nur in sehr geringen Keimzahlen. Dieser Keim gilt vielmehr neben *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* als Hauptverursacher nosokomialer Infektionen (Bergogne-Bérézin, et al., 1996).

Nosokomiale Infektionen, also Infektionen, die im Krankenhaus erworben werden und die vor allem durch arzneimittelresistente Erreger entstehen, haben in den letzten Jahren immens an Bedeutung zugenommen. Man schätzt, dass heutzutage einer von zehn Patienten, die in ein Krankenhaus innerhalb der EU eingeliefert werden, an einer nosokomialen Infektion erkrankt. Jährlich erliegen rund 50.000 Menschen deren Folgen (Fluit, et al., 2001). Nachrichten aus den Kriegsgebieten Irak und Afghanistan berichteten von Epidemieausbrüchen in Militärkrankenhäusern unter schwer verwundeten Soldaten, verursacht durch *A. baumannii* (CDC, 2004).

Zu den Risikofaktoren, die eine Infektion durch *A. baumannii* begünstigen, zählen neben fortgeschrittenem Alter und geschwächtem Immunstatus durch andere Grunderkrankungen insbesondere lange Krankenhausaufenthalte (Intensivstation), langwierige Antibiotika-Therapien, vorangegangene chirurgische Eingriffe und die Präsenz von medizinischen Fremdkörpern, wie z. B. Kathetern oder Beatmungstuben (Prashanth, et al., 2006).

Die von *A. baumannii* hauptsächlich verursachten schweren nosokomialen Infektionen sind Atemwegsinfekte, Bakteriämien sowie sekundäre Meningitiden. Aber auch Wundinfektionen und Infektionen des Urogenitaltraktes werden beschrieben (Tomaras et al., 2007).

Bei den respiratorischen Infektionen stehen solche bei ventilierten Patienten auf Intensivstationen im Vordergrund. Die dabei identifizierten Risikofaktoren umfassen u.a. neurochirurgische Interventionen, Schädeltraumata, antibiotische Behandlung und chronische Lungenaffektionen. Die Mortalitätsrate bei solchen Patienten liegt, je nach Untersuchung, zwischen 30 und 75 % und ist somit also vergleichbar mit derjenigen von *Pseudomonas aeruginosa*. (Bergogne-Bérézin, et al., 1996).

Auch bei den Bakteriämien findet man das häufigste Auftreten bei immunkompromittierten Patienten. Die Form dieser Bakteriämien reicht von der gutartigen transistorischen Bakteriämie bis zum fulminanten septischen Schock. Der primäre Infektionsherd ist häufig respiratorisch, und die identifizierten Risikofaktoren sind Malignome, Traumata sowie Verbrennungen.

Meningitis kommt praktisch ausschließlich als sekundäre Form nach einem Schädel-Hirn-Trauma sowie nach neurochirurgischen Eingriffen (z.B. Lumbalpunktion) vor. Ein weiterer Risikofaktor ist eine hochdosierte Behandlung solcher Patienten mit Antibiotika auf der Intensivstation. Die betroffenen Patienten entwickeln eine Entzündung der Hirn- und Rückenmarkshäute. Die Letalitätsrate liegt dabei bei 25 % (Bergogne-Bérézin, et al., 1996).

Eine weitere mögliche Risikogruppe sind Neugeborene auf neonatologischen Intensivstationen, bei denen Septikämien sowohl in Japan als auch in Israel beschrieben worden sind. Die dabei angegebenen Risikofaktoren waren ein geringes Geburtsgewicht, vorangegangene Antibiotika - Therapie und mechanische Beatmung.

Die Übertragung von *A. baumannii* erfolgt primär über den Kontakt mit infizierten Personen oder durch das Krankenhauspersonal. Bei früheren Untersuchungen sind 4 bis 30 % des Krankenhauspersonals als Träger von *Acinetobacter* sp. identifiziert worden. Die Übertragung

#### Einleitung

über die Hände scheint also von entscheidender Bedeutung bei der Ausbreitung nosokomialer Infektionen zu sein (Seifert, 1995). Verschiedene *A. baumannii*-Epidemien sind aber auch im Zusammenhang mit einer Übertragung durch kolonisierte medizinische Gerätschaften mit Beatmungs- und Befeuchtungsgeräten beschrieben worden, die von dem Keim als Reservoir genutzt wurden. Der Organismus bildet Biofilme auf abiotischen und biotischen Oberflächen aus, wodurch ihm eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen verliehen wird, sowie die Fähigkeit, mehrere Tage bis Wochen in unbelebter Natur, sogar unter trockenen und staubigen Bedingungen zu überleben (Vidal, et al., 1996). Damit besteht die Möglichkeit einer Übertragung über Vektoren, wie z.B. kontaminierte Bettwäsche oder kontaminierte Instrumente (Beatmungsschläuche, intravaskuläre Katheter und auch Luftbefeuchter) und erklärt die Entwicklung und Persistenz der Epidemien durch *A. baumannii*.

Biofilme sind im Allgemeinen als mikrobielle, sessile Gemeinschaft definiert, charakterisiert durch Zellen, die irreversibel mit Substraten, bzw. Interphasen oder miteinander verbunden sind (Donlan, und Costerton, 2002). Die Bakterien im Biofilm liegen eingebettet in eine Matrix aus exopolymeren Substanzen, die von den Bakterien selbst produziert wurden. Im Zusammenhang mit Infektionen wird die Fähigkeit zur Biofilmbildung als entscheidender Virulenzfaktor angesehen, der den Bakterien die Möglichkeit bietet, auch in feindlicher Umgebung zu überleben. So sind die im Biofilm eingeschlossenen Erreger wirkungsvoll geschützt vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus und zeigen eine außerordentliche Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen. Letzteres wird durch verschiedene Faktoren begünstigt:

Die extrapolymeren Substanzen des Biofilms wirken als Diffusionsbarriere, die zu einer verzögerten Penetration der Agenzien durch die Biofilm-Matrix führt. Zudem zeigen Biofilm-Bakterien einen anderen Phänotyp als frei in Dispersion wachsende Keime, der sich zunächst in einer verlangsamten Wachstumsrate äußert. Somit werden die antimikrobiellen Substanzen viel langsamer aufgenommen. Zusätzlich kommt es zu einer veränderten Gentranskription in Abhängigkeit der im Biofilm vorherrschenden Bedingungen, was sich bei *A. baumannii* u. a. in einer Überproduktion von β-Laktamasen zeigen kann (Donlan, and Costerton, 2002).

Auch *A. baumannii* zeigt Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika. Häufig findet man diese in Form einer Multiresistenz gegen ß-Laktame und Aminoglykoside. Diese wird hauptsächlich durch ß-Laktamasen, sowie Aminoglykosid-modifizierende Enzyme vermittelt, aber auch eine enzymatische Inaktivierung, oder der aktive Transport der antimikrobiellen Substanz nach außen, bzw. der gedrosselte Einstrom sind klassische Mechanismen, die zum umfangreichen Resistenzvermögen von *A. baumannii* beitragen. Dabei besitzt der Organismus allgemein nur sehr wenige chromosomale Resistenzgene, die meisten Gene, die solche inaktivierenden Enzyme, wie z. B. ß-Laktamasen oder spezifische Efflux-Pumpen kodieren, sind nur in einigen *A. baumannii*-Stämmen präsent, sie liegen in vielen Fällen auf mobilen genetischen Elementen, wie Integrons (Ploy et al., 2000), Transposons, und Plasmiden vor und wurden vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben (Bergogne-Bérézin, et al., 1996; Dijkshoorn, et al., 2007). Die aktuelle Genomsequenzierung von *A. baumannii* (Smith, et al., 2007) identifizierte dem entsprechend Resistenzgeninseln, die offensichtlich durch sukzessive Insertion mobiler genetischer Elemente mit einem weiten Wirtsspektrum an bevorzugter Stelle in das *A. baumannii*-Chromosom zu Stande gekommen sind (Towner, 2007).

Es wurden viele epidemiologische Studien und Analysen der auftretenden Antibiotika-Resistenzen durchgeführt, genaue Kenntnisse über Pathogenitätsfaktoren und Virulenzmechanismen, die zu einer effizienten Therapie führen könnten, liegen zur Zeit aber nicht vor.

Eine koreanische Arbeitsgruppe untersuchte erstmals molekulargenetisch die Interaktion von *A. baumannii* mit humanen Rachenepithelzellen HEp2. Sie konnte nach einer Infektionsinkubation von zwölf Stunden cytotoxische Effekte auf die eukaryotischen Zellen beobachten: Die Zellen fingen an zu schrumpfen, zeigten eine Abkugelung und ein Ablösen vom Plattenboden. Die chromosomale DNA lag fragmentiert in einzelne Oligonukleotide vor. Die Beobachtungen führte man auf das so genannte "outer membrane protein" OmpA zurück, ein Porin, das auf der Oberfläche von *A. baumannii* verankert ist und in der frühen exponentiellen Wachstumsphase sekretiert wird. Es besitzt eine Signalsequenz für die Mitochondrien der Wirtszellen und führt in der frühen Infektionsphase zu einer Aktivierung von Apoptose-induzierenden Faktoren, wie z.B. Cytochrom c und dem Apoptose-induzierenden Faktor AIF (Choi et al., 2005). Die Mechanismen, auf denen die Interaktion des pathogenen Erregers mit eukaryotischen Zellen basiert, sind jedoch noch weitestgehend unklar.

Die Adhärenz stellt in der Pathogenese ein Schlüsselereignis dar, denn sie vermittelt den primären engen Kontakt zwischen Krankheitserreger und Wirtsorganismus. Ohne diesen wäre eine Besiedelung des Wirts aufgrund unspezifischer, physikalischer Abwehrmechanismen, wie z.B. Sekretfluss oder Peristaltik kaum möglich (Finlay, und Falkow, 1997). Die Adhärenz ermöglicht es den Bakterien, gegebenenfalls in die Wirtszellen, bzw. in tiefere

Gewebeschichten vorzudringen und sich anschließend über die Blutbahn in andere Körperregionen auszubreiten.

Voraussetzung für die Adhärenz ist eine Interaktion von Komponenten der Bakterienoberfläche, den so genannten Adhäsinen, und komplementären Rezeptorstrukturen an der Wirtsoberfläche (Niemann, et al., 2004). Man unterscheidet hierbei zwischen Fimbrien als Adhäsinen und so genannten Nicht-Fimbrien-Adhäsinen.

Bei den Fimbrien handelt es sich um filamentöse Fortsätze auf der bakteriellen Oberfläche, die aus Untereinheiten des so genannten Hauptpiliproteins aufgebaut sind. Einige Pili weisen noch eine feine Spitze aus Nebenpiliuntereinheiten auf, an dieser befindet sich das eigentliche Fimbrienadhäsin. Die meisten dieser Adhäsine binden an spezifische Kohlenhydrateinheiten von Glykoproteinen oder Glykolipiden, die sich auf der Wirtszelloberfläche befinden (Soto et al., 1999). Sie wirken zusätzlich als Hämagglutinine, da sie die Fähigkeit besitzen, Erythrozyten zu agglutinieren. Letzteres Phänomen konnte auch für *A. baumannii* bestätigt werden. In Hämagglutinationsexperimenten zeigten verschiedene *A. baumannii*-Isolate die Fähigkeit, menschliche Erythrozyten der Blutgruppe AB zu agglutinieren. Dabei korrelierte die Anwesenheit von Fimbrien mit dem Hämagglutinationsvermögen der getesteten Stämme (Braun et al., 2004).

Außer Fimbrien scheinen aber auch noch andere Strukturen, bzw. Mechanismen an der Interaktion von *A. baumannii* mit eukaryotischen Zellen beteiligt zu sein. So erfolgte die Bindung an Tracheal- und Blasengewebe der Ratte unabhängig von der Produktion an Fimbrien (Ruiz et al., 1998; Sepulveda et al., 1998). Zusammenfassend wurde eine Interaktion zwischen *A. baumannii* und eukaryotischen Epithelzellen in verschiedenen Studien nachgewiesen, die Mechanismen, auf denen die unterschiedlichen Adhärenzphänomene basieren, sind aber noch nicht vollständig geklärt.

In manchen Fällen können auch Proteine der extrazellulären Matrix als Vermittler zwischen bakteriellen Adhäsinen und Rezeptorstrukturen auf der Wirtszelle zwischengeschaltet sein. Zu solchen Proteinen zählen v. a. Laminin, Fibronektin und Kollagen. Sie bedecken gewöhnlich die Oberfläche eukaryotischer Zellen und sind an so genannte  $\beta_1$ -Integrine gebunden. Bei diesen handelt es sich um Heterodimere, die als Transmembranverbindungsglieder wirken, indem sie die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett verbinden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Untersuchung der molekularen Grundlagen einer Infektion des Menschen mit *A. baumannii* eingeleitet werden mit dem Ziel, Komponenten zu identifizieren und zu analysieren, welche zur Interaktion mit humanen Zellen notwendig sind. Dazu sollten Experimente zur Analyse des Adhärenz- und Invasionsverhaltens mit verschiedenen epithelialen Zelllinien aus dem menschlichen Respirationstrakt etabliert werden. Hervorgehend aus einer Kooperation mit Prof. Dr. H. Seifert, (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Köln), einem Wissenschaftler, der sich mit der Isolation von *Acinetobacter* aus infizierten Patienten beschäftigt, stand für die geplanten Untersuchungen eine Sammlung aus knapp 40 verschiedenen klinischen Isolaten von *A. baumannii* zur Verfügung. Eine Übersicht, in der die verschiedenen Stämme aufgelistet sind, befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Komponenten zu identifizieren, die für das Adhärenzvermögen von *A. baumannii* notwendig sind. Dabei war es von Interesse zu untersuchen, ob das Adhärenzvermögen der Bakterien auf einer Bindung an eukaryotische Proteine der extrazellulären Matrix basiert.

Auf der Suche nach bakteriellen Adhäsinen wurde zudem eine Transposonmutagenese durchgeführt mit der Absicht, bei der generierten Mutantenbank nach Stämmen zu suchen, die ihre Fähigkeit zur Adhärenz an die eukaryotischen Epithelzellen verloren haben.

Es war dabei geplant, die Transposonmutagenese mit Hilfe eines Tn5-basierenden Systems durchzuführen, welches zu einer Vielzahl von Mutantenstämmen führt mit je einer einzelnen Mutation (Tn-Integration).

Weiteres Ziel war es in der vorliegenden Arbeit, eine Methode zu etablieren, mit der die Biofilmbildung von *A. baumannii* demonstriert werden kann.

## II. Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien sind dem Anhang zu entnehmen.

## 1. Kits, Enzyme, Oligonukleotide, Proteine und Antikörper

#### 1.1 Kits

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Kits wurden vor allem zur Aufreinigung und Konzentrierung von DNA eingesetzt.

Microcon 100-Microkonzentratoren	Amicon GmbH; Witten
Nucleo Spin Extract 2 in 1	Macherey und Nagel GmbH; Düren

### 1.2 Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und New England Biolabs GmbH (Schwalbach) bezogen.

Weitere Enzyme sind nachfolgend aufgelistet.

Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH;	Steinheim
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH;	Mannheim
RNase A (DNase-frei)	Roche Diagnostics GmbH;	Mannheim
T4-Ligase (1U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas GmbH;	St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH;	St. Leon-Rot
Natriumperjodat	Merck, KGaA;	Darmstadt,
Pronase (Streptomyces griseus; 6,3 U/mg)	Merck, KGaA;	Darmstadt,
Lipase (Typ II aus Schweinepankreas)	Merck, KGaA;	Darmstadt,
Endo H	Biolabs;	New England

## 1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für die Amplifizierung von DNA – Fragmenten oder Sequenzierungen wurden von der Firma Biomers bezogen. Die Oligonukleotide wurden mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei –20 °C gelagert. Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid - Primer aufgelistet.

Oligonukleotid-Primer für die Durchführung der Kolonie – PCR und für die Herstellung der Southern-Blot-Sonde zum Nachweis von der Transposonkassette des Plasmides pRL27

tnpRL17-1:	5'- CGT TAC ATC CCT GGC TTG TT -3'
tnpRL17-2:	5'- TCG TGA AGA AGG TGT TGC TG-3'

#### **1.4 Proteine**

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind nachfolgend aufgelistet.FibrinogenSigma-Aldrich Chemie GmbH, SteinheimBSASigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

#### 1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind nachfolgend aufgelistet.

Anti- ß1-Integrin-Antikörper	D09400-8	Oncogen, Haar
Anti-Fibrinogen-Antikörper	A0080	Dako Cytomation, Glostrup, Denmark
Anti-Kaninchen-Antikörper	P0448	Dako Cytomation, Glostrup, Denmark

Die Antikörper wurden bis zur Verwendung nach Herstellerangaben gelagert. Eine längere Lagerung der Antikörper erfolgte bei -20 °C, in 50 % - Glyzerin.

## 2. Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Plasmide

Bezeichnung	Größe [kBp]	Eigenschaften	Referenz / Herkunft
pRL27	4,08	Tn5 mit Km <sup>R</sup> , <i>tnp</i> , R6K ori, RP4 oriT;	Larsen <i>et al.</i> , 2002
pRK415	10,5	Tc <sup>R</sup> <i>lacp/o</i> Shuttle Vektor	Keen et al., 1988

## 3. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien sind in folgender **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tabelle 2: Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

<u>E. coli-Stämme:</u>			
Stamm	Genotyp	Referenzen / Herkunft	
DH5a	recA1, endA1, hsdR17 (r-, m+), supE44,gyrA96, thi-1, deoR, F-, $\lambda$ -, $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZY-argF)U196, phoA	Hanahan, 1983	
S17/1	C600::RP-4, 2-(Tc::Mu) (Km::Tn7), <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> <sup>-</sup> , <i>hsdM</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i>	Simon et al., 1983	
DH5 $\alpha/\lambda pir$	$\varphi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, recA1, hsdr17, deoR, thi-1, supE44, gyrA96, relA1/ $\lambda$ pir	Miller und Mekalanos, 1988	

Material	und	Methoden
----------	-----	----------

Stamm	Genotyp	Referenzen / Herkunft
BW20797	RP4-2-Tc::Mu-1 kan::Tn7 integrant leu-63::IS10 recA1 zbf-5 creB510 hsdr17 endA1 thi uidA (ΔMIuI)::pir	Metcalf et al.; 1996
K12	Wildtyp	
<u>S. agalactiae - Stämme:</u>		
6313	klinisches Isolat eines infizierten Neugeborenen; Serotyp III	Valentin-Weigand, 1996
<u>Pseudomonas sp Stämme</u>		
Pseudomonas fluorescens	Wildtyp	
<u>Acinetobacter baumannii – Stämme</u>		
ATCC 19606	Referenzstamm	Bouvet and Grimont, 1991
20820	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
17093	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
7961	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
6675	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
19001-I	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
19001-II	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
284	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
10247	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
10812	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005
1901	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005

Stamm	Genotyp	Referenzen / Herkunft	
A. haemolyticus 10812	klinisches Isolat	Prof. Dr. H. Seifert, 2005	
A. calcoaceticus BD4	Wildtyp	Juni und Janick, 1969	
A. baylyi ADP1	kapsellose Mutante von	Juni und Janick, 1969	
	A. calcoaceticus BD4		
Eukaryotische Zelllinien			
Zellart	Eigenschaften	Referenzen / Herkunft	
HEp2	menschliche	ATCC CCL-23	
	Rachenepithelzelllinie		
A549	menschliche	ATCC CCL-185	
	Lungenepithelzelllinie		

## sonstige Acinetobacter sp. - Stämme

## 4. Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien

## 4.1 Kultivierung von E. coli

#### Medien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme wurden sowohl in 2 x TY-Komplexmedium, als auch in LB- (Luria-Bertani-) Komplexmedium (Sambrook *et al*; 1989) kultiviert. Diese Medien setzen sich wie folgt zusammen:

2 x TY–Medium		LB-Medium	
Trypton	16 g/l	Trypton	10 g/l
NaCl	5 g/l	NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	10 g/l	Hefeextrakt	5 g/l

Für die Herstellung von Agarplatten wurde das jeweilige Medium vor dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) mit 16 g/l Bacto Agar versetzt.

#### Anzucht und Lagerung

In Flüssigkulturen erfolgte die Inkubation bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 180 rpm, Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Für Mini-Plasmidpräparationen wurden die Kulturen in einem Volumen von 5 ml Flüssigmedium in Reagenzgläsern kultiviert. Für Midi-Plasmidpräparationen wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen und ein Volumen von 70 ml 2 x TY-Medium zur Anzucht der Bakterien verwendet.

Auf Agarplatten war es möglich, *E. coli* bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufzubewahren. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Flüssigkulturen mit 10 % DMSO versetzt und diese bei -70 °C gelagert.

#### 4.2 Kultivierung von S. agalactiae

#### Medien

Die Züchtung aller in dieser Arbeit verwendeten *S. agalactiae*-Stämme erfolgte in THY-Komplexmedium (<u>T</u>odd-Hewitt <u>B</u>roth (Fertigmischung von Oxoid) mit zugesetztem Hefeextrakt). Das Medium wurde wie folgt hergestellt:

## **THY-Medium**

Todd-Hewitt Broth	36,4 g/l
Hefeextrakt	10 g/l

Für die Herstellung von THY - Platten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

#### Anzucht und Lagerung

*S. agalactiae* wurde bei 37 °C inkubiert. In Flüssigmedium erfolgte die Inkubation stehend oder unter leichtem Schütteln. Die Kultivierung der Streptokokken auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Die Agarplatten wurden maximal 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Das Anlegen von Glycerin-Kulturen (500  $\mu$ l Glycerin + 500  $\mu$ l Flüssigkultur) diente der langfristigen Lagerung von *S. agalactiae* - Kulturen. Diese wurden bei -70 °C aufbewahrt.

#### 4.3 Kultivierung von Acinetobacter sp.

#### Medien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Acinetobacter*-Stämme wurden sowohl in Mineralmedium, als auch in LB - Komplexmedium kultiviert. Das Mineralmedium setzt sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Zugabe	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,8 g	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g	8,8 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g	9,3 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g	0,8 mM
Succinat (1M)	10 ml	10 mM
A. bidest. ad 1000 ml		

Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung fester Medien erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von Bacto-Agar (Difco) speziell für Minimalmedien (16 g/l).

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Lösungen steril zugegeben

Komponenten	Zugabe	Endkonzentration
FeSO <sub>4</sub> (5 mg/ml)	1 ml	0,033 mM
CaCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1ml	0,034 mM

Zur Selektion rekombinanter *Acinetobacter*-Kolonien mittels Antibiotika, wurden sterilfiltrierte Stammlösungen dem autoklavierten Medium nach Abkühlung auf ca. 60 °C bei Agar, bzw. RT bei Flüssigmedien zugegeben. Die Antibiotikakonzentrationen zur Selektion rekombinanter *Acinetobacter*-Stämme waren wie folgt:

Tetrazyklin	12,5 µg/ml
Kanamyzin	15 μg/ml

#### Anzucht und Lagerung

In Flüssigkulturen erfolgte die Inkubation für sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 180 rpm. Agarplatten wurden im Brutschrank ebenfalls sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C bebrütet.

Auf Agarplatten wurde *Acinetobacter* sp. bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Flüssigkulturen mit 10 % DMSO versetzt und diese bei -70 °C gelagert.

#### 4.4 Kultivierung von Pseudomonas fluorescens

Der Stamm *P. fluorescens* wurde sowohl in Mineralmedium, als auch in LB- Komplexmedium bei 30 °C und in Flüssigkultur bei einer Schüttelfrequenz von 180 rpm kultiviert.

Zur Selektion rekombinanter *Pseudomonas* sp. - Kolonien mittels Antibiotika, wurden sterilfiltrierte Stammlösungen dem autoklavierten Medium nach Abkühlung auf ca. 60 °C bei

Agar, bzw. RT bei Flüssigmedien zugegeben. Die Antibiotikakonzentrationen zur Selektion rekombinanter *Pseudomonas*-Stämme waren wie folgt:

Tetrazyklin12,5 μg/mlKanamyzin50 μg/ml

Auf Agarplatten wurde *P. fluorescens* bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Flüssigkulturen mit 10 % DMSO versetzt und diese bei -70 °C gelagert.

## 4.5 Kultivierung von A549 - Zellen und HEp2 - Zellen

Medien

A549 – Zellen wurden in RPMI – Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS),

HEp2 – Zellen in MEM - Medium mit 10% FCS inkubiert.

Diese Medien sind nachfolgend aufgelistet.

<b>RPMI</b> + 10 % (v/v) FCS		<b>MEM + 10 % (v/v) FCS</b>	
RPMI	500 ml	MEM 5	500 ml
L-Glutamat (200 mM)	5 ml	L-Glutamat (200 mM)	5 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml	Natriumpyrovat	5 ml
Non Essential Aminoacids (NEAA)	5 ml	Non Essential Aminoacids (NEAA)	5 ml
FCS	50 ml	FCS	50 ml
ad 1 l A. bidest		ad 1 l A. bidest	

Die Herstellung der Medien erfolgte immer unter der Sterilwerkbank. Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde das FCS vor Zugabe zum Medium für 30 min bei 56 °C inaktiviert. Die Komponenten L-Glutamat, Natriumpyruvat und die NEAA wurden sterilfiltriert dem Medium zugegeben. Die Lagerung des fertigen Mediums erfolgte bei 4 °C, wobei das Medium nicht länger als 4 Wochen verwendet wurde.

Für die Kultivierung der A549 - und der HEp2 - Zellen wurde ein Phosphatpuffer benötigt, der aus einer zehnfach konzentrierten Stammlösung hergestellt wurde.

#### 10 x PBS (für Zellkultur)

KCl	2,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/l
NaCl	80,0 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	21,6 g/l

Der 10-fach konzentrierte PBS - Puffer wurde vor der Verwendung 1:10 verdünnt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, und die Lösung autoklaviert.

#### Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut und in 20 ml Zellkulturmedium (10 % FCS) aufgenommen. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 15 min., RT) wurde das Zellpellet vorsichtig in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und das gesamte Volumen in eine 50 ml – Kulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C mit  $5 \% CO_2$ .

Zur Entfernung nicht am Boden haftender, toter Zellen wurde das Medium am nächsten Tag vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, die am Plastikboden anhaftenden Zellen einmal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in insgesamt 20 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen, in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 8 ml frischem Medium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit 22 ml frischem Zellkultur - Medium versetzt und zum Animpfen einer 250 ml - Kulturflasche verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>.

#### Kultivierung in 250 ml - Kulturflaschen

Die in dieser Arbeit verwendeten HEp2- und A549-Zellen teilen sich etwa einmal in 24 Stunden. Nach etwa 3 bis 4 Tagen sind die Zellen konfluent in der Kulturflasche gewachsen und müssen erneut verdünnt werden, um konstantes Wachstum und Zellteilungsmöglichkeit gewährleisten zu können. Zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium von den Zellen vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in insgesamt 20 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen, in ein steriles 50 ml

Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 8 ml frischem MEM - , bzw. RPMI -Medium suspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 1,5 bis 3 ml mit 28 ml frischem RPMI-Medium versetzt und zum Animpfen einer neuen Kulturflasche verwendet. Die Kulturflasche wurde wiederum für drei Tage inkubiert.

#### Einfrieren eukaryotischer Zellen

Als Ausgangsmaterial für das Einfrieren eukaryotischer Zellen diente der konfluente Monolayer einer 250 ml – Flasche. Die Zusammensetzung des Einfriermediums ist im Folgenden aufgeführt:

Zellkulturmedium (RPMI, bzw. MEM)	8 ml
FCS (Hitze - inaktiviert)	1 ml
DMSO (Sigma, D2650)	1 ml

 $\rightarrow$  steril filtrieren

Die Zellen wurden wie unter "Kultivierung in 250 ml - Kulturflaschen" aufgeführt aus dem Gewebeverband gelöst und abzentrifugiert. Nach dem das Zellsediment in 3 ml Einfriermedium resuspendiert worden war, wurden 1 ml Portionen in Kryoröhrchen überführt, für 20 min auf Eis abgekühlt, 2 Stunden bei -20 °C inkubiert und ÜN bei -70 °C gelagert. Die Zellen wurden am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie dann langfristig aufbewahrt werden konnten.

## 5. Trübungsmessung

Durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers konnte der Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur verfolgt werden. Die Messung erfolgte in einer 1-ml-Kunststoffküvette mit unbeimpftem Medium als Referenzwert. Um eine Linearität zwischen der Zunahme der optischen Dichte und der Zellzahl zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die Absorptionsmesswerte nicht über 0,3 lagen. Gegebenfalls wurde die Probe mit unbeimpftem Medium verdünnt.

## 6. Molekulargenetische Methoden

#### 6.1 Präparation genomischer DNA mittels CTAB

Bei diesem Verfahren werden Bakterien einer gesättigten Flüssigkultur lysiert, und Proteine aus dem Ansatz entfernt durch Verdau mit Proteinase K. Anschließend werden Zelltrümmer, Polysaccharide und verbliebene Proteine durch Präzipitation mit Cetyltrimethyl – Ammoniumbromid (CTAB), einem ionischen Detergenz eliminiert. Eine abschließende Isopropanol-Behandlung fällt hochmolekulare DNA aus dem Überstand (Murray und Tompson, 1980; Meade et al., 1982; Silhavy et al., 1984).

Die Durchführung dieser Methode und die dazu notwendigen Pufferlösungen sind im Folgenden beschrieben:

10x TE-Puffer (pH 7,6)

• Tris-Base 100 mM

10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)

5 M NaCl

• EDTA 10 mM Proteinase K (20 mg/ml)

10 % CTAB in 0,7 M NaCl

Zur DNA – Isolierung aus *Acinetobacter* sp. und *Pseudomonas fluorescens* wurden 1,5 ml einer Übernacht-Kultur in LB-Medium für 5 min bei 8000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Bakterienpellet in 567 µl TE-Puffer suspendiert. Zur Lyse der Zellen und zum Ausfällen, bzw. zum Abbau von Proteinen wurden 30 µl 10 % (w/v) SDS und 3 µl Proteinase K zum Ansatz gegeben, und dieser für eine Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die Zugabe von 100 µl gesättigter NaCl - Lösung (5 M) und langsames Schwenken, bis ein weißer Niederschlag sichtbar wurde, führte zur Fällung von Proteinen. Restliche Proteine, Zelltrümmer und Polysaccharide wurden nach Zugabe von 80 µl CTAB / NaCl – Lösung (10 % CTAB, 0,7 M NaCl) und anschließender Inkubation für 10 min bei 65 °C im Heizblock durch Komplexbildung aus dem Ansatz entfernt. Die Komplexe wurden bei Raumtemperatur für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch eine zweimalige Phenolextraktion von restlichen Proteinen getrennt. Durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol wurde die chromosomale DNA gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach

Trocknung in 100  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Die Aufbewahrung der chromosomalen DNA erfolgte stets bei 4 °C .

#### 6.2 Isolierung von Plasmid - DNA aus E. coli mittels alkalischer Lyse

Um Plasmidpräparationen durchzuführen, wurden die *E. coli* - Zellen stets in TY-Medium gezüchtet. In diesem Medium wächst *E. coli* zu einer höheren optischen Dichte als in LB - Medium heran, wodurch die Ausbeute an Plasmid - DNA erhöht wird. Das Verfahren zur Isolierung von Plasmid - DNA mittels alkalischer Lyse wurde zuerst von Birnboim und Doly (1983) beschrieben. Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen zur Plasmidisolierung aufgeführt.

Sol A (pH 8,0) Sol B (f		Sol B (frisch	n ansetzen)	Sol C (pH 5,2)	
Glucose	50 mM	NaOH	0,2 M	Kaliumacetat 3 M	
Tris/HCl (pH 8,0)	25 mM	SDS (w/v)	1 %	Eisessig (v/v) 11,5 %	
EDTA (pH 8,0)	10 mM				

#### Mini-Plasmidpräparation

Mit dieser leicht abgewandelten Methode der alkalischen Lyse lässt sich schnell Plasmid-DNA gewinnen. Zunächst wurden 2 ml einer in 5 ml TY gewachsenen Flüssigkultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet durch Inkubation auf einem Rüttler für 3 bis 4 min im restlichen Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl Sol A. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 300 µl Sol B zugegeben, und der Ansatz nach sofortigem und vorsichtigem Mischen 2 bis 5 min bei RT inkubiert. Das im Puffer enthaltene SDS bewirkt die Denaturierung der zellulären Proteine, das durch NaOH hervorgerufene alkalische Milieu der Lösung führt zur Denaturierung der chromosomalen und der Plasmid - DNA. Anschließend wurden 300 µl Sol C zugegeben, der Ansatz kurz geschüttelt, und erneut 5 min bei RT inkubiert. Die hohe Salzkonzentration der Lösung bewirkt die Präzipitation der denaturierten Proteine, Zellreste, SDS und chromosomaler DNA. Die Plasmid - DNA renaturiert unter diesen Bedingungen und verbleibt in Lösung. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Plasmid - DNA enthaltende klare Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Abtrennung restlicher Proteine wurde eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Die Fällung der Plasmid - DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen. Isopropanol. Nach 10 bis 15 min Inkubation bei RT wurde für 10 min bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert. Das DNA - enthaltende Pellet wurde zum Entsalzen der DNA mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in einem Heizblock bei 37 °C getrocknet, in 50  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) aufgenommen und bei –20 °C aufbewahrt.

#### Midi - Plasmidpräparation aus E. coli

Bei der Midi-Plasmidpräparation handelt es sich um eine leicht modifizierte Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Dabei werden Plasmide aus einem größeren Volumen isoliert, und die gewonnene Plasmid-DNA liegt in großer Reinheit und Menge vor.

Die Bakterien einer 70 ml ÜN- Kultur in TY-Medium wurden in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 8 min bei 4 °C und 4000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 5 ml Sol A suspendiert. Für eine bessere Lyse der Bakterien im nachfolgenden Schritt erfolgten die Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und eine Inkubation des Ansatzes für 10 min bei RT. Anschließend wurden 10 ml Sol B zugegeben, und der Ansatz nach kurzem Schwenken 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 7,5 ml Sol C, kurzem Mischen und erneuter Inkubation für 10 min auf Eis wurden Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Abtrennung weiterer Zellbestandteile, welche durch die Zentrifugation nicht sedimentiert werden konnten, durch eine Mullbinde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend durch Zugabe von 0,8 Volumen. Isopropanol. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min wurde das Plasmidhaltige Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 2 ml A. dest. gelöst. Die Zugabe von 2 ml 5 M LiCl / 50 mM Tris/HCl (pH 5.2) mit anschließender Inkubation für 15 min auf Eis führte zum Ausfallen der RNA. Diese wurde durch eine anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm sedimentiert, der DNA - haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die DNA mit 10 ml absolutem Ethanol für eine Stunde bzw. über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Plasmid - DNA wurde anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 400 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte zum Abbau weiterer RNA eine RNase -Behandlung für 30 min bei 37 °C durch Zugabe von 5 µl RNase A (10 mg/ml). Um die RNase aus dem Ansatz zu entfernen, wurde eine zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt, gefolgt von einer zweimaligen Chloroform-IsoamylalkoholBehandlung zur Entfernung restlichen Phenols. Um die Plasmid-DNA anzukonzentrieren, wurde sie mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -20 °C gefällt. Die DNA wurde für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm sedimentiert und anschließend mit 1 Volumen 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA - haltige Pellet wurde in einem Heizblock getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 suspendiert. Die Lagerung der Plasmid - DNA erfolgte bei -20 °C.

#### 6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Acinetobacter sp.: Kochmethode

Mit dieser leicht abgewandelten Methode nach Holmes und Quigley (1981) wurde in der vorliegenden Arbeit Plasmid–DNA aus *Acinetobacter* sp. isoliert. Die hierfür notwendige Pufferlösung ist im Folgenden aufgeführt:

#### **STET-Puffer**

Saccharose	8 %
Triton X-100	0,5 %
EDTA	50 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM

Dazu wurden 5 ml ÜN – Kulturen in Minimal-, oder in LB – Medium abzentrifugiert bei 13000 rpm, und das Zellpellet anschließend in 700  $\mu$ l STET – Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l frisch angesetzter Lysozym – Lösung (10 mg/ml in Tris – HCL, pH 8,0) und vorsichtigem Mischen erfolgte eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Die Proteine wurden während einer einminütigen Inkubation der Ansätze in kochendem Wasser denaturiert. Eine Abtrennung der wässrigen DNA–haltigen Phase von Zellresten und denaturierten Proteinen erfolgte nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers. Die DNA wurde durch Zugabe von 68  $\mu$ l 3 M Na – Acetat (pH 5,2) und 700  $\mu$ l Isopropanol (96 %, v/v) gefällt, nach Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, RT) das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Aufnahme des getrockneten DNA–Pellets erfolgte in 200  $\mu$ l TE – Puffer unter Zusatz von RNase A (20  $\mu$ g/ml). Vor dem experimentellen Einsatz der isolierten Plasmid – DNA erfolgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion zur Abtrennung von Proteinen.

#### 6.4 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Eine Phenolbehandlung wurde zur Denaturierung und Abtrennung von Proteinen und somit zur Aufreinigung der isolierten DNA angewendet. DNA-haltige Lösungen wurden mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 (v/v/v)) versetzt für ca. 2 min geschüttelt. Durch das Mischen kommt das wasserunlösliche Phenol mit den Proteinen in Kontakt und verdrängt durch seine Anlagerung die stabilisierende Hydrathülle um das Protein. Dadurch werden die Proteine inaktiviert bzw. denaturiert. Das Gemisch wurde anschließend zur Phasentrennung für 5 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteine befinden sich anschließend als weißer Niederschlag zwischen der wässrigen und der organischen Phase und bilden die so genannte Interphase aus. Die obere, wässrige Phase enthält die DNA, welche vorsichtig abpipettiert und erneut einer Phenolbehandlung unterzogen wurde. Zur Entfernung von Phenolresten in der wässrigen Phase wurde im Anschluss eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24/1 (v/v)) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol, wobei das Gemisch erneut für 2 min geschüttelt und im Anschluss zur Ausbildung der wässrigen Phase zentrifugiert wurde. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die DNA-haltige wässrige Lösung bis zur weiteren Verwendung in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### 6.5 Alkoholische Fällung von DNA

Die anschließende Ethanolfällung dient dem Ankonzentrieren der im Ansatz enthaltenen DNA.

Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol wurde die DNA innerhalb einer zweistündigen Inkubation bei -20 °C durch Entzug der Hydrathülle aus der wässrigen Lösung gefällt, durch anschließendes Zentrifugieren pelletiert, anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen, im Heizblock bei 37 °C getrocknet und dann in einem kleinen Volumen A. bidest oder 10 mM Tris/HCl pH 7,6 gelöst. Mittels photometrischer Detektion oder durch einen Agarosegellauf wurde die DNA-Ausbeute bestimmt.

#### 6.6 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt ein Verfahren zur Auftrennung und Größenbestimmung geladener Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes dar. Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundenen D-Galaktose- und 3,6-Anhydrogalaktose-Molekülen, dient als interne Matrix, in der DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch mehrere Faktoren, wie zum Beispiel die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflusst. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Benötigt werden die im Folgenden aufgeführten Pufferlösungen:

#### TBE-Stammlösung (5x) (SAMBROOK et al., 1989)

Tris-Base	54 g	0,089	М
Borsäure	27,5 g	0,089	Μ
EDTA (0,5 M pH 8,0)	20 ml	0,002	Μ
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		

#### Probenauftragspuffer (SAMBROOK et al., 1989)

Ficoll 400	15 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarose – Konzentration von 0,5 bis 2 % (w/v) gewählt. Hierfür wurde das Gel in einen passenden Gelschlitten gegossen und nach dem Erhärten in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt, die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllt war. Die aufzutrennende Probe wurde mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und in eine Tasche des Gels geladen. Der Ladepuffer erleichtert das Beladen der Geltaschen, indem er durch seinen Glyzerinanteil die

Dichte der Probe erhöht. Zusätzlich kann durch das zugesetzte Bromphenolblau das Laufverhalten der geladenen Proben optisch verfolgt werden. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 30 bis 130 V. Anschließend wurde das Agarosegel für 5 bis 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt und in Wasser entfärbt. Ethidiumbromid lagert sich interkalierend in DNA ein und emittiert nach Anregung mit UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) Fluoreszenzlicht, wodurch DNA im Agarosegel detektiert und mittels einer Photodokumentationsanlage photographiert werden kann.

Die Größenbestimmung von DNA - Fragmenten > 700 Bp erfolgte unter Verwendung PstI – verdauter  $\lambda$  – DNA als Standard. Dabei wird ein breites Spektrum von unterschiedlich großen DNA – Fragmenten abgedeckt. Durch den Vergleich der Banden der aufgetragenen DNA-Proben mit den Banden des Markers sind Rückschlüsse auf die Größe der aufgetrennten Moleküle möglich.

#### 6.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion stellt ein sehr wichtiges Verfahren in der Molekularbiologie zur Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte dar. Sie wurde erstmals von Mullis et al. (1986) vorgestellt und seitdem von Saiki *et al.* (1988) durch die Einführung der hitzestabilen DNA - Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* weiter optimiert. Die PCR findet heutzutage ihre Anwendung in vielen Bereichen der (Gerichts-)Medizin und Naturwissenschaften. Voraussetzung für die Anwendung der PCR sind Sequenzkenntnisse über die flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes.

Man verwendet für dieses Verfahren synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die homolog zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden DNA sind. An diese Sequenzen lagern sich die Primer nach Denaturierung der DNA an, so dass kurze doppelsträngige DNA-Bereiche entstehen, von denen aus die *Taq*-Polymerase den dazwischenliegenden einzelsträngigen Bereich mittels freier Nukleotide zu einem Doppelstrang aufpolymerisieren kann.

Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA bei 94 °C, Anlagerung (Annealing) der Primer - wobei die Annealing-Temperatur vom GC-Gehalt der Primer abhängig ist - und Verlängerung (Elongation) der Primer bei 72 °C durch die *Taq*-Polymerase, ist es möglich, ein DNA-Fragment, welches in geringer Kopienzahl vorliegt, in

großen Mengen zu amplifizieren und anschließend mittels Gelelektrophorese sichtbar zu machen.

Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes ist im Folgenden aufgeführt:

10 x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer	0,1 Vol.
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 mM
dNTP- Gemisch	200 µM
template -DNA (Plasmide, PCR-Produkte) 1-2 ng	
oder chromosomale DNA	0,5 – 1 μg
Primer 1	100 pM
Primer 2	100 pM
Taq-Polymerase	0,5 – 2 U
A. dest. $\rightarrow$ ad 50 µl	

Die Ansätze wurden gut gemischt, kurz abzentrifugiert und im programmierten Thermo-Cycler plaziert.

Im Folgenden ist ein Standard - PCR - Programm aufgeführt:

Vorabdenaturierung	: 94 °C	-	2 min 30sec
PCR-Zyklus (32 x):			
Denaturierung	: 94 °C	-	30 sec
Annealing	: 45 - 65 °C	-	30 sec
Elongation	: 72 °C	-	60 sec / 1000 Bp
Elongation	: 72 °C	-	4 min

Nach beendeter PCR-Reaktion wurden als Kontrolle je 5  $\mu$ l PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### Kolonie – PCR

Bei der Kolonie – PCR handelt es sich um eine schnelle Detektionsmethode, um nach Klonen mit der richtigen Mutation zu suchen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Überprüfung der Präsenz der Transposonkassette nach Konjugation in den Rezipienten *P. fluorescens* und *Acinetobacter* sp. durchgeführt. Bei dieser Technik können Bakterienkolonien ohne Vorbehandlung direkt in die PCR als Matrize eingesetzt werden. Hierzu wurden 4 bis 10 Kolonien von einer Agarplatte mittels eines Zahnstochers in 100 μl steriles A. dest suspendiert und als Matrize in eine Standard – PCR eingesetzt. Die weitere Vorgehensweise entspricht der einer Standard – PCR.

## 7. Übertragung von DNA in Zellen

#### 7.1 Konjugation von Plasmiden aus E. coli S17 -1 in P. fluorescens und Acinetobacter sp.

Nach der modifizierten Methode von Dimarco et al., 1993b erfolgte die Transformation des shuttle – Vektors pRK415 in *P. fluorescens und Acinetobacter* sp. durch Zell – Zell – Kontakt. Das Plasmid pRK415 lag bereits in *E. coli* S17 – 1 transformiert vor. Dieser Stamm besitzt die nötigen *tra* – Gene, um das Plasmid über Konjugation in den jeweiligen Rezipentenstamm zu übertragen.

Für die Konjugation wurden 60 ml LB-Medium mit einer ÜN-Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C unter Antibiotika-Selektionsdruck (Donor), bzw. 30 °C (Rezipient) bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,8 inkubiert.

Zur Entfernung des Antibiotikums aus dem Ansatz wurde daraufhin jeweils 1 ml Kultur 5 min bei 4 °C und 8000 rpm sedimentiert, der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 1 ml LB-Medium suspendiert Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 8000 rpm wurde das Pellet in 1 ml LB-Medium aufgenommen.

Die Konjugation erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen:

- 1:1: 200 µl Donor + 200 µl Rezipient
- 1:10 50 µl Donor + 500 µl Rezipient

Nach Zentrifugation (5 min, 8000 rpm, 4 °C) wurde das Sediment in 50  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und als Tropfen auf eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum gesetzt. Nach

Inkubation für 16 – 20 h bei 30 °C wurde die Tropfenkolonie mit 1 ml Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle geflutet, daraufhin einmal mit 1 ml Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen, um eventuell restliches LB-Medium aus dem Ansatz zu entfernen. Nach Erstellen von Verdünnungsstufen in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle wurden jeweils 100  $\mu$ l jeder Verdünnung sowohl auf Minimalmedium mit 10 mM Succinat ohne Antibiotikum, als auch auf 10 mM – Succinat -Minimalmedium mit Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl der Rezipienten erfolgt über das Auszählen der CFU (Colony Forming Units) pro Agarplatte unter Einberechnung der Verdünnungsstufen. Das Wachstum des Donorstammes ist auf Minimalmedium unterbunden. Über den direkten Vergleich mit dem Koloniewachstum auf den Antibiotika-haltigen Platten lässt sich eine Aussage über die Konjugationseffizienz machen, d.h. wie hoch die Rate der Rezipienten ist, die durch den Konjugationsprozess die entsprechende Antibiotikumsresistenz erworben haben.

#### 7.2 Transposonmutagenese mit P. fluorescens und Acinetobacter sp.

Für die Mutagenese von A. *baumannii*, A. *baylyi* ADP1 und *P. fluorescens* wurde ein so genanntes Mini-Tn5-Element verwendet, welches auf dem Vektor pRL27 kodiert vorliegt. (Larsen et al., 2002).

Dabei handelt es sich um das Konstrukt eines rekombinanten Transposons, welches auf die Komponenten reduziert ist, die für die Transposition absolut notwendig sind. Als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Transposition fungiert das Gen *aph*, dessen Expression eine Kanamyzinresistenz vermittelt und von zwei IS-Elementen flankiert wird. Das Gen, welches die Transposase codiert, ist mehrfach gezielt mutiert worden, um die Aktivität des codierten Enzyms zu steigern. Es liegt außerhalb der Transposonkassette, mit der Absicht, durch diese Konstruktion stabile Insertionen zu erzielen.

Über den shuttle-Vektor pRL27, der bereits transformiert im Donorstamm *E. coli* BW20797 vorlag, sollte das Transposon über Konjugation in die Rezipientenstämme *P. fluorescens* und *Acinetobacter* sp. eingebracht werden. Weitere Vorgehensweise gleicht der Durchführung der Konjugation von Plasmiden aus *E. coli* S17 -1 in *P. fluorescens* und *Acinetobacter* sp..
## 8. Southern Blot Analyse

Die Methode des Southern Blots wurde von Southern (1975) etabliert und dient als eine zentrale Methode des Transfers, der Fixierung und der Detektion von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen.

## 8.1 Southern Blot Transfer

Zur Durchführung eines Southern Blots wurde zunächst die chromosomale DNA mit einer Restriktionendonuklease verdaut und in einem großen 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese lief ÜN bei 24 V, um eine optimale elektrophoretische Auftrennung zu erhalten. Da der Größen-Standard nach dem Transfer nicht mehr zu erkennen ist, wurde das Gel nach der Ethidiumbromid-Färbung zusammen mit einem Lineal in der Photodokumentationsanlage photographiert. Damit ließen sich später die Größen der detektierten Fragmente auf dem Röntgenfilm feststellen.

Für den Transfer wurde die Apparatur gemäß den Herstellerangaben aufgebaut, und das Gel luftblasenfrei auf eine positiv geladene Nylonmembran gelegt. Während des gesamten Transfervorgangs war ein Unterdruck von 50 mbar an der Apparatur angelegt.

Die für den Transfer verwendeten Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

Depurinierungslösung		Denaturierungsl	<u>ösung</u>
HCl	0,25 M	NaOH	0,5 M
		NaCl	1,5 M
Neutralisierung	slösung	<u>Transferlösung</u>	( <u>20 x SSC)</u>
Tris/HCl	1 M	NaCl	3 M
NaCl	2 M	Trinatrium-Citrat	0,3 M
рН 5,0		рН 7,0	

Zuerst wurde das Gel für 20 min mit Depurinierungslösung beschichtet, wobei die Lösung während der Inkubationszeit zweimal ausgetauscht wurde. Bei der Depurinierung kommt es zu Einzelstrangbrüchen, wodurch der Transfer großer DNA-Fragmente auf die Membran sehr viel effizienter möglich wird. Anschließend wurde das Gel für 20 min mit

Denaturierungslösung beschichtet, wobei diese Flüssigkeit während der Inkubationszeit auch zweimal gewechselt wurde. Als nächstes folgte eine 20 minütige Überschichtung des Gels mit Neutralisierungslösung, die ebenfalls zweimal während der Inkubation gewechselt wurde. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran erfolgte durch die Beschichtung des Gels mit Transferlösung für 1 Stunde. Die Transferlösung wurde in dieser Zeit sechsmal ausgetauscht. Die Nylonmembran wurde kurz zwischen Whatman-Papier angetrocknet, und die DNA im UV-Crosslinker (120000  $\mu$ J, 30 s) auf der Membran fixiert. Diese wurde daraufhin bei 80 bis 100 °C für 1 bis 2 Stunden gebacken und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### 8.2 Southern-Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde zunächst eine spezifische DNA-Sonde hergestellt, indem einem Standard-PCR-Ansatz 0,5  $\mu$ l Digoxigenin-dUTP zugesetzt wurden. Durch Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide in das PCR-Produkt konnte dieses in der anschließenden Southern-Hybridisierung mit Hilfe von spezifischen Anti-Digoxigenin-Antikörpern, die mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt waren, detektiert werden.

Die für die Southern-Hybridisierung benötigten Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

(Prä-) Hybridisierungslösung	50 x Denhardt
6 x SSC	1 % (w/v) Ficoll
5 x Denhardt	1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone
0,5 % (w/v) SDS	1 % (w/v) BSA Fraktion V
100 µg/ml Heringssperma-DNA	in A. bidest bei 37 °C lösen
ad 20 ml mit A, bidest	

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit Prähybridisierungslösung im Hybridisierungsofen (65 °C) für 1 Stunde in einer Glasröhre abgesättigt. Anschließend wurden zur Prähybridisierungslösung 5  $\mu$ l Sonde, die durch 5 min Inkubation bei 95 °C und anschließendem Abkühlen auf Eis zuvor denaturiert worden war, gegeben, und die Membran über Nacht in dieser Lösung rotierend bei 65 °C inkubiert.

#### 8.3 Detektion durch Chemilumineszenz

Das Prinzip der Detektion durch Chemilumineszenz beruht auf der Bindung eines modifizierten Antikörpers an die DIG-Markierung der DNA-Sonde. An den Antikörper ist das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, die das als Substrat zugegebene CSPD<sup>®</sup> dephosphoryliert, wodurch Licht einer Wellenlänge von 477 nm ausgesendet wird. Dieses Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Nylonmembran sichtbar gemacht werden. Nachfolgend sind zunächst die für Waschschritte und Detektion erforderlichen Lösungen aufgelistet:

Waschlösung I	Waschlösung II
2x SSC	0,1x SSC
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS

#### Waschpuffer

#### **Puffer II**

0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer I

# 1 % (w/v) Blocking-Reagenz in Puffer I

Puffer I (Maleinsäurepuffer)		Puffer III (	(Detektionspuffer)
Maleinsäure	0,1 M	Tris/HCl	0,1 M
NaCl	1 M	NaCl	1 M

Die Membran wurde nach der Hybridisierung gegen die DNA-Sonde zunächst zweimal für 15 min bei RT mit Waschlösung I gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit Waschlösung II bei 65 °C für 25 min gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde kurz in Waschpuffer gelegt und anschließend für 30 min in Puffer II inkubiert. Für die Antikörperreaktion wurde Anti-Digoxygenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche) 1:10000 in 20 ml Puffer II verdünnt und der Membran für 30 min zugegeben. Nach anschließendem Waschen der Membran für zweimal 15 min in Waschpuffer wurde diese für 5 min in 20 ml Puffer III äquilibriert. CSPD<sup>®</sup> (25 mM, Roche) wurde 1:1000 in Puffer III verdünnt und der Membran für 15 min zugegeben. Nach kurzem Antrocknen der Membran auf Whatman-Papier wurde diese zwischen Kopierfolie gelegt und zum Starten der Dephosphorylierungsreaktion für 10 bis 15 min bei 37 °C präinkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amershan Pharmacia) aufgelegt und nach 1 bis 10 Stunden entwickelt.

# 9. Enzymatische Modifikationen von DNA

## 9.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Sequenz-spezifische Spaltung von Plasmid-, bzw. chromosomaler DNA wurde mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs. Sie spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch und unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Für das Spalten von chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA wurden in dieser Arbeit Restriktions-Endonukleasen des Typs II verwendet. Bei Restriktions-Endonukleasen dieses Typs liegt der Schnitt innerhalb ihrer Erkennungssequenz und somit weisen diese Enzyme absolut definierbare Schnittstellen auf. Für alle Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet. Bei der Arbeit mit zwei verschiedenen Enzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme nach Herstellerangaben zu mindestens 75 % aktiv sind. Wenn dies nicht möglich war, wurde zuerst mit einem Enzym verdaut, der gesamte Ansatz mit Ethanol gefällt und danach das andere Enzym zugegeben. Der Enzymanteil im Restriktionsansatz sollte maximal 10 % des Gesamtvolumens betragen, da den Lagerungspuffern der Enzyme in der Regel 50 % (v/v) Glyzerin zugesetzt sind und es bei Konzentrationen oberhalb von 5 % zu unspezifischen oder zur Hemmung der Enzymaktivitäten kommen kann (Fuchs und Blakesley, 1983).

## Restriktionsverdau chromosomaler DNA

Die Ansätze für die durchgeführten Southern Blots setzten sich in allen Fällen wie folgt zusammen:

10  $\mu$ l chromosomale DNA

2 µl 10x Puffer

7 µl A. dest

1 µl Restriktionsenzym

Der Ansatz wurde bei 37 °C für ca. 12 Stunden inkubiert, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Nach 6-stündiger Inkubation bei entsprechender Temperatur wurde nochmals 1  $\mu$ l Restriktionsenzym zugegeben.

## Analytischer Verdau

Zur Kontrolle rekombinanter Plasmide wurde ein analytischer Verdau durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte der Verdau der im Ansatz enthaltenen RNA mit einer 1:200 verdünnten RNase-Stammlösung.

Der Ansatz wurde wie folgt durchgeführt:

1 µg DNA

 $2 \ \mu l \ 10x \ Puffer$ 

3 µl 1:200 verdünnte RNase-Stammlösung (10 mg/ml)

2 µl Restriktionsenzym

 $\rightarrow$  ad. 20 µl A. dest

Die Inkubation erfolgte 3 Stunden bei entsprechender Temperatur. Anschließend wurde ein Aliquot von 10  $\mu$ l zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt.

# 10. Proteinbindungsstudien

# 10.1 Bindung FITC-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine

Im Folgenden sind die für die Durchführung des Bindungsassays notwendigen Lösungen aufgeführt:

1x PBS		1x PBST	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,43 g/l	PBS	
NaCl	5,84 g/l	Tween 20	0,05 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,5 g/l		

Lösung A		100 mM Natriumbicarbonatpuffer	
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 M	Lösung A	34 ml
		Lösung B	5,5 ml
Lösung B		NaCl	230 mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,1 M	→ pH 9,2	

#### Fluoresceinisothiocyanat-Lösung (FITC-Lösung) (frisch ansetzen)

1 mg/ml FITC in Natriumbicarbonat-Puffer

Aufbewahrung im Dunklen

Zur Quantifizierung der Bindung FITC-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine wurde zunächst Fibrinogen (100  $\mu$ g/ml PBS) für ca. 16 Stunden auf einer Terasaki-Platte immobilisiert. Dazu wurden für jeden zu testenden Keim 4 Wells mit je 10  $\mu$ l Proteinlösung befüllt, und die Platte ÜN in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Terasaki-Platte vor Inkubation mit den Bakterien vorsichtig mit 10 ml 1x PBS gewaschen, und die Flüssigkeit vollständig durch Absaugen und Ausklopfen entfernt. Zum Abblocken freier Bindestellen wurden je 10  $\mu$ l 10 % BSA in PBS in die Wells pipettiert, und die Terasaki-Platte für mindestens 2 Stunden in der feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert.

Aus ÜN-Kulturen der zu testenden Bakterien-Stämme wurden je 3 ml in einem Eppendorfgefäß für 5 min bei 9000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml PBS gewaschen, anschließend in 500  $\mu$ l FITC-Lösung suspendiert und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Kulturen wurden bei 9000 rpm und RT für 5 min sedimentiert, und das Pellet nach Abnahme des Überstands mit 1 ml PBS gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde zur Entfernung nicht gebundenen FITCs so oft wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation völlig farblos war. Dann wurde das Pellet in 1 ml PBS suspendiert und nach Vortexen auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 1,0 in 1x PBS eingestellt.

Um aus der Terasaki-Platte ungebundenes Blockingreagenz zu entfernen, wurde die Platte nach der zweistündigen Inkubation einmal vorsichtig mit 10 ml 1x PBS gewaschen, und die Flüssigkeit vollständig durch Absaugen und Ausklopfen entfernt. Anschließend wurden pro Keim je 4 Wells mit 10 µl der eingestellten Bakterien - Suspension befüllt, und die Terasaki-Platte für 1 Stunde in der feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit je 10 ml PBST-Puffer gewaschen und bis zur Fluoreszenz-Messung in einem Cytoflow-Meßgerät im Dunkeln aufbewahrt.

Für die Bestimmung des 100 %-Wertes, welcher die Fluoreszenzmarkierung der in den Bakterien Versuch eingesetzten wiedergibt, wurden 500 μl der eingestellten Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls für eine Stunde in der feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit 1x PBS wurde das Pellet daraufhin in 500 µl 1x PBS aufgenommen und 10 µl dieser Suspension in jeweils 6 Wells einer neuen unbeschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Mit dieser Platte konnten die 100 %-Werte für die Fluoreszenz der einzelnen Stämme ermittelt werden.

Die Auswertung der Bindungsversuche erfolgte an einem Cytofluor-Messgerät (PerSeptive Biosystems).

Nachfolgend sind die Parameter des verwendeten Cytofluor-Programms beschrieben.

# **Cytofluor-Programm:**

Cycles:	1
Scans/Cycle:	3
Excitation:	485/20
Emission:	530/30
Gains:	72, 75, 77

Die Fluoreszenz-Werte der Protein - beschichteten Platte wurden auf den 100 %-Wert des jeweiligen Stammes bezogen. Somit konnte angegeben werden, welcher Prozentsatz der in den Versuch eingesetzten Bakterien an die Proteine gebunden hatte.

## 10.2 Bindung Kristallviolett – markierter Bakterien an immobilisierte Proteine

Die Durchführung der Methode erfolgte leicht modifiziert nach Heise & Dersch, 2006.

Im Folgenden sind die für die Durchführung des Bindungsassays notwendigen Lösungen aufgeführt:

Kristallviolett	– Stammlösung	Kristallviolett – Gebrauchslösung
pH	7,5	Paraformaldehyd 4 % (v/v) in A. dest.
NaCl	150 mM	
Tris - HCl	20 mM	
1x TBS		<b>BSA 2 %</b> (m/v) in TBS

1,5 g Kristallviolett in 100 ml EtOH abs.

Zur Quantifizierung der Bindung Kristallviolett - markierter Bakterien an immobilisiertes Fibrinogen wurden zunächst 96 Well – Platten (Nunc Immuno Maxisorp) mit humanem Fibrinogen (100 µg/ml TBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet.

Stammlösung 1:50 verd. in A. dest.

Am darauf folgenden Tag wurde die Platte vor Inkubation mit den Bakterien vorsichtig mit mit TBS (300  $\mu$ l / Vertiefung) gewaschen; zum Abblocken freier Bindestellen wurden je 200  $\mu$ l TBS + 2 % BSA in die Wells pipettiert, und die Platte für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Aus ÜN-Kulturen der zu testenden Bakterien - Stämme wurden je 3 ml in einem Eppendorfgefäß für 5 min bei 9000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml TBS + 2 % BSA gewaschen, anschließend in 1 ml PBS suspendiert und nach Vortexen auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,5 in TBS + 2 % BSA eingestellt.

Um aus den einzelnen Vertiefungen der 96 Well - Platte ungebundenes Blockingreagenz zu entfernen, wurde die Platte nach der einstündigen Inkubation einmal vorsichtig ausgeklopft. Anschließend wurden pro Keim je 3 Wells mit 100  $\mu$ l der eingestellten Bakterien -Suspension befüllt, und die Platte für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Platte einmal mit TBS - Puffer gewaschen und die adhärenten Bakterien durch Zugabe von jeweils 100  $\mu$ l/Vertiefung Paraformaldehyd (4 % v/v) fixiert. Die Anfärbung der an immobilisiertes Fibrinogen gebundenen Bakterien erfolgte durch Zugabe von je 100  $\mu$ l Vertiefung Kristallviolett – Gebrauchslösung und anschließender Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Überschüssiger Farbstoff wurde drei Waschschritte mit TBS aus den einzelnen Vertiefungen entfernt und nach Zugabe von je 100  $\mu$ l / Vertiefung TBS erfolgte die Auswertung der Bindungsversuche an einem ELISA – Mikroplatten – Lesegerät durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge von 562 nm.

# 11. Isolierung und Nachweis bakterieller Proteine

## 11.1 Herstellung von Proteinfraktionen aus A. baumannii

In dieser Arbeit wurden Proteinfraktionen nach der Methode von Siebers & Altendorf (1992) isoliert. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der benötigten Lösungen dargestellt.

Puffer A		Puffer B	
Tris / HCL (pH 7,5)	50 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	50 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	10 mM	DTT	1 mM
		PMSF	0,5 mM
		Glyzerin	8,7 %

Puffer C		Puffer P	
Tris / HCL (pH 7,5)	1 mM	Tris/HCL (pH 8,0)	100 mM
PMSF	0,5 mM	Saccharose	500 mM
EDTA	3 mM	EDTA	1 mM
		NaN <sub>3</sub>	0,2 g/l

#### Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand von A. baumannii

Eine *A. baumannii* - Kultur wurde bis zum Erreichen einer gewünschten  $OD_{600}$  in LB-Flüssigmedium bei 37°C inkubiert und anschließend in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Kultur bei 4 °C und 4000 rpm für ca. 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Vol 100 % TCA (Trichloressigsäure) versetzt und ÜN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend mehrmals mit 5 % (w/v) gesättigtem Natrium-Acetat in Ethanol (mit einer Spatelspitze Phenolrot) gewaschen, bis der Indikator Phenolrot durch Rotfärbung einen neutralen pH-Wert anzeigte. Um das Natrium-Acetat aus der Probe zu entfernen, wurde das Pellet mit absolutem Ethanol gewaschen, dieses anschließend getrocknet und in 500  $\mu$ l 50 mM Tris/ HCL (pH 7,6) aufgenommen und bei -20 °C eingefroren.

#### Isolierung von cytoplasmatischen und Membranproteinen aus A. baumannii

Zur Isolierung von Proteinen aus der bakteriellen Zellwand und cytoplasmatischer Proteine wurden 2 g Bakterienzellen (Feuchtgewicht) zweimal mit 20 ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml kaltem Puffer B aufgenommen. Daraufhin erfolgte der Zellaufschluss mittels der French Press, bei der die A. baumannii - Zellen durch einen hohen Druck (12,5 MPa) zum Platzen gebracht werden. Zum Entfernen von Zelltrümmern und von verbliebenen intakten Zellen wurde das gewonnene Lysat für 30 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und dann einer Ultrazentrifugation für eine Stunde bei 4 °C und 190000 g unterzogen mit dem Ziel der Membransedimentation. Der klare Überstand enthielt dann die Proteine aus dem Zellextrakt. Das gewonnene Membransediment wurde in 20 ml Puffer C homogenisiert und erneut ultrazentrifugiert für eine Stunde bei 4 °C und 190000 g. Das Sediment wurde anschließend in 1 ml Puffer D aufgenommen. Um Membranproteine zu solubilisieren, erfolgte die Zugabe von 2 % (w/v) Dodecyl-ß-D-maltosid und eine einstündige Inkubation auf Eis unter permanentem Rühren. Mit Hilfe einer Ultrazentrifugation (190000 g, 1 h, 4 °C) wurden die solubilisierten Proteine von Membranfragmenten isoliert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### Isolierung periplasmatischer Proteine aus A. baumanni

Zur Präparation periplasmatischer Proteine wurde eine *A. baumannii* - Kultur in 100 ml LB-Flüssigmedium angezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer P (4 °C) suspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Zur Abtrennung der entstandenen Sphäroblasten wurde die Suspension zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der klare Überstand enthält nun periplasmatische Proteine. Aliquots des gewonnenen Überstands wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 11.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren nach ihrer Größe mit hoher Auflösung. In ihr werden die Proteine mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) und reduzierenden Agentien denaturiert. Die diskontinuierliche PAGE besteht aus zwei Phasen, dem Sammelgel und dem Trenngel. Das Trenngel ist wesentlich konzentrierter als das Sammelgel. Das Sammelgel dient dazu, alle Proben an dem Übergang zwischen Sammelund Trenngel zu sammeln, damit soll der gleichzeitige Trennbeginn für alle Proben garantiert sein. Die Gelanordnung bei der PAGE erfolgt im Gegensatz zum Agarosegel vertikal. Zur Polymerisation der dünnen Gele werden Acrylamid, Methylenbisacrylamid, TEMED (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) genutzt. Der Polymerisation liegt eine radikalische Reaktion zu Grunde. APS induziert die Bildung von Acrylamidradikalen, die durch TEMED katalysiert und stabilisiert werden. Acrylamid- und Methylenbisacrylamidradikale reagieren zu einer Matrix, wobei die Menge an Methylenbisacrylamid dabei den Vernetzungsgrad und so die Porenweite des Gels bestimmt. Die Trennung der Proben erfolgt im Gleichstromfeld, wobei die Moleküle nach Größe und Ladung getrennt werden. Eine negative Grundladung der Proteine wird durch Natriumdodecylsulfat gewährleistet. Die SDS-Anionen bilden einen negativ geladenen Komplex mit dem aufzutrennenden Protein; dabei überdeckt die negative Eigenladung des Detergenz die Ladungseigenschaft der Proteine. Das Ausmaß der Anlagerung des SDS an die Proteine erfolgt proportional zur Proteinmasse; diese erworbene Ladung ist größer als die mögliche Eigenladung des Proteins, welche damit keine Bedeutung mehr besitzt. Somit wird eine Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe möglich.

Die für eine SDS-PAGE benötigten Lösungen sind nachfolgend dargestellt.

5x SDS-Probenpuffer		10x SDS-I	Laufpuffer
Tris/ HCl (pH 6,8)	250 mM	Tris	250 mM
DTT	500 mM	Glycin	2,5 M
SDS	10 % (w/v)	SDS	1 % (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)		

Spatelspitze Bromphenolblau

Trenngelpuffer		Sammelgelpuffer	
Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 M	Tris/HCl (pH 6,8)	1 M

Die Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Zunächst wurden die Gelplatten (70 x 60 x 1 mm) mit 100 % Ethanol fettfrei geputzt und in einer Gelgießvorrichtung eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel bis ca. 1 cm unter die Oberkante der Ohrenplatte gegossen. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war (ca. 45 min), wurde das Gel in ein Minigelsystem (Owl Scientific) eingespannt, mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet, der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Proben aufgetragen. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen für 5 min in 1x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Der Gellauf erfolgte bei ca. 16 mA, bis die Bromphenolblaubande die Unterseite der Gele erreicht hatte. Die Proteinbanden wurden anschließend mit Coomassiefärbung sichtbar gemacht

# 11.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen über eine colloidale Coomassie-Färbung

Mit einer colloidalen Coomassie-Färbung können Proteinmengen ab 100-300 ng pro Bande nachgewiesen werden. Zur Herstellung einer colloidalen Coomassie-Lösung wurden folgende Lösungen verwendet.

Coomassie-Färbelösung	Entfärbelösung
0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250	10% (v/v) Eisessig
40% (v/v) Methanol	
10% (v/v) Eisessig	
filtrieren über Faltenfilter	

Für eine Coomassie-Färbung wurde das Gel für mindestens 1 h in Färbelösung, und anschließend in Entfärberlösung bis zur Entfärbung des Hintergrundes inkubiert.

## 11.4 Western Blot (nach Towbin et al, 1979)

Mit Hilfe des Western Blots werden auf eine Nitrocellulose-Membran Proteine übertragen, welche anschließend mittels Antikörpern nachgewiesen werden können.

Nachfolgend ist die Lösung aufgeführt, die für den Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran benötigt wurde.

#### Semidry-Transfer-Puffer

Tris	5,8 g/l
Glycin	2,9 g/l
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,38 % (w/v)

Für den Western Blot wurden zunächst die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend in Semidry-Transfer-Puffer äquilibriert. Whatman-Papier und Nitrocellulose-Membran wurden in Semidry-Transfer-Puffer getränkt und wie nachfolgend gezeigt für den Transfer aufgebaut.

Kathodenplatte	
 Whatman-Papier	
 (2 Lagen)	
 SDS-Polyacrylamidgel	
 Nitrocellulose-Membran	
 Whatmanpapier	
 (2 Lagen)	
Anodenplatte	

Für einen gleichmäßigen Blot wurden die einzelnen Lagen luftblasenfei auf die Platten gelegt. Der Transfer erfolgte anschließend bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gel für 1 bis 2 Stunden.

#### **Far Western**

Mit Hilfe des Far Westerns können spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Nachfolgend sind die hierfür verwendeten Lösungen angegeben.

1x Western Blot	-PBS	1x PBST	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 g/l	Tween 20	0,05 % (v/v in 1x PBS)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 g/l		
NaCl	5,8 g/l		

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Western Blot zunächst über Nacht in 10 % Magermilchlösung (v/v in 1x PBS) bzw. 1 % Blockingreagenz (w/v in 1x PBS) zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Nitrocellulose-Membran mit 1x PBS wurde die Membran zum Test von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit 2  $\mu$ g/ml humanem Fibrinogen für eine Stunde bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers Anti-Fibrinogen-Antikörper (1:1000 in PBS) und erneut eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin erfolgt die Zugabe des Zweit-Antikörpers Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000 in PBS). Der Zweit-Antikörper ist mit dem Enzym Meerettich-Peroxidase gekoppelt, über dessen Aktivität anschließend die Detektion dieses Antikörpers erfolgen kann. Nach Inkubation mit dem Zweit-Antikörper wurde die Membran zweimal mit 1x PBS, zur Verringerung des Hintergrunds dreimal mit 1x PBST und abschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion über Chemilumineszenz, welches ein sehr sensitives Verfahren ist, da sich hierdurch bereits geringe Mengen des Sekundärantikörpers nachweisen lassen. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben. Der ECL-Kit enthält Luminol, welches durch die Meerrettich-Peroxidase zu 3-Aminonaphthalat unter Lichtemission oxidiert wird. Die Membran wurde dazu zwischen Kopierfolie gelegt, ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser nach 1 bis 3 min entwickelt.

#### 12. Adhärenz und Invasion

Die Adhärenz gilt als Schlüsselereignis für die Infektion eines Wirtsorganismus mit einem pathogenen Keim. Nachdem der pathogene Organismus an die Wirtszelle adhäriert hat, kann er gegebenenfalls in diese eindringen und durch anschließende Penetration in tiefere Gewebe vorstoßen, bzw. sich über die Blutbahn im Wirtsorganismus ausbreiten. Die Adhärenz an und die Invasion in Eukaryotenzellen sind somit potentielle Pathogenitätsmechanismen bei einer Infektion durch *Acinetobacter*.

In dieser Arbeit wurden Adhärenz- und Invasionsversuche mit den humanen Lungenepithelzelllinien A549 und HEp2 durchgeführt. Mit deren Hilfe wurde das Adhärenz- und Invasionsverhalten von verschiedenen *Acinetobacter* - Stämmen quantifiziert.

## 12.1 Vorbereitung der Zellen für Adhärenz- und Invasionsversuche

Sowohl für Adhärenz- als auch für Invasionsversuche wurden die eukaryotischen Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Dafür wurden die konfluent gewachsenen Zellen einer Kulturflasche einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen, anschließend nach Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA und 5 minütiger Inkubation bei 37 °C vom Kulturflaschenboden abgelöst und dann mit 20 ml entsprechendem Zellkulturmedium (+ 10 % FCS) in ein Falcon-Gefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1200 rpm und RT wurden die Zellen in 8 ml Zellkulturmedium (+ 10 % FCS) aufgenommen. 50 µl davon wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypanblaulösung versetzt, und die Lebendzellzahl durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zusammensetzung der benötigten Trypanblaulösung ist nachfolgend dargestellt:

## Trypanblaulösung

NaCl 0,45 % (w/v)

Trypanblau0,25 % (w/v)

 $\rightarrow$  Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter).

Die Trypanblaulösung ermöglicht eine Lebend-Tod-Differenzierung der eukaryotischen Zellen, da sich Trypanblau nur in membrangeschädigte Zellen einlagert. Im Phasenkontrastmikroskop können anschließend angefärbte geschädigte Zellen von ungefärbten und somit unbeschädigten Zellen unterschieden werden.

Es wurden alle vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors von 2 x  $10^4$  wurde die Zellzahl / ml bestimmt. Für jeden zu testenden Bakterienstamm wurden anschließend je zwei Wells einer 24 Well-Platte für Adhärenztests und je zwei Wells für Invasionsversuche mit jeweils 6 x  $10^5$  eukaryotischen Zellen in 1 ml Zellkulturmedium angeimpft. Zur Anheftung der Zellen am Boden der Wells wurden die 24-Well-Platten ÜN bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

#### 12.2 Vorbereitung der Bakterienstämme für Adhärenz und Invasionsversuche

Für die Adhärenz- und Invasionsversuche wurden die zu untersuchenden *Acinetobacter*-Stämme in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 5 min bei RT und 8000 rpm abzentrifugiert, und das Pellet mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde anschließend in 1 ml Zellkulturmedium suspendiert und eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3 in Zellkulturmedium eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt und kurz gevortext. Um das mögliche Wachstum der Bakterien im Zellkulturmedium während der Inkubation mit den eukaryotischen Zellen in die Bestimmung der Lebendzellzahl einzuberechnen, wurden 900 µl Zellkulturmedium mit 100 µl Bakteriensuspension beimpft und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden anschließend Verdünnungsstufen in LB-Medium erstellt. Je 2 x 100 µl der Verdünnungsstufen 10<sup>-2</sup>–10<sup>-4</sup> wurden pro Bakterienstamm auf LB - Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

#### 12.3 Adhärenztest

Von den über Nacht in den Wells konfluent gewachsenen A549 -, bzw. HEp2 - Zellen wurde vorsichtig das Medium abgezogen und durch 900  $\mu$ l frisches Zellkulturmedium ersetzt. Pro Well wurden 100  $\mu$ l der 1:10 verdünnten Bakteriensuspension zugegeben, und der gesamte Ansatz für 2 Stunden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgezogen, und jedes Well 3 x mit 1 ml PBS gewaschen. Dadurch wurden alle nicht-adhärierten Bakterien abgewaschen und entfernt. Durch die anschließende Zugabe von 20  $\mu$ l Trypsin/EDTA und Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden die eukaryotischen Zellen von den Wells abgelöst. Zur anschließenden Lyse der Eukaryotenzellen wurden 400  $\mu$ l steriles A. bidest pro Well zugegeben, und der gesamte Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Ansatz wurde sofort auf Eis gestellt und 3 x für 5 s stark gevortext. Zur Bestimmung der Anzahl adhärenter Bakterien wurden Verdünnungsstufen in LB-Medium bis 10<sup>-4</sup> pro Well erstellt, und je 100  $\mu$ l der Verdünnungen 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-4</sup> auf LB - Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert.

Unter diesen Versuchsbedingungen werden sowohl die adhärenten als auch die intrazellulären Bakterien erfasst.

#### **12.4 Invasionstest**

Wie auch bei der Durchführung des Adhärenztests wurde zunächst das Medium von den eukaryotischen Zellen vorsichtig abgezogen und durch 900 µl frisches Medium ersetzt. Pro Well wurden 100 µl der 1:10 verdünnten Bakteriensuspension zupipettiert, und die Zellen für 2 Stunden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgezogen, und 1 ml frisches Medium mit 100 µg/ml Meropenem pro Well zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin für weitere zwei Stunden bei 37 °C und mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit wurden alle extrazellulären Bakterien abgetötet, so dass nur die intrazellulären Bakterien überlebten. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und jedes Well zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 20 µl Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C für 5 min wurden die eukaryotischen Zellen vom Well abgelöst und durch Zugabe von 400 ml A. bidest lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorfgefäße überführt und sofort auf Eis gestellt. Um die intrazelluläre Bakterienzahl zu bestimmen, wurden Verdünnungsstufen der Lysate in LB-Medium erstellt und pro Well je 100 µl der Verdünnungen  $10^{0}$  -  $10^{-2}$  auf LB - Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Beim Invasionstest werden ausschließlich die intrazellulären Bakterien erfasst.

#### 12.5 Auswertung

Die Bestimmung der adhärenten und intrazellulären Bakterien erfolgte über das Auszählen der CFU (Colony Forming Units) pro Agarplatte unter Einberechnung der Verdünnungsstufen. Zur exakten Berechnung der adhärenten und invasiven Bakterienzahl wurden die erhaltenen Werte mit dem Faktor 4,2 multipliziert, der das Volumen für Ablösen und Lysieren der Eukaryotenzellen im Well beinhaltet. Anschließend war ein direkter Vergleich der Anzahl der in den Versuch eingesetzten Bakterien (Lebendzellzahlbestimmung) und der adhärenten bzw. invasiven Bakterien möglich. Um aussagekräftige Absolutwerte für Adhärenz und Invasion zu erhalten, wurde die Anzahl der adhärenten, bzw. invasiven Bakterien auf die Lebendzellzahl der Bakterien nach Wachstum für 2 Stunden in Zellkulturmedium bezogen. Zur Berechnung des Invasionsindexes wurde die Anzahl der invasiven Keime in Relation zur Anzahl der adhärenten Bakterien gesetzt. Insgesamt wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelt.

#### 12.6 Adhärenzexperimente mit vorbehandelten Bakterien

Die zu untersuchenden Bakterienstämme in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 5 min bei RT und 8000 rpm abzentrifugiert, und das Pellet mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde anschließend in 1 ml 1 x PBS suspendiert und eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,3 in 1 x PBS eingestellt.

Anschließend wurden von jedem Bakterienstamm 4 x 500  $\mu$ l Portionen in Eppendorfgefäße überführt, für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, und das Pellet einmal mit PBS gewaschen.

Die Resuspension der Pellets erfolgte in

- 1) 500 µl 1 x PBS
- 2) 450 µl 1 M Glycin
- 3) 450 µl 1 x PBS
- 4) 450 µl Pronase Puffer (10 mM NaAc, 5 mM KAc, pH 7,5)
- Probe 1) wurde für eine Stunde schüttelnd bei RT inkubiert
- Probe 2) wurden 50 μl 100 mM NaIO<sub>4</sub> Puffer in 1 M Glycin zugesetzt und f
  ür eine Stunde sch
  üttelnd bei Raumtemperatur inkubiert.
- Probe 3)wurden 50 μl Lipase (10 mg / ml PBS, pH 7,4) zugegeben.Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 37 °C.
- Probe 4)wurde mit 50 μl Pronase (10 mg / ml Pronase-Puffer) versehen und für eine<br/>Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die einzelnen Proben abzentrifugiert, und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellpellets der Proben 1-4 wurden jeweils in 5 ml RPMI – Zellkulturmedium aufgenommen. Bei der Probe 4 erfolgte zusätzlich die Zugabe von PMSF mit einer Endkonzentration von 1,4 mM als Proteinase – Inhibitor, um eine Schädigung der infizierten Eukaryotenzellen im weiteren Verlauf des Experimentes zu verhindern.

In dem nachfolgenden Adhärenzassay wurden je 1 ml Bakteriensuspension eingesetzt und der Versuch wie in 12.3 beschrieben fortgesetzt.

#### 12.7 Adhärenzexperimente mit inhibierenden Antikörpern

Die eukaryotischen Zellen werden vor Einsatz in das Adhärenz - Experiment mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta_1$  – Integrine inkubiert.

Die eukaryotischen Zellen, die als Monolayer ausgesät in 24 – Well –Platten vorliegen, werden zweimal mit PBS gewaschen. Die Anti –  $\beta_1$  – Integrin – Antikörper wurden daraufhin in verschiedenen Verdünnungen zu den eukaryotischen Zellen zugegeben (250 µl /Vertiefung). Die Verdünnungen wurden in Zellkulturbindepuffer hergestellt. Die Zusammensetzung dieses Puffers ist im Folgenden aufgeführt:

## **Bindepuffer:**

RPMI - Zellkulturmedium	500 ml
HEPES (pH 7,0)	20 mM
BSA	0,4 % (w/v)

Die Ansätze werden daraufhin für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Während dieser Zeit sollte mikroskopisch kontrolliert werden, ob sich die eukaryotischen Zellen eventuell von dem Plattenboden ablösen aufgrund der Antikörperbehandlung. Gegebenenfalls muss die Antikörperkonzentration herabgesetzt werden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden von den verschiedenen Bakteriensuspensionen, die zuvor auf eine Optische Dichte von 0,3 in Zellkulturbindepuffer eingestellt und daraufhin 1:10 verdünnt wurden, jeweils 20  $\mu$ l / Well hinzugefügt, und der Ansatz für zwei Stunden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Der weitere Verlauf des Versuches erfolgt wie unter Punkt 12.3 nach Infektion der Zellen beschrieben.

### 12.8 Verifizierung der Adhärenzergebnisse am Rasterelektronenmikroskop

Zur Darstellung des Adhärenzvermögens von *A. baumannii* an die Lungenepithelzelllinie A549 im Rasterelektronenmikroskop wurden A549-Zellen analog zum Adhärenzexperiment in Vertiefungen einer 24 – Well - Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Infektion der Zellen mit *A. baumannii* erfolgte ebenfalls analog zum Adhärenzexperiment wie in 12.3 beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die einzelnen Wells fünfmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Die Waschlösung wurde vollständig aus den Wells entfernt und durch Zugabe von 1 ml / Well Fixierlösung ersetzt. Die Fixierlösung setzte sich wie folgt zusammen:

#### **Fixierlösung:**

2,5 % Glutaraldehyd
2,5 % Paraformaldehyd (v/v in 1x PBS)
0,1 M Phosphat – Cacodylatpuffer
1 % Saccharose
ph 7,3

Die Zellen wurden anschließend in der Abteilung Elektronenmikroskopie für das Rasterelektronenmikroskop präpariert und konnten schließlich im Rasterelektronenmikroskop (Zeiss DSM 962) untersucht werden

# 13. Kapselfärbung nach Maneval

Kapseln lassen sich nicht anfärben, daher sollte die Bakterienzelle und der Hintergrund angefärbt werden, um die Kapsel deutlich hervortreten zu lassen. Verwendet wird dazu eine Kombination aus Negativ- und Einfachfärbung.

Kongorot 2 % in A. dest.	Manevalsche Lösung (frisch ansetzen):	
	5 % Phenol	3 ml
HCl 3 %	20 % Eisessig	10 ml
	30 % FeCl <sub>2</sub>	4 ml
	1 % Säurefuchsin	

Die hierfür benötigten Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt:

Flüssigkulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme werden im Verhältnis 1:1 mit Kongorot in einem Eppendorfgefäß gemischt. Daraufhin erfolgt die Herstellung eines dünnen Ausstriches auf einem Glasobjektträger. Dieser wird an der Luft getrocknet. Eine Hitzefixierung würde die Bakterien schrumpfen lassen und somit könnte sich ein falsches Bild der Kapsel ergeben.

Der Ausstrich wird anschließend für 3 bis 4 Minuten mit der Manevalschen Lösung bedeckt. Überschüssige Farbe wird mit 3 %-iger HCl – Lösung vorsichtig abgespült, damit die Zellen nicht abgewaschen werden. Zum Abschluss erfolgt ein Spülschritt mit A. dest mit anschließender Trocknung der Präparate zwischen Whatman – Papier. Das in der Maneval'schen Färbelösung enthaltene Fuchsin färbt die Bakterienzellen rot, Eisen - II chlorid und Phenol dienen der Kapselfestigung und die weiteren verwendeten Reagenzien Essigsäure, bzw. Salzsäure führen zur Absenkung des pH - Wertes. Kongorot wird bei dieser Färbung als pH - Wert - Indikator eingesetzt und färbt sich bei saurem pH blau. Somit erscheinen die Bakterien rot mit weißen Kapseln vor blauem Hintergrund.

## 14. Analyse der Biofilmbildung

In diesem Projekt wurde ein Testsystem zur Analyse der Biofilmbildung für *A. baumannii* etabliert. Das Experiment basiert auf der Methode nach Christensen et al., 1999.

*A. baumannii*-Kulturen wurden ÜN bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler in je 5 ml LB-Flüssigmedium inkubiert. Die gewachsenen Kulturen wurden daraufhin 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt und 3 x je 200  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension in eine Vertiefung einer 96-well Platte - hergestellt aus Polystyrol - überführt. Die beimpfte Platte

wurde stehend bei 37 °C für 8 – 24 Stunden inkubiert und anschließend ausgeklopft, um den Inhalt zu entfernen.

Daraufhin erfolgten zwei Waschschritte mit 1 x Zellkultur-PBS (Rezept erläutert unter 4.5 Kultivierung von A549 - Zellen und Hep2 – Zellen), um freischwimmende Bakterien aus dem Ansatz zu entfernen. Jede beimpfte Vertiefung der 96-Well-Platte wurde daraufhin mit je 200  $\mu$ l 1 x - PBS aufgefüllt. Die Anfärbung der sessilen Bakterien an der Plastikoberfläche erfolgte durch Zugabe von je 10  $\mu$ l/Well Kristallviolett (0,1 % w/v) und einer anschließenden Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur.

Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit A. dest. aus dem Ansatz entfernt. Für quantitative Analysen wurde der Farbstoff durch Zugabe von je 200 µl/Well absoluten Ethanols solubilisiert und die Absorption bei 562 nm in einem Mikrotiter-Plattenlesegerät bestimmt. Im Rahmen der Etablierung wurde ein Absorptionsspektrum für die verwendete Kristallviolett-Lösung gemessen und dabei ein Absorptionsmaximum bei 590 nm bestimmt (s. Anhang). Da in unserer Abteilung kein geeigneter Filter dieser Wellenlänge vorliegt, wurden nachfolgende Messungen mit einem Filter für die Wellenlänge 562 nm durchgeführt. Vergleichsmessungen unter Verwendung Filter anderer Wellenlänge (600 nm, 570 nm) (Abt. Medizinische Mikrobiologie) zeigten keinen signifikanten Unterschied.

## **III. Ergebnisse**

Grundlage der nachfolgend beschriebenen Arbeit ist die aktuelle Problematik nosokomialer Infektionen verursacht durch *A. baumanni*, die sich insbesondere als schwere Pneumonien manifestieren. Trotz der zunehmenden medizinischen Relevanz einer *A. baumannii*-Infektion sind die Pathogenitätsmechanismen dieser Bakterien weitestgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit soll die Untersuchung der molekularen Grundlagen einer Infektion des Menschen mit *A. baumannii* eingeleitet werden mit dem Ziel, bakterielle Komponenten zu identifizieren und zu analysieren, welche zur Interaktion mit humanen Epithelzellen notwendig sind.

# 1. Analyse und Quantifizierung des Adhärenzverhaltens ausgewählter A. baumannii - Stämme an unterschiedliche eukaryotische Zelllinien

In der Pathogenese ist die Adhärenz des Erregers der erste Schritt in der Kolonisierung von Körpergewebe des Wirtsorganismus und stellt somit ein Schlüsselereignis dar. Sie ermöglicht es den Bakterien, gegebenenfalls in die Wirtszellen, bzw. in tiefere Gewebeschichten vorzudringen und sich anschließend über die Blutbahn in andere Körperregionen auszubreiten. Man vermutet hierbei, dass spezifische Oberflächenstrukturen der Bakterien - so genannte Adhäsine - eine Rolle bei der Besiedelung des Wirtsorganismus spielen (Klemm, et al; 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Adhärenzverhalten verschiedener *A. baumannii*-Stämme an unterschiedliche menschliche Zelllinien unter definierten Bedingungen untersucht und quantifiziert werden. Primär wurden zunächst eine Lungenepithelzelllinie (A549) und eine humane Rachenepithelzelllinie (HEp2) für die Adhärenzexperimente eingesetzt, da *A. baumannii* am häufigsten zu Infektionen des Respirationstraktes führt.

In diesem Projekt wurden spezifische Bedingungen für *A. baumannii* etabliert, die auf der Ermittlung Kolonie-bildender Einheiten basieren. Im Experiment werden hierbei humane Zellen und Bakterien unter definierten Bedingungen inkubiert, die nicht adhärenten Bakterien abgewaschen, und die Anzahl der adhärenten Bakterien durch die Bestimmung Koloniebildender Einheiten quantifiziert. Für aussagekräftige Absolutwerte wird die Anzahl der adhärenten Bakterien in die Anzahl der bildender Einheiten auf die Lebendzellzahl nach Wachstum für zwei Stunden in





Abb. 1: Schematische Darstellung der Durchführung des Adhärenzexperimentes

Der Ablauf des angewandten Adhärenz - Experimentes orientierte sich methodisch an den bereits sehr gut etablierten Adhärenzexperimenten mit *Streptococcus agalactiae* (Rubens, C. et al; 1992; Schubert, et al; 2004). Zunächst sollten daher die einzelnen Versuchsbedingungen für *A. baumannii* etabliert, bzw. optimiert werden.

## 1.1. Etablierung

Eine entscheidende Voraussetzung für die Bestimmung der Adhärenz an A549-Zellen ist, dass sich die Bakterien während der zweistündigen Inkubation im Zellkulturmedium weder stark vermehren, noch absterben. Eine starke Vermehrung könnte zu einem Missverhältnis zwischen Anzahl der eukaryotischen Zellen und Bakterien führen, und beim Absterben der Zellen wäre möglicherweise nicht gewährleistet, dass Adhäsinstrukturen intakt und funktionsfähig sind. In beiden Fällen würde die Adhärenz zu niedrig bewertet werden. Daher wurde exemplarisch ausgehend von zwei *A. baumannii*-Stämmen das Wachstumsvermögen im Zellkulturmedium getestet (**Abbildung 2**). Zum einen wurde im Rahmen des Adhärenzassays die Anzahl Kolonie-bildender Einheiten direkt vor Infektion der eukaryotischen Zellen und nach der zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bestimmt.



Abb. 2: Wachstumsvermögen von A. *baumannii* ATCC 19606 und A. *baumannii* 20820 im Zellkulturmedium in Gegenwart von Sauerstoff und 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C.
 Die Ausgangs-OD<sub>600</sub> betrug 0,65.

Wie aus **Abbildung 2** hervorgeht, konnte kein nennenswertes Wachstum der Bakterien während der zweistündigen Inkubationszeit beobachtet werden. Das heißt, es hat weder eine signifikante Vermehrung, noch ein deutliches Absterben von *A. baumannii* stattgefunden.

Allerdings werden die Bakterien in diesem Experiment während der zweistündigen Inkubation kaum mit Sauerstoff versorgt.

Parallel hierzu wurde das Wachstum von *A. baumannii* in Zellkulturmedium getestet bei einer Züchtung der Kulturen im Erlenmeyerkolben bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 180 rpm. Die Kulturen werden auf diese Weise optimal mit Sauerstoff versorgt und zeigten in diesem Fall stetiges Wachstum (Daten nicht gezeigt).

#### Infektionsdosis

Zur Bestimmung einer geeigneten Infektionsdosis wurden die Bakterienkulturen auf unterschiedliche optische Dichte eingestellt und anschließend in das Adhärenzexperiment eingesetzt, indem die eukaryotischen Zellen in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml in jeder Vertiefung vorlagen.





Abb. 3: Adhärenz an die Lungenepithelzelllinie A549 mit *A. baumannii* - Stämmen ATCC 19606 und 20820, die vor Einsatz in das Experiment auf unterschiedliche OD<sub>600</sub> eingestellt wurden. Die eukaryotischen Zellen lagen in einer Konzentration von 3 x 10<sup>5</sup> Zellen / ml vor. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Aus der Abbildung 3 geht hervor, dass sowohl bei A. baumannii ATCC 19606, als auch bei baumannii 20820 die künstlich eingestellte OD<sub>600</sub> 0,3 Rahmen Α. im der Adhärenzexperimente zu den höchsten Bindungswerten führt. Des Weiteren sollte der Einfluss der eukaryotischen Zellzahl im Versuch für die Adhärenz von A. baumannii untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden in folgenden Adhärenzexperimenten die eukaryotischen Zellen in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und wiederum mit Bakteriensuspensionen unterschiedlicher OD<sub>600</sub> inkubiert. Abbildung 4 gibt die dabei erzielten Ergebnisse graphisch wieder.



Abb. 4:Adhärenz an die Lungenepithelzelllinie A549 der A. baumannii - Stämme ATCC19606 und 20820<br/>die vor Einsatz in das Experiment auf unterschiedliche OD600 eingestellt wurden. Die eukaryo-<br/>tischen Zellen lagen in folgenden Konzentrationen vor: 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen / ml, 3 x 10<sup>5</sup> Zellen / ml ,<br/>6 x 10<sup>5</sup> Zellen / ml. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die<br/>Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Die Ergebnisse in **Abbildung 4** bestätigen die Aussage, dass die Einstellung der Bakterien auf eine künstliche optische Dichte 0,3 zu den höchsten Adhärenzwerten führt, sowohl bei einer eukaryotischen Zellzahl von 3 x  $10^5$  Zellen / ml, als auch bei einer Zellzahl von 6 x  $10^5$  / ml. Bei einer Einstellung der eukaryotischen Zellzahl von 1,5 x  $10^5$  Zellen / ml werden generell niedrigere Ergebnisse erzielt. Lichtmikroskopische Kontrollen bestätigen, dass diese Konzentration zu gering ist, um nach ÜN - Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> einen geschlossenen Zellrasen in den einzelnen Wells auszubilden, während bei den anderen gewählten Zellkonzentrationen nach ÜN - Inkubationen der eukaryotischen Zellen in den Wells ein geschlossener Zellrasen vorliegt. Da der Einsatz von 6 x  $10^5$  eukaryotischer Zellen / ml zu den höchsten Adhärenzergebnissen führte, wurde diese Konzentration in den nachfolgenden Adhärenzexperimenten routinemäßig eingesetzt; die Infektion der eukaryotischen Zellen erfolgte mit Bakteriensuspensionen verschiedener *A. baumannii* - Stämme, die zuvor auf eine künstliche optische Dichte von 0,3 eingestellt wurden.

#### Bindung an Plastik

*A. baumannii* bildet sowohl auf biotischen, als auch auf abiotischen Oberflächen Biofilme aus (Vidal et al; 1992). Im nächsten Schritt sollten falsch positive Adhärenzwerte ausgeschlossen werden, die dadurch zustande kommen, dass *A. baumannii* während der zweistündigen Inkubation an der Kunststoffwand der 24-Well-Platten binden kann. Hierzu wurden exemplarisch für einzelne Stämme Adhärenzversuche durchgeführt, bei denen die Wells nicht mit eukaryotischen Zellen beschichtet waren. Aus der **Abbildung 5** kann man entnehmen, dass die gemessenen Werte für die Bindung an das eingesetzte Plastikmaterial vernachlässigbar niedrig waren.



 Abb. 5: Gegenüberstellung des Adhärenzverhaltens der A. baumannii - Stämme ATCC 19606 und 20820 an A549 - Lungenepithelzellen und an das Plastikmaterial der in die Experimente eingesetzten 24-Well-Platten. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Spezies der Gattung *Acinetobacter* zeichnen sich durch eine hohe metabolische Diversität an Kohlenstoff- und Energiequellen aus (Bergogne - Bérézin et al. 1996). So reagiert auch *A. baumannii* tolerant auf verschiedene vorherrschende Wachstumsbedingungen: Der Organismus wächst sowohl auf diversen Komplexmedien, wie z. B. LB-, THY- oder auch TY-Medium, er zeigt aber auch auf Minimalmedium mit Succinat [1M] als Kohlenstoffquelle gutes Wachstum (Daten nicht gezeigt). Um einen möglichen Effekt der äußeren Wachstumsbedingungen auf das Adhärenzverhalten von *A. baumannii* zu untersuchen, wurden Adhärenzexperimente mit Stämmen durchgeführt, die zum einen in verschiedenen Medien (LB -, M9 - Minimalmedium) zum anderen bei unterschiedlicher Temperatur (25 °C, 37 °C) kultiviert wurden (**Abbildung 6**).





Abb. 6: Untersuchung des Einflusses der Wachstumsbedingungen auf das Adhärenzverhalten von
 A. *baumannii*. Adhärenzexperimente an A549 - Lungenepithelzellen der A. *baumannii* - Stämme
 1901 und 7961, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei
 Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die getesteten Rahmenbedingungen für die Vorkultivierung der Bakterien keinen signifikanten Effekt auf das Adhärenzverhalten der untersuchten *A. baumannii* - Stämme hat. *A. baumannii* 1901 zeigt nach Vorkultivierung in LB - Medium schüttelnd, bei 37 °C unter den festgelegten Standardbedingungen eine Adhäsion von 7,72 %, unter denselben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von

25 °C 6,80 %. Adhärenzwerte im gleichen Größenbereich ergeben sich nach Vorkultivierung in M9 - Minimalmedium mit 6,64 % bei 37 °C, und 5,48 % bei 25 °C.

Für den Stamm *A. baumannii* 7961 zeigen sich vergleichbare Relationen: Die Vorkultivierung in LB - Medium schüttelnd bei 37 °C führt mit 6,52 % zum höchsten Adhärenzergebnis; die Rate adhärenter Bakterien sinkt minimal auf 6,05 % ab bei einer veränderten Inkubationstemperatur von 25 °C; die Vorkultivierung von *A. baumannii* 7961 in Minimalmedium führte zu einer Adhärenzrate von 6,17 % bei 37 °C und zu 5,78 % bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C.

Daher wurde für die Durchführung der Adhärenzexperimente unter Standardbedingungen die Kultivierung der Bakterien auf LB - Medium beibehalten, die Inkubation erfolgte bei 37 °C schüttelnd (180 rpm).

Eine ausführliche Beschreibung für die Durchführung der standardisierten Adhärenzexperimente ist dem Part "Material und Methoden" zu entnehmen.

# 1.2 Bindung von *A. baumannii* an die humane Lungenepithelzelllinie A549 und an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2

In der folgend beschriebenen Adhärenzstudie sollte das Bindungsvermögen des *A. baumannii* - Referenzstammes und diverser klinischer *A. baumannii* - Isolate an die humanen Zelllinien A549 und HEp2 untersucht werden. Die Verfügbarkeit der klinischen Isolate resultiert aus der Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. Seifert (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Köln), der sich seit langem mit der Problematik nosokomialer Infektionen auseinandersetzt, die durch *A. baumannii* verursacht werden, und *Acinetobacter* sp. aus infizierten Patienten isoliert (Brauers et al.; 2005; Seifert et al; 1995). Er stellte eine Vielzahl von *A. baumannii* - Stämmen für die hier geplanten Untersuchungen zur Verfügung. Eine ausführliche Liste, in der alle Stämme vollständig aufgeführt sind, ist dem Anhang beigefügt.

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der Adhärenzexperimente mit dem Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606 und verschiedenen klinischen Isolaten.

*E. coli* DH5α, bzw. *E. coli* K12 wurden in die Experimente als nicht adhärente Negativkontrollen eingesetzt. Zusätzlich wurde auch das Adhärenzverhalten von *A. baylyi* ADP1 als apathogener Organismus der Gattung *Acinetobacter* untersucht.

#### Ergebnisse

Adhäsine vieler Bakterien werden im Verlauf des Infektionszyklus wachstumsphasenabhängig exprimiert (Ofek et al., 2003). Um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen Adhärenzvermögen und Wachstumsphase der Bakterien besteht, wurden die Adhärenzexperimente an die Lungenepithelzelllinie A549 mit Bakterien aus der stationären, als auch aus der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal in Doppelbestimmung durchgeführt.



Abb. 7: Adhärenz verschiedener Acinetobacter - Isolate und des Referenzstammes A. baumannii ATCC 19606 an die humane Lungenepithelzelllinie A549. Die Bakterienstämme wurden aus der aus der mittleren exponentiellen und stationären Wachstumsphase eingesetzt. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Wie aus der Abbildung eindeutig hervorgeht, zeigen alle untersuchten Stämme Adhärenz an die ausgewählte humane Lungenepithelzelllinie. Das Adhärenzvermögen der einzelnen klinischen Isolate ist jedoch sehr inhomogen. Überraschenderweise zeigt der Referenzstamm im Vergleich zu den untersuchten klinischen Isolaten mit einem Wert von 1,31 % ein relativ schwach ausgeprägtes Adhärenzvermögen, während die klinischen Isolate *A. baumannii* 1901

(5,93 %), 7961 (4,33 %) das stärkste Adhärenzverhalten an die Zelllinie aufweisen. Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass das nahe verwandte apathogene Bodenbakterium *A. baylyi* ADP1 mit 2,97 % deutlich an die A549 - Zellen adhäriert. Beim Vergleich der Adhärenzergebnisse von den untersuchten *Acinetobacter* - Stämmen, die in verschiedenen Wachstumsphasen eingesetzt wurden, konnte keine generelle Veränderung bezüglich der Adhäsionskapazität beobachtet werden. Einige *A. baumannii* - Stämme, wie z.B. der Referenzstamm ATCC 19606 und die klinischen Isolate 20820, 1901, 17093, 10247 und 284 zeigen ein deutlich gesteigertes Adhärenzvermögen in der logarithmischen Wachstumsphase, während bei *A. baumannii* 6675, 10812 und 19001 - I und 19001 - II die Wachstumsphase keinen signifikanten Einfluss auf das Adhärenzverhalten hat. Weiterhin wurde das Adhärenzverhalten ausgewählter *A. baumanni* - Stämme an HEp2-Zellen, einer weiteren humanen Zelllinie aus dem Respirationstrakt untersucht und die Ergebnisse sind in Doppelbestimmung durchgeführt.



 Abb. 8: Adhärenz verschiedener klinischer Isolate und des Referenzstammes A. baumannii ATCC 19606 an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2. Die Bakterienstämme wurden aus der stationären Wachstumsphase eingesetzt. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium.

Auch hier zeigt sich ein sehr inhomogenes Adhärenzvermögen unter den einzelnen Isolaten an die humane Epithelzelllinie; tendentiell zeigen die untersuchten Stämme an diese Zelllinie besseres Adhärenzvermögen. Eine Ausnahme bildet in diesem Zusammenhang jedoch das klinische Isolat 7961, welches bei den A549 - Zellen mit 4,33 % zu den stark adhärierenden Stämmen zählte. Dieser Stamm zeigt im Vergleich zu den anderen untersuchten *A. baumannii* - Isolaten das geringste Adhärenzvermögen an die HEp2 - Zelllinie.

# 1.3 Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf das Adhärenzvermögen von A. baumannii

In so genannten "Wurmversuchen" konnte für Ethanol eine stimulierende Wirkung auf die Pathogenität von *A. baumannii* nachgewiesen werden (Smith, et al., 2004). Bei diesen Studien zeigten *A. baumannii* - Zellen, die unter Zugabe von 1 % Ethanol kultiviert wurden, wesentlich stärkere Virulenz gegenüber ihrem Fressfeind *Caenorhabditis elegans*. Weiterhin bewiesen diese Ethanol - gefütterten *A. baumanni* - Kulturen eine höhere Resistenz gegenüber hohen Salzkonzentrationen. Aus diesem Grund sprach man der Substanz Ethanol in diesem Zusammenhang nicht nur die alleinige Funktion als Kohlenhydratquelle zu, vielmehr scheint Ethanol Auslöser eines oder mehrerer Signalwege zu sein, die zu einer veränderten Physiologie und Überlebensstrategie des Bakteriums führen. Aus diesem Grund war es interessant, den Effekt von Ethanol auf das Adhärenzverhalten von *A. baumannii* exemplarisch an die humane Lungenepithelzelllinie A549 zu untersuchen.



Abb. 9: Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf das Adhärenzverhalten von *A. baumannii*.
 Adhärenzexperimente an A549 - Lungenepithelzellen der *A. baumannii* - Stämme 7961 und 1901, die jeweils mit und ohne Zugabe von 1 % Ethanol kultiviert wurden. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Aus der Abbildung geht hervor, dass Ethanol keinen offensichtlichen Effekt auf das Adhärenzvermögen der getesteten A. baumannii - Isolate hat. A. baumannii 1901 zeigt in

Abwesenheit von Ethanol eine 4,2 %-ige Adhärenz an die eukaryotischen Zellen, Ethanol - gefütterte Zellen dieses Stammes fallen entgegen der Erwartung in ihrem Adhärenzvermögen auf 3,1 % ab. Bei dem klinischen Isolat 7961 verhält es sich ähnlich: Die Adhärenz der Zellen, die unter Ethanol - Einfluss kultiviert wurden, liegen in ihrer Adhärenz mit 4,5 % leicht unter dem Adhärenzvermögen in Abwesenheit von Ethanol. Ingesamt betrachtet, kann der beobachtete Effekt als nicht signifikant bewertet werden.

# 1.4 Elektronenmikroskopische Verifizierung der Adhärenz von A. *baumannii* an A549 - Zellen

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Elektronenmikroskopie unter der Leitung von Prof. Dr. P. Walther wurden einzelne Aufnahmen der Wechselwirkung von *A. baumannii* 1901 mit der humanen Lungenepithelzelllinie A549 mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops möglich.

Hierzu wurden zunächst A549 - Zellen analog zu den Adhärenzexperimenten mit *A. baumannii* 1901 infiziert. Ungebundene Bakterien wurden nach einer zweistündigen Inkubationszeit durch Waschen entfernt und die adhärierten Bakterien anschließend fixiert. Die fixierten Proben wurden anschließend in der Abteilung Elektronenmikroskopie für das Rasterelektronenmikroskop präpariert.
In Abbildung 10 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt:



Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von A. *baumannii* 1901 auf A549-Zellen. Die eukaryotischen Zellen wurden zunächst mit dem A. *baumannii* - Stamm 1901 infiziert und für zwei Stunden inkubiert. Ungebundene Bakterien wurden durch Waschen aus dem Ansatz entfernt und adhärierte Bakterien auf den A549 -Zellen fixiert. Die fixierten Proben wurden in der Abteilung Elektronenmikroskopie für das Rasterelektronenmikroskop präpariert.

Abbildung 10 A stellt eine Übersicht dar. Man erkennt die äußere Umrandung der eukaryotischen Zelle, auf der die einzelnen *A. baumannii* - Zellen haften. Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 10 B - D) kann man die für *A. baumannii* charakteristische kokkoide Morphologie erkennen.

#### 2. Analyse des Invasionsverhaltens ausgewählter A. baumannii - Stämme an die eukarvotische Zelllinie A549

Die Invasion in eukaryotische Zellen ist für viele pathogene Bakterien ein wichtiger Schritt im Verlauf der Infektion eines Organismus und verschafft ihnen zahlreiche Vorteile. Auf diese Weise können Bakterien z. B. die Angriffe des Immunsystems, bzw. die Wirkung von Antibiotika umgehen. Der Invasionsprozess erlaubt es Ihnen auch, durch bestimmte Zellschichten hindurch zu treten und in tiefer gelegene Wirtsgewebe und Organe einzuwandern (Dersch, 2003).

Im folgenden soll der Referenzstamm von A. baumannii und unterschiedliche klinische Isolate auf ihre Fähigkeit analysiert werden, in die eukaryotische Zelllinie A549 zu invadieren. Abbildung 11 gibt den schematischen Ablauf des Invasionsexperimentes wieder:





Der Invasionsversuch verläuft analog zu den zuvor beschriebenen Adhärenzexperimenten, jedoch werden nach zweistündiger Inkubation extrazelluläre Bakterien durch Zugabe von Antibiotika abgetötet.

#### 2.1 Etablierung

Da *A. baumannii* resistent gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika ist, muss für die Durchführung der Invasionsexperimente ein Antibiotikum gefunden werden, auf das *A. baumannii* sensitiv reagiert. Die in diesem Zusammenhang wirkungsvollsten Antibiotika zählen zur Gruppe der Carbapeneme (Brauers et al.; 2005), zu denen auch Imipenem und Meropenem gehören. Es handelt sich hierbei um ß-Laktam-Antibiotika mit bakteriostatischer Wirkung durch Hemmung der Transpeptidase, wodurch die Zellwandsynthese der Bakterien gestört wird. **Abbildung 12** gibt die Struktur von Imipenem und Meropenem wieder:



Abb.12: Strukturformel Imipenem

Strukturformel Meropenem

#### Bestimmung der MHK für Meropenem

Voraussetzung für den Einsatz dieser Antibiotika ist die Bestimmung der stammspezifischen MHK (minimale Hemmkonzentration) der *A. baumannii*-Stämme, die in das Invasionsexperiment eingesetzt werden sollten. Die MHK ist definiert als "die kleinste Konzentration [µg/ml] eines antimikrobiellen Wirkstoffes (z.B. Antibiotikum), die die Keimvermehrung im Kulturansatz noch verhindert." (Urban & Fischer, 2003).

Zur Bestimmung der MHK für Meropenem wurde eine geometrische Verdünnungsreihe (bis 1:128) der Antibiotika in jeweils 20 ml LB - Medium, das mit Agar versetzt war, vorgelegt. Die Antibiotika - haltigen Agarplatten wurden daraufhin mit ÜN - Kulturen von verschiedenen *A. baumannii* - Stämmen beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### Ergebnisse

Bewertungskriterium war gehemmtes Wachstum der Bakterien auf der LB - Platte mit der geringsten Antibiotikum - Konzentration im Rahmen der eingesetzten Verdünnungsreihe.

In **Abbildung 13** sind die Ergebnisse der MHK - Bestimmung für das Antibiotikum Meropenem aufgeführt. Der Einsatz von Imipenem für zukünftige Invasionsexperimente mit *A. baumannii* wurde verworfen, da sich das Antibiotikum als sehr instabil erwies und somit kein sicheres Abtöten extrazellulärer Bakterien im Rahmen des Invasionsexperimentes gewährleistet war.



 Abb. 13: Bestimmung der MHK des Antibiotikums Meropenem für den Referenzstamm von A. baumannii und verschiedene klinische Isolate. Bewertungskriterium war gehemmtes Wachstum der Bakterien auf der LB - Platte mit der geringsten Antibiotikum - Konzentration im Rahmen der eingesetzten Verdünnungsreihe.

Wie man der **Abbildung 13** entnehmen kann, zeigen alle getesteten *A. baumannii* - Stämme Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Meropenem. Diese Resistenz fällt jedoch bezogen auf die einzelnen Stämme sehr inhomogen aus. Am effektivsten wirkt das Antibiotikum gegen das klinische Isolat 284, das bei einer Konzentration von 32  $\mu$ g/ml LB - Medium kein Wachstum mehr aufwies. Die stärkste Resistenz gegenüber Meropenem zeigte das Isolat 6675, bei dem erst eine Antibiotikumskonzentration von 64  $\mu$ g/ml das Wachstum vollständig unterdrückte. In die folgenden Invasionsexperimente mit *A. baumannii* sollte Meropenem in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass stammunabhängig alle extrazellulären Bakterien nach der zweistündigen Inkubation abgetötet werden.

#### Kontrolle von Meropenem / Imipenem auf Durchlässigkeit durch die eukaryotische Membran

Eine weitere Forderung stellte sich an das einzusetzende Antibiotikum: Es muss gewährleistet sein, dass Meropenem nicht durch die eukaryotische Membran der A549 - Zellen dringen kann; dies würde zu falsch negativen, bzw. stark erniedrigten Invasionswerten führen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde *S. agalactiae* als Kontrollorganismus herangezogen und in Invasionsexperimente eingesetzt (Schubert et al. 2004). *S. agalactiae* 6313 reagiert auf eine Antibiotika - Kombination aus Penicillin (10 U / ml) und Streptomycin (0,01 mg/ml) sensitiv, wie sie bereits erfolgreich in etablierten Invasionsstudien eingesetzt wird. Der Stamm ist aber ebenso empfindlich für Carbapeneme. Die MHK für Imipenem, wurde bestimmt auf 0,064  $\mu$ g/ml (Reinscheid, D. et al.; 2001).

Es wurden nun Invasionsexperimente mit *S. agalactiae* 6313 durchgeführt (**Abbildung 14**), bei denen zum einen die Antibiotikumskombination aus Penicillin (10 U/ml) und Streptomycin (0,01 mg/ml) eingesetzt wurde, parallel dazu aber auch Meropenem und Imipenem in einer Konzentration von 1 µg/ml. Die Sensitivität von *S. agalactiae* gegenüber Meropenem in dieser Konzentration wurde experimentell sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Wäre die eukaryotische Membran durchlässig für die Carbapeneme, müsste die Invasion in diesem Fall wesentlich niedriger ausfallen als bei Einsatz der Antibiotikumskombination, da so auch intrazelluläre, bereits invadierte Bakterien durch das Antibiotikum abgetötet würden.



Abb. 14: Invasionsverhalten von *S. agalactiae* 6313 in die humane Lungenepithelzelllinie A549 bei Verwendung verschiedener Antibiotika. Angegeben ist der prozentuale Anteil invasiver Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium.

Erfahrungsgemäß liegt der prozentuale Anteil invasiver *S. agalactiae* 6313 - Zellen bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach 2 Stunden Wachstum in Zellkulturmedium in einem Größenbereich zwischen 0,01 - 0,06 % (Diplomarbeit Lübeck, 2005). In diesen Versuchen wurde eine Invasionsrate von 0,0159 % bei Einsatz der Antibiotikumskombination aus Penicillin und Streptomycin erreicht; im Vergleich dazu lagen die Invasionsraten von *S. agalactiae* 6313 unter Verwendung der Carbapeneme mit Imipenem bei 0,02 % und mit Meropenem bei 0,0215 %. Unter Berücksichtigung des Größenbereiches der erhaltenen Invasionswerte sind die Unterschiede vernachlässigbar klein. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die getesteten Carbapeneme nicht durch die eukaryotische Membran während der zweistündigen Inkubationszeit im Invasionsexperiment dringen können und somit für den Einsatz in die geplanten Invasionsexperimente mit *A. baumannii* - Stämmen und der humanen Lungenepithelzelllinie A549 geeignet sind.

## 2.2 Analyse des Invasionsverhaltens ausgewählter *A. baumannii* - Stämme an die eukaryotische Zelllinie A549

Nun sollten ausgewählte *A. baumannii* - Stämme, die in Relation zu den anderen getesteten klinischen Isolaten ein gutes Adhärenzvermögen an die humane Lungenepithelzelllinie A549 aufwiesen, auf ihr Invasionsvermögen in dieselbe Zelllinie getestet werden. Als Positivkontrolle wurde der invasive Stamm *S. agalactiae* 6313, als Negativkontrolle *E. coli* K12 mitgeführt. Auch der apathogene Stamm *A. baylyi* ADP1 wurde in die Invasionsstudie mit eingeschlossen. In **Abbildung 15** sind die Ergebnisse der Invasionsversuche graphisch zusammengefasst. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal in Doppelbestimmung durchgeführt.



Abb. 15: Invasionsverhalten von S. agalactiae und verschiedenen A. baumannii - Stämmen in die humane Lungenepithelzelllinie A549. E. coli K12 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Angegeben ist der prozentuale Anteil invasiver Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium

Die erhaltenen Werte für das Invasionsvermögen der getesteten *A. baumannii* - Stämme in die A549 - Zellen fielen sehr niedrig aus. Sie lagen alle deutlich unter 0,01 %. Die klinischen Isolate 7961, 1901 und 17093 scheinen sich auf den ersten Blick in ihrem Invasionsvermögen von den anderen *Acinetobacter* - Stämmen abzuheben, allerdings lag bei der Auswertung eine erhebliche Streuung der Ergebnisse vor, wie man anhand der jeweiligen Fehlerbalkengröße erkennen kann.

Auch der Anteil invasiver Streptokokken lag in dieser Studie im unteren Erwartungsbereich bei 0,019 %. Da die Streptokokken verglichen mit anderen invasiven Pathogenen, z.B. Yersinia pseudotuberculosis (Eitel, et al., 2005) ein eher schwaches Invasionsvermögen zeigen, kann nach Vergleich der erhaltenen Invasionswerte von den Acinetobacter - Stämmen mit denen von S. agalactiae 6313 davon ausgegangen werden, dass bei den hier getesteten angewandten Stämmen mit dieser Methode keine Invasion in die humane Lungenepithelzelllinie A549 nachzuweisen ist.

#### 3. Charakterisierung bakterieller Adhäsine

Adhäsine dienen als Erkennungsmoleküle auf der Oberfläche des pathogenen Bakteriums. Sie reagieren mit entsprechenden Rezeptoren an den Wirtszellen und fördern so die Haftung des Bakteriums über Adhäsin - Rezeptor - Interaktionen.

# 3.1 Adhärenzexperimente mit enzymatisch, bzw. chemisch vorbehandelten Bakterien an die humane Lungenepithelzelllinie A549

Um nun die chemische Beschaffenheit der Adhäsine von *A. baumannii* für die Bindung an eukaryotische Epithelzelllinien zu charakterisieren, wurden die Bakterien vor Einsatz in das Adhärenzexperiment mit A549 - Zellen chemisch, bzw. enzymatisch vorbehandelt. Um Proteinstrukturen als mögliche Adhäsine auf der Oberfläche von *A. baumannii* zu identifizieren, wurden die Bakterien mit Pronase vorbehandelt. Diese setzt sich aus einer Mischung an diversen Endo - und Exopeptidasen zusammen, die rekombinant in *Streptomyces griseus* hergestellt wurden. Eine Vorbehandlung mit Lipase sollte die Beteiligung Lipid - haltiger Strukturen an dem Adhärenzprozess aufdecken. Zusätzlich wurde Natriumperjodat in die bakterielle Vorbehandlung eingesetzt; diese Substanz oxidiert 1,2 Glykole zu freien Aldehydgruppen (Perry, M. B. et. al.; 1998) und dient somit dem Nachweis von Kohlehydrat - enthaltenden Adhäsinen. Die auf diese Weise vorbehandelten *A. baumannii* - Stämme wurden dann in Adhärenzexperimente an die humane Lungenepithelzelllinie A549 eingesetzt. Die Ergebnisse wurden daraufhin mit den Adhärenzwerten aus parallel mitgeführten unbehandelten *A. baumannii* - Zellen verglichen.

Die Behandlung der Bakterien mit Natriumperjodat führte zu einem drastischen Absterben, was anhand der im Experiment integrierten Lebendzellzahl offensichtlich wurde; denselben Effekt erhielt man bei Einsatz der Substanz in höheren Verdünnungen. Es wurden verschiedene Konzentrationen getestet (Daten nicht gezeigt). In **Abbildung 16** sind die Adhärenzergebnisse der mit Pronase, bzw. mit Lipase vorbehandelten *A. baumannii* - Stämme ATCC 19606 (Referenzstamm), 284 und 1901 graphisch den entsprechenden Adhärenzwerten ohne Vorbehandlung gegenübergestellt. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal in Doppelbestimmung durchgeführt.







 Abb. 16: Adhärenz der A. *baumannii* - Stämme ATCC 19606, 1901 und 284 an humane Lungenepithelzellen A549 nach Vorbehandlung mit Pronase und Lipase im Vergleich zur Adhärenz ohne Vorbehandlung. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Bei dem Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606 zeigte die Vorbehandlung keinen Einfluss auf das Adhärenzvermögen. Lipase - vorbehandelte Zellen steigen zwar im Vergleich zu den unbehandelten Bakterien in der Adhärenz leicht an. Dieser Unterschied liegt jedoch im Bereich der Streuung der Messergebnisse.

Bei den klinischen *A. baumannii* - Isolaten 1901 und 284 führt die enzymatische Vorbehandlung der Bakterien zu einem signifikanten Abfall der Adhärenz, sowohl mit Pronase, als auch mit Lipase. Bei dem 1901 - Stamm sinkt die detektierte Adhärenzrate um knapp 70 %. Bei *A. baumannii* 284 führt die enzymatische Vorbehandlung mit Pronase zu einer 60 % igen Reduktion des Adhärenzvermögens an A549 - Zellen, mit dem Enzym Lipase sinkt die Adhärenz sogar um 80 %. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass an dem Adhärenzmechanismus an epitheliale Zellen dieser *A. baumannii* - Stämme Protein -, bzw. Lipid - haltige Strukturen beteiligt sind.

Dadurch, dass der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien auf die Lebendzellzahl nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium bezogen wird, kann sicher gestellt werden, dass die erniedrigten Adhärenzwerte nach der Vorbehandlung nicht durch eine herabgesetzte Vitalität der Zellen verursacht wurde. Zusätzlich wies eine lichtmikroskopische Kontrolle der eukaryotischen Zellen nach Ablauf der zweistündigen Inkubation mit den vorbehandelten Bakterien einen intakten Monolayer nach. Auf diese Weise konnte ebenfalls eine massive Schädigung der Eukaryotenzellen ausgeschlossen werden.

# 3.2 Untersuchung der Bedeutung von extrazellulären Matrixproteinen für den Adhärenzmechanismus von *A. baumannii*

Voraussetzung für die Adhärenz ist die Interaktion spezifischer Oberflächenstrukturen der Bakterien mit unterschiedlichen Komponenten der Wirtszelle. Diese basiert bei vielen pathogenen Bakterien auf der Wechselwirkung zwischen Zellwand - verankerten Proteinen der Bakterien und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) der Wirtszellen. So wurde zum Beispiel für *S. agalactiae* die Bindung an die humanen Glykoproteine Laminin, Fibronektin, Kollagen und Fibrinogen beschrieben, die Bestandteil der ECM der Wirtszelle sind (Reinscheid, 2004). Erste Untersuchungen belegen auch für eine Vielzahl von *A. baumannii* - Isolaten die Bindung an humanes Kollagen, Fibronektin und Fibrinogen basierend auf Latexagglutinationsexperimenten (Koljalg, et al., 1996). In diesem Zusammenhang sollte nun methodisch erweitert *A. baumannii* auf die Eigenschaft hin untersucht werden, mit Wirtsproteinen aus der extrazellulären Matrix zu interagieren.

#### 3.2.1. B1 - Integrin - gekoppelte Matrixproteine

Kollagen, Fibronektin und Laminin bedecken als Wirtsproteine aus der extrazellulären Matrix gewöhnlich die Oberfläche eukaryotischer Zellen. Sie sind an  $\beta_1$  - Integrine gebunden. Bei den Integrinen handelt es sich um Heterodimere, die als Transmembran - Verbindungsglieder wirken, indem sie die ECM mit dem Cytoskelett der Zellen verbinden. Sie bestehen aus zwei nicht - kovalent verbundenen Transmembran - Glykoproteinen, die man als  $\alpha$  - und  $\beta$  - Untereinheit bezeichnet. Die  $\alpha$  - Untereinheit bestimmt die Spezifität des  $\beta_1$  - Integrins für die verschiedenen ECM - Proteine. Beide Untereinheiten tragen aber zur Bindung der Matrixproteine bei (Heise, et al.; 2006).

Um zu untersuchen, ob diese Proteine der ECM in den Adhärenzprozess von *A. baumannii* involviert sind, wurden Adhärenzexperimente mit A549 - Zellen und verschiedenen *A. baumannii* - Isolaten durchgeführt, bei denen die eukaryotischen Zellen vor Einsatz in das Experiment mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta_1$  - Integrine für eine Stunde inkubiert wurden. Diese Antikörper zeigen eine so hohe Affinität gegenüber diesen Rezeptorstrukturen, dass sie die verschiedenen Matrixproteine von ihren Bindestellen an den Integrinen verdrängen.

Wenn der Adhäsionsprozess von *A. baumannii* auf einer Protein-Protein-Interaktion zwischen bakteriellem Adhäsin und  $\beta_1$  - Integrin - gekoppeltem ECM - Protein beruht, wird durch die Antikörperbehandlung die bakterielle Adhärenz geblockt. Die spezifischen Antikörper wurden in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, und die Ergebnisse dann mit den Adhärenzwerten aus Parallelversuchen mit unbehandelten Eukaryotenzellen verglichen.

Als Positivkontrolle wurde *E. coli* K12 mit dem Plasmid-kodierten *yadA*-Gen eingesetzt. *yadA* codiert ein äußeres Membranprotein von *Yersinia enterocolitica* und stellt für dieses pathogene Bakterium einen bedeutsamen Virulenzfaktor dar. Neben vielfältigen Funktionen ermöglicht dieses Protein die Bindung von *Y. enterocolitica* an Fibronectin, ein Protein der extrazellulären Matrix, das über  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine in der Eukaryotenzelle verankert ist. Über diese Protein-Protein-Interaktion wird eine rasche Invasion des pathogenen Organismus in die Wirtszelle ermöglicht (Heise, et al., 2006). Als Negativkontrolle diente der nicht - adhärente Organismus *E. coli* K12.



Die Abbildung 17 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Abb. 17: Adhärenz der A. *baumannii* - Isolate 1901 und 7961 an humane Lungenepithelzellen A549, welche vor Einsatz in das Adhärenzexperiment mit monoklonalen Antikörpern gegen β<sub>1</sub> - Integrine inkubiert wurden, im Vergleich zur Adhärenz ohne Vorbehandlung. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Zellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Inkubation in Zellkulturmedium.

Die Positivkontrolle zeigt ein von der Antikörperkonzentration abhängiges Adhärenzverhalten. Ohne Präinkubation der Epithelzellen mit Antikörpern weist *E. coli* vermittelt durch das Protein YadA eine Adhärenz von 21,7 % auf. Durch die Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit der höchsten eingesetzten Konzentration an monoklonalen  $\beta_1$  - Integrin - Antikörpern wird die Adhärenz um fast 97 % geblockt. Sie regeneriert sich bei zunehmender Verdünnung des Antikörpers auf 47 %, bzw. auf 78 % des Ausgangswertes.

Bei den getesteten *A. baumannii* - Stämmen hingegen zeigt die Antikörper - induzierte Blockade der Matrixproteinbindestellen keinen Effekt auf das Adhärenzvermögen. Es sind keine Antikörperkonzentration - abhängigen Unterschiede in den jeweiligen Adhärenzwerten zu erkennen. Somit zeigen die Ergebnisse dieses Versuches, dass Proteine der extrazellulären Matrix, die über  $\beta_1$  - Integrine mit der eukaryotischen Zelle verbunden sind, als Adhäsinrezeptoren für *A. baumannii* ausgeschlossen werden können.

#### 3.2.2 Analyse der Bindung humanen Fibrinogens an A. baumannii

Im Gegensatz zu Kollagen, Laminin oder Fibronektin liegt Fibrinogen nicht an  $\beta_1$ -, sondern an  $\beta_3$ -Integrine gekoppelt vor. Diese kommen auf verschiedenen Zellen vor, insbesondere in hoher Anzahl auf Thrombozyten.

Die Bindung von wirtseigenem Fibrinogen an die bakterielle Oberfläche ist ein weit verbreitetes Virulenzprinzip vieler pathogener Bakterien (Schubert, et al.; 2002). Um die Verbreitung der Fibrinogen - Bindung bei *A. baumannii* zu analysieren, wurden ausgewählte *A. baumannii* - Stämme mit verschiedenen Methoden auf ihre Fähigkeit zur Fibrinogenbindung getestet.

Analyse der Bindung FITC - markierter Bakterien an immobilisiertes humanes Fibrinogen

Für diese Bindungsversuche wurde zunächst humanes Fibrinogen über Nacht in Terasakiplatten immobilisiert, ungebundenes Protein anschließend durch mehrmaliges Waschen entfernt, und freie Bindungsstellen auf den Platten mit 10 %-iger BSA-Lösung abgesättigt. ÜN-Kulturen der verschiedenen A. baumannii - Stämme wurden mehrmals mit die Phosphatpuffer gewaschen und Bakterien anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Um bei der Auswertung des Versuches vergleichbare Signalwerte zu erhalten, musste eine definierte und konstante Anzahl an markierten Bakterien pro Versuch zugegeben werden. Dazu wurde die FITC -markierte Bakteriensuspension auf eine optische Dichte von 1,0 eingestellt. Nach Inkubation der markierten Bakterien mit dem immobilisierten Fibrinogen wurden ungebundene Bakterien durch mehrmaliges Waschen aus dem Ansatz entfernt, und die Menge der an Fibrinogen gebundenen Bakterien durch anschließende Fluoreszenzmessung quantifiziert. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis dieser Bindungsstudie. Angegeben ist die prozentuale Fibrinogen -Bindung der einzelnen A. baumannii - Stämme bezogen auf die Gesamtmenge der in den Versuch eingesetzten Bakterien. Als Negativkontrolle wurde E. coli DH5a, als Positivkontrolle wurde S. agalactiae 6313 eingesetzt. Für diesen Organismus konnte ein spezifisches Fibrinogen - bindendes Protein als Virulenzfaktor identifiziert, bzw. isoliert und analysiert werden (Schubert, et al., 2002).



Abb. 18: Fibrinogen - Bindung der FITC - markierten *A. baumannii* - Stämme ATCC 19606, 20820, 17093, 7961 und 284. *S. agalactiae* 6313 wurde als Positivkontrolle, *E. coli* DH5α als Negativkontrolle in das Experiment eingesetzt. Angegeben ist die prozentuale Bindung der Bakterien an immobilisiertes humanes Fibrinogen bezogen auf die Gesamtzahl der in den Versuch eingesetzten Bakterien.

Der Stamm *S. agalactiae* zeigt als Positivkontrolle mit 52 % eine starke Bindung an immobilisiertes humanes Fibrinogen. Die getesteten *A. baumannii* - Stämme liegen zwar in ihrem Bindungsvermögen signifikant unter der Positivkontrolle, scheinen aber dennoch alle, bis auf den Referenzstamm mit 12 % im Vergleich zu *E. coli* DH5 $\alpha$  eine deutliche Bindung an Fibrinogen in der hier angewandten Methode aufzuweisen. So liegt das gemessene Bindungsvermögen von *A. baumannii* 20820 bei 19 %, von 17093 bei 30 %, das Isolat 7961 weist eine Fibrinogenbindung von 28 %, und *A. baumannii* 284 eine Bindungskapazität von 18 % auf. Allerdings lag die Fibrinogenbindung der Negativkontrolle mit 9 % unerwartet hoch. Zudem war es nicht möglich, für dieses Experiment eine geeignete Kontrolle für die Ermittlung der unspezifischen Bindung zu finden. Es wurden in diesem Zusammenhang anstelle von immobilisiertem Fibrinogen verschiedene Reagenzien getestet: 10 %-ige BSA-Lösung, 1 % Blocking - Reagenz und 1 x Zellkultur - PBS (**Abbildung 19**).



#### A. baumannii ATCC 19606



Abb. 19: Fibrinogen - Bindung der FITC - markierten Stämme A. baumannii ATCC 19606 und
 S. agalactiae 6313 in Gegenüberstellung zur Bindung an 1 x ZK - PBS, 10 % BSA, und 10 %
 Blockingreagenz. Angegeben ist die prozentuale Bindung der Bakterien an die immobilisierten
 Reagenzien bezogen auf die Gesamtzahl der in den Versuch eingesetzten Bakterien.

Sowohl *A. baumanni* ATCC 19606, als auch *S. agalactiae* 6313 zeigen in **Abbildung 19** verglichen mit der gegenübergestellten Fibrinogenbindung eine relativ hohe unspezifische Bindung an die verschiedenen Reagenzien. Somit ist eine klare Aussage über ein spezifisches Bindungsvermögen von *A. baumannii* an immobilisiertes humanes Fibrinogen mit dieser Methode nicht möglich.

Daher sollte *A. baumannii* mit Hilfe einer anderen Methode auf eine mögliche Bindungsfähigkeit an humanes Fibrinogen untersucht werden.

Herstellung von Proteinfraktionen aus A. baumannii mit anschließenden Western - Blot -Analysen zur Detektion Fibrinogen - bindender Proteine

In dieser Arbeit wurden Proteinfraktionen aus dem Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606 nach der leicht modifizierten Methode von Abee, Siebers & Altendorf isoliert (Abee, T. et al.; 1992).

Als Ergebnis wurden folgende Proteinfraktionen gewonnen:

- sekretierte Proteine aus dem Kulturüberstand
- Proteine aus dem Cytoplasma
- Membranproteine
- periplasmatische Proteine

Diese wurden im weiteren Verlauf in Western Blot - Analysen eingesetzt, um eine mögliche Interaktion zwischen bakteriellem Protein und humanem Fibrinogen nachzuweisen.

Zur Bewertung der Fraktionierung wurden Zellextrakt, sowie die Proteine der einzelnen Fraktionen auf ein 12 % iges SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen, gelelektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Das Ergebnis ist in der folgenden **Abbildung 20 A** dargestellt. Weiterhin sollte in die geplante Western - Blot - Analyse als Positivkontrolle isoliertes FbsA - Protein [900  $\mu$ g/ml] aus *S. agalactiae* 6313 eingesetzt werden. Dieses Protein setzt sich aus 442 Aminosäuren zusammen und hat eine molare Masse von 51 kDa (Schubert, A. et al.; 2002).





 A
 B

 Abb. 20:
 (A):
 Ergebnis der durchgeführten Proteinfraktionierung aus A. baumannii ATCC 19606.

 Gezeigt ist das Coomassie-gefärbte 12 % ige SDS-Polyacrylamidgel, in dem die gewonnenen Proteinfraktionen aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden.

 (B): Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung von isoliertem FbsA - Protein aus S. agalactiae 6313 in einem 12 % igem SDS - Polyacrylamidgel, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde. Das Protein FbsA hat eine molare Masse von 51 kDa.

**Die Abbildung 20 A** zeigt, dass in den jeweiligen Proteinfraktionen eine Vielzahl an Proteinen verschiedener Größe aufgetrennt werden konnten. Die jeweiligen Bandenmuster der einzelnen Proteinfraktionen fallen ebenfalls unterschiedlich aus. Daraus kann man schließen, dass die Methode der Proteinfraktionierung, bei *A. baumannii* ATCC 19606 angewandt, erfolgreich war.

#### Western Blot Analyse der isolierten Proteinfraktionen auf Fibrinogenbindung

Um zu überprüfen, ob Proteine aus den isolierten Fraktionen von A. *baumannii* an humanes Fibrinogen binden können, wurden die Proteinfraktionen über SDS - PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. In einem anschließenden Western Blot wurden die Proteine zunächst auf eine Nitrocellulose - Membran übertragen und anschließend mit gelöstem Fibrinogen inkubiert. Der Nachweis von gebundenem Fibrinogen erfolgte über eine weitere Inkubation mit Kaninchen Anti - Fibrinogen - Antikörpern, gefolgt von einer Inkubation mit Peroxidase markierten Anti - Kaninchen - Antikörpern. Die Detektion einer Bindung erfolgte über Chemilumineszenz. In **Abbildung 21** ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt.



Abb. 21: Western - Blot - Analyse zur Untersuchung der Bindung von bakteriellen Proteinen aus verschiedenen Zellfraktionen aus *A. baumannii* an humanes Fibrinogen. Diverse Proteinfraktionen aus *A. baumannii* ATCC 19606 wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran mit humanem Fibrinogen inkubiert und mit dem polyklonalen Kaninchen - Serum gegen humanes Fibrinogen inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit Peroxidase - gekoppelten Ziege-Kaninchen-Antikörpern detektiert und über Chemilumineszenz nachgewiesen.

Die Auswertung des Western - Blots wurde durch eine unspezifische Schwarzfärbung der Membran erschwert. Diese erfolgte bereits nach einer Expositionszeit von einer Minute. Die Signale der oben abgebildeten Western - Blot- Analyse erhielt man nach einer Exposition des Films für eine Sekunde und dennoch erscheint der Hintergrund sehr stark angefärbt. Im Zuge der Ursachenforschung wurden mehrere Western - Blots durchgeführt, in denen jeweils zum einen die Waschschritte verstärkt und anstelle von 1 % Blocking - Reagenz Trockenmilch eingesetzt wurde. Um Fibrinogen als Ursache für die unspezifische Schwarzfärbung zu

#### Ergebnisse

untersuchen, wurde des Weiteren die Membran mit den transferierten bakteriellen Proteinen mit unterschiedlichen Konzentrationen an humanem Fibrinogen inkubiert (Daten nicht gezeigt). Keine dieser durchgeführten Abwandlungen konnte das Ergebnis ändern. Aufgrund dieser Tatsache ist keine eindeutige Auswertung des Western Blots in **Abbildung 21** möglich. Ein eindeutiges Signal ist in der Positivkontrolle FbsA zu erkennen, dessen Bindung an humanes Fibrinogen mit dieser Methode immunologisch nachgewiesen werden konnte. In der Spur mit aufgetragenen Proteinen des Periplasmas von *A. baumannii* ATCC 19606 könnte man ein Signal vermuten, das auf eine Bindung von bakteriellem Protein an humanes Fibrinogen schließen lässt, allerdings ist dieses aufgrund der Problematik in der Auswertung nicht eindeutig belegbar. In den anderen Spuren mit aufgetragenen *A. baumannii* - Proteinfraktionen konnte kein positives Signal detektiert werden, welches auf eine Interaktion zwischen humanem Fibrinogen und einem bakteriellem Protein aus *A. baumannii* hindeuten würde.

#### Analyse der Bindung Kristallviolett - markierter Bakterien an immobilisiertes humanes Fibrinogen in Nunc Maxi -Sorp - Platten

Für diese Bindungsversuche wurde hier zunächst humanes Fibrinogen über Nacht in Maxi -Sorp - Platten (Nunc) immobilisiert, ungebundenes Protein anschließend durch mehrmaliges Waschen entfernt, und freie Bindungsstellen auf den Platten mit 2 % iger BSA - Lösung abgesättigt. Für den Erhalt vergleichbarer Signalwerte sollte eine definierte und konstante Anzahl an markierten Bakterien pro Versuch zugegeben werden. Dazu wurden ÜN - Kulturen von *A. baumannii* auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 1,5 eingestellt. Nach Inkubation der Bakterien mit dem immobilisierten Fibrinogen wurden ungebundene Bakterien durch Waschen aus dem Ansatz entfernt, und die an Fibrinogen gebundenen Bakterien durch Zugabe von 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgt die Anfärbung der Bakterien mit Kristallviolett. Überschüssiger Farbstoff wird nach Ablauf der Inkubation durch mehrmaliges Waschen aus dem Ansatz entfernt. Die Quantifizierung der Fibrinogenbindung erfolgt durch Messen der Absorption bei 562 nm. **Abbildung 23** zeigt das Ergebnis dieser Bindungsstudie. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* K12, als Positivkontrolle wurde *S. agalactiae* 6313 eingesetzt. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse erfolgten die Messungen in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen.



 Abb. 23: Fibrinogen - Bindung der Kristallviolett - markierten A. baumannii - Stämme ATCC 19606, 1901, 7961, 17093, 6675 und 284. S. agalactiae 6313 wurde als Positivkontrolle, E. coli K12 als Negativkontrolle in das Experiment eingesetzt. Die Quantifizierung der Fibrinogenbindung der einzelnen Bakterienstämme erfolgt durch Messung der Absorption A 562 nm.

Die Ergebnisse dieser Proteinbindungsstudie zeigen, dass sich die gemessenen Absorptionswerte der einzelnen *A. baumannii* - Stämme im Größenbereich des Messwertes der Negativkontrolle *E. coli* K12 bewegen. Dieser macht knapp 26 % der ermittelten Absorption der Positivkontrolle *S. agalactiae* 6313 aus. Aus dem direkten Vergleich darf somit die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine spezifische Bindung der getesteten *A. baumannii* - Stämme an humanes Fibrinogen nicht nachweisbar ist.

# 4. Lichtmikroskopischer Kapselnachweis ausgewählter A. baumannii - Isolate

Viele pathogene Bakterien scheiden während ihres Wachstums Polysaccharide und Polypeptide aus, was zu einer charakteristischen Ausbildung von Schleimkapseln führt. Bedeutende Krankheitserreger können in diesem Zusammenhang genannt werden, wie z. B. *Streptococcus pneumoniae* oder *Klebsiella pneumoniae*, die beide zu schweren Lungenentzündungen führen. Die Kapsel spielt dabei für die Pathogenese eine wichtige Rolle. Ihre Hauptfunktion bezogen auf die Virulenz besteht im Schutz der Bakterien vor Phagozytose durch Makrophagen im Wirt. Des Weiteren vermittelt sie bakterielle Resistenz vor Austrocknung, da die äußeren Polysaccharidschichten viel Wasser binden können (Hof und Dörries, Medizinische Mikrobiologie, 2002). Zudem kann die Kapsel als bakterielle Oberflächenstruktur Adhäsinfunktion für die Anheftung an Epithelzellen erfüllen. Somit war es von Interesse, verschiedene *A. baumannii* - Isolate auf die Präsenz einer Kapsel hin zu untersuchen.

Da sich Bakterienkapseln nicht anfärben lassen, werden die Zelle und der Hintergrund des Präparates gefärbt, um die Kapsel deutlich hervortreten zu lassen. Hierfür wurde die Kapselfärbung nach Maneval angewandt.

#### (http://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische\_Mikrobiologie)

Das in der Maneval'schen Färbelösung enthaltene Fuchsin färbt die Bakterienzellen rot, Eisen - II - chlorid und Phenol dienen der Kapselfestigung und die weiteren verwendeten Reagenzien Essigsäure, bzw. Salzsäure führen zur Absenkung des pH - Wertes. Kongorot wird bei dieser Färbung als pH - Wert - Indikator eingesetzt und färbt sich bei saurem pH blau.

Im lichtmikroskopischen Bild erscheinen die Kapseln auf diese Weise als helle Zonen zwischen rot erscheinenden Zellen und blau gefärbtem Hintergrund. Abbildung 24 zeigt eine Kapselfärbung bei verschiedenen *A. baumannii* - Isolaten. Als Positivkontrolle wurde der Stamm *A. calcoaceticus* BD4 verwendet, der sich durch den Besitz einer dicken Schleimschicht um die einzelnen Bakterienzellen auszeichnet. *E. coli* K12 diente in diesem Experiment als Negativkontrolle.



A. baumannii 1901



A. baumannii 7961

A. baumannii 6675

Abb. 24: Mikroskopischer Nachweis von Kapseln, bzw. Schleimhüllen bei A. baumannii 284, 1901, 7961 und 6675. Als Positivkontrolle wurde Stamm A. calcoaceticus BD4, als Negativkontrolle E. coli K12 eingesetzt. Die Kapselfärbung, durchgeführt nach Maneval, zeigt rotgefärbte Bakterien und weiße Kapseln vor blauem Hintergrund.

Mit Hilfe dieser Färbung nach Maneval konnte bei allen untersuchten A. baumannii - Isolaten eine Kapsel nachgewiesen werden. Das Ergebnis bestätigt Angaben in der Literatur für die Gattung Acinetobacter allgemein (Bergogne-Berezin, et al.; 1996).

#### 5. Transposonmutagenese zur Identifikation der an der Adhärenz beteiligten Komponenten

Zur Identifikation der an der Adhärenz beteiligten Komponenten von *A. baumannii* wurde eine Transposonmutagenese durchgeführt. Mit einer anschließenden Durchmusterung der Transposon - Mutantenbank sollten Stämme identifiziert werden, die keine Adhäsion an humane Epithelzellen mehr aufweisen.

Die Transposonmutagenese wurde mit einem relativ neuen, hocheffizienten System getestet, das in einer Vielzahl nahe verwandter Bakterien erfolgreich eingesetzt worden war (Larsen et al., 2002). Für die Mutagenese wurde ein so genanntes Mini-Tn5-Element verwendet. Dabei handelt es sich um das Konstrukt eines rekombinanten Transposons, welches auf die Komponenten reduziert ist, die für die Transposition absolut notwendig sind. Als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Transposition fungiert das Gen *aph*, dessen Expression eine Kanamyzinresistenz vermittelt und von zwei IS-Elementen flankiert wird. Das Gen, welches die Transposase codiert, ist mehrfach gezielt mutiert worden, um die Aktivität des codierten Enzyms zu steigern. Es liegt außerhalb der Transposonkassette, mit der Absicht, durch diese Konstruktion stabile Insertionen zu erzielen. Über den Vektor pRL27, der bereits transformiert im Donorstamm *E. coli* BW20797 vorlag, sollte das Transposon über Konjugation in die Zielzellen eingebracht werden (Larsen et al.; 2002). Es handelt sich bei diesem Vektor um ein zirkularisiertes PCR-Produkt von pRL23 und umfasst eine Größe von 4080 Bp. Die folgende **Abbildung 25** gibt dessen schematischen Aufbau wieder:



Abb. 25: Schematische Darstellung des Vektors pRL27

Dabei steht das Transposase-codierende Gen tnp unter der Kontrolle des tetA - Promotors. Stromabwärts vom tnp - Gen liegt der Replikationsursprung ori R6K. Es handelt sich hierbei um ein  $\pi$  - Protein abhängiges Replikon, was zur Folge hat, dass dieser Vektor nur in solchen Organismen replizieren kann, die das so genannte pir - Gen exprimieren. Nachdem das Plasmid in Rezipienten eingebracht wurde, die das pir - Gen nicht besitzen, werden folglich nur dann Kanamyzin - resistente Transkonjuganten erhalten, wenn das Transposon im Genom des Rezipientenstammes integriert wurde (Larsen, et al.; 2002, Dorsey, et al.; 2002). Der den Replikationsursprung oriT stromabwärts der Transposonkassette ist für Konjugationsprozess relevant; er vermittelt den DNA - Transfer zwischen Donor - und Rezipientenstamm.

Für die Durchführung der Mutagenese sollten *Pseudomonas fluorescens* und das apathogene Bodenbakterium *A. baylyi* ADP1 als Vergleichsorganismen mitgeführt werden.

#### 5.1 Bestimmung der Konjugationseffizienz

Der primäre Vorgang der Plasmidaufnahme ist maßgeblich für einen erfolgreichen Verlauf der geplanten Mutagenese. Daher sollte in Vorversuchen zunächst die Konjugationseffizienz für P. fluorescens, A. baylyi ADP1 und A. baumannii ATCC 19606 bestimmt werden. Als Donor diente in diesem Zusammenhang E. coli S17 mit dem Weitwirtsbereichsvektor pRK415. Diesen Resultaten werden in Abbildung 26 die Ergebnisse der Konjugationseffizienzen derselben Stämme mit dem Transposon - kodierenden Plasmid pRL27 gegenübergestellt.



# Abb. 26: A: Konjugationseffizienz der Stämme *P. fluorescens*, *A. baylyi* ADP1 und *A. baumannii* ATTC 19606 mit dem Weitwirtsbereichsvektor pRK415. Angegeben ist die Anzahl der Transkonjuganten bezogen auf die in den Versuch eingesetzte Rezipientenzahl. B: Konjugations - bzw. Transpositionseffizienz der Stämme *P. fluorescens* und *A. baumannii* ATTC 19606 mit dem Plasmid pRL27. Angegeben ist die Anzahl der Transkonjuganten bezogen auf die in den Versuch eingesetzte Rezipientenzahl.

Aus der Abbildung 26 geht eindeutig hervor, dass *A. baumannii* eine wesentlich schlechtere Konjugationseffizienz im Vergleich zu *P. fluorescens* und *A. baylyi* ADP1 aufweist. Während die Konjugation mit pRK415 erfolgreich zu Transkonjuganten bei allen eingesetzten Rezipientenstämmen führte, war es trotz mehrfacher Versuche nicht möglich, das Plasmid pRL27 in *A. baylyi* ADP1 einzubringen. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Experimente in der Arbeitsgruppe, in denen auch *A. baylyi* ADP1 mit dem pRL27 - Vektor vergeblich konjugiert werden sollte. In direktem Vergleich zur erzielten Konjugationseffizienz mit dem Weitwirtsbereichsvektor pRK415 wird die Effizienz von *P. fluorescens* bezogen auf das Transposon - kodierende Plasmid pRL27 um knapp den Faktor 1000 erniedrigt. Eine Absenkung der Effizienz bei Anwendung dieses Systems entspricht auch den Erwartungen, da bei der Transposonmutagenese mittels des Plasmides pRL27 nicht nur eine erfolgreiche

Konjugation alleine, sondern zusätzlich auch noch die direkt im Anschluss zu erfolgende Transposition für den Erhalt von Kanamyzin - resistenten Transkonjuganten und für die erfolgreiche Mutagenese erforderlich ist.

#### 5.2 Kolonie - PCR zum Nachweis der Transposonkassette in den Rezipienten

Um die Funktionalität der Konjugation des Transposon - kodierenden Plasmides pRL27 bei den Rezipientenstämmen *P. fluorescens* und *A. baumannii* ATCC 19606 zu überprüfen, sollte in den Kanamyzin - resistenten Kolonien mit Hilfe einer Kolonie - PCR die Transposonkassette mit entsprechenden Primern tnpRL17-1 und tnpRL17-2 nachgewiesen werden. Ein PCR - Produkt der erwarteten Größe von 1576 Bp konnte bei allen getesteten Kolonien nachgewiesen werden. **Abbildung 27** zeigt exemplarisch für beide Rezipientenstämme das Ergebnis der durchgeführten Kolonie - PCR.



Kontrolle:Wildtyp Pseudomonas fluorescens, bzw. A. baumanniiKontrolle:PCR ohne DNA – template

Abb. 27:Kolonie - PCR zur Überprüfung der Funktionalität der Konjugation des Transposons in die<br/>Rezipientenstämme *P. fluorescens* und *A. baumannii* ATCC 19606

Die erfolgreiche Detektion der Transposonkassette über Kolonie - PCR in den Rezipienten belegt jedoch nur die Präsenz des Transposons in den Stämmen *P. fluorescens* und

*A. baumannii* ATCC 19606, das Ergebnis gibt aber noch keinen Hinweis darauf, ob die aufgenommene Transposonkassette im jeweiligen Rezipientenchromosom integriert vorliegt.

# 5.3 Southern Blot Analyse zur Bestätigung der chromosomalen Insertion der Transposonkassette

Um dies zu untersuchen, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurde chromosomale DNA von *P. fluorescens*, bzw. *A. baumannii* ATCC 19606 und ihrer potentiellen Transposonmutanten über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon - Membran übertragen. Als Sonde für die Southern - Hybridisierung diente ein Digoxigenin - markiertes PCR - Produkt, das mit den Primern tnpRL 17-1 und tnpRL 17-2 amplifiziert worden war und die Transposonkassette trägt. Nach Hybridisierung der Sonde gegen die auf der Membran befindliche DNA erfolgte die Detektion der gebundenen Sonde mittels Chemilumineszenz. **Abbildung 28** zeigt das Ergebnis der Southern Blot Analyse für *P. fluorescens*.





Der Southern Blot zeigt Transposoninsertionen an verschiedenen Stellen in der chromosomalen DNA von *P. fluorescens*, da Signalbanden in den einzelnen Spuren auf

unterschiedlicher Höhe detektiert werden konnten. Somit beweist dieses System eine sehr hohe Anwendungseffizienz zur Herstellung einer umfangreichen Mutantenbank von *P. fluorescens*.

Bei *A. baumannii* ATCC 19606 allerdings erwiesen sich diese potentiellen Transposonmutanten im Southern Blot als Träger des ganzen Ausgangsplasmides pRL27 und nicht als Organismen, bei denen das Transposon in das Chromosom gesprungen war. In **Abbildung 29** ist das Ergebnis der Southern Blot Analyse zu sehen.



Abb. 29: Southern Blot zum Nachweis der chromosomalen Insertion der Transposonkassette. Die chromosomale DNA wurde mit *Eco*RV verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. (WT: Wildtyp A. *baumannii* ATCC 19606; 1 -11: potentielle Transposonmutanten).

Gemäß der Erwartung sollte sich das Transposon an verschiedenen Orten in das Chromosom von *A. baumannii* ATCC 19606 inserieren. Somit sollten im Southern Blot Signalbanden auf unterschiedlicher Höhe zu sehen sein. Statt der erwarteten Ergebnisse zeigte sich bei allen untersuchten Stämmen ein identisches Signalmuster, wie man es von einem ungeschnittenen, elektrophoretisch aufgetrennten Plasmid bei *Acinetobacter* sp. her kennt. Dieses Vermutung

#### Ergebnisse

konnte bestätigt werden durch die Tatsache, dass DNA-Moleküle aus diesen potentiellen Transposon -Mutanten isoliert werden konnten und nach Restriktion mit *Sal*I und gelelektrophoretischer Analyse gleiches Bandenmuster aufwiesen wie das Originalplasmid pRL27. Diese Ergebnisse sind in **Abbildung 30** dargestellt.





- Co: Positivkontrolle: Originalplasmid pRL27 aus *E. coli* BW 20797; erwartete Größen der Restriktionsfragmente: 2269 Bp, 1761 Bp, 50 Bp
- Co: Negativkontrolle: Plasmidisolat aus A. baumannii ATCC 19606 (Wildtyp)
- 1-8: Plasmidisolate potentieller Transposonmutanten

Zusätzlicher Nachweis wurde durch eine Retransformation der isolierten Plasmide in *E. coli*  $pir^+$ , bzw. *E. coli pir^-* erbracht. Die Transformation der isolierten DNA - Moleküle in *E. coli*  $pir^+$ , der eine chromosomale Kopie des *pir* - Gens trägt und somit das  $\pi$  - Protein bildet, war erfolgreich; gleichzeitig wurden keine Transformanten erhalten mit einem *E. coli* - Stamm, der keine entsprechende Kopie des *pir* - Gens besitzt. Damit konnte bewiesen werden, dass die Replikation des  $\pi$  - Protein-abhängigen Plasmids in *A. baumannii* entgegen der Theorie möglich ist - eventuell durch ein unbekanntes endogenes Protein. Da zu diesem Zeitpunkt das Genom von *A. baumannii* noch nicht sequenziert vorlag, wurden in silico Analysen in diesem Zusammenhang mit dem nahe verwandten apathogenen *A. baylyi* ADP1 Organismus durchgeführt. Es konnten aber keine Gene identifiziert werden, die für ein  $\pi$  - Protein, bzw.  $\pi$  -ähnliches Protein kodieren. Somit ist dieses System - entgegen der Theorie - offensichtlich in *A. baumannii* ATCC 19606 nicht anwendbar.

# 6. Analyse der Biofilmbildung von *A. baumannii* ATCC 19606 und verschiedenen klinischen Isolaten

Aus aktuellen Studien ist bekannt, dass *A. baumannii* auf natürlichen und künstlichen Oberflächen Biofilme bildet (Vidal, et al.; 1996), wodurch ihm eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen verliehen wird, sowie die Fähigkeit, mehrere Tage bis Wochen in unbelebter Umgebung zu überleben (Seifert, et al.; 1995). Dies ermöglicht dem Keim die Übertragung mittels Vektoren, dabei sind die Hände des Krankenhauspersonals als wichtige Infektionsquelle zu erwähnen.

Das Vermögen pathogener Mikroorganismen, Biofilme auszubilden, spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen chronischer Infektionen. Im Biofilm liegen die Keime eingeschlossen in einer Matrix aus exopolymeren Substanzen, v.a. Exopolysaccharide vor. Diese verleiht ihnen zum einen Schutz vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus', zum anderen aber auch mit der Funktion als Penetrationsbarriere Resistenz gegenüber Antibiotika. In diesem Projekt wurde ein Testsystem zur Analyse der Biofilmbildung für *A. baumannii* auf Polystyrol -Mikrotiterplatten etabliert. Das Experiment basiert auf der Methode nach Christensen et al. (Christensen, et al.; 1999).

In LB - Medium verdünnte ÜN - Kulturen wurden in eine Vertiefung einer 96 - Mikrotiterplatte - hergestellt aus Polystyrol - überführt, und die beimpfte Platte stehend bei 37 °C für mehrere Stunden inkubiert und anschließend ausgeklopft, um den Inhalt zu entfernen. Freischwimmende Bakterien wurden aus dem Ansatz durch mehrere Waschschritte entfernt. Die Anfärbung der sessilen Bakterien an der Plastikoberfläche erfolgte durch Zugabe von Kristallviolett (0,1 % w/v). Überschüssiger Farbstoff wurde wiederum durch Waschen aus dem Ansatz entfernt. Für quantitative Analysen wurde der Farbstoff durch Zugabe von je 200 µl/Vertiefung absoluten Ethanols solubilisiert und die Absorption bei 562 nm in einem Mikrotiter-Plattenlesegerät bestimmt. Im Rahmen Etablierung der wurde ein Absorptionsspektrum für die verwendete Kristallviolett - Lösung gemessen und dabei ein Absorptionsmaximum bei 590 nm bestimmt (s. Anhang). Da in unserer Abteilung kein geeigneter Filter dieser Wellenlänge vorliegt, wurden nachfolgende Messungen mit einem Filter für die Wellenlänge 562 nm durchgeführt.

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Biofilm - Analyse von *A. baumannii* ATCC 19606 und zwei weiteren klinischen Isolaten, die starkes Adhärenzvermögen an die eukaryotischen Zellen aufwiesen. Dabei wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  als Negativkontrolle eingesetzt. Die Analyse wurde in Abhängigkeit verschiedener Inkubationszeiten bei 37 °C durchgeführt. Zur statistischen Absicherung erfolgten die Messungen in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen.



Abb. 31:Biofilmbildung auf Polystyrol-Mikrotiter-Platten in Abhängigkeit der Inkubationszeit; getestet<br/>wurden A. baumannii ATCC 19606, die klinischen Isolate, A. baumannii 1901 und 284 sowie<br/>E. coli als Negativkontrolle. Die Biofilmbildung wurde quantitativ analysiert durch Anfärbung<br/>mit Kristallviolett und anschließender Solubilisierung des Farbstoffes mit Ethanol.

Alle getesteten Stämme zeigen Biofilmbildung, allerdings in unterschiedlich starker Ausprägung. Nach Inkubation für 8 Stunden bei 37 °C wird bei allen untersuchten *A. baumanni*i - Stämmen im Verlauf das höchste Niveau der Biofilmausprägung erreicht, der 24 - Stunden -Wert der sinkt daraufhin generell wieder leicht ab.

In folgenden Versuchen sollten weitere klinische Isolate auf ihre Fähigkeit, Biofilme auf Polystyrol zu bilden, getestet werden. Die beimpften Mikrotiterplatten wurden zum einen für 8 Stunden und zum anderen im Vergleich hierzu für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden die *E. coli* - Stämme K12 und DH5 $\alpha$  als Negativkontrollen eingesetzt. Auch hier erfolgten die Messungen in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen zur statistischen Absicherung der Ergebnisse. In **Abbildung 32** ist das Ergebnis dieser Studie dargestellt.



Abb. 32: Biofilmbildung nach 8-, bzw. 24-stündiger Inkubationszeit; getestet wurden A. baumannii
 ATCC 19606, die klinischen Isolate 284, 6675 und 1901; A. baylyi ADP1 und als
 Negativkontrollen E. coli K12 und DH5α

Als stärkster Biofilmbildner zeichnet sich überraschenderweise der Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606 aus - im Gegensatz zu seinem eher schwach ausgeprägten Adhärenzverhalten. Auch das klinische Isolat 284 weist starke Biofilmbildung auf Polystyrol auf; es erreicht ein wesentlich höheres Niveau, als *A. baumannii* 1901, welcher von allen untersuchten *A. baumannii* - Stämmen das stärkste Adhärenzvermögen aufwies.

#### **IV. Diskussion**

### Analyse und Quantifizierung des Adhärenzverhaltens ausgewählter A. baumannii - Stämme an unterschiedliche eukaryotische Zelllinien

Um die Interaktion zwischen den klinischen Isolaten von *A. baumannii* und eukaryotischen Epithelzellen als Schlüsselereignis in der Pathogenese näher zu untersuchen, wurden Adhärenz- und Invasionsstudien mit der eukaryotischen humanen Lungenepithelzelllinie A549, bzw. mit der humanen Rachenepithelzelllinie HEp2 etabliert und durchgeführt. Die Zelllinien aus dem humanen Respirationstrakt wurden für diese Experimente ausgewählt, da *A. baumannii* primär zu Lungenaffektionen führt (Bergogne - Bérézin, et al., 1996).

In umfangreichen Studien konnte erfolgreich das Bindungsvermögen des Referenzstammes ATCC 19606, sowie zahlreicher klinischer A. baumannii - Isolate nachgewiesen werden. Insgesamt wurden elf Stämme auf ihr Adhärenzvermögen an die eukaryotischen Zelllinien untersucht, zum einen der Referenzstamm A. baumannii ATCC 19606 und zehn weitere klinische Isolate, die bei den Patienten zu schweren Erkrankungen führten. A. baumannii zeigt ein Adhärenzvermögen von durchschnittlich 3 % an die eukarvotischen Zellen auf. Dies ist niedriger als bei Yersinia sp., bzw. S. agalactiae z. B., zwei pathogenen Bakterienarten, die ebenfalls einen adhärenten Phänotyp aufweisen. Die Adhärenz von A. baumannii liegt aber signifikant höher als die des getesteten nicht-adhärenten Organismus E. coli K12. Auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verifizieren das Bindungsvermögen an die Lungenepithelzelllinie A549. Allerdings fiel das Adhärenzvermögen der untersuchten Stämme an die eingesetzten Epithelzelllinien sehr inhomogen aus. So zeigt der Referenzstamm verglichen mit den anderen klinischen Isolaten deutlich schwächeres Bindungsvermögen; herausragende Adhärenz weisen die Isolate 1901, sowie die Stämme 7961 und 284 an die A549 - Lungenepithelzellen auf. Diese unterschiedliche Adhärenzkapazität der getesteten A. baumannii - Stämme kann verschiedene Ursachen haben: Die Ausbildung von Adhäsinen unterliegt zum einen starkem standortabhängigen Selektionsdruck. Somit können Anzahl und Art der Adhäsine auf der Oberfläche von A. baumannii variieren (Ofek et al., 2003).

Bakterien haben zudem die Fähigkeit, die Expressionsmuster der verschiedenen adhäsiven Oberflächenmoleküle zu ändern, bzw. sogar einen nicht-adhärenten Phänotyp anzunehmen. (Blomfield et al., 1993). Das hängt damit zusammen, dass ein spezifisches Adhäsin oft nur unter spezifischen Umweltbedingungen und für eine bestimmte Phase im Infektionsprozess essentiell ist. Der nicht-adhäsive Phänotyp nimmt auch eine bedeutende Rolle in der Pathogenese ein, denn er soll zum einen dazu führen, dass die Bakterien vom Immunsystem des Wirtes über die antigen wirkenden Adhäsine nicht erkannt werden, zum anderen ermöglicht diese Form den Bakterien, sich vom Wirtsgewebe zu lösen und andere Bereiche oder neue Organismen zu kolonisieren. Dieses je nach Bedarf erfolgende An- und Abschalten der Adhäsinexpression erfordert ein komplexes Regulationswerk, das zum großen Teil von den vorherrschenden Umweltbedingungen abhängt (Blomfield et al., 1993). Da die vorherrschenden Rahmenbedingungen im Adhärenzexperiment identisch sind für alle untersuchten *A. baumannii* - Stämme könnte die unterschiedliche Adhärenzkapazität in grundsätzlich verschiedenen Regulationsmechanismen begründet sein.

Die untersuchten klinischen Isolate von *A. baumannii* entstammen unterschiedlichen Orten des menschlichen Organismus'. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Isolationsort und Adhärenzkapazität konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Zu den Stämmen, die aus dem Urin isoliert wurden, zählen neben dem Isolat 1901, mit dem stärksten nachgewiesenem Adhärenzvermögen, auch der Stamm 10247. Letzterer zeigt vergleichbares Bindungsvermögen wie die *A. baumannii* – Isolate 7961, 284 oder 17093, die aus Blut verschiedener Patienten isoliert werden konnten.

Stammspezifische Sequenzunterschiede oder Mutationen im Promotor für die Expression von Adhäsingenen können ebenfalls eine mögliche Ursache für das unterschiedlich stark ausgeprägte Adhärenzvermögen der verschiedenen klinischen *A. baumannii* - Isolate an die eukaryotischen Epithelzellen sein. Als Beispiel sollen in diesem Zusammenhang die FimH-Adhäsine von *E. coli* genannt werden, die Forschungsgegenstand von Schembri und Klemm (2000) waren. Es handelt sich hierbei um bakterielle Oberflächenstrukturen, die eine Interaktion des Bakteriums mit verschiedenen Wirtszellen über eine Bindung an D-Mannose vermitteln. Die Arbeitsgruppe konnte anhand einer generierten Mutantenbank von *E. coli*, zeigen, dass eine Veränderung in der Primärstruktur des FimH-Proteins, einer Fimbrien-Komponente, zu einer Veränderung in der Anzahl der Fimbrien auf der Oberfläche der Bakterien führt. Zum anderen konnten aber auch eine veränderte Rezeptoraffinität, bzw. -spezifität als Konsequenzen der Mutationen detektiert werden. Dies äußerte sich in einem veränderten Adhärenzvermögen der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

# Analyse des Invasionsverhaltens ausgewählter *A. baumannii* - Stämme an die eukaryotische Zelllinie

Die Fähigkeit, sich an eukaryotische Zellen anzuheften und aktiv in diese einzudringen, ist eine wichtige Eigenschaft vieler pathogener Bakterien (Dersch, 2003). Sie verschafft ihnen einen gewissen Selektionsvorteil, denn intrazelluläre Bakterien können Angriffe des Immunsystems und die Wirkung von antimikrobiellen Substanzen umgehen. Der Invasionsprozess wird von einigen Bakterien auch dazu genutzt, Epithelzellschichten zu durchqueren und somit zu tiefer gelegene Gewebe und Organe vorzudringen. Damit droht eine weitere Ausbreitung des pathogenen Keims über die Blutbahn im Körper. Eine andere Möglichkeit der invadierten Bakterien besteht darin, sich intrazellulär so stark zu vermehren, dass sie die befallene Zelle dabei schädigen oder sogar komplett zerstören, bzw. Apoptose induzieren

Somit stellt der Invasionsprozess pathogener Organismen einen bedeutsamen Virulenzmechanismus dar. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode war es nicht möglich, ein Invasionsvermögen der getesteten *A. baumannii* - Stämme in humane Lungenepithelzellen nachzuweisen. Da aber die Anzahl der invadierten Bakterien in diesem Experiment über das Auszählen Kolonie-bildender Einheiten erfolgt, werden mit dieser angewandten Methode auch nur solche Zellen erfasst, die nach Invasion in die eukaryotische Zelle noch lebens-, bzw. wachstumsfähig sind. Erreger, die im Zuge der Invasion phagozytiert worden sind, können mit dieser Methode folglich nicht detektiert werden.

Andererseits könnte die Virulenz von *A. baumanni* auch darin begründet sein, dass dieser Erreger fähig ist, epitheliale Oberflächen zu schädigen und sich auf diese Weise - unabhängig von einer Invasion in das Wirtszellepithel - Zugang zu tiefer gelegenen Geweben verschafft. Diese Hypothese wird experimentell durch Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen untermauert.

So belegten frühere Studien, dass *A. baumannii* extrazelluläre Enzyme und Schleim produziert mit letaler Wirkung auf Mäuse in in-vivo-Experimenten (Poh et al., 1985; Obana, 1986).

Eine koreanische Arbeitsgruppe konnte zudem erfolgreich zeigen, dass *A. baumannii* - Zellen, bzw. auch entsprechende Kulturüberstände die Apoptose von HeLa-Zellen induzieren über Caspase 3-Aktivierung (Lee et al., 2001).

99
#### Charakterisierung bakterieller Adhäsine

In Adhärenzversuchen mit enzymatisch vorbehandelten Bakterien sollte untersucht werden, welche bakteriellen Strukturen für die spezifische Wechselwirkung zwischen *A. baumannii* und A549-Lungenepithelzellen verantwortlich sind. Bei den klinischen Isolaten 1901 und 284 konnte nach Behandlung mit Pronase und Lipase eine Erniedrigung der Bindung auf 30 %, bzw. 20 % des Ausgangswertes beobachtet werden. Dies führt zu dem Schluss, dass an dem Adhärenzprozess sowohl bakterielle Proteinkomponenten beteiligt sind, als auch Lipid-haltige Strukturen.

Ergebnisse aktueller Studien konnten für *A. baumannii* zeigen, dass Fimbrien, die aus Proteinuntereinheiten zusammengesetzt sind, für das Adhärenzvermögen an humane Bronchialzellen eine bedeutende Rolle spielen (Lee et al., 2006).

Die Pili kontrahieren nach einer ersten Interaktion mit den Wirtszellrezeptoren ("loose contact"), was wiederum eine engere Anheftung an die Zelle erlaubt ("intimate contact"). *Acinetobacter* sp. zeichnen sich durch den Besitz von Typ IV-Pili aus, eine besondere Art von Fimbrien, die an Polysaccharide der Wirtszelle binden (Gohl, et al., 2005). Die Klasse der Typ IV-Pili wurde bereits ausgiebig untersucht, da diese Strukturen die Adhäsion vieler anderer pathogener Organismen an Wirtszellen vermitteln. Zu diesen zählen u.a. *P. aeruginosa* und enteropathogene und enterotoxische *E. coli*-Stämme (Strom et al., 1993). Weiterhin vermittelt der Typ IV-Pilus eine spezifische Art der gleitenden Fortbewegung auf festen Oberflächen, die Twitching Motility genannt wird. Dieses Gleiten beruht auf der Synthese und Retraktion der Pilusstrukturen unter Vorschub der Zelle (Wall et al., 1999).

Wie groß die Bedeutung der Fimbrien für den Adhärenzprozess an die A549-, bzw. HEp2-Zellen ist, könnte mit Hilfe von weiteren Adhärenzexperimenten ermittelt werden, bei denen die eukaryotischen Zellen mit aufgereinigten Pili-Strukturen von *A. baumannii* kompetitiv zu den Bakterien koinkubiert werden. Sind die Fimbrien von *A. baumannii* maßgeblich für das beobachtete Bindevermögen, würde als Ergebnis die bakterielle Adhärenz geblockt werden.

Außer Fimbrien scheinen aber auch noch andere Strukturen, bzw. Mechanismen an der Interaktion von *A. baumannii* mit eukaryotischen Zellen beteiligt zu sein. So erfolgte die Bindung an Tracheal- und Blasengewebe der Ratte unabhängig von der Produktion von Fimbrien (Ruiz et al., 1998; Sepulveda et al., 1998).

Grundlage für dieses Ergebnis stellt möglicherweise ein anderer Adhärenzmechanismus dar, der auf so genannten Nicht-Fimbrienadhäsinen beruht. Bei dieser Gruppe handelt es sich um sehr verschiedenartige oberflächenexponierte integrale Membranproteine oder zellwandassoziierte Polypeptide, die eine sehr enge Bindung zwischen dem Erreger und der Wirtszelle vermitteln (Dersch, 2003). Die Art der Zellrezeptoren, die durch die adhäsiven Faktoren pathogener Bakterien erkannt werden, ist sehr unterschiedlich. Ihre Anzahl und Verteilung in den verschiedenen Zelltypen und Geweben kann sich deutlich voneinander unterscheiden. Die Zellrezeptoren bestimmen somit die bakterielle Gewebe- und Organspezifität und legen den Ort der Adhäsion, sowie die Wirtsspezies fest. Viele der verwendeten Oberflächenrezeptoren, so auch die bereits beschriebenen heterodimeren Integrine, sind über die Bindung von extrazellulären Matrixproteinen an der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, bzw. Zelladhäsionsvorgängen beteiligt. So wurde zum Beispiel für *S. agalactiae* die Bindung an die humanen Glykoproteine Laminin, Fibronektin und Fibrinogen beschrieben, die Bestandteil der extrazellulären Matrix der Wirtszelle sind (Schönbeck et al., 1981; Spellerberg et al., 1999).

Um die Bedeutung einer möglichen Interaktion von *A. baumannii* – Isolaten mit Komponenten der extrazellulären Matrix der Wirtszelle für den Adhärenzprozess zu untersuchen, wurden zum einen Adhärenzexperimente durchgeführt, bei denen die eukaryotischen Zellen A549 vor der Inkubation mit den Bakterien mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Integrine vorbehandelt werden. Diese Antikörper zeigen eine so hohe Affinität zu den Integrinen, dass die  $\beta_1$ -gekoppelten Matrixproteine, wie z. B. Laminin, Fibronektin oder Kollagen von ihren entsprechenden Bindestellen verdrängt werden und auf diese Weise nicht mehr als Rezeptoren für die Adhärenz von *A. baumannii* zur Verfügung stehen. Somit würde das bakterielle Adhärenzvermögen durch die Antikörperbehandlung der Eukaryotenzellen geblockt werden.

Leider zeigte die Vorinkubation der eukaryotischen Zellen mit den monoklonalen Antikörpern keinen Effekt auf das Adhärenzvermögen der getesteten Stämme. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass das Adhärenzvermögen von den getesteten *A. baumannii* – Isolaten nicht auf einer Interaktion zwischen bakteriellem Adhäsin und  $\beta_1$ -Integringekoppelten ECM-Proteinen beruht.

Fibrinogen wird auch als Bestandteil der extrazellulären Matrix beschrieben, allerdings liegt dieses Protein nicht  $\beta_1$ -Integrin-gekoppelt auf der Zelloberfläche vor, sondern ist über  $\beta_3$ -Integrine mit der Zelloberfläche verbunden, die in sehr hoher Anzahl auf Thrombozyten zu finden sind. In dieser Arbeit konnte mit den getesteten *A. baumannii* - Stämmen keine spezifische Interaktion mit humanem Fibrinogen nachgewiesen werden. Allerdings wird Fibrinogen von Eukaryotenzellen im Gegensatz zu den anderen  $\beta_1$ -gekoppelten Matrixproteinen eher basolateral sezerniert und steht somit als Adhäsinrezeptor auf der

101

Oberfläche von Epithelzellen kaum zur Verfügung. Vielmehr vermittelt die Bindung von körpereigenem Fibrinogen pathogenen Erregern Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes und dient somit der molekularen Mimikry (Salyers, et al., 2002)

#### Lichtmikroskopischer Kapselnachweis ausgewählter A. baumannii – Isolate

Bei vielen pathogenen Mikroorganismen wird die Virulenz durch den Besitz einer so genannten Kapsel gesteigert, da sie zum Schutz der Bakterien vor Defensivmechanismen der Wirtszellen beiträgt (Hulse et al., 1993). In dieser Arbeit konnte erfolgreich der mikroskopische Nachweis erbracht werden, dass alle getesteten A. baumannii - Isolate eine Kapsel besitzen. Dabei handelt es sich um ein lockeres Polysaccharidgeflecht aus L-Rhamnose, D-Glucose, D-Glucuronsäure und D-Mannose, angereichert mit Glykoproteinen, Polyalkoholen und Aminosäurezuckern (Bergogne - Bérézin, et al., 1996). Eine Polysaccharidkapsel wirkt insgesamt schwach immunogen und induziert wie die zuvor beschriebene Bindung von wirtseigenem Fibrinogen molekulare Mimikry, da die sehr häufigen Bestandteile Hyaluronsäure und Sialinsäure Wirtsglykoproteinen ähneln (Hulse et al., 1993). Sie erfüllt vielfältige Funktionen für die Bakterien. Im Rahmen der Pathogenese ist aber insbesondere der durch sie vermittelte Schutz vor Opsonophagozytose zu nennen. Durch die Anwesenheit der Kapsel wird den Phagozyten der Zugang zu Antikörpern, bzw. Komplementfaktoren verwehrt, die auf der bakteriellen Oberfläche im Zusammenhang mit der primären Immunantwort gebunden haben (Finlay et al., 1997). Diese Kapselfunktion trägt dazu bei, dass pathogene Erreger im Blut oder in verschiedenen Geweben des Wirtes überleben können. Auf dieser Tatsache basierend erklären sich z. B. schwere Pneumonien, verursacht durch den Keim Klebsiella pneumoniae; welcher sich durch den Besitz einer dicken Kapsel auszeichnet (Sahly et al. 2000).

In einigen Fällen wurde beschrieben, dass der Besitz einer Kapsel auch zu einer Maskierung, bzw. sterischen Abschottung bakterieller Oberflächenrezeptoren führt. Auf diese Weise werden viele Interaktionen zwischen Bakterium und Wirt unterbunden aufgrund des Funktionsverlustes kurzer Adhäsine, bzw. auch Invasine in Anwesenheit einer Polysaccharidkapsel (Sahly et al., 2000; Schembri et al., 2004).

Somit könnte die Polysaccharidkapsel von *A. baumannii* störenden Einfluss auf die Bindung an die verschiedenen Proteine der extrazellulären Matrix nehmen. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant zu vergleichen, wie sich das Adhärenz-, bzw. auch das Invasionsvermögen verschiedener klinischer Isolate von *A. baumannii* gegenüber dem entsprechender Kapseldeletionsmutanten verhält. Würde sich die Theorie unter diesem Aspekt bestätigen, wäre die Adhäsion bekapselter Stämme signifikant niedriger als die der korrespondierenden Kapselmutanten. Auch der Adhärenzversuch mit Anti- $\beta_1$ -Integrinvorbehandelten Epithelzellen könnte bei Einsatz unbekapselter *A. baumannii* - Mutanten möglicherweise auf eine Interaktion mit  $\beta_1$ -Integrin-gekoppelten Matrixproteinen hinweisen.

## Transposonmutagenese zur Identifikation der an der Adhärenz beteiligten Komponenten

Die Transposonmutagenese wurde mit Hilfe eines relativ neuen, hocheffizienten Tn5basierenden Systems durchgeführt, welches in einer Vielzahl mit Acinetobacter nahe verwandten Bakterienarten erfolgreich eingesetzt worden war (Larsen et al., 2002). Eine erfolgreiche Anwendung dieses Systems in A. baumannii ist bereits beschrieben (Dorsey et al., 2002), jedoch wurde hier nicht wie üblich mit konjugativen Plasmiden gearbeitet, sondern ein Komplex aus Transposase und Transposonkassette über Elektroporation in die Zellen eingebracht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Anwendung des konventionellen, Konjugations-basierten Systems. Zur Kontrolle wurde Р. fluorescens als Vergleichsorganismus verwendet. Dieser konnte mit hoher Effizienz mutagenisiert werden. Die anschließende Southernblotanalyse einer Anzahl der erhaltenen Transposonmutanten demonstrierte die zufällige Integration des Transposons. Leider zeigte sich, dass weder A. baumannii (Referenzstamm) noch der nicht-pathogene Boden-Organismus, A. baylyi ADP1 mit dem System zu mutagenisieren waren.

Dies ist zum einen in der dramatisch schlechteren Konjugationseffizienz (im Vergleich zu *P. fluorescens*) begründet. Die Konjugationseffizienz wurde sowohl für *P. fluorescens* als auch für *A. baumannii* ATCC 19606 und den apathogenen Stamm *A. baylyi* ADP1 explizit bestimmt. Als Donor diente in diesem Zusammenhang *E. coli* S17 mit dem Vektor pRK415, der ein weites Wirtsspektrum aufweist. Parallel und vergleichend wurden dieselben Rezipientenstämme mit dem Tn-kodierendem Plasmid pRL27 konjugiert. Dabei wurde ersichtlich, dass *A. baumannii* eine wesentlich schlechtere Konjugationseffizienz im Vergleich zu *P. fluorescens* und *A. baylyi* ADP1 aufweist. Während die Konjugation mit pRK415 bei allen Rezipientenstämmen erfolgreich zu Transkonjuganten führte, war es trotz mehrfacher Versuche nicht möglich, das Plasmid pRL27 in *A. baylyi* einzubringen. Dieses Ergebnis bestätigt die erfolglosen Mutageneseversuche von *A. baylyi* mit dem Mini-Tn5-

System in vorhergehenden Arbeiten. Auch hier konnten nach Konjugation keine positiven Transkonjuganten isoliert werden (Dal Demir, 2004).

Da bei der Transposonmutagenese mittels des Plasmides pRL27 nicht nur eine erfolgreiche Konjugation alleine, sondern zusätzlich auch noch die direkt im Anschluss zu erfolgende Transposition maßgebend ist für die erfolgreiche Mutagenese, erhält die eigentliche Effizienz dieses Systems in Bezug auf die Anwendung für *Acinetobacter* aufgrund der schlechten Konjugationseffizienz schon im Vorfeld eine schlechte Prognose.

Neben der Problematik der schlechten Konjugationseffizienz scheint das Selektionsprinzip basierend auf dem  $\pi$ -Protein-abhängigen ori R6K in *A. baumannii* nicht zu funktionieren. Transkonjuganten, die in einer niedrigen Rate erhalten werden konnten, erwiesen sich als Träger des ganzen Ausgangsplasmides und nicht als Organismen, bei denen das Transposon in das Chromosom gesprungen war. Aufgrund des  $\pi$ -Protein-abhängigen R6K-Replikationsursprungs sollte eine Vervielfältigung des pRL27-Plasmids in *A. baumannii* nicht möglich sein, da dieser Stamm über kein *pir*-Gen verfügt. Eine mögliche Erklärung ist, dass  $\pi$ -Protein-ähnliche Systeme Funktionen des  $\pi$ -Proteins übernehmen. In silico Analysen mit dem nahe verwandten apathogenen *A. baylyi* Organismus und mit der aktuell publizierten Genomsequenz von *A. baumannii* ATCC 17978 (Smith, et al., 2007) führten jedoch zu keiner Identifikation von Genen, die für ein  $\pi$  - Protein, bzw.  $\pi$  -ähnliches Protein kodieren. Somit ist dieses System – entgegen der Theorie – offensichtlich in der Gattung *Acinetobacter* nicht anwendbar.

In anderen Arbeiten meiner Arbeitsgruppe wurde statt des Mini-Tn5-Elementes ein alternatives Mini-mariner-Transposon zur direkten Mutagenese des *A. baylyi*-Genoms eingesetzt (Fischer, 2008). Dieses System führte zu einer Integration des Transposons an unterschiedlichen Positionen im Chromosom von *A. baylyi*. Es sei zu hoffen, dass sich dieses System auch erfolgreich auf *A. baumannii* zur Mutantenherstellung übertragen lässt.

#### Analyse der Biofilmbildung von A. baumannii und verschiedenen klinischen Isolaten

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Referenzstamm von *A. baumannii* und die verschiedenen untersuchten klinischen Isolate Biofilme auf Polystyrolhaltigen Mikrotiterplatten ausbilden. Dabei zeigte sich, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf der eingesetzten abiotischen Oberfläche sehr inhomogen unter den analysierten Stämmen ausfällt. Der Referenzstamm zeigt von allen eingesetzten Stämmen stärkste Biofilmbildung, was im Gegensatz zu seinem eher schwach ausgeprägten Adhärenzverhalten steht. Auch das klinische Isolat 284 weist starke Biofilmbildung auf Polystyrol auf; es erreicht ein wesentlich höheres Niveau, als *A. baumannii* 1901, welcher von allen untersuchten Stämmen das stärkste Adhärenzvermögen an die epithelialen Zellen A549 und HEp2 aufwies. Man hätte einen Zusammenhang zwischen der Adhärenzkapazität und der Fähigkeit zur Biofilmbildung erwarten können, da die Ausbildung von Biofilmen zu einer ersten unspezifischen Kontaktaufnahme des Krankheitserregers mit der Wirtszelloberfläche führen kann und eine nachfolgende Adhärenz begünstigt, welche dann aber auf spezifischen Interaktionen basiert.

Biofilme bilden sich in der Natur an allen Grenzflächen und in technischen Systemen aus, die ausreichend Wasser enthalten. Für die Adsorption der Zellen an der Grenzfläche können unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein. Von Bedeutung sind insbesondere van der Waals'sche Kräfte, elektrostatische Anziehung sowie Wasserstoffbrücken (Donlan et al., 2002). In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass die Bindung eines pathogenen Erregers an spezifische Rezeptorstrukturen auf der Oberfläche der Zielzellen des Wirts eine höhere Affinität aufweist, als sie durch reine ionische oder elektrostatische Anziehungskräfte erreicht werden kann.

Allerdings kann die Fähigkeit zur Biofilmbildung einen primären reversiblen Kontakt mit dem beabsichtigten Zielgewebe fördern, bzw. begünstigen. Denn auch auf lebenden Zellen sind solche pathogenen Biofilme zu finden. Derartige Aggregate konnten u.a. im Schleim der Lunge von Patienten isoliert werden, die an cystischer Fibrose erkrankt sind (Singh et al., 2000). Verantwortlich für die Bildung von Biofilmen in der Lunge dieser Patientengruppe ist in den meisten Fällen *Pseudomonas aeruginosa*. Dieser Keim zählt zu den opportunistischen Humanpathogenen; für Menschen mit intaktem Immunsystem ist er harmlos, bedrohlich ist der Keim jedoch für Mukoviszidose-Patienten, weil er chronische Infektionen der Lunge hervorruft.(Singh et al., 2000). Mokoviszidose ist eine Erbkrankheit, bei der die Lunge einen zähen Schleim bildet, der kaum abtransportiert werden kann. In diesem Schleim vermehrt sich *P. aeruginosa* stark und bildet einen Biofilm. Im Biofilm sind die Mikroorganismen geschützt und bilden eine erstaunliche genetische Vielfalt aus. Durch diese Diversität überleben die Keime Stress, wie z. B. eine Antibiotika-Therapie leichter (Lee, et al., 2005).

Man schätzt, dass ca. 65 % aller bakteriellen Infektionen auf der Fähigkeit der Krankheitserreger basieren, Biofilme auf verschiedenen Oberflächen auszubilden (Potera,

105

1999). Biofilme, die von *A. baumannii* gebildet wurden, konnten von verschiedenen medizinischen Gerätschaften isoliert werden, wie z.B. von Kathetern, Beatmungsschläuchen, künstlichen Herzklappen und Prothesen (Dijkshoorn, 2007). Das führte u. a. zu Infektionen des Urogenitaltraktes, Pneumonie, Endokarditis oder sogar zur Abstoßung der Prothese.

Der erste Schritt in der bakteriellen Biofilmbildung besteht in einer anfänglichen Migration des Bakteriums zur Zieloberfläche (Pratt and Kolter, 1998). Nach Erreichen der Oberfläche erfolgt bei den meisten Biofilm-bildenden Bakterien die Bindung über TypI-Pili zur ersten direkten Kontaktaufnahme. Es handelt sich hierbei um haarähnliche Fimbrienstrukturen, die über die gesamte Zelloberfläche gleichmäßig verteilt sind. Infolge der Vermehrung der Zellen, die sich an einer Oberfläche angelagert haben, kommt es zu einer Ausbreitung der Organismen und zur Produktion der extrazellulären Matrix. Die Grenzfläche wird in Form eines Biofilms erst flächig besiedelt. Gleichzeitig oder später wachsen die Biofilme mehrschichtig auf und bilden schließlich dreidimensionale Strukturen mit mehr oder minder scharfen Grenzen zu den an den Biofilm angrenzenden Phasen. Die so entstehende Biofilmmatrix kann geschlossen sein, aber auch mit Poren, Kavernen und Gängen durchsetzt. Letzteres wird vor allem im jungen Stadium der Biofilmentwicklung beobachtet.

Um den Biofilm und die damit verbundene Diversität aufbauen zu können, müssen die Bakterien koordiniert zusammen arbeiten. Sie kommunizieren mit Hilfe von kleinen Signalmolekülen, den Homoserinlaktonen (Tomaras et al., 2007) Diese interbakterielle Kommunikation, das Quorum Sensing, ermöglicht es den Bakterien zelldichteabhängig Gene zu regulieren und bei einer genügend großen Masse, Biofilme zu bilden.

Da *A. baumannii* zu den unbeweglichen kokkoiden Stäbchen zählt und somit über keine Flagelle verfügt, nutzt dieser Keim einen anderen Bewegungsmechanismus, die Typ IV-vermittelte Twitching Motility, um die Zieloberfläche zu erreichen. Diese Fimbrienart ermöglicht es *A. baumannii*, an der Oberfläche entlang zu kriechen und die spätere typische dreidimensionale Struktur des Biofilms aufzubauen (Tomaras et al., 2003). Fimbrien wurde bereits für das Adhärenzvermögen von *A. baumannii* an humane Bronchialzellen eine Bedeutung zugemessen, ein möglicher Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Biofilmbildung von *A. baumannii* und dem Adhärenzvermögen an die eukaryotischen Epithelzellen A549 , bzw. HEp2 konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht detektiert werden.

In früheren Studien (Tomaras et al., 2003) wurde das Vermögen von *A. baumannii* untersucht, auf biotischen Oberflächen Biofilme auszubilden. Für diese Experimente wurden zwei verschiedene biotische Oberflächenmodellsysteme eingesetzt, die Hyphenform von *Candida* 

*albicans*, sowie HeLa-Zellen, humane zervikale Epithelzellen. Da für die Bindung an Plastik die Anwesenheit von Typ I-Pili erforderlich ist, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, ob die Proteinstrukturen auch für die Bindung an diese biotischen Oberflächen essentiell sind. Aus diesem Grund setzte Tomaras et al.(2003) neben dem Wildtyp von *A. baumannii* auch eine Typ I-Pili-defiziente Mutante ein, die in früheren Experimenten absolut unfähig war, Biofilme auf Plastikoberflächen auszubilden. Beide Stämme zeigten Bindung an die biotischen Oberflächen, sodass die Typ I-Pili für die Ausbildung von Biofilmen auf biotischen Oberflächen keine Voraussetzung darstellen.

Dies entspricht auch der sich abzeichnenden Tendenz der Ergebnisse aus Adhärenz- und Biofilmexperimenten in der vorliegenden Arbeit. Das Adhärenzvermögen der verschiedenen klinischen Isolate an die eukaryotischen Epithelzellen korreliert nicht mit ihrer Fähigkeit, Biofilme auf Plastikoberflächen auszubilden. Es müssen folglich andere zelluläre Faktoren und Strukturen für die Bindung an biotische Oberflächen verantwortlich sein.

Die genauen molekularen Mechanismen und Zellkomponenten für den Prozess der Biofilmbildung von *A. baumannii* sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Arbeitsgruppe in den USA (Tomaras et al., 2003) leitete die initiale Analyse des Biofilmprozesses mit dem Referenzstamm ATCC 19606 auf molekularer Ebene ein und konnte erste Zellkomponenten identifizieren, die für die Biofilmbildung von *A. baumannii* essentiell sind. Es handelt sich hierbei um einzelne Genprodukte des polycistronischen *csu*-Operons, das insgesamt sechs Gene umfasst und für ein Chaperon/Usher-Sekretionssystem kodiert. Dieses ist verantwortlich für die Produktion und Präsentation von Typ I-Pili auf der Oberfläche von *A. baumannii*, die, wie bereits erwähnt, notwendig sind für die erste Zelladsorption und die Initiierung der Biofilmentwicklung.

Biofilme sind nicht als statische Gebilde zu verstehen, sondern sie unterliegen einem dynamischen Auf- und Abbauprozess. Permanent lösen sich einzelne Zellen aus dem Verband und wandern zu anderen Biofilmaggregaten oder zu nicht-kolonisierten Gebieten, wo sie die Biofilmbildung von Anfang an neu initiieren. Diese Biofilmdynamik geschieht in Abhängigkeit der vorherrschenden Umweltbedingungen (Stoodley et al., 2002).

Bei *A. baumannii* wird die Biofilmbildung u.a. über ein Zweikomponentensystem reguliert. Es kontrolliert die Pili-Produktion durch Aktivierung der Transkription des Chaperon/Usher-Systems, welches vom *csu*-Operon kodiert wird. Zu dem Zweikomponentensystem gehört eine Membransensorkinase BfmS, die in enger Verbindung mit dem zugehörigen Regulatorprotein BfmR steht. Jede Komponente dieses Systems spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Biofilmbildung in Abhängigkeit extrazellulärer Signale (Towner et al., 2006). Einige Fragen bleiben bezüglich dieses Regulationssystems jedoch noch offen: So ist u.a. noch ungeklärt, welche Umweltsignale dieses Regulationssystem stimulieren, bzw. ob die Interaktion zwischen BfmS und dem *csu*-Operon direkt oder indirekt erfolgt.

Dabei kann die Verfügbarkeit an Nährstoffen ein entscheidendes Signal sein für den Übergang einer freischwimmenden, planktonischen Existenz zu einer sessilen Form eingeschlossen im Biofilm. In diesem Zusammenhang spielt bei dem humanpathogenen Organismus P. aeruginosa das Crc - Catabolite repression control- Protein, ein entscheidender Regulator des Kohlehydrat-Metabolismus, eine bedeutende Rolle für die Biofilmbildung (O'Toole et al, 2000). Nach Durchführung einer Transposonmutagenese zeigte eine Mutante mit Integration des Transposons im crc-Gen eine defekte Biofilmbildung und eine Abnahme der TypIV-Pili vermittelten Zuckbeweglichkeit. Sie wies zusätzlich alle Phänotypen bezogen auf die Kohlenstoffverwertungen auf, die durch eine gezielte Deletion des crc-Gens hervorgerufen werden. Es wurde vermutet, dass der beobachtete Defekt in der Biofilmbildung der crc-Mutante wahrscheinlich darin begründet liegt, dass nicht genügend oder keine voll funktionsfähigen Typ IV-Pili ausgebildet werden. Folglich könnten Nährstoffsignale über Crc als Teil eines Signaltransduktionsweges integriert werden, welcher die Biofilmbildung reguliert. Es wäre nun interessant zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß das Protein Crc, welches in Acinetobacter auch nachweisbar ist, die Fähigkeit von A. baumannii reguliert, Biofilme auszubilden.

## V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes konnte das Adhärenzverhalten von *A. baumannii* an die menschliche Lungenepithelzelllinie A549 und an die Rachenepithelzelllinie HEp2 unter definierten Bedingungen untersucht und quantifiziert werden.

Für diese Untersuchungen wurden bereits gut charakterisierte klinische Isolate, sowie einige Referenzstämme aus der Sammlung von Prof. Dr. H. Seifert, - Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Köln - eingesetzt.

Dabei wurden spezifische Bedingungen für *A. baumannii* etabliert, die auf der Ermittlung Kolonie-bildender Einheiten basieren. Insgesamt wurden elf Stämme auf ihr Adhärenzvermögen an die eukaryotischen Zelllinien untersucht, zum einen der Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606 und zehn weitere klinische Isolate, die zu schweren Erkrankungen der Patienten führten.

Quantitativ fiel die Adhärenz der untersuchten Stämme sehr inhomogen aus; *A. baumannii* zeigt ein Adhärenzvermögen von durchschnittlich 3 % an die eukaryotischen Zellen auf. Das ist niedriger als bei *Yersinia* sp., bzw. *S. agalactiae* z. B., zwei pathogenen Bakterienarten, die ebenfalls einen adhärenten Phänotyp aufweisen. Die Adhärenz von *A. baumannii* liegt aber signifikant höher als die des getesteten nicht-adhärenten Organismus *E. coli* K12.

Die Wachstumsphase hatte in den Adhärenzexperimenten keinen signifikanten Einfluss auf das Adhärenzvermögen der getesteten Stämme. Ebenfalls konnte kein Zusammenhang zwischen dem Isolationsort der Stämme und der entsprechenden Adhärenzkapazität beobachtet werden.

Ein Invasionsvermögen der getesteten *A. baumannii* - Stämme in humane Lungenepithelzellen konnte mit der in dieser Arbeit angewandten Methode nicht nachgewiesen werden, berücksichtigend, dass hierbei nur lebens- und wachstumsfähige Zellen detektierbar sind.

Adhärenzversuche mit Pronase-, Lipase-, und Natriumperjodat - vorbehandelten Bakterien, deuten darauf hin, dass bei *A. baumannii* Protein-, bzw. Lipid-haltige Strukturen in den Adhärenzmechanismus involviert sind.

Die extrazellulären Matrixproteine Kollagen, Laminin und Fibronektin liegen an  $\beta_1$ -Integrine gebunden vor. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Adhärenzexperimenten, bei denen die

eukaryotischen Lungenepithelzellen A549 mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Integrine vorbehandelt wurden, gezeigt werden, dass das Bindevermögen von *A. baumannii* an die Eukaryotenzellen A549 nicht auf einer Interaktion der Bakterien mit  $\beta_1$ -Integrin-gekoppelten Matrixproteinen basiert.

Über Bindungsexperimente mit humanem Fibrinogen, ein  $\beta_3$ -Integrin-gekoppeltes Matrixprotein, konnte dieses Protein ebenfalls als Rezeptorstruktur für den Adhärenzmechanismus von *A. baumannii* ausgeschlossen werden.

Bei den *A. baumannii* - Isolaten 7961, 284, 1901 und 6675 wurde erfolgreich der lichtmikroskopische Nachweis einer Polysaccharidkapsel erbracht. Diese Kapsel könnte zu einer Maskierung, bzw. sterischen Abschottung bakterieller Adhäsine führen und somit die Bindung an eukaryotische Matrixproteine verhindern.

Die Transposonmutagenese wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Tn5basierenden Systems durchgeführt, welches zu einer Vielzahl von Mutantenstämmen führen sollte mit je einer einzelnen Mutation (Tn-Integration). Die Anwendung des Tn5 mittels des konventionellen, Konjugations-basierten Systems führte bei dem mitgeführten Kontrollorganismus *P. fluorescens* wie erwartet zu einer Vielzahl an Mutanten mit einer Transposoninsertion an jeweils unterschiedlichen Stellen im Chromosom. Bei *A. baumannii* konnte dieses System leider nicht erfolgreich angewendet werden:

Es wurde vielmehr bewiesen, dass die Replikation des  $\pi$  – Protein-abhängigen Plasmids pRL27 in *A. baumannii* entgegen der Theorie möglich ist – eventuell durch ein unbekanntes endogenes Protein. Zusätzlich verhindert die als sehr niedrig bestimmte Konjugationseffizienz von *A. baumannii* eine effiziente Transposonmutagenese. Somit ist dieses System – entgegen der Theorie – offensichtlich in *A. baumannii* ATCC 19606 nicht anwendbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Testsystem zur Analyse der Biofilmbildung von *A. baumannii* auf Polystyrol-Mikrotiterplatten etabliert. Die Biofilmbildung wurde durch Anfärbung mit Kristallviolett und anschließendem Lösen in Ethanol quantifiziert. Alle getesteten Stämme zeigten Biofilmbildung, allerdings in unterschiedlich starker Ausprägung. Ein Zusammenhang zwischen dem Adhärenzvermögen an eukaryotische Epithelzellen und der Fähigkeit zur Biofilmbildung konnte in dieser Arbeit mit den getesteten Stämmen nicht beobachtet werden.

### **Summary**

In this project the adhesion of *A. baumannii* to human lung epithelial cells A549 and pharyngeal epithelial cells Hep2 was investigated and quantified.

For the experiments the wild type of *A. baumannii* ATCC 19606 as well as characterized clinical isolates from the collection of Prof. Dr. Seifert, University of Cologne were used.

Experimental conditions were established which base on a colony plating assay. Eleven strains were investigated, including the *A. baumannii* type strain ATCC 19606 and ten clinical isolates associated with outbreaks. Quantitative adherence varied considerably among the strains. *A. baumannii* shows an adhesion to eukaryotic cells of medial 3 %. It's lower than the adhesion capacity of *Yersinia* sp. or *S. agalactiae* for example, two bacterial pathogens with an adherent phenotype. But it means a significantly higher adhesion than *E. coli* K12, a non-adherent organism. There was no general significant change of adhesion during course of growth and additionally there was no significant correlation between the locus of isolation and adhesion capacity.

Furthermore no invasion behaviour into eukaryotic cells A549 was able to be observed, keeping in mind, that only viable cells can be detected by this used method.

Adherence assays with pronase-, lipase-, and sodiumpriodate-pretreated bacteria indicate, that protein- and lipid-containing structures are involved in the adhesion process of *A. baumannii*.

The extracellular matrix proteins collagen, laminin and fibronectin are bound to distinct  $\beta_1$  integrin receptors. In this project adhesion assays, in which eukaryotic cells were preincubated with monoclonal anti- $\beta_1$  integrins, indicate that there is no tight interaction between *A. baumannii* and these proteins of the extracellular matrix, which would confer an adherent phenotype.

Binding assays with human fibrinogen, a  $\beta_3$ -bound extracellular matrix protein, precluded this protein being a receptor structure in the adhesion process of *A. baumannii*.

The presence of a polysaccharide capsule was successfully shown by light microscopy with the *A. baumannii* isolates 7961, 284, 1901 and 6675. The capsule may prevent sterically

target-recognition of short bacterial adhesins. In this way the binding of *A. baumannii* to eukaryotic extracellular matrix proteins might be inhibited.

Tn-mutagenesis was performed to identify components, that are involved in adherence. This used method employs a vector carrying a Tn5-transposon. The delivery plasmid was transferred into the recipients by conjugation.

In this project this Tn-system was shown to be a very efficient method in order to generate a high number of different mutants of *P. fluorescens*. The same system is not useful for *A. baumannii* ATCC 19606, because this strain might produce a  $\pi$ -similar protein which facilitates the replication of this plasmid with oriR6K. Additionally the low conjugation efficiency of *A. baumannii* does not allow an efficient transposon mutagenesis.

Furthermore a biofilm-testing assay was established to investigate biofilm formation of *A. baumannii* on polystyrol microtiter dishes. Biofilm formation was quantified by staining with crystalviolet followed by solubilization with ethanol. All investigated *A. baumannii* strains showed biofilm formation but with different capacity. No relationship between adhesion capacity of the different investigated *A. baumannii* isolates and the ability of biofilm formation was observed in this work.

# VI. Literaturverzeichnis

**Abee, T., Siebers, A., Altendorf, K., Konings, W.N.; 1992** Isolation and characterization of the high-affinity K(+)-translocating ATPase from Rhodobacter sphaeroides. *J. Bacteriol.* **174(21):** 6907 – 6911

**Bergogne - Bérézin, E., Towner, K. J.; 1996** *Acinetobacter* spp. As Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9** (2): 148–165

**Birnboim, H. C.; 1983** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **100:** 243 – 255

Blomfield, I. C., Calie, P. J., Eberhardt, K. J., Mc Clain, M. S., Eisenstein, B.I.; 1993 Lrp stimulates phase variation of type I fimbriation in *E. coli* K12 *J. Bacteriol.* 175: 27-36

**Bouhennii, R., Gehrke, A., Saffarini, D.; 2005** Identification of genes involved in cytochrome c biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon. *Appl. Environ. Microbiol.* **71 (8):** 4935-4937

Brauers, J., Frank, U., Kresken, M., Rodloff, A. C., Seifert, H.; 2005 Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin. Microbiol. Infect.***11** (1): 24-30

Braun, G., Vidotto, M. C.; 2004 Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *A. baumannii* causing urinary tract infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99** (8): 839-844

Chastre, J., Trouillet, J. L.; 2000 Problems Pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*). *Seminars in Respiratory Infections* 15 (4): 287-298

Christensen, B. B., Sternberg, C., Andersen, J. B., Palmer, R. J. Jr., Nielsen, A.T., Givskov, M., Molin, S.; 1999 Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods. Enzymol.* 310: 20 - 42 Rev.

**Dal Demir, S.; 2004** Analysen zum molekularen Mechanismus der C-Katabolitrepression in *Acinetobacter sp.* Stamm ADP1, Doktorarbeit, Universität Ulm

**Dersch, P.; 2003** Molecular and cellular mechanisms of bacterial entry into host cells. *Contrib. Microbiol.* **10:** 183 - 209 Rev.

**Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H.; 2007** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5** (12): 939-950

**Di Marco, A. A., Averhoff, B., Ornston, L. N.; 1993 b** Identification of the transcriptional activator *pobR* and characterization of its role in the expression of *pobA*, the structural gene for p-hydroxybenzoate hydroxylase in *Acinetobacter calcoaceticus. J. Bacteriol.* **175 (14):** 4499-4506

Donlan, R. M., Costerton, J. W.; 2002 Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2): 167-193

**Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Actis, L. A.; 2002** Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (**12**): 6353-6360

**Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., Dersch, P.; 2005** Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell. Microbiol.* **7** (1): 63 – 77

**Engvall E., Perman, P.; 1971** Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8** (9): 871-874

Finlay, B. B., Falkow, S.; 1997 Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(2): 136-169

**Fischer, R.; 2008** Anpassung von *Acinetobacter baylyi* Stamm ADP1 an aromatische Substratbedingungen, Doktorarbeit, Universität Ulm

**Fuchs, R., Blakesley, R.; 1983** Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* **100:** 3-38

**Gohl, O., Friedrich, A., Hoppert, M., Averhoff, B.; 2005** The thin Pili of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 mediate Adhesion to Biotic and Abiotic Surfaces *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2): 1394-1401

Heise, T., Dersch, P.; 2006 Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103 (9): 3375 – 3380

Hof, H., Dörries, R.; 2000 Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie, 2. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Holmes, D. S., Quigley, M.; 1981 A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 (1): 193-197

http://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische\_Mikrobiologie

**Hunger, M., Schmucker, R., Kishan, V., Hillen, W.; 1990** Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in *Acinetobacter calcoaceticus* and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Gene* **87** (1): 45 – 51

Hulse, M. L., Smith, S., Chi, E. Y., Pham, A., Rubens, C. E.; 1993 Effect of type III group B streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 61: 4835-4841

Klemm, P., Schembri, M. A.; 2000 Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* 290 (1): 27 – 35

Kõljalg, S., Vuopio-Varkila, J., Lyytikäinen, O., Mikelsaar, M., Wadström, T.; 1996 Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*. APMIS 104 (9): 659 – 666

Larsen, R. A., Wilson, M. M., Guss, A. M., Metcalf, W. W.; 2002 Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Arch. Microbiol.* **178** (3): 193 – 201

Lee, B., Haagensen, J. A., Ciofu, O., Andersen, J. B., Høiby, N., Molin, S.; 2005 Heterogenicity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **43** (10): 5247-5255

Lee, J. C., Koerten, H., van den Broekc, P., Beekhuizenc, H., Wolterbeek, R., van den Barselaar, M., van der Reijden, T., van der Meer, J., van de Gevel, J., Dijkshoorn, L.; 2006 Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res. Microbiol.* 157 (4): 360-366

Lee, J. C., Oh, J. Y., Kim, K. S., Jeong, Y. W., Park, J. C., Cho, J. W.; 2001 Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase -3 activation *APMIS* **109** (10): 679-684

Lübeck, A.; 2005 Diplomarbeit: Molekularbiologische Analyse zur FbsA-vermittelten Fibrinogenbindung von *Streptococcus agalactiae* und zur transkriptionellen Regulation des *fbsA*-Gens.

Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S.E., Ausubel, F. M.; 1982 Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn 5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149 (1):114-122

**Miller A., Virginia L., Mekalanos, M., John, J.; 1988** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR. J. Microbiol.* **170** (6): 2575 – 2583

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.; 1992 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 24: 17-27

Murray, M. G., Thompson, W. F.; 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA . *Nucleic Acids Res.* 8 (19): 4321 - 4325

Niemann, H. H., Schubert, W. D., Heinz, D.W.; 2004 Adhesins and Invasins of Pathogenic Bacteria: A Structural View. Microbes and Infection 6 (1): 101-112

**Obana, Y.; 1986** Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: Analysis of experimental infection in mice. *Microbiol. Immunol.* **30** (7): 645-657

**Ofek, I., Hasty, D. L., Doyle, R. J.; 2003** Adhesins As Bacterial Cell Surface Structures: General Concepts Of Structure, Biogenesis and Regulation in Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues, *ASM Press* **4:** 63 - 97

**O`Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., v. Phibbs, Jr. P., V., Kolter, R.; 2000** The Global Carbon Metabolism Regulator Crc Is a Component of a Signal Transduction Pathway Required for Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa: J. Bacteriology* **192** (2): 425-431

**Perry, M. B., Whitfield, C.; 1998** Structural analysis of cell surface polysaccharides from Gram - negative bacteria. Methods in Micobiology - Bacterial pathogenesis, *Williams, P. and Ketley, J. (eds.), Academic Press, London,* **27:** 259–275

Ploy, M. C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T.; 2000 Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron *Antimicrob*. *Agents Chemother*. 44 (10): 2684-2688

Poh, C. L., Loh, G. K.; 1985 Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter* calcoaceticus Med. Microbiol. Immunol. 174 (1): 29-33

Potera, C.; 1999 Forging a link between biofilms and disease. Science 283, 1837-1839

**Prashanth, K., Badrinath, S.; 2006** Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. *Indian J. Med. Microbiol.* **24** (1): 39-44 Pratt, L. A. and Kolter, R. 1998 Genetic analysis of *Escherichia. coli* biofilm formation: rules of flagella, motility chemotaxis and type 1 pili. Mol. Microbiol. **30**: 285-293

**Reinscheid D. J.; 2004** The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect. Immun.* **72:** 6197 – 6205

**Reinscheid, D., Gottschalk, B., Schubert, A., Eikmanns, B. J., Chatwal, G.S.; 2001** Identification and Molecular Analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of Group B Streptococcus. J. Bact. **183** (4): 1175 – 1183

**Rubens, C., Smith, S., Hulse, M., Chi, E.Y., van Belle, G.; 1992** Respiratory Epithelial Cell Invasion by Group B *Streptococci. Infect. Immun.* **60** (12): 5157 – 5163

Ruiz, M., Bello, H., Sepulveda, M., Dominguez, M., Martinez, M. A., Pinto, M. E., Gonzalez, G., Mella, S., Zemelmann, R.; 1998 Adherence of *Acinetobacter baumannii* to rat tracheal tissue. *Rev. Med. Chil.* 126 (10): 1183-1188

Sahly, H., Podschun, R., Oelschlaeger, T. A., Greiwe, M., Parolis, H., Hasty, D., Kekow, J., Ullmann, U., Ofek, I., Sela, S.; 2000 Capsule Impedes Adhesion to and Invasion of Epithelial Cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68** (12): 6744-6749

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.; 1988 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

Salyers, A., Whitt, D.; 2002 Bacterial Pathogenesis - A Molecular Approach. Second Edition; *ASM Press* Washington

Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.; 2001 Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor; NY

Schembri, M. A., Sokurenko, E. V., Klemm, P.; 2000 Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect. Immun.* 68 (5): 2638-2646

Schembri, M. A., Dalsgaard, D., Klemm, P.; 2004 Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins. *J. Bacteriol.* 186 (5): 1249-1257

Schönbeck, C., Björck, L., Kronvall, G.; 1981 Receptors for fibrinogen and aggregated beta 2-microglobulin detected in strains of group B *streptococci*. *Infect. Immun.* **31** (3): 856-861

Schubert, A., Zakikhany, K., Pietrocola, G., Meinke, A., Speziale, P., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D. J.; 2004 The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect. Immun.* 72 (11): 6197 – 6205

Schubert, A., Zakikhany, K., Pietrocola, G., Meinke, A., Speziale, P., Eikmanns, B. J., Tamura, G. S. and Rubens, C. E.; 1995 Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol. Microbiol* 15 (3): 581-589

Schubert, A., Zakikhany, K., Schreiner, M., Frank, R., Spellerberg, B., Eikmanns, B.J., Reinscheid, D.J.; 2002 A fibrinogen receptor from group B *streptococcus* interacts with fibrinogen by repititive units with novel ligand binding sites. *Mol. Microbiol* **46** (2): 557 – 569

Seifert, H., Strate, A., Pulverer, G.; 1995 Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 74 (6): 340-349

Sepulveda, M., Ruiz, M., Bello, H., Dominguez, M., Martinez, M. A., Pinto, M. E., Gonzalez, G., Mella, S., Zemelmann, R.; 1998 Adherence of *Acinetobacter baumannii* to rat bladder tissue. *Microbios.* 95 (380): 45-53

Silhavy, T. J., Berman, M. L., Enquist, L. W.; 1984 Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Pr

Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O. Welsh, M. J., Greenberg, E. P.; 2002: Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407: 762-764

Smith, M. G., Des Etages, S. G., Snyder, M.; 2004 Microbial synergy via an ethanoltriggered pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24 (9): 3874 – 3884

Smith, M. G., Gianoulis, T. A., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J., Ornston, L. N., Gerstein, M., Snyder, M.; 2007 New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* 21 (5): 601-614

Soto, G. E., Hultgren, S., J.; 1999 Bacterial Adhesins: comon themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181 (4): 1059-1071

Southern E. M.; 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517

Spellerberg, B., E., Rozdzinski, S., Martin, J., Weber-Heynemann, N., Schnitzler, R.,
Lütticken, R., Podbielski, A.; 1999 Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.* 67 (2): 871-878

Strom, M. S., Lory, S.; 1993 Structure-Function And Biogenesis Of The Type IV Pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 565-596

Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., Actis, L. A.; 2003 Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149** (Pt 12): 3473-3484

Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., McQueary, C., Actis, L.A.; 2007 *Acinetobacter* virulence and pathogenicity *Acinetobacter* Molecular Biology, Ed. Ulrike Gerischer Horizon Scientific press

**Towbin H., Staehelin, T., Gordon, J.; 1979** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76:** 4350-4355

Towner, K., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C. A.; 1991 The Biology of *Acinetobacter*. *Plenum Press*, New and London

Urban & Fischer 2003 Roche Lexikon Medizin 5. Aufl. Jena

**Vaneechoutte, M., De Baere, T.; 2007:** 16S rRNA gene sequence based taxonomy of the genus *Acinetobacter. Acinetobacter* Molecular Biology, Ed. Ulrike Gerischer Horizon Scientific press

**Vidal R., Dominguez, M., Urrutia, H., Bello, H., Garcia, A., Gonzalez, G., Zemelman, R.; 1996** Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii. Microbios.* **86 (346):** 49 – 58

Wall, D., Kaiser, D.; 1999 Type IV pili and cell motility. Mol. Microbiol. 32 (1): 1-10

# VII. Anhang

# 1. Material und Chemikalien

### 1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind nachfolgend alphabetisch aufgelistet:

Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlruhe
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Inc.;Eggenstein
Ammoniumsulfat	Merck AG; Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck AG; Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Bacto - Agar	Difco Laboratories; Detroit, USA
Bacto - Hefeextrakt	Difco Laboratories; Detroit, USA
Bacto - Trypton	Difco Laboratories; Detroit, USA
Blocking-Reagenz	Boehringer Mannheim GmbH; Mannheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fluka-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck AG; Darmstadt

Chloroform	Merck AG; Darmstadt
Coomassie-Brilliantblau G250	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
CSPD <sup>®</sup> - Lösung	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
(Chemilumineszenz - Substrat)	
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
<b>D</b> igoxigenin - 11 - dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck AG, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dodecyl-ß-D-maltosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisensulfat	Fluka Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisessig	Merck AG; Darmstadt
EndoH	Biolabs, New England
Ethanol abs., unvergällt	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ethanol abs., vergällt	Merck Eurolab GmbH
Ethidiumbromid	Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fibrinogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

Fluoresceinisothiocyanat

122

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

	6
Foetal Calf Serum (FCS)	Gibco BRL Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Formaldehyd	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glucose	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glycin	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glycerin (99 %, wasserfrei)	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Größenstandards	
- 1 kb-DNA-Ladder	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
- Proteinmarker	Fermentas GmbH; St Leon-Rot
Lambda-DNA	Fermentas GmbH; St Leon-Rot
Isoamylalkohol (IAA)	Merck AG; Darmstadt
Isopropanol	Merck AG; Darmstadt
Imipenem	Apotheke, Klinikum Ulm
Kaliumacetat	Merck AG; Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Kaliumhydrogencarbonat	Merck AG; Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
Kanamyzin	Merck AG, Darmstadt

	7 minung
Kongorot	Merck AG; Darmstadt
Kristallviolett	Merck AG; Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck AG; Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
MEM-Medium	Gibco BRL Life Technologies, Inc., Eggenstein
Methanol	Merck AG; Darmstadt
Meronem	Astra Zeneca GmbH, Wedel
Natriumacetat	Merck AG; Darmstadt
Natriumbicarbonat	Gibco BRL Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Natriumcarbonat	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Natriumchlorid	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat - Dihydrat	Merck AG; Darmstadt
Natriumhydroxidplätzchen	Merck AG; Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Gibco BRL Life Technologies, Inc.; Eggenstein

	Anhang
Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Non-Essential-Aminoacids (NEAA)	Gibco BRL Life Technologies, Inc.; Eggenstein
<b>O</b> ligonukleotid-Primer	Biomers GmbH, Ulm
Oligodesoxynukleotide	MWG Biotech AG, Ebersberg
Phenol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
<b>R</b> PMI-Medium	Gibco BRL Life Technologies, Inc., Eggenstein
Saccharose	
Säurefuchsin Rubin S	Merck AG, Darmstadt
Salzsäure (32 % und 37 %)	Merck AG; Darmstadt
Schwefelsäure 37 %	Merck AG; Darmstadt
Silbernitrat	Merck AG; Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Succinat	Merck AG, Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetrazyklin	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
3,3', 5, 5'-Tetra-Methylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

Todd Hewitt Broth (THB)	Oxoid; Basingstoke
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Tris-Base	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Triton	Fluka-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Trypsin/EDTA	Gibco BRL Life Technologies, Inc.; Eggenstein
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tween 20	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen

### 1.2 Geräte und Materialien

Alle in dieser Arbeit benutzten Geräte und Materialien sind nachfolgend alphabetisch geordnet aufgeführt:

Agarose - Gelelektrophorese - Kammer	Gibco BRL Life Technologies, Inc; Eggenstein
(Horizon <sup>TM</sup> 11.14 und Modell H5)	
Autoklav	H + P Labortechnik GmbH
Autoklav	ZIRBUS
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
$(37 \text{ C}, 5\% \text{ CO}_{2}; \text{Zelikultur})$	
Cellophan-Papier	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Einmalspritzen, 20 ml	Ersta, Røgby
Elektrophoresis Power Supply EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Elektroporationsgerät Gene-Pulser II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Falcon Multiwell Zellkulturplatten	Nunc GmbH & Co. KG
Fotodokumentationsanlage	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
(Gelprint 2000i)	

French Press	SLM Instruments, Inc.; New York, USA
Geltrocknungsrahmen (24x24 cm) Glasperlen (0,2 mm)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heizblock	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg (Thermostat 5320, Thermomixer compact)
Hybridisierungsofen Biometra OV2	Biometra
Hyperfilm ECL (18 x 24 cm )	Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Inkubationsschüttler: - Certomat MO -G 24 environmental incubator shaker	B. Braun Biotech International New Brunswick Scientific Inc.; USA
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten	Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
- Einmalküvetten	Ratiolab
- Elektroporationsküvetten	EQUIBIO
Microcon 100-Mikrokonzentratoren	Amicon GmbH, Milipore; Eschborn
Mikroskop	Olympus; Japan

Mikrowellengerät Micromat 15	AEG Nürnberg
Mullbinde	Apotheke
Multiwell Maxisorp-Platten	Nunc GmbH & Co. KG
Multiwell Falcon 3911 Microtest III	Becton-Dickinson GmbH
Nylonmembran (positiv geladen)	Boehringer, Appligene oncor
PCR - Mastercycler 5330	Eppendorf
PCR Primus Thermocycler	MWG Biotech AG, Ebersberg
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
pH - Meter (WTW pH 521)	Wissenschaftliche-Techn. Werkstätten; Weilheim
Photometer Lambda	Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH, Überlingen
Photometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Pipetten	
- Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Labor Schubert und Weiss GmbH, München
Rasterelektronenmikroskop	Carl Zeiss GmbH; Berlin
Reaktionsgefäße	
- 1,5 ml	Eppendorf
- 2 ml	Eppendorf
Rühr - und Heizplatte (IKAMAG RCT)	IKA <sup>®</sup> -Labortechnik; Staufen

New Brunswick Scientific Co, Inc; Edison
Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Heraeus Instruments GmbH; Osterode
Nunc, Wiesbaden
Liebherr Ochsenhausen
Haereus Instruments GmbH; Fellbach
Amersham Life Science
Bachhofer; Reutlingen
Vacuubrand GmbH und Co; Wertheim
Heidolph

## Waagen

- Sartorius BP8100	Sartorius AG; Göttingen
- Mettler AE163	Mettler
Wasserbad	Köttermann
24-Well-Platten	Labor Schubert und Weiss GmbH, München
Whatmanpapier	Whatman International Ltd. Maidstone, England
Zellkulturflaschen (Falcon <sup>®</sup> )	Becton Dickinson Labware Europe; Le Pont de Chaix, France
Zellkulturflaschen	Labor Schubert und Weiss GmbH, München
Zentrifugen	
- Biofuge A (Tischzentrifuge)	Heraeus Christ
- Centrifuge 5804 R	Eppendorf
- HERMLE ZK 401	Eppendorf
- Varifuge 3.OR	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach

# 2. Abkürzungen

A. baumannii	Acinetobacter baumannii
A. baylyi ADP1	Acinetobacter baylyi Stamm ADP1
abs.	absolut, 100%
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Вр	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
СТАВ	Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid
ddNTP	Didesoxynukleosid-5`-triphosphat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5`-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g GBS	Gramm Gruppe B Streptokokken
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser

k	kilo (1 x 10 <sup>3</sup> )
Kb	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilodalton
1	Liter
mA	Milliampere
mM	Millimolar (mol/l)
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
mind.	mindestens
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
Ν	Normal (Anzahl Mole Äquivalentteilchen pro Liter)
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ori	origin, Replikationsursprung
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBST	Phosphat gepufferte Saline mit Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
P. fluorescens	Pseudomonas fluorescens
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
pН	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S. agalactiae	Streptococcus agalactiae
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Sol	Solution
SW	Sequenz-Wiederholung(en)
Т	Thymin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
THB	Todd Hewitt Broth
THY	THB mit Hefe
ТМВ	3,3', 5, 5'-Tetra-Methylbenzidine
TY	Anzuchtmedium für E. coli aus Trypton, Hefe und NaCl
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
U	Enzymeinheit (1 U = Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt)
u.a.	unter anderem
μg	mikrogramm
usw.	und so weiter
ÜN-Kultur	über Nacht-Kultur
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
W	Watt
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

ID	Gefrier Nr	Sammlung	Labor	Laufende Nr	Name	Krankenhaus	Station	Material	Spezies Pheno	Biot yp	Ardra	Spezies Geno	PFGEtype	Outbreak
43	29 I	Pelzer		033	Ersöz Sezai			Leiste	A. radioresistens		Aci 12			
46	32 I	Pelzer		036	Zimmermann Margarethe			Ohr	A. radioresistens		Aci 12			
211	III-30	Aci-90/91	ST	15220	BLASS	М	215 MED	ВК	A. haemolyticus					
217	I-19	Aci-90/91	U	10912	MÜNNINGHOF F	М	NOTAUFNAH ME	URIN	A. haemolyticus					
254	IIII-42	Aci-90/91	ST	22459	KANTE	UNI	16 B	ВК	A. junii					
255	III-55	Aci-90/91	V	12030	KLEIN	UNI	ONKO- KINDER	RACHENABSTRICH	A. junii					
263	II-07	Aci-90/91	ST	8818	WIENAND	UNI	ONKO- KINDER	ВК	A. junii					
269	III-75	Aci-90/91	ST	17764 II	SCHIFFERS	М	173	LIQUOR	A. genospecies 03					
271	II-33	Aci-90/91	ST	11479	SCHMITT	М	464	ВК	A. lwoffii					
276	IIII-29	Aci-90/91	ST	22101	SCHULZ	М	213	ВК	A. lwoffii					
283	IIII-41	Aci-90/91	ST	22455	GESSNER	UNI	16 B	ВК	A. lwoffii					
342	IIII-55	Aci-90/91	ST	23636	OHLERT	М	831	ВК	A. genospecies 03					
345	IIII-01	Aci-90/91	ST	19093	RENOWSKI	М	521	ВК	A. genospecies 03					
583		Aci-92/94	St	1650 '92				blood	A. baumannii	3		2	2-III	Ja
594		Type-strains		ATCC 19606					A. baumannii			2	2-VII	
639	II-58	Aci-90/91	М	3317	SCHMOECKEL	UNI	10 A KINDER	RACHENABSTRICH	A. baumannii	6			2-XII	Nein
641	IIII-46	Aci-90/91	М	7360	KRAUS	HEILIGGEIST	INTENSIV	TS	A. baumannii	9			2-XXV	Nein
642	VII-11	Aci-90/91	М	13546	SCHMOECKEL	UNI	10 A KINDER	TS	A. baumannii	6			2-XIV	Nein
643	I-02	Aci-90/91	ST	284	KRAFT	KKH RIEHL	В 2	ВК	A. baumannii	6			2-VI	Ja
645	I-76	Aci-90/91	ST	7961	HEISTERBACH	М	166	ВК	A. baumannii	9			13-I	Ja

3. Tabellarische Übersicht über die Stammsammlung von Herrn Prof. H. Seifert
| ID       | Gefrier Nr | Sammlung         | Labor | Laufende Nr | Name       | Krankenhaus     | Station | Material                                 | Spezies Pheno     | Biot<br>yp | Ardra        | Spezies<br>Geno | PFGEtype | Outbreak |
|----------|------------|------------------|-------|-------------|------------|-----------------|---------|--|-------------------|------------|--------------|-----------------|----------|----------|
| 648      | II-39      | Aci-90/91        | ST    | 12084       | OEZKILIC   | М               | 133     | ВК                                       | A. baumannii      | 9          |              |                 | 2-XXI    | Nein     |
| 651      | III-42     | Aci-90/91        | ST    | 15598       | ROGGENBUCH | М               | 192     | ZVK                                      | A. baumannii      | 2          |              |                 | 2-II     | Ja       |
| 653      | III-63     | Aci-90/91        | ST    | 17093       | KOHLMANN   | М               | 166     | ВК                                       | A. baumannii      | 9          |              |                 | 2-XV     | Ja       |
| 659      | IIII-14    | Aci-90/91        | ST    | 20820       | UNGLAUB    | М               | 192     | ВК                                       | A. baumannii      | 6          |              |                 | 2-IV     | Ja       |
| 661      | I-01       | Aci-90/91        | U     | 1901        | MEYER      | UNI             | 30/7    | URIN                                     | A. baumannii      | 1          |              |                 | 2-I      | Ja       |
| 663      | I-12       | Aci-90/91        | U     | 10247       | SCHMIDT    | UNI             | REHA I  | URIN                                     | A. baumannii      | 6          |              |                 | 2-V      | Ja       |
| 666      | II-09      | Aci-90/91        | v     | 4316        | PARVIN     | EDUARDUS        |         | WA                                       | A. baumannii      | 6          |              |                 | 2-XI     | Nein     |
| 673      | I-48       | Aci-90/91        | w     | 8832        | HOFFMANN   | UNI             | 1 B     | WA LI OS                                 | A. baumannii      | 6          |              |                 | 2-X      | Nein     |
| 684      | II-21      | Aci-92           | St    | 11387       | Comtuerk   | Augustinerinnen | Maria   | ВК                                       | A. radioresistens |            |              |                 |          |          |
| 964      | I-64       | Boden-<br>Wasser |       | A095a       |            |                 |         | am Teich,<br>Niedercollenbach,<br>Kûrten | A. calcoaceticus  |            | 1            |                 |          |          |
| 968      | II-66      | Boden-<br>Wasser |       | A105a       |            |                 |         | Decksteiner,<br>Gerstenfeld              | A. calcoaceticus  |            | 1            |                 |          |          |
| 970      | II-68      | Boden-<br>Wasser |       | A113a       |            |                 |         | Stommeln,<br>Kartoffelfeld               | A. calcoaceticus  |            | 1            |                 |          |          |
| 991      | I-28       | Boden-<br>Wasser |       | A054-0a     |            |                 |         | Rurwasser<br>flussabwärts                | A. haemolyticus   |            | 4 or<br>14TU |                 |          |          |
| 1140     |            | Type-strains     |       | 3/25        |            |                 |         |  | A. genospecies 03 |            |              | 3               |          |          |
| Referenz |            |                  |       |             |            |                 |         |  |                   |            |              |                 |          |          |
|          |            |                  |       | 12/76       |            |                 |         |  | Aci sp.           |            |              |                 |          |          |
|          |            |                  |       | 42          |            |                 |         |  | Aci junii         |            |              |                 |          |          |
|          |            |                  |       | 6/46        |            |                 |         |  | Aci sp.           |            |              |                 |          |          |
|          |            |                  |       | 9/62        |            |                 |         |  | Aci sp.           |            |              |                 |          |          |
|          |            |                  |       | 10/69       |            |                 |         |  | Aci sp.           |            |              |                 |          |          |

3. Tabellarische Übersicht über die Stammsammlung von Herrn Prof. H. Seifert

ID	Gefrier Nr	Sammlung	Labor	Laufende Nr	Name	Krankenhaus	Station	Material	Spezies Pheno	Biot yp	Ardra	Spezies Geno	PFGEtype	Outbreak
				11/73					Aci sp.					
				60					A. lwoffii					
				1					A. calcoaceticus					
				St 2312`92					Geno 13					
				32					A. haemolyticus					
				48					A. johnsonnii					

### 3. Tabellarische Übersicht über die Stammsammlung von Herrn Prof. H. Seifert

BK = Blutkultur

TS = Trachealsekret

ZVK = Zentraler Venenkatheter

#### Anhang

Gemessenes Absorptionsspektrum für Kristallviolett



## Tagungsbeiträge

Lübeck A. und Gerischer U. (2006): Analysis of adhesion of *Acinetobacter baumannii* to human cells, Biospektrum, Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2006, Poster PN06

Lübeck A. und Gerischer U. (2006): Analysis of adhesion of *Acinetobacter baumannii* to human cells, 7th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, Barcelona, Poster P19

# Lebenslauf

# persönliche Daten

Name:	Lübeck, Anke
Geburtstag / -ort:	30.08.1973 / Heessen (Westfalen)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

### Hochschulstudium

seit 03/2005	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm
	unter Anleitung von Frau HD. Dr. Ulrike Gerischer
	Thema: "Analyse der Interaktion von Acinetobacter baumannii
	mit humanen epithelialen Zellen."
03/2005	Abschluss als Diplom-Biologin
05/2004 - 01/2005	experimentelle Diplomarbeit
	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm
	Thema: "Molekularbiologische Analyse zur FbsA-vermittelten
	Fibrinogenbindung von Streptococcus agalactiae und zur
	transkriptionellen Regulation des fbsA-Gens."
09/2002 - 04/2004	Hauptstudium
	Schwerpunkte: Mikrobiologie und Molekularbiologie
00 /2002	Vordinlam in Dialogia
0972002	
10/2000 - 03/2005	Studium der Biologie: Universität Ulm

# Berufsausbildung / Berufserfahrung

09/1997 - 09/2000	Tätigkeit als MTA-L beim DRK-Blutspendedienst Baden-
	Württemberg in Ulm
	Abteilung für Blutgruppenserologie und Immunhämatologie
09/1997	Abschluss der Berufsausbildung zur staatlich geprüften MTA-L
09/1994 - 09/1997	Ausbildung zur Medizinisch - Technischen
	Laboratoriumsassistentin (MTA-L) am Klinikum Ulm,
	Schulzentrum für nicht-ärztliche medizinische Berufe

# Schulbildung

06/1993	Abitur
08/1987 - 06/1993	Johann-Wolfgang-Goethe-Gymnasium in Germersheim
08/1984 - 06/1987	St. Irmengard-Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen
07/1983 - 06/1984	Grundschule in Mittenwald
08/1980 - 06/1983	Grundschule in Celle

### Danksagung

Frau HD. Dr. Ulrike Gerischer möchte ich ganz herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken, meine Doktorarbeit unter ihrer Obhut anzufertigen. Sie ermöglichte mir die Bearbeitung eines sehr interessanten Themas und gewährte mir große Selbständigkeit bei der Verwirklichung meiner Ideen.

Dem Korrekturlesen dieser Arbeit und der Übernahme des Referats gilt ein besonderer Dank.

Auch Prof. Dr. Bernhard Eikmanns danke ich an dieser Stelle für die Übernahme des Koreferats, aber auch für seine Unterstützung und das offene Ohr in Bezug auf alle meine Fragen, die während des gesamten Studiums und der Promotion aufgetreten sind.

Herrn Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid danke ich für seine immer gewährte Unterstützung und die ständige Hilfsbereitschaft, die er mir zukommen ließ.

Ganz besonders möchte ich mich zunächst bei meinen Laborkollegen aus dem "Kellerlabor" für ihre Unterstützung und permanente Diskussionsbereitschaft bedanken: trotz der räumlichen Abgeschiedenheit vom Hauptkern der Abteilung haben mir Eure Kameradschaft und Euer ausgeprägter Teamgeist viel Spaß bei der Arbeit bereitet und für ein ausgesprochen gutes Arbeitsklima gesorgt. Betina Schrade und Dominik Schilling sei ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

Herzlichen Dank auch an das 352-Labor in der Abteilung, bzw. an das Braunschweiger Labor unter der Leitung von Prof. Dr. Petra Dersch, die mich mit verschiedenen Materialien und wertvollen Tipps versorgt haben, welche für die Realisierung vieler Experimente notwendig waren.

Mit Eurer Motivation und Eurem Interesse an meiner Dissertation konnte ich die Berg- und Talfahrt sehr gut meistern, welche die mühsame und oft recht langwierige Etablierungsarbeit mit sich bringt.

Allgemein möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Mitgliedern der Abteilung für den herzlichen Umgangston, das tolle Arbeitsklima und die vielen schönen Stunden – auch außerhalb des Labors – bedanken!

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Jörg, meiner Familie und meinen Freunden, die mir privat wertvoller Ausgleich und herzliche Unterstützung waren.

# Unterstützung universitärer und nicht-universitärer Einrichtungen

## Klinikum der Universität zu Köln, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

### Prof. Dr. D. H. Seifert

Bereitstellung einer Sammlung von klinischen Isolaten von A. baumannii

## Universität Ulm, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Leitung von Prof. Dr. S. Stenger

Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der sterilen Zellkultur, Benutzung des Cytoflour

### Universität Ulm, Sektion Elektronenmikroskopie unter Leitung von Prof. Dr. P. Walter

Probenaufbereitung, und Bedienung des Rasterelektronenmikroskops

## Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie Prof. Dr. P. Dersch

Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der ß<sub>1</sub>-Integrin-Antikörper

### Firma Astra Zeneca, Wedel, Deutschland; Dr. Rollwage

kostenfreie Bereitstellung von Meropenem

### Landesgraduiertenförderungskolleg

Bewilligung eines Promotionsstipendiums