

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Die Rolle periplasmatischer Chaperone für  
die Außenmembranprotein-Biogenese  
und Antibiotikaresistenz von MDR  
Acinetobacter baumannii**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Luib, Laura Marie**

**2026**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Schütz  
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Stubenrauch

Tag der Disputation: 15.06.2023

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	1
1.1.1 Charakteristika und Taxonomie	1
1.1.2 Epidemiologie und Klinische Relevanz	3
1.1.3 Antibiotika- und Umweltresistenz	4
1.1.4 Die Modell-Stämme AB5075 und AYE	8
1.2 Außenmembranprotein-Biogenese in Gram-negativen Bakterien	10
1.2.1 Transport von OMPs in das Periplasma	11
1.2.2 Die periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP	11
1.2.3 Die $\beta$ -barrel assembly (BAM) Maschinerie	13
1.2.4 Besonderheiten der OMP-Biogenese in <i>A. baumannii</i>	14
1.3 Vorgegangene Arbeiten und Erkenntnisse der Arbeitsgruppe	15
2 Fragestellung dieser Arbeit	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Bakterienstämme	20
3.1.2 Plasmide	21
3.1.3 Primer	22
3.1.4 Puffer und Lösungen	24
3.1.5 Reagenzien und Chemikalien	25
3.1.6 Verbrauchsmaterial	27
3.1.7 Kulturmedien für Bakterien	28
3.1.8 Kits	30
3.1.9 Technische Ausrüstung	30
3.1.10 Software und Programme	31

3.2	Mikro- und molekularbiologische Labormethoden _____	32
3.2.1	Kultivierung von Bakterien in flüssigen und auf festen Medien __	32
3.2.2	Isolation von Plasmid-DNA _____	32
3.2.3	Isolation von genomischer DNA _____	32
3.2.4	Kolonie-PCR und Agarose-Gelelektrophorese _____	33
3.2.5	Western Blots zur Expressionskontrolle von Proteinen _____	34
3.3	Spezifische Versuche mit AB5075 _____	36
3.3.1	Generierung eines Mutatorplasmids _____	36
3.3.2	Mutagenese von <i>Ab</i> _____	41
3.3.3	Generierung homogener Populationen opaker Zellen _____	44
3.3.4	Maneval-Färbung _____	45
3.3.5	Antibiotika-Suszeptibilitätstestung _____	45
3.3.6	Zytochrom C – Assay _____	47
3.3.7	Transkriptomanalyse durch RNA-Sequenzierung _____	48
4	Ergebnisse _____	52
4.1	Die Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von <i>Ab</i> AB5075 __	52
4.1.1	Antibiotikasuszeptibilitäts-Messungen durch Mikrobouillon-Dilution _____	52
4.1.2	Analyse möglicher Zusammenhänge der Expression von SurA und der Tobramycin-Resistenz von AB5075 _____	61
4.1.3	Suche nach Erklärungen für die Rolle von SurA für die Tobramycin- Resistenz von <i>Ab</i> AB5075 auf mRNA-Ebene _____	66
4.2	Generierung einer konditionellen $\Delta$ <i>surA</i> -Mutante in einem $\Delta$ <i>skp</i> $\Delta$ <i>degP</i> - Hintergrund _____	76
4.2.1	Titration des Induktors Arabinose für die Expression von SurA vom pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA Mutatorplasmid _____	80
4.2.2	Optimierung der Transformationsmethodik für <i>Ab</i> AB5075 ____	82
5	Diskussion _____	83
5.1	Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von <i>Ab</i> AB5075? ____	84
5.1.1	Reproduktion einer Resensitivierung der <i>Ab</i> AB5075 $\Delta$ <i>surA</i> -Mutante für Tobramycin _____	84

5.1.2	Überprüfung der Spezifität dieses Effektes für Tobramycin – Vergleich mit den strukturell nah verwandten Aminoglykosiden Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin	86
5.1.3	Mögliche Mechanismen einer Rolle von SurA für die Aminoglykosid-Resistenz von <i>Ab</i> AB5075	90
5.2	Weitere Suche nach Faktoren, die den Verlust von SurA, DegP und Skp in <i>Ab</i> kompensieren können	105
5.3	Ausblick	107
6	Zusammenfassung	109
7	Anhang	111
	Literaturverzeichnis	112
	Erklärung zum Eigenanteil	126
	Danksagung	127

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Schematischer Aufbau eines Western Blot-Sandwichs .....	35
<b>Abbildung 2</b> Plasmidkarte des pJM220-Vektorplasmids .....	37
<b>Abbildung 3</b> Zytochrom C – Bindung von WT und $\Delta surA$ -Mutante der <i>Ab</i> - Stämme AB5075 und AYE .....	63
<b>Abbildung 4</b> Zytochrom C – Bindung aller getesteten Mutanten im Vergleich zum jeweiligen WT für die <i>Ab</i> -Stämme AB5075 und AYE .....	65
<b>Abbildung 5</b> Expressionslevel von <i>surA</i> in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von <i>Ab</i> AB5075 WT und $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin .....	70
<b>Abbildung 6</b> Expressionslevel von ABUW_RS15520 und ABUW_RS15525 in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von <i>Ab</i> AB5075 WT und $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin.....	71
<b>Abbildung 7</b> Expressionslevel von ABUW_RS00050, ABUW_RS18055 und ABUW_RS12810 in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.- Analyse von <i>Ab</i> AB5075 WT und $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin .....	72
<b>Abbildung 8</b> Expressionslevel von ABUW_RS11245 und ABUW_RS11250 in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von <i>Ab</i> AB5075 WT und $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin.....	73
<b>Abbildung 9</b> Expressionslevel von <i>carO</i> in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von <i>Ab</i> AB5075 WT und $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin .....	74
<b>Abbildung 10</b> Agarose-Gel nach einer Kolonie-PCR zur Überprüfung der Insertion der Hygromycin-Kassette in das pJM220-Mutatorplasmid .....	77
<b>Abbildung 11</b> Western Blot zur Überprüfung der Expression von der induzierbaren <i>Ab-surA</i> -Kassette des pJM220-Mutatorplasmids .....	78
<b>Abbildung 12</b> Plasmidkarte des fertigen Konstruktes des pJM220- Mutatorplasmids .....	79
<b>Abbildung 13</b> Titration des Induktors für die Expression von SurA des pJM220- Mutatorplasmids .....	81

<b>Abbildung 14</b> Überprüfung der Membranintegrität und Efflux-Aktivität von <i>Ab</i> AB5075 WT und verschiedenen Deletionsmutanten durch einen NPN-Assay .	94
<b>Abbildung 15</b> Auszug aus der Genomsequenz von <i>Ab</i> AB5075 um die Gene ABUW_2312 ( <i>htrE</i> ) und ABUW_2313 ( <i>fimA_2</i> ) .....	99
<b>Abbildung 16</b> Auszug aus der Genomsequenz von <i>Ab</i> AB5075 um die Gene ABUW_3197 ( <i>metE</i> ) und ABUW_3198 .....	103
<b>Abbildung 17</b> OMP-Biogenese und das periplasmatische Chaperon-Netzwerk in Gram-negativen Bakterien und <i>Ab</i> AB5075 .....	105

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> MHK-Werte von <i>Ab</i> AB5075 Deletions-Mutanten im Vergleich zum WT .....	16
<b>Tabelle 2</b> Verwendete Bakterienstämme .....	20
<b>Tabelle 3</b> Verwendete Plasmide und ihre Herkunft .....	21
<b>Tabelle 4</b> Primer mit Verwendungszweck, Sequenz, Schmelztemperatur <sup>TM</sup> und Amplikon-Größe .....	22
<b>Tabelle 5</b> Puffer und Lösungen .....	24
<b>Tabelle 6</b> Reagenzien und Chemikalien .....	25
<b>Tabelle 7</b> Verbrauchsmaterialien .....	27
<b>Tabelle 8</b> Feste Medien zur Kultivierung von Bakterien .....	28
<b>Tabelle 9</b> Flüssige Medien zur Kultivierung von Bakterien .....	29
<b>Tabelle 10</b> Kommerzielle Kits .....	30
<b>Tabelle 11</b> Geräte .....	30
<b>Tabelle 12</b> Spezielle Software .....	31
<b>Tabelle 13</b> Kolonie-PCR – Reaktionsgemisch .....	33
<b>Tabelle 14</b> Kolonie-PCR – Programm .....	33
<b>Tabelle 15</b> KAPA-PCR – Reaktionsgemisch.....	38
<b>Tabelle 16</b> KAPA-PCR – Programm .....	38
<b>Tabelle 17</b> DNase-Verdau – Reaktionsgemisch .....	50
<b>Tabelle 18</b> MHK-Werte für AB5075 WT und AB5075 $\Delta$ <i>surA</i> -Deletionsmutante für unterschiedliche Antibiotika .....	53
<b>Tabelle 19</b> Übersicht strukturell nah verwandter Aminoglykosid-Antibiotika mit 4,6-disubstituiertem Deoxystreptamin-Ring .....	54
<b>Tabelle 20</b> MHK-Werte für AYE WT und AYE $\Delta$ <i>surA</i> -Deletionsmutante für unterschiedliche Antibiotika .....	57
<b>Tabelle 21</b> MHK-Werte der klinischen <i>Ab</i> -Isolate für unterschiedliche Antibiotika .....	59
<b>Tabelle 22</b> Bekannte und potentiell die Aminoglykosid-Resistenz beeinflussende Gene von <i>Ab</i> AB5075 .....	66

**Tabelle 23** Übersicht über Gene mit signifikant veränderter Expression in einer vergleichenden Transkriptom-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante

..... 69

**Tabelle 24** Zusammenfassung der analysierten Auswirkungen einer Deletion von *surA* in *Ab* AB5075 und AYE .....

## **Abkürzungsverzeichnis**

*Ab Acinetobacter baumannii*

ad. auffüllen auf

AME Aminoglykosid-modifizierendes Enzym

ATCC American Type Culture Collection

AZT 3'-Azido-2'-3'-dideoxythymidin

BAM  $\beta$ -barrel-Assembly Machinery

bp Basenpaare

CC Clonal Complex

CCCP Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon

ddH<sub>2</sub>O doppelt destilliertes Wasser

(g)DNA (genomische) Desoxyribonucleinsäure

E-Test Epsilometerest

*Ec Escherichia coli*

et al. et alii (und andere)

fwd forward

IM Innenmembran

IPTG Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

IS Insertionssequenz

kDa Kilodalton

LB lysogeny broth

LPS Lipopolysaccharid

MDR multidrug resistant (multiresistent)

MHK minimale Hemmkonzentration

MRGN Multiresistente Gram-negative Keime

*Nm Neisseria meningitidis*

NPN 1-N-phenylnaphthylamin

OD optische Dichte

OM outer membrane (Außenmembran)

OMP outer membrane protein (Außenmembranprotein)

*Pa Pseudomonas aeruginosa*

PBS Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

(RT-)PCR (Real time-) Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PMB Polymyxin B

PPIase Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase

PV Phasenvariation

QS Quorum sensing

rpm revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

RI Resistenzinsel

RT Raumtemperatur

rev reverse

Skp seventeen-kilodalton protein

SurA survival factor A

T<sub>m</sub> Schmelztemperatur

ÜNK Übernachtkultur

VE-Wasser Vollentsalztes Wasser

WHO World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

WT Wildtyp

XDR extended drug resistant (erweitert multiresistent)

*Ye Yersinia enterocolitica*

# 1 Einleitung

## 1.1 *Acinetobacter baumannii*

Von der WHO als Erreger höchster Priorität eingestuft, wird *Acinetobacter baumannii* zu den sechs wichtigsten multiresistenten Pathogenen im Krankenhaussetting weltweit, der sogenannten ESKAPE-Gruppe (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter species*) gezählt (Boucher et al., 2009; Rice, 2008). Er kann Verursacher einer großen Bandbreite an Infektionen sein, allen voran von Ventilator-assoziiertes Pneumonie (VAP) und Bakteriämie (Antunes et al., 2014). Aufgrund zahlreicher intrinsischer und erworbener Virulenzfaktoren ist eine adäquate Therapie jedoch oft eine medizinische Herausforderung und Mortalitätsraten von durch diesen Keim verursachten Erkrankungen reichen durchschnittlich von 8 bis hin zu 35 % (Falagas & Rafailidis, 2007).

Obwohl *Ab* also in erster Linie ein opportunistischer Keim ist, stellt sein Potenzial, ernsthafte und mitunter letale Erkrankungen auszulösen und die zunehmende Ausbreitung multiresistenter Stämme, eine Bedrohung für das Gesundheitswesen dar, was ihn in den letzten Jahren und Jahrzehnten zunehmend in den Fokus von Wissenschaft und Forschung gerückt hat.

### 1.1.1 *Charakteristika und Taxonomie*

Der Klasse der Gamma-Proteobakterien und darunter der Familie der Moraxellaceae zugerechnet, handelt es sich bei *Acinetobacter baumannii* um ein Gram-negatives, Katalase positives, Oxidase negatives, nicht-fermentierendes und nicht im klassischen Sinne motiles, da unbegeißeltes, strikt aerobes Coccobacillum (Wareth et al., 2019). Als wenig anspruchsvolles Bakterium ist es ihm möglich, auch unter besonderen Bedingungen wie z.B. auf eisenarmen Medien zu wachsen und Phasen der Austrocknung, ohne Sporenbildung, zu überstehen (Antunes et al., 2014). Auch auf unbelebten Oberflächen kann *Ab* folglich lange persistieren (Jawad et al., 1998) - eine Eigenschaft, die in Kombination mit seiner ausgeprägten Fähigkeit zur Biofilmbildung (McConnell et

al., 2013) vor allem auf Intensivstationen folgenschwere Auswirkungen haben kann (Dijkshoorn et al., 2007).

Dort und im erweiterten Milieu des Krankenhauses, ist *Ab* vornehmlich aufzufinden, doch auch außerklinisches Vorkommen ist bekannt (Eveillard et al., 2013). So konnte *Ab* ebenfalls aus Erdböden, Wasser, Tieren und Lebensmitteln, darunter vor allem Milch (Cho et al., 2018), isoliert werden. Fraglich bleibt jedoch, ob es sich hierbei um tatsächliche Alternativreservoirs in der Natur und Umwelt handelt oder diese vornehmlich als Kontamination, bzw. Sekundärreservoirs aus dem primären Krankenhausreservoir zu bewerten sind (Antunes et al., 2014).

Genauso fraglich und einigen Änderungen unterworfen war lange Zeit die genaue taxonomische Zuordnung des Bakteriums (Bergogne-Berezin & Towner, 1996). Im Jahre 1986 von Bouvet und Grimont (1986) erstmals formal bezeichnet, bildet *Ab* heute mit mindestens 32 weiteren bekannten Arten die Gattung der *Acinetobacter* (Nemec et al., 2004). Darunter kommt den Spezies der *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii* und *Ab* selbst die größte klinische Bedeutung zu (Visca et al., 2011). Sie werden zusammen mit dem klinisch weniger relevanten *Acinetobacter calcoaceticus* zu dem sogenannten *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* (ACB) – Komplex zusammengefasst (Gerner-Smidt et al., 1991). Aufgrund vieler überschneidender phänotypischer Eigenschaften, wird der ACB-Komplex weiter in vier DNA-Gruppen (1-3 und 13) unterteilt, worunter *Ab* die Gruppe 2 bildet (Gerner-Smidt, 1992).

Das Genom von *Ab* wurde erstmals 2007 sequenziert (Smith et al., 2007). Es zeigte sich, dass dieses aus einem relativ kleinen Kerngenom und einem großen akzessorischen Genom zusammensetzt ist – möglich durch ein offenes Pangenom innerhalb der *Acinetobacter*-Gattung (Imperi et al., 2011) - und einen GC-Gehalt von 39 bis 47 % aufweist (Peleg et al., 2008). Dieser Offenheit des Pangenomes kommt eine bedeutende Rolle hinsichtlich eines möglichen Genaustausches und damit einer Adaptation an vorliegende Umweltbedingungen zu (Medini et al., 2005). So kann *Ab* in bemerkenswerter Weise dynamisch auf Veränderungen seiner Umgebung reagieren und im Krankenhaus Virulenzdeterminanten weiterer Pathogene über horizontalen

Gentransfer erwerben (Imperi et al., 2011). Multiresistenzen sind dadurch charakteristisch für die als Clonal Complex 1-3 (CC1-3) bezeichneten drei, von insgesamt acht international bekannten, *Ab*-Stämme geworden, welche seit den 1970er Jahren Ursache für schwerwiegende Infektionen und Krankenhausausbrüche sind (Bergogne-Berezin & Towner, 1996).

### **1.1.2 Epidemiologie und Klinische Relevanz**

Insgesamt kann *Ab* für rund 0,7 bis 4,6 % aller nosokomialer Infektionen mit Gram-negativen Keimen verantwortlich gemacht werden (Lob et al., 2016).

Dabei sind vor allem bereits vorerkrankte oder immungeschwächte Patienten mit oft langen Krankenhausaufenthalten betroffen (Peleg et al., 2008). Eine solche nosokomiale Infektion mit *Ab* kann sich als Wund- oder Weichteilinfekt, Meningitis, Harnwegsinfekt, Bakteriämie bis hin zu einer Sepsis und im häufigsten Fall als Atemwegsinfekt in Form einer Pneumonie manifestieren (Dijkshoorn et al., 2007). Hauptrisikofaktoren sind dabei die Einnahme von Breitband-Antibiotika, kürzlich durchgeführte Operationen, die Einlage eines Katheters und, vor allem bei Patienten auf Intensivstationen, eine mechanische Beatmung (Pierre Edouard Fournier et al., 2006). Letztere kann eine Ventilatorassoziierte Pneumonie begünstigen, bzw. verursachen, die mit einer Mortalitätsrate von 46 bis 61 % einhergeht und sogar 84 % betragen kann, wenn sie von erweitert multiresistenten XDR-*Ab*-Stämmen ausgelöst wurde (Inchai et al., 2015).

Wie von Dexter et al. (2015) beschrieben, können Infektionen mit *Ab* ebenfalls außerhalb von Krankenhäusern, am häufigsten auch hier in Form von Pneumonien (community acquired pneumonia, CAP), auftreten. Dabei ist eine solche CAP häufig assoziiert mit fortgeschrittenem Alter, Alkoholismus, Diabetes mellitus, exzessivem Rauchen und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und vor allem in tropischen Regionen anzutreffen. Der Verlauf zeigt sich als äußerst fulminant, weshalb die Mortalitätsrate auch hier recht hoch bei 64 % anzusiedeln ist. Des Weiteren können durch Verletzungen von Personen in Notfallsituationen wie Naturdesastern, das Marmara Erdbeben 1999 in der Türkei beispielsweise, Kriegen wie solchen im Irak oder Afghanistan und weiteren

humanitären Katastrophen, die eine übliche Infektionskontrolle schwer bis unmöglich machen, Infektionen mit *Ab* ambulant entstehen (Joly-Guillou, 2005).

Interessanterweise zeigen über 40 % an gesunden Erwachsenen natürlicherweise und primär folgenlos eine Kolonisation mit *Ab*, als Teil des natürlichen Mikrobiomes der Haut, vor allem an feuchteren Stellen wie beispielsweise zwischen den Zehen (Abdi et al., 2020).

Auch Tiere können von Infektionen mit *Ab* betroffen sein, meist in Form von Wundinfektionen und Septikämien, wobei die Datenlage in der Veterinärmedizin hier im Vergleich zur Humanmedizin eher spärlich ist und Tiere als Reservoir für humane Infektionen nicht mit Gewissheit ausgeschlossen werden können (van der Kolk et al., 2019).

### **1.1.3 Antibiotika- und Umweltresistenz**

Dem aktuellen Regelwerk V 12.0 des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) zufolge, weist *Ab* eine intrinsische Resistenz gegen die folgenden Antibiotika auf: Ampicillin, Amoxicillin-Clavulansäure, Cefotaxim, Ceftriaxon, Aztreonam, Ertapenem, Trimethoprim und Fosfomycin. Darüber hinaus gegen sämtliche Tetracycline und Doxycyclin, so dass lediglich einige wenige wirksame antimikrobielle Substanzen, darunter Minocyclin, Tigecyclin, Colistin und zuweilen Ampicillin-Sulbactam, genannt werden können.

Diese hohe intrinsische Resistenz wird durch das Zusammenspiel einer Vielzahl an Resistenzmechanismen ermöglicht, mit welchen *Ab* natürlicherweise ausgestattet ist (Wareth et al., 2019). Dazu zählen  $\beta$ -Laktamasen, Aminoglykosid-modifizierende Enzyme, Efflux-Pumpen und die geringe Permeabilität der Außenmembran, beeinflusst durch ihre Zusammensetzung und das Vorhandensein spezieller  $\beta$ -barrel Proteine (Peleg et al., 2008).

Letztere weisen größtenteils nur sehr kleine Poren und eine geringe Aktivität auf (Zahn et al., 2016), weshalb die Permeabilität für spezifische Antibiotika bei *Ab* (verglichen mit *E. coli*) als etwa 100-fach niedriger gewertet wird (Sugawara & Nikaido, 2012). Das bekannteste solcher  $\beta$ -barrel Proteine in *Ab* ist das Außenmembranprotein OmpA<sub>AB</sub>, ein unspezifisches Porin, das trotz eines

Molekulargewichtes von 22 bis 36 kDa und einem Durchmesser von rund 2 nm eine derart geringe Permeationsrate aufweist, dass es als sogenanntes „slow porine“ bezeichnet wird (Sugawara & Nikaido, 2012). Homologe sind in *P. aeruginosa* als OprF bzw. in *E. coli* als OmpA bekannt (Sugawara et al., 2006).

Auch unter den  $\beta$ -Laktamasen ist ein prominentes Beispiel hervorzuheben: die Gruppe der Oxacillinasen, angeführt durch das Enzym OXA-51, welche als Klasse D  $\beta$ -Laktamasen Carbapeneme hydrolysieren und so maßgeblich zur problematischen Carbapenemresistenz von MDR-*Ab* beitragen (Da Silva & Domingues, 2016). Zwischen einer weiteren Oxacillinase, nämlich OXA-23, und verschiedenen zuvor bereits beschriebenen  $\beta$ -barrel-Porinen der Außenmembran, konnte von Wu et al. (2016) eine direkte Interaktion nachgewiesen werden. Dabei interagiert das hydrolysierende Enzym mit einem Porin, z.B. OmpA<sub>AB</sub>. Durch die räumliche Nähe kann vermutlich der enzymatische Abbau von Antibiotika, die die Barriere der Außenmembran dennoch passiert haben, deutlich an Effizienz gewinnen.

Wenn nicht bereits durch die geringe Permeabilität der Außenmembran *Ab*s abgewehrt, können Antibiotika außer von  $\beta$ -Laktamasen auch von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen (AMEs) degradiert werden. Dabei handelt es sich um eine mehrere Klassen umfassende Gruppe an Enzymen, die durch die Modifikation funktionaler Gruppen die Fähigkeit und Effizienz der Aminoglykosid-Antibiotika, an ihre Zielstruktur, die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen, zu binden, deutlich senkt (Benveniste & Davies, 1973; Ramirez & Tolmasky, 2010). Stämme von MDR- und vor allem von XDR-*Ab* weisen demnach nicht nur eine starke Expression von AMEs auf, sondern exprimieren häufig auch mehrere verschiedenen Klassen von AMEs (Zhu et al., 2009).

Neben der effektiven enzymatischen Elimination von in die Bakterienzellen eingedrungenen antimikrobiellen Substanzen spielt zudem ihre rasche Ausschleusung eine bedeutende Rolle (Temgoua & Wu, 2019). Möglich wird dies durch eine weitere Gruppe von Proteinen, die Efflux-Pumpen. Durch eine starke Expression dieser Efflux-Pumpen kann *Ab* das Gleichgewicht zwischen dem *per*

se geringen Influx noch deutlich auf die Seite eines starken Effluxes verlagern und so bewirken, dass verabreichte Antibiotika in den Bakterienzellen weniger akkumulieren. Dadurch sinkt die Antibiotika-Wirksamkeit und die MHKs steigen (Abdi et al., 2020). Efflux-Pumpen lassen sich in fünf Familien unterteilen: die Major Facilitator Superfamilie (MFS), die ATP-binding Cassette (ABC) Superfamilie, die Small Multidrug Resistance (SMR) Familie, die Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Familie und die Superfamilie der Resistance-Nodulation-Division (RND) – Pumpen (Paulsen, 2003). Allen gemeinsam ist ihr dreiteiliger Aufbau aus einem aktiven Transporter an der Innenmembran, einem periplasmatischen Adapterprotein und einem Kanal in der Außenmembran (Abdi et al., 2020). Ihre mehr oder weniger stark ausgeprägte Substratvariabilität lässt vermuten, dass ihre primäre physiologische Funktion nicht darin liegt, Antibiotika zu transportieren (Fernando & Kumar, 2013). Dennoch tragen sie maßgeblich zu multiresistenten Phänotypen von Bakterien bei. Vor allem die der RND-Familie zugehörigen Efflux-Pumpen sind unter Gram-negativen Bakterien weit verbreitet (Abdi et al., 2020). So sind in *Ab* vornehmlich die RND-Effluxpumpen AdeABC, AdeDE und AdeIJK bekannt, deren Überexpression in zahlreichen Studien mit einer Resistenz gegen Antibiotika aus den Gruppen der Aminoglykoside, Tetracycline, Cephalosporine, Carbapeneme und  $\beta$ -Laktame assoziiert werden konnte (Chau et al., 2004; Damier-Piolle et al., 2008; Hou et al., 2012; Marchand et al., 2004).

Interessanterweise konnte ihre verstärkte Expression auch in biofilmbildenden Zellen nachgewiesen werden (Gilbert et al., 2002). So wird den Efflux-Pumpen, wie z.B. der *Ab*-spezifischen RND-Pumpe AdeFGH (He et al., 2015) über ihre Transportleistungen hinaus, ein wichtiger Beitrag zur Adhäsionsfähigkeit und Vermehrung von Bakterien wie *Ab* zugeschrieben (Alav et al., 2018).

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist zusätzlich ursächlich für die hohe Austrocknungs-Toleranz und Persistenz von *Ab* sowohl auf biotischen als auch abiotischen Oberflächen. Damit stellt sie neben Mechanismen zur gezielten Abwehr von Antibiotika und der Barrierefunktion der Außenmembran einen weiteren Faktor dar, der zur außerordentlichen Umwelt- und Antibiotikaresistenz von *Ab* beiträgt (Espinal et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die MHKs

in sessilen Bakterienzellen eines Biofilmes 10- bis 1000fach höher liegen als bei Zellen in planktonischem Zustand (Wu et al., 2015). Dies liegt an spezifischen genetischen Veränderungen, in *Ab* beispielsweise einer Hochregulation der Expression der Gene *A1S\_1316*, das für eine MFS- und der Gene *A1S\_0009*, *A1S\_0116* und *A1S\_0538*, die für RND-Efflux-Pumpen kodieren (Rumbo-Feal et al., 2013). Primäre Ursache ist aber vor allem die Struktur von Biofilmen *per se* (Corona & Martinez, 2013). So ist z.B. die polymere Biofilm-Matrix für Antibiotika weitgehend impermeabel. Das verhindert das Erreichen einer antibiotisch wirksamen Konzentration (Anderl et al., 2000). Es wird zudem eine Beteiligung der Efflux-Pumpen an der Biofilmbildung vermutet: da sie u.a. den Efflux von Zuckern ermöglichen, könnten sie die Entstehung der Biofilmmatrix als Netzwerk aus Lipiden, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten entscheidend fördern (Flemming & Wingender, 2010).

Ein Blick auf die genetische Ebene zeigt, dass in *Ab* die Expression Biofilmbildungs-assoziiierter Gene und die Biofilmbildung generell, wie viele weitere bakterielle Verhaltensweisen, durch den Prozess des Quorum sensings (QS) reguliert wird. Unter QS versteht man eine durch Autoinduktoren ermöglichte Form der interzellulären Kommunikation, in der konzentrationsabhängig die Expression quorum-spezifischer Gene koordiniert wird. Dadurch können Populationen gezielt auf Umweltveränderungen reagieren (Li & Tian, 2012).

Die genomische Organisation von *Ab* zeigt außerdem, dass neben zahlreichen intrinsischen Resistenzmechanismen der Erwerb zusätzlicher Resistenzgene über horizontalen Gentransfer erfolgt sein muss (Gallagher et al., 2017). Dieser Transfer wird in *Ab* sehr effizient durch natürliche Transformationsprozesse möglich (Wilharm et al., 2013). Voraussetzung für diese Plastizität ist folgendes Zusammenspiel zwischen Kern- und Pangenom: grundlegende metabolische und strukturelle zelluläre Prozesse werden durch das kleine Kerngenom reguliert und der Austausch von spezifischen Resistenzgenen durch zahlreiche chromosomale und plasmidkodierte Resistenzinseln (RI) und transposable Insertionssequenzen (IS) ermöglicht (Pagano et al., 2016). Ein Beispiel für eine

solche IS ist ISAb<sub>a</sub>125, kodiert auf dem p1-Plasmid von *Ab* AB5075 (Gallagher et al., 2017; Gallagher et al., 2015).

Zusammenfassend ist also von einer multifaktoriellen Strategie auszugehen, welche, ähnlich wie bei *Pa*, die Virulenz und vor allem die bemerkenswerte Umwelt- und Antibiotika-Resistenz von *Ab* bedingt (Lee et al., 2006). Entsprechende Gene können in großer Vielfalt und in verschiedensten Kombinationen von den jeweiligen *Ab*-Stämmen exprimiert werden. Dadurch können sich diese in ihren phänotypischen Eigenschaften und ihrem Resistenzverhalten den gegebenen Umständen optimal anpassen (de Breij et al., 2010; Eijkelkamp et al., 2011; Giannouli et al., 2013).

#### **1.1.4 Die Modell-Stämme AB5075 und AYE**

Verschiedene *Ab*-Stämme besitzen ein sehr unterschiedliches pathogenetisches Potenzial (de Breij et al., 2012). Für diese Arbeit wurden primär zwei Stämme verwendet, nämlich der hochvirulente Stamm AB5075 und der Stamm AYE, als ein weiteres humanes Vergleichsisolat.

Wie etwa von Jacobs et al. (2014) beschrieben, handelt es sich bei AB5075 um einen im Jahre 2008 aus den Wunden eines von tibialer Osteomyelitis befallenen U.S.-Soldaten isolierten, klinisch repräsentativen Stamm aus der CC1-Gruppe. In mehreren Tiermodellen wurde eine reproduzierbare und hohe Virulenz nachgewiesen. AB5075 lässt sich vergleichsweise gut genetisch manipulieren und liegt mit seinen Multiresistenzen gegen viele herkömmliche Antibiotika, ausgenommen Hygromycin, Erythromycin, Doxycyclin und Tetrazykline, weitaus näher an den Resistenzspektren aktueller Krankenhauserreger als die sonst zahlreich verwendeten, jedoch vor über 50 Jahren isolierten Stämme der „American Type Culture Collection“ (ATCC) wie z.B. ATCC 19606T oder 17978.

All dies macht den Stamm AB5075 zu einem sehr interessanten und geeigneten Kandidaten in der gegenwärtigen Grundlagenforschung zu *Ab*.

Der ebenfalls multiresistente Stamm AYE wurde von uns vor allem als Vergleichsisolat eingesetzt. Er besitzt die Besonderheit einer 86-kb AbaR1-Resistenzinsel, die 45 virulenzassoziierte Gene umfasst und für einen

landesweiten *Ab*-Ausbruch in Frankreich im Jahre 2001 verantwortlich gemacht werden kann (P. E. Fournier et al., 2006; Rose, 2010). Er ist dadurch u.a. zur Biofilmbildung befähigt, weist ein Siderophor-basiertes Eisenaufnahmesystem vor, besitzt hohe katabolische und Resistenz-Kapazitäten und ist dem hochvirulenten AB5075-Stamm damit weitaus ebenbürtiger als empfindlichere Stämme wie der von der Kleiderlaus isolierte SDF-Stamm oder der in der Erde vorkommende avirulente *A. baylyi*-Stamm ADP1 (Vallenet et al., 2008).

Wird wie in unserem Falle ein besonderes Augenmerk auf die Resistenzmechanismen von *Ab* gelegt, ist zu beachten, dass Bakterien sowohl des AB5075- als auch des AYE-Stammes zu einer sogenannten „Phasenvariation“ fähig sind. Dies beschreibt ein mögliches Wechseln zwischen zwei verschiedenen Erscheinungsformen der Bakterienzellen, nach ihrer Kolonie-Erscheinungsform „opak“ und „transluzent“ benannt (Tipton et al., 2015). Auch einige weitere *Ab*-Stämme wie beispielsweise AB1712, AB307-0294, AB0057, A095 und A100– nicht jedoch ATCC 17978 – sind, in unterschiedlichen Frequenzen, dazu in der Lage (Ahmad et al., 2019; Tipton et al., 2015).

Die Namensgebung opak und transluzent rührt dabei von den mit bloßem Auge sichtbaren Unterschieden zwischen den beiden Erscheinungsformen: auf speziellen PV-Agar (siehe 3.1.7) aufgebracht, zeigen sich die avirulenten, transluzenten Zellen durchscheinend und die virulenten, opaken Zellen massiv-weißlich und damit optisch eindeutig abgrenzbar. Sie unterscheiden sich des Weiteren auch in ihren phänotypischen Eigenschaften: transluzente Zellen sind die besseren Biofilm-Bildner, während opake Zellen *in vivo* deutlich virulenter und generell resistenter gegenüber herausfordernden Umweltbedingungen wie Trockenheit, Desinfektionsmitteleinsatz usw. sind (Ahmad et al., 2019). Das strukturelle Manifest für diese hohe Resistenz und Virulenz opaker Zellen lässt sich gut in einer Maneval-Färbung als verdickte Kapsel unter dem Mikroskop darstellen.

Dass es nun zu einem solchen, reversiblen Switch kommt, ist eng mit der Dichte an Zellen in dem entsprechenden Medium verbunden. Grund hierfür ist nicht wie zunächst angenommen ein dichtebedingter Nährstoffmangel oder Anstieg des

pH-Wertes. Stattdessen konnte die Akkumulation eines extrazellulären Faktors bei hoher Zelldichte ausfindig gemacht werden. Dieser entspricht in seiner Wirkung einem auto- bzw. parakrinen Signalmolekül und beeinflusst über Mechanismen des Quorum Sensing und unter Mitbeteiligung eines transkriptionellen TetR-Regulators, dass die Bakterienzellen in den energetisch günstigeren transluzenten Zustand wechseln (Chin et al., 2018; Tipton et al., 2015; Tipton & Rather, 2017).

Dies zu beachten ist wichtig, um ein unbewusstes Arbeiten mit inhomogenen Populationen zu vermeiden, was unweigerlich zu einer hohen Variabilität der Ergebnisse und damit einer schlechten Reproduzierbarkeit führen würde.

## **1.2 Außenmembranprotein-Biogenese in Gram-negativen Bakterien**

Der Außenmembran (OM) Gram-negativer Bakterien wie *Ab* kommt eine elementare Funktion als natürliche Barriere und damit als Schutzschild vor schädlichen Umwelteinflüssen zu (Delcour, 2009). Entscheidend hierfür ist ihre Zusammensetzung. Als asymmetrische Lipiddoppelschicht beinhaltet sie nur in ihrer äußeren Schicht Lipopolysaccharide, während die innere Schicht durch Phospholipide charakterisiert ist. Zudem gibt es eine Vielzahl an integralen Membranproteinen, die beide Schichten der Außenmembran durchspannen (Knowles et al., 2009).

In *Ab* zählt zu diesen integralen Außenmembranproteinen (outer membrane proteins, OMPs) das bereits erwähnte Protein Omp<sub>Ab</sub>, das als Stellvertreter zeigt, wie durch OMPs wichtige Funktionen wie Nährstoffimport, Adhäsion oder Kommunikationsprozesse ermöglicht werden (Wimley, 2003). Strukturell sind OMPs über eine  $\beta$ -barrel Domäne, bestehend aus 8 bis 36 amphipathischen  $\beta$ -Strängen, in der Außenmembran verankert. Ihre Biogenese folgt einem komplexen, zahlreiche Schritte und Komponenten umfassenden Weg (Schulz, 2000).

### **1.2.1 Transport von OMPs in das Periplasma**

Im Zytoplasma synthetisiert, werden OMPs zunächst über drei mögliche Transportsysteme der Innenmembran (IM) in den periplasmatischen Raum geschleust: das Sec-Translokon, eine YidC-Insertase oder das sogenannte Tat-System (Kudva et al., 2013). Dabei kommt dem Sec-Translokon in *Ab* die größte Bedeutung zu. Es kann zusammen mit der YidC-Insertase auch  $\alpha$ -helikale Proteine in die IM inserieren.  $\beta$ -barrel OMPs werden in der Regel durch den engen Kanal des heterotrimeren Sec-Translokons geschleust und auf der periplasmatischen Seite von Chaperonen in Empfang genommen. Unter diesen Faltungshelferproteinen sind in Gram-negativen Bakterien allgemein und auch in *Ab* vornehmlich die Peptidyl-Prolyl-Isomerasen SurA und FkpA, sowie Skp und DegP bekannt.

### **1.2.2 Die periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP**

Periplasmatische Chaperone übernehmen eine wichtige Funktion bei der Biogenese von  $\beta$ -barrel-OMPs (de Cock et al., 1996; Eppens et al., 1997). Allgemein stabilisieren sie die OMPs in ungefaltetem Zustand und schützen damit die stark hydrophoben Proteine vor der Aggregation. Zudem eskortieren sie OMPs zu einer Insertionsmaschinerie, die in der OM verankert ist, dem sogenannten „ $\beta$ -barrel-assembly-machinery“ (BAM)-Komplex. Die Chaperone lassen sich in drei verschiedene Gruppen unterteilen: Disulfidbrücken-Bildung katalysierende Enzyme, Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) und solche mit allgemeiner Chaperon-Aktivität (Duguay & Silhavy, 2004).

Im Folgenden soll kurz auf die drei wichtigsten periplasmatischen Chaperone eingegangen werden.

#### **1.2.2.1 SurA**

Das prominenteste unter den mittlerweile zahlreichen bekannten Chaperonen ist die PPIase SurA (Behrens et al., 2001). Identifiziert wurde das Protein ursprünglich bei einem Screen als ein Faktor, der für das Überleben von *E. coli* in der stationären Phase essentiell ist (Tormo et al., 1990). Daher rührt auch sein Name SurA, der für „survival protein A“ steht. In späteren Arbeiten mit *Ec* wurde gezeigt, dass SurA wichtig für die Faltung einiger OMPs ist (Lazar & Kolter,

1996). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Depletion von SurA mit einer Abnahme der Dichte der OM einhergeht (Sklar et al., 2007). Dies macht die Bakterien deutlich vulnerabler gegenüber Substanzen wie Gallensalzen, SDS und hydrophoben Antibiotika.

Im Gegensatz zu weiteren in *Ec* bekannten PPIasen, namens FkpA, PpiA und PpiD, hatte lediglich das Fehlen von SurA derart ausgeprägte phänotypische Konsequenzen (Justice et al., 2005). In vergleichenden Proteomanalysen zwischen WT und SurA-depletierten Stämmen von *Ec* konnte zudem gezeigt werden, dass einige OMPs wie LptD und FhuA strikt SurA-abhängige Substrate darstellen (Vertommen et al., 2009). Weitere OMPs, darunter die Porine OmpA und OmpF, zeigten lediglich eine Präferenz mit SurA zu interagieren oder konnten wie BamA und TolC gänzlich unabhängig von SurA assemblieren bzw. inserieren.

#### **1.2.2.2 Skp**

Interessanterweise kann das Substratspektrum und damit auch die Relevanz der Chaperone je nach Bakterienart variieren, wie das Beispiel von *Neisseria meningitidis* zeigt. Während in den allermeisten untersuchten Gram-negativen Bakterien SurA das wichtigste periplasmatische Chaperon ist, ist in *N. meningitidis* Skp von größerer Bedeutung (Volokhina et al., 2011). Skp steht dabei für „seventeen kilodalton protein“ (Goemans et al., 2014). Um zu verstehen, welche Rollen konkret den beiden Chaperonen Skp und DegP zukommen, wurden in Arbeiten an *E. coli* (Sklar et al., 2007) die Auswirkungen eines SurA-Knockouts auf zwei OMPs, nämlich LamB – ein Maltose-Transporter (Lazar & Kolter, 1996; Rouviere & Gross, 1996) – und OmpA, untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass Skp und DegP in *Ec* und auch in *Ye* gemeinsam in einem, zwar für die OMP-Biogenese direkt funktionell nicht äquivalenten, aber dennoch sehr wichtigen Parallelweg zu SurA agieren. In diesem Parallelweg „retten“ oder degradieren sie missgefaltete Proteine. Dies kommt dann zu greifen, wenn SurA depletiert ist und/oder die Bakterienzelle unter Stress steht und betrifft auch OMPs, die bereits an den BAM-Komplex gebunden sind, von diesem jedoch nicht in die OM inseriert werden können (Combs & Silhavy, 2022). Hier dient Skp als Adapterprotein für das Ablösen der OMPs vom BAM-Komplex und ihrer

Weiterleitung an die Protease DegP. Bei der Degradation der dysfunktionalen OMPs wird Skp selbst ebenfalls degradiert.

Neben diesem Synergismus zwischen Skp und DegP, wurde des Weiteren eine feinabgestimmte Kooperation zwischen Skp und SurA selbst beobachtet: an einem weiteren OMP namens OmpX wurde gesehen, dass beide Chaperone ungefaltete OmpX-Moleküle expandieren und synergistisch OmpX-Oligomer-Aggregate disassemblieren (Chamachi et al., 2022).

### **1.2.2.3 DegP**

Zusätzlich zu der Degradation von missgefalteten Proteinen im Periplasma zusammen mit Skp, wurde für das Chaperon DegP in *Ec* eine Interaktion mit einer periplasmatischen  $\alpha$ -Amylase namens MalS gezeigt (Freundlieb & Boos, 1986). Das könnte darauf hinweisen, dass DegP maßgeblich an der Faltung von Proteinen im Periplasma beteiligt ist. Es wurde anhand dieses Zusammenhanges außerdem ersichtlich, dass DegP temperaturabhängig zwischen seiner Aktivität als Chaperon (Temperaturen unter 28°C) oder als Protease (Temperaturen über 28°C) wechseln kann (Spiess et al., 1999).

### **1.2.3 Die $\beta$ barrel assembly (BAM) Maschinerie**

Am BAM-Komplex findet schließlich die finale Faltung der Proteine und ihre Insertion in die OM statt (Tamm et al., 2004). Über die genauen Abläufe existieren an dieser Stelle verschiedene Theorien (Wu et al., 2020).

Es ist bekannt, dass der BAM-Komplex fünf Proteine namens BamA-E umfasst (Knowles et al., 2009; Ryan, 2004), wobei ihre Komposition vor allem in Bezug auf die akzessorischen, nicht-essentiellen Bestandteile BamBCE variieren kann (Wu et al., 2005). Dabei hat sich gezeigt, dass BamA und BamD essentiell sind, während eine Depletion der weiteren Bam-Lipoproteine lediglich zu unterschiedlich ausgeprägten, aber meist milden OMP-Defekten führte (Malinverni et al., 2006; Werner & Misra, 2005).

Als Hauptlieferant der ungefalteten OMPs an den BAM-Komplex dient SurA (Bennion et al., 2010; Sklar et al., 2007). Auch wenn die Art und Weise der Präsentation der OMPs am BAM-Komplex noch unklar ist, wurde ersichtlich, dass

für diese Interaktion zwischen SurA und dem BAM-Komplex die Kern-Domäne und zwei PPlasen-Domänen von SurA essentiell sind (Schiffrin et al., 2022). Der Komplex aus SurA und dem Substrat bindet dabei direkt an den BAM-Komplex (BamB+E) und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung von BAM zum sog. „lateral closed“/„inward-open“ Akzeptorzustand. Angekommene OMPs erhalten so Zugang zu der katalytischen BamA-Site und können gefaltet und in die OM inseriert werden.

Neben seiner essentiellen Rolle in der OMP-Biogenese nimmt der BAM-Komplex zudem eine Rolle in einem kontaktabhängigen CDI-System ein, das unter Nährstoffmangel das Wachstum von Nachbarzellen über sekretorische Proteine zum eigenen Vorteil inhibieren kann (Willett et al., 2015).

#### **1.2.4 Besonderheiten der OMP-Biogenese in *A. baumannii***

Der BAM-Komplex ist auch in *Ab* von großer Bedeutung für die Fitness und Virulenz der Bakterienzellen. Zusätzlich macht ihn seine Lokalisierung in der pharmazeutisch gut erreichbaren äußeren Zelloberfläche zu einem höchst interessanten Kandidaten für die Entwicklung neuer Therapeutika (Doyle & Bernstein, 2019). In einer Studie von Sing et al. (2017) wurde gezeigt, dass gegen *Ab*-BamA immunisierte Mäuse bei Gabe einer sonst letalen Dosis an *Ab* Überlebensraten von 60 bis 80 % aufwiesen.

Über die enorme Wichtigkeit der Funktion von periplasmatischen Chaperonen bei der OMP-Insertion in *Ab* herrscht Einigkeit. So konnte für *Ab* auf genetischer Ebene ermittelt werden, dass alle für diese Proteine kodierenden Gene der Regulation durch einen bestimmten  $\sigma$ -Faktor, namens  $\sigma^E$ , unterliegen (Rouviere & Gross, 1996). Aktiviert durch un- oder missgefaltete OMPs im Periplasma, induziert dieser die Transkription von Stressgenen im Zytoplasma (Rhodius et al., 2006; Walsh et al., 2003).

Dennoch bleiben einige Fragen, v.a. hinsichtlich der Existenz der parallel zueinander arbeitenden Wege (SurA und Skp/DegP, weitere?) des Shuttlings und der Qualitätskontrolle durch periplasmatische Chaperone offen: präferieren bestimmte Proteine einen der möglichen Wege? Wie übergeben die Chaperone ihre Fracht an den BAM-Komplex? Gibt es noch zusätzliche wichtige, doch

bislang unentdeckte Chaperone in diesem Netzwerk? Welche weiteren Auswirkungen könnte eine Depletion des bekannten Hauptchaperons SurA in *Ab* haben, die es eventuell in den Fokus für die Entwicklung neuer Drug Targets rücken?

### **1.3 Vorangegangene Arbeiten und Erkenntnisse der Arbeitsgruppe**

In Arbeiten an *Pa*, *Ec* und *Ye* wurde festgestellt, dass das periplasmatische Chaperon SurA einen geeigneten Schlüssel zur Reduktion von Resistenz und Virulenz in Gram-negativen Bakterien darstellt: eine Deletion von *surA* führte in allen diesen drei Spezies zu einer gesteigerten OM-Permeabilität, damit einhergehend einer reduzierten Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen und einer erhöhten Sensibilität gegenüber Antibiotika (Justice et al., 2005; Klein et al., 2019; Sklar et al., 2007; Weirich et al., 2017).

In *Pa*, der *Ab* in seinen erworbenen und intrinsischen Resistenzmechanismen nicht nachsteht, wurden konkret Veränderungen an 42 OMPs unter Deletion von *surA* beobachtet (Klein et al., 2019). Dazu zählten Efflux-Pumpen, Autoporter (Typ V Sekretionssysteme), Siderophor-rezeptoren, Proteine des BAM-Komplexes, Porine wie OprF und viele mehr.

Als man die bekannten periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP in *Ab* (AB5075) deletierte, stellte sich interessanterweise heraus, dass *Ab* im Gegensatz zu den bereits untersuchten Pathogenen *Pa*, *Ye* und *Ec*, auf ein Fehlen der Chaperone SurA, Skp und DegP mit nur sehr schwach ausgeprägten Phänotypen reagierte, und sogar alle möglichen Doppel- und eine Dreifachdeletion tolerierte. Am wenigsten ausgeprägt waren phänotypische Auswirkungen in den Einzelmutanten und auch die anschließend generierten Doppelmantanten  $\Delta surA\Delta skp$ ,  $\Delta surA\Delta degP$  und  $\Delta skp\Delta degP$  zeigten nur milde Defekte verglichen zu den zuvor in *Pa*, *Ec* und *Ye* beobachteten Auswirkungen. Eine sehr interessante Beobachtung war jedoch eine Resensibilisierung der  $\Delta surA\Delta skp$ - und  $\Delta surA$ -Mutante gegenüber Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 **MHK-Werte (in mg/l) von *Ab* AB5075 Deletions-Mutanten im Vergleich zum WT; entnommen aus Birkle et al. (2022).** Die Ermittlung der Antibiotikasuszeptibilität erfolgte sowohl über eine Mikroboulliondilution (MICRONAUT-Assay) und E-Tests (nur für Vancomycin). Ein roter Hintergrund weist auf eine verringerte MHK hin, jedoch noch immer über dem Breakpoint liegend. Ein grüner Hintergrund kennzeichnet MHK-Werte unterhalb des Breakpoints. Ein grauer Hintergrund bedeutet eine Verringerung der MHK um weniger als das 2-fache, bzw. eine unveränderte MHK. Ausrufezeichen markieren erhöhte MHK-Werte. Sternchen weisen auf Kolonien in der Hemmzone bei den E-Tests hin.

(AMK=Amikacin, Gen=Gentamicin, TOB=Tobramycin, IMP=Imipenem, MER=Meropenem, PIT=Piperacillin/Tazobactam, CTA=Ceftolozan/Tazobactam, CAA=Ceftazidim/Avibactam, LEV=Levofloxacin, Van=Vancomycin).

MIC-plates		MIC Breakpoints		WT	Single K.O.			Double K.O.			Triple K.O.
		S ≤	R >		$\Delta surA$	$\Delta skp$	$\Delta DegP$	$\Delta surA\Delta degP$	$\Delta surA\Delta skp$	$\Delta skp\Delta degP$	$\Delta surA\Delta skp\Delta degP$
Aminoglycosides	AMK	8	16	32	16	8	>32!	32	8	32	4
	GEN	4	4	>32	32	>32	>32	32	8	>32	16
	TOB	4	4	8	2	16!	16!	2	2	8	1
Carbapenems	IMP	2	4	>8	8	8	8	8	4	4	4
	MER	2	8	16	16	16	16	16	2	4	4
Penicillins	PIT	16	64	>128	>128	128	>128	>128	16	128	64
Cephalosporins	CTA	-	-	>8	>8	>8	>8	>8	1	>8	8
	CAA	-	-	>8	2	2	>8	4	1	4	1
Fluoroquinolone	LEV	0,5	1	4	4	4	8!	4	2	4	4
<b>E-test</b>											
Vancomycin	VAN	-	-	>256	48	96*	128	96	12*	64	24

Da *Ab* sogar einen Knockout aller dieser drei Chaperone zeitgleich verkräftet, lag zudem die Vermutung nahe, dass in *Ab* weitere Mechanismen existieren, die in Abwesenheit von SurA, Skp und DegP agieren. Diese Mechanismen würden in diesem Modell dafür sorgen, dass die Aufrechterhaltung der OM-Barriere zumindest soweit weiterhin funktioniert, dass essentielle OMPs weiterhin zum BAM-Komplex eskortieren werden und *Ab* letztlich auch ohne SurA, Skp und DegP überleben kann. Ein solcher Mechanismus könnte parallel zu dem bekannten SurA und Skp/DegP Chaperoning agieren, oder z.B. nur unter besonderen Stressbedingungen aktiviert werden.

Um herauszufinden, welche Proteine diese Funktionen bei Deletion von *surA*, *skp* und *degP* übernehmen oder kompensieren könnten, wurde eine komparative Massenspektrometrieanalyse zwischen dem Proteom des Wildtyps und der Tripelmutante  $\Delta surA\Delta skp\Delta degP$  von AB5075 durchgeführt. Es zeigten sich dabei zahlreiche Veränderungen, welche sich jedoch vor allem auf eine Anreicherung bislang uncharakterisierter Proteine in der Tripelmutante zurückführen lassen

(Birkle et al., 2022). Die globale Anzahl an OMPs zeigte sich dabei im Gesamten nicht signifikant verändert. Auch im Blick auf spezifische OMPs wie FhuA und LptD, die in anderen Gram-negativen Bakterien als SurA-abhängig gefunden wurden, wurden keine Veränderungen beobachtet.

Bei einer Suche nach Paralogen der Chaperone SurA und DegP wurden PpiD – eine periplasmatische PPIase – und DegS – eine membranverankerte, periplasmatische Protease – identifiziert. Des Weiteren wurden unter den in der Tripelmutante angereicherten Proteinen das Lipoprotein ABUW\_0607 und das entweder als Histidin-Phosphatase oder Phosphoglyceratmutase annotierte Enzym ABUW\_1852 in Hinblick auf eine mögliche Kompensationsfunktion für ein Fehlen der bekannten Chaperone genauer untersucht. Entsprechende Knockout-Mutanten zeigten allerdings bezüglich Membranintegrität, Fitness und Antibiotikaresistenz nur schwach ausgeprägte Defekte. Synergistisch konnte auch hier ein Bruch von Antibiotikaresistenzen erzielt werden, jedoch nur bei zeitgleichem Knockout von SurA, Skp und/oder DegP (Masterarbeit von Elena Weber (2021) und Bachelorarbeit von Katharina Astfalk (2021)).

Die genauen Mechanismen, die *Ab* verwendet, um ohne die periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP noch immer viabel zu sein, sind folglich weiterhin ungeklärt.

## 2 Fragestellung dieser Arbeit

Startpunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass *surA*-Deletionsmutanten eine reduzierte Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika und besonders für Tobramycin haben. In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte Membranpermeabilität bzw. ein verstärkter Efflux wohl nicht die Ursachen für diese erhöhte Suszeptibilität sind (Birkle et al., 2022). Ein erster Teil dieses Projektes befasste sich daher mit weiteren Aspekten, die erklären könnten, wie ein Fehlen von SurA eine erhöhte Suszeptibilität für Tobramycin verursachen kann. Folgende Hypothesen wurden formuliert und sollten experimentell überprüft werden:

1. Da in der Gruppe der Aminoglykoside insbesondere die Suszeptibilität für Tobramycin durch SurA beeinflusst war, stellte sich die Frage, ob der beobachtete Effekt substanzspezifisch ist. Daher sollte vergleichend überprüft werden, ob auch die Suszeptibilität für die strukturell sehr nah verwandten Aminoglykoside Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin durch SurA beeinflusst wird. Dafür sollten vergleichende Mikroboullion-Dilutionstests durchgeführt werden.
2. Eine Deletion von *surA* bewirkt durch eine Veränderung der OM-Zusammensetzung eine veränderte Oberflächenladung. Diese führt dazu, dass das Aminoglykosid Tobramycin besser an die Mutante binden und effizienter in die Zelle gelangen kann. Diese Hypothese sollte durch einen Zytochrom C verwendenden Assay überprüft werden.
3. Die erhöhte Suszeptibilität für Tobramycin kann auch durch eine veränderte Expression Aminoglykosid-modifizierender Enzyme (AMEs) verursacht werden. Diese Hypothese sollte durch vergleichende RNA-Sequenz-Analysen von WT und *surA*-Deletionsmutante, sowohl unstimulierter als auch mit subinhibitorischen Konzentrationen von Tobramycin stimulierten Zellen durchgeführt werden. Dadurch sollten AMEs identifiziert werden, deren Expression in der Mutante verändert sind und zudem untersucht werden, ob sich die zelluläre Antwort einer  $\Delta surA$ -Mutante auf die Stimulation mit Tobramycin grundlegend von der des Wildtyps unterscheidet.

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass *Ab* neben den bekannten periplasmatischen Chaperonen Mechanismen besitzen muss, die ein gleichzeitiges Fehlen der 3 Faktoren kompensieren können. Eine weitere Fragestellung dieses Projektes beschäftigte sich daher mit der Identifizierung von Faktoren, die in Abwesenheit von SurA, Skp and DegP essentiell werden. Dazu sollte zunächst eine konditionelle  $\Delta surA$ -Mutante in einem  $\Delta skp \Delta degP$ -Hintergrund generiert werden, da in Vorversuchen die Herstellung von Quadrupelmutanten nicht erfolgreich war (was auf ein technisches Problem, oder aber eine tatsächliche Rolle des jeweiligen Proteins für die OMP-Biogenese in *Ab* sprechen könnte). Eine solche konditionelle Mutante würde es dann erlauben, die Rolle einzelner Faktoren im Kontext von Skp, DegP und SurA zu analysieren, bzw. würde dann als Ausgangspunkt für globale Analysen mit Hilfe einer Transposon-Insertion-Library dienen.

Um eine mögliche Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf andere *Ab*-Stämme zu prüfen, wurden die Experimente teilweise zusätzlich mit dem *Ab*-Stamm AYE durchgeführt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Stammbezeichnung	Herkunft
<i>Acinetobacter baumannii</i> AB5075	WT $\Delta surA$ $\Delta skp$ $\Delta ppiD$ $\Delta surA\Delta skp$ $\Delta surA\Delta degP$ $\Delta surA\Delta ppiD$ $\Delta skp\Delta ppiD$ $\Delta surA\Delta skp\Delta degP$	Birkle et al. (2022)
<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	WT $\Delta surA$ $\Delta surA\Delta skp\Delta degP$	
<i>Acinetobacter baumannii</i> klinische Isolate (4MRGN und OXA-23 positiv)	371-MRGN-9145 372-MRGN-9126 373-MRGN-9088 374-MRGN-9021 375-MRGN-9146 376-MRGN-9106 377-MRGN-8016 378-NF-29545 379-NF-31708 380-MRGN-9709	übernommen aus der hauseigenen Stammsammlung
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (#C2987H)	chemisch kompetente Zellen	käuflich erworben von New Englands Biolabs
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) (#C2527H)	Träger des pCOLI-His paSurA FL – Plasmids (Positivkontrolle bei der Überprüfung der SurA- Expression in Western Blots)	

### 3.1.2 Plasmide

Tabelle 3 Verwendete Plasmide und ihre Herkunft

Plasmid	Resistenzmarker	Ursursungsplasmid / Herkunft
pJM220 puC18T-miniTn7T-Gm-rhaSR-PrhaBAD	<i>Ampicillin, Gentamycin</i>	<i>ein Geschenk von Herbert Schweizer</i> (Addgene Plasmid # 63121 <a href="http://n2t.net/addgene:63121">http://n2t.net/addgene:63121</a> ; RRID: Addgene_63121) (Choi et al., 2005)
Topo_Hygro R	<i>Hygromycin, Kanamycin</i>	<i>ein Geschenk von Tylor Jacks</i> (Addgene Plasmid # 68445 <a href="http://n2t.net/addgene:68445">http://n2t.net/addgene:68445</a> ; RRID: Addgene_68445) (Akama-Garren et al., 2016)
pUC18T-mini-Tn7T-Ara-SurA-Hyg	<i>Ampicillin, Hygromycin</i>	pUC18T-mini-Tn7T-Gm bzw. pJM220 puC18T-miniTn7T-Gm-rhaSR-PrhaBAD
pTNS3	<i>Ampicillin</i>	<i>ein Geschenk von Herbert Schweizer</i> (Addgene Plasmid # 63127 <a href="http://n2t.net/addgene:63127">http://n2t.net/addgene:63127</a> ; RRID: Addgene_63127) (Choi et al., 2008)
pRK2013	<i>Kanamycin</i>	<i>Clontech</i>
pFLP3-TelR-tdk	<i>Tellurit</i>	<i>pFLP3-TelR-sacB</i> <i>ein Geschenk von Herbert Schweizer</i> (Addgene Plasmid # 64946 <a href="http://n2t.net/addgene:64946">http://n2t.net/addgene:64946</a> ; RRID: Addgene_64946) (Choi et al., 2005)
pCOLI-His paSurA FL	<i>Ampicillin</i>	pCOLI-His-3C paSurA FL (amplifiziert aus pET 28a paSurA FL (Novagen))

### 3.1.3 Primer

Tabelle 4 Primer mit Verwendungszweck, Sequenz, Schmelztemperatur <sup>TM</sup> und Amplikon-Größe

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Produktgröße (bp)
<b>Primer zur Überprüfung der konditionalen SurA-Mutanten</b>			
Überprüfung der pUC18T-mini-Tn7T-ara-SurA-Hyg - Integration und - Insertionsrichtung im Genom			
SeqAraC_fwd	GATCATTTTGGCGCTTCAGCC	57	817
Seq_KonditionalerSurAKO_rev	GACGCAGACGATTAATTGCT	56	
Insertion1_glmS_rev	CGTAACTTGGCGAAGTCAGT	56	687
Insertion1_araC_fwd	GAGGACCAACGTATCAGCCA	56	
Insertion2_Hygro (mit Insertion1_glmS_rev)	TGTGTAGAAGTACTCGCCGA	56	815
Überprüfung auf Vorhandensein des intakten <i>surA</i> -Gens			
231_SurA_5075_fwd	ATGAAGACAAAACATCTTAAACAG	52	1303
232_SurA_5075_rev	GTAAGTTCTTTTTGTCGAGG	52	
233_SurA_5075_neg_fwd (mit 232)	GTTTCGTTCACTTGGCT	52	697
Überprüfung des pFLP3-TelR-tdk – Verlustes			
M13fwd	TGTAACGACGGCCAGT	56	1156
AZTseq2R	GAGATTCGTGCGGAACATG	56	

<b>Primer zur Generierung des pJM220-HygroR-SurA5075-Plasmids durch Gibson Assembly</b>			
Gibson-Primer zur Amplifizierung der Hygromycin-Kassette			
234_Gib_Hygro_fwd	ggaattctagatcgaattgg- CATGATTACGCCAAGCTATTTAG	65	1203
235_Gib_Hygro_rev	ctgattccctttgtcaacag- AGAGTAATTCAACCCCAAAC	65	
Öffnungsprimer zum Austausch der Gentamycin- durch die Hygromycin-Kassette in pJM220			
236_Hyg_open_puC18T_fwd	CTGTTGACAAAGGGAATCAGG	56	5863 (bzw. 7166 mit SurA)
237_Hyg_open_puC18T_rev	CCAATTCGATCTAGAATTCCATTG	54	
Verifizierung der Insertion der Hygromycin-Sequenz in pJM220			
244_Hyg_pJM220_check_fwd	GAGCGCTTTTGAAGCTGA	55	1353
245_Hyg_pJM220_check_rev	CATTGTTCCACTCTTTGAGCTC	56	
Gibson-Primer zur Amplifizierung der <i>surA</i> -CDS aus gDNA von AB5075 WT zur Insertion in pJM220			
238_Gib_SurA5075_fwd	aggaattcctcgagaagctt- ATGAAGACAAAACATCTTAAAC	63	1351
239_Gib_SurA5075_rev	tgcaaggccttcgcgaggta- TTATTTTTGTAAGTTCTTTTTGTCTG	67	
Öffnungsprimer zur Insertion der <i>surA</i> -Sequenz in pJM220			
240_EO_773_Gib_uni_pJM220_f	TACCTCGCGAAGGCCTTGCA	59	6686 (bzw. 7018 mit Hygro)
241_EO_774_Gib_uni_pJM220_r	AAGCTTCTCGAGGAATTCCTGC	60	

Verifizierung der Insertion der <i>surA</i> -CDS in pJM220			
242_EO_777_pJM220_seq_f	TTTTCAAGATACAGCGTGAA	51	1743
243_EO_778_pJM220_seq_r	GCCCAAACATAACAGGAAGA	53	
Primer zum Nachweis von <i>surA</i> -mRNA Expression mit RT-qPCR			
269_rtPCR_SurA_FWD	TACAGTTAGCTCAAGGCGGC	60,5	82
270_rtPCR_SurA_REV	CGATCTTCCCAGCATGACCA	59,5	

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Puffer und Lösungen

	<b>Zusammensetzung</b>
5 x SDS-Laufpuffer	60,55 g Tris 288,15 g Glycin 10 g SDS ad 2 l ddH <sub>2</sub> O
10 x Western Blot-Transferpuffer	60 g Tris 288,8 g Glycin ad 2 l ddH <sub>2</sub> O
10 x Western Blot-Waschpuffer	24,2 g Tris 180 g NaCl 1M HCl (für pH = 7,4) 100 ml Tween-20 ad 2 l ddH <sub>2</sub> O
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub> Puffer (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 20 mM, MgCl <sub>2</sub> : 1 mM; pH=7)	2,72 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,095 g MgCl <sub>2</sub> ad 1000ml VE-H <sub>2</sub> O

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Puffer (100 mM, pH=7)	2,74 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 200 ml VE-H <sub>2</sub> O
MOPS-Puffer (20 mM, pH=7)	0,837 g MOPS ad 200 ml VE-H <sub>2</sub> O

### 3.1.5 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 6 Reagenzien und Chemikalien

	<b>Hersteller</b>
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Lonza, Rockland (USA)
<u>Antibiotika</u>	
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Dibekacin-Sulfat /	BiosynthCarbosynth,
3',4'-DideoxykanamycinB-Sulfat (#AD32509)	Compton (UK)
Gentamicin	AppliChem, Darmstadt
Hygromycin B (in PBS)	Thermo Fisher, Schwerte
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
Polymyxin B Nonapeptid Hydrochlorid (PMB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tobramycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<u>Antikörper</u>	
AB_SurA PP-serum Rabbit SA8994 (1:1000) (#FB04049)	Eurogentec, Seraign (B)
goat anti rabbit POX (1:1000) (#31460)	Thermo Fisher, Schwerte
Arabinose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Azido-3'-deoxythymidin (AZT)	Jena Bioscience, Jena
10 x BlueBlock PF	Serva, Heidelberg
Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP) (#C2759)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chemisch kompetente <i>E. coli</i> TOP10 - Zellen	Thermo Fisher, Schwerte
Clarity™ Western ECL Blotting Substrat	Bio-Rad, München

Congo Rot-Lösung (1%)	Carolina Biological Supply Company, New York (USA)
Descosept	Dr. Schumacher, Malsfeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I (rekombinant, RNase-frei) mit Inkubationspuffer (10 x) (#04716728001)	Roche, Basel (CH)
Dpnl	Thermo Fisher, Schwerte
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Gene Ruler DNA-Leiter (1 kb plus)	Thermo Fisher, Schwerte
Gibson-Mix	-hausintern- (AG Wagner)
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab, Erlangen
5x KAPA HiFi Puffer	KAPA HiFi PCR Kit, Roche, Basel (CH)
KAPA dNTP-Mix (10 mM)	
KAPA HiFi DNA-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	
KOD Hot Start DNA-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	Merck, Darmstadt
KOD-Puffer	
5 x Laemmli Puffer	Bio-Rad, München
Maneval-Farbstoff	Carolina Biological Supply Company, New York (USA)
2 x MangoMix	BioCat, Heidelberg
Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Mueller Hinton-Bouillon II (MHB II)	Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (IT)
3-N-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-N-Phenyl-naphthylamine (NPN) (#10051610)	Thermo Fisher, Schwerte

NaCl (0,9 %)	B. Braun, Melsungen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Orange G Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/ Thermo Fisher, Schwerte
PAGE Ruler vorgefärbte Protein-Leiter (10 – 180 kDa)	Thermo Fisher, Schwerte
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
Steriles Wasser	B. Braun, Melsungen
Sucrose	Merck, Darmstadt
SYBR Safe DNA Gel-Farbstoff	Thermo Fisher, Schwerte
Tellurit (#60539)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween-20	Merck, Darmstadt
Zytochrom C (#C2506)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.1.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7 Verbrauchsmaterialien

	<b>Hersteller</b>
Blotting-Papier	Bio-Rad, München
Küvetten, Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten, Gene / <i>E. coli</i> Pulser	Bio-Rad, München
Erlenmeyer Kolben	DWK Life Sciences, Mainz
E-Test-Streifen (Tobramycin) (#92121)	Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (IT)
Glasflaschen	DWK Life Sciences, Mainz
Glasspatel	WU, Mainz
Handschuhe (Peha-soft nitrile)	Hartmann, Heidenheim

Impfösen (1 µl, 10 µl)	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen, -deckel	Sarstedt, Nümbrecht
MICRONAUT-S MDR MRGN Screening-Platten (#E1-114-040)	Merlin Diagnostika, Bornheim
Mikrotiterplatte (Polystyrol, 96 well)	Greiner, Frickenhausen
Nitrocellulose-Membran (0.45 µm Poren)	GE Healthcare, Freiburg
Parafilm	Brand, Wertheim
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, Amsterdam (NL)
Pipettenspitzen (10 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße-Eppendorf (1.5 ml, 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße-Falcon-Tube (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße-PCR (0.2 ml)	Biozym, Oldendorf
Reservoir für Mehrkanalpipette	Integra, Zizers (CH)
Rundboden-Polystyrolröhrchen (5 ml, 14 ml)	Greiner, Frickenhausen
SDS Gele (Mini-Protean TGX Precast Gel)	Bio-Rad, München
Siegelfolien für MIC-Platten (mitgeliefert für #E1-114-040)	Merlin Diagnostika, Bornheim
Trübungsdensitometer-Röhrchen	Biomérieux, Nürtingen

### 3.1.7 Kulturmedien für Bakterien

Tabelle 8 Feste Medien zur Kultivierung von Bakterien

<b>feste Medien</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl 15 g Agar ad 1 l VE-H <sub>2</sub> O

Motility-Agar für Transformation via twitching motility	2,5 g Trypton 1,25 g NaCl 2,5 g Agar ad 500 ml VE-H <sub>2</sub> O
0,5 x Agar (PV-Agar) für Visualisierung der Phasen-Variation	5 g Trypton 2,5 g NaCl 2,5 g Hefe-Extrakt 8 g Agar ad 1 l VE-H <sub>2</sub> O

Tabelle 9 Flüssige Medien zur Kultivierung von Bakterien

<b>flüssige Medien</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
LB-Bouillon	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1 l VE-H <sub>2</sub> O
LB-Glycerol-Bouillon (20%) für Kryokonservierung	100 ml Glycerol (100 %) ad 500 ml LB-Bouillon
Mueller Hinton-Bouillon II (MHB II)	3 g Rinder-Extrakt 1.5 g Stärke 17.5 g saures Kasein-Hydrolysat ad 1 l VE-H <sub>2</sub> O
S.O.C – Medium für Transformation in chemisch kompetente <i>E.coli</i> (DH5 $\alpha$ / TOP10)- Zellen	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose

### 3.1.8 Kits

Tabelle 10 Kommerzielle Kits

	<b>Hersteller</b>
Monarch® Plasmid Miniprep Kit (#T1010L)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
QIAGEN® DNeasy UltraClean Microbial Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit	Promega Corporation, Fitchburg (USA)
QIAGEN® RNeasy Micro Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiFast® SYBR® Green RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Zymo-Seq RiboFree total RNA Library Prep Kit	Zymo Research, Irvine (USA)

### 3.1.9 Technische Ausrüstung

Tabelle 11 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Eismaschine	AF 156	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (USA)
Elektrophorese-System	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München
Etikettendrucker	Dymo 450	Dymo/Newell brands, Sandy Springs (USA)
Feinwaage	BP 210 D	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer (mit Schlitten, Kämmen, Netzteil)	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Dokumentationssystem	BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Elektroporation-System	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	B6420	Heraeus, Hanau

Sterilbank	BDK-S 1200, 1300	Weiss, Sonnenbühl
magnetische Heizplatte	MR 3002	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipette (elektronisch)	Xplorer	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	BX51	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	Micromat	AEG, Frankfurt a.M.
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Reference; Research plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	PowerPac 200/300	Bio-Rad, München
qRT-PCR-System	Lightcycler 480	Roche, Rotkreuz (CH)
Röhrchenrotator	RM-2	Neolab, Heidelberg
Spektralphotometer	NanoDrop One	Thermo Fisher, Schwerte
Tecan-Plattenleser	Infinite M200 Pro	Tecan Group, Crailsheim
Thermocycler für PCR	C1000 Touch	Bio-Rad, München
Trübungsdensitometer	DensiCheck Plus	Biomérieux, Nürtingen
Vortexer	Vortex Relax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	WB 10	Memmert, Schwabach
Wippschüttler	Assistant RM5	Karl Hecht, Sondheim
Zentrifuge	5430R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Tisch (klein)	Rotilabo	Roth, Karlsruhe

### 3.1.10 Software und Programme

Tabelle 12 Spezielle Software

	<b>Hersteller / Referenz</b>
GraphPad Prism 7.04	GraphPad Software, San Diego (USA)
LightCycler 480 SW 1.5.0	Roche, Rotkreuz (CH)
SnapGene Software	GSL Biotech, Chicago (USA)

## **3.2 Mikro- und molekularbiologische Labormethoden**

### **3.2.1 Kultivierung von Bakterien in flüssigen und auf festen Medien**

Die verwendeten Stämme von *Ab* und *Ec* wurden stets aerob, auf LB-Agar-Platten oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C kultiviert. Für die Inokulation wurden entweder tiefgefrorene Glycerol-Stocks (-80°C) oder einzelne Kolonien von Agarplatten verwendet. Diese wurden in das Medium eingerührt bzw. mit Hilfe eines Drei-Ösenausstriches oder eines Drigalski-Spatels auf die Platte aufgetragen. Optional wurden den Medien Selektionsmarker oder andere Zusätze hinzugefügt. *Ab* AB5075 existiert in zwei Morphen: erreicht eine Kultur eine hohe OD, switcht der Phänotyp von einer opaken (virulenteren) Form zu einem transluzenten (weniger virulenten) Phänotyp (Tipton et al., 2015). Für diese Arbeit wurden zur phänotypischen Testung stets opake Zellen verwendet. Um einen Phänoswitch zu vermeiden, wurden die opaken Zellen ohne Schütteln und in Flüssigkultur lediglich bei RT kultiviert. Dadurch wurde vermieden, dass eine hohe Zelldichte erreicht und dadurch der Switch induziert wurde. Um die für Assays evtl. benötigten höheren Zellzahlen zu produzieren, wurden einfach mehrere Kulturen oder größere Volumina inokuliert und wie oben beschrieben kultiviert.

### **3.2.2 Isolation von Plasmid-DNA**

Hierfür wurde aus Übernachtskulturen des Bakteriums, welches das gewünschte Plasmid trug, mit Hilfe des Monarch® Plasmid Miniprep Kits - entsprechend der Anleitung des Herstellers - die Plasmid-DNA isoliert. Die resultierende DNA-Konzentration wurde an einem Nanodrop-Photometer gemessen und die Plasmid-DNA bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.3 Isolation von genomischer DNA**

Aus einer Übernachtskultur von *Ab* wurde die genomische DNA mit Hilfe des QIAGEN® DNeasy UltraClean Microbial Kits – entsprechend den Angaben des Herstellers– isoliert. Abweichend vom Hersteller-Protokoll wurde die Matrix-gebundene gDNA statt mit dem mitgelieferten Elution-Puffer mit sterilem aqua dest. eluiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die gDNA, falls nicht sofort verwendet, bei 4°C gekühlt aufbewahrt.

### 3.2.4 Kolonie-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Für eine Kolonie-PCR wurden pro Ansatz 50 µl steriles aqua dest. in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen und eine Agar-Platte, wahlweise inklusive Selektionsmedium, vorbereitet. Die zu untersuchenden Kolonien wurden mit kleinen Pipettenspitzen von ihren ursprünglichen Platten gepickt, auf die neue LB-Platte abgetupft und durch Auf- und Abpipettieren in den Eppendorf-Gefäßen im vorgelegten Wasser suspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden die Ansätze dann bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert, so dass intakte Zellen und Zelltrümmer von der freigesetzten DNA abgetrennt wurden. 3 µl des Überstandes wurde als Template für die PCR eingesetzt, welche nach nachfolgendem Schema ablief:

Tabelle 13 Kolonie-PCR – Reaktionsgemisch (bezogen auf ein Reaktionsgefäß)

Mango Mix (2x)	7,5 µl
Primer fwd + rev (10 µM)	je 0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
Template	3 µl
	<b>= 15 µl</b>

Tabelle 14 Kolonie-PCR – Programm

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	30 – 35 x
Annealing	primerspezifisch	30 s	
Extension	72°C	je nach Produktlänge (ca. 30 s pro kbp)	
Finale Extension	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Nach der PCR wurden die Reaktionsgemische zur Auftrennung und Analyse der PCR-Produkte auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Das 1 %ige Agarose-Gel selbst wurde aus 4 g Agarose und 400 ml 0,5x TBE hergestellt, welches

durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach anschließendem Abkühlen mit 12 µl SYBR Safe DNA gel stain (1:33000) versehen wurde. Je nach benötigter Gelgröße wurden 40-200 ml Gel in einen fixierten Schlitten, inklusive 16- oder 30-teiligem Kamm, gegossen und ca. 15 min aushärten gelassen. Nach dieser Zeit konnte der Kamm entfernt und das ausgehärtete Gel auf dem Gelschlitten in eine Gelelektrophorese-Kammer mit 0,5x TBE getaucht werden. Waren jeweils 10 µl der Proben und 5 µl eines geeigneten Markers aufgetragen, konnte die elektrophoretische Trennung im Gel bei 110 V für 60 min erfolgen. Abschließend erfolgte eine Dokumentation mit Hilfe des Imaging-Geräts FastGene FAS-V unter UV-Bestrahlung.

### **3.2.5 Western Blots zur Expressionskontrolle von Proteinen**

Zur Herstellung eines Western Blots wurden zunächst Übernachtskulturen hergestellt. Diese wurden am nächsten Morgen mit frischem Medium auf eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,2 verdünnt, anschließend bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> zwischen 0,6 und 0,8 kultiviert und schließlich die Proteinexpression induziert. Sollte die SurA-Expression der konditionellen *AbΔsurA*-Mutanten nach erfolgreichem Einbringen des pUC18T-mini-Tn7T-ara-SurA-Hyg-Plasmids überprüft werden, wurde dafür mit Arabinose (Endkonzentration 0,001 %) induziert. Für die Kontrolle (*E. coli* BL21 pCOLI-His paSurA FL clone 5) wurde zur Induktion der SurA-Expression IPTG (Endkonzentration 1 mM) verwendet. Die Kulturen wurden dann für weitere 2 – 4 h wachsen gelassen. Erneut wurde die OD<sub>600 nm</sub> der Proben gemessen und anschließend jeweils 1 ml der Proben abgenommen, um bei 4000 g für 5 min abzentrifugiert zu werden. Die Pellets der Proben wurden nach Verwerfen des Überstandes in einem 1:1-Gemisch aus 5 x Lämmli mit sterilem Wasser aufgenommen, wobei ca.  $1 \times 10^9$  Bakterien auf 2 ml Gesamtvolumen kamen. Für die sich anschließende SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gelelectrophoresis) mussten die Lämmli-Proben zunächst für 10 min bei 95°C aufgekocht werden. Auf Eis wurden sie anschließend abgekühlt und kurz abzentrifugiert. 10 µl der Proben (entspricht  $5 \times 10^6$  Bakterien pro Spur) und 5 µl der PAGE Ruler vorgefärbten Protein-Leiter als Marker konnten dann auf das Gel geladen und in 1x SDS-Laufpuffer für 60 min bei 110 V aufgetrennt werden.

Das SDS-Gel wurde in einem nächsten Schritt für den darauffolgenden Western-Blot in einem Blot-Sandwich nach nachfolgendem Schema zusammengebaut:

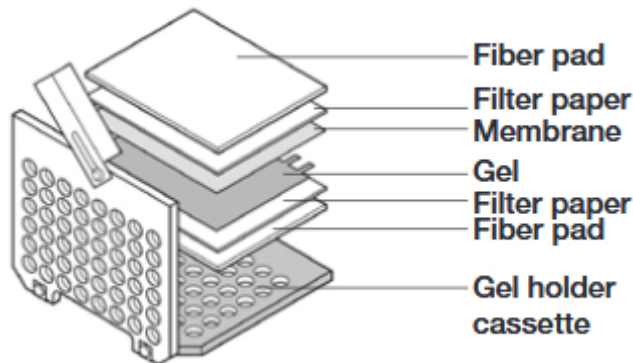


Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines Western Blot-Sandwichs (BioRad, 2016; <https://openwetware.org/wiki/File:GelSandwich.gif> [Zugriff 15.08.2022])

Als Membran diente dabei eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$ ). Durch Rollen mit einem 15 ml Reaktionsgefäß konnten Luftblasen herausgedrückt werden. 100 ml des 10 x Western Blot-Transferpuffers wurden durch Zugabe von 200 ml Methanol (Endkonzentration 20 %) und Auffüllen auf 1 l mit sterilem Wasser für den nachfolgenden Schritt des Blottings bereit gemacht und kühl gestellt. Das Blot-Sandwich wurde zusammen mit einem Kühlakku in eine Blotting-Kammer gehängt, diese mit dem 1 x Western Blot-Transferpuffer aufgefüllt und der Transfer auf die Western Blot-Membran bei 4°C und 0,3 Ampère für 1 h vollzogen.

Die Membran wurde nach dem Blotten dem Blot-Sandwich entnommen, kurz in VE-Wasser gelegt und durch eine 10-minütige Inkubation mit Ponceau S auf der Wippe gefärbt. Ponceau S färbt Proteine unspezifisch an. Dadurch können die Transfereffizienz bestimmt und die geladenen Proteinmengen verglichen werden. Nach anschließendem Entfärben durch dreimaliges kurzes Waschen mit VE-Wasser wurde eine Aufnahme der Gesamtproteinmenge am Detektionsgerät erstellt. Nicht benötigte Teile der Membran wurden abgeschnitten und die Membran dann für 1 h bei RT auf der Wippe mit 10 ml 1 x Blueblock abgesättigt. Nach dem Blocken der Membran konnte der erste Antikörper direkt hinzugegeben werden. Für den Nachweis der SurA-Expression (*Ab* und *Ec/Pa*)

wurde der AB\_SurA PP-serum Rabbit SA8994-Antikörper im Verhältnis 1:1000 zugegeben und für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde mit Tween-haltigem Western Blot-Waschpuffer 3 Mal je 5 min gewaschen, bevor die Membran wieder mit 10 ml 1 x Blueblock und dem Sekundärantikörper (goat anti rabbit POX-Antikörper) im Verhältnis von 1:1000 für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert wurde. Danach wurde die Membran weitere 3 Mal je 5 min mit Tween-haltigem Western Blot-Waschpuffer gewaschen und abschließend einmalig mit PBS.

Die gewaschene Membran wurde in einen Entsorgungsbeutel gelegt, mit ca. 800 µl Biorad-Substrat (1:1 Mischung aus Lösung 1 (enthält Luminol) und Lösung 2 (enthält Peroxid)) versehen und eine Aufnahme am Detektionsgerät angefertigt (Tischeinschubhöhe 1; für Blot-Marker Blende bei 5,6 und für das Signal Blende bei 0,86).

### **3.3 Spezifische Versuche mit AB5075**

#### **3.3.1 Generierung eines Mutatorplasmids**

Die für die Generierung der konditionellen  $\Delta$ *surA*-Mutante angewandte Methodik folgte der von Kumar et al. (2010) etablierten Mini-Tn7 Vektor-Strategie. Zunächst wurde dabei das geeignete Mutatorplasmid aus dem pJM220- puC18T-miniTn7T-gm-rhaSR-PrhaBAD Vektorplasmid generiert. In einem ersten Schritt erfolgte ein Austausch der vorhandenen Gentamicin- zu einer Hygromycin-Resistenzkassette. Über eine PCR wurde das Plasmid so eröffnet, dass alle Komponenten des Rhamnose-induzierbaren Promoters entfernt wurden. Im Anschluss wurde die coding sequence des *Ab* SurA unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promoters inseriert. Das resultierende Plasmid ermöglicht eine Insertion in die attTn7 site downstream des *glmS*-Gens in das Genom von *Ab*. Von diesem Locus wurde bereits gezeigt, dass Insertionen ohne nachteilige Auswirkungen auf die Fitness von *Ab* sind (Kumar et al., 2010).

### 3.3.1.1 Linearisierung des Vektorplasmids

Aus Übernachtskulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$ \_pJM220 in 10 ml LB mit 100  $\mu$ l Ampicillin wurde das pJM220-Vektorplasmid, wie unter 3.2.2 beschrieben, isoliert.

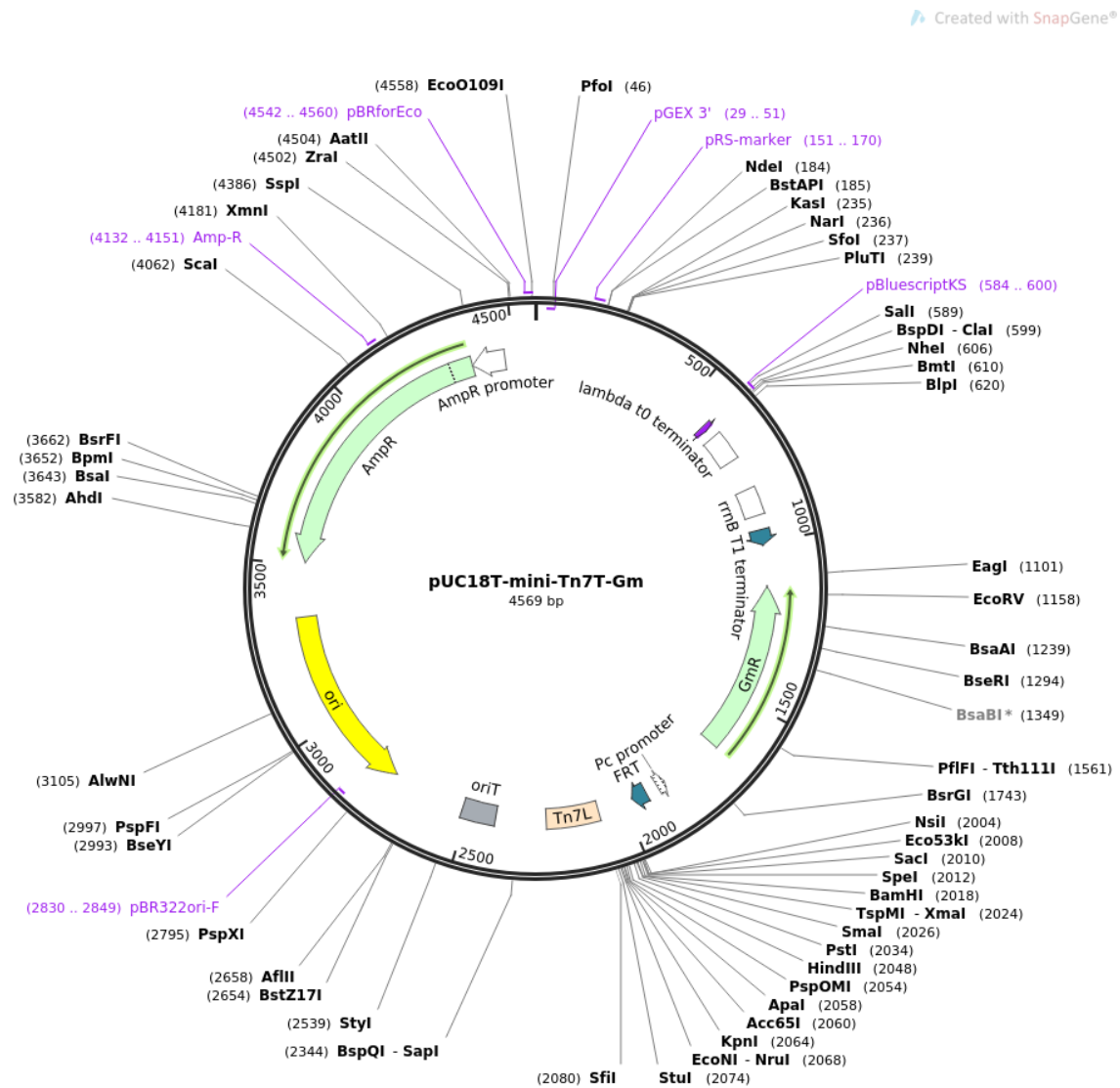


Abbildung 2 Plasmidkarte des pJM220-pUC18T-mini-Tn7T-Gm-Vektorplasmids

Für die Integration der gewünschten DNA-Inserts in das Vektorplasmid, musste dieses zunächst linearisiert und amplifiziert werden. Dies erfolgte unter Verwendung der KAPA-Polymerase unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 15 KAPA-PCR – Reaktionsgemisch (bezogen auf ein Reaktionsgefäß)

5x KAPA-Puffer (mit MgSO <sub>4</sub> )	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
KAPA-HiFi-Polymerase (1 U/ µl)	0,5 µl
Primer fwd + rev (10 µM)	je 0,5 µl
H <sub>2</sub> O	36,5 µl
Plasmid-Template (100 ng/µl)	1 µl
	<b>= 50 µl</b>

Tabelle 16 KAPA-PCR – Programm

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	30 – 35 x
Annealing	primerspezifisch (aufgrund der langen Überhänge oft sehr hoch, siehe Tabelle 4)	30 s	
Extension	72°C	je nach Produktlänge (bei KAPA-Polymerase 15-60 s pro kbp)	
Finale Extension	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Ein erfolgreiches Öffnen des pJM220-Vektorplasmids wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese bei 100 V für 40 Minuten überprüft. Für die Ansätze, die auf dem Gel sichtbare Banden zeigten, wurden entweder die Gel-Bereiche ausgeschnitten und anschließend mit dem Wizard® Clean-Up Kit aufgereinigt oder die PCR-Ansätze direkt gepoolt, wenn nur ein einziges sauberes PCR-Produkt auf der richtigen Höhe im Gel zu sehen war. In beiden Fällen wurde in einem nächsten Schritt ein Endonuklease-Verdau eingeleitet. Endonukleasen spalten ausschließlich (hemi-)methylierte DNA, so dass die nicht-methylierten

PCR-Produkte gegenüber der Template-DNA selektioniert werden können. Die gesammelten Ansätze wurden also mit 1 µl DpnI versetzt und für 1 h bei 37 °C und Schütteln bei 350 rpm in einem Heizblock inkubiert. Es erfolgten eine (weitere) Aufreinigung mit dem Wizard® Clean-Up Kit und abschließend eine Konzentrationsbestimmung für die weitere Verwendung des Vektorplasmids.

### 3.3.1.2 Vorbereitung der DNA-Inserts

Aus Übernachtskulturen von *E. coli* Stbl3\_Topo\_HygroR in 10 ml LB mit 100 µl Hygromycin bzw. *Ab* AB5075 WT in 10 ml LB wurde, wie unter 3.2.3 beschrieben, genomische DNA isoliert. Für die Amplifizierung des gewünschten Hygromycin- bzw. des Arabinose-induzierbaren *surA*-Inserts (Amplifikation aus *araC\_SurA-surApVT77*, Strain No. 2141) erfolgte analog zu der Amplifizierung des Vektorplasmids eine KAPA-PCR. Alle dafür verwendeten Primer sind unter 3.1.3 aufgeführt. Es schlossen sich ebenfalls eine Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung, eine Aufreinigung (wie oben beschrieben) und eine Konzentrationsbestimmung an.

Die Ligation der Fragmente für die Hygromycin-Resistenzkassette und das induzierbare *Ab-surA*-Gen mit dem pJM220-Vektorplasmid erfolgte über die Assemblierungsmethode nach Gibson et al. (2009). Hierbei können multiple lineare DNA-Fragmente mit Hilfe dreier Enzyme zu vollständig ligierten, doppelsträngigen DNA-Molekülen fusioniert werden. Bei den Enzymen handelt es sich um eine Phusion-DNA-Polymerase, eine *Taq*-DNA-Ligase und eine T5-Exonuklease. Letztere verdaut die Enden der Fragmente in 5'-3'-Richtung. Durch die so von der T5-Exonuklease erzeugten „sticky ends“, können überlappende Enden der in den PCRs generierten Fragmenten aneinanderlagern. Entstandene Lücken werden von der Phusion-DNA Polymerase geschlossen und die Stränge durch die *Taq*-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Die Assemblierung der beiden Inserte mit dem Vektorplasmid fand in zwei aufeinanderfolgenden Schritten statt, wobei mit dem Austausch der Gentamicin-Resistenzkassette begonnen wurde.

Für das Gibson-Assembly wurden jeweils 1 µl des Insert-Ansatzes (~100 ng/µl) in 1:10 – Verdünnung, 4 µl des linearisierten Vektorplasmids (~100 ng/µl) und 10 µl eines hausintern hergestellten Gibson-Mixes zusammengeführt. Es folgte eine

50-minütige Inkubation bei 50 °C und 350 rpm in einem Heizschüttler. Anschließend wurde dem Gemisch 1 µl DpnI zugegeben und bei 37 °C 1 h verdaut.

#### **3.3.1.3 Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$**

10 µl des DpnI-verdauten Insert-Gibson-Mixes wurden mit 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  vermischt. Für diese Transformation wurde der Ansatz aus Bakterien und dem Insert-Gibson-Mix für 20 Minuten auf Eis gelagert. Es folgten ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C, die Aufnahme in 900 µl vorgewärmtes S.O.C-Medium und eine einstündige Inkubation bei 37 °C und 350 rpm. 100 µl des Ansatzes konnten dann direkt auf eine LB-Platte mit Hygromycin (250 µg/ml) gegeben werden. Der Rest des Ansatzes wurde abzentrifugiert, das resultierende Pellet in 100 µl LB resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausplattiert. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **3.3.1.4 Verifizierung des Mutatorplasmids**

Zeigte sich auf den Selektivplatten am nächsten Tag ein Wachstum der transformierten Zellen an *E. coli* DH5  $\alpha$ , wurde eine erfolgreiche Aufnahme der erzeugten Plasmide in die Zellen über eine Kolonie-PCR und Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Als Kontrolle diente das unveränderte pJM220-Vektorplasmid aus 3.3.1.1.

Zudem wurden die Proben zur Verifizierung einer Sequenzierung durch Eurofins Scientific unterzogen. Hierfür wurden aus Übernachtskulturen der transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$ \_pJM220\_Hygro bzw. *E. coli* DH5 $\alpha$ \_pJM220\_Hygro\_AB-SurA in LB mit 250 µg/ml Hygromycin die Plasmide mit Hilfe des Monarch® Plasmid Miniprep Kits isoliert. Die Konzentration dieser wurde mit sterilem Wasser auf 100 ng/µl in 15 µl Endvolumen eingestellt. 2 µl der jeweiligen Sequenzierprimer wurden hinzugegeben. Die Ergebnisse wurden nach erfolgter Sequenzierung durch Eurofins mit der Software SnapGene ausgewertet. Konnte ein fehlerloses Alignment mit den vorab mit Hilfe von SnapGene *in silicio* generierten Vektorkarten festgestellt werden, wurden die jeweiligen Klone als *E. coli* Dh5 $\alpha$ -Mutatorplasmid-Stämme in die Stammsammlung aufgenommen und bei -80 °C in LB-Glycerol aufbewahrt.

### **3.3.2 Mutagenese von *Ab***

Um gezielt Veränderungen im Genom von *Ab* zu bewirken, kann man sich die unter 1.1.1 erwähnten Eigenschaften von selbigem zu Nutze machen. So gibt es mehrere Wege, die generierten Mutatorplasmide in die Bakterienzellen einzubringen und damit die gewünschten K.O.-Mutanten zu erzeugen.

#### **3.3.2.1 Twitching**

Für diese Methode wurde ein spezieller Weichagar („motility agar“, siehe 3.1.7) verwendet. Dieser wurde am Tag der Verwendung frisch zubereitet und stand, sobald in Petrischalen gegossen, nicht länger als 20-30 Minuten offen. Die spezielle, feuchte Konsistenz des Agars ermöglicht den Bakterien des Stammes AB5075, sich über die ihnen eigene Fähigkeit zum Twitching fortzubewegen und dabei über horizontalen Gentransfer das gewünschte Plasmid als freie DNA in sich aufzunehmen (Wilharm et al., 2013).

Von einem Dreiösenausstrich wurden einzelne Kolonien der gewünschten Stämme gepickt. Diese wurden dann in eine vorbereitete Lösung von 20 µl sterilem PBS gegeben, die auf einen Gehalt von 4 oder 8 µg an gewünschtem Mutatorplasmid eingestellt war. Nach ausreichend Vermischen der Bakterien-Plasmid-Suspension konnte die Weichagar-Platte inokuliert werden. Dafür wurden an ca. 7 Punkten der Platte je 2 µl der Suspension in die Interphase zwischen Plattenboden und Agar eingespritzt. Die Platten wurden zur Inkubation mit dem Deckel nach oben gelagert und mussten mit Parafilm verschlossen werden, da sonst die Gefahr der Austrocknung bestand.

Waren die Bakterien in gewünschter Weise gewachsen und ausgeschwärmt, wurden mit PBS zunächst die oberflächlich gewachsenen Bakterien abgewaschen und gesammelt, bevor dann durch Einstechen in den Agar auch die Bakterien der Interphase zum Sammeln ab gespült werden konnten. Die gesammelte Flüssigkeit wurde zentrifugiert und das in 100 µl PBS resuspendierte Pellet auf ein geeignetes Medium ausgespatelt.

#### **3.3.2.2 Mating**

Für eine Transformation über den von Kumar et al. (2010) etablierten Vorgang des Matings wurden neben dem Stamm, der das gewünschte Mutatorplasmid

enthält, weitere Stämme benötigt, die sogenannte Helferplasmide lieferten. Zur Insertion der Arabinose-induzierbaren *surA*-Kassette (*araC\_SurA*) bei der Generierung konditioneller Mutanten waren dies *E. coli* SM10 mit dem pTNS3-Helferplasmid als Lieferant des Tn7-Transposase-Gens *tnsABCD*, *E. coli* HB101 als Träger des pRK2013-Plasmids zur Mobilisation nicht selbst-transmissibler Plasmide und *E. coli* DH5 $\alpha$  als Träger des zuvor generierten Mutatorplasmids pUC18T-mini-Tn7T-Ara-SurA-Hyg.

Von all diesen und dem zu transformieren gewünschtem Stamm wurden Übernachtskulturen angesetzt. Aus diesen wurden am nächsten Tag je 100  $\mu$ l entnommen und jeweils mit 600 ml vorgewärmter LB-Bouillon gemischt. Das Gemisch wurde zentrifugiert, das Pellet in LB gewaschen und in 100  $\mu$ l LB resuspendiert. 50  $\mu$ l in jeder Suspension wurde auf dieselbe LB-Platte gegeben, mit einem Drygalsky-Spatel gleichmäßig auf der Platte verteilt und vermischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der entstandene Zellrasen konnte am nächsten Tag gänzlich von der Platte abgetragen und in 0,85 % NaCl resuspendiert werden. Danach wurde die Suspension erneut auf Platte gebracht – im genannten Beispiel mit 250  $\mu$ l/ml Hygromycin B, 15  $\mu$ l/ml Streptomycin und 15  $\mu$ l/ml Gentamicin zur Selektion erfolgreich transformierter *Ab*-Zellen.

### 3.3.2.3 Elektroporation

Das Prinzip der Elektroporation wurde zunächst vornehmlich von unserem Arbeitsgruppenmitglied PD Dr. Bohn nach dem speziell für *Pa* optimierten Protokoll von Choi et al. (2006) zur Transformation von *Pa* angewendet. Dabei ändert das angelegte elektrische Feld die Permeabilität der Bakterienzellmembran. So kann selbst DNA als geladenes Molekül in linearer oder in zirkulärer Form in das Bakterium aufgenommen werden (Jacobs, Thompson, Gebhardt, et al., 2014).

In mehreren Durchläufen stellte sich heraus, dass auch *Ab* sich durch diese Methode zuverlässig und effizient transformieren lässt. Dies war auch der Fall, wenn, wie zur Generierung konditionaler *surA*-Mutanten, mehr als ein Plasmid transformiert werden sollte. Dabei wurden zunächst aus Übernachtskulturen elektrokompente Zellen vorbereitet. Die abzentrifugierten Pellets der

Übernachtkulturen wurden dazu jeweils mindestens zwei Mal mit 1 ml 300 mM Sucrose gewaschen. In 100 µl der 300 mM Sucrose wurden die Bakterienzellen dann mit 100 ng, bei Einsatz zweier Plasmide mit je 50 ng, zuvor isolierter Plasmid-DNA vermischt.

In speziellen Elektroporations-Küvetten erfolgte dann die eigentliche Elektroporation bei 2,5 kV. Direkt nach dem Stromimpuls wurde die Suspension auf Eis lagernd in 1 ml LB aufgenommen und 1 h bei 37°C geschüttelt inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und in 100 µl LB resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden auf Platten, wahlweise mit Selektionsmedium, ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Im konkreten Fall der Generierung der konditionalen araC\_SurA-Mutanten wurden im Unterschied zu einer Transformation über die Methode des Matings das pRK2013-Plasmid nicht benötigt. Somit wurde, wie bereits erwähnt, zunächst mit zwei Plasmiden, dem pUC18T-mini-Tn7T-Ara-SurA-Hyg-Mutatorplasmid und dem pTNS3-Helferplasmid, elektroporiert. Dieser ersten Elektroporation schloss sich, nach erfolgtem Wachstum auf LB-Platten mit 250 µg/ml Hygromycin, eine zweite Elektroporation unter Verwendung des pFLP3-TelR-tdk-Plasmids an. Dieses kodiert für eine Flp-Rekombinase, eine Tellurit-Resistenz und eine heterologe Thymidinkinase. Die erfolgreiche Aufnahme des Plasmids konnte anhand von nun möglichem Wachstum der Bakterien auf LB-Platten mit 30 µg/ml Tellurit überprüft werden. Dadurch sollte aus der im Vorangegangenen frisch in die Bakterien eingebrachten araC\_SurA-Kassette, durch Plasmid-induzierte Exzision zwischen den FRT-Sites, der die Hygromycin-Resistenz kodierende Abschnitt entfernt werden. Auch das pFLP3-Plasmid selbst wurde anschließend durch den Einsatz von AZT wieder entfernt. Durch die Zugabe von 1 mM IPTG wurde zunächst die Expression der Thymidinkinase induziert, so dass die Zugabe von AZT einen zytotoxischen Effekt bewirkt und alle Bakterien, die das pFLP3-Plasmid noch tragen, im Wachstum unterdrückt werden. Nach einer letzten Verifikation über Wachstumsverhalten auf LB-Platten mit jeweils 250 µg/ml Hygromycin, 30 µg/ml Tellurit und wiederum 200 µg/ml AZT, konnten die neuen und nur auf den AZT-Platten gewachsenen Mutanten gewonnen und in die Stammsammlung eingepflegt werden.

### **3.3.3 Generierung homogener Populationen opaker Zellen**

Wie unter 1.1.1 beschrieben, kommt es bei einigen *Ab*-Stämmen, darunter auch der hochvirulente Stamm AB5075, zu einem sogenannten Phasenwechsel zwischen transluzenter und opaker Erscheinungsform, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps deutlich unterscheiden (Tipton et al., 2015).

Die Herstellung homogener Populationen opaker oder transluzenter Zellen ist für verlässliche Testdurchführungen und reproduzierbare Ergebnisse also höchst relevant. Soweit möglich, wurde vornehmlich mit den weitaus virulenteren opaken Zellen gearbeitet, nach welchen nach dem Protokoll von Anderson et al. (2019) sortiert wurde.

Dafür wurden die gewünschten Bakterien zunächst in einem Dreiösenausstrich auf speziellen PV (Phasenvariation)-Agar (siehe 3.1.7) aufgebracht. Aus den sich ergebenden Einzelkolonien wurde durch Betrachten gegen künstliches Licht am nächsten Tag eine gut abgrenzbare Kolonie des opaken Phänotyps ausgewählt und diese wiederum per Dreiösenausstrich auf eine 1× LB-Agar-Platte gegeben. Die über Nacht neu gewachsenen Kolonien wurden mikroskopisch betrachtet und 2-3 besonders kleine Kolonien ausgewählt, um diese jeweils separat in 2 ml LB-Bouillon zu inokulieren. Wichtig war wiederum, diese bei RT und ohne Schütteln wachsen zu lassen, da der Phasenwechsel ein von der Zelldichte abhängiger Prozess ist (Tipton et al., 2015) und die OD<sub>600 nm</sub> der Ansätze am nächsten Tag noch immer kleiner als 0,1 sein sollte. War letzteres der Fall, wurden aus den Übernachtskulturen erneut Dreiösenausstriche auf PV-Agar angefertigt und die Zwischenstufen als Glycerol-Stocks gesichert.

Für eine finale Beurteilung der Reinheit der opaken Stocks wurden die Kolonien auf den PV-Platten erneut vor künstlichem Licht betrachtet und lediglich absolut reine Kulturen für den weiteren Gebrauch und die Stammsammlung verwendet. Aus einem für gut befundenen Stock der zwischengelagerten Glycerol-Stocks wurden abschließend aus 9 x 5 ml Übernachtskulturen drei Glycerol-Stocks gefertigt, diese in die Stammsammlung eingepflegt und bei -80 °C gelagert.

### **3.3.4 Maneval-Färbung**

Um die Homogenität der wie zuvor beschrieben gewonnenen opaken Zell-Stocks durch eine weitere Methode zu evaluieren, wurde eine Kapselfärbung durchgeführt.

Mit den Reagenzien Kongorot und Maneval-Farbstoff konnte die verdickte Kapsel opaker Zellen als ungefärbter Halo sichtbar gemacht und opake und transluzente Zellen unter dem Mikroskop eindeutig unterschieden werden. Hierfür wurde eine Einzelkolonie in 10 µl PBS gegeben und 5 µl der Suspension auf die linke Seite eines Objektträgers aufgetropft. Ein Tropfen 1 %iger Kongorot-Lösung wurde hinzugefügt und mit dem Zellmaterial gut vermischt. Dieses Gemisch wurde dann mit Hilfe eines zweiten Objektträgers zu einem dünnen Film ausgestrichen. Diesen ließ man trocknen und fügte dann drei Tropfen Maneval's Stain auf ein Stück Parafilm. Der Objektträger wurde dann kopfüber, mit der Seite der getrockneten Bakteriensuspension, in die Tropfen auf dem Parafilm gelegt und auf diese Weise für 2 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Präparat luftgetrocknet, in Roti-Histol (Carl Roth) eingebettet und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Anschließend konnten die Zellen mit dem Ölimmersions-Objektiv unter dem Mikroskop betrachtet und beurteilt werden.

### **3.3.5 Antibiotika-Suszeptibilitätstestung**

#### **3.3.5.1 E-Test**

Um die Empfindlichkeit eines Bakteriums gegenüber ausgewählten Antibiotika zu bestimmen, bedient man sich u.a. sogenannter Epsilometertests (E-Test). Dabei handelt es sich um einen mit einem bestimmten Antibiotikum, in dieser Arbeit Tobramycin, imprägnierten Papierstreifen, bei dem die Konzentration an Antibiotikum von oben nach unten abnimmt. Die genauen Wirkstoffkonzentrationen sind vom Hersteller auf den Teststreifen aufgebracht, so dass ein Ablesen der MHK nach Bewachsen der Platte visuell möglich ist.

Von tags zuvor vorbereiteten Dreiösenaustrichen wurden für die Durchführung eines E-Tests Einzelkolonien gewonnen und in 1 ml 0,9 % NaCl eingerührt. Durch Vortexen wurden die Suspensionen gut homogenisiert und auf einen McFarland von 0,5 (+/- 0,03) eingestellt. Mittels eines sterilen Wattestäbchens wurde die

Suspension dann drei Mal kreuzförmig und möglichst lückenlos auf eine Platte ausgestrichen und der Teststreifen anschließend mittig darauf platziert. Die Platten wurden mit dem Deckel nach oben über Nacht bei 37°C inkubiert und konnten am nächsten Tag abgelesen werden. Dabei entsprach die minimale Hemmkonzentration (MHK) der angegebenen Konzentration am Schnittpunkt des unteren Randes der Inhibitionszone mit dem Teststreifen.

### **3.3.5.2 MICRONAUT – Mikrobouillon-Dilutions-Assay**

Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Test für die Empfindlichkeitsermittlung ausgewählter Bakterien gegenüber spezifischen Antibiotika, wobei das grundlegende Testverfahren auf dem Prinzip der Mikrobouillon-Dilution basiert.

Die Testung erfolgte in Kationen-angepasster Müller-Hinton Bouillon (MHBII) und erforderte ein mehrstufiges Vorgehen: zunächst waren die Verdünnungen des gewünschten Antibiotikums auf 96-well-Platten vorzubereiten. Dafür wurde eine Antibiotikum-Stocklösung in der doppelten Konzentration wie final gewünscht in MHBII angesetzt und jeweils 50 µl davon in die Wells der ersten Spalte der Platte gegeben. Manuell, oder automatisch mit einem Pipettier-Roboter (Integra ViaFlo), wurden dann von der zweiten Spalte an in jedes Well 50 µl MHBII-Medium vorgelegt. In die Spalte der Sterilitätskontrolle wurden nochmals 50 µl MHBII-Medium pipettiert, da hier keine Bakteriensuspension mehr hinzukam. Nun wurden auch in die erste Spalte eines jeden Wells 50 µl MHBII zugegeben und durch auf- und abpipettieren gut durchmischt. Mit frischen Spitzen wurden 50 µl aus den Wells der Spalte 1 in die Wells der Spalte 2 pipettiert und wieder gut durchmischt. Analog wurde auf diese Weise fortgefahren und zuletzt in der letzten Verdünnungsspalte vor Wachstums- und Sterilitätskontrolle 50 µl entnommen und verworfen. Die Platte war somit bereit für das Beimpfen mit dem Inokulum.

Das Inokulum wurde aus Einzelkolonien von tags zuvor vorbereiteten Dreiösenaustrichen gewonnen. Die Kolonien wurden einzeln in 1 ml NaCl (0,9 %) eingerührt und durch Vortexen gut homogenisiert, bis die Trübung einem McFarland von 0,5 entsprach. 100 µl dieser Bakteriensuspension konnten dann in 11,5 ml Mueller-Hinton Bouillon gegeben (1:115 – Verdünnung) und gut

vermischt werden. In einem letzten Schritt wurde die Testplatte beimpft, indem jeweils 50 µl der Bakteriensuspension in die Wells mit den vorbereiteten 50 µl Antibiotikaverdünnung pipettiert wurden – ausgenommen der Sterilitätskontrolle.

Wurden bereits vorkonfektionierte Platten verwendet, war lediglich das Inokulum in einer 1:230-Verdünnung der Bakteriensuspension mit einem McFarland von 0,5 in MHB-II vorzubereiten. Davon wurden dann je 100 µl pro Well in die Platte pipettiert. Die Antibiotika lagen darin in dehydrierter Form in unterschiedlichen Konzentrationen vor und wurden durch die Zugabe der Bakterienlösung gelöst.

Unter Verschluss mit atmungsaktiven Folien konnten in beiden Fällen nach 12 – 18 h Inkubation in einer Feuchtkammer bei 37°C die OD<sub>600 nm</sub> – Werte im Tecan-Photometer gemessen und die Platten visuell mit Hilfe eines Spiegelsystems beurteilt werden.

### **3.3.6 Zytochrom C – Assay**

Zum Vergleich der Zelloberflächenladungen von K.O.-Mutanten und *Ab* AB5075 Wildtyp wurde ein von Peschel et al. (1999) veröffentlichter Assay adaptiert, der Zytochrom C als Stellvertreter für Tobramycin verwendet. Zytochrom C ist ein kationisches Molekül, das an die negativ geladenen LPS, Phospholipide und Außenmembranproteine der Gram-negativen Bakterien binden kann. Je nachdem wie die Membranen der verschiedenen Mutanten folglich beschaffen sind, wird Zytochrom C verschieden stark gebunden. Dies kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 530 nm quantifiziert werden. So können Rückschlüsse getroffen werden, ob eine Deletion der periplasmatischen Chaperone in *Ab* eine Veränderung der Zelloberflächenladung bewirkt.

Aus Übernachtskulturen wurde nach zwei Waschschritten mit je einmal 100 mM Phosphatpuffer und einmal 20 mM MOPS-Puffer die jeweils gleiche Menge an Zellen in MOPS-Puffer eingestellt. Die einer OD<sub>600 nm</sub> von 6 entsprechende Menge an Bakterien wurde in ein Eppendorf-Gefäß transferiert, abzentrifugiert und in 100 µl MOPS-Puffer resuspendiert. Die Suspension konnte dann mit einer definierten Menge an Zytochrom C (15 mg/ml in MOPS-Puffer) vermischt und für 15 Minuten bei RT auf einem Röhrchenrotator inkubiert werden. Nach der Inkubation und einer anschließenden Zentrifugation wurden 100 µl des

Überstands abgenommen und in eine klare 96-well Platte überführt. Damit wurde die photometrische Quantifizierung des Zytochrom C bei 530 nm aus dem Überstand vorgenommen. Hiermit konnte ermittelt werden, welcher Anteil der ursprünglich zugegebenen Menge an Zytochrom C von den Bakterien gebunden wurde. 0 % Bindung entsprach demnach, dass nach der Inkubation des Zytochrom C-haltigen Puffers mit den Bakterien der gesamte Zytochrom C-Input im Überstand verblieben war. 100 % Bindung bedeutete, dass nach der Inkubation der gesamte Zytochrom C-Input mit dem Bakterienpellet assoziiert und kein Zytochrom C im Überstand mehr nachweisbar war. Um diese Werte abschließend auf die gleiche Bakterienzahl zu relativieren, wurde der restliche Überstand von den Bakterienpellets entfernt und verworfen. Die Bakterien-Pellets wurden dann erneut in MOPS resuspendiert. 100 µl davon wurden in eine weitere klare 96-well Platte überführt und im Tecan Plattenlesegerät die exakte OD<sub>600 nm</sub> für eine rechnerische Relativierung und Auswertung ermittelt.

### **3.3.7 Transkriptomanalyse durch RNA-Sequenzierung**

In einer Transkriptomanalyse, die vergleichend zwischen dem WT und der *surA*-Deletionsmutante von AB5075 stattfand, wurde nach veränderten Expressionslevels von Resistenzdeterminanten gesucht, welche einen Einfluss auf Aminoglykosidresistenz haben können. Zu diesen zählen u.a. die Gruppe der AMEs und einige weitere ausgewählte Kandidaten (vollständige Auflistung siehe 4.1.3, Tabelle 22). Durch Zugabe einer subinhibitorischen Tobramycin-Konzentration zu einer Hälfte des Sample-Sets wurde in diesem Kontext zudem versucht, eine Stressantwort in den Zellen von sowohl WT als auch  $\Delta$ *surA*-Mutante zu induzieren. So sollte in diesen, im Vergleich zu unbehandelten Kulturen, die Reaktion auf einen Stimulus mit einem Aminoglykosid erfasst und verglichen werden.

In einem Vorversuch wurden zunächst die MHK-Werte für *Ab* AB5075 WT und die  $\Delta$ *surA*-Mutante für Tobramycin ermittelt. Dafür wurden 5 ml LB in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit unterschiedlichen Mengen an Tobramycin versehen, jeweils mit einer definierten Anzahl von  $5 \times 10^8$  Bakterienzellen (entsprechend einer OD<sub>600 nm</sub> von 1) beimpft und exakt 14 h bei RT über Nacht wachsen

gelassen. Anhand einer photometrischen Dichtemessung am nächsten Tag konnten so die MHK-Werte unter diesen Bedingungen bestimmt werden. Als Cutoff für Wachstum wurde eine  $OD_{600\text{ nm}} < 0,1$  bestimmt. Dabei wurde eine MHK von 128 mg/l für *Ab* AB5075 WT und von 32 mg/l Tobramycin für *Ab* AB5075  $\Delta$ *surA* bestimmt.

### 3.3.7.1 RNA-Extraktion und -Aufreinigung

An einem separaten Arbeitsplatz (Minimierung der Degradation durch RNAsen) wurden Übernachtskulturen vorbereitet. Da lediglich eine subinhibitorische Konzentration von Tobramycin eingesetzt werden sollte, legten wir diese auf die Hälfte der jeweils zuvor ermittelten MHK-Werte fest. Da sich die MHK für die beiden Stämme unterscheidet, wurde zusätzlich ein Ansatz integriert, bei dem *Ab* AB5075 WT mit der für die  $\Delta$ *surA*-Mutante ermittelten subinhibitorischen Konzentration von 16 mg/l inkubiert wurde. Daraus ergab sich das folgende Probenset:

1. AB5075 WT unbehandelt
2. AB5075 WT + 64 mg/l Tobramycin
3. AB5075 WT + 16 mg/l Tobramycin
4. AB5075  $\Delta$ *surA* unbehandelt
5. AB5075  $\Delta$ *surA* + 16 mg/l Tobramycin

Für die Anzucht der Kulturen wurden jeweils 5 ml LB in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben, diese gegebenenfalls mit den entsprechenden Mengen an Tobramycin versehen und jeweils mit einer definierten Anzahl von  $5 \times 10^8$  Bakterienzellen beimpft. Die Ansätze wurden für exakt 14 h bei RT ohne Schütteln über Nacht wachsen gelassen.

Am nächsten Tag wurde aus den Bakterien dann mit Hilfe des QIAGEN® RNeasy Micro Kits – entsprechend den Angaben des Herstellers – die RNA isoliert. Die isolierte RNA wurde sofort auf Eis gelagert und eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Um in allen weiteren Schritten der Transkriptomanalyse mit biologischen Triplikaten arbeiten zu können, wurde an drei unterschiedlichen Tagen RNA aus jeweils frisch und wie oben beschrieben angesetzten Übernachtskulturen

gewonnen. Alle RNA-Proben wurden dreifach mit DNase I (rekombinant, RNase-frei) nachverdaut.

Für diesen DNA-Verdau wurden die RNA-Proben jeweils wie folgt angesetzt:

Tabelle 17 DNase-Verdau – Reaktionsgemisch (bezogen auf ein Reaktionsgefäß)

Gesamt-RNA	10-50 µg
Inkubations-Puffer (10 x)	5 µl
DNase I (rekombinant, RNase-frei)	10 U bzw. 1 µl
Wasser (RNase-frei)	ad 50 µl

Mit Hilfe eines Vortexmischers wurden die Ansätze gut durchmischt und anschließend bei 37 °C für 20 min inkubiert. Um die Reaktion wieder zu stoppen, wurden dann 2 µl EDTA (0,2 M, pH=8) hinzugefügt, erneut gevortext und die Ansätze bei 75 °C für 10 min inkubiert. Die aufgereinigte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.3.7.2 Qualitätsüberprüfung der Proben durch (RT-)qPCR

Zur Überprüfung, ob die genomische DNA erfolgreich abgereichert wurde und in allen Proben eine äquivalente Menge an RNA vorhanden war, wurden die Ansätze quantitativen PCRs im Lightcycler unterzogen. Dabei wurden *surA*-spezifische Primer verwendet, da in der *ΔsurA*-Mutante so nur bei Anwesenheit von genomischer DNA eine Amplifikation zu erzielen war. Für die WT-RNA hingegen würde sich bei ausreichendem DNA-Verdau ein sehr viel höherer C<sub>t</sub> (Cycle Threshold) -Wert der PCR aus nicht transkribierter RNA als aus vorher in cDNA umgeschriebener RNA ergeben. Alle Proben wurden daher jeweils mit Hilfe zweier qPCR-Kits analysiert: Dem QuantiFast® SYBR® Green RT-PCR-Kit, wobei die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben wurde und sich dann eine qPCR anschloss. Und dem QuantiFast® SYBR® Green PCR-Kit, bei welchem ohne den Schritt einer Reversen Transkription direkt eine qPCR erfolgte. Pro Reaktion wurden ca. 100 ng RNA als Template eingesetzt und alle Schritte entsprechend den Herstellerangaben befolgt. Zusätzlich wurden die RNA-Proben in einer einfachen Gelelektrophorese (siehe 3.2.4) auf 1 %igem Agarose-Gel auf mögliche, als Banden sichtbare DNA-Verunreinigungen untersucht.

### 3.3.7.3 RNA-Sequenzierung

Nach Kontrolle der RNA-Proben auf eine erfolgreiche Abreicherung genomischer DNA hin, wurden die RNA-Proben dem NGS Competence Center Tübingen (NCCT) überlassen. Dort führte Kristina Engesser die weiteren Vorbereitungen der RNA zur Sequenzierung durch, bei der u.a. mit Hilfe des Zymo-Seq RiboFree total RNA Library Prep Kits die noch enthaltene ribosomale RNA depletiert wurde und führte die eigentliche Sequenzierung per Illumina NextSeq500 (2x75bp, MidOutput Flowcell) durch. Eine anschließende bioinformatische Auswertung erfolgte durch Jennifer Müller (NCCT).

### 3.3.7.4 Datenanalyse

Für die Analyse der RNA-Sequenzierdaten und die zugehörige differenzielle Expressionsanalyse wurde die *RNAseq* Pipeline (v 3.6) von *nf-core* verwendet. Diese Pipeline ermöglicht eine grundlegende Analyse von RNA-Sequenzierdaten inklusive QC (quality control, Qualitätskontrolle), Quantifizierung und einer einfachen differentiellen Expressionsanalyse mit standardisierten Parametern. Für die Analyse wurden die Rohdaten der Sequenzierung sowie ein annotiertes Referenzgenom benötigt. In diesem Fall wurde das Referenzgenom des *Ab*-Stammes AB5075-UW (GCF\_000963815.1\_ASM96381v1) verwendet, das sowohl das Genom als auch seine 3 Plasmide umfasst. Da die *nf-core/rnaseq* Pipeline für Eukaryoten ausgelegt ist, mussten default Parameter für die Benutzung mit Prokaryoten angepasst werden. Zunächst wurde der „*—featurecounts\_group\_type*“ von „gene\_biotype“ auf „Name“ geändert, um später eine differentielle Expressionanalyse auf Genebene durchführen zu können. Zusätzlich wurde der „*—featurecounts\_feature\_type*“ von „exon“ auf „transcript“ geändert, da es in Prokaryoten keine Unterscheidung von Exon und Intron gibt und diese somit auch nicht in den Annotationen aufgeführt werden. Als Aligner der Sequenzierdaten auf das Referenzgenom wurde *Hisat2* (v 2.2.0) verwendet. Eine ausführliche Dokumentation für genauere Details über die Parameter findet sich unter <https://nf-co.re/rnaseq/3.6>. Die Ergebnisse aus der *nf-core/rnaseq* Pipeline wurden im Anschluss als Input für die differentielle Expressionsanalyse mit *DeSeq2* (v 1.36.0) verwendet und die Ergebnisse mit *Glimma* (v 2.6.0) als interaktive Vulkanoplots visualisiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* AB5075

Mit dem übergeordneten Ziel, ein besseres Verständnis der Funktionsweise des OMP-Insertionsnetzwerks von *Ab* zu entwickeln, wurde in meinem Projekt ein spezielles Augenmerk auf die Bedeutung und Funktionsweise von in diesem Netzwerk agierenden periplasmatischen Chaperonen geworfen. Grundlage hierfür lieferten u.a. vorangegangene Beobachtungen, dass *surA*-Deletionsmutanten deutlich sensibler gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika, vor allem für Tobramycin, wurden (siehe Tabelle 1). Ein erster Teil dieses Projektes befasste sich daher mit der Reproduktion und Untersuchung der Zusammenhänge einer möglicherweise SurA-vermittelten Tobramycin-Resistenz.

#### 4.1.1 Antibiotikasuszeptibilitäts-Messungen durch Mikrobouillon-Dilution

Periplasmatische Chaperone übernehmen eine wichtige Funktion bei der Biogenese von  $\beta$ -barrel-OMPs (de Cock et al., 1996; Eppens et al., 1997). Das bekannteste und am besten untersuchte unter ihnen ist die PPLase SurA, die, wie in Arbeiten an *Pa*, *Ec* und *Ye* festgestellt wurde (Justice et al., 2005; Klein et al., 2019; Sklar et al., 2007; Weirich et al., 2017), eine geeignete Zielstruktur zu einer Wirkstoff-vermittelten Reduktion von Resistenz und Virulenz in Gram-negativen Bakterien darstellt. Eine Deletion von *surA* führte in allen diesen drei Spezies und auch in *Ab* selbst (Birkle et al., 2022) zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Antibiotika der Gruppe der Aminoglykoside, insbesondere Tobramycin.

Dieser Vorbefund einer SurA-vermittelten Tobramycin-Resistenz sollte zunächst reproduziert und überprüft werden. In mehreren voneinander unabhängigen MIC-Assays wurden die Bakterienstämme daher auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Tobramycin und weiteren Antibiotika getestet. Die verwendeten Bakterienzellen umfassten dabei jeweils den WT und die  $\Delta$ *surA*-Mutante der *Ab* Stämme AB5075 und AYE und als drittes Vergleichsset 10 weitere klinische *Ab*-Isolate aus der institutseigenen Stammsammlung. Tabelle 18 bietet eine Übersicht über die für den *Ab*-Stamm AB5075 ermittelten Werte.

Tabelle 18 **MHK-Werte (in mg/l) für AB5075 WT und AB5075  $\Delta surA$ -Deletionsmutante für unterschiedliche Antibiotika.** Für die blau umrahmten Substanzen erfolgt die Angabe der MHK jeweils in Konzentrationsbereichen, da wiederholte Messungen sich in diesen Bereichen bewegten (ebenfalls mg/l). Die Ermittlung dieser MHKs erfolgte in mindestens 4 Durchläufen mit manuell hergestellten Antibiotikaverdünnungen. Die MHK-Ermittlung für die restlichen Substanzen erfolgte unter Verwendung vorkonfekionierter MDR MRGN-Screening Platten (siehe 3.1.6) ohne Wiederholungsmessungen. Als MHK wurde die erste Konzentration verwendet, bei der die Messung der OD<sub>600 nm</sub> einen Wert  $\leq 0,05$  ergab. Rot markiert sind MHKs, die sich über dem Breakpoint der entsprechenden Substanz bewegen bzw. über einer therapeutisch denkbaren Dosierung (Dibekacin, DBK). Gelb markiert sind die aufgrund fehlender Referenzwerte nicht final beurteilbaren MHK-Werte für Kanamycin (KAN). Grün markiert ist ein Unterschreiten des Resistenzwertes, bzw. für DBK eine starke Verringerung des MHK-Wertes in der AB5075  $\Delta surA$ -Mutante im Vergleich zum WT. Für KAN und DBK gibt es für *Ab* keine MHK-Breakpoints (-).

(AMK=Amikacin, TOB=Tobramycin, GEN=Gentamicin, KAN=Kanamycin, DBK=Dibekacin, PIT=Piperacillin/Tazobactam, IMP=Imipenem, MER=Meropenem, LEV=Levofloxacin, CIP=Ciprofloxacin, COL=Colistin).

MIC-Platten		MHK Breakpoints (mg/l) (nach EUCAST V. 12.0)		<i>Acinetobacter baumannii</i> AB5075	
		S $\leq$	R $>$	WT	$\Delta surA$
Aminoglykoside	AMK	8	16	>32	>32
	TOB	4	4	0,25 - 0,5	< 0,01563
	GEN	4	4	8 - 32	< 0,125
	KAN	-	-	8	2 - 4
	DBK	-	-	> 160	0,0391 - 0,25
Penicilline	PIT	16	64	>64	>64
Carbapeneme	IMP	2	4	>8	>8
	MER	2	8	32	32
Fluoroquinolone	LEV	0,5	1	>2	>2
	CIP	0,001	1	>2	>2
Polymyxine	COL	2	2	<1	<1

Die Ermittlungen der MHK-Werte für Tobramycin ergaben, dass der WT und die  $\Delta surA$ -Mutante des *Ab*-Stammes AB5075 mit einer MHK  $\leq 4$  mg/l jeweils als

sensibel gegenüber Tobramycin zu werten sind. Im Genaueren zeigt sich, dass zwischen dem AB5075 WT und der AB5075  $\Delta surA$ -Mutante eine ca. 17-fache Reduktion der MHK für Tobramycin stattfand. Diese Daten bestätigen demnach den Vorbefund einer SurA-vermittelten Tobramycin-Resistenz für *Ab* AB5057.

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass ein vergleichbarer Effekt nicht für alle Aminoglykoside (siehe Amikacin) zu beobachten ist, bzw. der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt ist als für Tobramycin (siehe Kanamycin). Um zu überprüfen, ob der für Tobramycin beobachtete Effekt also spezifisch an der chemischen Struktur dieser Substanz liegt, wurden in einem nächsten Schritt strukturell nah verwandte Substanzen unter den Aminoglykosiden in die Testungen mit einbezogen (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19 **Übersicht strukturell nah verwandter Aminoglykosid-Antibiotika mit 4,6-disubstituiertem Deoxystreptamin-Ring.** Letzterer ist durch rote Farbe hervorgehoben. Die Grafik und die Tabelle wurden übernommen und modifiziert aus Magnet et al. (2005)

**B**

Antibiotic	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>
Kanamycin A	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	OH	H	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH
Kanamycin B	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH
Tobramycin	H	NH <sub>2</sub>	OH	H	NH <sub>2</sub>	H	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH
Dibekacin	H	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	H	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH
Gentamicin B	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Gentamicin C1	CH <sub>3</sub>	NHCH <sub>3</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Gentamicin C1A	H	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Gentamicin C2	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Sisomicin*	H	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Netilmicin*	H	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Isepamicin	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	OH		CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Arbekacin	H	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>		H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH
Amikacin	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	OH		H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH

\*( $\Delta 5'>4'$  unsaturation)

Ob sich diese nun ähnlich wie Tobramycin verhalten, wurde in einem nächsten Schritt durch weitere MIC-Testungen überprüft.

#### **4.1.1.1 Erhöhte Suszeptibilität auch für die nahe mit Tobramycin verwandten Substanzen Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin?**

Erweitert man den Vergleich der Sensitivität von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ surA-Mutante auf die dem Aminoglykosid Tobramycin strukturell nah verwandten Substanzen Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin – und darüber hinaus auf weitere gängige Therapeutika anderer Substanzklassen, inklusive dem „last resort“ Antibiotikum Colistin, zeigt sich folgendes Bild (siehe ebenso Tabelle 18):

Für Gentamicin lässt sich zwischen dem AB5075 WT und der AB5075  $\Delta$ surA-Mutante mit einer ca. 212-fachen Reduktion des MHK-Wertes eine deutliche Resensitivierung erzielen. Hinsichtlich Kanamycin zeigen die ermittelten MHK-Werte für den AB5075 WT und die AB5075  $\Delta$ surA-Mutante eine ca. 2,4-fache Reduktion. Ein demnach deutlich geringerer Unterschied verglichen zu den MHK-Differenzen bei Gentamicin. Ob diese Werte für Kanamycin allerdings als sensibel zu werten sind, lässt sich aufgrund fehlender Angaben zu den MHK-Breakpoints in der Literatur nicht final beurteilen. Das gilt ebenso für die Bewertung der MHKs für Dibekacin, da auch hier keine Breakpoints in der Literatur angegeben sind. Nichtsdestotrotz lassen sich für eben dieses Antibiotikum erstaunliche Beobachtungen verzeichnen: zwischen dem AB5075 WT und der AB5075  $\Delta$ surA-Mutante kommt es zu einer ca. 4.092-fachen Reduktion des MHK-Wertes. Mit der niedrigsten gemessenen MHK von 0,0391 mg/l Dibekacin für die AB5075  $\Delta$ surA-Mutante befinden wir uns in dem Konzentrationsbereich einer therapeutisch denkbaren Dosierung. So ist zu vermuten, dass trotz des Fehlens von Grenzwerten zur Einordnung für Resistenz oder Suszeptibilität gegenüber Dibekacin, hier von einer hohen Sensitivität der AB5075  $\Delta$ surA-Mutante ausgegangen werden kann.

Für die weiteren Antibiotika aus den Klassen der  $\beta$ -Laktame, Fluorquinolone und Polymyxine, auf welche die Bakterienproben darüber hinaus getestet wurden, zeigt sich ein weitestgehend sehr resistentes Profil: der AB5075-Stamm weist für

WT und  $\Delta$ surA-Mutante lediglich für das „last resort“ Antibiotikum Colistin eine Suszeptibilität auf.

Anhand dieser Messungen lässt sich also festhalten, dass sich die für Tobramycin beobachteten Effekte für *Ab* AB5075 auch auf weitere Substanzen unter den Aminoglykosid-Antibiotika übertragen lassen. Ausgenommen davon ist das Aminoglykosid Amikacin und auch für Kanamycin mit nur einer Halbierung der MHK im Vergleich von WT und  $\Delta$ surA-Mutante gilt dies lediglich eingeschränkt. Für Gentamicin jedoch lässt sich der gleiche Effekt einer SurA-vermittelten Resistenz, zudem noch ausgeprägter als für Tobramycin selbst beobachten. Ebenso für Dibekacin, das mit einer MHK-Reduktion um das rund 4092-fache im Vergleich von WT und  $\Delta$ surA-Mutante den dramatischsten Effekt unter den verglichenen Substanzen aufzeigt.

#### **4.1.1.2 Untersuchung einer Stammspezifität dieser Effekte – Vergleich mit dem *Ab*-Stamm AYE und klinischen *Ab*-Isolaten**

Um in einem nächsten Schritt zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt einer Rolle von SurA für die Tobramycin-, bzw. Aminoglykosid-Resistenz spezifisch für AB5075 ist oder die Beobachtung auch auf andere Stämme übertragbar ist, wurden erneut MHK-Testungen, ebenfalls mit dem WT und der  $\Delta$ surA-Mutante des *Ab*-Stammes AYE durchgeführt. Tabelle 20 bietet eine Übersicht über die dabei ermittelten Werte.

Tabelle 20 **MHK-Werte (in mg/l) für AYE WT und AYE  $\Delta surA$ -Deletionsmutante für unterschiedliche Antibiotika.** Für die blau umrahmten Substanzen erfolgt die Angabe der MHK jeweils in Konzentrationsbereichen, da wiederholte Messungen sich in diesen Bereichen bewegten (ebenfalls in mg/l). Die Ermittlung dieser MHKs erfolgte in mindestens 4 technischen Wiederholungen mit manuell hergestellten Antibiotikaverdünnungen. Die MHK-Ermittlung für die restlichen Substanzen erfolgte unter Verwendung vorkonfektionierter MDR MRGN-Screening Platten (siehe 3.1.6) ohne Wiederholungsmessungen. Als MHK wurde die erste Konzentration verwendet, bei der die Messung der OD<sub>600 nm</sub> einen Wert  $\leq 0,05$  ergab. Gelb markiert sind die aufgrund fehlender Referenzwerte nicht final beurteilbaren MHK-Werte für Dibekacin (DBK) und Kanamycin (KAN). Grün markiert sind Werte, bei denen die gemessene MHK unter dem Breakpoint liegt.

(AMK=Amikacin, TOB=Tobramycin, GEN=Gentamicin, KAN=Kanamycin, DBK=Dibekacin, PIT=Piperacillin/Tazobactam, IMP=Imipenem, MER=Meropenem, LEV=Levofloxacin, CIP=Ciprofloxacin, COL=Colistin).

MIC-Platten		MHK Breakpoints (mg/l) (nach EUCAST V. 12.0)		<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	
		S $\leq$	R $>$	WT	$\Delta surA$
Aminoglykoside	AMK	8	16	16	16
	TOB	4	4	0,125 - 0,5	0,125
	GEN	4	4	8 - 32	2 - 16
	KAN	-	-	16	16
	DBK	-	-	8 - 10	1 – 1,25
Penicilline	PIT	16	64	>64	32
Carbapeneme	IMP	2	4	<1	<1
	MER	2	8	0,5	1
Fluoroquinolone	LEV	0,5	1	>2	>2
	CIP	0,001	1	>2	>2
Polymyxine	COL	2	2	<1	<1

Für Gentamicin lässt sich im Vergleich zwischen AYE WT und der AYE  $\Delta surA$ -Mutante eine MHK-Reduktion um das ca. 3,3-fache verzeichnen. Beide sind mit einer MHK  $\geq 4$  mg/l als resistent gegenüber Gentamicin zu werten.

Hinsichtlich Kanamycin zeigen die ermittelten MHK-Werte für den AYE WT und die AYE  $\Delta$ surA-Mutante sogar überhaupt keinen Unterschied. Ob diese Werte als sensibel zu werten sind, lässt sich auch hier aufgrund fehlender Angaben zu den MHK-Breakpoints in der Literatur nicht final beurteilen. Das gilt ebenso für die Bewertung der MHKs für Dibekacin. Für Dibekacin ist zwischen dem AYE WT und der AYE  $\Delta$ surA-Mutante eine Reduktion der MHK zu beobachten. Die Reduktion ist hier allerdings, wie schon bei Gentamicin und Kanamycin beobachtet, geringer ausgeprägt als bei den AB5075-Proben und beträgt nur das ca. 8-fache. Für die weiteren Antibiotika aus den Klassen der  $\beta$ -Laktame, Fluorquinolone und Polymyxine, auf welche die Bakterienproben darüber hinaus getestet wurden, zeigt sich auch für den AYE-Stamm ein weitestgehend resistentes Profil, wenn auch tendenziell etwas susceptibler als das des AB5075-Stammes. So sind sowohl der AYE WT als auch die AYE  $\Delta$ surA-Mutante ihren MHKs nach für die beiden Carbapeneme Imipenem und Meropenem, als auch für Colistin als sensibel zu bewerten.

Während für den *Ab*-Stamm AB5075 also weitestgehend deutliche Effekte einer *surA*-Deletion auf die Suszeptibilität gegenüber den getesteten Antibiotika zu sehen sind, zeigt sich der *Ab*-Stamm AYE relativ unbeeinflusst von einer *surA*-Deletion. Die MHK-Differenzen zwischen AYE WT und AYE  $\Delta$ surA-Mutante sind, wenn überhaupt vorhanden, mit Faktoren im einstelligen Bereich deutlich geringer ausgeprägt als zwischen AB5075 WT und der AB5075  $\Delta$ surA-Mutante, wo diese bis in den dreistelligen Bereich reichen (siehe Dibekacin). Es ist also davon auszugehen, dass der beobachtete Effekt einer SurA-vermittelten Aminoglykosid-Resistenz zumindest teilweise stammspezifisch ist. Um diese Resistenzprofile mit möglichst repräsentativen Vertretern der Resistenzlage von *Ab* im aktuellen Krankenhaussetting zu vergleichen und eine mögliche Wirksamkeit von Dibekacin gegenüber multiresistenten Isolaten zu testen, wurden in einem folgenden Schritt 10 weitere klinische *Ab*-Isolate aus der institutseigenen Stammsammlung in die Testungen miteinbezogen. Aufgrund von Lieferproblemen für Dibekacin konnte leider nur für einige Stämme eine Dibekacin-MHK bestimmt werden. Tabelle 21 bietet eine Übersicht über die dabei ermittelten Werte.

Tabelle 21 **MHK-Werte (in mg/l) der klinischen *Ab*-Isolate für unterschiedliche Antibiotika**. Für die blau umrahmten Substanzen erfolgte die Ermittlung der MHK mit manuell hergestellten Antibiotikaverdünnungen ohne Wiederholungsmessungen. Die MHK-Ermittlung für die restlichen Substanzen erfolgte unter Verwendung vorkonfektionierter MDR MRGN-Screening Platten (siehe 3.1.6) ebenfalls ohne Wiederholungsmessungen. Als MHK wurde die erste Konzentration verwendet, bei der die Messung der OD<sub>600 nm</sub> einen Wert  $\leq 0,05$  ergab. Rot markiert sind MHKs, die sich weit über dem Breakpoint der entsprechenden Substanz bewegen. Gelb markiert sind die aufgrund fehlender Referenzwerte nicht final beurteilbaren MHK-Werte für Dibekacin (DBK) und Kanamycin (KAN). Grün markiert ein Unterschreiten des Resistenzwertes. Auf Gentamicin (GEN) wurden die klinischen Isolate von *Ab* im Vergleich zu den anderen *Ab*-Sets nicht geprüft.

(AMK= Amikacin, TOB= Tobramycin, KAN = Kanamycin, DBK = Dibekacin, PIT= Piperacillin/Tazobactam, IMP= Imipenem, MER= Meropenem, LEV= Levofloxacin, CIP = Ciprofloxacin, COL = Colistin)

MIC-Platten		MHK Breakpoints (mg/l) (nach EUCAST V. 12.0)		<i>Acinetobacter baumannii</i> klinische Isolate									
		S $\leq$	R >	377- MRGN 8016	379- NF 31708	378 -NF 29545	374- MRGN 9021	373- MRGN 9088	371- MRGN 9145	380- MRGN 9709	376 -MRGN 9106	372- MRGN 9126	375- MRGN 9146
Aminoglykoside	AMK	8	16	>32	32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
	TOB	4	4	>64	4	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
	KAN	-	-	64	64	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
	DBK	-	-	>5	>5	>5	-	-	-	-	-	-	-
Penicilline	PIT	16	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
Carbapeneme	IMP	2	4	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
	MER	2	8	64	>128	64	128	32	32	64	32	64	64
Fluoroquinolone	LEV	0,5	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
	CIP	0,001	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
Polymyxine	COL	2	2	<1	8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Für Tobramycin weisen die klinischen Isolate alle, bis auf die Ausnahme des 379-Isolates, ihrem 4-MRGN-Resistenzprofil entsprechend, MHKs weit über 64 mg/l und damit eine Resistenz für Tobramycin auf. Auch hinsichtlich Kanamycin zeigen sich die klinischen Isolate mit MHKs  $\geq 64$  mg/l weitestgehend konsistent resistent. Lediglich drei Isolate – 377, 378 und 379 – weisen eine MHK von 64 mg/l Kanamycin auf. Daher wurden diese Isolate zusätzlich auf ihre MHKs für Dibekacin untersucht. Es zeigten sich für alle drei eine MHK  $> 5$  mg/l. Da aufgrund der Limitation der verfügbaren Dibekacin-Menge keine höheren Wirkstoffkonzentrationen getestet werden konnten, ließ sich eine exakte MHK nicht feststellen und Aussagen zu einer möglichen Sensitivität gegenüber Dibekacin können nicht getroffen werden. Auf ihre MHKs für Gentamicin wurden die klinischen Isolate nicht überprüft. Ihrer Klassifizierung als 4-MRGN-Keime zu entnehmen, ist allerdings zu erwarten, dass sie gegenüber Gentamicin ebenfalls eine Resistenz aufweisen.

Für die weiteren Antibiotika aus den Klassen der  $\beta$ -Laktame, Fluorquinolone und Polymyxine, auf welche die Bakterienproben darüber hinaus getestet wurden, zeigt sich auch hier ein sehr resistentes Profil. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass das 379-Isolat sogar eine Resistenz gegenüber Colistin aufweist. Damit ist es mit seiner zuvor beschriebenen Tobramycin-Sensitivität unter den klinischen *Ab*-Isolaten als doppelte Ausnahme zu sehen.

Die Frage, ob Dibekacin eventuell auch eine Therapieoption für multiresistente klinische Isolate sein könnte, kann durch den Umfang dieser Testungen leider nicht abschließend beantwortet werden. Zum einen konnte aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Dibekacin keine präzise MHK-Bestimmung erfolgen und aufgrund des begrenzten zeitlichen Rahmens keine *surA*-Knockout-Mutanten von den klinischen *Ab*-Isolaten generiert werden. Zum anderen fehlen Breakpoint Angaben in der Literatur, die ein Bewerten der jeweiligen Werte als „resistent“ und „sensibel“ ermöglichen würden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MHK-Messungen bestätigen, dass die Deletion von *surA* zu einer erhöhten Suszeptibilität der Bakterien für Tobramycin führt. Dies gilt allerdings nur für den *Ab*-Stamm AB5075 und auch

nicht für alle getesteten Aminoglykoside. Unter den neben Tobramycin getesteten Substanzen Gentamicin, Kanamycin, Dibekacin und Amikacin ließ sich für den AB5075-Stamm mit Dibekacin eine weitere Substanz identifizieren, bei der der Effekt ebenfalls und zudem noch viel deutlicher als für Tobramycin zu beobachten war. Was der Grund dafür ist, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht sagen. Auch scheint eine erhöhte Aminoglykosid- bzw. Tobramycin-Suszeptibilität durch eine Deletion von *surA* nicht einfach generalisierbar zu sein, da man den Effekt beim *Ab*-Stamm nur AYE viel schwächer bzw. gar nicht beobachten konnte. Für ein weiterführendes Verständnis der Mechanismen dieser beobachteten und bestätigten SurA-vermittelten Aminoglykosid-Resistenz von *Ab* AB5075, wurde daher in einem nächsten Abschnitt meines Projekts nach möglichen Ursachen für diese Beobachtungen gesucht.

#### **4.1.2 Analyse möglicher Zusammenhänge der Expression von *SurA* und der Tobramycin-Resistenz von AB5075**

Um die beobachteten Suszeptibilitätsunterschiede zwischen dem WT und der  $\Delta$ *surA*-Mutante von *Ab* AB5075 besser zu verstehen, wurden gezielt und komparativ Aspekte der Bakterienphysiologie betrachtet. Dazu wurde zunächst die Zelloberflächenladung, als wichtiger Einflussfaktor der Absorption von Medikamenten an die Bakterienzelle, analysiert. Untersucht wurde diese mit Hilfe eines Zytochrom C-basierten Assays, der im Rahmen dieses Projektes von mir etabliert wurde. Ein weiteres Augenmerk lag auf Analysen der Aufnahme und des Effluxes eines quantifizierbaren Substrates (als Surrogat für Antibiotika) in und aus Bakterienzellen. Diese Faktoren haben entscheidenden Einfluss auf die erreichten lokalen Wirkstoffkonzentrationen verabreichter Antibiotika, v.a. im Inneren der Bakterienzellen. Dies sollte mit einem NPN-basierten Assay untersucht werden. NPN ist ein Substrat, das in hydrophober Umgebung, wie z.B. der Bakterien-Zellhülle fluoresziert und von Efflux-Pumpen aus den Zellen entfernt werden kann. Aufgrund technischer Hürden und der zeitlichen Limitierung des Projektes wurden diese Versuche nicht von mir selbst durchgeführt, sondern es wird auf die Beobachtungen der früheren AG-Mitglieder Karolin Birkle und Elena Weber Bezug genommen. Diese haben die Messungen unter der Anleitung von Dr. Monika Schütz durchgeführt.

#### 4.1.2.1 Quantifizierung der Zelloberflächenladung durch den Zytochrom C – Assay

Unterschiede der Zelloberflächenladung zwischen dem WT und der  $\Delta$ surA-Mutante sind eine denkbare Folge einer veränderten OM-Zusammensetzung in der Deletionsmutante und könnten eine Erklärung der für Tobramycin beobachteten Suszeptibilitätsdifferenzen liefern. Aminoglykoside binden nämlich, aufgrund ihrer polykationischen Valenz, bei Kontakt mit der Oberfläche einer Gram-negativen Bakterienzelle an deren anionische Komponenten wie OMPs, Phospholipide und LPS (Ramirez & Tolmasky, 2010; Vanhoof et al., 1995). Je nach Ausprägung der Oberflächenladung kann also mehr oder weniger des verabreichten Aminoglykosids an die Zelle adhären, lokal akkumulieren und in die Bakterienzelle eindringen, um seine Wirkung zu entfalten.

Wie Tobramycin selbst, ist auch Zytochrom C ein kationisches Molekül, das an die negativ geladenen LPS, Phospholipide und Außenmembranproteine Gram-negativer Bakterien, wie z.B. *Ab*, binden kann. Zytochrom C wurde daher als einfach quantifizierbares Surrogat für Tobramycin zur Evaluation der Zelloberflächenladungen verwendet. Eine Quantifizierung des Anteils an freiem Zytochrom C konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 530 nm aus den Überständen der zuvor mit Zytochrom C inkubierten Bakterien-Proben erfolgen. Hieraus ließ sich dann der Anteil an zellgebundenem Zytochrom C errechnen (siehe 3.3.6). Mit Hilfe einer Bestimmung der tatsächlichen Bakterienzahlen in den Wells (OD<sub>600 nm</sub>-Messungen), war es möglich, die Zytochrom C-Bindung auf eine Bakterienzahl entsprechend einer OD<sub>600 nm</sub> = 0,6 zu normieren und dadurch besser vergleichbar zu machen. Reduzierte Messwerte gegenüber einer Referenz (keine Bakterien im Ansatz, also keine Zytochrom C-Bindung) würden dabei einen erhöhten Anteil an zellgebundenem Zytochrom C widerspiegeln und auf eine verstärkte Negativierung der Zelloberflächenladung hinweisen. Im übertragenen Sinne bedeutete dies eine gesteigerte Absorption von Tobramycin an die Zellen, mit der Folge lokal erhöhter Wirkstoffkonzentrationen. Das könnte eine Erklärung für die gesteigerte Suszeptibilität der AB5075  $\Delta$ surA-Mutante für Tobramycin liefern.

Abbildung 3 bietet eine Übersicht über die in fünf voneinander unabhängigen Wiederholungen dieses Assays generierten Ergebnisse. Um eine mögliche Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf andere *Ab*-Stämme zu prüfen, wurden hier – wie auch bei den Untersuchungen zu den MHKs – jeweils der WT und die  $\Delta surA$ -Mutante von AB5075 als auch dem AYE-Stamm verwendet.

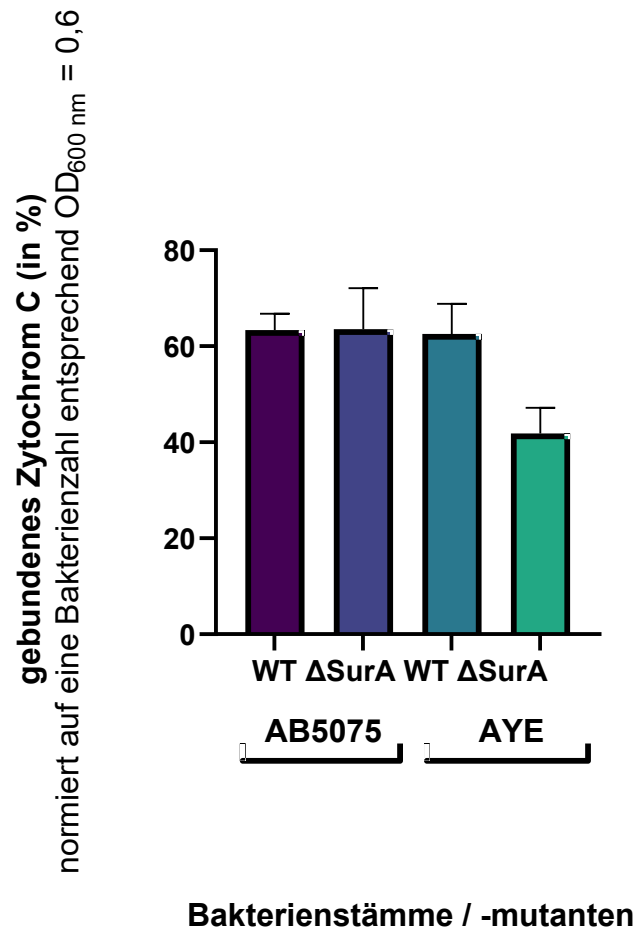


Abbildung 3 **Zytochrom C – Bindung von WT und  $\Delta surA$ -Mutante der *Ab*-Stämme AB5075 und AYE.** Zytochrom C – Bindung von WT und  $\Delta surA$ -Mutante der *Ab*-Stämme AB5075 und AYE im direkten Vergleich. 0 % Bindung würde bedeuten, dass nach der Inkubation des Zytochrom C-haltigen Puffers mit den Bakterien der gesamte Zytochrom C-Input im Überstand verbleibt, 100 % Bindung würde bedeuten, dass nach der Inkubation der gesamte Zytochrom C-Input mit dem Bakterienpellet assoziiert und kein Zytochrom C im Überstand mehr nachweisbar ist. Die Werte beziehen sich dabei auf die bei 530 nm ermittelte Extinktion des mit Zytochrom C versetzten Assay-Puffers. Die Messung der Extinktion erfolgte in allen Ansätzen ebenfalls bei 530 nm. Eine zusätzliche Messung der  $OD_{600\text{ nm}}$  in den Ansätzen wurde zur Normierung der Zytochrom C-Bindung auf eine definierte Bakterienzahl ( $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ ) vorgenommen. Es erfolgten 5 voneinander unabhängige Experimente.

Aus den ermittelten Werten wird ersichtlich, dass es für die Zelloberflächenladung sowohl für den AB5075- als auch den AYE-Stamm zwischen dem WT und der  $\Delta surA$ -Mutante keine signifikanten Unterschiede gibt. 0 % Bindung entsprechen dabei der bei 530 nm ermittelten Extinktion des mit Zytochrom C versetzten MOPS-Puffers ohne Bakterien im Ansatz. Die prozentuale Bindung von Zytochrom C an die Bakterienzellen beträgt somit 56,9 - 66,7 % für AB5075 WT, 55,4 - 72,1 % für die AB5075  $\Delta surA$ -Mutante, 52,1 - 68,8 % für AYE WT und 37,1 - 47,2 % für die AYE  $\Delta surA$ -Mutante. Die größte Differenz gibt es demnach zwischen dem AYE WT und der AYE  $\Delta surA$ -Mutante mit 20,8 Prozentpunkten Unterschied, berechnet anhand der Mittelwerte des oben beschriebenen Ergebnisumfangs. Der Unterschied zwischen AB5075 WT und der AB5075  $\Delta surA$ -Mutante liegt so bei lediglich 0,1 Prozentpunkten.

In Abbildung 4 sind die ermittelten Werte aller getesteten Mutanten der *Ab*-Stämme AB5075 und AYE zu sehen.

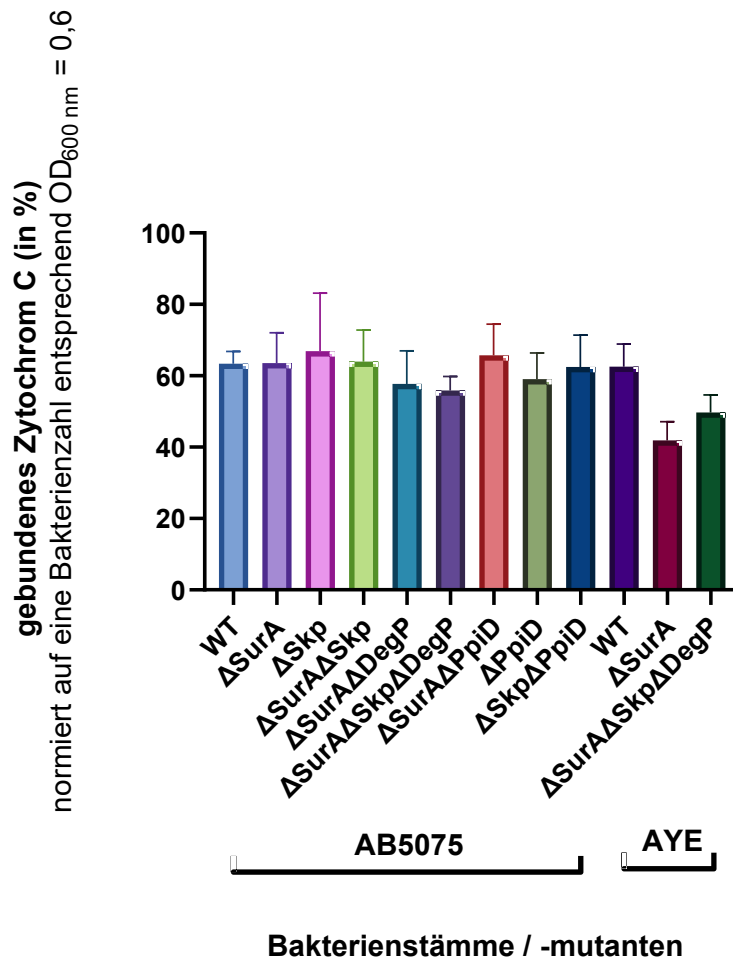


Abbildung 4 **Zytochrom C – Bindung aller getesteten Mutanten im Vergleich zum jeweiligen WT für die *Ab*-Stämme AB5075 und AYE.** Anteil an gebundenem Zytochrom C der AB5075 und AYE WT-Stämme und Deletionsmutanten im Vergleich. 0 % Bindung würde bedeuten, dass nach der Inkubation des Zytochrom C-haltigen Puffers mit den Bakterien der gesamte Zytochrom C-Input im Überstand verbleibt, 100 % Bindung würde bedeuten, dass nach der Inkubation der gesamte Zytochrom C-Input mit dem Bakterienpellet assoziiert und kein Zytochrom C im Überstand mehr nachweisbar ist. Die Werte beziehen sich dabei auf die bei 530 nm ermittelte Extinktion des mit Zytochrom C versetzten Assay-Puffers. Die Messung der Extinktion erfolgte in allen Ansätzen ebenfalls bei 530 nm. Eine zusätzliche Messung der  $OD_{600\text{ nm}}$  in den Ansätzen wurde zur Normierung der Zytochrom C-Bindung auf eine definierte Bakterienzahl ( $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ ) vorgenommen. Es erfolgten 5 voneinander unabhängige Messungen.

Alle diese Deletionsmutanten wurden zwar in die Untersuchungen einbezogen und sind hier zur Vollständigkeit mitaufgeführt, jedoch lag der Fokus auf dem Vergleich von WT und der *ΔsurA*-Mutante. Es wurde mit keiner der zusätzlich zur *ΔsurA*-Mutante getesteten Mutanten des AB5075-Stammes ein signifikanter Unterschied in der Zytochrom C-Bindung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich möglicher phänotypischer Ursachen der SurA-vermittelten Aminoglykosid-Resistenz festhalten, dass eine unterschiedliche Zelloberflächenladung wohl nicht der Grund für die erhöhte Tobramycin-Sensitivität ist, die in AB5075 mit einer *surA*-Deletion einhergeht. Die Suche nach möglichen Ursachen wurde daher in einem nächsten Schritt durch vergleichende Transkriptomanalysen weitergeführt.

#### 4.1.3 Suche nach Erklärungen für die Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* AB5075 auf mRNA-Ebene

Neben den bereits untersuchten Aspekten der Bakterienphysiologie haben auch modifizierende und inaktivierende Enzyme einen entscheidenden Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von Bakterien. Inwieweit SurA einen Einfluss auf deren Expression bzw. Aktivität nehmen könnte, ist bis dato noch unklar (außer möglicherweise als Reaktion auf Membranstress, der durch das Fehlen von SurA verursacht werden könnte). Dennoch könnte insbesondere eine veränderte Expression Aminoglykosid-modifizierender Enzyme (AMEs) die erhöhte Suszeptibilität der AB5075 *surA*-Mutante für Tobramycin erklären. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten in komparativen RNA-Expressions-Analysen von WT und *surA*-Deletionsmutante des *Ab*-Stammes AB5075 AMEs identifiziert werden, deren Expression in der Mutante möglicherweise verändert sind. Einen Überblick über die hierfür besonders in Frage kommenden Kandidatengene von *Ab* AB5075 bietet Tabelle 22.

Tabelle 22 **Bekannte und potentiell die Aminoglykosid-Resistenz beeinflussende Gene von *Ab* AB5075** (Gallagher et al., 2015; Scribano et al., 2019).

Resistenzmechanismus	Locus Tag	Gen-name	Funktion / Beschreibung
<b>Aminoglykosid-modifizierende Enzyme</b>	ABUW_24	<i>sun</i>	16S rRNA (cytosin(967)-C(5))-Methyltransferase B
	ABUW_172	<i>rsmE_1</i>	16S rRNA (uracil(1498)-N(3))-Methyltransferase E1
	ABUW_281	<i>mraW</i>	16S rRNA (cytosin(1402)-N(4))-Methyltransferase MraW
	ABUW_653	<i>rsmC</i>	16S rRNA (guanin(1207)-N(2))-Methyltransferase C

	ABUW_898	<i>rrmJ</i>	23S rRNA (uridin(2552)-2'-O)-Methyltransferase J
	ABUW_1222	<i>rsmE_2</i>	16S rRNA (uracil(1498)-N(3))-Methyltransferase E2
	ABUW_1851	-	Aminoglykosid-Phosphotransferase
	ABUW_2266	-	Aminoglykosid-Phosphotransferase
	ABUW_2640	-	Acetyltransferase
	ABUW_3235	<i>rsmJ</i>	16S rRNA (guanin(1516)-N(2))-Methyltransferase J
	ABUW_3303	<i>rumA</i>	23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-Methyltransferase RumA
	ABUW_3710	-	N-Acetyltransferase (GNAT-Familie)
	ABUW_3754	-	Aminoglykosid-3''-Nukleotidyltransferase IIa
	ABUW_4051	<i>aacA4</i>	Aminoglykosid-6'-N-Acetyltransferase Ib
	ABUW_4055	<i>strB</i>	Streptomycin-Resistenzprotein B (Phosphotransferase)
	ABUW_4056	<i>strA</i>	Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase StrA
	ABUW_4057	<i>aadA1</i>	Aminoglykosid-3'-Adenylyltransferase AadA1
	ABUW_4060	<i>aadB</i>	Aminoglykosid-2'-Nucleotidyltransferase AadB
	ABUW_4087	<i>aphA6</i>	Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase APH6a
<b>weitere Mechanismen gegen Antibiotika</b>	ABUW_10	<i>adeT</i>	RND-Efflux-Pumpe AdeT
	ABUW_394	<i>adeT2</i>	RND-Efflux-Pumpe AdeT2
	ABUW_563	<i>blaOXA-23</i>	Carbapenemase OXA-23
	ABUW_1194	<i>ampC</i>	Cephalosporinase AmpC
	ABUW_4052	<i>blaGES-11</i>	Carbapenemase GES-11
<b>OMP-Pathway</b>	ABUW_850	<i>lolA</i>	Lipoprotein-spezifisches Chaperon / OM-Lipoprotein-Carrier-Protein LolA
	ABUW_1027	<i>degP</i>	Chaperon DegP
	ABUW_1741	<i>bamA</i>	OMP BamA (BAM-Komplex)

	ABUW_1742	<i>skp</i>	Chaperon Skp
	ABUW_2268	<i>surA</i>	Chaperon SurA
	ABUW_3835	<i>fkIB</i>	Chaperon FkIB
<b>unbekannte Funktion</b>	ABUW_2868	-	Heat shock protein (HslJ-like Superfamilie)
	ABUW_1012	<i>queC</i>	7-Cyano-7-Deazaguanin-Synthase

Zudem sollte untersucht werden, ob sich die zelluläre Antwort einer *surA*-Mutante auf die Stimulation mit Tobramycin grundlegend von der des WTs unterscheidet. Daher wurden sowohl unstimulierte als auch mit subinhibitorischen Konzentrationen von Tobramycin stimulierte Zellen in die Analysen eingeschlossen. Die Daten wurden dann auf Veränderungen der Expressionslevels der ausgewählten und weiterer Gene zwischen den Proben gefiltert, wobei zur Bewertung der statistischen Signifikanz aufgefundener Unterschiede (dargestellt als log<sub>2</sub>-fache Änderung) der adjustierte p-Wert (bzw. -log<sub>10</sub>(adjustierter p-Wert)) diente. Die aufgefundenen signifikanten Unterschiede sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23 Übersicht über Gene mit signifikant veränderter Expression in einer vergleichenden Transkriptom-Analyse von *Ab AB5075* WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante. Verglichen wurden die Expressionslevel von WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante sowohl ohne als auch nach Stimulation mit einer subinhibitorischen Menge an Tobramycin (16 mg/l). Alle Proben wurden unabhängig voneinander vorbereitet und in Triplikaten hergestellt. Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der jeweiligen Differenzen in den Expressionslevels (log2-fache Änderung) diente der  $-\log_{10}$ (adjustierter p-Wert), wobei ab einem  $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 1,3$  (entsprechend adj. p-Wert  $\leq 0,05$ ) von einer statistischen Signifikanz ausgegangen wurde. Abstufungen der Signifikanzen sind durch verschiedene Intensitäten an Rot unterlegt, wobei dunkles Rot eine sehr hohe Signifikanz ( $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 100$ ), mittleres Rot eine hohe Signifikanz ( $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 50$ ), helles Rot eine mäßige Signifikanz ( $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 1,3$ ) und weiß keine Signifikanz ( $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\leq 1,3$ ) markieren. Ebenso sind die log2-fachen Änderungen farblich unterlegt, wobei Grün eine Reduktion und Orange eine Erhöhung der Expression der Gene im jeweiligen Vergleich markieren.

Gen-ID (NCBI) <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/C_P008706">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/C_P008706</a>		UniProt-ID	Genname, Synonym	Funktion	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB5075					
					Verhältnis $\Delta$ <i>surA</i> unstimuliert / WT unstimuliert		Verhältnis WT_Tobra16 / WT unstimuliert		Verhältnis $\Delta$ <i>surA</i> _Tobra16 / $\Delta$ <i>surA</i> unstimuliert	
LocusTag	alternativer LocusTag				log2- fache Änderung	$-\log_{10}$ adj. p- Wert	log2- fache Änderung	$-\log_{10}$ adj. p- Wert	log2- fache Änderung	$-\log_{10}$ adj. p- Wert
ABUW_2268	ABUW_RS11030	WP_000850091.1	<i>surA</i>	periplasmatisches Chaperon	-11,40	15,39	-0,28	0,00	-	-
ABUW_0010	ABUW_RS00050	WP_001212535.1	<i>adeT</i>	RND-Efflux-Pumpe	-0,61	0,00	3,18	6,22	3,59	9,55
ABUW_3710	ABUW_RS18055	WP_001159732.1		N-Acetyltransferase (GNAT-Superfamilie)	-0,76	0,00	4,58	33,20	5,01	38,08
ABUW_2640	ABUW_RS12810	WP_000132359.1		Acetyltransferase (CysE/LacA/LpxA/NodL-Familie)	-0,16	0,00	3,11	4,34	3,10	4,12
ABUW_1015	carO	WP_000866525.1	<i>carO</i>	Carbapenem-Resistenz assoziiertes OMP	-0,11	0,00	-4,38	30,42	-3,70	15,77
ABUW_3197	ABUW_RS15520	WP_000735356.1	<i>met_E</i>	Methyltransferase	-3,20	5,69	-5,80	76,61	-2,38	0,81
ABUW_3198	ABUW_RS15525	WP_000031355.1		(uncharakterisiert)	-3,11	4,09	-5,32	52,25	-1,99	0,00
ABUW_2312	ABUW_RS11245	WP_005115797.1	<i>htrE_2</i>	Fimbrien-/Pilus-OMP	-0,60	0,00	7,17	119,85	7,51	127,07
ABUW_2313	ABUW_RS11250	WP_000738477.1	<i>fimA_2</i>	Fimbrien-Adhäsionsprotein	-0,63	0,00	6,89	126,45	7,28	136,90

#### 4.1.3.1 Unterschiede im Transkriptom von *Ab* AB5075 WT und $\Delta$ *surA*-Mutante ohne Tobramycin-Stimulus

Tatsächlich gibt es in diesem Vergleich nur sehr wenige signifikante Unterschiede. Dazu gehört erwartungsgemäß die Expression von *surA* (ABUW\_RS11030, bzw. ABUW\_2268), welches in der Mutante deletiert und daher nicht exprimiert ist (Tabelle 23;

Abbildung 5).

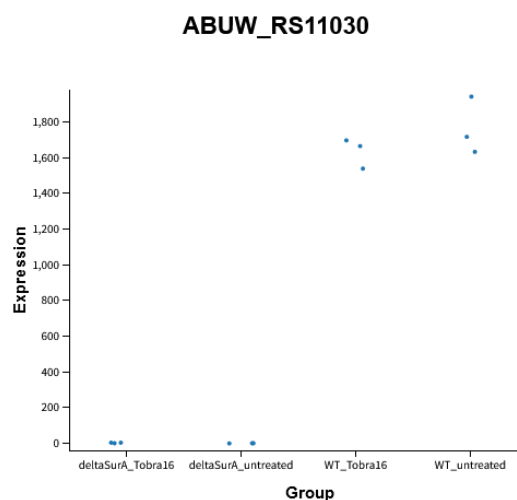


Abbildung 5 **Expressionslevel von *surA* (ABUW\_RS11030) in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin.** Verglichen wurden die Expressionslevel zwischen WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante von *Ab* AB5075 sowohl unter Stimulation mit einer subinhibitorischen Menge an Tobramycin (16 mg/ml, Tobra 16) als auch ohne Stimulation (untreated). Alle Proben wurden unabhängig voneinander vorbereitet und in Triplikaten hergestellt. Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der jeweiligen Differenzen in den Expressionslevels (log2-fache Änderung) diente der  $-\log_{10}$ (adjustierter p-Wert), wobei ab einem  $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 1,3$  (entsprechend adj. p-Wert  $\leq 0,05$ ) von einer statistischen Signifikanz ausgegangen wurde. *SurA* wird natürlich nur in *Ab* AB5075 WT exprimiert, nicht jedoch in der *Ab* AB5075 *surA*-Deletionsmutante.

Zusätzlich ist die Expression eines als Methyltransferase annotierten Gens (ABUW\_RS15520, bzw. ABUW\_3197) und ein bislang uncharakterisiertes Protein kodierendes Gen (ABUW\_RS15525, bzw. ABUW\_3198) in der  $\Delta$ *surA*-Mutante signifikant weniger exprimiert als in den WT-Zellen. Interessanterweise

sinkt die Expression derselben Gene im WT nach einer Tobramycin-Stimulation etwa auf das Niveau der  $\Delta surA$ -Mutante (siehe Abbildung 6).

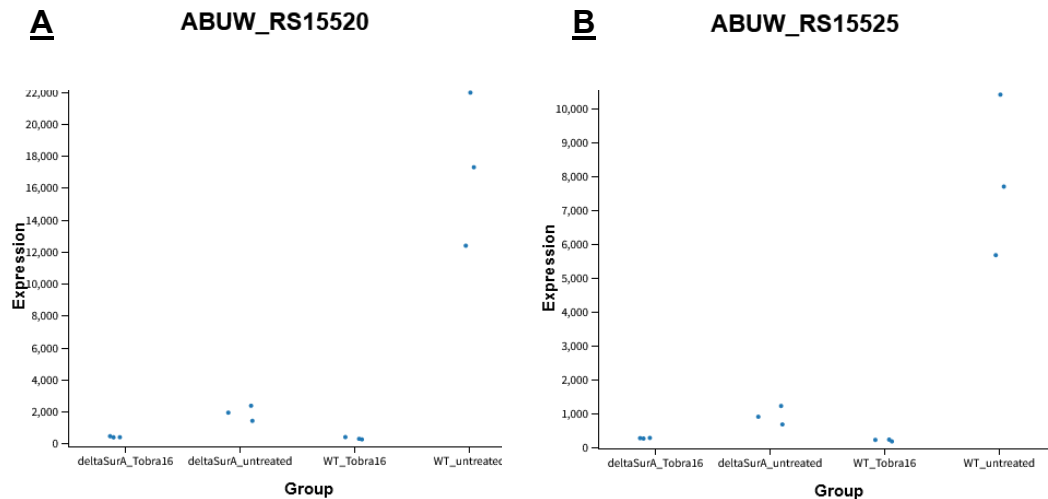


Abbildung 6 **Expressionslevel von ABUW\_RS15520 (A) und ABUW\_RS15525 (B) in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin.** Verglichen wurden die Expressionslevel zwischen WT und  $\Delta surA$ -Mutante von *Ab* AB5075 sowohl unter Stimulation mit einer subinhibitorischen Menge an Tobramycin (16 mg/ml) als auch ohne Stimulation, um mögliche generelle Auswirkungen einer Stressreaktion bei Deletion von *surA* zu beobachten. Alle Proben wurden unabhängig voneinander vorbereitet und in Triplikaten hergestellt. Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der jeweiligen Differenzen in den Expressionslevels ( $\log_2$ -fache Änderung) diente der  $-\log_{10}$ (adjustierter p-Wert), wobei ab einem  $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 1,3$  (entsprechend adj. p-Wert  $\leq 0,05$ ) von einer statistischen Signifikanz ausgegangen wurde. Für beide Gene ist ohne Stimulation mit Tobramycin in der *Ab* AB5075 *surA*-Deletionsmutante eine signifikant verringerte Expression verglichen mit dem WT zu sehen. Nach Stimulation mit Tobramycin sinkt die Expression derselben Gene im WT etwa auf das Niveau der *surA*-Deletionsmutante.

#### 4.1.3.2 Veränderungen im Transkriptom von *Ab* AB5075 WT und $\Delta surA$ -Mutante nach Tobramycin-Stimulation

Von den 32 ausgewählten Kandidaten, die mit Antibiotikaresistenz allgemein und teils spezifisch mit Aminoglykosid-Resistenz in Zusammenhang gebracht werden können (siehe Tabelle 22), zeigten lediglich drei Gene (ABUW\_RS00050, bzw. ABUW\_0010; ABUW\_RS18055, bzw. ABUW\_3710 und ABUW\_RS12810, bzw. ABUW\_2640) unter Stimulation mit Tobramycin eine signifikant erhöhte Expression. Dies gilt sowohl für den Vergleich von unstimulierten und stimulierten WT-Zellen als auch für den Vergleich ihrer Expressionslevel in der  $\Delta surA$ -Mutante in unstimuliertem und stimuliertem Zustand (siehe Abbildung 7).

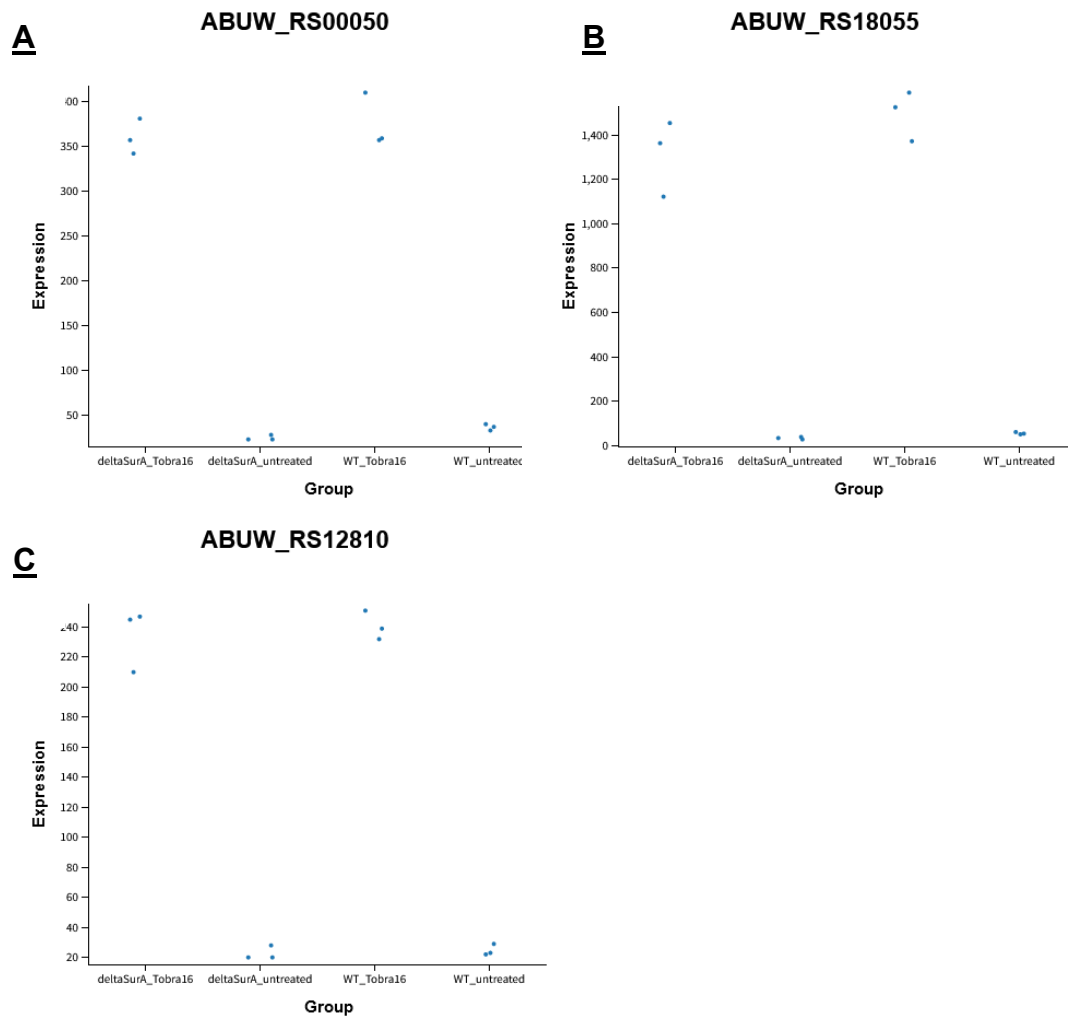


Abbildung 7 Expressionslevel von ABUW\_RS00050 (A), ABUW\_RS18055 (B) und ABUW\_RS12810 (C) in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin. Verglichen wurden die Expressionslevel zwischen WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante von *Ab* AB5075 sowohl unter Stimulation mit einer subinhibitorischen Menge an Tobramycin (16 mg/ml) als auch ohne Stimulation, um mögliche generelle Auswirkungen einer Stressreaktion bei Deletion von *surA* zu beobachten. Alle Proben wurden unabhängig voneinander vorbereitet und in Triplikaten hergestellt. Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der jeweiligen Differenzen in den Expressionslevels (log<sub>2</sub>-fache Änderung) diente der  $-\log_{10}$ (adjustierter p-Wert), wobei ab einem  $-\log_{10}$ (adj. p-Wert)  $\geq 1,3$  (entsprechend adj. p-Wert  $\leq 0,05$ ) von einer statistischen Signifikanz ausgegangen wurde. Für alle drei Gene (A-C) ist sowohl bei *Ab* AB5075 WT als auch der AB5075 *surA*-Deletionsmutante nach Stimulation mit Tobramycin die Expression signifikant erhöht.

Durch Stimulation mit Tobramycin ebenfalls in ihrer Expression erhöht, waren über die 32 ausgewählten Kandidatengene hinaus zwei an der Fimbrien- und Pilus-Biogenese beteiligten Gene (ABUW\_RS11245, bzw. ABUW\_2312 und ABUW\_RS11250, bzw. ABUW\_2313). Dies traf gleichermaßen auf WT-Zellen und die  $\Delta surA$ -Mutante zu (siehe Abbildung 8).

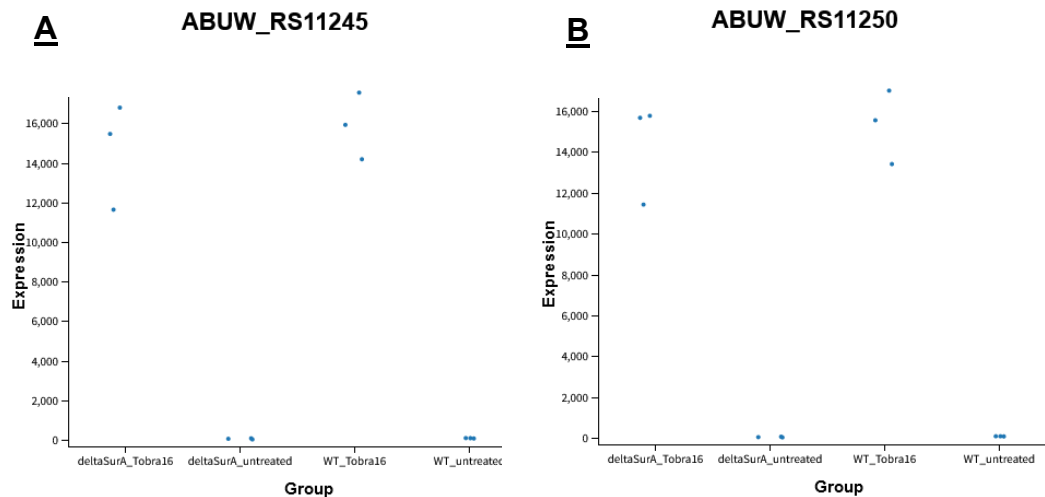


Abbildung 8 Expressionslevel von ABUW\_RS11245 (A) und ABUW\_RS11250 (B) in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta surA$ -Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin. Verglichen wurden die Expressionslevel zwischen WT und  $\Delta surA$ -Mutante von *Ab* AB5075 sowohl unter Stimulation mit einer subinhibitorischen Menge an Tobramycin (16 mg/ml) als auch ohne Stimulation, um mögliche generelle Auswirkungen einer Stressreaktion bei Deletion von *surA* zu beobachten. Alle Proben wurden unabhängig voneinander vorbereitet und in Triplikaten hergestellt. Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der jeweiligen Differenzen in den Expressionslevels (log2-fache Änderung) diente der  $-\log_{10}(\text{adjustierter p-Wert})$ , wobei ab einem  $-\log_{10}(\text{adj. p-Wert}) \geq 1,3$  (entsprechend  $\text{adj. p-Wert} \leq 0,05$ ) von einer statistischen Signifikanz ausgegangen wurde. Für beide Gene ist sowohl bei *Ab* AB5075 WT als auch der AB5075 *surA*-Deletionsmutante nach Stimulation mit Tobramycin die Expression signifikant erhöht.

Eine durch Stimulation mit Tobramycin erniedrigte Expression ließ sich hingegen für die bereits erwähnten Gene ABUW\_RS15520 (bzw. ABUW\_3197) und ABUW\_RS15525 (bzw. ABUW\_3198), allerdings nur für die Zellen des WTs, beobachten. Ihre Expression sinkt im WT nach Tobramycin-Stimulation etwa auf das Niveau der  $\Delta surA$ -Mutante (siehe Abbildung 6).

Die Expression des für das Carbapenem-Resistenz-assoziierte OMP CarO kodierenden Gens *carO* (ABUW\_1015) ist durch Tobramycin-Stimulation sowohl zwischen unstimulierten und stimulierten WT- als auch zwischen unstimulierten und stimulierten  $\Delta$ *surA*-Mutante-Zellen ebenfalls erniedrigt (siehe Abbildung 9).

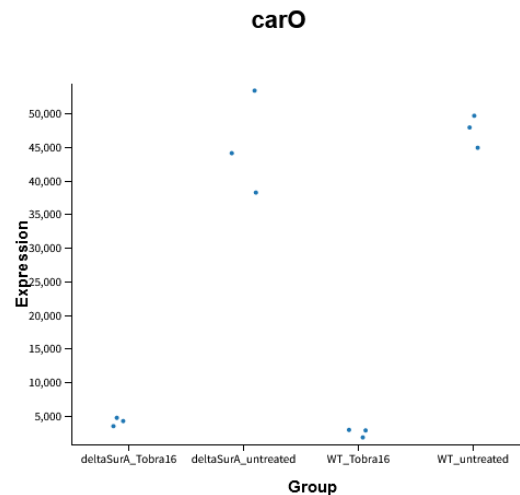


Abbildung 9 **Expressionslevel von *carO* in allen Vergleichsproben einer vergleichenden RNA-Seq.-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante ohne und mit Einfluss von Tobramycin.** Verglichen wurden die Expressionslevel zwischen WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante von *Ab* AB5075 sowohl unter Stimulation mit einer subinhibitorischen Menge an Tobramycin (16 mg/ml) als auch ohne Stimulation, um mögliche generelle Auswirkungen einer Stressreaktion bei Deletion von *surA* zu beobachten. Alle Proben wurden unabhängig voneinander vorbereitet und in Triplikaten hergestellt. Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der jeweiligen Differenzen in den Expressionslevels (log2-fache Änderung) diente der  $-\log_{10}(\text{adjustierter p-Wert})$ , wobei ab einem  $-\log_{10}(\text{adj. p-Wert}) \geq 1,3$  (entsprechend  $\text{adj. p-Wert} \leq 0,05$ ) von einer statistischen Signifikanz ausgegangen wurde. Die Expression von *carO* ist nach Stimulation mit Tobramycin sowohl im WT als auch der *surA*-Deletionsmutante signifikant erniedrigt.

Zusammenfassend wird aus den Daten der komparativen Expressionsanalyse ersichtlich, dass sich die zelluläre Antwort der *Ab* AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante auf die Stimulation mit Tobramycin nicht grundlegend von der des WT unterscheidet. Stattdessen sind für beide Proben bei Tobramycin-Stimulation vergleichbare Veränderungen der Expressionslevel oben aufgeführter Gene zu beobachten. Sowohl der WT als auch die  $\Delta$ *surA*-Mutante zeigen unter Behandlung mit 16 mg/l Tobramycin eine verstärkte Expression von Genen kodierend für einen RND-Efflux-Pumpenbestandteil (ABUW\_00050, bzw. ABUW\_0010), zwei Acetyltransferasen (ABUW\_RS18055, bzw. ABUW\_3710 und ABUW\_RS12810, bzw. ABUW\_2640), ein Fimbrien-/Pilus-OMP (ABUW\_RS11245, bzw. ABUW\_2312) und ein weiteres Fimbrienadhäsions-Protein (ABUW\_RS11250, bzw. ABUW\_2313). Eine verminderte Expression ist bei beiden für das *carO*-Gen (ABUW\_1015) zu verzeichnen. Für die  $\Delta$ *surA*-Mutante sind lediglich die beiden Gene mit den LocusTags ABUW\_3197 (ABUW\_RS15520) und ABUW\_3198 (ABUW\_RS15525) im Gegensatz zum WT unter Tobramycin-Stimulation nicht signifikant verringert exprimiert. Die Expression des für SurA kodierenden Gens (ABUW\_RS11030, bzw. ABUW\_2268) ist beim WT unter Stimulation mit Tobramycin nicht in seiner Expression verändert.

Die Diagramme sind in interaktiver Form ebenso unter [https://github.com/jenmuell/Doktorarbeit\\_Laura\\_Luib](https://github.com/jenmuell/Doktorarbeit_Laura_Luib) einzusehen.

## 4.2 Generierung einer konditionellen *surA*-Mutante in einem *Δskp ΔdegP*-Hintergrund

Da *Ab* neben den bekannten periplasmatischen Chaperonen Mechanismen aufweisen muss, die ein gleichzeitiges Fehlen dieser 3 kompensieren können, beschäftigte sich ein weiterer Teil meines Projekts mit der Identifizierung von Faktoren, die in Abwesenheit von SurA, Skp and DegP essentiell werden.

Hierfür sollte eine konditionelle *surA*-Mutante in einem *ΔskpΔdegP*-Hintergrund generiert werden, da in Vorversuchen die Herstellung von Quadrupelmутanten nicht erfolgreich war. Durch eine solche konditionelle Mutante sollte es möglich werden, die Rolle einzelner Faktoren im Kontext von Skp, DegP und SurA zu analysieren und globale Analysen mit Hilfe einer Transposon-Insertion-Library durchzuführen.

Die erforderlichen Schritte der Generierung einer solchen konditionellen *surA*-Mutante erfolgten wie unter 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben.

Die Generierung des Mutatorplasmids pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA aus dem pJM220-puC18T-miniTn7T-gm-rhaSR-PrhaBAD Vektorplasmid war hierbei erfolgreich und konnte durch Sequenzierung verifiziert werden. Die Ergebnisse einer Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer 244\_Hyg\_pJM220\_check\_fwd und 245\_Hyg\_pJM220\_check\_rev, welche die Hygromycin-Kassette im o.g. Plasmid flankieren (1353 bp) (siehe Abbildung 10) zeigen, dass das Mutatorplasmid nach dem Gibson Assembly und der Transformation in chemisch kompetente Zellen von *E. coli* DH5  $\alpha$  in den Klonen 1, 2, 4 und 6 die Hygromycin-Resistenzkassette inseriert hatten. Für eine zusätzliche Verifizierung dieser Ergebnisse wurde Plasmid-DNA aus eben diesen Klonen isoliert und eine Sequenzierung unter Verwendung der Primer 242\_EO\_777\_pJM220\_seq\_f und 243\_EO\_777\_pJM220\_seq\_r durchgeführt. Für zwei der Klone konnte verifiziert werden, dass die Sequenz der gesamten Hygromycin-Kassette keine Deletionen oder Basenaustausche enthielt, welche zu Konsequenzen auf Proteinebene geführt hätten. Eines dieser Plasmide wurde in *E. coli* Dh5 $\alpha$  als *E. coli* DH5 $\alpha$  pJM220\_Hyg\_surA in die Stammsammlung (Nr. 2506) eingebracht.

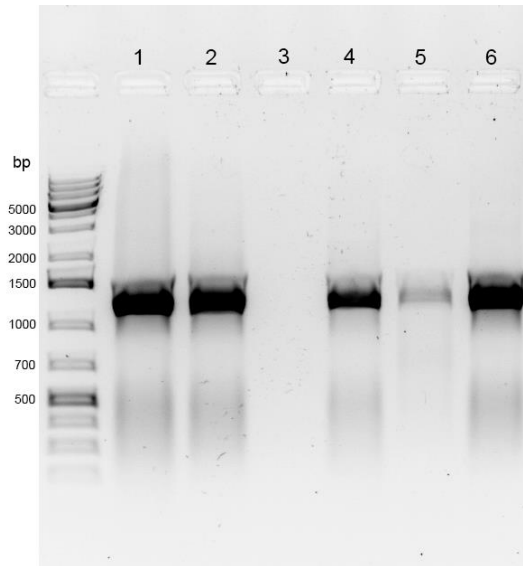


Abbildung 10 **Agarose-Gel nach einer Kolonie-PCR zur Überprüfung der Insertion der Hygromycin-Kassette in pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA.** Das Plasmid wurde zuvor in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und diese auf Selektivplatten mit 250 Hygromycin  $\mu$ g/ml ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in einer Kolonie-PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese auf das Vorhandensein der Hygromycin-Resistenzkassette getestet. Zeigten sich Banden auf der Höhe von ca. 1353 bp war von der Anwesenheit der Hygromycin-Resistenzkassette in dem jeweiligen Klon auszugehen. Die Klone 1, 2, 4 und 6 wurden für positiv befunden und für die Sequenzierung ausgewählt.

Das generierte Mutatorplasmid wurde des Weiteren auf die induzierbare Expression von *Ab-SurA* hin überprüft. Dazu wurde ein Western Blot angefertigt (siehe Abbildung 11). Die Bakterien wurden für 2-4 h mit 1 % Arabinose (bzw. 1 mM IPTG für die mitgeführte Kontrolle mit pCOLI His paSurA FL) induziert, Gesamtzelllysate hergestellt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern, gerichtet gegen das *Ab-SurA* im Western Blot analysiert.

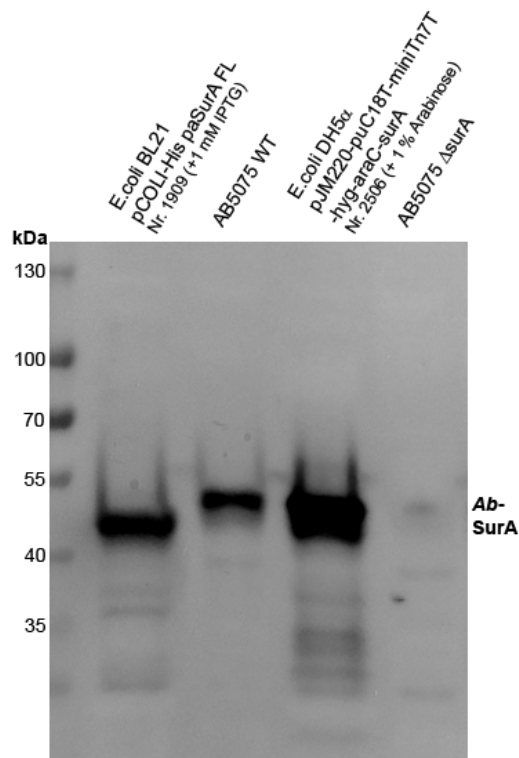


Abbildung 11 **Western Blot zur Überprüfung der Expression von der induzierbaren *Ab-surA*-Kassette des pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA Mutatorplasmids.** Induziert wurde die SurA-Expression in dem das Mutatorplasmid tragenden *E. coli* DH5 $\alpha$  durch Zugabe von 1 % Arabinose und Wachstum für 2- 4 h. Als Kontrolle diente *E. coli* BL21 pCOLI-His paSurA FL, welcher unter Induktion mit 1 mM IPTG das SurA aus *P. aeruginosa* exprimiert. Des Weiteren wurden als Referenzen sowohl der WT-Stamm von AB5075 als auch die  $\Delta$ surA-Mutante von Ab AB5075 in das Probenet aufgenommen. Alle Proben wurden mit dem Erstantikörper AB\_SurA PP-serum Rabbit SA8994 (1:1000) und dem Zweitantikörper goat anti rabbit POX-Antikörper (1:1000) behandelt. *Ab*-SurA hat ein berechnetes Molekulargewicht von rund 47 kD, *Pa*-SurA von 45 kDa.

Die erfolgreiche Selektion von Mutatorplasmid-tragenden *E. coli* mit Hygromycin, die Kolonie-PCR, die Sequenzierung und der Western Blot zeigen, dass das pJM220-Mutatorplasmid die beiden Komponenten aufweist (siehe Abbildung 12), die eine Selektion mit Hygromycin und die induzierbare Expression von *Ab*-SurA erlauben. Des Weiteren enthält das Plasmid alle Komponenten, die ihm die Insertion der araC-*surA*-Kassette in das Genom von *Ab* AB5075 an der Stelle der attTn7 Site downstream des *glmS*-Gens ermöglichen sollten (Peters & Craig, 2001; Waddell & Craig, 1989).

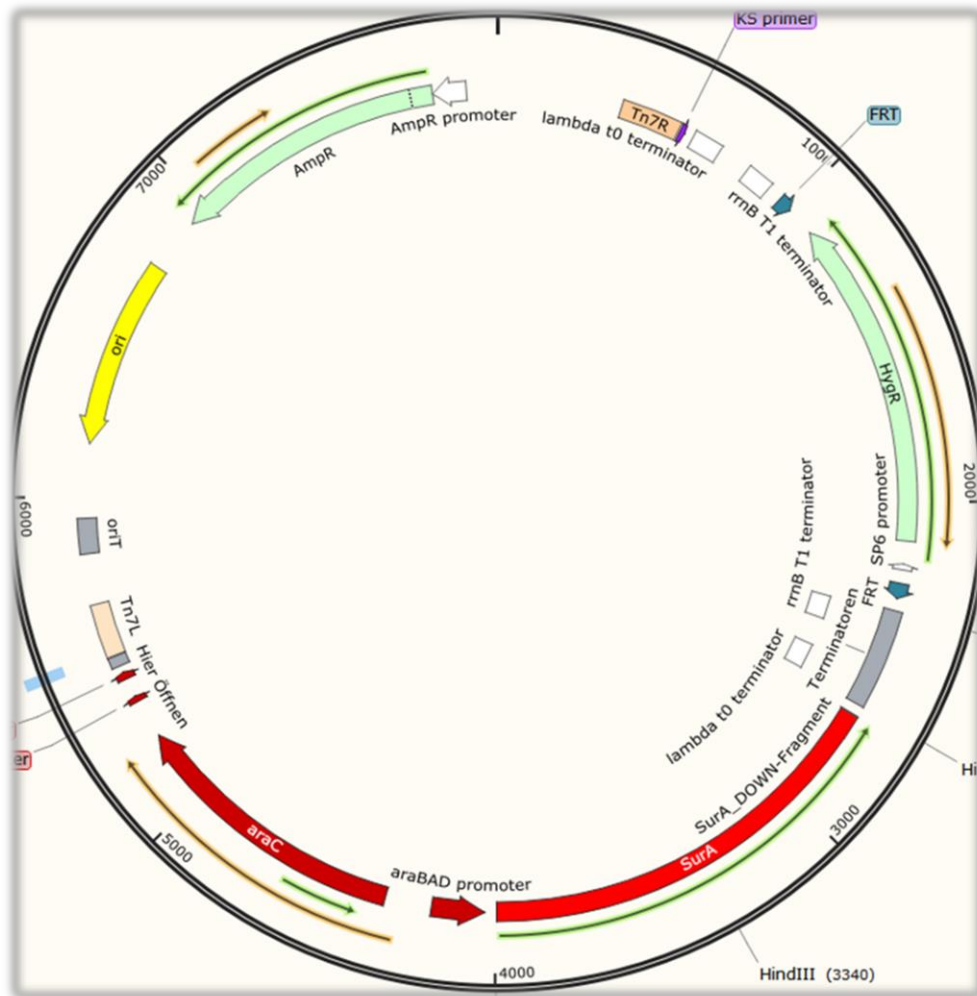


Abbildung 12 **Plasmidkarte des fertigen Konstruktes von pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA.** Ausgewählte wichtige Strukturelemente des Mutatorplasmids: Tn7R (rechtes Ende des Tn7-Transposons), FRT (Erkennungssites für FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* zur späteren Entfernung der Hygromycin-Resistenzkassette aus dem Genom), HygR (Resistenzkassette kodierend für *aph(4)-Ia* aus *E. coli*, vermittelt Resistenz gegen Hygromycin), *surA* (CDS für *surA*) unter der Kontrolle des araBAD Promotor, *araC* (Repressor des araBAD Promotor), Tn7L (mini-Tn7-Element, linkes Ende des Tn7-Transposons), AmpR (Resistenzkassette, kodierend für eine  $\beta$ -Laktamase (*bla*), vermittelt Resistenz u.a. gegen Ampicillin und Carbenicillin).

Alle Versuche der Insertion der induzierbaren *surA*-Kassette in das Genom von *Ab* AB5075 zeigten sich allerdings trotz zahlreicher Anläufe und dem Einsatz verschiedener Mutagenese-Techniken erfolglos. War es zuvor also möglich eine solche konditionelle Mutante in *Pa* zu generieren (Klein et al., 2019), bleibt dieser letzte Schritt für die Generierung einer konditionellen *surA*-Mutante in *Ab* AB5075 offen und Teil eines nachfolgenden Projekts.

Es konnten hierfür bei den multiplen Anläufen zur Generierung der konditionellen  $\Delta surA$ -Mutante jedoch weitere wichtige Erkenntnisse über das pJM220-Mutatorplasmid und die Mutagenese von *Ab* AB5075 gewonnen werden. So wurde in *Ec* die Induktormenge titriert, um eine möglichst physiologische SurA-Expression vom induzierbaren Promoter zu erreichen. Zusätzlich wurde eine neue Transformationsmethode für den verwendeten Stamm etabliert und dadurch die Transformationseffizienz von *Ab* AB5075 erheblich verbessert, so dass die besten Voraussetzungen für weitere Versuche, eine konditionale Mutante zu generieren, geschaffen werden konnten.

#### **4.2.1 Titration des Induktors Arabinose für die Expression von SurA vom pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA Mutatorplasmid**

Bei den Ergebnissen des Western Blots zur Überprüfung der induzierbaren *Ab-surA*-Kassette des generierten pJM220-Mutatorplasmids fiel auf, dass die SurA-spezifische Bande im Western Blot für den mit 1 % Arabinose induzierten *E. coli* DH5 $\alpha$  deutlich stärker als die des AB5075 WTs ausfiel (siehe Abbildung 11). SurA wurde in diesem also wesentlich stärker als in *Ab* AB5075 WT exprimiert. Um das SurA-Expressionslevel an das Level von AB5075 WT anzugleichen, sollte also die zur Induktion der SurA-Expression genutzte Arabinose-Konzentration titriert werden. In einem weiteren Western Blot wurden daher verschiedene Konzentrationen von Arabinose (0,01 – 0,0001 %) getestet (Abbildung 13).

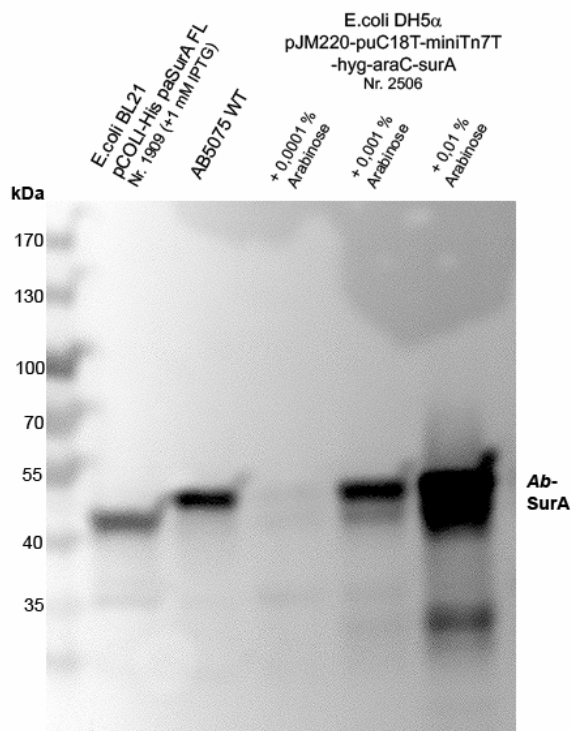


Abbildung 13 Titration des Induktors für die Expression von SurA vom pJM220-puC18T-miniTn7T-hyg-araC-surA Mutatorplasmid. Die SurA-Expression in dem das Mutatorplasmid tragenden *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde jeweils durch die Zugabe von Arabinose in der Endkonzentration 0,0001 %, 0,001 % und 0,01% induziert. Als Kontrolle diente *E. coli* BL21 pCOLI-His paSurA FL, welcher durch die Induktion mit 1 mM IPTG das *Pa*-SurA exprimiert. Zusätzlich wurde als Referenz ein Gesamtzellysate von *Ab* AB5075 WT verwendet. Alle Proben wurden mit dem Erstantikörper AB\_SurA PP-serum Rabbit SA8994 (1:1000) und dem Zweitantikörper goat anti rabbit POX-Antikörper (1:1000) behandelt. *Ab*-SurA hat ein berechnetes Molekulargewicht von rund 47 kD, *Pa*-SurA von 45 kDa.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, liegt die SurA-Expression vom pJM220-Mutatorplasmids bei Expression in *E. coli* DH5 $\alpha$  bei einer zur Induktion genutzten Endkonzentration von 0,001 % Arabinose auf etwa vergleichbarem Niveau zu der SurA-Expression des AB5075 WTs.

#### **4.2.2 Optimierung der Transformationsmethodik für *Ab* AB5075**

Für die Transformation von *Ab* AB5075 wurde bislang vor allem die „twitching motility“ (siehe 3.3.2.1) von *Ab* ausgenutzt. Diese Methode führt in der Regel zwar zur Transformation, ist aber experimentell vergleichsweise aufwändig und verbraucht viel Plastikmaterial. Durch den Vergleich verschiedener Transformations-Techniken bei den mehrfachen Anläufen zur Generierung der konditionellen *surA*-Mutante in *Ab* AB5075 zeigte sich jedoch, dass *Ab* durch Elektroporation mindestens ebenso zuverlässig und bedeutend effizienter zu transformieren ist. Bei dieser Methodik ändert das angelegte elektrische Feld die Permeabilität der Bakterienzellmembran derart, dass selbst DNA als geladenes Molekül in linearer oder in zirkulärer Form in das Bakterium aufgenommen werden kann (Jacobs, Thompson, Gebhardt, et al., 2014). Dies traf auch zu, wenn zur Transformation mehr als ein Plasmid eingesetzt werden soll. Das neu etablierte Transformationsprotokoll ist unter 3.3.2.3 nachzulesen.

## 5 Diskussion

Gram-negative Erreger stellen eine wachsende Bedrohung für das weltweite Gesundheitswesen dar. Gründe hierfür sind vor allem hohe Raten an Antibiotika-Resistenzen und eine im Verhältnis dazu zu langsame und wenig nachhaltige Entwicklung effizienter Therapeutika. Unter den Gram-negativen Bakterien als Erreger nosokomialer Infektionen kommt *Ab* ein Anteil von 0,7 bis 4,6 % zu (Lob et al., 2016). Dabei liegen die MDR-Raten bei eben solchen *Ab*-Infektionen laut einer im Rahmen der „SMART surveillance initiative“ 2016 durchgeführten Studie zwischen 47 – 93 %. Es ist demnach dringend erforderlich, neue Konzepte zur Prävention und Bekämpfung von Infektionen mit *Ab* zu entwickeln.

Da die OM Gram-negativer Keime, wie z.B. *Ab*, als Permeabilitätsbarriere und Träger zahlreicher Virulenzfaktoren maßgeblich zur Antibiotikaresistenz und Pathogenität beiträgt und zugleich eine einzigartige Architektur aufweist, stellt sie ein hochinteressantes Ziel für die Entwicklung neuer Antibiotika dar. Dieser Intention folgend, wurde im Rahmen meines Projektes versucht, den Einfluss der OM-Zusammensetzung insbesondere für die Aminoglykosid-Resistenz von *Ab* besser zu verstehen. Der Fokus lag hierbei auf der Rolle der periplasmatischen Chaperone SurA, Skp und DegP. Sie beeinflussen durch ihre wichtige Funktion bei der Biogenese von Außenmembranproteinen maßgeblich die Zusammensetzung der OM.

In verschiedenen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust insbesondere von SurA zu einer beeinträchtigten OM-Barrierefunktion, reduzierter Virulenz und einer Resensitivierung gegenüber bestimmten Antibiotika führen kann (Justice et al., 2006; Klein et al., 2019; Sklar et al., 2007; Watts & Hunstad, 2008; Weirich et al., 2017). Bei der Analyse der Rolle dieser Chaperone in *Ab* wurde kürzlich gezeigt, dass in *Ab* eine Deletion aller dieser drei Chaperone nicht letal ist, seine Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika jedoch deutlich beeinträchtigt ist (Birkle et al., 2022). Insbesondere für das Aminoglykosid Tobramycin konnte in *Ab* AB5075 bei einer Deletion von *surA* eine Resensitivierung für bestimmte Antibiotika beobachtet werden (siehe Tabelle 1).

## **5.1 Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* AB5075?**

Um eine mögliche Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* zu überprüfen, wurde eine Reihe verschiedener Suszeptibilitätstestungen durchgeführt. In MIC-Assays wurden die MHKs von jeweils einem WT-Stamm und einer  $\Delta$ *surA*-Mutante der *Ab*-Stämme AB5075 und AYE, als auch zehn weiterer klinischer *Ab*-Isolaten ermittelt. Verglichen wurden dabei die Substanzen Tobramycin, die strukturell nah verwandten Substanzen Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin und weitere gängige Antibiotika für die Therapie von Infektionen mit Gram-negativen Pathogenen.

### **5.1.1 Reproduktion einer Resensitivierung der *Ab* AB5075 $\Delta$ *surA*-Mutante für Tobramycin**

Die Beobachtungen einer erhöhten Suszeptibilität von *Ab* für das Aminoglykosid Tobramycin bei Deletion von *surA* ließen sich in den MIC-Assays reproduzieren: die MHK betrug für die AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante das ca. 17-Fache unter der für eine Wachstumshemmung des AB5075 WT benötigten Konzentration. Zwar kann hier nicht von einer Resensitivierung gesprochen werden, da sowohl der AB5075 WT als auch die AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante mit MHKs  $\leq 4$  mg/l als sensibel gegenüber Tobramycin zu werten sind, doch weist die signifikante Differenz dieser Werte auf eine erhöhte Sensitivität der Deletionsmutante hin. Dies bestätigt die Vermutung eines bestehenden Zusammenhanges zwischen dem Chaperon SurA und einer Resistenz gegen Tobramycin.

Wie alle Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside, interagiert auch Tobramycin mit der kleinen 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und induziert dabei den Einbau falscher Aminosäuren in die gerade an dieser Stelle entstehenden Polypeptide. Dies hat zur Folge, dass missgefaltete, nicht-funktionale Proteine entstehen und dadurch bakterizider Einfluss auf die Bakterienzellen genommen werden kann (Davis, 1987). Gerade zur Behandlung von schweren Infektionen mit Gram-negativen Bakterien wird Tobramycin daher oft in Kombination mit einem  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum eingesetzt (Nakamura et al., 2000). Resistenzen gegenüber Tobramycin können demnach folgenschwere Auswirkungen auf die Therapie und letztlich das Überleben der betroffenen

Patienten haben. Dabei sind die zugrunde liegenden Mechanismen einer solchen Resistenz gegenüber Tobramycin sehr vielfältig (Anderson et al., 2018). In Analysen von Gallagher et al. (2017) konnten Gene des Kerngenomes von *Ab* AB5075 identifiziert werden, die mit einer intrinsischen Tobramycin-Resistenz assoziiert sind. Darunter fanden sich auch die Gene der PPlasen PpiA, PpiB, PpiD und SurA, was möglicherweise auf eine Schlüsselfunktion von periplasmatischen Peptidyl-Prolyl-Isomerasen bzw. der OMP-Biogenese in diesem Kontext hinweisen könnte. Die dazu stimmigen Daten und Erkenntnisse dieser und vorangegangener Arbeiten unseres Labors, bestätigen die Annahme einer besonderen Rolle von SurA in dem Entstehen und dem Erhalt einer Resistenz gegen Tobramycin. Als periplasmatisches Chaperon liegt die Hauptfunktion von SurA in der Vermeidung von Fehlfaltungen von v.a. der OMPs (Lazar & Kolter, 1996; Sklar et al., 2007). Ist SurA nun abwesend und die Bakterienzelle zusätzlich dem Stress durch die Akkumulation weiterer missgefalteter Proteine durch den Einfluss von Tobramycin ausgesetzt, könnte dies in einem bakteriziden Synergismus münden und die erhöhte Suszeptibilität von *Ab* gegenüber Tobramycin bei Deletion von *surA* erklären. Um diesen möglichen Synergismus experimentell zu untersuchen, wurde das Ausmaß der Auswirkungen einer *surA*-Deletion in *Ab* analysiert. Dazu zählten vergleichende Untersuchungen der Zelloberflächenladung, der OM-Permeabilität und der Efflux-Pumpen-Aktivität zwischen WT und *surA*-Deletionsmutante. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Stimulation mit Tobramycin auf die Expressionslevel spezifischer, Resistenz-vermittelnder Gene im WT und der *surA*-Deletionsmutante durch komparative Transkriptomanalysen untersucht. Es stellte sich auch die Frage, inwiefern ein solcher Synergismus zwischen *surA*-Deletion und Tobramycin-Stimulation übertragbar auf weitere Substanzen der Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika ist. Die bakterizide Wirkung aller Aminoglykoside basiert letztlich auf dem Prinzip der Protein-Missfaltung (Davis, 1987), was die Auswirkungen einer *surA*-Deletion in den betroffenen Bakterienzellen maßgeblich verschärfen und die Deletionsmutanten auch für weitere Substanzen unter den Aminoglykosid-Antibiotika suszeptibler machen könnte.

### **5.1.2 Überprüfung der Spezifität dieses Effektes für Tobramycin – Vergleich mit den strukturell nah verwandten Aminoglykosiden Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin**

Um zu überprüfen, ob sich der Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von SurA und einer erhöhten Suszeptibilität für Tobramycin spezifisch ist, oder auf weitere strukturell sehr nahverwandte Substanzen aus der Gruppe der Aminoglykoside ausgeweitet werden kann, wurden auch die MHKs für Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin ermittelt.

Tobramycin, Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin weisen alle als zentrales Strukturelement einen jeweils 4,6-disubstituierten Deoxystreptamin-Ring und dadurch einen hohen Grad struktureller Verwandtschaft auf (Magnet & Blanchard, 2005). Ihre Unterschiede liegen lediglich in der Substitution mit variablen Resten an eben diesem Ring (siehe Tabelle 19). Nimmt man Tobramycin als Referenz, so unterscheidet sich Kanamycin von Tobramycin – wenn wie in den Arbeiten zu diesem Projekt als Gemisch aus Kanamycin A und B verwendet – in den zusätzlichen OH-Gruppen an den Positionen der Reste 4 bzw. 5. Dibekacin weist im Vergleich zu Tobramycin lediglich an der Position des Restes 3 eine zusätzlichen OH-Gruppe auf. Der strukturelle Unterschied von Gentamicin zu Tobramycin ist etwas umfassender: an den Positionen der Reste 4, 5 und 7 bis 10 unterscheiden sich die Substituenten für Gentamicin, zumeist handelt es sich dabei um eine zusätzliche OH- oder CH<sub>3</sub>-Gruppe.

Zur Überprüfung, ob der für Tobramycin beobachtete Effekt einer Resensitivierung von *Ab* bei *surA*-Deletion also spezifisch an der chemischen Struktur der Substanz liegt, wurden diese strukturell nahen Verwandten unter den Aminoglykosiden ebenfalls in die Suszeptibilitätstestungen miteinbezogen.

Bezogen auf den AB5075-Stamm zeigt sich zwischen WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante für Kanamycin mit einer ca. 2,4-fachen MHK-Reduktion unter diesen drei Therapeutika die geringste Differenz. Darauf folgt Gentamicin mit einer ca. 212-fachen MHK-Reduktion von WT zu der  $\Delta$ *surA*-Mutante. Die größte Differenz der MHKs zwischen dem AB5075 WT und der AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante ist für Dibekacin zu verzeichnen: die MHK der  $\Delta$ *surA*-Mutante liegt das rund 4.092-

Fache unter dem für den WT ermittelten Wert von > 160 mg/l Dibekacin. Aufgrund fehlender Breakpoint-Angaben in der Literatur kann eine finale Beurteilung als „resistent“ oder „suszeptibel“ an dieser Stelle nicht erfolgen. Jedoch befindet sich die MHK für die  $\Delta$ surA-Mutante in dem Konzentrationsbereich einer therapeutisch denkbaren Dosierung, weshalb von einer Resensitivierung der *Ab* AB5075  $\Delta$ surA-Mutante für Dibekacin ausgegangen werden kann.

Der vermutete Zusammenhang zwischen dem Chaperon SurA und einer Resistenz gegen Tobramycin lässt sich für *Ab* AB5075 folglich bestätigen und darüber hinaus auf die strukturellen Tobramycin-Verwandten Gentamicin und Dibekacin, mit Einschränkungen auch auf Kanamycin, unter den Aminoglykosiden ausweiten.

Dass unter den in diesem Projekt getesteten Aminoglykosiden allen voran Dibekacin die größten Effekte aufzeigt, ist bemerkenswert. Dibekacin wurde erstmalig 1971 als semisynthetisches Kanamycin B-Derivat (3', 4'-Dideoxy-Kanamycin B) in Japan hergestellt und ist dort seit 1973 in klinischer Verwendung (Oizumi et al., 1974). Wie auch das Aminoglykosid Amikacin wurde Dibekacin aus Kanamycin entwickelt, um Infektionen mit Kanamycin-resistenten Erregern wieder therapierbar zu machen. Durch die Abwesenheit der OH-Gruppen an den Resten 3 und 4, ist das Molekül vor Phosphorylierung und Adenylierung an diesen Stellen und einer Acetylierung an der 3-Aminogruppe des 2-Deoxystreptamin-Ringes durch in Kanamycin-resistenten Stämmen exprimierte AMEs geschützt (Schassan & Witt, 1979; Umezawa et al., 1975). Dibekacin wird stattdessen von denselben bakteriellen Enzymen wie Tobramycin, v.a. also durch 6'-N-Acetylierung und 2"-Nukleotidylierung, inaktiviert (Deforges et al., 1982). Dies ist naheliegend, da sich die beiden Moleküle, wie zuvor beschrieben, lediglich um eine OH-Gruppe an dem Rest 3 des Deoxystreptamin-Ringes unterscheiden.

Hinsichtlich seiner Pharmakokinetik und dem Wirkungsspektrum jedoch, scheint Dibekacin vergleichbarer zu Gentamicin als dem eigentlich strukturell näher verwandten Tobramycin zu sein: in einem Vergleich der MHKs für Dibekacin und Gentamicin von 221 verschiedenen klinischen Isolaten zeigte sich

Dibekacin nur in einigen wenigen *Pa*-Stämmen wirksamer als Gentamicin, insgesamt also sehr vergleichbar zu diesem (Hill et al., 1981). Therapeutische Vorteile bei dem Einsatz von Dibekacin lägen demnach entweder in einer geringeren Toxizität der Substanz oder in einer synergistischen Wirkung in Kombination mit anderen Therapeutika. Hinsichtlich der Toxizität ist festzuhalten, dass Dibekacin sowohl in akuten Infusionsstudien als auch in Studien mit Mehrfachdosierungen im Tiermodell vergleichbar hohe Konzentrationen im Nierenrindengewebe wie Gentamicin erreicht und diese deutlich über den Werten für Tobramycin liegen (Whelton et al., 1980). Die demnach sehr hohe inhärente Nephrotoxizität von Dibekacin gilt es in jedem Fall bei Therapiekonzeptionierungen zu beachten. Synergistische Effekte konnten für den kombinatorischen Einsatz von Dibekacin und Sulbenicillin in *Pa* gezeigt werden, sogar wenn diese nur in subinhibitorischen Konzentrationen eingesetzt wurden (Aonuma et al., 1987).

Setzt man nun diese Fakten mit den in dem Projekt gewonnenen Erkenntnissen in Zusammenhang, zeichnet sich ab, dass für den Einsatz von Dibekacin bei *Ab*-Infektionen eine Kombinationstherapie mit einem SurA-Inhibitor die wohl vielversprechendste Strategie sein könnte. Mit Dibekacin hat sich unter den neben Tobramycin getesteten Substanzen Gentamicin, Kanamycin, Dibekacin und Amikacin für den *Ab*-Stamm AB5075 eine weitere Substanz identifizieren lassen, bei der der Effekt einer Resensitivierung von *Ab* AB5075 bei *surA*-Deletion ebenfalls und zudem noch viel deutlicher als für Tobramycin zu beobachten war.

Was der Grund hierfür ist, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht abschließend sagen. Hinsichtlich der bereits ausgeführten strukturellen Unterschiede zwischen den Substanzen könnte eine veränderte Expression von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen unter *surA*-Deletion entscheidend Einfluss nehmen. AMEs senken durch die Modifikation funktionaler Gruppen die Fähigkeit und Effizienz der Aminoglykosid-Antibiotika, an ihre Zielstruktur, die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen, zu binden (Benveniste & Davies, 1973; Ramirez & Tolmasky, 2010). Diese funktionalen Gruppen sind zumeist die Reste an den variabel substituierten Ringen der Aminoglykoside. Liegt hier eine Abweichung,

wie z.B. zuvor ausgeführt zwischen Tobramycin und Dibekacin, vor, kann es passieren, dass das Bakterium zwar die eine, nicht aber die andere Substanz mit derselben Ausstattung an AMEs inaktivieren kann. Da Dibekacin jedoch von denselben AMEs wie Tobramycin inaktiviert wird (Deforges et al., 1982), scheint diese Erklärung weniger plausibel.

Auch scheint eine erhöhte Aminoglykosid- bzw. Tobramycin-Suzeptibilität durch eine Deletion von *surA* zumindestens teilweise stammspezifisch und nicht einfach generalisierbar zu sein, da man den Effekt bei dem *Ab*-Stamm AYE wesentlich schwächer bzw. überhaupt nicht beobachten konnte. Um dennoch eine Erklärung der Beobachtungen einer SurA-vermittelten Aminoglykosid-Resistenz von *Ab* AB5075 zu finden, wurde in einem weiteren Teil meines Projekts nach möglichen Ursachen hierfür gesucht.

### **5.1.3 Mögliche Mechanismen einer Rolle von SurA für die Aminoglykosid-Resistenz von *Ab* AB5075**

#### **5.1.3.1 Zellphysiologische Erklärungen für die Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* AB5075**

Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung der Beobachtungen zu einer reduzierten Aminoglykosid-Resistenz in Abwesenheit von SurA, wurde zunächst ein Blick auf mögliche physiologische Auswirkungen einer *surA*-Deletion in *Ab* geworfen. In Versuchen zur Evaluation der Zelloberflächenladung, der OM-Integrität und dem Efflux-Influx-Verhältnisses der Bakterienzellen, wurde überprüft, inwieweit ein Fehlen von SurA diese Aspekte beeinflusst. Da all diese Aspekte eine veränderte Bindung, Aufnahme bzw. den Efflux antibiotisch wirksamer Substanzen verursachen können, könnten sie ursächlich sein für die beobachteten Suszeptibilitätsunterschiede zwischen dem WT und der  $\Delta$ *surA*-Mutante.

Aufgrund ihrer polykationischen Valenz binden Aminoglykoside bei Kontakt mit der Oberfläche einer Gram-negativen Bakterienzelle an deren anionische Komponenten wie OMPs, Phospholipide und LPS (Ramirez & Tolmasky, 2010; Vanhoof et al., 1995). Je nach Ausprägung der Oberflächenladung adhäriert also mehr oder weniger des verabreichten Aminoglykosids an die Zelle, akkumuliert dort und kann vermehrt in die Bakterienzelle eindringen, um seine Wirkung zu entfalten. Die Zelloberflächenladung spielt demnach eine wichtige Rolle in der Aufnahme und Wirksamkeitsentfaltung dieser Therapeutika. Daher wurde die Oberflächenladung von WT und  $\Delta$ *surA*-Mutanten von *Ab* AB5075 und AYE in einem Zytochrom C-basierten Assay vergleichend untersucht.

Die Ergebnisse dieses Assays zeigten, dass sich die Zytochrom-C – Bindung und demnach die Zelloberflächenladung zwischen AB5075 WT und der AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante nicht signifikant unterscheidet (siehe Abbildung 3). Zwischen dem AYE WT und der AYE  $\Delta$ *surA*-Mutante ist tatsächlich eine größere Differenz zu beschreiben (~20 % weniger Bindung bei der  $\Delta$ *surA*-Mutante). Ob diese jedoch repräsentativ für weitere *Ab*-Stämme (nicht AB5075) ist und demnach von therapeutischer Relevanz wäre, lässt sich nicht sagen.

Festzustellen bleibt, dass eine veränderte Oberflächenladung, zumindest soweit sie mit diesem Assay quantifiziert werden kann, in AB5075 nicht ursächlich für die erhöhte Tobramycin-Sensitivität der  $\Delta$ *surA*-Mutante ist. Eine Zusammenfassung der bislang beschriebenen Auswirkungen der Deletion von *surA* in *Ab* AB5075 und AYE bietet Tabelle 24.

Tabelle 24 Zusammenfassung der analysierten Auswirkungen einer Deletion von *surA* in *Ab* AB5075 und AYE

Auswirkungen im Vergleich zu <i>Ab</i> AB5075 WT		<i>Ab</i> AB5075	<i>Ab</i> AYE	
		$\Delta surA$	WT (Vergleich mit AB5075 WT)	$\Delta surA$ (Vergleich mit AYE WT)
<b>Antibiotikassuszeptibilität</b>				
Aminoglykoside	AMK	↔	↑	↑
	TOB	↑	↔	↑
	GEN	↑↑	↔	↑
	KAN	↑	↓	↓
	DBK	↑↑↑	↑↑	↑↑
Penicilline	PIT	↔	↔	↑
Carbapeneme	IMP	↔	↑↑	↑↑
	MER	↔	↑↑	↑↑
Fluoroquinolone	LEV	↔	↔	↔
	CIP	↔	↔	↔
Polymyxine	COL	↔	↔	↔
<b>Zelloberflächenladung</b>				
Zytochrom C - Absorption		↔	↔	↓
↑ leicht erhöht (MHK 1 Stufe höher)		(AMK=Amikacin, TOB=Tobramycin, GEN=Gentamicin, KAN=Kanamycin,		
↑↑ mäßig erhöht (MHK 2 Stufen höher)		DBK=Dibekacin, PIT=Piperacillin/Tazobactam, IMP=Imipenem, MER=Meropenem,		
↑↑↑ stark erhöht (MHK 3 Stufen höher)		LEV=Levofloxacin, CIP=Ciprofloxacin, COL=Colistin)		
↓ reduziert (MHK 1 Stufe niedriger)				
↔ keine Veränderung im Vergleich zu <i>Ab</i> AB5075 WT				

Eine unterschiedliche Zelloberflächenladung ist demnach nicht der Grund für die erhöhte Tobramycin-Sensitivität von *Ab* bei *surA*-Deletion. Aus diesem Grund wurden von Birkle et al. (2022) zwei weitere Aspekte beleuchtet, die diese Beobachtung ebenso erklären könnten. Dies waren zum einen die OM-Permeabilität der Bakterien und zum anderen die Efflux-Pumpen-Effizienz in den jeweiligen Stämmen. Sowohl eine erhöhte Permeabilität als auch eine Aktivitätseinschränkung der Efflux-Pumpen bei *surA*-Deletion könnten zu einer lokal höheren Wirkstoffkonzentration der verabreichten Substanzen in den Bakterienzellen führen und so die beobachteten Suszeptibilitätsunterschiede zwischen WT und  $\Delta$ *surA*-Mutanten erklären.

Um die Permeabilität der OM, die Wirksamkeit von Efflux-Pumpen und damit die Netto-Aufnahme zwischen AB5075 WT und der AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante zu vergleichen, kann ein NPN-basierter Assay verwendet werden. Solche Experimente wurden im Rahmen der Publikation von Birkle et al. (2022) durchgeführt. N-Phenyl-1-naphthylamin (NPN) ist ein hydrophobes Molekül, das in hydrophobem Milieu fluoresziert. Ein solches Milieu stellt auch die innere Schicht der OM von Gram-negativen Bakterien dar. In diese kann NPN im Normalfall aufgrund der anwesenden LPS nur sehr schlecht eindringen. Ist die OM in ihrer Zusammensetzung und Funktion jedoch beeinträchtigt, kann NPN sich darin einlagern. Hohe Fluoreszenzwerte weisen demnach auf eine beeinträchtigte OM-Integrität hin. Zudem kann NPN von einigen Efflux-Pumpen wieder aus der Zelle entfernt werden. Es stellt somit einen geeigneten Indikator für die Beurteilung sowohl der Integrität der OM als auch der Effizienz einer Reihe von Efflux-Pumpen dar. Abbildung 14 zeigt Daten aus Birkle et al., (2022). Zu sehen sind für eine Reihe von Deletionsmutanten und den WT des AB5075-Stammes ermittelte Unterschiede in den initialen Fluoreszenzwerten (welche die OM-Permeabilität widerspiegeln, da gleichzeitig die Aktivität der Efflux-Pumpen durch CCCP inhibiert wurde) und Werte für die Reduktion der Fluoreszenzwerte unmittelbar nach Reaktivierung der Efflux-Pumpen durch die Zugabe von Glukose (was eine Beurteilung der Effizienz der Entfernung von NPN aus dem Zellinneren durch die Efflux-Pumpen erlaubt).

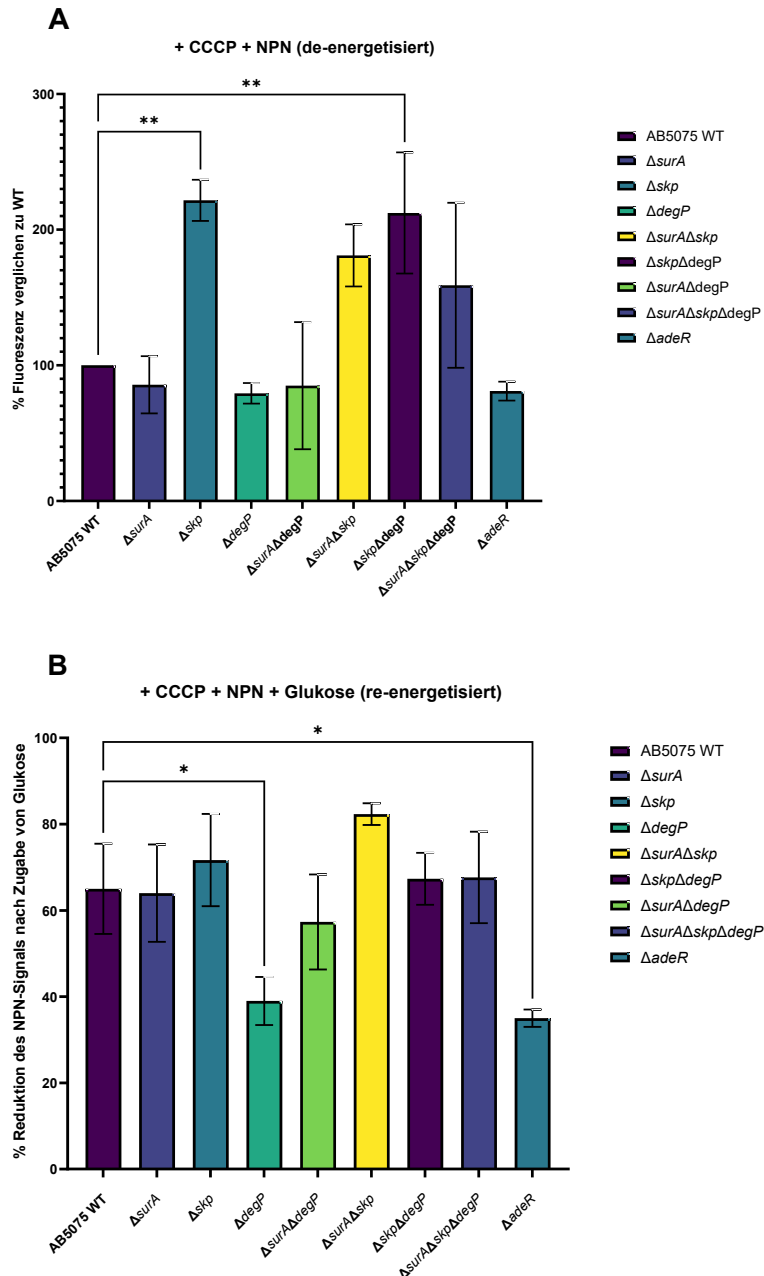


Abbildung 14 **Überprüfung der Membranintegrität und Efflux-Aktivität von *Ab* AB5075 WT und verschiedenen Deletionsmutanten durch einen NPN-Assay.** 1-N-phenyl-naphthylamine (NPN) fluoresziert lediglich in hydrophober Umgebung. Höhere Fluoreszenzwerte deuten folglich auf eine erhöhte Aufnahme und damit eine reduzierte Außenmembranintegrität hin. (A) Membranintegrität. Vor Beladung der Zellen mit NPN wurden die Efflux-Pumpen aller Zellen durch Behandlung mit CCCP de-energetisiert und die NPN-Fluoreszenz photometrisch quantifiziert. Gezeigt ist der relative Unterschied der Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp. (B) NPN-Efflux. Durch die Zugabe von Glukose wurden die Efflux-Pumpen reaktiviert und die NPN-Fluoreszenzwerte unmittelbar danach erneut quantifiziert. Gezeigt ist die prozentuale Reduktion im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz in %. Alle Fluoreszenzwerte wurden jeweils auf die im Ansatz vorhandene Bakterienzahl normiert. Es erfolgten 3 voneinander unabhängige Messungen und eine statistische Analyse mit One-way-ANOVA (\*\* $p$  0.001-0.01 oder \* $p$  0,01-0,05). Die Abbildung wurde Birkle et al. (2022) entnommen und modifiziert.

Es ist zu erkennen, dass die Einzelknockout-Mutante  $\Delta skp$  und die Doppelknockout-Mutante  $\Delta skp \Delta degP$ , und nicht etwa die Tripelknockout-Mutante  $\Delta surA \Delta skp \Delta degP$ , eine signifikant höhere Fluoreszenz als der WT aufweisen. Die  $\Delta surA$ -Mutante zeigt verglichen mit dem WT hingegen eine marginal verringerte Fluoreszenz (Abb. 14A). Hinsichtlich der Reduktion der NPN-Fluoreszenz im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz nach Reaktivierung durch Glukose weist unter den Deletionsmutanten lediglich die Einzelknockout-Mutante  $\Delta degP$  signifikant verringerte Werte im Vergleich zum WT auf (Abb. 14B). Gleiches gilt für die, für die Expression bestimmter Efflux-Pumpen defiziente und damit als Positivkontrolle dienende  $\Delta adeR$ -Mutante. Zusammenfassend scheint also vielmehr Skp als SurA wichtig für die OM-Permeabilität zu sein und DegP scheint eine Rolle für den Efflux zu spielen.

Hinsichtlich der Aktivität der Efflux-Pumpen ist also festzuhalten, dass zwischen der AB5075  $\Delta surA$ -Mutante und dem AB5075 WT keine signifikanten Unterschiede bestehen. Sowohl hinsichtlich der initialen NPN-Fluoreszenz zur Quantifizierung der OM-Integrität, als auch bei Betrachtung der Reduktion der NPN-Fluoreszenz nach Glukose-Zufuhr zur Quantifizierung der Efflux-Pumpen-Aktivität gibt es hier keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 14). Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass der NPN-Assay natürlich nur ein Surrogat für die Analyse der Interaktion der Bakterienzellen mit Tobramycin sein kann und der Assay auch nicht unbedingt den Efflux von Tobramycin widerspiegeln muss. Was der Assay aber zeigt, ist, dass es in der  $surA$ -Mutante keine globale und tiefgreifende Beeinträchtigung der OM-Permeabilität gibt und der Efflux (soweit er hiermit abgebildet werden kann) durch das Fehlen von SurA ebenfalls nicht gravierend verändert wird.

Die theoretisch denkbaren Folgen einer veränderten Zelloberflächenladung, einer erhöhten Durchlässigkeit der OM oder eingeschränkten Aktivität der Efflux-Pumpen aufgrund einer veränderten OM-Zusammensetzung durch die Deletion des periplasmatischen Chaperons SurA, können demnach in der Praxis nicht als Erklärungsmodell für die verminderte Tobramycin- bzw. Aminoglykosid-Resistenz der *Ab* AB5075  $\Delta surA$ -Mutante dienen. Um andere mögliche Erklärungen für die beobachteten Effekte zu untersuchen, wurde daher die Suche in einem nächsten Schritt auf Transkriptom-Ebene fortgeführt.

Dafür wurden zunächst allgemein Veränderungen der Genexpression durch die Deletion von *surA* und spezifischer die Expression von Resistenzdeterminanten des periplasmatischen Raumes in einer vergleichenden RNA-Sequenz-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante untersucht.

### 5.1.3.2 Suche nach Erklärungen für die Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* AB5075 auf mRNA-Ebene

Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung der OM nicht der einzige Faktor ist, der die Suszeptibilität von Bakterien gegenüber Antibiotika entscheidend beeinflussen kann. Vielmehr existieren zahlreiche weitere Mechanismen, z.B. veränderte Zielstrukturen und die Expression modifizierender oder inaktivierender Enzyme. Eine wichtige Gruppe solcher Enzyme ist die der Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme (AMEs) (Magnet & Blanchard, 2005). Letztere können auch in *Ab* wesentlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Multiresistenzen beitragen und könnten z.B. durch Stressinduktion, die aus der *surA*-Deletion möglicherweise resultiert, in ihrer Expression verändert sein (Gallagher et al., 2015).

Für die Tripelknockout-Mutante  $\Delta$ *surA* $\Delta$ *skp* $\Delta$ *degP* konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass das für die Aminoglykosid-Phosphotransferase APH(3')-VI kodierende Gen *aphA6* des p1AB5075-Plasmids von AB5075 (Gallagher et al., 2015; Ramirez & Tolmasky, 2010), ein transposables Element, verloren gegangen war (Birkle et al., 2022). Mobile genetische Elemente wie das p1AB5075-Plasmid sind natürliche Vektoren des horizontalen Gentransfers (Shintani et al., 2015). Aufgrund ihres rekombinanten Charakters sind sie dazu befähigt, auf ihnen befindliche Gene zu mobilisieren und an anderer Stelle zu inserieren oder gar, wie im Falle des *aphA6*-Gens, zu deletieren (Lipszyc et al., 2022; Partridge et al., 2018). Dies kann eine gesteigerte Suszeptibilität der Tripelknockout-Mutante gegenüber Tobramycin zumindest teilweise erklären. Dieser Genverlust war jedoch nicht in den Doppel- und Einzelknockout-Mutanten erfolgt. Die erhöhte Sensitivität der  $\Delta$ *surA*-Mutante gegenüber Tobramycin, Gentamicin, Kanamycin und allen voran Dibekacin kann demnach nicht auf einen Verlust des für APH(3')-VI kodierenden Bereichs zurückgeführt werden. Eine veränderte Expression dieser und auch anderer AMEs könnte jedoch weiterhin ursächlich für die veränderte Aminoglykosid-Resistenz der  $\Delta$ *surA*-Mutante sein.

Mögliche Kandidaten sind zahlreich, wurden in AB5075 doch 32 Gene im Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Tobramycin identifiziert (Gallagher et al., 2017). Darunter sind lediglich 3 Gene nicht auf dem Kerngenom, sondern plasmidisch kodiert: *aadB* und *aacA4* auf dem p1AB5075-Plasmid und ein Gen für ein Protein unbekannter Funktion auf dem p2AB5075-Plasmid von AB5075 (Gallagher et al., 2017). Tabelle 22 bietet eine Übersicht über die aus diesem Pool und weiteren potenziell einflussreichen periplasmatischen Faktoren von *Ab* AB5075 (Scribano et al., 2019), die nach der Transkriptom-Analyse genauer betrachtet werden sollten.

Zudem sollte untersucht werden, ob sich die zelluläre Antwort einer  $\Delta$ *surA*-Mutante auf die Stimulation mit Tobramycin grundlegend von der des WTs unterscheidet. Daher wurden sowohl unstimulierte als auch mit subinhibitorischen Konzentrationen von Tobramycin stimulierte Zellen in die Analysen eingeschlossen (siehe 3.3.7).

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zeigten, dass von den ausgewählten 32 Kandidatengenen lediglich drei Gene unter Stimulation mit Tobramycin eine signifikant erhöhte Expression aufweisen. Diese kodieren für einen RND-Efflux-Pumpenbestandteil (ABUW\_0010, bzw. ABUW\_RS00050) und zwei Acetyltransferasen (ABUW\_3710 bzw. ABUW\_RS18055 und ABUW\_2640, bzw. ABUW\_RS12810). Des Weiteren fielen fünf Gene auf, die durch die Stimulation mit Tobramycin in ihrer Expression signifikant verändert waren. Darunter waren unter Tobramycin-Stimulation ebenso verstärkt exprimiert die für ein Fimbrien-/Pilus-OMP (ABUW\_2312, bzw. ABUW\_RS11245) und für ein weiteres Fimbrienadhäsionsprotein (ABUW\_2313, bzw. ABUW\_RS11250) kodierenden Gene. Die Expression der Gene für das mit Carbapenem-Resistenz assoziierte OMP CarO (ABUW\_1015), für eine Methyltransferase (ABUW\_3197, bzw. ABUW\_RS15520) und für ein bislang uncharakterisiertes Protein (ABUW\_3198, bzw. ABUW\_RS15525), zeigten unter Tobramycin-Stimulation hingegen eine reduzierte Expression. Diese Beobachtungen gelten gleichermaßen für *Ab* AB5075 WT als auch für die  $\Delta$ *surA*-Mutante bei Stimulation mit Tobramycin. Einzig davon ausgenommen sind die beiden Gene ABUW\_3197 und ABUW\_3198, welche nur bei der  $\Delta$ *surA*-Mutante bei Stimulation mit Tobramycin keine Veränderung in ihren Expressionslevels zeigten. Die exakte zelluläre Funktion dieser beiden Faktoren ist jedoch nicht bekannt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die zelluläre Antwort der *Ab* AB5075  $\Delta$ *surA*-Mutante auf die Stimulation mit Tobramycin nicht grundlegend von der

des WT's unterscheidet. Zur Klärung der Frage, welche Rolle ABUW\_3197 und ABUW\_3198 in diesem Zusammenhang spielen, wären jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

Stattdessen sind für beide Proben bei Tobramycin-Stimulation simultane Veränderungen der Expressionslevel bestimmter Gene zu beobachten. Dass hierunter vor allem die an der Fimbrien- und Pilus-Biogenese beteiligten Gene ABUW\_2312 und ABUW\_2313 derart signifikant verstärkt exprimiert sind, ist interessant und kongruent zu Ergebnissen vorangegangener Studien. In diesen wurden Veränderungen des Transkriptoms von *Ab* im Verlauf einzelner MDR-*Ab*-Infektionen und deren Therapien durch RNA-Sequenzierung untersucht (Wright et al., 2016; Wright et al., 2017). Dabei wurde ersichtlich, dass v.a. das *csu* Operon sehr dynamischen Remodellierungsprozessen unterliegt. Chaperone-usher (Csu)-Pili sind adhäsive Oberflächenorganellen, die maßgeblich zur Biofilmbildung beitragen können und von zahlreichen Gram-negativen Pathogenen produziert werden (de Breij et al., 2009; McQueary & Actis, 2011; Pakharukova et al., 2018). Den Typ-I-Pili zugehörend, werden Csu-Pili in *Ab* von einem sechs Gene umfassenden Operon (*csuA/BABSDE*; ABUW\_1487 bis ABUW\_1492) kodiert (Tomaras et al., 2008).

Den LocusTags von ABUW\_2312 (annotiert als *htrE*; Pili-Assemblierungs-Chaperon) und ABUW\_2313 (annotiert als *fimA\_2*, Fimbrien-Biogenese-OM Usher Protein) und ihrer Anordnung im Genom zu entnehmen, könnten auch diese beiden Gene zusammen mit ABUW\_2310 (annotiert als *fimF*; Fimbrienprotein) und ABUW\_2311 (annotiert als *fimC\_1/2*; periplasmatisches Pili-Assemblierungs-Chaperon) ein Operon bilden, wie ein Blick auf die Genomsequenz von *Ab* AB5075 an dieser Stelle zeigt (siehe Abbildung 15).

## Acinetobacter baumannii strain AB5075-UW, complete genome

GenBank: CP008706.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

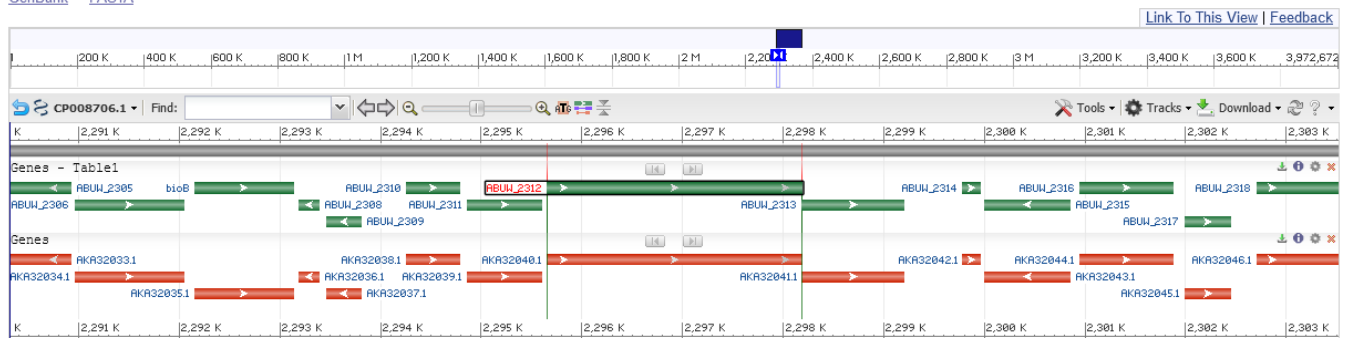


Abbildung 15 Auszug aus der Genomsequenz von *Ab* AB5075 um die Gene ABUW\_2312 (*htrE*) und ABUW\_2313 (*fima\_2*)

Die vollständige Sequenz ist einzusehen unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP008706.1?report=graph>.

Auch die in etwa vergleichbar erhöhte Expression von ABUW\_2312 und ABUW\_2313, sowie von ABUW\_2310 und ABUW\_2311 bei Stimulation mit Tobramycin im Vergleich zu ihren Expressionslevels in unstimulierten Zellen von *Ab* AB5075 WT und der *surA*-Mutante spricht für das Vorliegen eines Operons.

Die Assemblierung von Typ I-Pili in Gram-negativen Bakterien erfordert ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Protein-Translokationssysteme (Fronzes et al., 2008). So werden Pilus-Untereinheiten beispielsweise über das SecYEG-Translokon über die IM in das Periplasma transportiert, um dort mit der Hilfe periplasmatischer Chaperone wie HtrE oder FimC1/2 und Usher Proteinen wie FimA2 verlinkt und polymerisiert zu werden (Chahales & Thanassi, 2015; Jones et al., 1997). Diesem komplexen Zusammenspiel entsprechend, sind an der Pilus-Biogenese stets mehrere Gen-Cluster beteiligt, worunter vor allem das *fim* Gen-Cluster von *E. coli* bekannt ist (Klemm et al., 1985). Dieses liegt unter der Kontrolle eines als *fimS* bezeichneten Promotors, welcher phasenabhängig und stressinduziert die Ausbildung von Typ I-Pili in *E. coli* reguliert (Bessaiah et al., 2021).

Als Subgruppe der Typ I-Pili ist auch den Csu-Pili ein Gen-Cluster zugehörig (*csuA/BABSDE*, s.o.), welches in klinischen Isolaten von *Ab* als hoch konserviert beschrieben ist (Moriel et al., 2013). Das Csu-Gen-Cluster unterliegt der Regulation durch das Zweikomponenten-System *bfmR/S* (Tomaras et al., 2008). Besondere Bedeutung kommen dabei den Pilus-Komponenten CsuA/B und CsuC, welche in einem ersten Schritt der Pilus-Biogenese zu einem Komplex präassemblieren, und CsuE, aufgrund seiner Lokalisation an der Pilus-Spitze, zu (Pakharukova et al., 2015). Unterbrechungen der ORFs von *csuC* und *csuE* durch darin fehlinsertierte Sequenzen resultierten in *Ab* 19606 in nicht-pilierten Zellen, die zu Adhäsion und Biofilmbildung nicht mehr fähig waren (Tomaras et al., 2003).

Die Fähigkeit zur Adhäsion ist jedoch ein wichtiger Virulenzfaktor pathogener Bakterien. Durch sie können die Bakterienzellen an den Wirtszellen anheften und eine Kolonisation möglich werden. Zudem wurde gezeigt, dass Pili wichtig sind für die Bildung von Biofilmen (O'Toole & Kolter, 1998a, 1998b; Recht et al., 2000; Tomaras et al., 2003). Ist *Ab* nun in seinen Fertigkeiten für diesen initialen Schritt einer Infektion und möglicherweise auch in seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung eingeschränkt, ist zu vermuten, dass dadurch seine Virulenz reduziert ist und zusätzlich seine Suszeptibilität für eine Antibiotikatherapie (durch die reduzierte Biofilmbildung) erhöht ist.

Dies macht die Fimbrien- und Pilus-Biogenese zu einem weiteren interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Drug Targets und Gene wie ABUW\_2312 und ABUW\_2313 zu vielversprechenden Kandidaten für weitere Analysen.

In Kombination mit der Beobachtung einer verminderten Expression von ABUW\_0010 (annotiert als *adeT*; Efflux-Pumpe vom RND-Typ) bei Tobramycin-Stimulation, lässt sich des Weiteren ein inverser Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und Efflux-Pumpen-Aktivität in *Ab* vermuten. In früheren Studien wurde bereits beobachtet, dass *Ab*-Mutanten, welche die RND-Efflux-Pumpen-Gene *adeABC* und *adeIJK* überexprimieren, reduzierte Level an Pilus-Proteinen und folglich eine eingeschränkte Fähigkeit zur Biofilmbildung aufweisen (Yoon et al., 2015). Ob sich diese Beobachtung jedoch ohne Weiteres auf einen Zusammenhang zwischen einer verminderten *adeT*-Expression und einer kompensatorisch gesteigerten Biofilmbildung durch Überexpression von an der Fimbrien- und Pilus-Biogenese beteiligten Genen wie ABUW\_2312 und ABUW\_2313 übertragen lässt, ist fraglich und bedarf weiterer Untersuchungen. Zumal *adeT* in der Literatur kaum Erwähnung findet, da vor allem die RND-Efflux-Pumpen AdeABC, kodiert von dem *adeRS* Operon (Marchand et al., 2004), AdeIJK und AdeFGH von großer Bedeutung für die Antibiotikaresistenz in *Ab* sind (Coyne et al., 2011; Gallagher et al., 2015).

Transkriptionelle Veränderungen unter Stressbedingungen, wie z.B. durch die Behandlung mit Antibiotika, umfassen stets zahlreiche Veränderungen und so ist ein Rückschluss auf lineare Zusammenhänge meist nur ein Teilaspekt in einem weitaus komplexeren Regulations-Netzwerk. So zeigten weitere Transkriptionsanalysen, dass *Ab* auf Antibiotika-Exposition, Eisen- oder Zink-Limitation und etwaige Unterschiede in den Wachstumsbedingungen mit zahlreichen transkriptionellen Veränderungen reagiert, die sowohl Gene der Typ-I-/Csu-Pili und Biofilmbildung als auch des Eisenerwerbs und des Quorum Sensings betreffen (Chang et al., 2014; Mortensen et al., 2014; Richmond et al., 2016; Rumbo-Feal et al., 2013). Die Ursachen für derartige transkriptionelle Veränderungen in der Expression von Virulenz- oder Resistenz-assoziierten Genen von *Ab* sind dabei ebenso vielfältig und umfassen z.B. die Substitution einzelner Basen, IS-Mobilisation, IS-assoziierte Deletionen, Duplikationen und Rekombination, (Wright et al., 2017). IS werden dabei als die kleinsten transposablen Elemente gesehen, die durch Transkription von auf ihnen befindlichen Transposase-Genen zur unabhängigen Transposition innerhalb des bakterieneigenen

Genoms und durch Integration in größere mobile genetische Elemente wie z.B. Plasmide zum interzellulären, horizontalen Transfer zwischen verschiedenen Bakteriengenomen befähigt sind (Mahillon & Chandler, 1998; Siguier et al., 2014; Vandecraen et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass derartige pathoadaptive Mutationen unter Selektionsdruck zunehmen. Dies unterstreicht einmal mehr *Ab*s erstaunliche Adaptionfähigkeit an sich verändernde und herausfordernde Umwelt- und Wirtsbedingungen (Wen et al., 2014) und erklärt zumindest teilweise, warum er ein so widerstandsfähiges und auch ein in der molekularbiologischen Analyse anspruchsvolles und oft nur schwer therapierbares Pathogen ist.

Wurde ein solcher zusätzlicher Selektionsdruck, wie die Stimulation der *Ab*-Zellen mit Tobramycin darstellt, weggelassen, konnten des Weiteren Einblicke in die alleine durch die Deletion von *surA* verursachten Veränderungen des *Ab*-Transkriptoms gewonnen werden. Dabei zeigte sich in dem Vergleich zwischen *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante in jeweils unstimuliertem Zustand, dass die beiden für eine Methyltransferase und ein bislang uncharakterisiertes Protein kodierenden Gene ABUW\_3197 und ABUW\_3198 in der  $\Delta$ *surA*-Mutante weniger stark exprimiert werden als in den WT-Zellen. Auch ABUW\_3197 und ABUW\_3198 sind benachbarte LocusTags und es ist anzunehmen, dass sie zu einem Operon gehören (siehe Abbildung 16). Welche Auswirkungen ihre veränderte Expression jedoch hat und ob diese relevant für die verschiedenen Phänotypen einer *surA*-Deletionsmutante sind, müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

## Acinetobacter baumannii strain AB5075-UW, complete genome

GenBank: CP008706.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Link To This View](#) | [Feedback](#)

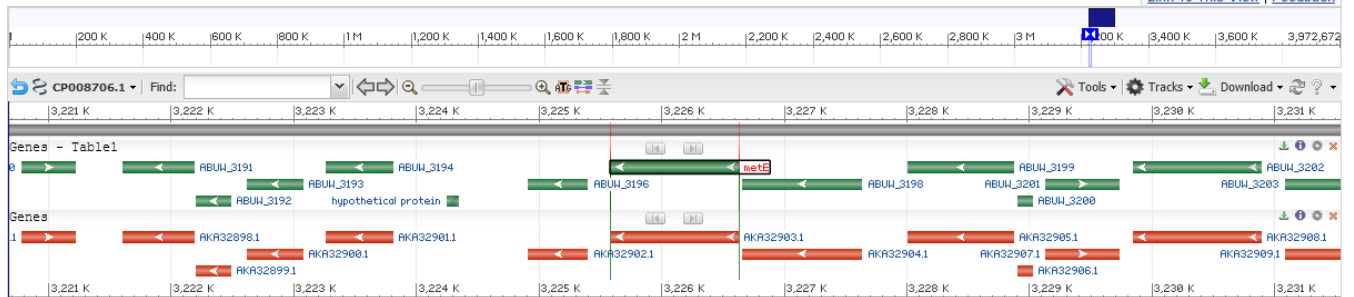


Abbildung 16 Auszug aus der Genomsequenz von *Ab* AB5075 um die Gene ABUW\_3197 (*metE*) und ABUW\_3198

Die vollständige Sequenz ist einzusehen unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP008706.1?report=graph>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletion von *surA* alleine in *Ab* AB5075 keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Expressionslevels der weiteren als relevant betrachteten AMEs bewirkt und somit auch nicht die erhöhte Tobramycin-Suszeptibilität der  $\Delta$ *surA*-Mutante erklären kann. Zusätzlicher Selektionsdruck durch eine Stimulation mit Tobramycin selbst hingegen, bewirkt sowohl bei WT- als auch Zellen der  $\Delta$ *surA*-Mutante simultan veränderte Expressionslevels von an der Pilus- und Fimbrien-Biogenese beteiligten Genen (ABUW\_2312, ABUW\_2313), diversen AMEs (ABUW\_3710, ABUW\_2640, ABUW\_3197, ebenso vermutlich ABUW\_3198) und dem Carbapenem-Resistenz assoziierten OMP CarO (ABUW\_1015). Auch wenn die veränderte Expression dieser Gene die erhöhte Tobramycin-Suszeptibilität der  $\Delta$ *surA*-Mutante nicht direkt erklären können, stellen einige von ihnen doch interessante Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen von Faktoren, die die Tobramycin-Resistenz von *Ab* AB5075 beeinflussen können, dar. Insbesondere ABUW\_2312 und ABUW\_2313, sowie ABUW\_3197 und ABUW\_3198 sind dabei interessante Kandidaten, die in weiterführenden Arbeiten analysiert werden.

Ebenso wäre es von großem Interesse, eine solche komparative RNA-Expressions-Analyse von *Ab* AB5075 WT und  $\Delta$ *surA*-Mutante auch mit subinhibitorischen Konzentrationen von Gentamicin und Dibekacin durchzuführen. Diese erwiesen sich teils sogar als wirksamer als Tobramycin, insbesondere in der  $\Delta$ *surA*-Mutante (siehe 4.1.1.1). Diese Analysen könnten helfen, Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der zellulären Reaktion auf diese unterschiedlichen Aminoglykoside aufzuzeigen und zusätzlich ein noch besseres Verständnis über die Mechanismen der Rolle von SurA für die Aminoglykosid-Resistenz von *Ab* ermöglichen.

## 5.2 Weitere Suche nach Faktoren, die den Verlust von SurA, DegP und Skp in *Ab* kompensieren können

Da *Ab* neben den bekannten periplasmatischen Chaperonen vermutlich weitere Mechanismen innerhalb des OMP-Biogeneseweges aufweist, die ein gleichzeitiges Fehlen dieser 3 Faktoren kompensieren können (siehe Abbildung 17), beschäftigte sich ein weiterer Teil meines Projekts mit Vorarbeiten zur Identifizierung von Faktoren, die in Abwesenheit von SurA, Skp and DegP essentiell werden.

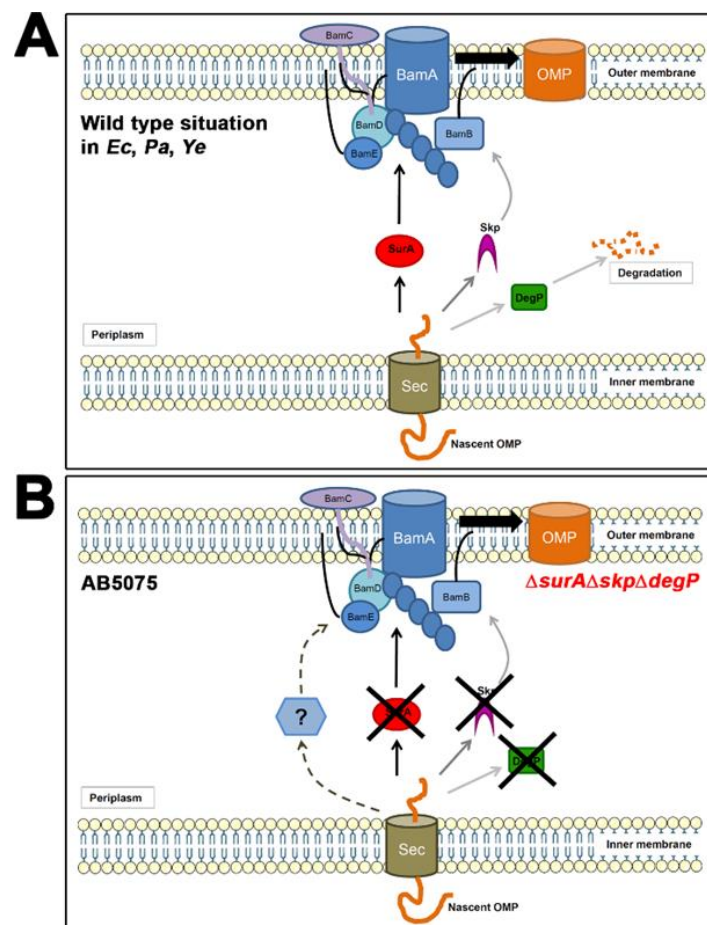


Abbildung 17 OMP-Biogenese und das periplasmatische Chaperon-Netzwerk in Gram-negativen Bakterien und *Ab* AB5075. Die Abbildung wurde übernommen aus Birkle et al. (2022).

(A) Die WT-Situation der OMP-Biogenese in *Ec*, *Pa* und *Ye*. Die Translokation naszierender OMPs erfolgt durch das secretory export (Sec) – Translokon in das Periplasma. Eine Eskortierung der OMPs durch das Periplasma findet durch SurA oder Skp/DegP statt, durch die Protease-Aktivität von DegP auch der Abbau aggregierter/missgefalteter Proteine. Nach der Passage durch das Periplasma werden die OMPs an den BAM-Komplex übergeben und in die OM inseriert. (B) Situation der OMP-Biogenese in AB5075 mit zusätzlichem, möglicherweise von SurA, Skp und DegP unabhängigem Alternativweg.

Hierfür sollte eine konditionelle *surA*-Mutante in einem  $\Delta skp\Delta degP$ -Hintergrund generiert werden, da in Vorversuchen die Herstellung von Quadrupelmutanten für interessante Kandidaten wie z.B. die periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerase PpiD oder DegS im  $\Delta surA\Delta skp\Delta degP$ -Hintergrund nicht erfolgreich war. Durch eine solche konditionelle Mutante sollte es möglich werden, die Rolle einzelner Faktoren im Kontext von Skp, DegP und SurA zu analysieren und globale Analysen mit Hilfe einer Transposon-Insertion-Library durchzuführen. Alle Versuche der Insertion einer induzierbaren SurA-Kassette in das Genom von *Ab* AB5075 zeigten sich allerdings trotz zahlreicher Anläufe und dem Einsatz verschiedener Mutagenese-Techniken erfolglos. Es konnten dabei jedoch weitere wichtige Erkenntnisse über das generierte pJM220-Mutatorplasmid und die Mutagenese von *Ab* AB5075 gewonnen werden. So wurde (in *E. coli*) die Induktormenge titriert, um eine physiologische SurA-Expression vom induzierbaren Promoter zu erreichen (0,001 % Arabinose). Zusätzlich wurde eine neue Transformationsmethode (Elektroporation, siehe 3.3.2.3) etabliert und dadurch die Transformationseffizienz von *Ab* AB5075 erheblich verbessert. Die Rolle mehrerer Kandidaten, die als alternative Komponenten zu den bekannten Chaperonen SurA, Skp und DegP in dem OMP-Biogeneseweg von *Ab* funktionieren könnten, konnte allerdings nicht verifiziert werden.

Dennoch wurden wichtige Voraussetzungen für eine Generierung konditionaler  $\Delta surA$ -Mutanten in *Ab* AB5075 geschaffen. Mittlerweile durch andere AG-Mitglieder durchgeführte Versuche, die gewünschte Mutante zu generieren, waren bislang ebenfalls nicht erfolgreich. Während die Deletion einzelner Gene und auch die Herstellung von Mehrfachmutanten in AB5075 mehrheitlich völlig problemlos durchführbar war, sind wir bislang daran gescheitert, ein induzierbares Expressionssystem zu identifizieren, dass in AB5075 funktioniert. Da das System in *E. coli* und anderen, sogar nah verwandten, *Ab*-Stämmen jedoch funktioniert, liegt die Vermutung nahe, dass der Stamm AB5075 besondere Features aufweist, die eine erfolgreiche Manipulation verhindern. Künftige Projekte werden daher voraussichtlich nicht mehr auf dem schwer zu manipulierenden und experimentell anspruchsvollen AB5075 basieren, sondern auf andere Stämme ausweichen.

### 5.3 Ausblick

Die Permeabilität und die Zusammensetzung der OM von Bakterien können als Hauptverantwortliche für das Entstehen und den Erhalt von Virulenz und Resistenz gesehen werden. Daher rücken Faktoren, die genau hierauf Einfluss nehmen, zunehmend in besonderen Fokus der mikrobiologischen und pharmazeutischen Forschung. Dazu zählen die auch in dieser Arbeit untersuchten periplasmatischen Chaperone und die vielversprechende Forschung an einem potenziellen Inhibitor des Chaperons SurA.

Darüber hinaus findet sich ein breites Spektrum an Akteuren in diversen weiteren Assemblierungs- und Transportmaschinerien der OM-Komponenten. Diese ermöglichen die vielfältige und variable Bestückung der OM mit Lipoproteinen, LPS, Phospholipiden und OMPs und bieten ebenso vielfältige Ansatzmöglichkeiten, um mit der Entwicklung von jeweiligen Inhibitoren effektive Therapeutika zu kreieren und dabei eine gänzlich neue Klasse an antimikrobiellen Agenzien zu generieren (Choi & Lee, 2019). So wurden durch intensive Erforschung des für die Lipoprotein-Insertion verantwortlichen Lol-Pathways bereits zwei Substanzen, CCT-00431 und CCT-00432, identifiziert, die die Bildung des essentiellen LolA-L10P-Komplexes zu 30 bis 60 % unterbinden (Ito et al., 2007). Auch zur Inhibition des LPS-Biogeneseweges wurden bereits mehrere  $\beta$ -Hairpin-Peptidomimetika entwickelt, die v.a. aus der Optimierung des antimikrobiellen Peptids Protegrin I entstanden sind (Kokryakov et al., 1993). Für das Peptidomimetikum Murepavadin, einen Inhibitor des für die LPS-Assemblierung essentiellen  $\beta$ -Barrel OMPs LptD, konnte bereits eine klinische Phase-II-Studie (NCT-Nummer: NCT02096328) erfolgreich abgeschlossen werden, wobei sich die Substanz vor allem bei Pneumonien durch *Pseudomonas spp.* wirksam zeigte (Zerbe et al., 2017). Peptidomimetika spielen auch hinsichtlich der Inhibition des für die OMP-Biogenese und -Insertion essentiellen BAM-Komplexes eine bedeutende Rolle. So inhibiert beispielsweise das Murepavadin-Analogon JB-95 sowohl LptD als auch BamA und die ebenfalls aus Extrakten von *Photorhabdus* und *Xenorhabdus spp.* natürlich gewonnene Substanz Darobactin durch die Bindung an den  $\beta$ -Strang des lateralen BamA-Gates den Eintritt naszierender OMPs an dieser Stelle (Imai et al., 2019; Kaur et

al., 2021). Einen umfassenden Überblick über weitere BAM-Inhibitoren und Forschungsansätze bietet die Übersichtsarbeit von Steenhuis et al. (2021).

Um das antimikrobielle Wirkungsspektrum dieser Substanzen auszuweiten, können diese auch mit einer weiteren potenten Substanz fusioniert werden. Ein wirksames Beispiel hierfür ist die Fusion des bereits erwähnten Murepavadins mit Fragmenten von Polymyxin B, einem klinisch eingesetzten Antibiotikum. Das resultierende chimäre Molekül zeigt *in vitro* Wirksamkeit gegen zahlreiche klinisch relevante Gram-negative Erreger und bewährte sich auch in einem Mausmodell gegen Peritonitis und Septikämie (Luther et al., 2019).

Interferenz mit all diesen Assemblierungsmaschinerien zeigt sich demnach als höchst interessanter Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien und wird auf vielfältige Weise erforscht. Noch gibt es kein einziges, klinisch eingesetztes Antibiotikum, das eine der OM-Assemblierungsmaschinerien zum Target hat, doch zeigen sich aus dem Pool von natürlichen und synthetischen Mimetika, Bakteriocinen, Peptiden, Antikörpern usw. einige vielversprechende Kandidaten, die allein oder als Verstärker in Kombinationstherapien synergistisch die OM als Achillessehne Gram-negativer Erreger angreifen können. So können Therapien von *Ab*-Infektionen auch bei schweren MDR- bis XDR-Fällen, wie beispielsweise dem des klinischen Vergleichsisolates *Ab* 379-NF-31708 in diesem Projekt (siehe 3.1.1), in hoffentlich naher Zukunft wieder zuverlässig und effektiv gewährleistet werden.

## 6 Zusammenfassung

*Acinetobacter baumannii* (*Ab*) ist ein Gram-negatives Bakterium, das aufgrund zahlreicher intrinsischer und erworbener Virulenzfaktoren von der WHO als Erreger höchster Priorität eingestuft wird. Der Erforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung von MDR-*Ab*-Infektionen kommt daher eine große Notwendigkeit zu. Einen interessanten Ansatzpunkt bietet hierfür die Außenmembran (OM) von *Ab*. Ihre Biogenese und Zusammensetzung unterliegt einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Akteure, wobei periplasmatischen Chaperonen eine besondere Bedeutung zukommt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Zusammenhänge zwischen der Bedeutung und Funktionsweise von periplasmatischen Chaperonen und Antibiotikaresistenz von *Ab* zu untersuchen. Dafür wurde zunächst die vorausgegangene Beobachtung einer Resensitivierung von *Ab* für das Aminoglykosid-Antibiotikum Tobramycin durch die Deletion des periplasmatischen Chaperons reproduziert. Als sich dies bestätigte, wurde in weiteren MIC-Assays ein Vergleich der Auswirkung einer Deletion von *surA* auf die Suszeptibilität von *Ab* gegenüber strukturell nahen Tobramycin verwandten Aminoglykosid-Antibiotika angestrebt. Dazu zählten Gentamicin, Kanamycin und Dibekacin. Die Beobachtung einer Rolle von SurA für die Tobramycin-Resistenz ließ sich dabei auf ein etwas breiteres Spektrum von Aminoglykosiden ausweiten. Neben einem leichten Effekt für Kanamycin, war die  $\Delta$ *surA*-Mutante überraschend sensibel für Gentamicin und insbesondere Dibekacin. In einem weiteren Schritt wurde dann nach Ursachen einer solchen SurA-vermittelten Tobramycin-, bzw. Aminoglykosid-Resistenz geforscht. In den Fokus traten dabei vergleichende Untersuchungen der Zelloberflächenladung, der OM-Permeabilität und Efflux-Pumpen-Aktivität. All diese Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit der verabreichten Antibiotika zeigten sich allerdings unter *surA*-Deletion als nicht signifikant verändert und somit nicht ursächlich für die beobachteten Suszeptibilitätsunterschiede. In einer sich diesen Testungen anschließenden komparativen Transkriptomanalyse zwischen WT und  $\Delta$ *surA*-Zellen von *Ab* AB5075 durch RNA-Sequenzierung, wurde beobachtet, dass die globale Stressreaktion von *Ab* AB5075 als Reaktion auf eine Deletion von *surA* nur sehr

wenige Gene betrifft. Auch die zelluläre Antwort der  $\Delta surA$ -Mutante auf die Stimulation mit Tobramycin unterscheidet sich nicht grundlegend von der des WT. Stattdessen bewirkte eine Stimulation mit Tobramycin sowohl in WT-Zellen als auch in der  $\Delta surA$ -Mutante simultane Veränderungen der Expression mehrerer Gene. Darunter waren besonders auffällig die beiden an der Pilus- und Fimbrien-Genese beteiligten Gene ABUW\_2312 und ABUW\_2313. Erwies sich die in diesem Projekt ebenfalls angestrebte Generierung einer konditionellen  $\Delta surA$ -Mutante in einem  $\Delta skp\Delta degP$ -Hintergrund zwar als nicht erfolgreich, konnten im Rahmen der RNA-Sequenz-Analysen dennoch weitere interessante Gene identifiziert werden, die für die Tobramycin-Resistenz von *Ab* eine wichtige Rolle spielen könnten. Diese erklären zwar nicht *Ab*s erstaunliche Viabilität selbst bei Knockout aller drei bekannten Chaperone, stellen jedoch vielversprechende Ansatzpunkte für weiterführende Projekte dar.

## 7 Anhang

Die Rohdaten der Messungen zur MHK-Ermittlung und der Messungen zur Zelloberflächenladung durch einen Zytochrom C-Assay sind in interaktiver Form unter [https://github.com/jenmuell/Doktorarbeit\\_Laura\\_Luib](https://github.com/jenmuell/Doktorarbeit_Laura_Luib) einzusehen.

## Literaturverzeichnis

- Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infect Drug Resist*, 13, 423-434. <https://doi.org/10.2147/IDR.S228089>
- Ahmad, I., Karah, N., Nadeem, A., Wai, S. N., & Uhlin, B. E. (2019). Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *PLoS One*, 14(1), e0210082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210082>
- Akama-Garren, E. H., Joshi, N. S., Tammela, T., Chang, G. P., Wagner, B. L., Lee, D. Y., Rideout, W. M., 3rd, Papagiannakopoulos, T., Xue, W., & Jacks, T. (2016). A Modular Assembly Platform for Rapid Generation of DNA Constructs. *Sci Rep*, 6, 16836. <https://doi.org/10.1038/srep16836>
- Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*, 73(8), 2003-2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(7), 1818-1824. <https://doi.org/10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000>
- Anderson, S. E., & Rather, P. N. (2019). Distinguishing Colony Opacity Variants and Measuring Opacity Variation in *Acinetobacter baumannii*. In I. Biswas & P. N. Rather (Eds.), *Acinetobacter baumannii: Methods and Protocols* (pp. 151-157). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_14)
- Anderson, S. E., Sherman, E. X., Weiss, D. S., & Rather, P. N. (2018). Aminoglycoside Heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *mSphere*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00271-18>
- Antunes, L. C., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*, 71(3), 292-301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Aonuma, S., Arijji, F., Oizumi, K., & Konno, K. (1987). Electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* treated with sulbenicillin and dibekacin. *Tohoku J Exp Med*, 152(2), 119-128. <https://doi.org/10.1620/tjem.152.119>
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X., & Gross, C. A. (2001). The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J*, 20(1-2), 285-294. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.285>
- Bennion, D., Charlson, E. S., Coon, E., & Misra, R. (2010). Dissection of  $\beta$ -barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 77(5), 1153-1171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07280.x>
- Benveniste, R., & Davies, J. (1973). Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 42, 471-506. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.42.070173.002351>
- Bergogne-Berezin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin*

- Bessaiah, H., Anamalé, C., Sung, J., & Dozois, C. M. (2021). What Flips the Switch? Signals and Stress Regulating Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Type 1 Fimbriae (Pili). *Microorganisms*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010005>
- Birkle, K., Renschler, F., Angelov, A., Wilharm, G., Franz-Wachtel, M., Maček, B., Bohn, E., Weber, E., Müller, J., Friedrich, L., & Schütz, M. (2022). An Unprecedented Tolerance to Deletion of the Periplasmic Chaperones SurA, Skp, and DegP in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, e0005422. <https://doi.org/10.1128/jb.00054-22>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 48(1), 1-12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Bouvet, P. J., & Grimont, P. A. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(2), 228-240.
- Chahales, P., & Thanassi, D. G. (2015). Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0018-2013>
- Chamachi, N., Hartmann, A., Ma, M. Q., Svirina, A., Krainer, G., & Schlierf, M. (2022). Chaperones Skp and SurA dynamically expand unfolded OmpX and synergistically disassemble oligomeric aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.2118919119>
- Chang, K. C., Kuo, H. Y., Tang, C. Y., Chang, C. W., Lu, C. W., Liu, C. C., Lin, H. R., Chen, K. H., & Liou, M. L. (2014). Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genomics*, 15(1), 815. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-815>
- Chau, S. L., Chu, Y. W., & Houang, E. T. (2004). Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10), 4054-4055. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.4054-4055.2004>
- Chin, C. Y., Tipton, K. A., Farokhyfar, M., Burd, E. M., Weiss, D. S., & Rather, P. N. (2018). A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii*. *Nat Microbiol*, 3(5), 563-569. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0151-5>
- Cho, G. S., Li, B., Rostalsky, A., Fiedler, G., Rösch, N., Igbinsosa, E., Kabisch, J., Bockelmann, W., Hammer, P., Huys, G., & Franz, C. (2018). Diversity and Antibiotic Susceptibility of *Acinetobacter* Strains From Milk Powder Produced in Germany. *Front Microbiol*, 9, 536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00536>
- Choi, K. H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2005). A Tn7-based broad-range

- bacterial cloning and expression system. *Nat Methods*, 2(6), 443-448. <https://doi.org/10.1038/nmeth765>
- Choi, K. H., Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods*, 64(3), 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.001>
- Choi, K. H., Mima, T., Casart, Y., Rholl, D., Kumar, A., Beacham, I. R., & Schweizer, H. P. (2008). Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol*, 74(4), 1064-1075. <https://doi.org/10.1128/aem.02430-07>
- Choi, U., & Lee, C. R. (2019). Antimicrobial Agents That Inhibit the Outer Membrane Assembly Machines of Gram-Negative Bacteria. *J Microbiol Biotechnol*, 29(1), 1-10. <https://doi.org/10.4014/jmb.1804.03051>
- Combs, A. N., & Silhavy, T. J. (2022). The sacrificial adaptor protein Skp functions to remove stalled substrates from the  $\beta$ -barrel assembly machine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.2114997119>
- Corona, F., & Martinez, J. L. (2013). Phenotypic Resistance to Antibiotics. *Antibiotics (Basel)*, 2(2), 237-255. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020237>
- Coyne, S., Courvalin, P., & P erichon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3), 947-953. <https://doi.org/10.1128/aac.01388-10>
- Da Silva, G. J., & Domingues, S. (2016). Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030029>
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambert, T., & Courvalin, P. (2008). AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(2), 557-562. <https://doi.org/10.1128/AAC.00732-07>
- Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev*, 51(3), 341-350. <https://doi.org/10.1128/mr.51.3.341-350.1987>
- de Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G., Wolterbeek, R., van den Broek, P., & Nibbering, P. (2010). Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One*, 5(5), e10732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010732>
- de Breij, A., Eveillard, M., Dijkshoorn, L., van den Broek, P. J., Nibbering, P. H., & Joly-Guillou, M. L. (2012). Differences in *Acinetobacter baumannii* strains and host innate immune response determine morbidity and mortality in experimental pneumonia. *PLoS One*, 7(2), e30673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030673>
- de Breij, A., Gaddy, J., van der Meer, J., Koning, R., Koster, A., van den Broek, P., Actis, L., Nibbering, P., & Dijkshoorn, L. (2009). CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their

- inflammatory response. *Res Microbiol*, 160(3), 213-218.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.01.002>
- de Cock, H., van Blokland, S., & Tommassen, J. (1996). In vitro insertion and assembly of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12 into the outer membrane. Role of Triton X-100. *J Biol Chem*, 271(22), 12885-12890. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12885>
- Deforges, L., Van Thoi, J., Le Soussy, C. J., & Duval, J. (1982). [In vitro antibacterial activity of dibekacin on staphylococci, streptococci and aerobic Gram negative bacilli]. *Nouv Presse Med*, 11(46), 3385-3390. (Activité antibactérienne in vitro de la dibékacine sur les staphylocoques, streptocoques et bacilles à Gram négatif aérobies.)
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 808-816.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Dexter, C., Murray, G. L., Paulsen, I. T., & Peleg, A. Y. (2015). Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13(5), 567-573.  
<https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1025055>
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, 5(12), 939-951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- Doyle, M. T., & Bernstein, H. D. (2019). Bacterial outer membrane proteins assemble via asymmetric interactions with the BamA beta-barrel. *Nat Commun*, 10(1), 3358. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11230-9>
- Duguay, A. R., & Silhavy, T. J. (2004). Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 121-134.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.012>
- Eijkelkamp, B. A., Stroehler, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., & Brown, M. H. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 323(1), 44-51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x>
- Eppens, E. F., Nouwen, N., & Tommassen, J. (1997). Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *Embo j*, 16(14), 4295-4301. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4295>
- Espinal, P., Marti, S., & Vila, J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect*, 80(1), 56-60.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013>
- Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhoriès, H., & Joly-Guillou, M. L. (2013). Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis*, 17(10), e802-805.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.021>
- Falagas, M. E., & Rafailidis, P. I. (2007). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care*, 11(3), 134.  
<https://doi.org/10.1186/cc5911>
- Fernando, D. M., & Kumar, A. (2013). Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. *Antibiotics (Basel)*, 2(1), 163-181. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2010163>

- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fournier, P. E., Richet, H., & Weinstein, R. A. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical infectious diseases*, 42(5), 692-699.
- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., & Claverie, J. M. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*, 2(1), e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>
- Freundlieb, S., & Boos, W. (1986). Alpha-amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, malS, and identification of its product as a periplasmic protein. *J Biol Chem*, 261(6), 2946-2953.
- Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *Embo j*, 27(17), 2271-2280. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.155>
- Gallagher, L. A., Lee, S. A., & Manoil, C. (2017). Importance of Core Genome Functions for an Extreme Antibiotic Resistance Trait. *mBio*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01655-17>
- Gallagher, L. A., Ramage, E., Weiss, E. J., Radey, M., Hayden, H. S., Held, K. G., Huse, H. K., Zurawski, D. V., Brittnacher, M. J., & Manoil, C. (2015). Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, 197(12), 2027-2035. <https://doi.org/10.1128/JB.00131-15>
- Gerner-Smidt, P. (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol*, 30(10), 2680-2685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383266>
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., & Ursing, J. (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*, 29(2), 277-282. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.277-282.1991>
- Giannouli, M., Antunes, L. C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., & Zarrilli, R. (2013). Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis*, 13, 282. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-282>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 6(5), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gilbert, P., Allison, D. G., & McBain, A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol*, 92 Suppl, 98s-110s.
- Goemans, C., Denoncin, K., & Collet, J. F. (2014). Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1517-1528. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.014>
- He, X., Lu, F., Yuan, F., Jiang, D., Zhao, P., Zhu, J., Cheng, H., Cao, J., & Lu, G. (2015). Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump.

- Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4817-4825.  
<https://doi.org/10.1128/aac.00877-15>
- Hill, C. D., Counts, G. W., & Turck, M. (1981). In vitro comparison of dibekacin and gentamicin activities. *Antimicrob Agents Chemother*, 19(1), 190-192.  
<https://doi.org/10.1128/aac.19.1.190>
- Hou, P. F., Chen, X. Y., Yan, G. F., Wang, Y. P., & Ying, C. M. (2012). Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*, 58(2), 152-158. <https://doi.org/10.1159/000335599>
- Imai, Y., Meyer, K. J., Inishi, A., Favre-Godal, Q., Green, R., Manuse, S., Caboni, M., Mori, M., Niles, S., Ghiglieri, M., Honrao, C., Ma, X., Guo, J. J., Makriyannis, A., Linares-Otoya, L., Bohringer, N., Wuisan, Z. G., Kaur, H., Wu, R., Mateus, A., Typas, A., Savitski, M. M., Espinoza, J. L., O'Rourke, A., Nelson, K. E., Hiller, S., Noinaj, N., Schaberle, T. F., D'Onofrio, A., & Lewis, K. (2019). A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 576(7787), 459-464. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1>
- Imperi, F., Antunes, L. C., Blom, J., Villa, L., Iacono, M., Visca, P., & Carattoli, A. (2011). The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life*, 63(12), 1068-1074. <https://doi.org/10.1002/iub.531>
- Inchai, J., Pothirat, C., Bumroongkit, C., Limsukon, A., Khositsakulchai, W., & Liwsrisakun, C. (2015). Prognostic factors associated with mortality of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Intensive Care*, 3, 9. <https://doi.org/10.1186/s40560-015-0077-4>
- Ito, H., Ura, A., Oyamada, Y., Yoshida, H., Yamagishi, J., Narita, S., Matsuyama, S., & Tokuda, H. (2007). A new screening method to identify inhibitors of the Lol (localization of lipoproteins) system, a novel antibacterial target. *Microbiol Immunol*, 51(3), 263-270. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03906.x>
- Jacobs, A. C., Thompson, M. G., Black, C. C., Kessler, J. L., Clark, L. P., McQueary, C. N., Gancz, H. Y., Corey, B. W., Moon, J. K., Si, Y., Owen, M. T., Hallock, J. D., Kwak, Y. I., Summers, A., Li, C. Z., Rasko, D. A., Penwell, W. F., Honnold, C. L., Wise, M. C., Waterman, P. E., Lesho, E. P., Stewart, R. L., Actis, L. A., Palys, T. J., Craft, D. W., & Zurawski, D. V. (2014). AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *mBio*, 5(3), e01076-01014.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.01076-14>
- Jacobs, A. C., Thompson, M. G., Gebhardt, M., Corey, B. W., Yildirim, S., Shuman, H. A., & Zurawski, D. V. (2014). Genetic Manipulation of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Protoc Microbiol*, 35, 6G 2 1-11.  
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06g02s35>
- Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A. M., Heritage, J., & Hawkey, P. M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol*, 36(7), 1938-1941.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650940>

- Joly-Guillou, M. L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*, 11(11), 868-873. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x>
- Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., Silhavy, T. J., & Hultgren, S. J. (1997). The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo j*, 16(21), 6394-6406. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6394>
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Harper, J. R., Duguay, A. R., Pinkner, J. S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T. J., & Hultgren, S. J. (2005). Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 187(22), 7680-7686. <https://doi.org/10.1128/jb.187.22.7680-7686.2005>
- Justice, S. S., Lauer, S. R., Hultgren, S. J., & Hunstad, D. A. (2006). Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. *Infect Immun*, 74(8), 4793-4800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00355-06>
- Kaur, H., Jakob, R. P., Marzinek, J. K., Green, R., Imai, Y., Bolla, J. R., Agustoni, E., Robinson, C. V., Bond, P. J., Lewis, K., Maier, T., & Hiller, S. (2021). The antibiotic darobactin mimics a  $\beta$ -strand to inhibit outer membrane insertase. *Nature*, 593(7857), 125-129. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03455-w>
- Klein, K., Sonnabend, M. S., Frank, L., Leibiger, K., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Trunk, T., Leo, J. C., Autenrieth, I. B., Schütz, M., & Bohn, E. (2019). Deprivation of the Periplasmic Chaperone SurA Reduces Virulence and Restores Antibiotic Susceptibility of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 10, 100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00100>
- Klemm, P., Jørgensen, B. J., van Die, I., de Ree, H., & Bergmans, H. (1985). The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. *Mol Gen Genet*, 199(3), 410-414. <https://doi.org/10.1007/bf00330751>
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., & Henderson, I. R. (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol*, 7(3), 206-214. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2069>
- Kokryakov, V. N., Harwig, S. S., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V., Korneva, H. A., & Lehrer, R. I. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett*, 327(2), 231-236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80175-t](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80175-t)
- Kudva, R., Denks, K., Kuhn, P., Vogt, A., Müller, M., & Koch, H. G. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res Microbiol*, 164(6), 505-534. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.016>
- Kumar, A., Dalton, C., Cortez-Cordova, J., & Schweizer, H. P. (2010). Mini-Tn7 vectors as genetic tools for single copy gene cloning in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Methods*, 82(3), 296-300. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.002>

- Lazar, S. W., & Kolter, R. (1996). SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol*, 178(6), 1770-1773. <https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1770-1773.1996>
- Li, Y. H., & Tian, X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*, 12(3), 2519-2538. <https://doi.org/10.3390/s120302519>
- Lipszyc, A., Szuplewska, M., & Bartosik, D. (2022). How Do Transposable Elements Activate Expression of Transcriptionally Silent Antibiotic Resistance Genes? *Int J Mol Sci*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158063>
- Lob, S. H., Hoban, D. J., Sahm, D. F., & Badal, R. E. (2016). Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, 47(4), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.015>
- Luther, A., Urfer, M., Zahn, M., Müller, M., Wang, S. Y., Mondal, M., Vitale, A., Hartmann, J. B., Sharpe, T., Monte, F. L., Kocherla, H., Cline, E., Pessi, G., Rath, P., Modaresi, S. M., Chiquet, P., Stiegeler, S., Verbree, C., Remus, T., Schmitt, M., Kolopp, C., Westwood, M. A., Desjonquères, N., Brabet, E., Hell, S., LePoupon, K., Vermeulen, A., Jaisson, R., Rithié, V., Upert, G., Lederer, A., Zbinden, P., Wach, A., Moehle, K., Zerbe, K., Locher, H. H., Bernardini, F., Dale, G. E., Eberl, L., Wollscheid, B., Hiller, S., Robinson, J. A., & Obrecht, D. (2019). Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. *Nature*, 576(7787), 452-458. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1665-6>
- Magnet, S., & Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*, 105(2), 477-498. <https://doi.org/10.1021/cr0301088>
- Mahillon, J., & Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), 725-774. <https://doi.org/10.1128/mnbr.62.3.725-774.1998>
- Malinverni, J. C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J. G., Kahne, D., Misra, R., & Silhavy, T. J. (2006). YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 61(1), 151-164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05211.x>
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., & Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(9), 3298-3304. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004>
- McConnell, M. J., Actis, L., & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*, 37(2), 130-155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>
- McQueary, C. N., & Actis, L. A. (2011). *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol*, 49(2), 243-250. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0343-7>
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev*, 15(6), 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>

- Moriel, D. G., Beatson, S. A., Wurpel, D. J., Lipman, J., Nimmo, G. R., Paterson, D. L., & Schembri, M. A. (2013). Identification of novel vaccine candidates against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*, 8(10), e77631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077631>
- Mortensen, B. L., Rathi, S., Chazin, W. J., & Skaar, E. P. (2014). *Acinetobacter baumannii* response to host-mediated zinc limitation requires the transcriptional regulator Zur. *J Bacteriol*, 196(14), 2616-2626. <https://doi.org/10.1128/JB.01650-14>
- Nakamura, A., Hosoda, M., Kato, T., Yamada, Y., Itoh, M., Kanazawa, K., & Nouda, H. (2000). Combined effects of meropenem and aminoglycosides on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *J Antimicrob Chemother*, 46(6), 901-904. <https://doi.org/10.1093/jac/46.6.901>
- Nemec, A., Dijkshoorn, L., & van der Reijden, T. J. K. (2004). Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol*, 53(Pt 2), 147-153. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05445-0>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 30(2), 295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28(3), 449-461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Oizumi, K., Arijii, F., Kumano, N., Oka, S., & Konno, K. (1974). Action mechanism of 3',4'-dideoxykanamycin B (DKB) on *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep Res Inst Tohoku Univ Med*, 21(3-4), 47-53.
- Pagano, M., Martins, A. F., & Barth, A. L. (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz J Microbiol*, 47(4), 785-792. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>
- Pakharukova, N., Garnett, J. A., Tuittila, M., Paavilainen, S., Diallo, M., Xu, Y., Matthews, S. J., & Zavialov, A. V. (2015). Structural Insight into Archaic and Alternative Chaperone-Usher Pathways Reveals a Novel Mechanism of Pilus Biogenesis. *PLoS Pathog*, 11(11), e1005269. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005269>
- Pakharukova, N., Tuittila, M., Paavilainen, S., Malmi, H., Parilova, O., Teneberg, S., Knight, S. D., & Zavialov, A. V. (2018). Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(21), 5558-5563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800961115>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-17>
- Paulsen, I. T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol*, 6(5), 446-451. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.08.005>
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(3), 538-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>

- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., & Gotz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 274(13), 8405-8410. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8405>
- Peters, J. E., & Craig, N. L. (2001). Tn7: smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11), 806-814. <https://doi.org/10.1038/35099006>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13(6), 151-171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Recht, J., Martínez, A., Torello, S., & Kolter, R. (2000). Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 182(15), 4348-4351. <https://doi.org/10.1128/jb.182.15.4348-4351.2000>
- Rhodijs, V. A., Suh, W. C., Nonaka, G., West, J., & Gross, C. A. (2006). Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol*, 4(1), e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040002>
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*, 197(8), 1079-1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Richmond, G. E., Evans, L. P., Anderson, M. J., Wand, M. E., Bonney, L. C., Ivens, A., Chua, K. L., Webber, M. A., Sutton, J. M., Peterson, M. L., & Piddock, L. J. (2016). The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. *mBio*, 7(2), e00430-00416. <https://doi.org/10.1128/mBio.00430-16>
- Rose, A. (2010). Tn AbaR1: a novel Tn 7-related transposon in *Acinetobacter baumannii* that contributes to the accumulation and dissemination of large repertoires of resistance genes. *Bioscience Horizons*, 3(1), 40-48. <https://doi.org/10.1754-7431>
- Rouviere, P. E., & Gross, C. A. (1996). SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev*, 10(24), 3170-3182. <https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3170>
- Rumbo-Feal, S., Gómez, M. J., Gayoso, C., Álvarez-Fraga, L., Cabral, M. P., Aransay, A. M., Rodríguez-Ezpeleta, N., Fullaondo, A., Valle, J., Tomás, M., Bou, G., & Poza, M. (2013). Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One*, 8(8), e72968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072968>
- Ryan, M. T. (2004). Chaperones: inserting beta barrels into membranes. *Curr Biol*, 14(5), R207-209. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.024>
- Schassan, H. H., & Witt, U. (1979). [Dibekacin--a novel aminoglycoside antibiotic]. Antimicrobial activity and parallel resistance in vitro]. *Arzneimittelforschung*, 29(2), 174-178. (Dibekacin--ein neues Aminoglykosid-Antibiotikum. Antimikrobielle Aktivität und Parallelresistenzen in vitro.)
- Schiffrin, B., Machin, J. M., Karamanos, T. K., Zhuravleva, A., Brockwell, D. J., Radford, S. E., & Calabrese, A. N. (2022). Dynamic interplay between the

- periplasmic chaperone SurA and the BAM complex in outer membrane protein folding. *Commun Biol*, 5(1), 560. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03502-w>
- Schulz, G. E. (2000). beta-Barrel membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 10(4), 443-447. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00120-2](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00120-2)
- Scribano, D., Marzano, V., Levi Mortera, S., Sarshar, M., Vernocchi, P., Zagaglia, C., Putignani, L., Palamara, A. T., & Ambrosi, C. (2019). Insights into the Periplasmic Proteins of *Acinetobacter baumannii* AB5075 and the Impact of Imipenem Exposure: A Proteomic Approach. *Int J Mol Sci*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143451>
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol*, 6, 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Siguiet, P., Gourbeyre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 38(5), 865-891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Singh, R., Capalash, N., & Sharma, P. (2017). Immunoprotective potential of BamA, the outer membrane protein assembly factor, against MDR *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*, 7(1), 12411. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12789-3>
- Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2007). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 21(19), 2473-2484. <https://doi.org/10.1101/gad.1581007>
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.1510307>
- Spieß, C., Beil, A., & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), 339-347. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80743-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80743-6)
- Steenhuis, M., van Ulsen, P., Martin, N. I., & Luirink, J. (2021). A ban on BAM: an update on inhibitors of the  $\beta$ -barrel assembly machinery. *FEMS Microbiol Lett*, 368(11). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab059>
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M., & Nikaido, H. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *J Biol Chem*, 281(24), 16220-16229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600680200>
- Sugawara, E., & Nikaido, H. (2012). OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, 194(15), 4089-4096. <https://doi.org/10.1128/JB.00435-12>
- Tamm, L. K., Hong, H., & Liang, B. (2004). Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2), 250-263. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.011>
- Temgoua, F. T. D., & Wu, L. (2019). Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter Baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. *Journal of Biosciences and Medicines*, 07, 48-70.

- Tipton, K. A., Dimitrova, D., & Rather, P. N. (2015). Phase-Variable Control of Multiple Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *J Bacteriol*, 197(15), 2593-2599. <https://doi.org/10.1128/JB.00188-15>
- Tipton, K. A., & Rather, P. N. (2017). An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *J Bacteriol*, 199(3). <https://doi.org/10.1128/JB.00705-16>
- 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26541-0>
- Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*, 154(Pt 11), 3398-3409. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019471-0>
- Tormo, A., Almiron, M., & Kolter, R. (1990). surA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J Bacteriol*, 172(8), 4339-4347. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990>
- Umezawa, H., Iinuma, K., Konda, S., Hamada, M., & Maeda, K. (1975). Synthesis of 1-N-acyl derivatives of 3', 4'-dideoxy-6'-N-methyl-kanamycin B and their antibacterial activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(4), 340-343. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.340>
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J. M., Raoult, D., Médigue, C., Weissenbach, J., & Cruveiller, S. (2008). Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One*, 3(3), e1805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001805>
- van der Kolk, J. H., Endimiani, A., Graubner, C., Gerber, V., & Perreten, V. (2019). *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist*, 16, 59-71. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.011>
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., & Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol*, 43(6), 709-730. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2017.1303661>
- Vanhoof, R., Sonck, P., & Hannecart-Pokorni, E. (1995). The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*, 35(1), 167-171. <https://doi.org/10.1093/jac/35.1.167>
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T. J., & Collet, J. F. (2009). Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics*, 9(9), 2432-2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800794>

- Visca, P., Seifert, H., & Towner, K. J. (2011). *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBMB Life*, 63(12), 1048-1054. <https://doi.org/10.1002/iub.534>
- Volokhina, E. B., Grijpstra, J., Stork, M., Schilders, I., Tommassen, J., & Bos, M. P. (2011). Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, 193(7), 1612-1621. <https://doi.org/10.1128/JB.00532-10>
- Waddell, C. S., & Craig, N. L. (1989). Tn7 transposition: recognition of the attTn7 target sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(11), 3958-3962. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.3958>
- Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A., & Sauer, R. T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell*, 113(1), 61-71. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00203-4)
- Wareth, G., Neubauer, H., & Sprague, L. D. (2019). *Acinetobacter baumannii* - a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. *Vet Res Commun*, 43(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s11259-018-9742-0>
- Watts, K. M., & Hunstad, D. A. (2008). Components of SurA required for outer membrane biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 3(10), e3359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003359>
- Weber, E. (2021). *Die Rolle von ABUW\_0607 und ABUW\_1852 für Fitness, Antibiotikaresistenz und Membranintegrität des multiresistenten A. baumannii- Stammes AB5075*. Eberhard Karls Universität Tübingen].
- Weirich, J., Bräutigam, C., Mühlenkamp, M., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Meuskens, I., Skurnik, M., Leskinen, K., Bohn, E., Autenrieth, I., & Schütz, M. (2017). Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for anti-infective drugs. *Virulence*, 8(7), 1170-1188. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1278333>
- Wen, H., Wang, K., Liu, Y., Tay, M., Lauro, F. M., Huang, H., Wu, H., Liang, H., Ding, Y., Givskov, M., Chen, Y., & Yang, L. (2014). Population dynamics of an *Acinetobacter baumannii* clonal complex during colonization of patients. *J Clin Microbiol*, 52(9), 3200-3208. <https://doi.org/10.1128/jcm.00921-14>
- Werner, J., & Misra, R. (2005). YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 57(5), 1450-1459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04775.x>
- Whelton, A., Carter, G. G., Stout, R. L., Herbst, D. V., Bryant, H. H., & Walker, G. (1980). Dibekacin intrarenal distribution characteristics and renal cortical elution kinetics. Comparison with gentamicin and tobramycin. *J Clin Pharmacol*, 20(8-9), 518-525. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1980.tb02545.x>
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., & Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol*, 195(18), 4146-4153. <https://doi.org/10.1128/JB.00754-13>
- Willett, J. L., Ruhe, Z. C., Goulding, C. W., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2015). Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) and CdiB/CdiA Two-Partner

- Secretion Proteins. *J Mol Biol*, 427(23), 3754-3765. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.010>
- Wimley, W. C. (2003). The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol*, 13(4), 404-411. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(03\)00099-x](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(03)00099-x)
- Wright, M. S., Iovleva, A., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Adams, M. D. (2016). Genome dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment. *Genome Med*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0279-y>
- Wright, M. S., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Adams, M. D. (2017). Transcriptome Remodeling of *Acinetobacter baumannii* during Infection and Treatment. *mBio*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02193-16>
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- Wu, R., Stephenson, R., Gichaba, A., & Noinaj, N. (2020). The big BAM theory: An open and closed case? *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862(1), 183062. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183062>
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J., & Kahne, D. (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, 121(2), 235-245. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.015>
- Wu, X., Chavez, J. D., Schweppe, D. K., Zheng, C., Weisbrod, C. R., Eng, J. K., Murali, A., Lee, S. A., Ramage, E., Gallagher, L. A., Kulasekara, H. D., Edrozo, M. E., Kamischke, C. N., Brittnacher, M. J., Miller, S. I., Singh, P. K., Manoil, C., & Bruce, J. E. (2016). In vivo protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nat Commun*, 7, 13414. <https://doi.org/10.1038/ncomms13414>
- Yoon, E. J., Chabane, Y. N., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., & Grillot-Courvalin, C. (2015). Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00309-15>
- Zahn, M., Bhamidimarri, S. P., Basle, A., Winterhalter, M., & van den Berg, B. (2016). Structural Insights into Outer Membrane Permeability of *Acinetobacter baumannii*. *Structure*, 24(2), 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.009>
- Zerbe, K., Moehle, K., & Robinson, J. A. (2017). Protein Epitope Mimetics: From New Antibiotics to Supramolecular Synthetic Vaccines. *Acc Chem Res*, 50(6), 1323-1331. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00129>
- Zhu, J., Wang, C., Wu, J., Jiang, R., Mi, Z., & Huang, Z. (2009). A novel aminoglycoside-modifying enzyme gene aac(6')-Ib in a pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Hosp Infect*, 73(2), 184-185. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.05.012>

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, unter Betreuung von Frau PD Dr. rer. nat. Monika Schütz, von mir eigenständig durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung, die Dr. Monika Schütz größtenteils selbst übernahm, von mir eigenständig durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte zu weitesten Teilen eigenständig durch mich, eine bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten im Rahmen der in diesem Projekt durchgeführten Transkriptomanalyse wurde dankenswerterweise von Jennifer Müller (NCCT) vollzogen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Laura Luib

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Dr. Monika Schütz bedanken. Mit unermüdlicher Geduld und tatkräftigem Einsatz hast du nie nachgegeben, auch aus einer Medizinerin eine waschechte Forscherin zu machen. Für all deine Anregungen und weiterbringenden Kommentare bin ich Dir sehr dankbar, genauso für deine fachliche wie zwischenmenschliche Unterstützung in all dieser, phasenweise doch sehr bewegten Zeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch allen weiteren „Schützens“ und „Bohns“ unserer fusionierten AG und den „NCCTlern“: Dr. Erwin Bohn, Dr. Fabian Renschler, Sarah Akinci, Lea Friedrich, Andrea Schäfer, Tanja Späth, Stephanie Aidoo, Noémie Teyssandier, Noelle Wackler, Lara Breuer, Fabian Smollich, Valentin Egle, Ole Eggers, Elena Weber, Kristina Engesser und Jennifer Müller. Über die Bedeutung von gutem wissenschaftlichen Arbeiten und Schreiben hinaus, habt ihr mir tagtäglich gezeigt, was Teamwork sein kann, wie viel wichtiger eine prozessorientierte Haltung gegenüber ergebnisfokussiertem Streben ist und dass es immer empfehlenswert ist, neben einem Plan B mindestens einen Plan C in der Kitteltasche bereit zu halten, wenn man mit Bakterien zu kooperieren gedenkt.

Auch all meinen Freunden, Mitbewohnern und vor allem meinen Eltern und meinen Schwestern möchte ich von Herzen danken. Nur auf ein stabiles Fundament kann man hohe Türme bauen und mit eurer Liebe, eurem verständnisvollen Interesse und sowohl emotionaler als auch finanzieller Unterstützung habt ihr mir stets Inspiration und Kraft gegeben, Stein auf Stein zu setzen und dabei selbst mindestens genauso mitzuwachsen.