

Interaktionen von
Acinetobacter baumannii
mit Plasminogen und Komplement

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Arno D. Koenigs
aus Hanau

Frankfurt am Main, 2015

D 30

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin:

Prof. Dr. M. Piepenbring

1. Gutachter

Prof. Dr. V. Müller

2. Gutachter

Prof. Dr. P. Kraiczy

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... VIII

1 Einleitung 1

1.1 Überblick und Taxonomie der Gattung *Acinetobacter* ..1

1.2 Klinische Bedeutung von *Acinetobacter baumannii*4

1.2.1 Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii* 8

1.3 Das Komplementsystem11

1.3.1 Funktionen und Aktivierung der Komplementkaskade..... 11

1.3.2 Regulation des Komplementsystems 14

1.3.3 Evasion des Komplementsystems 16

1.4 Komplementresistenz von *A. baumannii*.....18

1.5 Plasminogen19

1.5.1 Das fibrinolytische System und Plasminogen 19

1.5.2 Plasminogen und Komplement..... 21

1.5.3 Plasminogen-bindende „Moonlighting“-Proteine 22

1.6 Fragestellung und Zielsetzung23

2 Material & Methoden..... 25

2.1 Bakterienstämme.....25

2.1.1 *Acinetobacter baumannii* 25

2.1.2 *Legionella pneumophila*..... 25

2.1.3 *Escherichia coli*..... 26

2.2 Humane Zellen und Kulturmedien.....26

2.3 Antikörper27

2.4	Proteine	28
2.5	Reagenzienpackungen	30
2.6	Größenstandards	31
2.7	Starteroligonukleotide & Basisvektoren	32
2.7.1	Starteroligonukleotide.....	32
2.7.2	Basisvektoren.....	33
2.7.3	Weitere Vektoren.....	34
2.8	Humanserum.....	34
2.9	Chemikalien, Geräte & Verbrauchsmaterialien.....	34
2.9.1	Chemikalien und andere Substanzen.....	34
2.9.2	Geräteliste.....	38
2.9.3	Software	41
2.9.4	Spezielle Materialien	41
2.9.5	Allgemeine Puffer und Lösungen	43
2.10	Kultivierung von Mikroorganismen und humanen Zellen	44
2.10.1	Kultivierung von <i>A. baumannii</i>	44
2.10.2	Zellzahlbestimmung von <i>A. baumannii</i>	44
2.10.3	Kultivierung von <i>L. pneumophila</i>	44
2.10.4	Kultivierung von <i>E. coli</i>	44
2.10.5	Antibiotika.....	45
2.10.6	Kultivierung von humanen Endothelzellen (HUVEC).....	45
2.10.7	Auftauen humaner Zellen aus Flüssigstickstoff	47
2.10.8	Ermittlung der Lebendzellzahl von humanen Zellen.....	47
2.11	Molekularbiologische Methoden	47
2.11.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	47

2.11.2	Reinigung von amplifizierten DNA-Fragmenten.....	49
2.11.3	Auftrennung von DNA in der Agarose-Gelelektrophorese	49
2.11.4	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	50
2.11.5	Aufreinigung von Restriktionsansätzen.....	50
2.11.6	Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.11.7	Isolierung von Plasmid-DNA.....	51
2.11.8	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>A. baumannii</i>	51
2.11.9	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	52
2.11.10	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	52
2.12 Transformation von Bakterienzellen		52
2.12.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
2.12.2	Herstellung elektrokompetenter Zellen von <i>A. baumannii</i>	52
2.12.3	Transformation elektrokompetenter <i>A. baumannii</i> -Zellen	53
2.13 Proteinbiochemische Methoden.....		54
2.13.1	Tris/Tricin SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
2.13.2	Transfer von aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot).....	56
2.13.3	Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	56
2.13.4	Produktion und Aufreinigung rekombinant hergestellter Proteine aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	58
2.13.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA	59
2.13.6	Extraktion von Membranproteinen aus <i>A. baumannii</i>	60
2.14 Immunologische Methoden		60
2.14.1	Westernblot- und Far-Westernblot-Analysen.....	60
2.14.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	61
2.14.3	Zell-basierter hämolytischer Assay.....	63
2.14.3.1	Alternativer Weg.....	63

2.14.3.2	Klassischer Weg.....	65
2.14.3.3	Terminaler Weg.....	65
2.14.4	Zellzahlbestimmung von Erythrozyten.....	66
2.15	Immunhistochemische Methoden	66
2.15.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen	66
2.15.1.1	Untersuchung der Bindung von Plasminogen an <i>A. baumannii</i>	66
2.15.1.2	Nachweis von Plasminogen-bindenden Proteinen auf der Zelloberfläche von <i>A. baumannii</i>	67
2.15.2	Immunfluoreszenz-Test mit <i>Acinetobacter</i> -Zellen	68
2.16	Spezielle Methoden	68
2.16.1	Bindung von Plasminogen an vitale <i>A. baumannii</i> -Zellen.....	68
2.16.2	Lokalisation des Bindungsepitops von monoklonalen anti-p41 Antikörpern	69
2.16.3	Plasminogen-Aktivierungs-Assay	70
2.16.4	Fibrinogen-Degradation-Assay.....	71
2.16.5	Degradation von Komplement C3b durch aktiviertes Plasminogen.....	72
2.16.6	Protease-Assay	72
2.16.7	Kofaktor-Assay	73
2.16.8	Serumresistenz-Test	74
2.16.9	Transmigrations-Assay.....	74
2.16.10	Immunfluoreszenzmikroskopie von adhärierenden HUVEC-Zellen.....	76
2.17	Statistische Analyse	77

3	Ergebnisse	78
3.1	Interaktionen von <i>A. baumannii</i> mit Plasminogen	78
3.1.1	Bindung von Plasminogen an vitale <i>A. baumannii</i> -Zellen	78
3.1.2	Bindung von Plasminogen an verschiedene <i>A. baumannii</i> -Stämme	79
3.2	Identifizierung von Plasminogen-bindenden Proteinen	80
3.2.1	Far-Westernblot-Analyse von <i>A. baumannii</i> -Zellextrakten und Membranpräparationen	80
3.2.2	Identifizierung von <i>A. baumannii</i> Plasminogen-bindenden Proteinen mittels Massenspektrometrie.....	82
3.3	Produktion Plasminogen-bindender Proteine in <i>E. coli</i>.....	84
3.3.1	Klonierung der kodierenden Sequenzen der Plasminogen- bindenden Proteine von <i>A. baumannii</i> in einen Expressionsvektor.....	84
3.4	Charakterisierung von <i>A. baumannii</i> Elongationsfaktor Tuf.....	85
3.4.1	Produktion und Aufreinigung von Tuf	85
3.4.2	Bindung von Plasminogen an Elongationsfaktor Tuf	86
3.4.3	Einfluss von Ionenstärke und Lysin-Resten auf die Plasminogen-Bindung an Tuf _{Ab}	88
3.4.4	Aktivierung von Tuf-gebundenem Plasminogen zu Plasmin...	90
3.4.5	Degradation von Fibrinogen durch an Tuf gebundenes Plasmin	91
3.4.6	Abbau von Komplement C3b durch an Tuf gebundenes Plasmin	93
3.4.7	Bindung von FH an Elongationsfaktor Tuf	94

- 3.4.8 Nachweis der Kofaktor-Aktivität von Tuf-gebundenem FH.....95
- 3.4.9 Nachweis von Tuf_{Ab} auf der Oberfläche von *A. baumannii*.....97

3.5 Charakterisierung des 41 kDa-Proteins (p41)

von *A. baumannii*.....98

- 3.5.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von
A. baumannii p4198
- 3.5.2 Interaktion von Plasminogen mit p41 von *A. baumannii*.....99
- 3.5.3 Beteiligung von Lysin-Resten und Einfluss der Ionenstärke
auf die p41-Plasminogen-Interaktion..... 101
- 3.5.4 Lokalisation der Plasminogen-Bindedomäne im
p41-Molekül 102
- 3.5.5 Identifizierung der an der p41 Interaktion beteiligten
Kringle-Domänen von Plasminogen 109
- 3.5.6 Fibrinolyse durch p41-gebundenes, aktiviertes Plasmin 110
- 3.5.7 Degradation der Komplementkomponente C3b durch
p41-gebundenes Plasmin..... 112
- 3.5.8 Inhibitorische Wirkung von p41 auf humanes Komplement... 114
- 3.5.9 Bindung von Komplementkomponenten an p41 116
- 3.5.10 Charakterisierung des Bindungsepitops monoklonaler
anti-p41 Antikörper und Nachweis von p41 in verschiedenen
A. baumannii-Stämmen 118
- 3.5.11 Lokalisation von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii*
ATCC 19606..... 121
- 3.5.12 Generierung einer p41-Deletionsmutante von *A. baumannii*
ATCC 19606 durch markerlose Inaktivierung..... 125
- 3.5.13 Charakterisierung der $\Delta p41$ -Mutante von *A. baumannii*
ATCC 19606..... 128
- 3.5.14 Wachstum der $\Delta p41$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp 129
- 3.5.15 Bindung von Plasminogen an *A. baumannii* $\Delta p41$ 130

3.5.16	Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bindung von Plasminogen an <i>A. baumannii</i> $\Delta p41$	131
3.5.17	Überleben von <i>A. baumannii</i> $\Delta p41$ in normalem Humanserum	133
3.5.18	Vergleichende Untersuchungen zur Transmigration von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 und Mutante $\Delta p41$ durch Endothel-Monolayer	134
4	Diskussion.....	137
4.1	Resistenz von <i>A. baumannii</i> gegenüber der angeborenen Immunabwehr	137
4.2	Plasminogen-bindende Proteine von <i>A. baumannii</i>... 139	
4.2.1	Der Translations-Elongationsfaktor Tuf	139
4.2.2	Das Plasminogen-bindende p41-Protein von <i>A. baumannii</i> ..	146
4.2.2.1	Interaktion von p41 mit Plasminogen	146
4.2.2.2	Interaktionen von p41 mit Komplementkomponenten	151
4.2.3	Vorkommen von p41 bei klinischen <i>A. baumannii</i> -Isolaten...	154
4.2.4	Membranständigkeit von p41 in <i>A. baumannii</i>	154
4.2.5	Inaktivierung des p41-kodierenden Gens in <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	159
4.3	Physiologische Rolle der Plasminogen-Bindung.....	163
5	Zusammenfassung	166
6	Anhang	168
7	Literaturverzeichnis.....	174
	Danksagung.....	202
	Lebenslauf	204

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	MMP	Matrix-Metalloproteasen
APS	Ammoniumpersulfat	MOI	„multiplicity of infection“
ATCC	„American type culture collection“	NHS	Normales Humanserum
BSA	Bovines Serumalbumin	<i>o</i> -PD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin
C1-C9	Komplementkomponenten C1 bis C9	PAP	Präaktivierungspeptid
C1-INH	C1-Esterase Inhibitor	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
C4BP	„C4b-binding protein“	PFA	Paraformaldehyd
CRASP	„complement regulator-acquiring surface protein“	Plg	Plasminogen
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	RT	Raumtemperatur
EGTA	Ethylenglycol-tetraessigsäure	SCR	„short consensus repeat“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“	Tab.	Tabelle
Fc	„fragment, crystallizable“	TAE	Tris-Acetat-EDTA
FB	Faktor B	TE	Tris-EDTA
FD	Faktor D	TCC	„terminal complement complex“ (Terminaler Komplementkomplex)
Fg	Fibrinogen	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
FH	Faktor H	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
FHL-1	„factor H like protein-1“	t-PA	„tissue-type plasminogen activator“
FHR-1	„factor H related protein-1“	TRITC	Tetramethylrhodamine
FI	Faktor I	Tween	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat
GVB ⁺⁺	Gelatine-Veronal Puffer mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	u-PA	„urokinase-type plasminogen activator“
His ₆	Hexahistidin	Vn	Vitronektin
iC3b	inaktiviertes Fragment der Komplementkomponente C3b	v/v	Volumen pro Volumen
Ig	Immunglobulin	w/v	Gewicht pro Volumen
MAC	„membrane attack complex“ (Membranangriffskomplex)	YT	„yeast tryptone“ (Hefe-Extrakt-Trypton)

1 Einleitung

1.1 Überblick und Taxonomie der Gattung *Acinetobacter*

Die Geschichte der Gattung *Acinetobacter* (von griech. *akinetos* = unbeweglich) reicht zurück bis in das frühe 20. Jahrhundert, mit der Beschreibung eines Organismus namens *Micrococcus calcoaceticus* durch den niederländischen Mikrobiologen Martinus Willem Beijerinck. Dieses Bakterium war aus dem Boden isoliert und in einem Calciumacetat-haltigen Minimalmedium angereichert worden [1]. Über die nächsten Jahrzehnte wurden ähnliche Mikroorganismen beschrieben und in über 15 verschiedene Gattungen eingeordnet. Die Gattung *Acinetobacter* selbst wurde erstmals 1954 von Brisou und Prevot beschrieben [2], fand allerdings erst später Akzeptanz, mit der Publikation einer weitreichenden Studie durch Baumann et al. [3].

Die Gattung *Acinetobacter* gehört zur Familie der *Moraxellaceae* in der Ordnung der γ -Proteobakterien, welche neben *Acinetobacter* die Gattungen *Moraxella* und *Psychrobacter* umfasst. In ihrer gegenwärtigen Definition umfasst die Gattung *Acinetobacter* Gram-negative, nicht flagellierte, obligat aerobe, nicht fermentative, Oxidase-positive, Katalase-negative Bakterien, mit einem G+C-Gehalt der DNA zwischen 39% und 47% [4, 5]. *Acinetobacter*-Zellen sind durchschnittlich 1,5 μm lange Stäbchen (Abb. 1 A), wobei sehr kurze Stäbchen bisweilen Kokken-förmig erscheinen können [6].

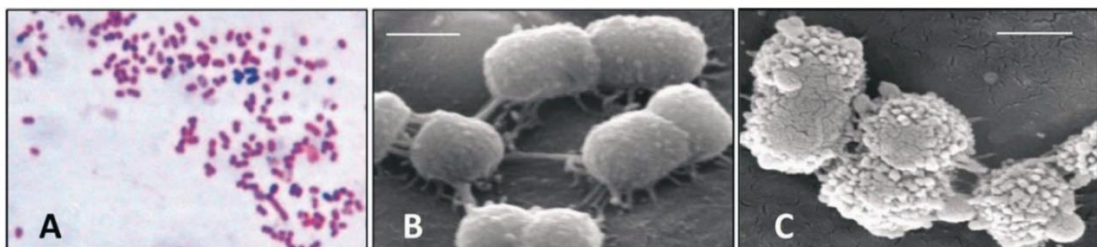


Abb. 1. Gram-Färbung und Morphologie von *Acinetobacter baumannii*. (A) Gram-Färbung von Zellen der stationären Phase, welche Stäbchen-förmig erscheinen. Sehr kurze Stäbchen können dabei ein fast Kokken-förmiges Erscheinungsbild aufweisen. Einige Zellen erscheinen blau, aufgrund der Retention des Farbstoffes Kristallviolett. (B) und (C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *A. baumannii* Stamm AYE und ACICU (der Skalierungsbalken entspricht 500 nm). Die Abbildung wurde übernommen aus [6].

Die Taxonomie der Gattung *Acinetobacter* ist komplex. Bis Mai 2011 wurden 23 Spezies beschrieben, welche einen formellen Namen besitzen, sowie mindestens 11 als Genomspezies beschriebene Spezies (Tab. 1, nachfolgende Seite). Die vier Spezies *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* (*Acinetobacter* gen. sp. 3) sowie *Acinetobacter nosocomialis* (*Acinetobacter* gen. sp. 13TU) haben sich in DNA-DNA Hybridisierungen als eng verwandt erwiesen und lassen sich phänotypisch nur schwer voneinander unterscheiden. Sie werden im so genannten *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (Acb)-Komplex zusammengefasst [7, 8]. *A. calcoaceticus* ist ein ubiquitär verbreitetes Bakterium, welches häufig aus Boden- und Gewässerproben isoliert werden kann. Im Gegensatz dazu sind die drei weiteren Spezies des Acb-Komplexes humanpathogen, daher ist diese Gruppierung klinisch betrachtet weniger sinnvoll.

Im klinischen Bereich hat sich die Gruppierung von *A. baumannii*, *A. pittii* und *A. nosocomialis* zum so genannten *A. baumannii*-Komplex durchgesetzt [4, 6, 9]. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens anderer Spezies der Gattung *Acinetobacter* [10], etwa von *A. calcoaceticus* oder *A. baylyi*, hält sich oftmals noch das Missverständnis, dass *A. baumannii* ebenfalls ubiquitär verbreitet ist [11]. Ein weiteres, nach wie vor verbreitetes Missverständnis ist, dass *A. baumannii* zur physiologischen Hautflora gehört. Während *A. Iwoffii* (56-61%) oder *A. johnsonii* (20%) tatsächlich der physiologischen Hautflora zugeordnet werden, konnte *A. baumannii* in entsprechenden Studien nur in 0,5-3% der Fälle auf der menschlichen Haut nachgewiesen werden [12, 13]. Dijkshoorn et al. haben zudem menschliche Fäkalien auf das Vorkommen verschiedener *Acinetobacter* Spezies untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass 25% aller gesunden Studienteilnehmer Träger von *Acinetobacter* waren, wobei *A. johnsonii* und *Acinetobacter* gen. sp. 1 dominierten. *A. baumannii* dagegen wurde in nur 0,8% der Fälle nachgewiesen [14]. Diese umfangreichen Studien zeigten, dass *A. baumannii* weder Bestandteil der normalen Hautflora noch der Darmflora von gesunden Menschen ist. Das natürliche Habitat von *A. baumannii* bleibt allerdings weiterhin unklar.

Tab. 1. Spezies der Gattung *Acinetobacter* (modifiziert nach [4, 6]).

Spezies	Genom- spezies	Typ-Stamm oder repräsentativer Stamm	Habitat oder Quelle	Referenzen
<i>A. baumannii</i>	2	ATCC 19606 ^T	Klinisches Isolat, natürliches Habitat unbekannt	[15, 16]
<i>A. baylyi</i>		DSM 14961 ^T	Klärschlamm, Boden	[17]
<i>A. beijerinckii</i>		NIPH 838 ^T	Boden, Wasser	[18]
<i>A. bereziniae</i>	10	ATCC 17924 ^T	Mensch, Boden	[19]
<i>A. bouvetii</i>		DSM 14964 ^T	Klärschlamm	[17]
<i>A. calcoaceticus</i>	1	ATCC 23055 ^T	Boden, Wasser	[15, 16]
<i>A. gernerii</i>		DSM 14967 ^T	Klärschlamm	[17]
<i>A. grimontii</i>		DSM 14968 ^T	Klärschlamm	[17]
<i>A. guillouiae</i>	11	ATCC 11171 ^T	Menschliche Fäkalien, Wasser, Boden	[19]
<i>A. gyllenbergii</i>		NIPH 2150 ^T	Mensch	[18]
<i>A. haemolyticus</i>	4	ATCC 17906 ^T	Mensch	[15, 16]
<i>A. johnsonii</i>	7	ATCC 17909 ^T	Menschliche Haut, Wasser, Boden	[15, 16]
<i>A. junii</i>	5	ATCC 17908 ^T	Mensch	[15, 16]
<i>A. lwoffii</i>	8/9	ATCC 15309 ^T	Menschliche Haut	[15, 16]
<i>A. nosocomialis</i> [†]	13TU	ATCC 17903	Klinisches Isolat	[15]
<i>A. parvus</i>		NIPH 384 ^T	Mensch und Tiere	[20]
<i>A. pittii</i> [†]	3	ATCC 19004	Klinisches Isolat	[15, 16]
<i>A. radioresistens</i>	12	IAM 13186 ^T	Mensch, Boden	[15, 16, 21]
<i>A. schindleri</i>		NIPH 1034 ^T	Mensch	[22]
<i>A. soli</i>		KCTC 22184 ^T	Boden	[23]
<i>A. tandoii</i>		DSM 14970 ^T	Klärschlamm, Boden	[17]
<i>A. tjernbergiae</i>		DSM 14971 ^T	Klärschlamm	[17]

Tab. 1. Spezies der Gattung *Acinetobacter* (modifiziert nach [4, 6]), fortgesetzt.

Spezies	Genom-spezies	Typ-Stamm oder repräsentativer Stamm	Habitat oder Quelle	Referenzen
<i>A. towneri</i>		DSM 14962 ^T	Klärschlamm	[17]
<i>A. ursingii</i>		NIPH 137 ^T	Mensch	[22]
<i>A. venetianus</i>		ATCC 31012 ^T	Meerwasser	[24]
	6	ATCC 17979	Mensch	[15, 16]
	13BJ, 14TU	ATCC 17905	Mensch	[15, 25]
	14BJ	CCUG 14816	Mensch	[25]
	15BJ	SEIP 23.78	Mensch	[25]
	15TU	M 151a	Mensch	[15]
	16	ATCC 17988	Mensch	[25]
	17	SEIP Ac87.314	Mensch, Boden	[25]
	Zwische n 1 and 3	10095	Klinisches Isolat	[26]
	Ähnlich zu 13TU	10090	Klinisches Isolat	[26]

^T) Typ-Stamm

[†]) Diese Speziesnamen wurden vorgeschlagen, haben aber noch keinen formellen Status in der taxonomischen Nomenklatur (Stand: Mai 2011)

1.2 Klinische Bedeutung von *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii ist ein opportunistisches, humanpathogenes, Stäbchen-förmiges Bakterium und für 2-10% aller nosokomialen Infektionen durch Gram-negative Erreger verantwortlich [27]. Klinische Manifestationen von *A. baumannii*-Infektionen umfassen Haut- und Weichteilinfektionen, Wundinfektionen, Infektionen des Urogenitaltrakts sowie sekundäre Meningitiden [9, 28, 29]. Die bedeutendsten Infektionen mit den höchsten Mortalitätsraten sind jedoch Ventilator-assoziierte Pneumonien sowie Bakteriämien [30]. Zu den Risikofaktoren für nosokomiale Infektionen mit *A. baumannii* gehören neben

fortgeschrittenem Alter und männlichem Geschlecht [31] sowie einem geschwächten Immunsystem (auch durch eventuelle Antibiotikatherapien), offene Wunden, vorangegangene chirurgische Eingriffe sowie die Präsenz von medizinischen Fremdkörpern wie etwa Kathetern oder Beatmungstuben [32]. Das Risiko einer Infektion steigt ebenfalls mit der Dauer des Krankenhausaufenthaltes [4]. Weit weniger verbreitet sind Pneumonien, welche nicht nosokomial erworben wurden [33]. Allerdings haben diese meist einen fulminanten Verlauf mit Mortalitätsraten von bis zu 70%. Solche Infektionen lassen sich häufiger bei Männern als bei Frauen nachweisen und gehen mit weiteren Risikofaktoren einher, wie z. B. fortgeschrittenes Alter, Alkoholismus, starkes Rauchen, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Diabetes mellitus sowie Nierenerkrankungen. Die meisten der untersuchten Fälle traten in tropischen und subtropischen Klimazonen auf [34] oder beim Personal der U.S. amerikanischen Streitkräfte nach Verletzungen während der Kriege im Irak (2003-2011) oder in Afghanistan (nach 2001) [27, 35]. Auch nach Naturkatastrophen, wie dem Marmara-Erdbeben in der Türkei 1999 konnte man das vermehrte Auftreten von *A. baumannii*-Infektionen beobachten [36]. Es gibt Indizien dafür, dass die immunsupprimierenden Eigenschaften von Morphinium in solchen Situationen *A. baumannii*-Infektionen begünstigen [37]. Unzureichend befolgte Hygiene-vorschriften, Stress, Zeitdruck, Ermüdung und Überarbeitung des Krankenhaus-personals sowie der Ausfall von Strom- und Wasserversorgung etc. begünstigen ebenfalls die Verbreitung von Infektionen mit *A. baumannii* [38].

A. baumannii ist äußerst tolerant gegenüber Trockenstress [39, 40] und resistent gegen eine Vielzahl an Antibiotika, was es dem Erreger erleichtert, in medizinischen Einrichtungen zu überleben. In einem Bericht von 2013 weist die amerikanische CDC (Centers for Disease Control and Prevention) explizit darauf hin, dass 63% aller *Acinetobacter*-Infektionen in den Vereinigten Staaten durch multiresistente Erreger hervorgerufen werden [41], was eine zunehmend ernste Problematik weltweit darstellt. Klinisch relevante Antibiotika und die entsprechenden Resistenzmechanismen von *A. baumannii* sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2. Mechanismen der Antibiotikaresistenz von *A. baumannii* (modifiziert nach [4, 9]).

Antibiotika Klasse	Resistenzmechanismus	Beispiele	Referenzen
β-Laktame	Inaktivierung von β-Laktam-Antibiotika	β-Laktamasen (AmpC, TEM, VEB [†] , PER, CTX-M, SHV)	[42-47]
		Carbapenemasen (OXA-23, -40, -51, -58 und 143-ähnliche, VIM, IMP, NDM)	[4, 48-52]
	Verringerte Produktion von äußeren Membranproteinen	CarO, 33-36 kD Protein, OmpW, Opr-D-ähnliches Protein	[53-57]
	Veränderte Produktion von Penicillin-bindenden Proteinen	PBP2	[55, 58]
	Effluxpumpen	AdeABC	[59-62]
Fluorchinolone	Modifikationen des Targets	Mutationen in <i>gyrA</i> und <i>parC</i>	[60, 63-65]
	Effluxpumpen	AdeABC, AdeM	[60, 61, 66]
Aminoglykoside	Aminoglykosid-modifizierende Enzyme	AAC ^{†,‡} , ANT, APH ^{†,‡}	[45, 47, 67, 68]
	Effluxpumpen	AdeABC, AdeM	[61, 66]
	Ribosomale Methylierung	ArmA	[69-71]
Tetracycline	Effluxpumpen	AdeABC, TetA [†] , TetB	[72-74]
	Schutz des Ribosoms	TetM	[74]
Glycylglycine	Effluxpumpen	AdeABC	[62, 75]
Polymyxine	Modifikationen des Targets	Mutationen im PmrA/B Zweikomponentensystem (LPS Modifikation), Mutationen in Genen der LPS-Biosynthese	[76, 77]

[†]) AbaR1 von *A. baumannii* AYE [78] [‡]) AbaR2 von *A. baumannii* ACICU [79]

Alle *A. baumannii*-Stämme verfügen über chromosomal-kodierte AmpC Cephalosporinasen [80]. Zusätzlich können eine ganze Reihe weiterer Resistenzgene vorhanden sein, welche für β -Laktamasen sowie Carbapenemasen kodieren [4]. Neben Enzymen mit inaktivierender Aktivität können Veränderungen in der Produktion einer Reihe von äußeren Membranproteinen bzw. von Penicillin-bindenden Proteinen zur Resistenz gegenüber von β -Laktam-Antibiotika führen [56]. *A. baumannii*-Stämme besitzen eine Reihe von Effluxpumpen, die Antibiotika aus den Bakterienzellen transportieren [78]. Das am besten charakterisierte System ist der Transporter AdeABC. Das Substratspektrum von AdeABC umfasst neben β -Laktamen, einschließlich Carbapenemen [59, 60], auch Aminoglykoside, Tetracycline, Fluorchinolone, Erythromycin, Chloramphenicol, Trimethoprim sowie Ethidiumbromid [61, 62, 75, 81, 82].

Besonders besorgniserregend ist die deutliche Zunahme von pan-resistenten *A. baumannii*-Stämmen, welche resistent gegenüber allen klinisch verwendeten Antibiotika sind [83-85]. Solche Stämme stellen die behandelnden Ärzte vor große Herausforderungen und erfordern neue Strategien zur Vermeidung und Behandlung entsprechender *A. baumannii*-Infektionen.

Die vermehrte Expression von intrinsischen Resistenzmechanismen bzw. die Akquisition neuer Mechanismen setzt eine hohe Plastizität des Genoms von *A. baumannii* voraus [9]. Über die natürliche Kompetenz, d. h. die Fähigkeit zur Aufnahme von DNA, von *A. baumannii* ist bisher nur wenig bekannt. *A. baylyi* weist allerdings eine sehr hohe natürliche Kompetenz auf [86-89]. Weitere Studien, etwa die Entdeckung einer 86 kBp großen, durch horizontalen Gentransfer erworbenen Resistenzinsel, AbaR1 [78], sowie die Beobachtung, dass *A. baumannii* viele weitere Resistenzgene besitzt, welche ebenfalls durch horizontalen Gentransfer erworben wurden [90], sprechen ebenso für die genetische Agilität von *A. baumannii*. Es ist zu vermuten, dass Resistenzgene von anderen Gram-negativen Pathogenen erworben wurden, beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp. oder *Escherichia coli* [78].

Zusammen mit weiteren multiresistenten Humanpathogenen gehört *A. baumannii* zur Gruppe der „ESKAPE“-Pathogene. Unter diesem Akronym

zusammengefasst sind neben *A. baumannii* noch *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *Enterobacter* sp. Kollektiv sind diese Erreger für die Mehrzahl nosokomialer Infektionen mit multiresistenten Erregern in den Vereinigten Staaten verantwortlich und entziehen sich den meisten Antibiotikatherapien [91]. Es ist jedoch anzumerken, dass der Erwerb von multiplen Antibiotikaresistenzen zumindest teilweise mit einem Verlust von Fitness und Virulenz einherzugehen scheint. So konnte für ein Ciprofloxacin-resistentes *A. baumannii*-Isolat gezeigt werden, dass der Erwerb der Resistenz mit reduziertem Wachstum *in vitro* und *in vivo* einherging. Zudem verursachte dieses Isolat weniger Apoptose in humanen Wirtszellen und geringere Mortalität in einem Mausmodell [92].

Grundsätzlich wird über den Schweregrad von *A. baumannii*-Infektionen diskutiert. Die auf *A. baumannii*-Infektionen zurückzuführende Mortalität schwankt zwischen 8% und 35% [34]. Unterschiedliche *A. baumannii*-Stämme können daher über ein unterschiedliches pathogenes Potential verfügen. So verursachte etwa ein multiresistentes Isolat von einem Patienten mit nosokomial-erworbener Pneumonie im Mausmodell eine Mortalität von 80%, während ein Isolat von einem Patienten mit Meningitis nur 13% Mortalität bei Mäusen verursachte [93]. Es ist möglich, dass die unterschiedliche Mortalität dieser beiden Stämme auf das Vorhandensein oder die differentielle Produktion verschiedener Pathogenitätsfaktoren zurückzuführen ist.

1.2.1 Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii*

Bisher sind nur wenige Pathogenitätsfaktoren bei *A. baumannii* identifiziert worden. Der bislang am besten untersuchte Pathogenitätsfaktor ist das äußere Membranprotein OmpA. Dieses Protein vermittelt Bindung an sowie Invasion von Epithelzellen [94], induziert Apoptose in Wirtszellen [95] und ist außerdem an der Bildung von Biofilm sowie der Motilität von *A. baumannii* auf Oberflächen beteiligt [96, 97]. Wie bei vielen anderen Mikroorganismen spielt auch die Lipopolysaccharid-Schicht (LPS) von *A. baumannii* eine Rolle in der Pathogenese. LPS löst über TLR-4 und CD14 eine pro-inflammatorische Immunantwort aus [98]. Ein weiterer Pathogenitätsfaktor ist der trimäre

Autotransporter Ata von *A. baumannii*. Dieses Adhäsion vermittelt die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen IV, hat eine Funktion bei der Bildung von Biofilm und trägt zum Überleben von *A. baumannii*-Zellen im Mausmodell bei [99]. Proteasen sind wichtige Virulenzdeterminanten zahlreicher humanpathogener Mikroorganismen. *A. baumannii* beispielsweise sekretiert eine Serinprotease, PKF, welche die Bildung von Biofilm negativ beeinflusst [100]. Auch Phospholipasen vom Typ C und D scheinen zur Virulenz von *A. baumannii* beizutragen. So führte die Inaktivierung der Phospholipase D zu einem Defekt in der Invasion dieses Erregers in Epithelzellen [101]. Die Inaktivierung von Phospholipase C resultierte in einer Abnahme der Fähigkeit von *A. baumannii*, Apoptose in Wirtszellen zu induzieren [102]. Penicillin-bindende Proteine sind an den späten Schritten der Peptidoglykan-Biosynthese beteiligt und tragen somit zur strukturellen Stabilität der Bakterienzelle bei [103]. Eine Transposon-Mutante mit Insertion im für das Penicillin-Bindeprotein kodierenden *pbpG* Gen weist ein schlechteres Überleben in verschiedenen Tiermodellen auf [104]. Vesikel der äußeren Membran (OMVs) zählen ebenfalls zu den Pathogenitätsfaktoren und dienen zum Austausch von genetischem Material, etwa für Antibiotikaresistenzen kodierende Gene, sowie dem Einschleusen von Pathogenitätsfaktoren, wie z. B. OmpA in Wirtszellen [105, 106]. Auch das Acinetobactin-Eisenaufnahmesystem wird zu den Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii* gerechnet. Die Verfügbarkeit von Eisen unterliegt im Wirt einer strikten Limitation. Durch Bindung an Eisentransport-Proteine wie Transferrin oder Laktoferrin liegt die Fe(III) Konzentration in humanem Serum bei etwa 10^{-24} M [107]. Pathogene Mikroorganismen benötigen daher effiziente Systeme zur Eisenaufnahme. Das Siderophor Acinetobactin ermöglicht es *A. baumannii*, im Wirt zu persistieren. Inaktivierung von Acinetobactin resultiert in einer starken Abnahme des Überlebens von *A. baumannii* in einer Reihe von verschiedenen Tiermodellen [108]. In Tab. 3 sind bis dato identifizierte Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii* zusammengefasst.

Tab. 3. Identifizierte Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii* (modifiziert nach [9]).

Pathogenitätsfaktor (Gen)	Funktion	Referenzen
OmpA (<i>ompA</i>)	Induktion der Apoptose in Wirtszellen, Adhäsion an und Invasion von Epithelzellen, Bildung von Biofilm, Motilität auf Oberflächen, Serumresistenz	[94-96, 109]
Lipopolysaccharid (<i>lpsB</i>)	Immunevasion, Induktion der proinflammatorischen Immunantwort, Entzündungsreaktionen	[110]
Polysaccharidkapsel (<i>ptk</i> und <i>epsA</i>)	Immunevasion, Serumresistenz	[111]
<i>Acinetobacter</i> trimeric autotransporter Ata	Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten, Bildung von Biofilm, Überleben <i>in vivo</i>	[99]
Phospholipase C	Induktion der Apoptose in Wirtszellen	[102]
Phospholipase D (A1S_2989)	Serumresistenz, Dissemination im Wirt, Überleben <i>in vivo</i>	[101]
Serinprotease PKF	Bildung von Biofilm, Serumresistenz	[100]
Penicillin-bindendes Protein 7/8 (<i>pbpG</i>)	Peptidoglykan-Biosynthese, Stabilität der Bakterienzelle, Serumresistenz	[104]
Vesikel der äußeren Membran	Einschleusung von Pathogenitätsfaktoren in das Zytoplasma von Wirtszellen, Gentransfer zwischen Bakterienzellen	[105, 106]
Acinetobactin-Eisen Aufnahme-System	Aufnahme von Eisen zur Persistenz im Wirt, induziert Apoptose von Wirtszellen	[108]

Interessanterweise scheinen viele Faktoren einen Einfluss auf das Überleben der Bakterien im Humanserum zu haben. Auf Pathogenitätsfaktoren, welche zur Serumresistenz beitragen wird in Abschnitt 1.4 genauer eingegangen.

1.3 Das Komplementsystem

1.3.1 Funktionen und Aktivierung der Komplementkaskade

Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, welche erst nach mehr als 96 h nach Kontakt mit einem Erreger einsetzt, stellt die angeborene, unspezifische Immunantwort die erste Linie der Verteidigung gegenüber eindringenden Krankheitserregern in den humanen Wirt dar. Das Komplementsystem ist eine zentrale Komponente der angeborenen Immunantwort und dient traditionell betrachtet der Erkennung, Opsonisierung und Lyse eindringender körperfremder Zellen, sowie der Kommunikation mit und Aktivierung der adaptiven Immunantwort [112]. Neben der Eliminierung von pathogenen Mikroorganismen erfüllt das Komplementsystem jedoch eine ganze Reihe weiterer Funktionen, beispielsweise bei Entwicklungsprozessen wie der Reifung von Synapsen [113], der Angiogenese [114] oder der Mobilisierung von Vorläuferzellen der hämatopoietischen Stammzellen [115-117]. Auch bei der Regenerierung von geschädigtem Gewebe [118] und im Lipidstoffwechsel [119] spielt Komplement eine Rolle.

Das Komplementsystem besteht aus über 40 löslichen und zellgebundenen Proteinen, welche hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden und u. a. Membranproteine, Entzündungsmediatoren, Phagozytoserezeptoren, Regulator-proteine und Zymogene als Vorstufen aktivierbarer Enzyme umfassen. Aktiviert werden kann die Komplementkaskade über drei unterschiedliche Wege, die jedoch im Laufe der Kaskade konvergieren (Abb. 2).

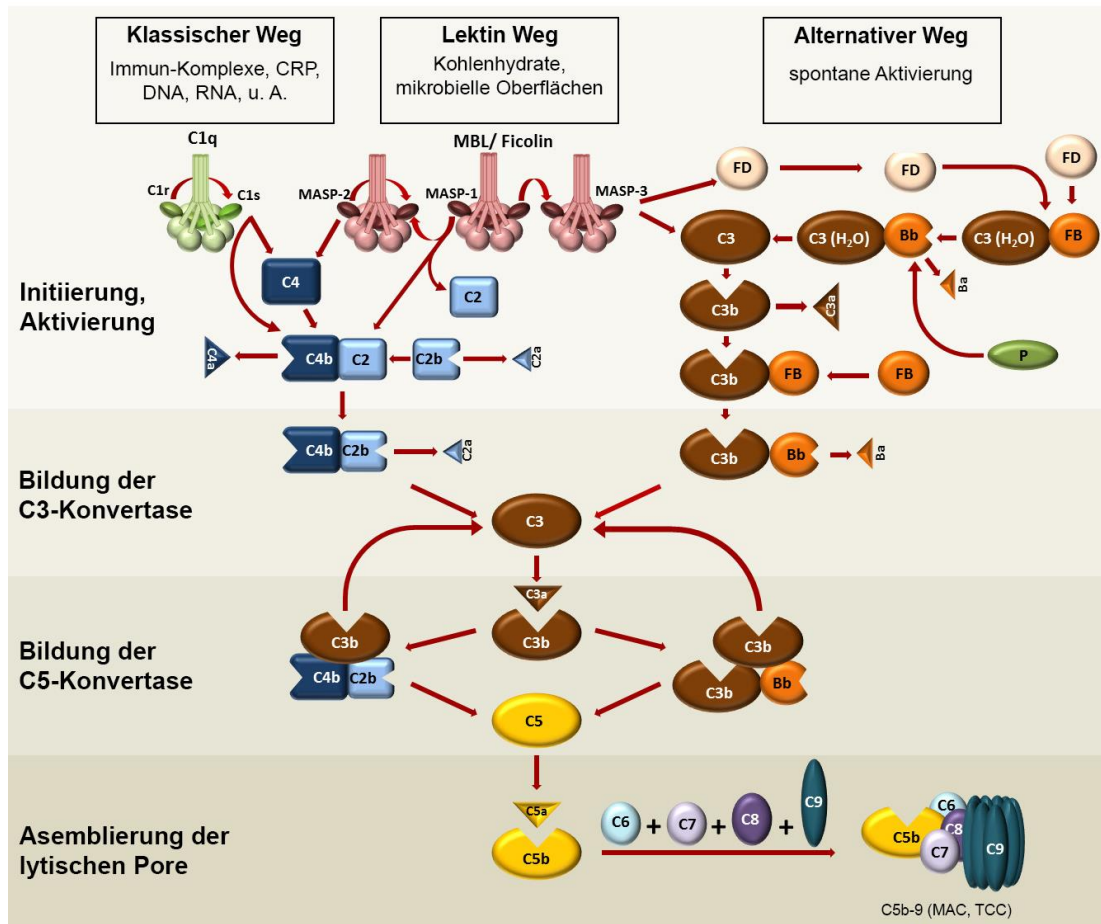


Abb. 2. Übersicht der Komplementkaskade. Die Aktivierung der Kaskade erfolgt durch drei verschiedene, konvergierende Wege und resultiert zunächst in der Bildung von C3-Konvertasen. Anlagerung weiterer C3b Moleküle an die jeweiligen C3-Konvertasen verändert deren Spezifität hin zu C5 (Bildung der C5-Konvertasen). Spaltung von C5 leitet die späten Schritte der Kaskade ein, welche in der Assemblierung der lytischen Pore C5b-9 (auch MAC bzw. TCC genannt) resultiert. (CRP) C-reaktives Protein, (MBL) Mannose-bindendes Lektin, (MASP) MBL bzw. Ficolin-assoziierte Serinproteasen, (MAC) Membranangriffskomplex, (TCC) terminaler Komplementkomplex. Die Abbildung wurde von Prof. P. Kraiczky, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

Der klassische Weg wird oftmals als Antikörper-abhängig bezeichnet, da dieser durch Antigen-Antikörper Komplexe mit IgM bzw. IgG aktiviert wird. Dabei interagiert die Komplementkomponente C1q mit den Fc-Regionen des IgM bzw. IgG-Moleküls [120]. In diesem Sinne stellt der klassische Weg eine Verbindung zwischen angeborener Immunantwort und der humoralen Komponente der adaptiven Immunantwort dar. Allerdings kann der klassische Weg auch unabhängig von Immunglobulinen aktiviert werden. Dies geschieht durch Interaktion von C1q mit einer ganzen Reihe von weiteren Molekülen, wie etwa dem C-reaktiven Protein (CRP), bakteriellen Polysacchariden,

Polyanionen wie DNA oder RNA, Bestandteile der extrazellulären Matrix sowie apoptotischen und nekrotischen Zellen [121-123]. Die Komponenten des klassischen und Lektin-Weges sind strukturell und funktionell ähnlich [122, 124, 125]. Analog zum Lektin-Weg kommt es auch beim klassischen Weg zur Ausbildung eines Komplexes, im Falle des klassischen Wegs von C1q mit den Proteasen C1r und C1s. Als Bestandteil dieses Komplexes kann C1s C4 sowie C2 spalten. Es kommt zur Bildung der C3-Konvertase des klassischen Wegs (C4b2b). Der klassische Weg ist Ca^{2+} -abhängig.

Der Lektin-Weg wird aktiviert, wenn Mannose-bindende Lektine (MBL) und Ficoline an Kohlenhydrate auf der Oberfläche eindringender Mikroorganismen, etwa Mannan [126] oder N-Acetylglukosamin, binden [127]. Nach Assemblierung zu einem Komplex mit MBL- bzw. Ficolin assoziierten Serinproteasen (MASPs) kommt es zur Spaltung von C4 bzw. C2 durch die assoziierten Proteasen und zur nachfolgenden Bildung der C3-Konvertase (C4b2b). Wie der klassische Weg, ist auch der Lektin-Weg Ca^{2+} -abhängig.

Im Gegensatz zum Lektin- und klassischen Weg basiert der alternative Weg nicht auf der Erkennung von Antigen-Antikörper Komplexen oder spezifischen Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen. Im Rahmen des sogenannten "tick-over" kommt es zur kontinuierlichen, spontanen Hydrolyse von C3 im Serum [128, 129]. C3(H_2O) kann durch Faktor B (FB) gebunden werden und wird von der Serinprotease Faktor D (FD) gespalten, wodurch die Flüssigphase C3-Konvertase C3(H_2O)Bb entsteht, welche weitere Moleküle C3 spalten kann. Spaltung von C3 führt zur Exponierung eines reaktiven Thioesters in C3b, welches kovalent an Amine und hydroxylierte Kohlenhydrate auf Zelloberflächen bindet. Dieser Prozess wird auf körpereigenen Zellen strikt reguliert. Auf körperfremden Oberflächen kommt es jedoch zu einer starken Amplifikation dieses Prozesses. Wenn C3b an die Oberfläche von eindringenden Pathogenen gebunden ist, lagert sich FB an, welcher dann durch FD gespalten werden kann. Auf diese Weise wird die C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBb) gebildet [130]. Somit entsteht eine Amplifikationsschleife. Durch die kontinuierliche Generation von C3b entstehen gleichzeitig immer neue C3-Konvertasen und die Konzentration von C3b steigt signifikant an [131]. Die C3-Konvertase wird durch Bindung von Properdin an

C3bBb zusätzlich stabilisiert [132]. Der alternative Weg scheint für 80-90% der Komplementaktivierung verantwortlich zu sein, selbst bei vorheriger Aktivierung durch den klassischen oder Lektin-Weg [133].

Durch Anlagerung von C3b an die C3-Konvertasen des alternativen, des klassischen und des Lektin-Weges verändert sich deren Substratspezifität von C3 zu C5. Diese C5-Konvertasen (C4b2b3b im klassischen und Lektin-Weg, C3bBb3b im alternativen Weg) spalten C5 in das Anaphylatoxin C5a sowie C5b. C5b interagiert mit C6 und C7, wobei der Komplex durch Assoziation mit C8 in Zellmembranen inseriert. C5b-8 dient nun als Rezeptor für C9 und katalysiert die Polymerisierung von C9 zu einer lytischen Pore, auch terminaler Komplementkomplex (TCC) oder Membranangriffskomplex (MAC) genannt [134]. Die lytischen Poren haben einen Durchmesser von 10 nm und führen zur Destabilisierung der Membran und zum Zusammenbruch der Zellhomeostase [135]. Eindringende Mikroorganismen werden zusätzlich durch die Opsonisierung mit C3b vermehrt von Makrophagen über spezifische Komplementrezeptoren erkannt und phagozytiert. Durch die Spaltprodukte C3a, C4a und C5a, welche lokale Entzündungsreaktionen verursachen und in größerer Konzentration anaphylaktische Wirkung entfalten, werden Phagozyten gezielt zum Infektionsort rekrutiert [136, 137]. Die Aktivierung von Komplement führt somit über eine Kaskade von Effektorproteinen zur effizienten Eliminierung eindringender Mikroorganismen.

1.3.2 Regulation des Komplementsystems

Komplement ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Immunsystems und bei der Eliminierung eindringender Mikroorganismen, wie auch nekrotischer und apoptotischer Zellen beteiligt. Um jedoch gesunde körpereigene Zellen vor überschießender Aktivierung und einem daraus resultierenden Angriff durch Komplement zu schützen, existieren eine Reihe von löslichen und membrangebundenen Proteinen, welche das Komplementsystem strikt regulieren. Diese Komplementregulatoren greifen an unterschiedlichen, strategisch wichtigen Stufen der Komplementkaskade ein.

Im nachfolgenden sind einige wichtige Vertreter der Komplementregulatoren beschrieben.

Membrangebundene Komplementregulatoren umfassen MCP (membrane cofactor protein), DAF (decay-accelerating factor), CR1 (complement receptor 1) und CD59 (Protectin) [138, 139]. Neben den membrangebundenen Regulatoren gibt es eine Reihe löslicher Komplementregulatoren.

C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) bindet kovalent an C1s, C1r sowie an MASP-1 und MASP-2, wodurch deren Funktion blockiert wird. Somit werden der klassische als auch der Lektin-Weg inhibiert. Davon unabhängig interagiert C1-INH auch mit C3b sowie FH und kann somit den alternativen Weg regulieren [122, 140].

Das C4b-bindende Protein (C4BP) reguliert sowohl den klassischen als auch den Lektin-Weg, indem es als Kofaktor für Faktor I (FI) fungiert, welcher C4b degradiert. Zusätzlich verdrängt C4BP C2b von der C3-Konvertase des klassischen und Lektin-Weges [141].

Die wichtigsten Regulatoren des alternativen Weges sind die Proteine der Faktor H-Familie, welche neben Faktor H selbst (FH) und dem Faktor H ähnlichen Protein-1 (FHL-1) [142, 143] mehrere Faktor H-verwandte Proteine (FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4A, FHR-4B und FHR-5) umfasst [144-146]. Die Proteine der Faktor H-Familie sind aus mehreren homologen, globulären SCR-Domänen (short consensus repeats) moduliert. Einzelne Proteine der Faktor H-Familie unterscheiden sich in Anzahl und Zusammensetzung der verschiedenen SCR-Domänen. FH und FHL-1 fungieren als Kofaktoren für FI, welcher C3b proteolytisch spaltet und inaktiviert, wobei die Komplementregulatorische Funktion in den SCR-Domänen 1-4 lokalisiert ist [147, 148]. Zusätzlich können FH und FHL-1 die C3-Konvertase des alternativen Weges regulieren, indem sie den Zerfall des C3bBb-Komplexes beschleunigen („Decay-accelerating activity“) und dessen Neuformation behindern [149-151]. Faktor H-verwandte Proteine regulieren Komplement auf unterschiedlichen Ebenen. FHR-1 inhibiert die C5-Konvertase sowie die Assemblierung des terminalen Komplexes [152]. FHR-2 inhibiert die C3-Konvertase des alternativen Weges sowie die Bildung des terminalen Komplexes [153]. FHR-3

sowie die beiden unterschiedlichen „Splicing“-Varianten von FHR-4 (FHR-4A und FHR-4B) sind Homologe mit hoher Sequenzidentität. Diese Faktor H-verwandten Proteine binden C3b und verstärken die Kofaktoraktivität von FH [142]. Der letzte Vertreter der Faktor H-verwandten Proteine, FHR-5 bindet C3b und fungiert wie FH als Kofaktor für FI und beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase des alternativen Weges [154, 155].

Vitronectin besitzt multiple biologische Funktionen. Innerhalb des Komplementsystems reguliert Vitronectin den terminalen Aktivierungsweg. Durch Interaktion mit dem löslichen C5b67 Komplex verhindert Vitronectin dessen Insertion in die Membran. Zusätzlich blockiert es die C9-Polymerisation und somit die Assemblierung der lytischen Pore [156, 157].

1.3.3 Evasion des Komplementsystems

Um erfolgreich im menschlichen Wirt zu überleben, müssen pathogene Mikroorganismen dem Immunsystem, insbesondere Komplement als unspezifischem Abwehrsystem entgehen. Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten haben hierzu eine Reihe unterschiedlicher Strategien entwickelt.

Eine allgemeine Strategie ist das Ausbilden sterischer Barrieren, beispielsweise einer Kapsel [158] oder Schleimschicht [159]. Auch LPS von Gram-negativen Bakterien [160-162] fungiert als sterische Barriere gegenüber Komplement, wie z. B. bei *Haemophilus influenzae* und *K. pneumoniae*. Auf ähnliche Weise scheint die Peptidoglykanschicht von Gram-positiven Bakterien, zumindest teilweise, vor einem Angriff durch Komplement zu schützen [163, 164]. Biofilm dient ebenfalls zum Schutz vor Komplement. Die Deposition von C1q und C3b sind deutlich reduziert auf *Streptococcus pneumoniae*-Zellen welche in einem Biofilm wachsen, im Vergleich zu planktonisch kultivierten Zellen. Zudem scheinen die von *S. pneumoniae* gebildeten Biofilme stärker FH zu binden als planktonische Zellen [165]. Außerdem aktivieren Biofilme von *P. aeruginosa* Komplement weniger stark als im Vergleich zu planktonischen Zellen [166].

Eine weitere Strategie zur Evasion von Komplement ist die Bindung löslicher Komplementregulatoren. Diese Regulatoren liegen im Serum teils in mikromolaren Konzentrationen vor (FH: 1,5-2 μM , C4BP: 0,3-0,6 μM , Vitronectin: 3-6 μM) und sind auch in extravaskulären Flüssigkeiten vorhanden. *Borrelia burgdorferi* ist in der Lage, FH sowie FHL-1 über verschiedene, membranständige Lipoproteine (CRASPs), zu binden [167-178]. Hierbei spielen CspA und CspZ für die Komplementresistenz eine wesentliche Rolle. Bei Fehlen dieser Proteine sind Borrelien nicht länger vor der Komplementvermittelten Lyse geschützt [179, 180]. CspA-orthologe Proteine konnten auch bei anderen Borrelienspezies nachgewiesen werden [181-184]. Ein weiteres Beispiel für die Bindung von Komplementregulatoren stellt *H. influenzae* dar. Dieses Pathogen bindet Vitronectin über die äußeren Membranproteine Hsf [185] und Protein E [186], sowie zusätzlich FH, FHL-1 und C4BP [187]. Dass die Bindung von Komplementregulatoren eine wichtige Strategie darstellt, zeigt die große Palette an humanpathogenen Erregern, welche unterschiedliche Komplementregulatoren binden. Neben den bereits genannten Beispielen umfasst diese Gruppe auch *S. pneumoniae* [188, 189], *Neisseria gonorrhoeae* [190-192], *Moraxella catarrhalis* [193], *Candida albicans* [194-197], *S. aureus* [198, 199], *Aspergillus fumigatus* [200], sowie *Yersinia enterocolitica* [201].

Eine Reihe von pathogenen Mikroorganismen ist in der Lage, Komplement durch proteolytische Spaltung einzelner Komponenten über Oberflächen-exponierte bzw. sekretierte Proteasen zu inaktivieren. *P. aeruginosa* kann beispielsweise C1q und C3 durch Elastase (PaE), alkalische Protease (PaAP) und PASP (*Pseudomonas aeruginosa* small protease) degradieren [202, 203]. Für *Serratia marcescens* wurde eine Protease beschrieben, welche das Anaphylatoxin C5a degradiert und somit nachfolgende chemotaktische und pro-inflammatorische Signalkaskaden inhibiert [204, 205]. *Streptococcus pyogenes* sekretiert Exotoxin B, eine Protease welche Properdin inaktiviert und somit den Zerfall der C3-Konvertase des alternativen Weges beschleunigt [206].

Manche Mikroorganismen sind auch dazu befähigt, Komplement direkt durch eigene Effektorproteine zu inhibieren. Das SIC Protein (streptococcal inhibitor of complement) wird von Streptokokken der Gruppe A sezerniert und interagiert

mit den Komplexen C5b-7 sowie C5b-8, wodurch die Formation des MAC verhindert wird [207-209]. Das *Herpes simplex* Virus Typ 1 und Typ 2 kann mit Hilfe des Transmembranproteins gC (glycoprotein C) C3b binden, den Zerfall der C3-Konvertase des alternativen Weges beschleunigen und die Interaktion zwischen C3b und Properdin inhibieren [210-213]. Das Transmembranprotein Sh-TOR von *Schistosoma mansoni* ist in der Lage, C2 zu binden, was dazu führt, dass dieses nicht mehr mit C4 interagieren kann und die C3-Konvertase des klassischen Weges inhibiert wird [214].

1.4 Komplementresistenz von *A. baumannii*

Grundsätzlich sind unterschiedliche klinische Isolate von *A. baumannii* in Bezug auf ihre Serumempfindlichkeit bzw. -resistenz phänotypisch divergent, wobei das gesamte Spektrum von Komplement-sensibel, über intermediär Komplement-resistent bis Komplement-resistent abgedeckt wird [215, 216].

Unter Abschnitt 1.2.1 wurden eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren bei *A. baumannii* beschrieben. Viele dieser Faktoren zeigten einen Einfluss auf das Überleben von *A. baumannii* in humanem Serum. *A. baumannii* scheint somit eine Reihe von Strategien zu besitzen, die dem Organismus ein Überleben und Persistieren im humanen Serum ermöglichen. Eine allgemeine Strategie ist das Ausbilden sterischer Barrieren. *A. baumannii* ist in der Lage, eine Polysaccharidkapsel auszubilden. Mutanten mit einem Defekt in der Kapselbildung weisen tatsächlich ein schlechteres Überleben in humanem Serum im Vergleich zum Wildtyp auf [111]. Das Penicillin-bindende Protein PBP7/8, welches an der Zellstabilität durch die Biosynthese der Peptidoglykanschicht beteiligt ist, spielt ebenfalls eine Rolle für die Serumresistenz. Inaktivierung von PBP7/8 führte zu einem verringerten Überleben von *A. baumannii* in humanem Serum [104]. Auch Modifikationen des LPS von *A. baumannii* scheinen einen Einfluss auf die Serumresistenz zu haben. Mutanten, welchen die LpsB-Glykotrtransferase fehlt, sind wesentlich empfindlicher gegenüber humanem Serum und überleben schlechter in Ratten [110]. Weiterhin konnten King et al. [215] zeigen, dass die Serumresistenz klinischer *A. baumannii*-Isolate teilweise mit der Ausbildung von Biofilm

korreliert. Biofilme stellen eine sterische Barriere dar und können die Zellen vor Komplement-vermittelter Lyse schützen. Serum-resistente *A. baumannii*-Isolate zeigen weniger C3 Ablagerungen auf ihrer Oberfläche und produzieren oft mehr Biofilm als Serum-sensible Isolate [215]. Eine weitere Strategie zur Komplementevasion ist die Sekretion von Proteasen. *A. baumannii* sekretiert die Serinprotease PKF, welche die Zellen vor den Effekten des Komplementsystems schützt, indem spezifisch der alternative Weg inhibiert wird [100]. Auch Phospholipasen spielen eine Rolle für die Serumresistenz. Inaktivierung der Phospholipase D führt ebenfalls zu vermindertem Überleben von *A. baumannii*-Zellen in humanem Serum [101]. Eine weitere Strategie stellt die Bindung von Komplementregulatoren dar. Kim et al. [109] konnten zeigen, dass das äußere Membranprotein OmpA den Regulator des alternativen Weges, FH binden kann. Eine OmpA-negative Mutante war im Vergleich zum Wildtyp Serum-sensibel.

1.5 Plasminogen

1.5.1 Das fibrinolytische System und Plasminogen

Die Blutgerinnung ist ein komplexer enzymatischer Vorgang, bei dem schlussendlich Fibrin gebildet wird. Zusammen mit Thrombozyten bildet Fibrin einen Thrombus, welcher exzessiven Blutverlust verhindert. Im Laufe der Fibrinolyse werden solche Thromben aufgelöst, um die normale Blutzirkulation wiederherzustellen. Plasmin ist die zentrale Komponente des humanen fibrinolytischen Systems. Das proteolytisch inaktive Zymogen von Plasmin ist Plasminogen, ein 92 kDa schweres, in der Leber synthetisiertes Glykoprotein, welches im humanen Serum mit einer Konzentration von etwa 2,4 μM vorliegt [217]. Zudem findet sich Plasminogen in vielen extravaskulären Flüssigkeiten. Wie Abb. 3 zeigt, besteht Plasminogen aus 791 Aminosäuren, 24 Disulfidbrücken und besitzt keine freien Sulfhydryl-Gruppen. Am N-Terminus von Plasminogen befindet sich das Präaktivierungspeptid (PAP). Spaltung des PAP durch Plasmin führt zur Generierung von Lys-Plasminogen, einer kürzeren Variante des Moleküls welche deutlich weniger stabil ist als das längere Glu-Plasminogen. Zwischen den Aminosäure-Resten K77 und R560 von

Plasminogen befinden sich insgesamt fünf Regionen mit interner Homologie zueinander, sogenannte Kringle-Domänen [218-221]. Jede dieser Domänen bestehen aus drei „loop“-Regionen, welche jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden.

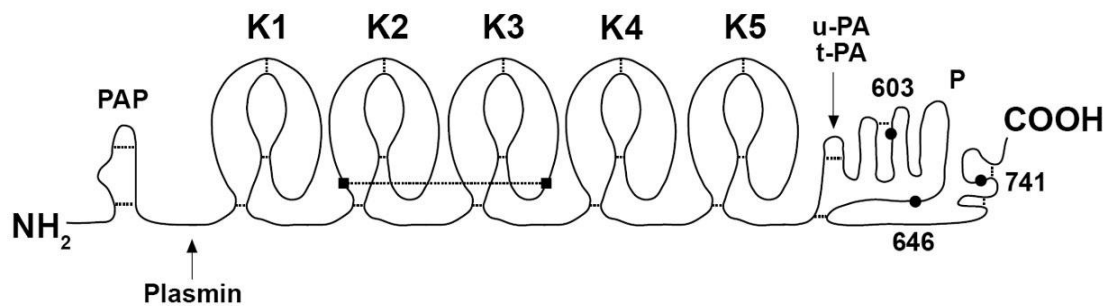


Abb. 3. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von humanem Plasminogen. Das Molekül besteht aus dem N-terminalen Präaktivierungspeptid (PAP), fünf Kringle-Domänen (K1-K5) sowie der C-terminalen Proteasedomäne (P). Plasminogen wird durch proteolytische Spaltung durch Urokinase-typ (u-PA) und Tissue-typ (t-PA) Plasminogen-Aktivator zu Plasmin aktiviert. Disulfidbrücken sind durch gestrichelte Linien dargestellt, die drei Punkte in der Proteasedomäne markieren die Aminosäure-Reste H603, D646 und S741, welche Bestandteile des aktiven Zentrums von Plasmin sind. K2 und K3 sind durch eine Inter-Kringle Disulfidbrücke verbunden. Die Abbildung wurde modifiziert nach [222].

Plasminogen besitzt eine Lysin-Bindestelle mit hoher Affinität in Kringle-Domäne 1 ($K_d = 17 \mu\text{M}$) [223]. Über Kringle-Domäne 1 findet auch die Interaktion mit Fibrin statt [224]. Weitere Lysin-Bindestellen mit niedrigerer Affinität sind in Kringle 4 ($K_d = 36 \mu\text{M}$), Kringle 5 ($K_d = 94 \mu\text{M}$), Kringle 2 ($K_d = 401 \mu\text{M}$) und Kringle 3 ($K_d = 2,5 \text{ mM}$) lokalisiert [223, 225, 226]. Die merklich reduzierte Affinität der Lysin-Bindestelle in Kringle-Domäne 3 beruht auf einem positiv geladenen Aminosäure-Rest in Kringle 3, während die Aminosäuren-Reste der restlichen Kringle-Domänen an dieser Stelle negativ geladen sind [226]. Am C-Terminus des Moleküls befindet sich die Serinprotease Domäne [219, 227]. Die native Form von Plasminogen im humanen Serum hat einen Glutamin-Rest am N-Terminus und wird daher als Glu-Plasminogen bezeichnet. Glu-Plasminogen liegt in einer geschlossenen Konformation vor, welche durch Bindung an Lysin-Reste (z. B. bei Bindung an Fibrin) „gestreckt“ wird. Die physiologische Rolle dieser Konformationsänderung ist nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die geöffnete

Konformation von Glu-Plasminogen leichter zugänglich für Aktivatoren ist [228]. Die Anwesenheit von Anionen, besonders Chlorid-Anionen (Cl⁻) scheint dagegen die geschlossene Konformation von Glu-Plasminogen zu begünstigen [229]. In dieser Form ist Plasminogen nur schwer für Aktivatoren zugänglich [230]. Plasminogen wird durch proteolytische Spaltung von körpereigenen Aktivatoren wie Urokinase-typ Plasminogen-Aktivator (u-PA) und Tissue-typ Plasminogen-Aktivator (t-PA) zur Serinprotease Plasmin umgesetzt. Dabei kommt es zu einer Spaltung im Molekül, wodurch ein zweikettiges Molekül entsteht, welches durch zwei Disulfidbrücken verbunden ist [231, 232]. Der primäre, endogene Tissue-typ Plasminogen-Aktivator (t-PA) wird von vaskulären Endothelzellen synthetisiert und ins Blut sekretiert. Urokinase-typ Plasminogen-Aktivator (u-PA) wird in der Niere gebildet und ist neben t-PA ein weiterer endogener Plasminogen-Aktivator. Wie t-PA wird auch u-PA in einer inaktiven Form synthetisiert. Geringste Konzentration an Plasmin spalten die Aktivatoren, welche dann wiederum weitere Plasminogen-Moleküle zu Plasmin aktivieren [220, 224, 233]. Neben den endogenen Aktivatoren u-PA und t-PA gibt es exogene Aktivatoren von Plasminogen. Hierzu zählen auch bakterielle Aktivatoren, wie Staphylokinase von *S. aureus* und Streptokinase von Streptokokken der Gruppen A, C und G [234-236]. Plasmin hat ein vergleichsweise breites Wirkspektrum und degradiert neben dem natürlichen Substrat Fibrin(ogen) auch Komponenten der extrazellulären Matrix wie etwa Laminin [237], Fibronectin [238], Vitronectin [239, 240], Proteoglykane [241] sowie die inaktiven Vorstufen einer Reihe von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) [242].

1.5.2 Plasminogen und Komplement

Plasmin kann die Komplementkaskade auf mehreren Ebenen negativ regulieren. Bereits frühe Untersuchungen zeigten, dass Plasmin eine Reihe von Komplementkomponenten proteolytisch spalten kann, unter anderem C1, C2, C3 und C4 [243], sowie C3b und C5 [244]. Neben der Aktivierung des alternativen Weges kann Plasmin somit auch den klassischen und den Lektin-Weg inhibieren. Zudem kann die proteolytisch inaktive Vorstufe, Plasminogen,

den Abbau von C3b durch FI in der Gegenwart von FH verstärken [244]. Plasmin ist auch in der Lage inaktiviertes C3b (iC3b) zu degradieren. Das daraus resultierende C3dg-ähnliche Protein hat vergleichbare Eigenschaften wie C3dg, welches während der Komplementaktivierung durch die Spaltung von iC3b mittels FI und FH oder CR1 entsteht. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der Phagozytose-Aktivität und einer Zunahme der Produktion von pro-inflammatorischem IL-12 [245]. Dass Interaktionen zwischen Plasminogen und Komplement auch *in vivo* relevant sind, konnte kürzlich durch Versuche mit einem humanisierten Mausmodell gezeigt werden. Aktiviertes Plasminogen führt zu einer verringerten C3b Deposition und Phagozytose bei Gruppe A Streptokokken und geht mit einer höheren Überlebensrate einher [246]. Auch wenn Plasminogen kein Komplementregulator im traditionellen Sinne ist, gibt es doch eine Reihe von Überschneidungen zwischen fibrinolytischem System und Komplement. Viele humanpathogene Mikroorganismen sind in der Lage Plasminogen zu binden, wie z. B. *S. pneumoniae* [247, 248], *S. aureus* [249], *P. aeruginosa* [250], *H. influenzae* [251, 252], *Helicobacter pylori* [253], *C. albicans* [195, 197], *Leptospira interrogans* [254, 255] und *B. burgdorferi* [256-262].

1.5.3 Plasminogen-bindende „Moonlighting“-Proteine

Einige bakterielle Plasminogen-bindende Proteine fallen unter die Kategorie der so genannten „Moonlighting“-Proteine. Darunter versteht man multifunktionelle Proteine, welche mehrere, voneinander unabhängige Funktionen ausüben, ohne dass diese Funktionen in verschiedenen Domänen lokalisiert sind [263]. Beispielsweise konnten eine Reihe von intrazellulär lokalisierten Proteinen, welche Funktionen im bakteriellen Metabolismus ausüben, auf der Zelloberfläche von humanpathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden, wo sie als Plasminogen-bindende Proteine fungieren, etwa die Enolase von *S. pneumoniae* [264-266], *B. burgdorferi* [267-269], *Neisseria meningitidis* [270], oder *Bifidobacterium animalis* [271]. Auch andere glykolytische Enzyme konnten als Plasminogen-bindende Proteine identifiziert werden, beispielsweise die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase von

Bacillus anthracis [272]. Ein „Moonlighting“-Protein, welches bei vielen pathogenen Bakterien als Plasminogen-bindendes Protein fungieren kann, ist der Translations-Elongationsfaktor Tuf (EF-Tu). Dieser wurde u. a. bei *Mycobacterium tuberculosis* [273], *L. interrogans* [274], *P. aeruginosa* [275] und *S. pneumoniae* [248] auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Auch bei *A. baumannii* konnte Tuf auf der Zelloberfläche sowie in Vesikeln der äußeren Membran detektiert werden [276]. Die physiologische Relevanz solcher „Moonlighting“-Proteine ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nicht vollständig geklärt.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

A. baumannii ist ein opportunistischer Erreger und für bis zu 10% aller nosokomialen Infektionen durch Gram-negative Erreger verantwortlich [27]. Vor allem vor dem Hintergrund der Multiresistenz und dem Auftreten pan-resistenter Isolate stellt dieses Bakterium eine enorme Bedrohung bei intensivpflichtigen Patienten dar [83-85]. Kenntnisse über die vielfältigen Immunevasionmechanismen könnten zukünftig helfen, alternative Therapiestrategien zur Behandlung von *A. baumannii*-Infektionen zu entwickeln bzw. zu optimieren. Deshalb ist die Aufklärung solcher Mechanismen von großer Bedeutung, die es dem Erreger erlauben, das Immunsystem und besonders Komplement, als erste Barriere der Immunabwehr, zu umgehen.

Einige der für die Komplementresistenz determinierenden Faktoren konnten bereits entschlüsselt werden (Abschnitt 1.4). In vielen Fällen tragen diese zwar zum Schutz von *A. baumannii* vor Bakterizidie bei, allerdings wurde bisher kein Pathogenitätsfaktor identifiziert, der allein für die Komplementresistenz von *A. baumannii* verantwortlich ist. Ein bislang noch nicht untersuchter Mechanismus beruht auf der Bindung von humanem Plasminogen durch *A. baumannii*.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob *A. baumannii* grundsätzlich in der Lage ist, Plasminogen zu binden. Ziel dieser

Arbeit war außerdem die Identifizierung und Charakterisierung von Plasminogen-bindenden Proteinen, wobei der Schwerpunkt auf der Rolle der Interaktion von Plasminogen für die Komplementresistenz von *A. baumannii* lag.

Far-Westernblot-Analysen sowie ELISA mit verschiedenen *A. baumannii*-Isolaten sollten Aufschluss über das Bindungsverhalten gegenüber humanem Plasminogen liefern. Im Anschluss an die Identifizierung von Plasminogen-bindenden Proteinen von *A. baumannii*, mittels Massenspektrometrie, sollten potentielle Kandidaten zunächst in *E. coli* heterolog überproduziert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, um sie funktionell zu charakterisieren.

Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz der Plasminogen-Interaktionen sollten isogene Deletionsmutanten von *A. baumannii* generiert und anschließend auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, in humanem Serum zu überleben.

2 Material & Methoden

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 *Acinetobacter baumannii*

Die für diese Arbeit relevanten *A. baumannii*-Stämme sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4. *A. baumannii*-Stämme

Stamm	Biologische Herkunft	Referenz / Herkunft
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Urin	[16]
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	Leiste	[277]
<i>A. baumannii</i> 11CS	Hautabstrich	Klinisches Isolat
<i>A. baumannii</i> 15CS	Sputum	Klinisches Isolat
<i>A. baumannii</i> 17CS	Sputum	Klinisches Isolat
<i>A. baumannii</i> 25CS	Trachealsekret	Klinisches Isolat
<i>A. baumannii</i> 27CS	Sputum	Klinisches Isolat
<i>A. baumannii</i> V754948	Wundabstrich	[278, 279]

Die klinischen *A. baumannii*-Isolate 11CS, 15CS, 17CS, 25CS, 27CS und V754948 wurden freundlicherweise von Dr. Dr. Stephan Göttig, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Die beiden ATCC-Stämme 19606 und 17978 wurden freundlicherweise von PD Dr. Gottfried Wilharm, Robert Koch-Institut, Wernigerode, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 *Legionella pneumophila*

Das verwendete klinische *L. pneumophila* Isolat (aus Trachealsekret, Serotyp 1) stammt aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt.

2.1.3 *Escherichia coli*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5. *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Anbieter
DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>	[280]	Invitrogen
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR16</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F⁺</i> <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15]</i>	[281]	Promega

2.2 Humane Zellen und Kulturmedien

Für diese Arbeit verwendeten humanen Zellen und Kulturmedien sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6. Humane Zelllinie und zugehöriges Medium

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Anbieter
HUVEC	Humane Endothelzellen der Nabelvene (Human umbilical vein endothelial cells)	Endothelial Cell Growth Medium	Promocell, Nr. C-12200 sowie Nr. C-22010

2.3 Antikörper

Alle relevanten Antikörper sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab. 7. Genutzte primäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Monoklonal/ Polyklonal	Referenz/Quelle
anti-His ₆	Hexahistidin	Monoklonal	GE Healthcare, Nr. 27-4710-01
anti-C3	humanes C3	Polyklonal	Complement Technology, Nr. A213
anti-C5	humanes C5	Polyklonal	Complement Technology, Nr. A220
anti-FH	humanes FH	Polyklonal	Merck Millipore, Nr. 341276
anti-Plg	humanes Plasminogen	Polyklonal	Acris Antibodies, Nr. R1598
anti-Fg	humanes Fibrinogen	Polyklonal	Acris Antibodies, Nr. AP09017PU-N
anti-p41	p41	Monoklonal	Diese Arbeit
anti-p41	p41	Polyklonal	Diese Arbeit
anti-Tuf _{Sp}	Elongation Faktor Tuf von <i>S. pneumoniae</i>	Polyklonal	[248]

Monoklonale anti-p41 Antikörper sowie polyklonales anti-p41 Mausserum wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. Wallich, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Das polyklonale anti-Tuf_{Sp} Antiserum wurde von Prof. Dr. P.F. Zipfel, Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (Hans-Knöll-Institut), Jena, zur Verfügung gestellt.

Verwendete sekundäre Antikörper-Konjugate sind in Tab. 8 aufgelistet

Tab. 8. Sekundäre Antikörper-Konjugate

Bezeichnung	Antigen	Konjugat	Referenz/Quelle
α -Maus IgG	Maus IgG	Meerrettichperoxidase	Dako Cytomation, Nr. P0260
α -Ziege IgG	Ziege IgG	Meerrettichperoxidase	Dako Cytomation, Nr. P0449
α -Kaninchen IgG	Kaninchen IgG	Meerrettichperoxidase	Dako Cytomation, Nr. P0448
α -Ziege IgG	Ziege IgG	Phycoerythrin	R&D Systems, Nr. F0107
α -Kaninchen IgG	Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies, Nr. A-11008
α -Maus IgG	Maus IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies, Nr. A-11001

2.4 Proteine

Die für diese Arbeit relevanten Restriktionsendonukleasen sind in Tab. 9 zusammengestellt.

Tab. 9. Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Schnittstelle 5' → 3'	Hersteller	Bestellnummer
<i>Bam</i> HI	GGATCC	New England Biolabs	R0136S
<i>Dpn</i> I	G[A-CH ₃]TC	New England Biolabs	R0176S
<i>Hind</i> III	AAGCTT	New England Biolabs	R0104S
<i>Not</i> I	GCGGCCGC	New England Biolabs	R0189S
<i>Pst</i> I	CTGCAG	New England Biolabs	R0140S
<i>Sal</i> I	GTCGAC	New England Biolabs	R0138S

Sonstige, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Tab. 10. Sonstige Proteine

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen	10342-053
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs	M0491S
HiFi DNA-Polymerase	PCR Biosystems	PB10.41-02
Komplement C3	Complement Technology	A113
Komplement C3b	Calbiochem	204860
Komplement C5	Complement Technology	A120
Komplement C5b-6	Complement Technology	A122
Komplement C7	Complement Technology	A124
Komplement C8	Complement Technology	A125
Komplement C9	Complement Technology	A126
Faktor H	Complement Technology	A137
Faktor I	Complement Technology	A138
C4BP	Complement Technology	A109
Vitronektin	Sigma Aldrich	V8379
Glu-Plasminogen	Haematologic Technologies	HCPG-0130
Plasminogen- Fragmente	HKI Jena	-

Tab. 10. Sonstige Proteine, fortgesetzt.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Urokinase-typ Plasminogen-Aktivator	Millipore	CC4000
Fibrinogen	Sigma-Aldrich	F3879
Tuf _{sp}	HKI Jena	-
Bovines Serumalbumin	PAA	K41-001

Aufgereinigte Plasminogen-Fragmente sowie gereinigtes Tuf_{sp} wurden ebenfalls von Prof. Dr. P.F. Zipfel, Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (Hans-Knöll-Institut), Jena, zur Verfügung gestellt.

2.5 Reagenzienpackungen

Alle für diese Arbeit genutzten Reagenzienpackungen sind in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11. Übersicht verwendeter Reagenzienpackungen

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung amplifizierter DNA	Qiagen	28106
MinElute Reaction Cleanup Kit	Aufreinigung von DNA im Anschluss an enzymatische Reaktionen	Qiagen	28206
Quick Ligation Kit	Ligation von DNA-Fragmenten	New England Biolabs	M2200S

Tab. 11. Übersicht verwendeter Reagenzienpackungen, fortgesetzt.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
PureYield Plasmid Miniprep System	Isolierung von Plasmid-DNA	Promega	A1222
PureYield Plasmid Midiprep System	Isolierung von Plasmid-DNA	Promega	A2492
BCA Protein Assay	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	Pierce	23225
Reversible Protein Detection Kit	Reversibles Färben von Nitrocellulose- membranen	Sigma- Aldrich	R-PROB

2.6 Größenstandards

Die bei der Agarose-Gelelektrophorese und Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzten Größenstandards sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Tab. 12. Größenstandards

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
1kb DNA ladder	Größenstandards für	New England	N3232S
100bp DNA ladder	die Agarose- Gelelektrophorese	Biolabs	N3231S
Precision Plus Protein Standard Dual Color	Größenstandard für die SDS-PAGE	Bio-Rad	161/0374

2.7 Starteroligonukleotide & Basisvektoren

2.7.1 Starteroligonukleotide

In Tab. 13 sind alle Starteroligonukleotide (Sigma-Aldrich) mit ihrer jeweiligen Bezeichnung und Sequenzabfolge aufgelistet. Die für die *in vitro* Mutagenese von p41 eingesetzten Starteroligonukleotide wurden mittels HPLC aufgereinigt (Sigma-Aldrich).

Tab. 13. Bezeichnungen und Sequenzabfolgen der Starteroligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Verwendungszweck
i.) Generierung von Proteinen mit N-terminaler His ₆ -Sequenz		
FP Abau	CGTAAACGAGGAAGGGATCCATGGCTAAA	Herstellung von Tuf _{Ab} (HMPREF0010_03765)
TufB-Bam	GCCAAGTTTGAACG	
RP Abau	GAGACGTAATTCGTCACCTATATTAAGCTT	
TufB-Hind	ATGCAGTTACTTTAGC	
FP Leg TufB	GTTAACGAGGTTGGATCCATGGCGAAGGA AAAATTTGAACGTAAG	Herstellung von Tuf _{Lp} (YP_094371.1)
RP Leg TufB	TAATATTTTGATTGCTACTCAAGCTTTTT ATGCAGTTACTTTAGC	
Ab41s-BamHI	CCTTTTTCTTTGATGGGATCCCAAACAGT TACTAATACTCCTGCTCC	Herstellung von p41 (HMPREF0010_01565)
Ab41-Sall	CGGATTTTTTTAGTCGTCGACTTATTTTT TAGGCTTTTTAACGAG	
ii.) Generierung C-terminal verkürzter Konstrukte von p41 mit N-terminaler His ₆ -Sequenz		
p41-351(-)	CTACAACCATATCTAAGTCGACTTATTGG CTAGATTGATCTGCTGCAGG	Herstellung von p41 ₁₉₋₃₅₁
p41-290(-)	CTTCACGAACTTGCAAGTCGACTTATGGT GCAACACCCGTACAAG	Herstellung von p41 ₁₉₋₂₉₀
iii.) <i>In vitro</i> Mutagenese von p41-Proteinen mit N-terminaler His ₆ -Sequenz		
p41 K365A(+)	GTAGAACAAGAAGCTCGTTGCAAAGCCTAA AAAATAAGTC	Aminosäuresubstitution K365A
p41 K365A(-)	GACTTATTTTTTTAGGCTTTGCAACGAGTT CTTGTTCTAC	
p41 K366A(+)	GTAGAACAAGAAGCTCGTTAAAGCGCCTAA AAAATAAGTCGAC	Aminosäuresubstitution K366A
p41 K366A(-)	GTCGACTTATTTTTTTAGGCGCTTTAACGA GTTCTTGTTCTAC	
p41 K368A(+)	GAACTCGTTAAAAAGCCTGCAAAATAAGT CGACCTGCAG	Aminosäuresubstitution K368A
p41 K368A(-)	CTGCAGGTCGACTTATTTTTGCAGGCTTTT TAACGAGTTC	

Tab. 13. Bezeichnungen und Sequenzabfolgen der Starteroligonukleotide, fortgesetzt.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Verwendungszweck
K369A FWD K2	GCCTAAAGCATAAGTCGACCTGCAGCCAA GCTTAATTAGC	Aminosäuresubstitution K369A
K369A REV K2	GGTCGACTTATGCTTTAGGCTTTTTAACG AGTTCTTGTTTC	
K365A/K366A FWD A2	CGTTGCAGCGCCTAAAAAATAAGTCGACC TGCAGCCAAGC	Aminosäuresubstitution K365A/K366A
K365A/K366A REV A2	CGACTTATTTTTTAGGCGCTGCAACGAGT TCTTGTTCTAC	
p41 K368A/K369A(+)	GAACTCGTTAAAAAGCCTGCAGCATAAGT CGACCTGCAGCCAAGC	Aminosäuresubstitution K368A/K369A
p41 K368A/K369A(-)	GCTTGGCTGCAGGTCGACTTATGCTGCAG GCTTTTTAACGAGTTC	
K365689A FWD H3	GAACTCGTTGCAGCGCCTGCAGCATAAGT CGACCTGCAGCC	Aminosäuresubstitution K365A/K366A/K368A/K369A
K365689A REV H3	TGCTGCAGGCGCTGCAACGAGTTCTTGTT CTACAACCATATC	
iv.) Generierung einer isogenen Deletionsmutante des p41-kodierenden Gens		
p41 up fwd PstI	GCGACTGCAGCAAACCTCAGGTTATTGAAC TCCCAATGG	Amplifikation der stromaufwärts-Region des p41-kodierenden Gens (HMPREF0010_01565)
p41 up rev BamHI	GCGAGGATCCCGCCATCAAAGAAAAAGGT AATAACGC	
p41 down fwd BamHI	GAGAGGATCCGTTTTAGACTAAAAAATC CGATGC	Amplifikation der stromabwärts-Region des p41-kodierenden Gens (HMPREF0010_01565)
p41 down rev NotI	GACAGCGGCCCGGGATTTAATATTTTGC TGCTAAATG	
p41 control fwd	GCTCTTGTCTATCTTATGTCACAGATAGC C	Überprüfung der Deletion des p41-kodierenden Gens (HMPREF0010_01565)
p41 control rev	CTGGCTGTCCACCAGGAACACATTTATTT GC	
v.) Sonstige Starteroligonukleotide		
pQE-FP 30	CTGAGGTCATTACTGGATCTATC	Sequenzierung von pQE- Vektoren
pQE-RP	TTTGCTTTGTGAGCGGATAAC	

Eingefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

2.7.2 Basisvektoren

pQE-30 Xa

Zur rekombinanten Herstellung von Proteinen mit einer N-terminalen His₆-Sequenz wurde der 3,5 kBp große pQE-30 Xa Vektor von Qiagen eingesetzt. Selektionsmarker: Ampicillin-Resistenz (The QIAexpressionist™, Nr. 33203, Qiagen)

pBIISK_sacBkanR

Der 5,3 kbp große Vektor pBIISK_sacBkanR [282] wurde zur Generierung einer isogenen Deletionsmutante des p41-kodierenden Gens eingesetzt. Der Vektor wurde freundlicherweise von Julia Stahl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Averhoff, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt zur Verfügung gestellt.

2.7.3 Weitere Vektoren

Zur Herstellung von rekombinantem BBA70 mit einer N-terminalen His₆-Sequenz wurde Vektor pQE-A70 B31 [262] verwendet.

2.8 Humanserum

Das Blut freiwilliger Spender wurde gesammelt. Nach Abnahme (S-Monovette für Serum, Sarstedt) und Koagulation wurden die Blutproben auf Eis gelagert und im Anschluss bei 2000 × g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1,5 ml Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

Alle Spender wurden vor Blutentnahme hinreichend über mögliche Risiken aufgeklärt und mussten eine Einverständniserklärung unterschreiben. Das Studiendesign sowie die Probandeninformation wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt geprüft und es wurden keine Bedenken zur Durchführung der Studie geäußert (Geschäftsnummer 492/13).

2.9 Chemikalien, Geräte & Verbrauchsmaterialien

2.9.1 Chemikalien und andere Substanzen

Alle in Tab. 14 angegebenen Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad verwendet.

Tab. 14. Chemikalienliste

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
A		
Acrylamid	AppliChem	A1089
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
Aminomethyl- cyclohexancarbonsäure (Tranexamsäure)	Sigma-Aldrich	85,765-3
6-Aminohexansäure (ϵ -Aminocaprinsäure)	Fluka	07260
Ampicillin	Sigma-Aldrich	A9518
Aceton	Sigma-Aldrich	32201
Ammoniumperoxodisulfat	Roth	9592.2
Agar	BD	214010
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Roth	K035.1
B		
Bisacrylamid	AppliChem	A1096
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	B-5525
C		
Coomassie, Bio-Safe	Bio-Rad	131-0786
2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat (dCTP)	Roth	K038.1
E		
EDTA, Dinatrium Salz	J.T. Baker	1073
EGTA	AppliChem	A0878
Essigsäure, min. 99,8%	Sigma-Aldrich	33209
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich	24102
Ethidumbromid-Lösung, 1%	AppliChem	A1152
F		
Formaldehyd, 36,5% Lösung	Riedel-De-Haen	33220
G		
Gelatine, gepulvert	AppliChem	A1693

Tab. 14. Chemikalienliste, fortgesetzt.

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
D-(+)Glukose	Merck	1.08337
Glycerin	Roth	3783.2
Glycin	Roth	3908.2
Glutaraldehyde, 25% Lösung	AppliChem	A0589
2'-Desoxyguanosin-5'- Triphosphat (dGTP)	Roth	K037.1
H		
Hefe-Extract	BD	212750
I		
Imidazol	Fluka	56749
Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid	Roth	2316,3
K		
Kaliumchlorid	AppliChem	A2939
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem	A3095
Kalilauge	AppliChem	A2180
Kanamycin	Sigma-Aldrich	K1876
L		
Lysozym	Sigma-Aldrich	L6876
M		
Magermilchpulver	Heirler	-
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	1.05833
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem	A6287
β -Mercaptoethanol	AppliChem	A1108
N		
Natriumacetat	AppliChem	A1522
Natriumbromid	AppliChem	A2404
Natriumcarbonat	Roth	8563.1
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	31434
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem	A3590
Natriumhydroxyd	Riedel-De-Haen	30620

Tab. 14. Chemikalienliste, fortgesetzt.

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Natriumazid	Sigma-Aldrich	S8032
Natronlauge	J.T. Baker	7097
Ni-NTA-Agarose	Expedeon	ANN0025
O		
<i>ortho</i> -Phenylendiamin	Sigma-Aldrich	P5412
P		
Paraformaldehyd	AppliChem	A3813
PBS für Zellkultur	Gibco/Life Technologies	14190-169
Penicillin/Streptomycin Mix	Biochrom	A 2212
S		
D-(+)Sucrose	Roth	4621.1
Sodiumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich	L5750
Serva Blau G	Serva	35050
Silbernitrat	Sigma-Aldrich	209139
Schwefelsäure, konzentriert	Sigma-Aldrich	339741
Salzäure, 1M	J.T. Baker	7088
S-2251 (D-Val-Leu-Lys- <i>p</i> -nitroanilid dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich	V7127
T		
Tricin	AppliChem	A1085
Tris	AppliChem	A1086
Triton X-100	AppliChem	A1388
Triton X-114	AppliChem	A3848
Tween20	Roth	9127.1
Trypsin-EDTA	Gibco/Life Technologies	25300-054
Trypton	BD	211705
TEMED	Roth	2367.3

Tab. 14. Chemikalienliste, fortgesetzt.

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat (dTTP)	Roth	K036.1
W		
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich	8070.2

2.9.2 Geräteliste

Es folgt eine Auflistung aller für diese Arbeit relevanten Geräte.

Pipetten:

Modelle Reference, Research und ResearchPlus	Eppendorf
Verschiedene Modelle	Gilson

Beheizbare Magnetrührer:

IKAMAG RET	IKA
IKA-COMBIMAG-RCO	IKA

Waagen:

Analysewaage 822	Kern
Analysewaage 572	Kern
BP110S	Sartorius

pH-Meter:

pH-Meter 654	METROHM
--------------	---------

Mikroskope und Kameras:

Standard 25 mit Dunkelfeldkonsensor	Zeiss
Axiovert 40 CFL	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop AxioImager M2	Zeiss
Visitron Spot RT3	Visitron Systems

Schüttler:

Rockomat	Integra Bioscience
Schüttler KL2	E. Bühler
Vortexer VF2	IKA

Temperierbare Schüttler/Inkubatoren:

Wasserbad 1083	GFL
Thermomixer comfort	Eppendorf
Novotron HT	INFORS

Zentrifugen und Rotoren:

Multifuge X3 FR	Thermo Scientific
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann
Rotor Ti50	Beckmann
Modell 4502	Eppendorf
Modell 5702R	Eppendorf
Modell 5415D	Eppendorf

Brutschränke:

Brutschrank B 20	Thermo Scientific
Brutschrank BBD 6220	Thermo Scientific

Sterilwerkbank:

Herasafe HS12	Heraeus
---------------	---------

PCR Thermocycler:

Progene	Techne
TProfessional Basic Gradient	Biometra
T3000	Biometra

Spektrometer/ELISA-Reader:

Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
PowerWave HT	Bio-Tek Instruments
Nanophotometer Pearl	Implem

Ultraschallgerät mit Kühlung:

Sonifier B12 mit Becherresonator	Branson/Heinemann
Kühlungsgerät Multistar	Fryka

Dispersionsgeräte:

MICCRA D-9 Dispersionsgerät	Art Prozess- & Labortechnik
Desaga AS30 Mikrodispersionsgerät	Sarstedt

Dokumentationssysteme:

Geldokumentationssystem	Peqlab
Densitometer GS-710	Bio-Rad

Agarosegel Zubehör:

Netzgerät E443	Consort
Elektrophorese-Kammer Horizon11.14	Gibco-BRL
Gel-Kammer Gel Casting System11.14	Gibco-BRL

SDS-PAGE und Zubehör für den Transfer von Proteinen:

Netzgerät E835	Consort
Blotgeräte	LFT, Peqlab
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Sigma-Aldrich

Elektroporationssystem:

Gene Pulser II mit Pulse Controller Plus	Bio-Rad
--	---------

Durchflusszytometer:

FACSCalibur	BD
-------------	----

2.9.3 Software

Im Folgenden ist die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Software aufgelistet.

Gen5 1.11	Bio-Tek Instruments
Quantity One 4.2.1	Bio-Rad
Cell Quest Pro 6.0	BD Bioscience
Flowing Software 2.5.1	Perttu Terho
Clone Manager 8 Basic	Sci-Ed Software
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
CLC Sequence Viewer 7.6	Qiagen
Endnote X7.3	Thomson Reuters
VisiView 2.0.5	Visitron Systems
Photoshop CC 2014	Adobe Systems
PyMOL 1.3	Schrödinger K.K.
Clustal Omega 1.2.1	EMBL-EBI [283]

2.9.4 Spezielle Materialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten speziellen Materialien sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 15. Spezielle Materialien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
Fötales Kälberserum (FCS)	Supplementierung von Kulturmedium für humane Endothelzellen	Sigma-Aldrich	F2442
Mueller-Hinton Agarplatten	Kultivierung von <i>Acinetobacter</i>	Oxoid	PO5007A

Tab. 15. Spezielle Materialien, fortgesetzt.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
„Charcoal yeast extract“ Agarplatten	Kultivierung von <i>Legionella</i>	Oxoid	CM0655B
Protran BA 83 Nitrocellulose- membran	Membran für den Westernblot	Whatman	FB0727-1
Poly-Prep Chromatography Columns	Säulen für die Affinitätschromatographie	Bio-Rad	731-1550
Vivaspin 20 5000 MWCO PES	Ultrazentrifugationseinheiten zur Aufkonzentrierung von Proteinen in Lösung	Sartorius Stedim	VS2012
KOVA-Glasstic Slide 10 with grids	Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahlen von <i>Acinetobacter</i> und Erythrozyten	Hycor	87144E
Neubauer- zählkammer	Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahlen von humanen Zellen	Roth	T728.1
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Inhibition von Proteasen bei der Aufreinigung rekombinanter Proteine	Roche	04693116001
Gene Pulser Elektroporations- küvetten (2 mm Spalt)	Elektroporation von <i>A. baumannii</i> -Zellen	Bio-Rad	1652086
TMB Substrate recomBlot	Detektionslösung für Westernblot-Analysen	Mikrogen	10038
5x Washbuffer recomBlot	Wasch- und Verdünnungspuffer für Westernblot-Analysen	Mikrogen	10012

Tab. 15. Spezielle Materialien, fortgesetzt.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
F8 Maxisorp Mikrotiterplatten	Puffer und Verbrauchsmaterialien für den ELISA	Nunc	468667
BSA III Blocking Buffer		AppliChem	A7252
GVB ⁺⁺ Buffer	Puffer für den hämolytischen Assay (Klassischer Weg)	Complement Technology	B100
ThinCert Zellkultureinsatz für 24-well platten	Transwell Assay mit humanen Endothelzellen	Greiner Bio-One	662610

2.9.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS

(Phosphate buffered saline)

10 mM Na₂HPO₄
1 mM NaH₂PO₄
150 mM NaCl
ad 1 L Aqua dest.
pH-Wert auf 7,4 eingestellt

Der Puffer wurde autoklaviert.

TBS

(Tris buffered saline)

50 mM Tris
200 mM NaCl
ad 2 L Aqua dest.
pH-Wert auf 7,5 eingestellt

Der Puffer wurde autoklaviert.

2.10 Kultivierung von Mikroorganismen und humanen Zellen

2.10.1 Kultivierung von *A. baumannii*

A. baumannii wurde in „Lysogeny broth“-Medium (LB-Medium) bei 37 °C kultiviert [284]. Kulturen wurden entweder von Einzelkolonien auf LB-Agar bzw. Mueller-Hinton Agar oder aus tiefgefrorenen Stammkulturen (-80 °C) angeimpft.

LB-Medium

(Flüssigmedium und Agar)

10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

ad 1 L Aqua dest.

pH-Wert auf 7,2 eingestellt

Das Kulturmedium wurde autoklaviert.

2.10.2 Zellzahlbestimmung von *A. baumannii*

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden *Acinetobacter*-Zellen in einer Zählkammer (Kova GlassticSlide, Hycor Biomedical) im Dunkelfeldmikroskop ausgezählt.

2.10.3 Kultivierung von *L. pneumophila*

Tiefgefrorene Stammkulturen (-80 °C) von *L. pneumophila* wurden auf „Charcoal yeast extract“-Agar (CYE-Agar) ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

2.10.4 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden entweder von tiefgefrorenen Stammkulturen (-80 °C) oder von Einzelkolonien auf LB-Agarplatten (Abschnitt 2.10.1) angeimpft. Als

Flüssigmedium zur Kultivierung von *E. coli* diente „Yeast tryptone“-Medium (2x YT-Medium). Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

2x Yeast Tryptone (YT)

16 g Trypton
 10 g Hefe-Extrakt
 5 g NaCl
 ad 1 L Aqua dest.
 pH-Wert auf 7,5 eingestellt

Das Kulturmedium wurde autoklaviert.

2.10.5 Antibiotika

Zur selektiven Kultivierung von *E. coli* oder *A. baumannii* wurden Flüssigmedium oder Agarplatten mit den in Tab. 16 angegebenen Antibiotika supplementiert. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und bei -20 °C gelagert.

Tab. 16. Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Penicillin/	10000 U/	100 U/
Streptomycin	10 mg/ml	10 µg/ml

2.10.6 Kultivierung von humanen Endothelzellen (HUVEC)

Alle Arbeiten mit humanen Zellen erfolgten unter der Sterilwerkbank und mit auf 37 °C vorgewärmten Medien und Lösungen. Zellkulturflaschen und Transwell-Filtereinsätze wurden vor Benutzung für 1 h bei 37 °C mit 0,1% (w/v) Gelatine in Aqua bidest. beschichtet und danach einmal in PBS (ohne Ca²⁺ und

Mg²⁺) gewaschen, da HUVECs nur auf einer Kollagen-haltigen Matrix kultiviert werden können. Stammkulturen von humanen Zellen wurden in Flüssigstickstoff gelagert und wie unter 2.10.7 beschrieben aufgetaut.

Zum Ablösen adhärenter Zellen wurden diese zunächst mit 10 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen, um tote und nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Dann wurde mit 3 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% v/v) für 10 min inkubiert, wodurch extrazelluläre Adhäsine hydrolysiert wurden. Nach erfolgtem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium gestoppt. Zum weiteren Passagieren der Zellen wurde 10 ml frisches Kulturmedium mit 1-2 ml der abgelösten Suspension beimpft und bei 37 °C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 80-100% inkubiert. HUVECs wurden maximal bis Passage 8 für Versuche verwendet und für nachfolgende Versuche erneut aufgetaut. Als Grundmedium diente „Endothelial cell growth medium“ (Promocell). Zur Kultivierung und Passagierung von HUVECs wurde Grundmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), Supplemente Mix (Promocell) sowie einer Penicillin/Streptomycin Stammlösung versetzt (nachfolgend als Kulturmedium bezeichnet). Für Infektionsversuche wurden HUVECs in Aussaatmedium ausgesät, welches keine Antibiotika enthielt. Um einen Einfluss von FCS auf die Adhäsion von *A. baumannii* an HUVECs zu vermeiden, erfolgte die Infektion der humanen Zellen in Infektionsmedium, welches weder Antibiotika noch FCS enthielt. Die verwendeten Medien sind in Tab. 17 zusammengestellt.

Tab. 17. Verwendete Medien und Zusätze

Bezeichnung	Verwendung	Grundmedium	Zusätze
Kulturmedium	Kultivierung und Passagieren von Zellenlinien	Endothelial cell growth medium	Supplemente Mix, 10% FCS, Penicillin/ Streptomycin Mix
Aussaatmedium	Aussäen von Zellen	Endothelial cell growth medium	Supplemente Mix, 10% FCS
Infektionsmedium	Infektion von Zellen mit Bakterien	Endothelial cell growth medium	Supplemente Mix

2.10.7 Auftauen humaner Zellen aus Flüssigstickstoff

Zellen wurden aus Flüssigstickstoff direkt in Eis gegeben. Danach wurden sie im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurde die Stammkultur zurück in Eis gegeben und in ein Röhrchen mit 10 ml eisgekühltem Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden dann bei 500 × g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, um Reste des Einfriermediums zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml bei 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in eine zuvor mit 0,1% (w/v) Gelatine beschichtete Gewebekulturflasche mit 9 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.10.8 Ermittlung der Lebendzellzahl von humanen Zellen

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Trypanblau. Dieser Farbstoff dringt nur in abgestorbene oder geschädigte Zellen ein, wodurch sich diese von den ungefärbten, vitalen Zellen unterscheiden lassen. 20 µl Zellsuspension wurden mit 80 µl Trypanblau gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte standardmäßig mit *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen). Die in Tab. 18 (nachfolgende Seite) aufgelisteten Substanzen wurden aus Eis pipettiert.

Tab. 18. Pipettierschema für Standard-Reaktionsansätze

Substanz	Volumen [μl]
10x PCR-Puffer	10
50 mM MgCl ₂	5
2 mM dNTP Mix	10
Vorwärts-Starteroligonukleotid (100 μ M)	1
Rückwärts-Starteroligonukleotid (100 μ M)	1
Matrizen-DNA (~ 100 ng/ μ l)	0,5 – 1
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5
Aqua bidest. (nukleasefrei)	ad 100 μ l

Nach Zugabe der *Taq* DNA-Polymerase wurde die PCR unter den in Tab. 19 angegebenen Standardbedingungen durchgeführt.

Tab. 19. Reaktionsschema für die Standard-PCR

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initialer Schritt	95	5	Denaturierung
	95	0,5	Denaturierung
30 Zyklen	55	1	Anlagerung der Starteroligonukleotide
	72	1	Amplifikation
Terminaler Schritt	72	7	Amplifikation

Nach Reaktionsende wurden Amplifikate bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Weitere verwendete Polymerasen (Q5, HiFi) wurden entsprechend den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers eingesetzt.

2.11.2 Reinigung von amplifizierten DNA-Fragmenten

Um überschüssige Oligonukleotide und Reste von Proteinen aus den PCR-Reaktionen zu entfernen, wurden 90 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.11.3 Auftrennung von DNA in der Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte je nach Fragmentgröße in 0,8-2%igen Agarosegelen. Hierzu wurden 0,8-2 g (w/v) Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst und diese in die entsprechende Gießvorrichtung gegossen.

5 µl der zu analysierenden Proben wurden mit 5 µl TE-Puffer und 2 µl Beladungspuffer für die Agarose-Gelelektrophorese versetzt. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden folgende Größenstandards eingesetzt: 100 bp oder 1 kb DNA ladder (New England Biolabs). Hierbei wurden jeweils 1 µl Größenstandard mit 9 µl TE-Puffer und 2 µl Beladungspuffer versetzt.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 180 V Gleichstrom in 0,5x konzentriertem TAE-Puffer. Nach Auftrennung der DNA wurden die Agarosegele 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung eingetaucht, was die spätere Visualisierung der DNA unter UV-Licht ermöglichte. Nach kurzem Eintauchen des Agarosegels in ein Wasserbad erfolgte die Dokumentation unter UV-Bestrahlung mit dem Geldokumentationssystem Photoprint (Peqlab).

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0
für die Agarosegelelektrophorese	1 mM EDTA
	ad 1L Aqua dest.

Der Puffer wurde autoklaviert.

50x TAE-Puffer

für die Agarosegelelektrophorese

2 M Tris

1 M Essigsäure

100 mM EDTA

ad 1 L Aqua dest.

pH-Wert auf 8,1 eingestellt

Der Puffer wurde autoklaviert.

Beladungspuffer

für Agarose-Gelelektrophorese

0,25 g Bromphenolblau

40 g Sucrose

ad 100 ml Aqua bidest.

Ethidiumbromid-Lösung

200 µl einer 1%igen (w/v) Ethidiumbromid-Stammlösung wurden in 2 L Aqua dest. gelöst.

2.11.4 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Tab. 9) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 350 rpm für 2 h oder über Nacht. Pro µg zu hydrolysierender DNA wurden 1-2 U Enzym eingesetzt.

2.11.5 Aufreinigung von Restriktionsansätzen

Nach erfolgter Hydrolyse wurden Restriktionsansätze mit Hilfe des MinElute Reaction Cleanup Kits (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.11.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente in zuvor linearisierte Vektor-DNA zu ligieren, wurde das Quick Ligation Kit (New England Biolabs) verwendet. Nach Empfehlung des

Herstellern kamen auf einen 20 µl Ligationsansatz, 1 µl T4 Quick Ligase. Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Ligationsansätze wurden für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden nach dem in Tab. 20 angegebenen Schema pipettiert:

Tab. 20. Pipettierschema für die Ligation von DNA-Fragmenten

Substanz	Volumen [µl]
Linearisierte Vektor-DNA (~ 50 ng/µl)	1
Insert-DNA	X
2x Quick Ligation Reaction Buffer	10
Aqua bidest.	ad 20
T4 Quick DNA Ligase	1

2.11.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab mit dem PureYield Miniprep Kit und im größeren Maßstab mit Hilfe des PureYield Midiprep Kits (Promega) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Plasmid-DNA wurde dabei stets in Aqua bidest. eluiert und anschließend bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.11.8 Isolierung chromosomaler DNA aus *A. baumannii*

Isolierung chromosomaler DNA aus *A. baumannii* erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA mini Kits (Qiagen). Dabei wurden 5 ml einer ÜNK für die Isolierung chromosomaler DNA eingesetzt. Die Zellen wurden bei 5000 × g und 4 °C für 15 min sedimentiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 15000 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment in 180 µl ATL Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Matrix-gebundene, chromosomale DNA wurde schließlich in 100 µl Aqua bidest. eluiert.

2.11.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von PCR-Produkten sowie isolierter chromosomaler DNA und Plasmid-DNA wurde photometrisch mit dem Nanophotometer™ Pearl (Implen) ermittelt.

2.11.10 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

PCR-Produkte und Plasmid-DNA wurden von GATC Biotech (Konstanz) sequenziert.

2.12 Transformation von Bakterienzellen

2.12.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden entsprechend den Vorschriften des Herstellers mit der Hitze-Schock Methode transformiert. Aliquots kompetenter *E. coli*-Zellen wurden bei -80 °C gelagert und auf Eis aufgetaut. 2-4 µl Ligationsprodukt (2.11.6) wurde zu den Zellen pipettiert und das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 42 °C für 2 min. Die Zellen wurden danach weitere 30 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde pro Ansatz 1 ml 2x YT-Medium zugegeben und die Reaktionsansätze wurden weitere 1-3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf LB-Agarplatten, supplementiert mit entsprechenden Antibiotika, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.12.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen von *A. baumannii*

Die Herstellung elektrokompetenter *A. baumannii*-Zellen erfolgte nach der von Julia Stahl, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Averhoff, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt, etablierten Methode [282]. Hierbei wurde *A. baumannii* in 500 ml LB-Medium auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,45 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 × g und 4 °C für

15 min sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment viermal mit eiskaltem, sterilem Aqua bidest. und einmal mit eiskaltem, sterilen 10%igem Glycerin gewaschen. Die Zellen wurden dann in 625 µl (1/800 des Ausgangsvolumens) 10%igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots von je 50 µl bei -80 °C gelagert.

2.12.3 Transformation elektrokompetenter *A. baumannii*-Zellen

Die Transformation elektrokompetenter *A. baumannii*-Zellen erfolgte ebenfalls nach einer von Julia Stahl etablierten Methode [282]. Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,5-3 µg Plasmid-DNA (Konzentration > 0,3 µg/µl) versetzt. Nach Transfer der Bakteriensuspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm) erfolgte ein Elektroschock bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach erfolgtem Elektroschock wurden die Zellen mit 1 ml bei 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt, in 12 ml Röhrchen überführt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agar, supplementiert mit entsprechenden Antibiotika, ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium

für die Transformation von *A. baumannii*

2% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

Das Medium wurde sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße).

2.13 Proteinbiochemische Methoden

2.13.1 Tris/Tricin SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Puffer und Gelzusammensetzung der Tris/Tricin SDS-PAGE

Acrylamid-Lösung 240 g Acrylamid
7,5 g Bisacrylamid
ad 500 ml Aqua bidest.

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,45 μm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

3x Gelpuffer 3 M Tris/HCl pH 8,9
0,3% (w/v) SDS
ad 500 ml Aqua bidest.

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,45 μm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

Die Gelzusammensetzung für Sammel- und Trenngel der Tris/Tricin SDS-PAGE [285] ist in Tab. 21 zusammengefasst.

Tab. 21. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für Tris/Tricin Polyacrylamidgele

Komponente	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
Glycerin	-	3 g
Acrylamid-Lösung	1 ml	6 ml
3x Gelpuffer	3 ml	10 ml
Aqua bidest.	ad 12 ml	ad 30 ml
10% APS	90 μl	150 μl
TEMED	9 μl	15 μl

Zum Gießen der Gele wurde eine entsprechende Gelkammer mit Trenngel-Lösung befüllt und mit Aqua bidest. überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das überschüssige Aqua bidest. vorsichtig abgossen, die

Sammelgel-Lösung dazugegeben und ein entsprechender Kamm aufgesteckt. Auspolymerisierte Gele wurden maximal 14 Tage bei 4 °C gelagert.

Probenvorbereitung und Auftrennung

Proben wurden mit PBS auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und mit 4x konzentriertem Inkubationspuffer versetzt. Für Westernblot-Analysen wurden 15 µl Proteinstandard, für Silberfärbungen von Proteinen 1 µl Proteinstandard (Bio-Rad) eingesetzt. Dieser wurde ebenfalls mit PBS aufgefüllt und mit 4x konzentriertem Inkubationspuffer versetzt. Proben und Proteinstandard wurden für 5 min bei 95 °C und 400 rpm inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Proben und der Proteinstandard auf ein 10% Tris/Tricin-Gel appliziert. Die Proben wurden zunächst im Sammelgel bei 40 V für 2 h, anschließend im Trenngel bei einer Spannung von 65 V über Nacht aufgetrennt.

Anoden-Puffer für Tris/Tricin SDS-PAGE	100 mM Tris/HCl pH 8,9 ad 1 L Aqua dest.
Kathoden-Puffer für Tris/Tricin SDS-PAGE	100 mM Tris/HCl pH 8,25 100 mM Tricin 0,1% (w/v) SDS ad 1 L Aqua dest.
4x Inkubationspuffer für Tris/Tricin SDS-PAGE	150 mM Tris/HCl pH 7,0 30% (v/v) Glycerin 12% (w/v) SDS 0,03% (w/v) Servablau G 6% (v/v) β-Mercaptoethanol ad 10 ml Aqua bidest.

2.13.2 Transfer von aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)

Vier in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode der Blotapparatur aufgelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde ebenfalls in Anodenpuffer getränkt und aufgelegt. Das Gel wurde in Kathodenpuffer getränkt und auf die Nitrocellulosemembran appliziert, gefolgt von vier weiteren Filterpapieren, ebenfalls in Kathodenpuffer getränkt und luftblasenfrei aufgelegt. Die Blotapparatur wurde verschlossen und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 1 mA/cm². Im Anschluss wurde die Membran kurz in Aqua bidest. geschwenkt und mit dem „Reversible protein detection“ Kit (Sigma-Aldrich) angefärbt, um den erfolgreichen Transfer der Proteine zu bestätigen. Durch Inkubation mit 50 mM EDTA-Lösung wurde die Membran entfärbt.

Anodenpuffer für Westernblot	300 mM Tris/HCl pH 8,7 100 mM Tricin ad 1 L Aqua dest.
Kathodenpuffer für Westernblot	30 mM Tris/HCl pH 8,6 300 mM ε-Aminocaprinsäure ad 1 L Aqua dest
EDTA-Stammlösung	0,5 M EDTA ad 2 L Aqua dest. pH-Wert auf 8,0 eingestellt

2.13.3 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese durch 30 minütige Inkubation mit Fixierlösung im Gel fixiert. Im Anschluss wurde das Gel für 30 min mit Inkubationslösung, unter leichtem Schütteln, inkubiert. Nach drei fünfminütigen

Waschschritten mit Aqua dest. wurde das Gel 20 min, unter leichtem Schütteln, mit Silberlösung inkubiert. Nach zweimaligem Schwenken in Aqua dest. wurde das Gel unter Schütteln solange mit Entwicklerlösung inkubiert, bis Proteine visualisiert werden konnten. Durch Zugabe von Stopplösung wurde die Reaktion abgebrochen. Nach Anfärbung der Proteine wurden die Gele digitalisiert.

Fixierlösung

für Silberfärbung

100 ml Ethanol
25 ml Essigsäure
ad 250 ml Aqua bidest.

Inkubationslösung

für Silberfärbung

17 g Natriumacetat
0,5 g Natriumthiosulfat
75 ml Ethanol
1,25 ml Glutaraldehyd
(25%ige Lösung)
ad 250 ml Aqua bidest.

Silberlösung

für Silberfärbung

625 mg Silbernitrat
350 µl Formaldehyd
(37%ige Lösung)
ad 250 ml Aqua bidest.

Entwicklerlösung

für Silberfärbung

6,25 g Natriumcarbonat
175 µl Formaldehyd
(37%ige Lösung)
ad 250 ml Aqua bidest.

Stopplösung

für Silberfärbung

29,22 g EDTA
ad 2 L Aqua dest.

2.13.4 Produktion und Aufreinigung rekombinant hergestellter

Proteine aus *E. coli*-Zellen

250 ml 2x YT-Medium wurde mit den jeweiligen *E. coli*-Suspensionen auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,2 eingestellt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6 erreicht wurde. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 100 µl 0,5 M IPTG induziert und die Zellen wurden für 4 h bei 21 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 5000 × g und 4 °C für 20 min sedimentiert und die Zellsedimente bei -80 °C eingefroren.

Zum Aufschluss der *E. coli*-Zellen wurden die Zellsedimente nach Auftauen auf Eis in insgesamt 14,4 ml eiskaltem Lysispuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte der Zellaufschluss per Dispersionsgerät (MICCRA D-9, Art Prozess- & Labortechnik GmbH) für 30 s bei Stufe D-E. Zelltrümmer wurden nach Zellaufschluss durch Zentrifugation für 30 min bei 5000 × g und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße).

Das Zelllysate wurde mit 1 ml Ni-NTA-Agarose pro 10 ml Lysat versetzt und unter leichtem Schwenken bei 4 °C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 600 × g und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA-Agarose in 20 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol) resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die Agarose in 10 ml Waschpuffer aufgenommen, auf eine Chromatographiesäule appliziert und anschließend bei 4 °C gelagert bis der gesamte Flüssigkeitsanteil die Säulenmatrix passiert hatte. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 10 ml Waschpuffer. Die Elution der Proteine erfolgte bei steigender Imidazolkonzentration (50-300 mM Imidazol), wobei alle Fraktionen gesammelt wurden. Je 5 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit 15 µl PBS sowie 4x Inkubationspuffer versetzt und auf ein 10%iges Tris/Tricin-Polyacrylamidgel appliziert. Am Folgetag wurde durch eine Silberfärbung (2.13.3) die Reinheit der einzelnen Fraktionen überprüft. Fraktionen, welche das gewünschte Protein in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereinigt und in Ultrazentrifugationseinheiten bei 4500 × g und 4 °C aufkonzentriert. Um die Imidazol-Konzentration der Proben zu senken, wurde mit insgesamt dreimal

20 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen. Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	5 mM Imidazol
	1 mg/ml Lysozym
	ad 1 L Aqua bidest.
	pH-Wert auf 8,0 eingestellt

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

Imidazolpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄
zum Waschen und Eluieren	300 mM NaCl
	20-300 mM Imidazol
	1 Tablette Roche Complete
	Protease Inhibitor Cocktail
	ad 400 ml Aqua bidest.
	pH-Wert auf 8,0 eingestellt

Die Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

2.13.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das auf der Bicinchoninsäure-Reaktion basierende BCA Kit (Pierce) genutzt. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des mitgelieferten BSA Standards. Dabei wurden jeweils 25 µl Nullwert, Probe oder Standard mit 200 µl Reaktionslösung versetzt und anschließend wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch, wobei die Absorption bei 562 nm bestimmt wurde. Die Proteinkonzentration konnte anschließend anhand der Standardkurve errechnet werden.

2.13.6 Extraktion von Membranproteinen aus *A. baumannii*

Die Isolierung der Membranproteine von *A. baumannii* erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von Radolf et al. [286]. *A. baumannii* wurde bis zur späten logarithmischen Phase bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und zweimal in PBS gewaschen. 1×10^{10} Zellen wurden anschließend in 5 ml 2% (v/v) Triton X-114 in 5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert und das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde am Folgetag bei 50000 \times g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und schließlich für 1 h bei 25 °C und 50000 \times g zentrifugiert. Die hydrophile Phase wurde von der hydrophoben Phase getrennt. Die hydrophobe Phase wurde zweimal mit 20% (v/v) 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA gewaschen, mit Zentrifugation bei 20000 \times g und 25 °C für 5 min. Die Proteine wurden durch Zugabe des zehnfachen Volumens an eiskaltem Aceton ausgefällt. Die Ansätze wurden bei 12500 \times g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Schließlich wurden die gefällten Proteine in PBS aufgenommen. Die Konzentration konnte mittels Micro-BCA bestimmt werden und die entsprechenden Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

2.14 Immunologische Methoden

2.14.1 Westernblot- und Far-Westernblot-Analysen

Um Plasminogen-bindende Proteine von *A. baumannii* nachzuweisen bzw. die Bindung von Plasminogen an rekombinante Proteine zu untersuchen, wurde eine Far-Westernblot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2.13.2), freie Bindungsstellen auf der Membran durch 5% Magermilchpulver in Blockierungspuffer für 1 h bei RT geblockt, danach dreimal 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen und anschließend mit Plasminogen (20 μ g/ml in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit einer

1:1000 Verdünnung des anti-Plasminogen Antiserums in 1x RecombiBlot Waschpuffer (Mikrogen) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran schließlich mit einer 1:1000 Verdünnung des anti-Ziege-Meerrettichperoxidase Konjugates für 1 h inkubiert und danach erneut dreimal für 5 min gewaschen. Schließlich wurden Antigen-Antikörper-Komplexe mit TMB visualisiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das TMB dekantiert und die Membran mehrfach mit Aqua bidest. gewaschen. Die getrocknete Membran wurde mittels Densitometer digitalisiert.

Blockierungspuffer für Westernblot	0,1% (v/v) Tween20 ad 1 L TBS
Waschpuffer für Westernblot	0,2% (v/v) Tween20 ad 1 L TBS

2.14.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Rekombinant produzierte Proteine wurden auf eine Konzentration von 5 µg/ml in Immobilisierungspuffer verdünnt, jeweils 100 µl pro Kavität in Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) pipettiert und unter leichtem Schwenken bei 4 °C über Nacht immobilisiert. Am Folgetag wurde jede Kavität dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült. Freie Bindungsstellen wurden mit 200 µl Blockierungspuffer pro Kavität für 1 h bei RT blockiert. Nach Entfernen des Blockierungspuffers und dreimaligem Waschen wurden pro Kavität 100 µl des jeweiligen Liganden in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugegeben und die Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei RT inkubiert. Die Überstände wurden verworfen, und erneut jede Kavität dreimal mit Waschpuffer gewaschen. 100 µl des in PBS verdünnten primären Antikörpers (1:1000 in PBS verdünnt) wurden pro Vertiefung pipettiert und die Mikrotiterplatten für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl des sekundären Antikörpers (1:2000 in PBS verdünnt) pro Vertiefung pipettiert. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei RT wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und schließlich 100 µl

Substratlösung mit *o*-PD pro Kavität zugesetzt. Die Reaktion wurde nach Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Kavität beendet und die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen.

Für ELISA Versuche mit C-Terminal verkürzten p41-Konstrukten wurden äquimolare Mengen der Konstrukte, bezogen auf die molare Masse von unverkürztem p41 eingesetzt. Für die Versuche mit Plasminogen-Fragmenten wurden ebenfalls äquimolare Mengen an Fragmenten eingesetzt, bezogen auf die molekulare Masse des größten Fragments. Im Falle der Kompetitions-ELISA wurden die Liganden (die jeweiligen Komplementkomponenten zusammen mit Plasminogen) ebenfalls in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt.

Für Ganzzell-ELISA mit intakten Bakterienzellen wurde *A. baumannii* zunächst in LB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase bei 37 °C inkubiert und die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 × g und 4 °C für 15 min sedimentiert. Das Sediment wurde in PBS aufgenommen und die Zellzahl wie unter 2.10.2 beschrieben unter dem Dunkelfeldmikroskop bestimmt. Suspensionen von *A. baumannii* mit unterschiedlichen Zellzahlen wurden in PBS hergestellt. Jeweils 100 µl der Suspensionen wurden pro Kavität pipettiert und die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken immobilisiert. Der restliche Versuchsablauf erfolgte wie oben beschrieben.

Für Komplement-ELISA wurde mit 1 µg der gereinigten Komplementkomponenten C3, C3b oder C5 in PBS inkubiert. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindung diente Gelatine, da BSA ein zu hohes Hintergrundsignal aufwies.

Immobilisierungspuffer

50 mM Na₂CO₃
0,02% (w/v) Natriumazid
ad 500 ml Aqua bidest.
pH-Wert mit NaHCO₃
auf 9,6 einstellen

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße).

Blockierungspuffer

0,2% (w/v) Gelatine
ad 500 ml 1x PBS

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

Waschpuffer

0,05% (v/v) Tween20
ad 1 L 1x PBS

für ELISA

Substratpuffer

0,1 M KH_2PO_4
ad 1 L Aqua dest.
pH-Wert mit KOH
auf 6,0 eingestellt

Für die Detektion mit *ortho*-Phenylendiamin wurde eine 20 mg Tablette *o*-PD in 20 ml Substratpuffer gelöst und kurz vor Gebrauch 1 µl H_2O_2 pro ml Substratlösung zugesetzt.

Stopplösung

2,6 M H_2SO_4

für ELISA

ad 500 ml Aqua dest.

2.14.3 Zell-basierter hämolytischer Assay

Zur Untersuchung der potentiellen Komplement-inhibitorischen Aktivität von p41 auf den alternativen, klassischen und terminalen Weg wurden hämolytische Assays durchgeführt.

2.14.3.1 Alternativer Weg

Der hämolytische Assay zum alternativen Weg basiert darauf, dass Kaninchenerthrozyten durch aktiviertes Komplement lysiert werden. Das bei der Lyse frei werdende Hämoglobin kann nach Sedimentierung der Erythrozyten photometrisch gemessen werden. Wenn p41 in der Lage ist, die

Erythrozyten vor Komplement-vermittelter Lyse zu schützen, sollte eine verringerte Freisetzung von Hämoglobin erfolgen. Zur Verlängerung der Haltbarkeit wurde frisch entnommenes Kaninchenblut (S-Monovette, 3 ml, 9NC, Sarstedt) 1:1 mit Alsevers-Lösung versetzt und bei 4 °C gelagert.

Um freies Hämoglobin zu entfernen wurde zunächst eine Erythrozytensuspension bei 900 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 12 ml Mg-EGTA Puffer resuspendiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde die Zellzahl der Erythrozyten bestimmt und eine Suspension von 2 × 10⁸ Zellen/ml hergestellt. Unterschiedliche Mengen der zu testenden Proteine wurden anschließend in einem Gesamtvolumen von 100 µl Mg-EGTA Puffer mit 7.5% (v/v) NHS[†] versetzt und für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Erythrozytensuspension zugesetzt und die Reaktionsansätze wurden für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden dann für 5 min bei 900 × g zentrifugiert, die Überstände vorsichtig abgenommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Absorption bei 414 nm bestimmt.

†) 7.5% (v/v) bezieht sich auf das Endvolumen der Reaktionsansätze von 150 µl. Diese Angabe wurde zuvor durch Titration des Serums experimentell ermittelt. Dabei wurde eine Serumkonzentration gewählt, die bei der eingesetzten Menge an Erythrozyten eine Absorption bei 414 nm von etwa 1,0 ergab.

Mg-EGTA Puffer

für den Zell-basierten hämolytischen Assay

20 mM HEPES

144 mM NaCl

7 mM MgCl₂

10 mM EGTA

ad 1 L Aqua dest.

pH-Wert auf 7,4 eingestellt

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße).

2.14.3.2 Klassischer Weg

Für den klassischen Weg wurden Schaferythrozyten eingesetzt, welche humanes Komplement nicht aktivieren können. Diese wurden dreimal in GVB⁺⁺-Puffer gewaschen um freies Hämoglobin zu entfernen. Im Anschluss wurde die Erythrozytensuspension mit Ambozeptor (Siemens Healthcare) inkubiert (1:3000). Diese sensibilisierten Erythrozyten aktivieren spezifisch den klassischen Weg des humanen Komplementsystems. Es folgten drei weitere Waschschriffe, um nicht gebundenen Ambozeptor aus der Suspension zu entfernen. Schließlich wurde die Zellzahl der Erythrozyten ermittelt und die Suspension auf 2×10^8 Zellen/ml eingestellt. Unterschiedliche Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine wurden mit 50 μ l einer 1:30 Verdünnung[‡] von NHS in einem Gesamtvolumen von 120 μ l GVB⁺⁺-Puffer, für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden 30 μ l der sensibilisierten Erythrozytensuspension hinzugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden für 5 min bei 900 \times g zentrifugiert und die Überstände vorsichtig in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption der Überstände bei 414 nm wurde anschließend photometrisch ermittelt.

‡) Diese Angabe wurde zuvor durch Titration experimentell ermittelt. 50 μ l der 1:30 Verdünnung ergaben dabei eine Absorption bei 414 nm von etwa 1,0.

2.14.3.3 Terminaler Weg

Schaferythrozyten wurden dreimal in GVB⁺⁺-Puffer gewaschen um freies Hämoglobin zu entfernen. Nach Ermittlung der Zellzahl wurde die Erythrozytensuspension auf 5×10^8 Zellen/ml eingestellt. Unterschiedliche Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine wurden mit gereinigten Komplementkomponenten C7 (2 μ g/ml), C8 (0,4 μ g/ml) und C9 (2 μ g/ml) für 5 min bei RT vorinkubiert. Parallel wurden 30 μ l der Erythrozytensuspension mit C5b-6 (1,5 μ g/ml) für 10 min bei RT vorinkubiert. Im Anschluss wurden die mit den zu untersuchenden Proteinen vorbehandelten Komplementkomponenten zu den C5b-6 behandelten Erythrozyten gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden dann für 5 min bei 900 \times g zentrifugiert und die Überstände vorsichtig in eine

Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption der Überstände bei 414 nm wurde schließlich photometrisch ermittelt.

Schaferythrocyten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Kirschfink, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Kaninchenerthrocyten zur Untersuchung des alternativen Weges stellte freundlicherweise Dr. Alf Theisen, Zentrale Forschungseinrichtung (ZFE) des Universitätsklinikums Frankfurt zur Verfügung.

2.14.4 Zellzahlbestimmung von Erythrozyten

Die Zellzahlbestimmung von Erythrozyten erfolgte analog zu dem in Abschnitt 2.10.2 beschriebenen Ablauf für *A. baumannii*. Die Erythrozyten wurden zunächst in PBS verdünnt. Dann wurden 10 µl der verdünnten Erythrozytensuspensionen in eine Zählkammer überführt und mindestens 9 Felder im Dunkelfeldmikroskop ausgezählt.

2.15 Immunhistochemische Methoden

2.15.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

2.15.1.1 Untersuchung der Bindung von Plasminogen an *A. baumannii*

A. baumannii-Zellen wurde in LB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase angezchtet. Die Zellen wurden sedimentiert (5000 × g, 15 min, 4 °C). Das Sediment wurde einmal in PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in PBS aufgenommen. Die optische Dichte der Suspension wurde auf 0,8 eingestellt und Volumina entsprechend 5×10^8 Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden sedimentiert (20000 × g, 5 min, 4 °C), in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei RT für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 100 µg/ml Plasminogen wurden die Reaktionsansätze für 1 h bei RT inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Plasminogen. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (20000 × g, 5 min, 4 °C). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit einem polyklonalen anti-

Plasminogen Antiserum (1:500 in FACS-Puffer) für 1 h bei RT inkubiert. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne Antiserum inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS. Die Sedimente wurden jeweils in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit einem anti-Ziege-Phycoerythrin-Konjugat (1:25) für 30 min bei RT unter Lichtauschluss inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Sedimente konnte nun in 3,75% (w/v) PFA in PBS aufgenommen und zur Fixierung für 15 min bei 4 °C inkubiert werden. Nach zwei weiteren Waschschriffen wurden die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen (50000 Zellen pro Versuchsansatz).

2.15.1.2 Nachweis von Plasminogen-bindenden Proteinen auf der Zelloberfläche von *A. baumannii*

Diese Untersuchungen erfolgten analog zu dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Versuch, allerdings wurden die *A. baumannii*-Zellen nicht mit einem Liganden, sondern nach Inkubation mit FACS-Puffer zum Absättigen freier Bindungsstellen, direkt mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Tuf_{sp} Antiserum (1:10 in FACS-Puffer) bzw. mit einem polyklonalen Maus anti-p41 Antiserum (1:25 in FACS-Puffer) für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit PBS wurde dann mit den entsprechenden sekundären, Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpern (1:20 in FACS-Puffer) für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden schließlich dreimal mit PBS gewaschen und nach Fixierung mit PFA und weiteren Waschschriffen in 2 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

FACS-Puffer

1% BSA (w/v)

ad 100 ml PBS

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

2.15.2 Immunfluoreszenz-Test mit *Acinetobacter*-Zellen

A. baumannii wurde in LB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase angezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5000 × g, 15 min, 4 °C) und einmal in PBS gewaschen. Die optische Dichte (OD₆₀₀) der Zellsuspension wurde auf 0,8 eingestellt und ausgehend von dieser Suspension wurden serielle Verdünnungen in PBS hergestellt. Jeweils 10 µl der Zellsuspension sowie der Verdünnungen wurden auf vorbereitete Objektträger pipettiert und diese über Nacht an der Luft getrocknet. Zur Fixierung wurden die Objektträger für 10 min in Methanol getaucht und anschließend 1 h an der Luft getrocknet. Danach wurden freie Bindungsstellen durch 30 min Inkubation mit PBS/0,2% (w/v) BSA in einer feuchten Kammer bei 33 °C blockiert. Die Objektträger wurden dreimal 5 min in PBS gewaschen und mit einem polyklonalen anti-p41 Antiserum (1:100 in PBS/0,2% BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei 33 °C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal 5 min in PBS gewaschen und mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus Antikörper (1:1000 in PBS/0,2% BSA) in einer feuchten Kammer, bei 33 °C unter Lichtausschluss, inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger erneut dreimal 5 min in PBS gewaschen, mit ProLong Gold antifade reagent DAPI (Life Technologies) überschichtet und mit Deckgläsern versiegelt. Die fluoreszenzbasierte Auswertung erfolgte mit einem Zeiss AxioImager M2 mit einer Spot RT3 Kamera (Visitron Systems).

2.16 Spezielle Methoden

2.16.1 Bindung von Plasminogen an vitale *A. baumannii*-Zellen

Zum Nachweis der Bindung von Plasminogen an vitale *A. baumannii*-Zellen wurden diese bei 37 °C unter Schütteln bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und durch Zentrifugation bei 5000 × g für 15 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde wie unter 2.10.2 beschrieben bestimmt. 2×10^9 Zellen wurden durch Zentrifugation (20000 × g, 15 min, 4 °C) sedimentiert und in 1 ml PBS mit Plasminogen (20 µg/ml) resuspendiert. Die

Zellen wurden für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert, anschließend viermal mit je 1 ml PBSAT gewaschen und durch Zentrifugation bei 20000 × g und 4 °C für 5 min sedimentiert. Die vierte Waschfraktion wurde auf Eis gelagert. Das Zellsediment wurde nachfolgend in 1 ml 0,1 M Glycin (pH 2,0) resuspendiert und für 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert, um die an die Zelloberfläche gebundenen Proteine abzulösen. Die Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand mit 80 µl 1 M Tris (pH 9,0) versetzt und nochmals für 15 min bei 20000 × g und 4 °C zentrifugiert, um alle Zellreste zu entfernen. Die vierte Waschfraktion sowie die Eluatfraktion wurden in Ultrazentrifugationseinheiten bei 5000 × g und 4 °C auf ein Volumen von etwa 100 µl aufkonzentriert. Jeweils 30 µl wurden mit 4x Inkubationspuffer versetzt und auf ein Tris/Tricin SDS-Polyacrylamidgel appliziert. Nach Auftrennung der Proteine und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde gebundenes Plasminogen mittels Westernblot-Analyse, wie unter 2.14.1 beschrieben, nachgewiesen.

PBSAT

1,35 M NaCl

30 mM Phosphatpuffer (pH 7,2)

0,02% (w/v) Natriumazid

0,05% (v/v) Tween20

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße).

2.16.2 Lokalisation des Bindungsepitops von monoklonalen anti-p41**Antikörpern**

Zur Eingrenzung des Bindungsepitops der gegen p41 gerichteten monoklonalen Antikörper wurden BSA, p41 sowie die C-terminal verkürzten Konstrukte von p41 per Mikrodistributionsverfahren mit der Desaga AS30 Sprühapparat auf eine Nitrocellulosemembran appliziert. Zunächst wurde das Gerät viermal mit 70% Ethanol gereinigt. Danach folgten vier Waschschrte mit PBS. Die Proteine wurden nacheinander auf die Nitrocellulosemembran gesprüht, wobei die Apparatur zwischen den einzelnen Probenapplikationen jeweils viermal mit PBS gespült wurde. Nach Beendigung des Sprühvorgangs

wurde die Membran über Nacht getrocknet. Am Folgetag wurde die Membran in 5 mm breite Streifen geschnitten. Die Konzentration der Proteine war beim Aufsprühen so gewählt worden, dass sich 250 ng der jeweiligen Proteine auf den 5 mm breiten Streifen befanden. Die Streifen wurden kurz in Aqua bidest. geschwenkt und freie Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver in Blockierungs-Puffer (für Westernblot) für 1 h abgesättigt. Die Streifen wurden anschließend dreimal 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen, bevor sie mit den verschiedenen monoklonalen Antikörper (1:10 verdünnt in 1x konzentriertem RecomBlot Waschpuffer (Mikrogen)) für 1 h bei RT inkubiert wurden. Nach drei Waschsritten mit Waschpuffer (für Westernblot) wurden die Streifen mit einem anti-Maus-Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:1000) für 1 h inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte, bevor Antikörper-Antigen-Komplexe durch TMB visualisiert wurden. Die Reaktionen wurden durch mehrfaches Waschen der Streifen mit Aqua bidest. abgestoppt und die Streifen nach Trocknung per Densitometer digitalisiert.

2.16.3 Plasminogen-Aktivierungs-Assay

Dieser Versuch diente dazu, zu überprüfen, ob an gereinigte Proteine gebundenes Plasminogen durch den Plasminogen Aktivator u-PA zu Plasmin aktiviert werden kann. Der Test basiert auf einem chromogenen Substrat, D-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilid dihydrochlorid (S-2251), welches durch aktives Plasmin gespalten wird. Dadurch tritt eine Farbänderung auf, welche photometrisch bei 405 nm verfolgt werden kann. Pro Kavität wurden 100 µl der zu untersuchenden Proteine in einer Konzentration von 5 µg/ml auf Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Am Folgetag wurde jede Kavität dreifach mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und für 2 h bei RT mit Blockierungspuffer blockiert. Nach dreimaligem Waschen wurde in jede Vertiefung 100 µl Plasminogen (10 µg/ml) in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle diente 50 mM Tris/HCl ohne Plasminogen sowie Plasminogen mit 50 mM Tranexamsäure (inhibiert die Bindung von Plasminogen). Nach Inkubation wurde jede Kavität dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden 96 µl

Reaktionslösung zugesetzt und schließlich 4 µl des Plasminogen Aktivators u-PA (2,5 µg/ml). Die Mikrotiterplatte wurde nun bei RT inkubiert und über einen Zeitraum von 18 h erfolgte alle 30 min die Ermittlung der Absorption bei 405 nm.

Substratpuffer	0,32 M Tris/HCl pH 7,5
für den Plasminogen-Aktivierungs-Assay	1,77 M NaCl
	ad 200 ml Aqua bidest.

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Reaktionslösung	Pro Reaktionsansatz
für den Plasminogen-Aktivierungs-Assay	werden 96 µl benötigt:
	6 µl S-2251 (5 mg/ml)
	18 µl Substratpuffer
	6 µl Aqua bidest.
	30 µl 0,01% Triton X-100
	36 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,5

2.16.4 Fibrinogen-Degradation-Assay

Fibrinogen ist das natürliche, physiologische Substrat von Plasmin. Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob an gereinigte Proteine gebundenes, aktives Plasmin in der Lage ist, Fibrinogen zu spalten. 100 µl der Proteine (5 µg/ml) wurden über Nacht bei 4 °C in Immobilisierungspuffer auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Am folgenden Tag wurde jede Kavität dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen, bevor freie Bindungsstellen mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT abgesättigt wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Platte mit 10 µg/ml Plasminogen (in 50 mM Tris/HCl pH 7,5) für 1 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Reaktionsansätze ohne Plasminogen sowie mit Plasminogen und 50 mM des Inhibitors Tranexamsäure. Nach Inkubation folgten drei weitere Waschschriffe. Im Anschluss wurden jeder Kavität 93,5 µl Fibrinogen in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 in einer Konzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Durch Zugabe von 6,5 µl u-PA (2,5 µg/ml) wurde die Reaktion initialisiert. Einzelne Reaktionen wurden zu unterschiedlichen

Zeitpunkten durch die Zugabe von 4x konzentriertem Inkubationspuffer für die Tris/Tricin SDS-PAGE abgestoppt. Aliquots von 30 µl wurden entnommen, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein Tris/Tricin SDS-Polyacrylamidgel appliziert. Nach Separation der Proben wurden die Proteine wie unter 2.13.2 beschrieben, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mittels Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-Fibrinogen Antiserum (1:1000) und einem anti-Ziege IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:1000) konnten Fibrinogen sowie die betreffenden Degradationsprodukte visualisiert werden.

2.16.5 Degradation von Komplement C3b durch aktiviertes Plasminogen

Die Untersuchung der Degradation von Komplement C3b durch an gereinigte Proteine gebundenes Plasmin wurde analog zu dem zuvor beschriebenen Versuch zur Degradation von Fibrinogen durchgeführt (2.16.4). Anstelle von Fibrinogen wurde jedoch 20 µg/ml C3b als Substrat eingesetzt. Bei der anschließenden Westernblot-Analyse (2.14.1) wurde mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum (1:1000) inkubiert, gefolgt von einem anti-Ziege IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:1000). Der Reaktion wurde TMB hinzugesetzt, um C3b bzw. C3b Degradationsprodukte zu detektieren.

2.16.6 Protease-Assay

Diese Untersuchung diene dem indirekten Nachweis von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii*. Zunächst wurden *A. baumannii*-Zellen in LB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase angezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 × g, 4 °C, 15 min) sedimentiert und das Sediment wurde in PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Sediment in PBS aufgenommen und die optische Dichte der Suspension auf 0,8 eingestellt. Volumina entsprechend 2×10^8 Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 20000 × g und 4 °C für 5 min sedimentiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden die Zellsedimente in 100 µl PBS resuspendiert und mit

steigenden Konzentrationen (0-100 µg/ml) Trypsin oder Proteinase K für 2 h unter leichtem Schütteln bei 24 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden jeweils 5 µl PMSF (50 mg/ml in Isopropanol), 5 µl AEBSF (100 mg/ml in Aqua bidest.) sowie 5 µl Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Anschließend wurden die *A. baumannii*-Zellen durch Zentrifugation bei 20000 × g und 4 °C für 5 min sedimentiert und die Sedimente in 500 µl PBS aufgenommen. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellsedimente in 40 µl PBS aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dabei wurde insgesamt 5 mal 20 s auf Stufe 6 beschallt, mit jeweils 20 s Pause zwischen den einzelnen Beschallungsgängen. Nach Zellaufschluss wurden den Proben 4x konzentrierter Inkubationspuffer für die Tris/Tricin SDS-PAGE zugesetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein Tris/Tricin SDS-Polyacrylamidgel appliziert. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mit einer Far-Westernblot-Analyse (2.14.1) wurde im Anschluss die Bindung von Plasminogen untersucht und mit einer Westernblot-Analyse die Integrität des p41-Proteins.

2.16.7 Kofaktor-Assay

Mit Hilfe des Kofaktor-Assays wurde untersucht, ob an gereinigte Tuf-Proteine gebundener FH seine Kofaktor-Aktivität beibehält. Gereinigte Tuf-Proteine (10 µg/ml) oder BSA (Negativkontrolle) wurden auf Mikrotiterplatten über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen wurde mit FH (20 µg/ml) für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrritte, wonach ein Reaktionsmix bestehend aus C3b (20 µg/ml) und FI (5 µg/ml) in PBS zugesetzt wurde. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze ohne FI. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 37 °C für 1 h, wonach Reaktionsansätze durch Zugabe von 4x Inkubationspuffer für die SDS-PAGE terminiert wurden. Die Proben wurden auf ein Tris/Tricin SDS-Polyacrylamidgel appliziert. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. C3b-Spaltprodukte wurden mittels Westernblot-Analyse (2.14.1) mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum (1:1000) detektiert.

2.16.8 Serumresistenz-Test

Um *A. baumannii* auf seine Resistenz gegenüber humanem Serum hin zu untersuchen, wurden Zellen zunächst in LB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000 × g für 15 min wurden die Zellen sedimentiert. Das Sediment wurde in PBS aufgenommen und wiederholt zentrifugiert, um alle Mediumbestandteile zu entfernen. Die optische Dichte (OD₆₀₀) der Kulturen wurde dann mit PBS auf 0,8 eingestellt und Volumina, welche einer Zellzahl von 5 × 10⁷ Zellen entsprachen, wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 20000 × g für 5 min wurden die Überstände vorsichtig entfernt und die Sedimente in jeweils 250 µl NHS bzw. verschiedenen NHS-Verdünnungen (0-100% (v/v) in PBS) aufgenommen. Die Reaktionsansätze wurden nun für 2 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden von allen Reaktionsansätzen serielle Verdünnungen in PBS hergestellt, die Verdünnungen auf Mueller-Hinton Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der LZZ durch Auszählung der Kolonien.

2.16.9 Transmigrations-Assay

Dieser Versuch sollte zeigen, ob Plasminogen und u-PA behandelte *A. baumannii*-Zellen effizienter durch einen Monolayer von HUVEC Endothelzellen transmigrieren, als unbehandelte Zellen. Hierzu wurden 2,5 × 10⁵ HUVEC Zellen in einem zuvor für 1 h bei 37 °C mit 0,1% (w/v) Gelatine behandelten Transwell-Einsatz (Greiner Bio-One) in Aussaatmedium ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert (gewöhnlich bis zu 2 Tage). *A. baumannii* (ATCC 19606 Wildtyp und Δ*p41* Mutante) wurden bis zur späten logarithmischen Phase angezüchtet und durch Zentrifugation 15 min bei 5000 × g und RT sedimentiert. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) der Bakterienzellen mit PBS auf 0,8 eingestellt. Volumina, die einer Zellzahl von 2,5 × 10⁷ entsprechen (MOI von 100) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 20000 × g und RT für 5 min zentrifugiert, die Überstände

verworfen und die Zellsedimente in jeweils 100 µl PBS mit 100 µg/ml Plasminogen resuspendiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 20000 × g sedimentiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS. Anschließend wurden die *Acinetobacter*-Zellen in 93,5 µl PBS resuspendiert, 6,5 µl u-PA (2,5 µg/ml) wurde zugesetzt und die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit PBS wurden die *A. baumannii*-Zellen in 300 µl Infektionsmedium resuspendiert. Die HUVEC Zellen wurden vorsichtig dreifach mit auf 37 °C vorgewärmtem Infektionsmedium gewaschen, anschließend mit den Plasmin-behandelten *A. baumannii*-Zellen infiziert und für 2 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Das Zellkulturmedium in den unteren Teilen der Transwell-Kammern wurde nun abgenommen und in PBS seriell verdünnt. Die Verdünnungen wurden auf Mueller-Hinton Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Lebendzellzahlen durch Auszählen der Kolonien ermittelt. Die Transwell-Einsätze mit den HUVEC Zellen wurden nach dem Infektionsversuch dreifach mit PBS gewaschen und mit 3,75% (w/v) PFA in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Einsätze bei 4 °C gelagert, um diese retrospektiv durch Immunfluoreszenzmikroskopie auf Konfluenz der HUVEC-Zellen hin zu überprüfen.

Parallel wurden die *A. baumannii*-Zellen auf Bindung von Plasminogen und Aktivierung zu Plasmin untersucht. Nach erfolgter Inkubation von *A. baumannii*-Zellen mit Plasminogen und u-PA, wurde jeweils ein Ansatz in 30 µl PBS, anstelle von 300 µl Infektionsmedium resuspendiert. Diese Proben wurden zunächst auf Eis gelagert und schließlich mittels Ultraschall, wie unter Kapitel 2.16.6 beschrieben, aufgeschlossen. Plasminogen bzw. Plasmin wurde mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum in der Westernblot-Analyse detektiert (Abschnitt 2.14.1).

2.16.10 Immunfluoreszenzmikroskopie von adhätierenden HUVEC-

Zellen

Nach erfolgtem Transmigrations-Assay wurde die Membran der Transwell-Einsätze mit den darauf adhätierenden HUVEC-Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt, um die Konfluenz der Zellen zu untersuchen [287]. Nach Lagerung der Einsätze wurde PBS vorsichtig entfernt und die Transwell-Einsätze wurden mit Permeabilisierungs-/Blockierungspuffer für 45 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Einsätze mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (1:500 verdünnt in Inkubationspuffer) für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert, welches spezifisch an F-Aktin bindet. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome fanden die nachfolgenden Schritte ebenfalls unter Ausschluß von Licht statt. Die Einsätze wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit einer DAPI-Lösung (1 µg/ml in PBS) für 10 min bei 4 °C inkubiert, um die DNA zu färben. Schließlich wurden die Transwell-Einsätze wiederholt dreimal mit PBS gewaschen, das PBS entfernt und die Membran wurde vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Einsatz ausgeschnitten. Ein Tropfen Fluoprep wurde auf einen Objektträger pipettiert, die Membran darauf positioniert und mit einem Deckglas fixiert, sodass sich die Membran mit den HUVEC Zellen zwischen Objektträger und Deckglas befand. Die Präparate konnten nun fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

Permeabilisierungs-/

1% (w/v) BSA

Blockierungspuffer

0,5% (v/v) Triton X-100

ad 100 ml PBS

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert

Inkubationspuffer

0,5% (w/v) BSA

0,25% (v/v) Triton X-100

ad 100 ml PBS

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert

2.17 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA Test mit multipltem Vergleichstest nach Bonferroni oder, wenn angegeben, mittels ungepaartem t-Test (GraphPad Prism 6). Als statistisch signifikant wurden p-Werte gewertet, welche $\leq 0,05$ waren. *) $p \leq 0,05$, **) $p \leq 0,01$, ***) $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktionen von *A. baumannii* mit Plasminogen

3.1.1 Bindung von Plasminogen an vitale *A. baumannii*-Zellen

Um herauszufinden, ob *A. baumannii* in der Lage ist, humanes Plasminogen zu binden, wurden vitale *A. baumannii*-Zellen des Referenzstammes ATCC 19606 mit Plasminogen inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten erfolgte die Elution der an die Oberfläche der Bakterienzellen gebundenen Proteine (2.16.1). Im Anschluss an die Auftrennung der letzten Waschfraktion sowie der Eluatfraktion mittels SDS-PAGE wurde die Bindung von Plasminogen durch eine Westernblot-Analyse nachgewiesen (2.14.1). Als Kontrollen dienten gereinigtes Plasminogen sowie NHS. Abb. 4 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Analyse.

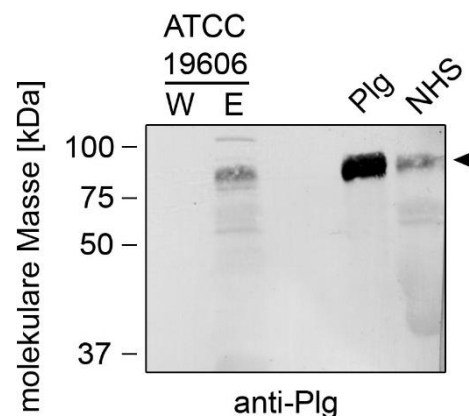


Abb. 4. Bindung von Plasminogen an vitale *A. baumannii*-Zellen. Gezeigt ist eine Westernblot-Analyse der vierten Waschfraktion (W) sowie Eluatfraktion (E) von Stamm ATCC 19606 (2×10^9 Zellen) nach Inkubation mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Plasminogen. Als Kontrollen dienten gereinigtes Plasminogen (500 ng, Plg) sowie 2 μl einer 1:10 Verdünnung von normalem Humanserum (NHS). Plasminogen (Pfeilspitze) wurde durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg, 1:1000) detektiert. Der Größenstandard Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

In der Eluatfraktion, nicht jedoch in der Waschfraktion, von Stamm ATCC 19606 ließ sich ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von etwa 92 kDa nachweisen, welches mit dem anti-Plasminogen Antiserum reagierte. Dies

korrespondiert mit der molekularen Masse von gereinigtem Plasminogen von 92 kDa, welches als Positivkontrolle diente. Auch bei NHS (zusätzliche Kontrolle) reagierte der anti-Plasminogen Antikörper mit einem Protein, dessen apparente molekulare Masse der von Plasminogen entsprach.

3.1.2 Bindung von Plasminogen an verschiedene *A. baumannii*-Stämme

Nachdem eine Bindung von humanem Plasminogen an *A. baumannii*-Referenzstamm ATCC 19606 nachgewiesen werden konnte, wurden der Referenzstamm und ausgewählte klinische Isolate auf ihre Eigenschaften, mit Plasminogen zu interagieren, im Ganzzell-ELISA (2.14.2) untersucht.

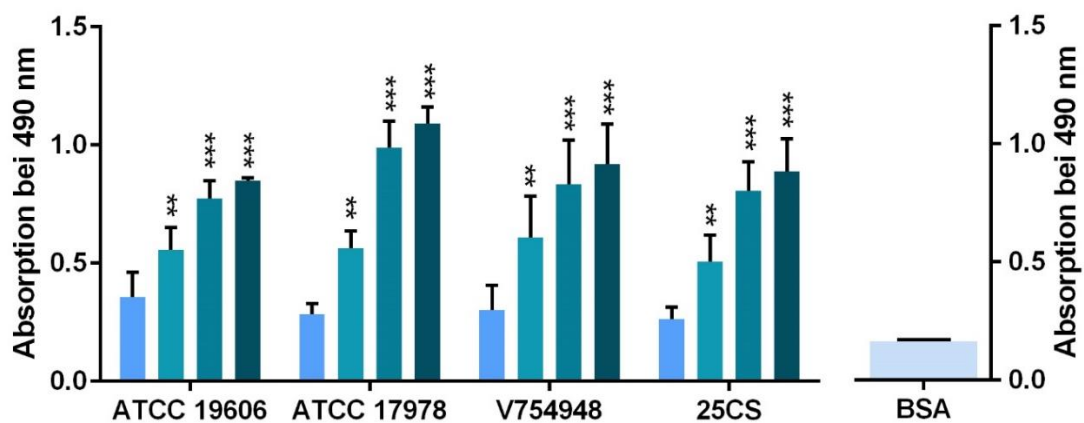


Abb. 5. Bindung von Plasminogen an ausgewählte *A. baumannii*-Stämme. 1×10^6 (■), 1×10^7 (■), 1×10^8 (■) und 1×10^9 (■) Zellen des Referenzstammes ATCC 19606 sowie der klinischen Isolate ATCC 17978, V754948 und 25CS wurden in PBS über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte die Zugabe von $1 \mu\text{g}$ gereinigten Plasminogen. Die Bindung von Plasminogen wurde nach mehrfachem Waschen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente BSA (500 ng). Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils als Triplikat durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. **) $p \leq 0,01$, ***) $p \leq 0,001$.

Hierzu wurden unterschiedliche Zellzahlen von *A. baumannii* ATCC 19606 sowie den klinischen Isolaten ATCC 17978, V754948 und 25CS über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockierung freier Bindungsstellen

wurde pro Kavität 1 µg Plasminogen in PBS zugesetzt. Nach mehrfachem Waschen wurde an *A. baumannii*-Zellen gebundenes Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum detektiert (Abb. 5, vorherige Seite). Wie zu erkennen, waren alle untersuchten *A. baumannii*-Stämme in der Lage, humanes Plasminogen an ihrer Zelloberfläche zu binden. Bei konstanter Plasminogen-Konzentration stiegen die Absorptionswerte mit zunehmender Zellzahl an und waren ab einer Zellzahl von 1×10^7 *A. baumannii*-Zellen pro Kavität statistisch signifikant ($p \leq 0,01$ bezogen auf BSA, welches als Negativkontrolle eingesetzt wurde).

3.2 Identifizierung von Plasminogen-bindenden Proteinen

3.2.1 Far-Westernblot-Analyse von *A. baumannii*-Zellextrakten und Membranpräparationen

Nachdem in Abschnitt 3.1 die Bindung von Plasminogen an *A. baumannii*-Zellen erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurden im Folgenden potentielle Plasminogen-bindende Proteine von *A. baumannii* mittels Far-Westernblot-Analyse identifiziert. Wie unter Abschnitt 2.14.1 beschrieben, wurden Zellextrakte von verschiedenen *A. baumannii*-Stämmen per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Membran mit Plasminogen überschichtet. Es folgten mehrere Waschschriffe, wonach an bakterielle Proteine gebundenes Plasminogen durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum detektiert wurde. Wie in Abb. 6 A zu erkennen, ließen sich in der Far-Westernblot-Analyse von Zellextrakten verschiedener *A. baumannii*-Stämme eine Reihe von Proteinen mit apparenten molekularen Massen von etwa 41 kDa, 32 kDa, 26 kDa sowie 16 kDa erkennen, welche nach Inkubation mit Plasminogen mit dem anti-Plasminogen Antikörper reagierten.

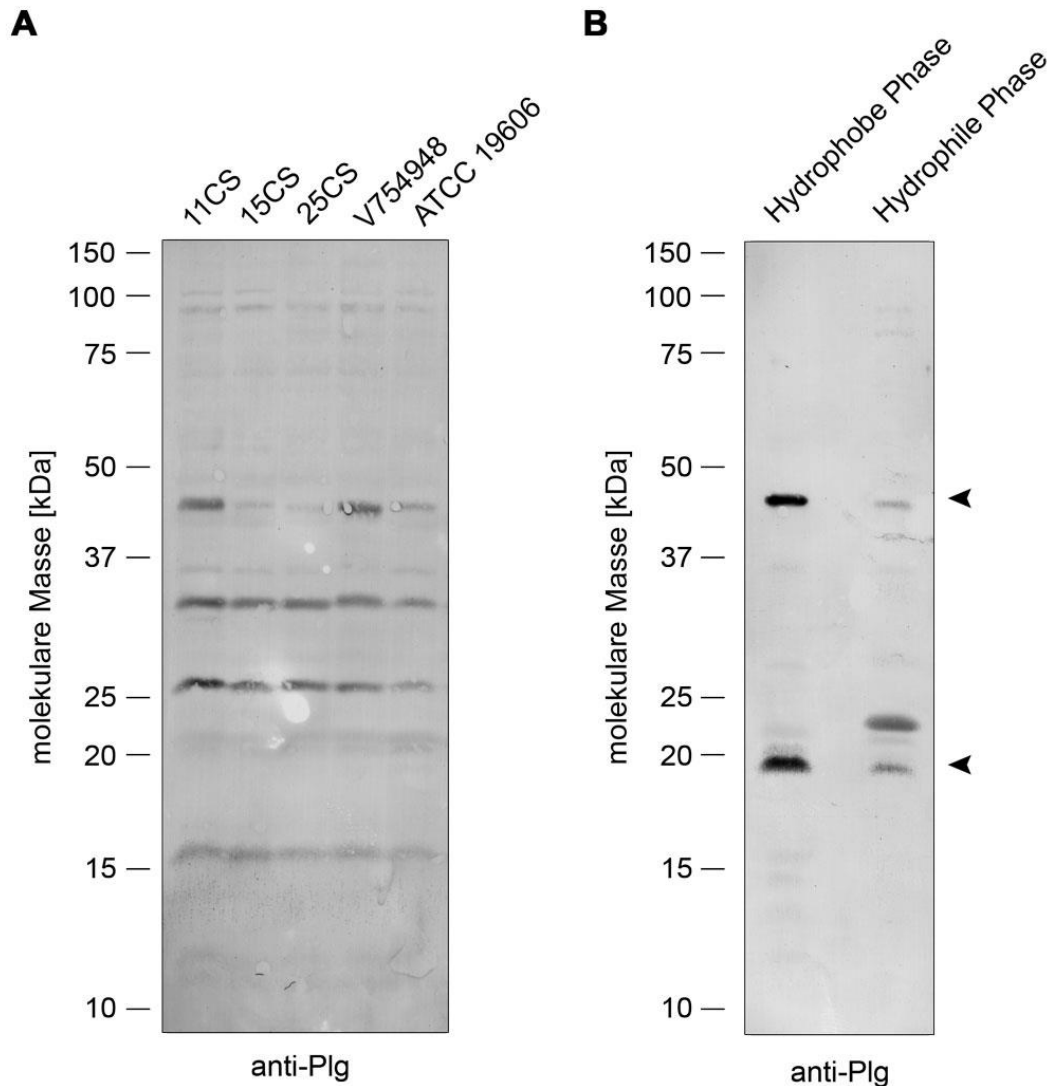


Abb. 6. Far-Westernblot-Analyse von *A. baumannii*-Zellextrakten und Membranfraktionen. 10 µg Zellextrakte (**A**) oder 10 µg Membranfraktionen (hydrophobe Phase) bzw. lösliche Proteine (hydrophile Phase) (**B**) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen wurde die Membran mit 20 µg/ml Plasminogen in PBS inkubiert. Bindung von Plasminogen an bakterielle Proteine wurde nach gründlichem Waschen durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg, 1:1000) detektiert. Pfeilspitzen markieren Proteine in der hydrophoben Phase mit apparenten molekularen Massen von etwa 41 kDa bzw. 19 kDa. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist jeweils links angegeben.

Zur Differenzierung von löslichen, zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen, wurde eine Extraktion der Membranproteine von *A. baumannii* Referenzstamm ATCC 19606 nach einer modifizierten Methode von Radolf et al. [286] durchgeführt (Abschnitt 2.13.6). Nach Extraktion wurden jeweils 10 µg der Membranfraktionen (hydrophobe Phase) sowie der löslichen Proteine

(hydrophile Phase) per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. In der im Anschluss durchgeführten Far-Westernblot-Analyse reagierte der anti-Plasminogen Antikörper mit zwei Proteinen in der hydrophoben Phase, die apparente molekulare Massen von etwa 41 kDa bzw. 19 kDa aufwiesen (Abb. 6 B, markiert durch Pfeilspitzen).

3.2.2 Identifizierung von *A. baumannii* Plasminogen-bindenden

Proteinen mittels Massenspektrometrie

Zur Identifizierung Plasminogen-bindender Proteine wurden zunächst unterschiedliche Mengen der Membranfraktionen per SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine wurden mittels Silberfärbung (2.13.3) angefärbt. Die apparenten molekularen Massen der mit einem Stern markierten Proteine in Abb. 7, korrespondierten mit den mittels Far-Westernblot-Analyse identifizierten Proteinen der hydrophoben Phase mit apparenten molekularen Massen von etwa 41 kDa bzw. 19 kDa. Die entsprechenden Proteine wurden vorsichtig aus der Gelmatrix ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die durchgeführte MASCOT-Analyse ergab eine Reihe möglicher Kandidaten, wobei zwei Proteine in ihren abgeleiteten molekularen Massen mit den zuvor experimentell ermittelten apparenten molekularen Massen korrespondierten. Die beiden Proteine sind in der BioCyc Datenbank als Hitzeschockprotein ohne bekannte Funktion (HMPREF0010_01565), mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 41,1 kDa bzw. als Membranprotein OmpW (HMPREF0010_01940), mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 19,9 kDa annotiert. Das Hitzeschockprotein wurde anschließend vereinfacht als p41 bezeichnet.

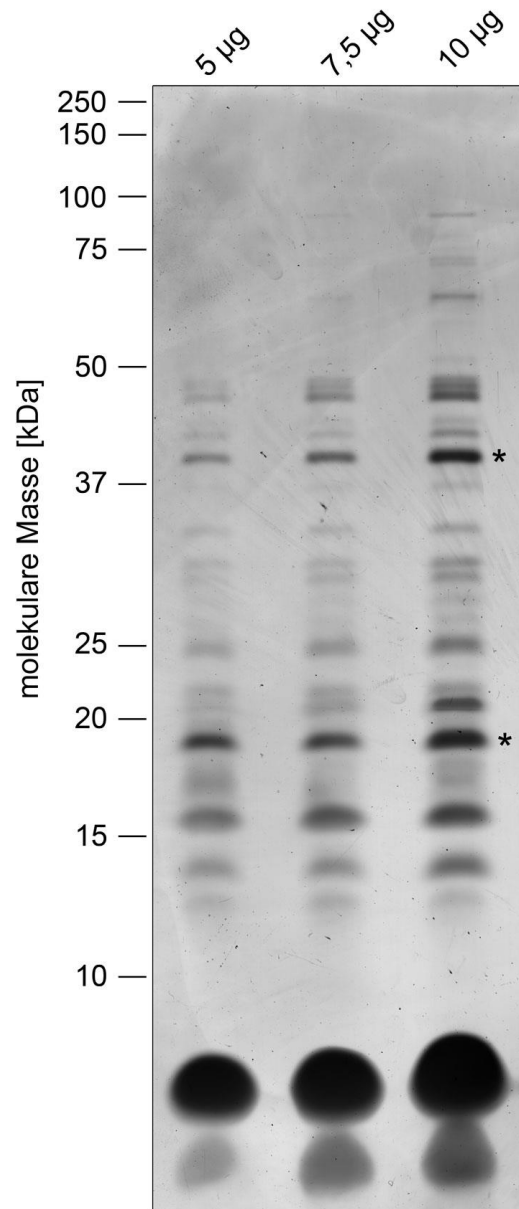


Abb. 7. Nachweis von *A. baumannii* Membranproteinen mittels Silberfärbung. Verschiedene Mengen an Membranpräparationen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung angefärbt. Proteine, welche mit den apparenten molekularen Massen von etwa 41 kDa bzw. 19 kDa der Proteine aus der zuvor durchgeführten Far-Westernblot-Analyse korrespondieren, sind markiert (Stern). Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

3.3 Produktion Plasminogen-bindender Proteine in *E. coli*

3.3.1 Klonierung der kodierenden Sequenzen der Plasminogen-bindenden Proteine von *A. baumannii* in einen Expressionsvektor

Nach Identifizierung von p41 als potentiell Plasminogen-bindendes Protein von *A. baumannii* wurde die kodierende Sequenz (HMPREF0010_01565) dieses Proteins mit sequenzspezifischen Starteroligonukleotiden (Tab. 13) mittels PCR amplifiziert. Um die Aufreinigung des rekombinanten p41-Proteins zu erleichtern, wurden die Starteroligonukleotide so ausgewählt, dass die N-terminale Signalsequenz von p41, einschliesslich des Cystein-Restes an Position 18, nicht amplifiziert wurde. Daher beginnt das rekombinante p41-Protein erst mit dem Glutamin-Rest an Position 19.

Da aus der Literatur bekannt war, dass bei vielen pathogenen Mikroorganismen der Translations-Elongationsfaktor Tuf als „Moonlighting“-Protein fungiert und ebenfalls Plasminogen binden kann [248, 274, 275], wurde die kodierende Sequenz des Elongationsfaktors Tuf von *A. baumannii* (HMPREF0010_03765, nachfolgend als Tuf_{Ab} bezeichnet) ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Als Matrize für alle PCR-Reaktionen diente chromosomale DNA des *A. baumannii*-Referenzstammes ATCC 19606. Als zusätzliche Kontrolle wurde die kodierende Sequenz des Elongationsfaktors Tuf von *L. pneumophila* (YP_094371.1, nachfolgend als Tuf_{Lp} bezeichnet) ebenfalls amplifiziert. Als Matrize für die Amplifikation mittels PCR diente zuvor isolierte chromosomale DNA eines klinischen *L. pneumophila* Isolates (Serotyp 1).

Nach Durchführung der PCR (Abschnitt 2.11.1) und Aufreinigung der Amplifikate wurden die gereinigten PCR-Amplifikate sowie der Vektor pQE-30 Xa mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (2.11.4) hydrolysiert. Nach Aufreinigung der enzymatischen Reaktionen und nachfolgender Ligation der hydrolysierten Amplifikate in den Vektor pQE-30 Xa (Abschnitt 2.11.6) erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli* JM109-Zellen mit den entsprechenden Ligationsprodukten (2.12.1). Die Selektionierung von Plasmid-tragenden *E. coli*-Klonen erfolgte auf Ampicillin-

supplementierten LB-Agarplatten. Nach Isolierung verschiedener Plasmide wurden diese mittels Restriktionsanalyse überprüft und ausgewählte Plasmide, deren inserierte DNA-Fragmente die erwartete Größe besaßen, wurden sequenziert. Nach Kontrolle der Sequenzen mit dem Programm CLC Sequence Viewer (Qiagen) wurden die *E. coli*-Klone ausgewählt, welche die gewünschte Sequenz im korrekten Leserahmen enthielten und zur Produktion der rekombinanten Proteine mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz eingesetzt.

3.4 Charakterisierung von *A. baumannii*

Elongationsfaktor Tuf

3.4.1 Produktion und Aufreinigung von Tuf

Die Produktion und Aufreinigung des Elongationsfaktors Tuf von *A. baumannii* (Tuf_{Ab}) und *L. pneumophila* (Tuf_{Lp}) erfolgte wie in Abschnitt 2.13.4 beschrieben. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden jeweils 500 ng von Tuf_{Ab}, Tuf_{Lp} und von Tuf von *S. pneumoniae* (Tuf_{Sp}, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P.F. Zipfel, vergleiche Abschnitt 2.4) als Kontrollen, sowie BSA als Negativkontrolle per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Reinheit der affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteine wurde anschließend mittels Silberfärbung und Westernblot-Analyse überprüft (Abb. 8, nachfolgende Seite).

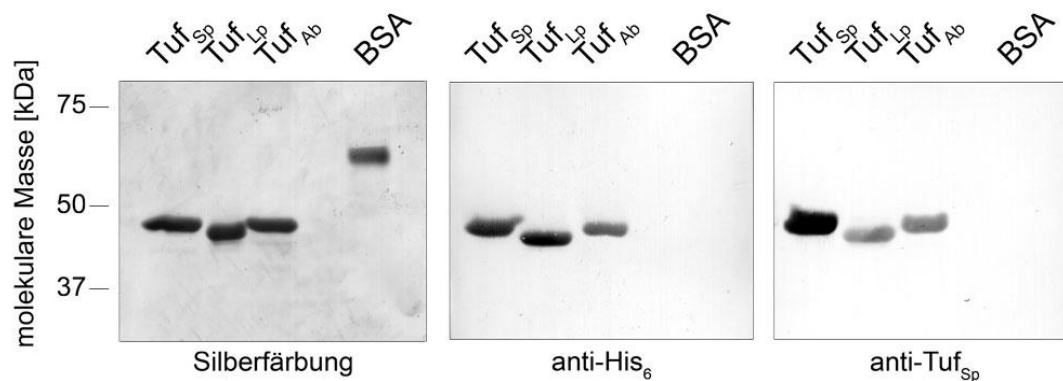


Abb. 8. Silberfärbung und Westernblot-Analyse affinitätschromatographisch aufgereinigter Tuf-Proteine. Jeweils 500 ng Protein von *S. pneumoniae* (Tuf_{Sp}), *L. pneumophila* (Tuf_{Lp}) und *A. baumannii* (Tuf_{Ab}) sowie BSA als Negativkontrolle wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Der linke Teil der Abbildung zeigt die mit Silbernitrat angefärbten, gereinigten Proteine. Im mittleren Teil der Abbildung ist eine Westernblot-Analyse zu sehen, wobei die gereinigten Proteine über die N-terminale Hexahistidin-Sequenz mit einem anti-Hexahistidin (anti-His₆) Antikörper detektiert wurden. Der rechte Teil der Abbildung zeigt ebenfalls eine Westernblot-Analyse, bei der mit einem polyklonalen Antiserum gegen Tuf von *S. pneumoniae* (anti-Tuf_{Sp}) inkubiert wurde. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Alle Proteine zeigten einen hohen Reinheitsgrad in der Silberfärbung sowie in der Westernblot-Analyse, die mit einem gegen die Hexahistidin-Sequenz gerichteten Antikörper durchgeführt wurde. Eine zusätzliche Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen Antiserum gegen Tuf_{Sp} zeigte zudem, dass dieses Antiserum mit den Tuf-Proteinen von *L. pneumophila* und *A. baumannii* kreuzreagierte und daher in weiteren Studien verwendet werden konnte.

3.4.2 Bindung von Plasminogen an Elongationsfaktor Tuf

Um zu untersuchen, ob Tuf_{Ab} in der Lage ist, humanes Plasminogen zu binden, wurde zunächst eine Far-Westernblot-Analyse durchgeführt. Nach Auftrennung von jeweils 500 ng Tuf_{Ab}, Tuf_{Sp}, und Tuf_{Lp} sowie BSA als Negativkontrolle mittels SDS-PAGE, wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit Plasminogen inkubiert und Bindung durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum nachgewiesen. Wie in Abb. 9 zu erkennen, konnte sowohl für Tuf_{Ab} als auch für Tuf_{Lp} und Tuf_{Sp} eine Bindung

von Plasminogen nachgewiesen werden, während der anti-Plasminogen Antikörper nicht mit BSA (Negativkontrolle) reagierte.

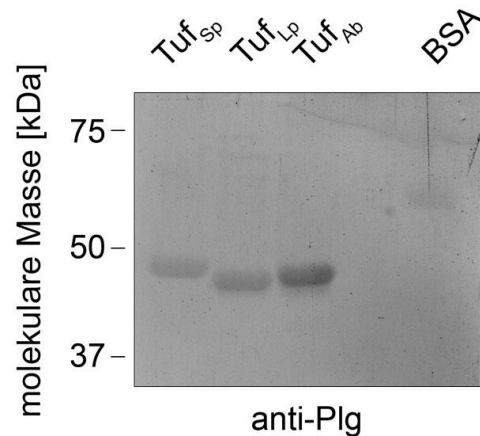


Abb. 9. Bindung von Plasminogen an Tuf-Proteine verschiedener Mikroorganismen mittels Far-Westernblot-Analyse. 500 ng der gereinigten Tuf-Proteine sowie BSA wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran nach dem Blockieren freier Bindungsstellen mit 20 µg/ml Plasminogen in PBS inkubiert und Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg, 1:1000) detektiert. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Da die gereinigten Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE in denaturierter Form vorliegen, wurde ebenfalls untersucht, ob nicht-denaturiertes Tuf_{Ab} in der Lage ist, Plasminogen zu binden (2.14.2). Zunächst wurden 500 ng der gereinigten Proteine sowie BSA als Negativkontrolle auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren von freien Bindungsstellen wurden pro Vertiefung 1 µg gereinigtes Plasminogen in PBS zugesetzt. Es folgten mehrere Waschschrte. Schließlich wurde gebundenes Plasminogen durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum detektiert. Die Ergebnisse der ELISA-Versuche sind in Abb. 10 A zusammengefasst. Sowohl Tuf_{Ab} als auch die beiden Tuf-Proteine von *S. pneumoniae* (Positivkontrolle) und *L. pneumophila* zeigten eine signifikante Bindung an Plasminogen. Im Falle von Tuf_{Ab} und Tuf_{Lp} wurde zudem die Dosis-Abhängigkeit der Plasminogen-Bindung untersucht.

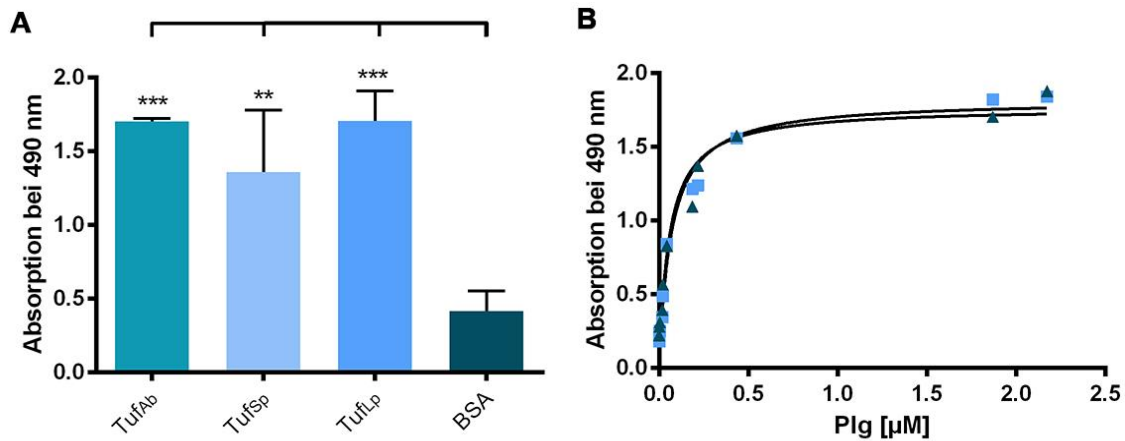


Abb. 10. Bindung von Plasminogen an Tuf-Proteine verschiedener Mikroorganismen im ELISA. (A) 500 ng der gereinigten Tuf-Proteine sowie BSA wurden auf Mikrotiterplatten über Nacht immobilisiert. Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde 1 μ g Plasminogen pro Vertiefung hinzugegeben. Die Bindung von Plasminogen wurde mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen, jeweils als Triplikat durchgeführt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. **(B)** Dosis-Abhängigkeit der Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} (\blacktriangle) und Tuf_{Lp} (\blacksquare). 500 ng der gereinigten Proteine wurden immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen von Plasminogen inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen. Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression, ausgehend von einem einfachen Bindungsmodell, errechnet.

Wie in Abb. 10 B zu sehen ist, stieg die Absorption bei 490 nm mit zunehmender Konzentration von Plasminogen an und erreichte bei einer Konzentration von etwa 1,5 μ M Sättigung. Basierend auf den ELISA-Daten konnte mittels nichtlinearer Regression die Dissoziationskonstante (K_d) für die Interaktion der gereinigten Tuf-Proteine mit Plasminogen approximiert werden. Für Tuf_{Ab} beträgt der K_d -Wert 57 nM (\pm 15 nM) und für Tuf_{Lp} 69 nM (\pm 15 nM).

3.4.3 Einfluss von Ionenstärke und Lysin-Resten auf die Plasminogen-Bindung an Tuf_{Ab}

Plasminogen interagiert mit einer Reihe von humanen Rezeptoren sowie bakteriellen Proteinen über Lysin-Bindestellen, welche in den Kringle-Domänen lokalisiert sind [224, 236]. Um die Rolle von Lysin-Resten bei der Bindung von Plasminogen durch Tuf_{Ab} sowie den Einfluss der Ionenstärke zu untersuchen, wurde eine Reihe von Bindungsanalysen durchgeführt. Zunächst wurde Tuf_{Ab} auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren der freien

Bindungsstellen wurde mit 1 μg Plasminogen pro Vertiefung inkubiert, wobei entweder steigende Konzentrationen des Lysin-Analogons Tranexamsäure oder steigende Konzentrationen Natriumbromid (NaBr) zugesetzt wurden. Nach Inkubation mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum sowie einem entsprechenden sekundären Antikörper konnten Antigen-Antikörper Komplexe durch o-PD visualisiert werden.

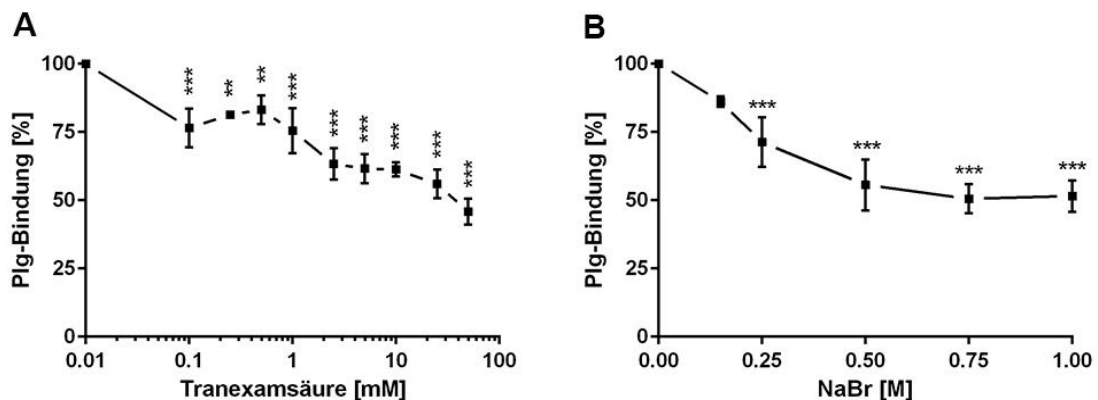


Abb. 11. Effekt von Tranexamsäure und NaBr auf die Tuf_{Ab}-Plasminogen Interaktion. Proteine (500 ng) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindestellen mit 1 μg Plasminogen inkubiert, unter Zusatz steigender Konzentrationen von Tranexamsäure (**A**) bzw. NaBr (**B**). Die Bindung von Plasminogen wurde durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert. Die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} ohne Inhibitoren wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Triplikat durchgeführt wurden. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Mittelwerte. **) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$.

Wie in Abb. 11 A zu erkennen ist, führte Tranexamsäure bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab}. Mit steigender Konzentration von Tranexamsäure nahm die Bindung von Plasminogen kontinuierlich ab. Bei einer Endkonzentration von 50 mM betrug die Plasminogen-Bindung allerdings noch 45% des anfänglichen Wertes. Die positiv geladene ϵ -Aminogruppe von Lysin-Resten lässt vermuten, dass die Ionenstärke einen Einfluss auf die Interaktion mit Plasminogen ausüben könnte. Tatsächlich kommt es ab einer Konzentration von 0,25 M NaBr zu einer signifikanten Abnahme der Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab}, die mit steigender NaBr-Konzentration weiter abnimmt und bei 1 M NaBr einen Wert von 51% des anfänglichen Wertes

erreicht (Abb. 11 B). Diese Daten bestätigen eine wichtige Rolle von Lysin-Resten bei der Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} und den damit zusammenhängenden Einfluss der Ionenstärke. Allerdings scheinen noch andere Faktoren eine Rolle bei der Bindung zu spielen, da eine vollständige Inhibition selbst bei hohen Konzentrationen von Tranexamsäure sowie NaBr nicht erzielt werden konnten.

3.4.4 Aktivierung von Tuf-gebundenem Plasminogen zu Plasmin

Plasminogen wird durch den Aktivator u-PA zu Plasmin aktiviert. Um der Frage nachzugehen, ob an Tuf gebundenes Plasminogen für den Aktivator u-PA zugänglich ist, wurde ein Plasminogen-Aktivierungs-Assay (Abschnitt 2.16.3) durchgeführt. Die gereinigten Tuf-Proteine wurden immobilisiert und nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit Plasminogen inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde der Aktivator u-PA sowie das chromogene Substrat S-2251 zugesetzt. Aktives Plasmin spaltet das chromogene Substrat, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt, der photometrisch durch Messung der Absorption bei 405 nm verfolgt werden kann. Die Ergebnisse des Plasminogen-Aktivierungs-Assays sind in Abb. 12 zusammengefasst.

Wie zu erkennen, stieg die Absorption bei 405 nm für Tuf_{Ab} (Abb. 12 A), Tuf_{Sp} (Positivkontrolle, Abb. 12 B) und Tuf_{Lp} (Abb. 12 C) in den Reaktionsansätzen mit Plasminogen, u-PA und dem chromogenen Substrat S-2251 kontinuierlich über den gesamten Zeitraum des Versuchs an. Für BSA (Negativkontrolle, Abb. 12 D) konnte kein Anstieg in den Absorptionen beobachtet werden. Für Reaktionsansätze ohne Plasminogen, ohne u-PA sowie mit Tranexamsäure zeigte sich ebenfalls kein Anstieg der Absorption.

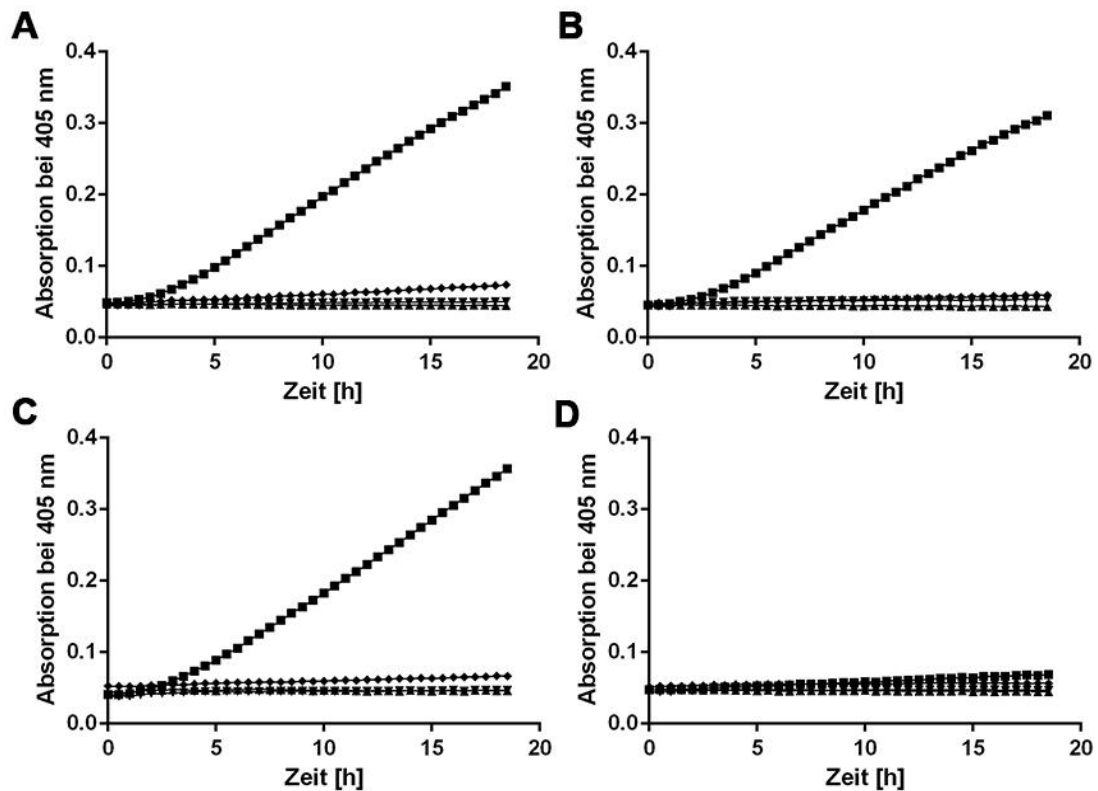


Abb. 12. Aktivierung von Tuf-gebundenem Plasminogen zu Plasmin. Die gereinigten Proteine (500 ng) sowie BSA als Negativkontrolle wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Blockieren freier Bindungsstellen und Inkubation mit 1 μg Plasminogen wurde ein Reaktionsmix, bestehend aus dem chromogenen Substrat S-2251 sowie dem Aktivator u-PA, zugesetzt (■). Veränderungen in der Absorption bei 405 nm wurden über einen Zeitraum von 18,5h verfolgt. Als Kontrollen dienen Reaktionsansätze ohne u-PA (▲), ohne Plasminogen (▼) sowie mit Tranexamsäure (◆). (A) Tuf_{Ab}, (B) Tuf_{Sp}, (C) Tuf_{Lp} und (D) BSA.

3.4.5 Degradation von Fibrinogen durch an Tuf gebundenes Plasmin

Da die Versuche mit dem chromogenen Substrat S-2251 als richtungsweisend für die Aktivierbarkeit von an Tuf gebundenem Plasminogen durch u-PA angesehen werden können, wurde im Folgenden der Abbau von Fibrinogen als physiologischem Substrat von Plasmin untersucht (2.16.4). Hierzu wurden 500 ng der gereinigten Proteine sowie BSA als Negativkontrolle auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde 1 μg Plasminogen zugesetzt. Es folgten mehrere Waschschriffe, wonach der Aktivator u-PA sowie 20 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen zugesetzt wurden. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von 4x Inkubationspuffer für die SDS-PAGE terminiert.

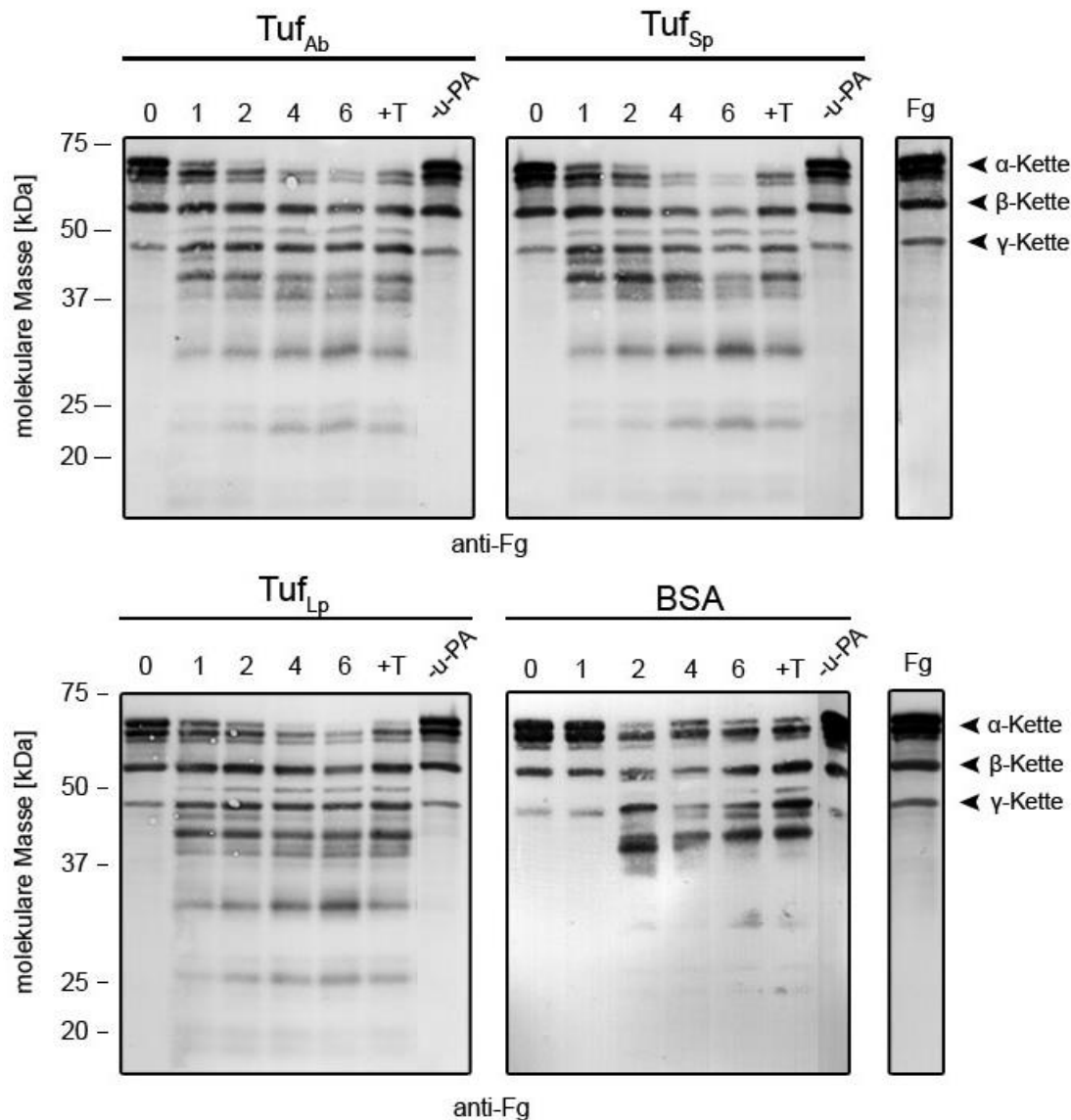


Abb. 13. Degradation von Fibrinogen durch an Tuf gebundenes, aktiviertes Plasmin. 500 ng der gereinigten Tuf-Proteine und BSA (Negativkontrolle) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen wurde 1 µg Plasminogen zugesetzt. Es folgten mehrere Waschschrte. Anschließend wurde ein Reaktionsmix zugesetzt, welcher den Aktivator u-PA sowie 20 µg/ml Fibrinogen (Fg) enthielt. Die Reaktionen wurden bei 37 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten terminiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nitrocellulose-membran konnten Fibrinogen und seine Abbauprodukte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Fibrinogen Antiserums (anti-Fg, 1:1000) detektiert werden. Bei zusätzlichen Kontrollen erfolgte die Inkubation mit Plasminogen und 50 mM Tranexamsäure (+T) bzw. ohne Zusatz des Aktivators (-u-PA). Die Inkubationszeiträume sind in Stunden angegeben. Es wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt, wobei repräsentative Ergebnisse dargestellt sind. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist jeweils links angegeben.

Nach Auftrennung der Proben und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran konnten Fibrinogen bzw. seine Degradationsprodukte durch eine Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-Fibrinogen Antiserum detektiert werden. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse sind in Abb. 13 zusammengefasst. Wie zu erkennen, wurde im Falle von Tuf_{Ab}, Tuf_{Sp} und Tuf_{Lp} die Fibrinogen γ -Kette nach 6 h fast vollständig proteolytisch abgebaut und auch die β -Kette zeigte leichte Anzeichen einer Degradation. Außerdem ließen sich spezifische Abbauprodukte mit apparenten molekularen Massen von etwa 31 kDa und 24 kDa im Zeitverlauf des Experimentes beobachten. Eine geringfügige Degradation zeigte sich auch in den Ansätzen mit Tranexamsäure. In den Reaktionsansätzen mit BSA war keine prominente Proteolyse von Fibrinogen zu erkennen.

3.4.6 Abbau von Komplement C3b durch an Tuf gebundenes Plasmin

Die Serinprotease Plasmin besitzt eine relativ breite Substratspezifität und ist in der Lage, unterschiedliche Komplementkomponenten zu degradieren [243, 244]. Um die Frage zu beantworten, ob an Tuf gebundenes Plasmin befähigt ist, die zentrale Komplementkomponente C3b zu degradieren, wurden 500 ng der gereinigten Tuf-Proteine bzw. BSA auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Freie Bindestellen wurden abgesättigt und pro Vertiefung 1 μ g Plasminogen pipettiert. Nach mehreren Waschschritten wurde ein Reaktionsmix zugesetzt, welcher neben dem Aktivator u-PA 20 μ g/ml C3b enthielt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktionen terminiert (Abschnitt 2.16.5). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es folgte eine Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum. Sowohl bei Tuf_{Ab} als auch der Positivkontrolle Tuf_{Sp} und Tuf_{Lp} ließen sich im Zeitverlauf spezifische Abbauprodukte von C3b mit apparenten molekularen Massen von etwa 27 kDa, 37 kDa und 43 kDa detektieren (Abb. 14). Dies bestätigt, dass an Tuf gebundenes Plasmin die zentrale Komplementkomponente C3b abbauen kann. Im Falle von BSA konnte kein prominenter C3b-Abbau beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich sowohl bei den gereinigten Proteinen,

als auch bei BSA eine leichte Degradation von C3b in den Kontrollreaktionen mit Tranexamsäure.

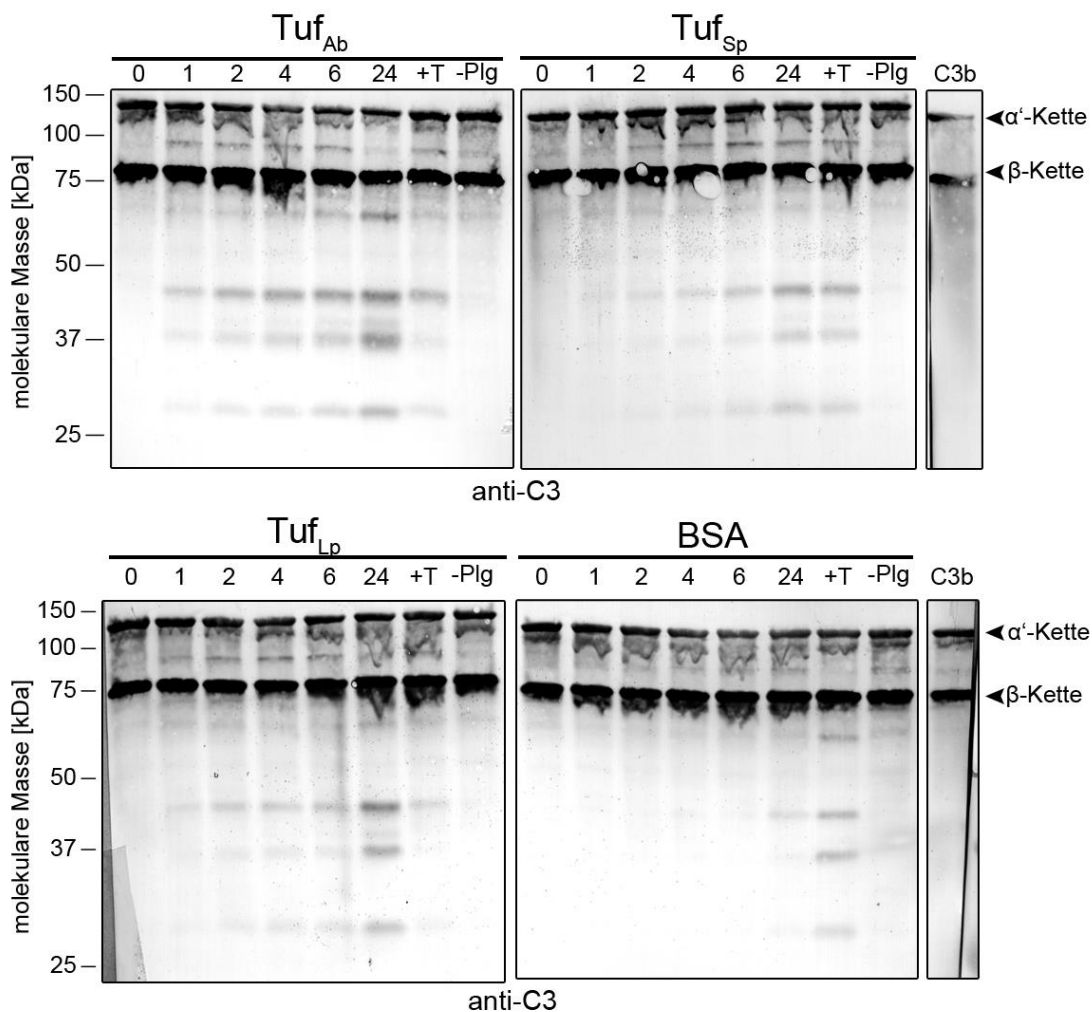


Abb. 14. Abbau von Komplement C3b durch an Tuf gebundenes Plasmin. Gereinigte Proteine (500 ng) sowie BSA wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden blockiert und pro Vertiefung 1 µg Plasminogen zugesetzt. Nach gründlichem Waschen wurde mit einem Reaktionsmix bestehend aus dem Aktivator u-PA sowie 20 µg/ml C3b inkubiert. Die Reaktionen wurden zu unterschiedlichen Zeitintervallen abgestoppt und die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion von C3b und seinen Abbauprodukten durch eine Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum (1:1000). Als zusätzliche Kontrollen wurde Plasminogen mit 50 mM Tranexamsäure (+T) oder ohne Plasminogen inkubiert (-Plg). Die Inkubationszeiträume sind in Stunden angegeben. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist jeweils links angegeben.

3.4.7 Bindung von FH an Elongationsfaktor Tuf

Es ist bekannt, dass Tuf von *S. pneumoniae* mit dem zentralen Komplementregulator des alternativen Weges, FH interagiert [248].

Weiterführende Bindungsstudien mit FH sollten zeigen, ob auch Tuf_{Ab} in der Lage ist, mit diesem Wirtsprotein zu interagieren. Hierzu wurden die gereinigten Tuf-Proteine von *A. baumannii*, *L. pneumophila* und *S. pneumoniae* (Positivkontrolle) auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen wurde pro Kavität 1 µg gereinigter FH zugegeben. Bindung von FH an die Tuf-Proteine wurde mit einem polyklonalen anti-FH Antiserum detektiert. Aus Abb. 15 geht hervor, dass sowohl Tuf_{Ab} als auch Tuf_{Lp} und Tuf_{Sp} zur Bindung von FH befähigt sind.

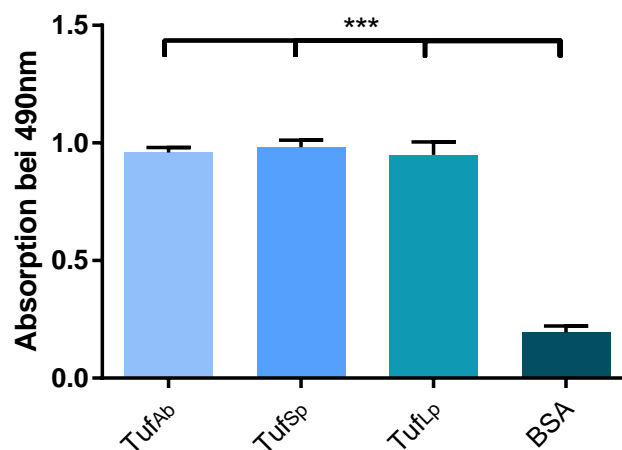


Abb. 15. Interaktion von Komplementregulator FH mit Tuf-Proteinen. Gereinigte Tuf-Proteine (500 ng) sowie BSA (Negativkontrolle) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden blockiert und pro Vertiefung wurde 1 µg FH zugesetzt. Nach 1 h Inkubation und mehreren Waschschritten wurde an Tuf-gebundenes FH mit einem polyklonalen anti-FH Antiserum detektiert. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils als Triplikat durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. *** $p \leq 0,001$.

3.4.8 Nachweis der Kofaktor-Aktivität von Tuf-gebundenem FH

Um zu überprüfen, ob an Tuf-Proteine gebundener FH als Kofaktor für die Serinprotease FI fungieren und so C3b inaktivieren kann, wurde ein Kofaktor-Assay durchgeführt (Abschnitt 2.16.7). Hierbei wurden die Tuf-Proteine auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit gereinigtem FH inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde ein Reaktionsmix, bestehend aus gereinigtem FI und C3b zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von Inkubationspuffer wurden die Reaktionen

terminiert. Schließlich wurden die Proben im SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Degradationsprodukte von C3b wurden durch ein polyklonales anti-C3 Antiserum detektiert.

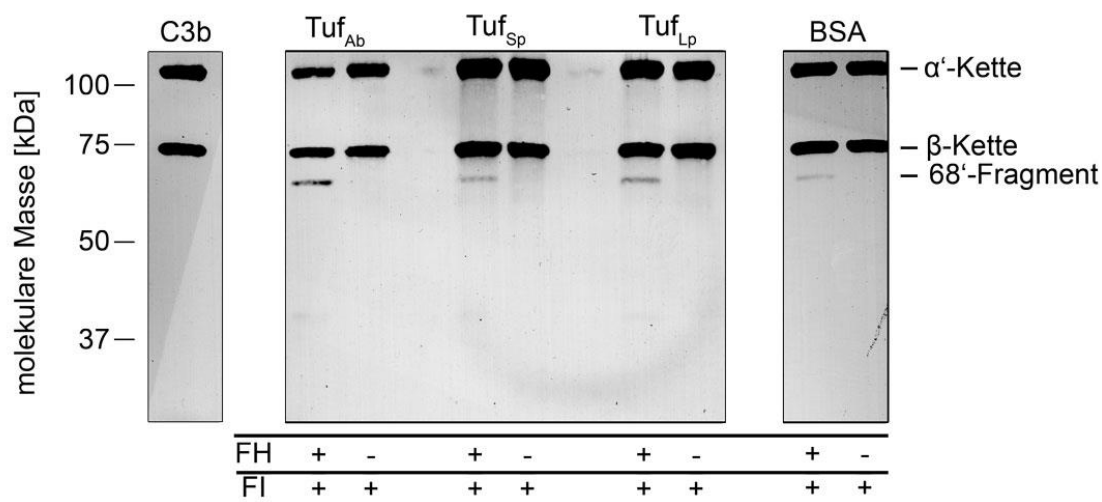


Abb. 16. Nachweis der Kofaktor-Aktivität von an Tuf-Proteine gebundenem FH. Gereinigte Tuf-Proteine (1 μ g) sowie BSA (Negativkontrolle) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen mit 2 μ g FH pro Kavität inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde ein Reaktionsmix bestehend aus C3b (20 μ g/ml) und FI (5 μ g/ml) zugesetzt. Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert und im Anschluss durch Zugabe von Inkubationspuffer für die SDS-PAGE abgestoppt. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Degradationsprodukte von C3b wurden in der Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum detektiert (1:1000). Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Wie in Abb. 16 zu erkennen, zeigte sich sowohl für Tuf_{Ab} als auch für Tuf_{Lp} und die Positivkontrolle Tuf_{Sp} eine Degradation von C3b in Reaktionsansätzen, welche sowohl FH als auch FI enthielten. Der anti-C3 Antikörper reagierte mit Proteinen von apparenten molekularen Massen von etwa 100 kDa und 75 kDa sowie mit einem Protein mit einer apparenten molekularen Masse kleiner als 75 kDa. Die molekularen Massen dieser Proteine korrespondieren mit den molekularen Massen der C3b α' -Kette (101 kDa), der C3b β -Kette (75 kDa) sowie dem spezifischen 68'-Fragment, welches bei der Spaltung von C3b durch FI in Gegenwart von FH entsteht. Das 68'-Fragment konnte jedoch auch im Reaktionsansatz mit BSA (Negativkontrolle) nachgewiesen werden.

3.4.9 Nachweis von Tuf_{Ab} auf der Oberfläche von *A. baumannii*

Um als Plasminogen-bindendes Protein fungieren zu können, muss Tuf_{Ab} auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* exponiert sein. Daher wurde mittels Durchfluss-zytometrie untersucht, ob Tuf_{Ab} tatsächlich auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* nachgewiesen werden kann (2.15.1.2). Hierzu wurden Zellen des *A. baumannii*-Referenzstammes ATCC 19606 (5×10^8 Zellen pro Ansatz) sedimentiert und mit einem polyklonalen anti-Tuf_{sp} Antiserum inkubiert, welches wie in Abschnitt 3.4.1 gezeigt, mit Tuf_{Ab} kreuzreagiert und daher zum Nachweis dieses Proteins in der Durchflusszytometrie genutzt werden konnte. Nach Inkubation der *A. baumannii*-Zellen mit den verschiedenen Antikörperkombinationen wurden diese durch PFA fixiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

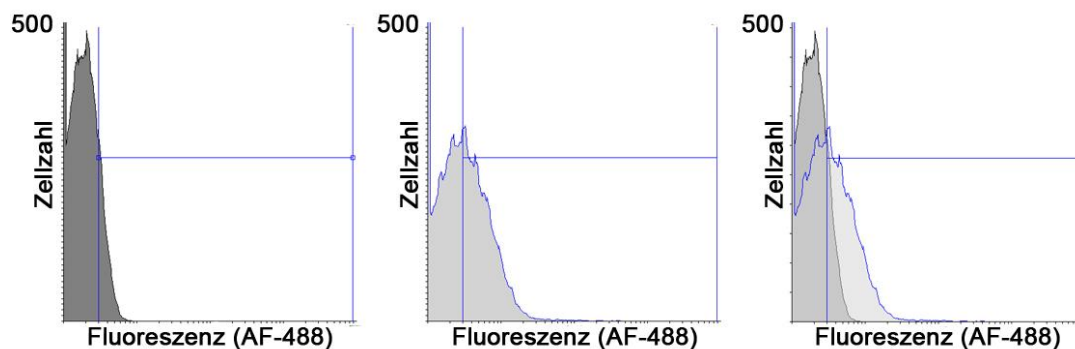


Abb. 17. Nachweis von Tuf_{Ab} auf der Zelloberfläche von *A. baumannii*. 5×10^8 *A. baumannii*-Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-Tuf_{sp} Antiserum (1:10 in FACS-Puffer) inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde dann mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte. Nach Fixierung der Zellen mit PFA wurden diese im Durchflusszytometer gemessen (50000 Zellen pro Reaktionsansatz). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente. Die linke Abbildung zeigt die Hintergrundfluoreszenz der *A. baumannii*-Zellen, welche nur mit dem Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper inkubiert wurden (Negativkontrolle). Im mittleren Teil ist die Fluoreszenz von Zellen dargestellt, welche mit dem anti-Tuf_{sp} Antiserum und dem Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper inkubiert wurden. Die rechte Abbildung zeigt die Überlagerung der beiden Histogramme.

Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, wobei pro Reaktionsansatz 50000 *A. baumannii*-Zellen gemessen wurden. Im Mittel konnte bei 39,9% ($\pm 4,9\%$) der *A. baumannii*-Zellen Tuf_{Ab} auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

3.5 Charakterisierung des 41 kDa-Proteins (p41) von

A. baumannii

3.5.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von

A. baumannii p41

Mit einer Hexahistidin-Sequenz versehenes p41 wurde wie in Abschnitt 2.13.4 beschrieben in *E. coli* produziert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung wurden 500 ng gereinigtes p41, sowie das Plasminogen-bindende Borrelienprotein BBA70 (Positivkontrolle) und BSA (Negativkontrolle) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um die Reinheit der Proteine zu überprüfen, wurden die Proteine in einem Teil des Polyacrylamidgels durch Silber angefärbt und die Proteine der zweiten Hälfte des Gels, nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran, mittels Westernblot analysiert.

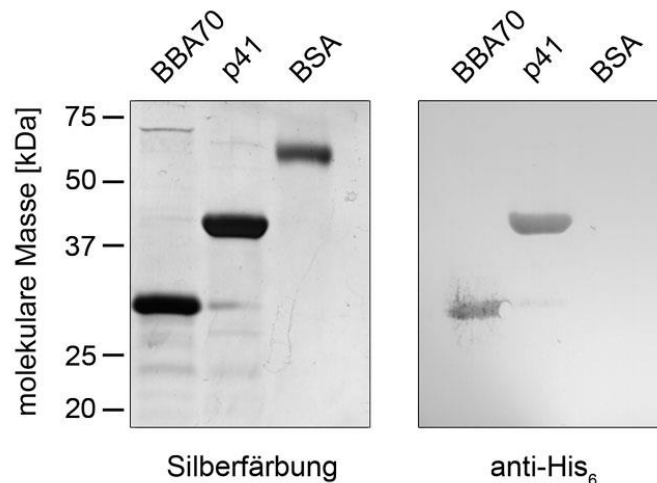


Abb. 18. Nachweis von gereinigtem p41 mittels Silberfärbung und Westernblot-Analyse.

Gereinigte Proteine (500 ng) sowie BSA wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine in einem Teil des Polyacrylamidgels wurden mit Silbernitrat visualisiert. Die Proteine auf dem verbleibenden Teil des Polyacrylamidgels wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. p41 sowie BBA70 wurden in der Westernblot-Analyse mit einem monoklonalen anti-Hexahistidin Antikörper detektiert (anti-His₆, 1:3000). Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Produktion von p41 in *E. coli* sowie die affinitätschromatographische Aufreinigung Proteine in ausreichender Menge und Reinheit lieferte. (Abb. 18). Das Protein zeigte sich in Lösung als stabil, da sich auch nach mehrfachen Auftau- und Einfrierzyklen keine Degradationsprodukte nachweisen ließen.

3.5.2 Interaktion von Plasminogen mit p41 von *A. baumannii*

Nach Aufreinigung von p41 sollte überprüft werden, ob dieses Protein tatsächlich humanes Plasminogen bindet. Hierzu wurde zunächst eine Far-Westernblot-Analyse, wie in Abschnitt 2.14.1 beschrieben, durchgeführt. Gereinigtes p41 (500 ng) sowie BBA70 (Positivkontrolle) und BSA (Negativkontrolle) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde nach Blockierung freier Bindestellen mit 20 µg/ml Plasminogen in PBS inkubiert. Nach Inkubation mit gereinigtem Plasminogen reagierte der anti-Plasminogen Antikörper sowohl mit p41 als auch mit BBA70. Für BSA (Negativkontrolle) zeigte sich keine Reaktion (Abb. 19).

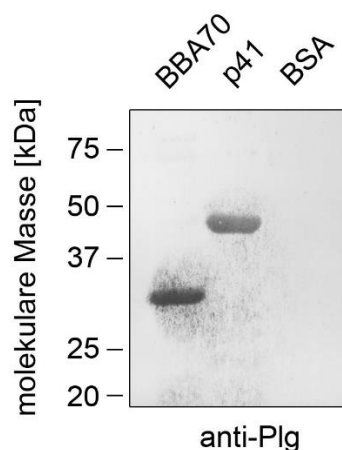


Abb. 19. Bindung von Plasminogen an gereinigtes p41 mittels Far-Westernblot-Analyse. p41, BBA70 sowie BSA (500 ng) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blockierung freier Bindestellen wurde die Membran mit Plasminogen (20 µg/ml) inkubiert. Gebundenes Plasminogen wurde nach mehreren Waschschritten mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg, 1:1000) detektiert. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Die Überprüfung, inwieweit p41 auch in nicht-denaturierter Form in der Lage ist, humanes Plasminogen zu binden, erfolgte mittels ELISA (2.14.2). Hierzu wurden p41, BBA70 und BSA auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde pro Kavität 1 μg Plasminogen hinzugegeben und die Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum detektiert (Abb. 20 A). Sowohl p41 als auch BBA70 zeigten eine signifikante Bindung an humanes Plasminogen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Bindung eine Dosisabhängigkeit aufweist (Abb. 20 B). Nach Immobilisierung von konstanten Mengen von p41 bzw. BBA70 wurde Plasminogen mit steigenden Konzentrationen hinzugegeben. Die Bindung von Plasminogen an beide Proteine zeigte einen eindeutigen, Dosis-abhängigen Verlauf und erreichte bei einer Plasminogen-Konzentration von etwa 0,75 μM Sättigung. Mittels nichtlinearer Regression konnten die Dissoziationskonstanten für Plasminogen-Bindung an p41 und BBA70 ermittelt werden. Für p41 ergab sich eine Dissoziationskonstante (K_d) von 36 nM (± 6 nM) und für BBA70 betrug der K_d -Wert 23 nM (± 5 nM).

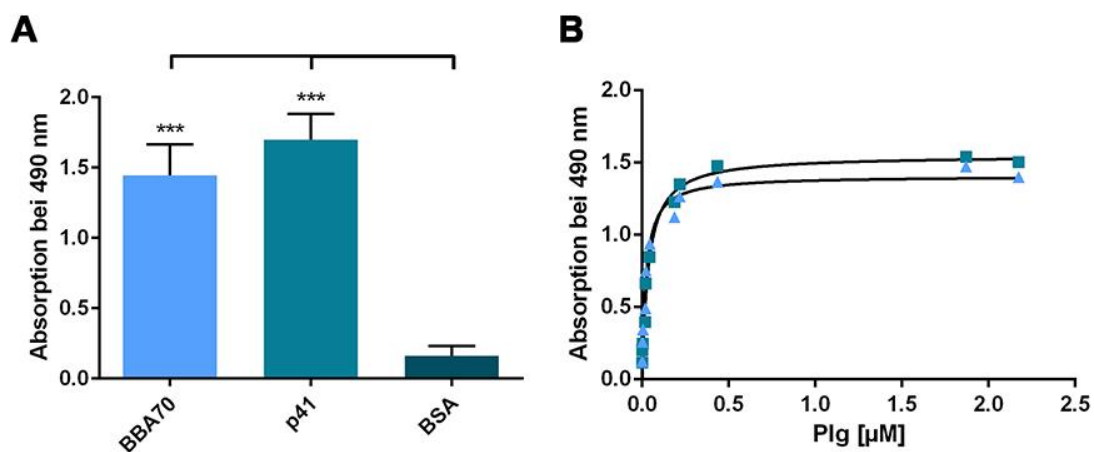


Abb. 20. Dosisabhängige Bindung von Plasminogen an p41. p41, BBA70 und BSA (500 ng) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden blockiert und 1 μg Plasminogen in PBS wurde pro Vertiefung zugesetzt (**A**). Es folgten mehrere Waschschrte, wonach die Bindung von Plasminogen durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert wurde. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils als Triplikat durchgeführt. ***) $p \leq 0,001$. (**B**) Zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit der Bindung wurden 500 ng an p41 (\blacksquare) sowie BBA70 (\blacktriangle) immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen an Plasminogen inkubiert, wonach Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum detektiert wurde. Bindungskurven wurden mittels nichtlinearer Regression, basierend auf einem einfachen Bindungsmodell kalkuliert.

3.5.3 Beteiligung von Lysin-Resten und Einfluss der Ionenstärke auf die p41-Plasminogen-Interaktion

Plasminogen interagiert mit den Lysin-Resten einer Reihe von humaner Rezeptoren, welche von Lysin-Bindestellen in den Kringle-Domänen von Plasminogen gebunden werden [224]. Inwiefern Lysin-Reste bzw. die Ionenstärke an der Bindung von Plasminogen an p41 beteiligt sind, wurde in weiterführenden Experimenten analysiert. Hierzu wurde p41 auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit Plasminogen inkubiert, wobei entweder steigende Konzentrationen des Lysin-Analogons Tranexamsäure oder Natriumbromid (NaBr) zugesetzt wurden. Die Bindung von Plasminogen wurde anschließend durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum detektiert.

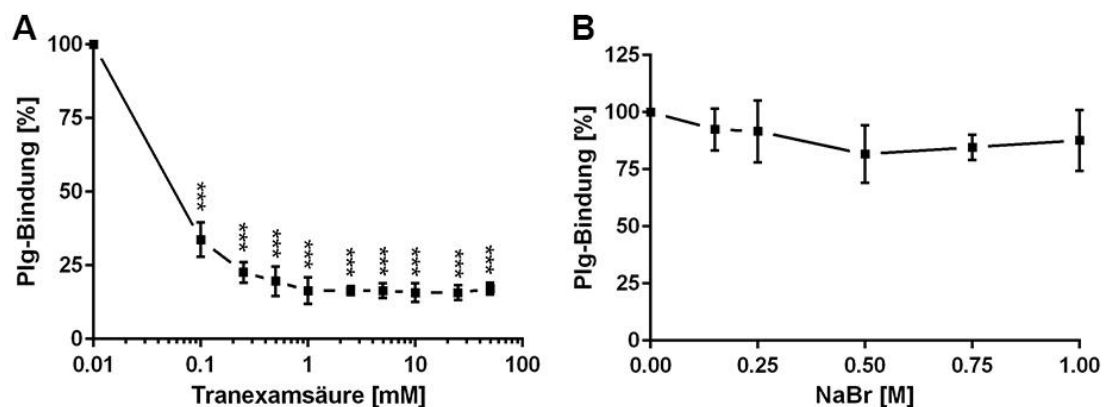


Abb. 21. Einfluss von Lysin-Resten und Ionenstärke auf die p41-Plasminogen-Interaktion. p41 (500 ng) wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit je 1 μ g Plasminogen, unter Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen des Lysin-Analogons Tranexamsäure (A) oder NaBr (B) inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe, wonach die Bindung von Plasminogen wurde mit einem polyklonales anti-Plasminogen Antiserum detektiert. Die Bindung von Plasminogen an p41 in Abwesenheit von Tranexamsäure und NaBr wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Triplikat durchgeführt wurden. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. ***) $p \leq 0,001$.

Die Inkubation mit Tranexamsäure führte bereits bei einer Konzentration von 100 nM zu einer signifikanten Abnahme der Bindung von Plasminogen an p41 (Abb. 21 A). Ab einer Konzentration von 1 mM Tranexamsäure lag die Plasminogen-Bindung bei lediglich 16% des Ausgangswertes. Höhere Konzentrationen von Tranexamsäure führten zu keiner weiteren Reduktion.

Demnach sollte die Interaktion von p41 mit Plasminogen auf Wechselwirkungen mit Lysin-Resten beruhen. Interessanterweise zeigte die Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von NaBr keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von Plasminogen an p41. Selbst bei einer Konzentration von 1 M NaBr lag die Bindung von Plasminogen noch bei 88% des Ausgangswertes (Abb. 21 B).

3.5.4 Lokalisation der Plasminogen-Bindedomäne im p41-Molekül

Zur Lokalisierung der Plasminogen-Bindedomäne im p41-Molekül wurde zunächst eine Analyse der Sekundärstruktur durchgeführt (NetSurfP, Technische Universität Dänemark), um C-terminal verkürzte Konstrukte von p41 zu generieren (Abb. 22).

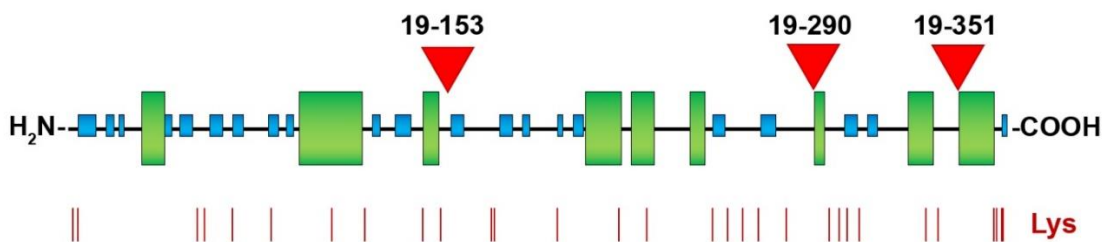


Abb. 22. Vorausgesagte Sekundärstruktur des p41-Moleküls. Zur Vorhersage der Sekundärstruktur des p41-Proteins wurde NetSurfP von der Technischen Universität Dänemark verwendet. Grün hinterlegte Bereiche bilden mit hoher Wahrscheinlichkeit α -Helices aus, während blau hinterlegte Bereiche β -Faltblattstrukturen repräsentieren. Rote Linien zeigen die Verteilung von Lysin-Resten über das p41-Molekül. Der Sequenzanalyse liegt die in der BioCyc Datenbank hinterlegte Sequenz HMPREF0010_01565 zugrunde, welche jedoch am 3'-Ende unvollständig war und daher im Rahmen dieser Arbeit sequenziert wurde (Anhang). Es wurden C-terminal verkürzte Konstrukte generiert, deren Abfolge von Aminosäuren nach Aminosäure-Rest Q351, Aminosäure-Rest P290 sowie Aminosäure-Rest A153 endeten. Die jeweiligen Positionen sind durch rote Dreiecke markiert.

Mit spezifischen Starteroligonukleotiden (Tab. 13) wurde nach den Kodons für die Aminosäure-Reste Q351 sowie P290 ein Stoppkodon eingeführt. Für die PCR wurde das Plasmid pQE-p41 19606 als Matrize verwendet (Abschnitt 3.3.1), welches das p41-kodierende Gen des *A. baumannii* Referenzstammes ATCC 19606 enthielt. Um die Konstrukte p41₁₉₋₃₅₁ und p41₁₉₋₂₉₀ zu generieren,

wurde das Starteroligonukleotid pQE-FP 30 in Kombination mit den jeweils spezifischen Starteroligonukleotiden p41-351(-) und p41-290(-) eingesetzt. Nach Durchführung der PCR wurden die Amplifikate aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I hydrolysiert. Nach Aufreinigung der enzymatischen Reaktionen wurden die Amplifikate in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Sal*I hydrolysierten Vektor pQE-30 Xa ligiert. Kompetente *E. coli* JM109-Zellen wurden mit den Ligationsreaktionen transformiert und positive Klone auf mit Ampicillin supplementierten LB-Agarplatten selektioniert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse mit *Bam*HI und *Sal*I auf das Vorhandensein der erwarteten, inserierten DNA-Fragmente hin untersucht. Ausgewählte Plasmide wurden sequenziert, um zu überprüfen, ob die Nukleotidsequenzen die gewünschten Stoppkodons im korrekten Leserahmen enthielten. Bei der Auswertung der Sequenzen fiel auf, dass in einem Fall ein zufälliges Stoppkodon durch die *Taq* DNA-Polymerase generiert wurde, was zu einem Translationsabbruch nach Aminosäure-Rest A153 führte. Zusammen mit den beiden Konstrukten p41₁₉₋₃₅₁ und p41₁₉₋₂₉₀ wurde dieses zufällig generierte Konstrukt p41₁₉₋₁₅₃ für weitere Versuche eingesetzt. Die betreffenden Proteine wurden in *E. coli* produziert und per Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (2.13.4).

Jeweils 500 ng der C-terminal verkürzten Proteine sowie p41 wurden schließlich per SDS-PAGE aufgetrennt, um den Reinheitsgrad der Aufreinigung zu überprüfen. Die apparenten molekularen Massen der mittels Silberfärbung visualisierten Proteine in Abb. 23 korrespondieren mit den abgeleiteten molekularen Massen der einzelnen p41-Konstrukte. Für die Berechnung der molekularen Masse wurde die N-terminale Hexahistidin-Sequenz sowie die Sequenz der Faktor Xa Proteaseschnittstelle mit berücksichtigt. Diese abgeleiteten molekularen Massen betragen für p41 41,5 kDa, für p41₁₉₋₃₅₁ 37,9 kDa, für p41₁₉₋₂₉₀ 31,3 kDa und für p41₁₉₋₁₅₃ 17,2 kDa. Die Proteine wiesen nur geringe Verunreinigungen auf und wurden daher für nachfolgende Experimente verwendet.

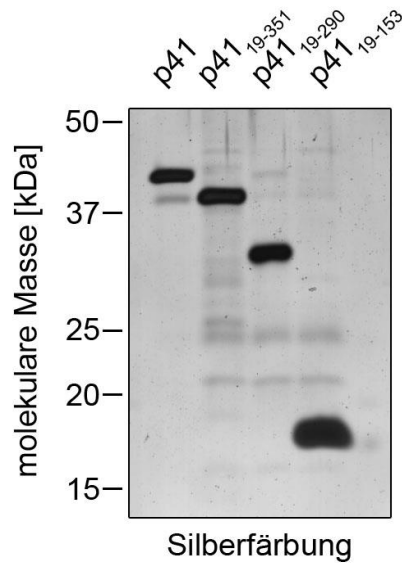


Abb. 23. Silberfärbung von C-terminal verkürzten p41 Konstrukten. 500 ng p41 sowie C-terminal verkürzte p41 Konstrukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung visualisiert. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Die drei C-terminalen Deletionskonstrukte wurden zunächst auf ihre Bindung an Plasminogen getestet (Abschnitt 2.14.2). Dabei wurden äquimolare Mengen der verkürzten Proteine, bezogen auf intaktes p41, auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde mit 1 µg Plasminogen pro Kavität inkubiert. Die Plasminogen-Bindung wurde mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum detektiert. Aus Abb. 24 geht hervor, dass bereits eine Verkürzung um 18 Aminosäuren (Konstrukt p41₁₉₋₃₅₁) in einer statistisch signifikanten Reduktion der Bindung von Plasminogen resultierte. Basierend auf diesen Daten ist anzunehmen, dass die Bindedomäne für Plasminogen im C-Terminus des p41-Moleküls lokalisiert sein sollte.

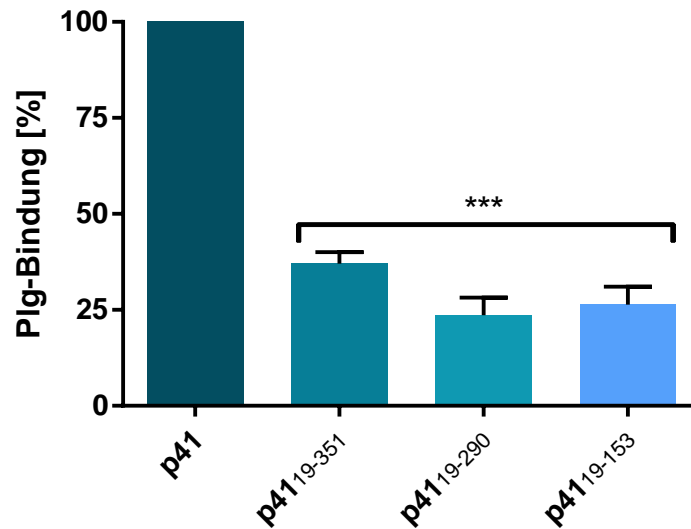


Abb. 24. Plasminogen-Bindung an C-terminal verkürzte p41 Konstrukte. p41 (500 ng) sowie äquimolare Mengen der C-terminal verkürzten p41-Konstrukte (bezogen auf intaktes p41) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert. Die Bindung von Plasminogen an intaktes p41 wurde auf 100% gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen, jeweils als Triplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder. (***) $p \leq 0,001$.

Da nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, dass sich durch die Deletionen die Topologie des p41-Proteins soweit verändert, dass die Konstrukte aus diesem Grund kein Plasminogen mehr binden konnten und um gleichzeitig Aufschluss über die an der Bindung beteiligten Aminosäure-Reste zu bekommen, wurde nachfolgend eine *in vitro* Mutagenese ausgewählter C-terminaler Aminosäure-Reste durchgeführt. Der C-Terminus umfasst zwei Lysin-Reste, K365 und K366, gefolgt von einem Prolin-Rest und zwei weiteren Lysin-Resten, K368 und K369 (Abb. 25).

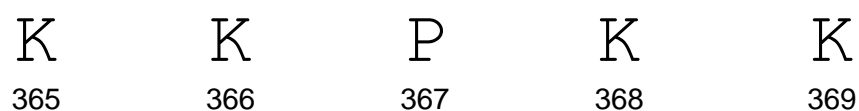


Abb. 25. C-terminale Aminosäuresequenz von p41. Gezeigt sind die letzten fünf, am C-Terminus lokalisierten, Aminosäure-Reste.

Durch Inhibition der Plasminogen-Bindung mit Tranexamsäure (Abschnitt 3.5.3) konnte bereits demonstriert werden, dass Lysin-Reste wahrscheinlich an der Bindung beteiligt sind. Daher wurden die vier C-terminalen Lysin-Reste für eine gezielte Substitution durch Alanin ausgewählt.

Ziel der Mutagenese war es, p41 Konstrukte zu generieren, welche einzelne Substitutionen (K365A, K366A, K368A und K369A), doppelte Substitutionen (K365A/K366A und K368A/K369A) sowie eine vierfache Substitution aller Lysin-Reste gegen Alanin (K365A-K369A) enthielten. Die entsprechenden Substitutionen wurden durch die Verwendung spezifischer Starteroligonukleotide eingeführt (Tab. 13), durch welche die Nukleotidabfolge der jeweiligen Ausgangsplasmide so verändert wurden, dass die entsprechenden Lysin-Reste durch Alanin-Reste ersetzt wurden. In einzelnen Fällen war der vom Hersteller empfohlene Reaktionsansatz mit zwei überlappenden Starteroligonukleotiden für die *in vitro* Mutagenese nicht erfolgreich. In diesen Fällen wurden modifizierte Starteroligonukleotide mit 3'-Überhängen nach einer Methode von Zheng et al. generiert [288].

Für den Austausch einzelner Aminosäure-Reste sowie der zweifachen Substitution K368A/K369A diente das Ausgangsplasmid pQE-p41 19606 als Matrize. Für den Austausch K365A/K366A wurde das Plasmid pQE-p41 K365A verwendet und für die Generation der vierfachen Substitution K365A-K369A wurde schließlich das Plasmid pQE-p41 K368/K369 als Matrize eingesetzt. Für die einzelnen *in vitro* Mutagenese-Reaktionsansätze wurden die HiFi DNA-Polymerase der Firma PCR Biosystems sowie die entsprechenden Starteroligonukleotide in unterschiedlichen Kombinationen verwendet. Die Extensionszeit betrug für alle Ansätze 7 min. Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsansätze mit 20 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* inkubiert, welche spezifisch methylierte DNA hydrolysiert und somit die Matrizen-DNA spaltet.

Im Anschluss an die Hydrolyse mit *DpnI* wurden kompetente *E. coli* JM109-Zellen mit den entsprechenden Reaktionsansätzen transformiert und positive Klone auf Ampicillin-supplementierten LB-Agarplatten selektioniert. Plasmid-DNA von den selektionierten *E. coli*-Zellen wurde isoliert und sequenziert, um

sicherzustellen, dass die Plasmide die gewünschte Substitution trugen. Im Anschluss wurden alle Proteine wie unter Abschnitt 2.13.4 beschrieben in *E. coli* produziert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die einzelnen, modifizierten, Proteine sowie p41 per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es folgte eine Far-Westernblot-Analyse (vergleiche 2.14.1) mit welcher initial die Fähigkeit der einzelnen Proteine, Plasminogen zu binden, untersucht wurde.

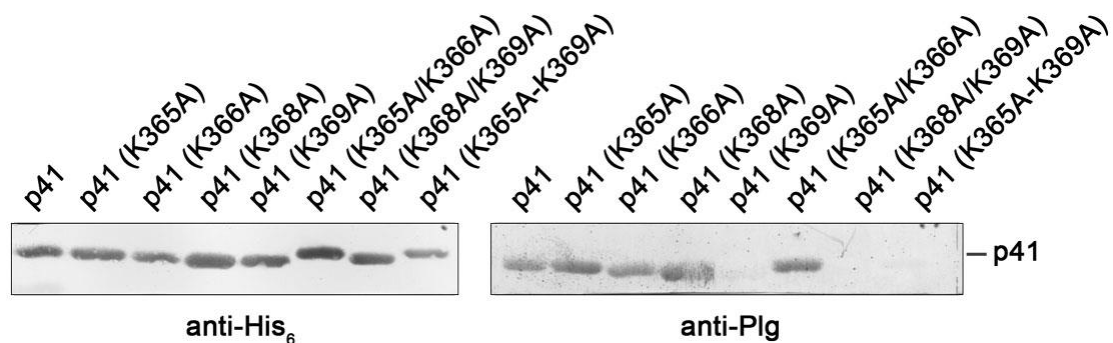


Abb. 26. Bindung von Plasminogen an modifizierte p41-Proteine. p41 bzw. modifizierte Proteine (500 ng) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mittels Westernblot-Analyse wurden alle Proteine nach Inkubation mit einem monoklonalen anti-Hexahistidin Antikörper visualisiert (anti-His₆, 1:3000, linke Abbildung). Die Evaluation der Plasminogen-Bindung an die mutagenisierten Proteine erfolgte mittels Far-Westernblot-Analyse. Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Membran mit 20 µg/ml Plasminogen inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe, wonach gebundenes Plasminogen durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg, 1:1000) detektiert wurde (rechte Abbildung).

Aus Abb. 26 geht hervor, dass sowohl die vierfache Substitution K365A-K369A als auch die doppelte Substitution K368A/K369A sowie die einzelne Substitution K369A zu einem vollständigen Verlust der Plasminogen-Bindung in der Far-Westernblot-Analyse führte. Diese Versuche indizieren, dass der Lysin-Rest an Position 369 essentiell für die Bindung von Plasminogen an p41 ist. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und gleichzeitig das Bindungsverhalten der modifizierten Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen zu untersuchen, wurde die Bindung von Plasminogen zusätzlich mittels ELISA untersucht (2.14.2). Dabei wurden die gereinigten Proteine auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde mit 1 µg

Plasminogen inkubiert. Im Anschluss wurde gebundenes Plasminogen durch Inkubation mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum detektiert.

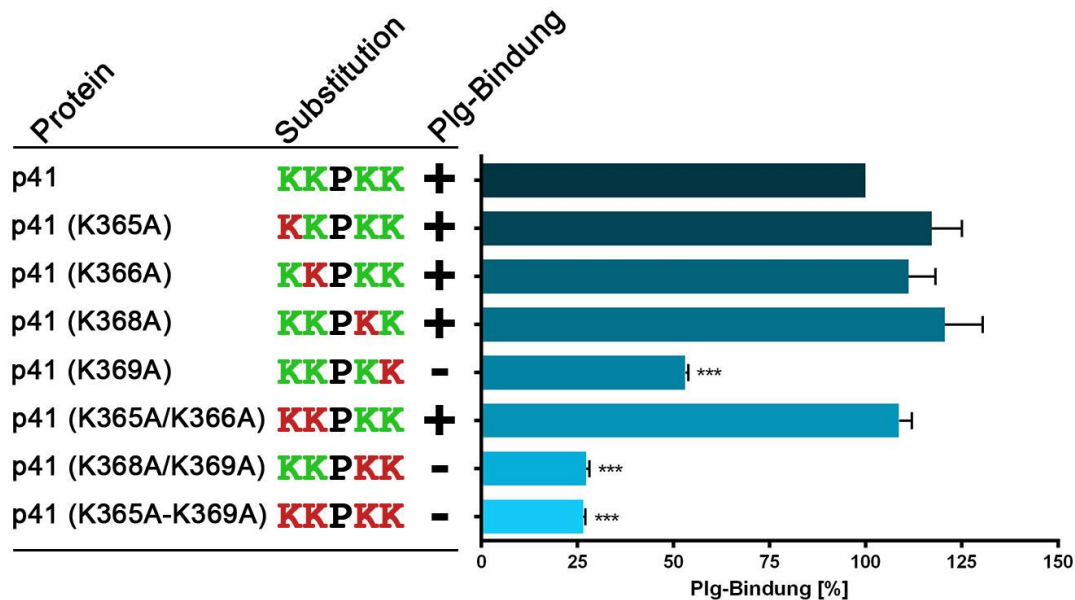


Abb. 27. Bindung von Plasminogen an p41 und modifizierte Proteine mittels ELISA. Gereinigtes p41 oder die modifizierten Proteine (500 ng) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Absättigung freier Bindungsstellen mit 1 µg Plasminogen pro Vertiefung inkubiert. Im Anschluss wurde Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert. Bindung von Plasminogen an gereinigtes, nicht-modifiziertes p41 wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt als Triplikat. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. (***) p ≤ 0,001.

Die Ergebnisse dieser Bindungsversuche sind in Abb. 27 zusammengefasst. Eine signifikante Reduktion der Plasminogen-Bindung konnte bei Proteinen nachgewiesen werden, die entweder eine vierfache Substitution (K365A-K369A), eine zweifache Substitution (K368A/K369A) bzw. eine Substitution an Position K369 aufwiesen. Diese Daten bestätigten die mit der Far-Westernblot-Analyse gewonnenen Ergebnisse und unterstreichen die essentielle Bedeutung des Lysin-Restes K369 für die Bindung von Plasminogen an p41.

3.5.5 Identifizierung der an der p41 Interaktion beteiligten Kringle-Domänen von Plasminogen

Wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, besteht Plasminogen aus sechs distinkten Domänen (Abb. 3). Im Anschluss an das N-terminale Präaktivierungspeptid folgen fünf sogenannte Kringle-Domänen, während die Proteasedomäne im C-terminalen Bereich des Moleküls lokalisiert ist. Plasminogen-Fragmente, bestehend aus verschiedenen Kringle-Domänen sowie der Proteasedomäne wurden freundlicherweise von Prof. Dr. P. F. Zipfel (Leibniz-Institut, Jena) zur Verfügung gestellt. Diese Fragmente wurden auf Bindung an p41 untersucht (2.14.2). p41 wurde auf einer Mikrotiterplatte über Nacht immobilisiert. Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurden äquimolare Mengen der einzelnen Plasminogen-Fragmente oder Gelatine (Negativkontrolle) zugesetzt. Es folgten mehrere Waschschrte, wobei die Bindung durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum detektiert wurde.

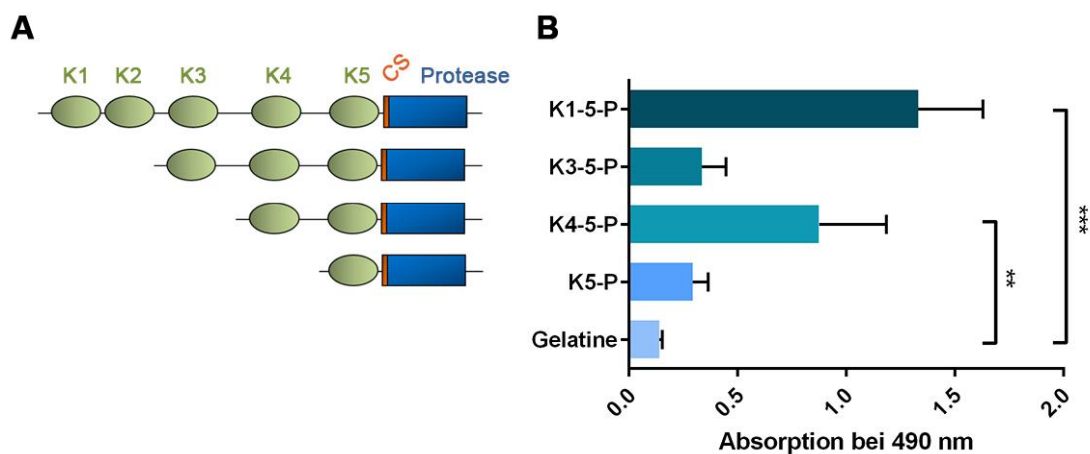


Abb. 28. Identifizierung der mit p41 interagierenden Kringle-Domänen von Plasminogen. p41 (500 ng) wurde auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit äquimolaren Mengen der einzelnen Plasminogen-Fragmente inkubiert. Bindung von Plasminogen wurde nach gründlichem Waschen mit einem polyklonales anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert. **(A)** Schematische Übersicht der eingesetzten Plasminogen-Fragmente. K1-K5: Kringle-Domänen 1 bis 5. CS: „Cleavage site“, Spaltstelle für die Aktivatoren t-PA und u-PA. **(B)** Bindung von Plasminogen-Fragmenten an p41. K1-5-P: Kringle-Domänen 1 bis 5 mit Proteasedomäne, K3-5-P: Kringle-Domänen 3 bis 5 mit Proteasedomäne, K4-5-P: Kringle-Domänen 4 bis 5 mit Proteasedomäne, K5-P: Kringle-Domäne 5 mit Proteasedomäne. Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Triplikat. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Mittelwerte. **) $p \leq 0,01$ und ***) $p \leq 0,001$.

Abb. 28 zeigt die Ergebnisse der Bindung der Plasminogen-Fragmente an gereinigtes p41. Fragment K1-5-P, bestehend aus den Kringle-Domänen 1 bis 5 sowie der Proteasedomäne zeigte die stärkste Bindung an p41. Für Fragment K4-5-P konnte ebenfalls eine signifikante Bindung an p41 nachgewiesen werden. Bei den beiden Fragmenten K3-5-P, bestehend aus Kringle-Domänen 1 bis 3 sowie der Proteasedomäne und K5-P, bestehend aus Kringle-Domäne 5 und Proteasedomäne zeigte sich keine Bindung an p41. Ein Fragment, welches die Kringle-Domänen 2 bis 5 sowie die Proteasedomäne enthält, ließ sich nicht rekombinant herstellen und stand daher für diese Analysen nicht zur Verfügung. Basierend auf diesen Interaktionsstudien kann angenommen werden, dass die Kringle-Domänen 1 und 4 eine wichtige Rolle für die Interaktion von Plasminogen mit p41 spielen.

Nachdem p41 als neues Plasminogen-bindendes Protein sowie die an der Interaktion mit Plasminogen beteiligten Aminosäure-Reste identifiziert werden konnten, sollte in den folgenden funktionellen Analysen demonstriert werden, dass an p41 gebundenes Plasminogen für den Aktivator u-PA zugänglich ist und aktives, an p41 gebundenes Plasmin seine proteolytische Aktivität entfaltet.

3.5.6 Fibrinolyse durch p41-gebundenes, aktiviertes Plasmin

Fibrinogen ist das physiologische Substrat der Serinprotease Plasmin. Mit Hilfe des Fibrinogen-Degradations-Assays (2.16.4) sollte gezeigt werden, dass an p41 gebundenes Plasminogen für u-PA zugänglich ist und zu aktivem Plasmin umgesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden p41 und BBA70, welches als Positivkontrolle diente, sowie BSA (Negativkontrolle) auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde mit 1 µg Plasminogen pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurde ein Reaktionsmix bestehend aus dem Aktivator u-PA sowie 20 µg/ml Fibrinogen zugesetzt. Die Reaktionen wurden bei 37 °C inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitintervallen durch Zugabe von Inkubationspuffer abgestoppt. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, erfolgte eine Westernblot-Analyse, wobei die

Degradationsprodukte von Fibrinogen durch ein polyklonales anti-Fibrinogen Antiserum detektiert wurden.

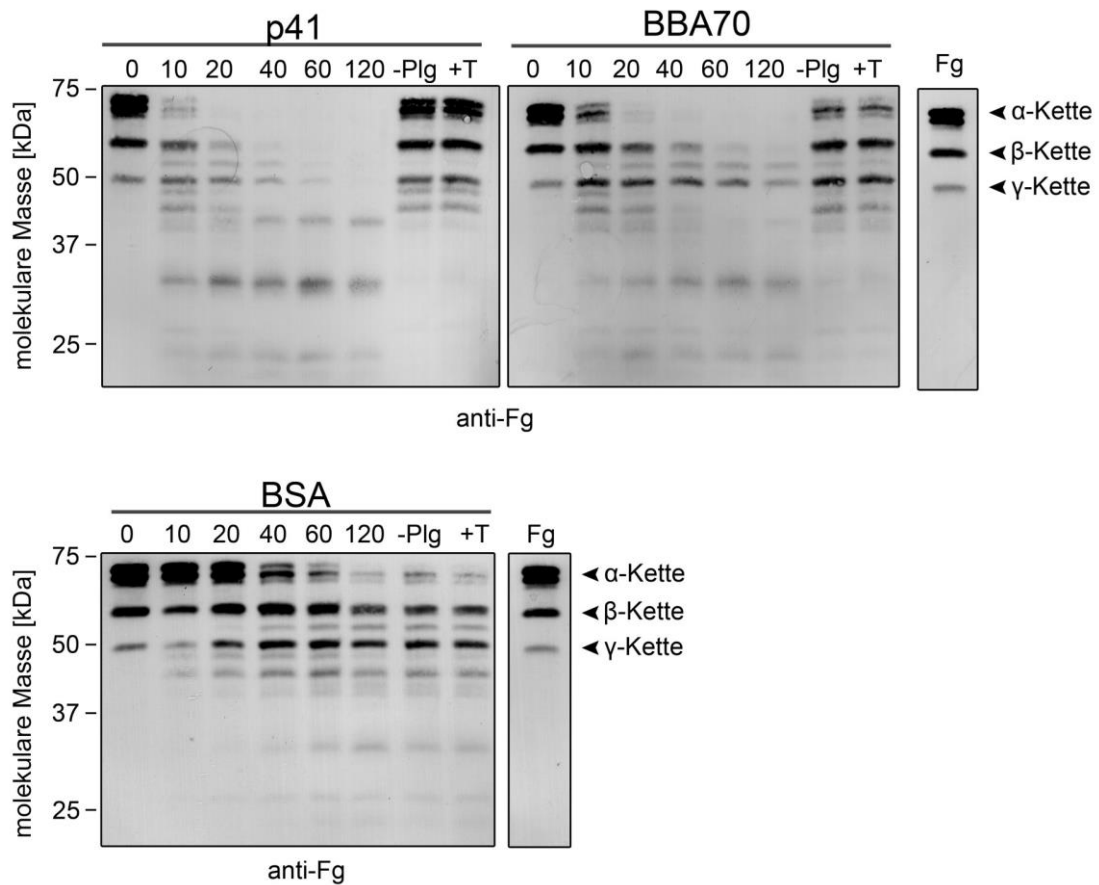


Abb. 29. Degradation von Fibrinogen durch p41-gebundenes Plasmin. p41, BBA70 sowie BSA (500 ng) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Die freien Bindungsstellen wurden blockiert und anschließend wurde pro Vertiefung 1 μg Plasminogen zugesetzt. Danach wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibrinogen sowie dem Aktivator u-PA hinzugegeben und bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Reaktionen abgestoppt und die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt. Fibrinogen und die Degradationsprodukte konnten durch ein polyklonales anti-Fibrinogen Antiserum (anti-Fg, 1:1000) detektiert werden. Reaktionsansatz ohne Plasminogen (-Plg), Inkubation mit Plasminogen und 50 mM Tranexamsäure (+T), Fibrinogen (Fg). Die Inkubationszeiträume sind in Minuten angegeben. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist jeweils links angegeben.

Aus Abb. 29 geht hervor, dass Plasminogen gebunden an p41 und BBA70 durch den Aktivator u-PA zu Plasmin umgesetzt wurde und nachfolgend Fibrinogen abbaute. Die Aktivierung zu Plasmin führte bereits nach 20 min zu einer kompletten Degradation der Fibrinogen α -Kette, während in Reaktionsansätzen mit p41 auch die Fibrinogen β - und γ -Ketten nach 60 min

nahezu vollständig degradiert wurden. Gleichzeitig ließen sich spezifische Abbauprodukte von etwa 31 und 24 kDa detektieren. Diese Untersuchungen zeigen, dass an p41-gebundenes Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden kann, was in einer deutlichen Proteolyse von Fibrinogen resultierte. Bei BSA konnte diese prominente Degradation von Fibrinogen nicht beobachtet werden.

3.5.7 Degradation der Komplementkomponente C3b durch p41-gebundenes Plasmin

Aufgrund seiner relativ breiten Substratspezifität kann Plasmin eine Reihe von unterschiedlichen Proteinen degradieren, u. a. auch die zentrale Komplementkomponente C3b [244]. In weitergehenden Versuchen sollte geprüft werden, ob an p41 gebundenes Plasmin in der Lage ist, ebenfalls C3b abzubauen. Hierzu wurde ein C3b-Degradations-Assay durchgeführt (Abschnitt 2.16.5). Dabei wurden p41 sowie BBA70 und BSA auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Blockieren von unspezifischen Bindestellen erfolgte die Zugabe von 1 µg Plasminogen pro Vertiefung. Im Anschluss an die Inkubation wurde ein Reaktionsmix bestehend aus dem Aktivator u-PA und 20 µg/ml C3b hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 37 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von Inkubationspuffer für die SDS-PAGE terminiert. Nach Auftrennung der Proben und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte eine Westernblot-Analyse, wobei C3b sowie dessen Degradationsprodukte mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum nachgewiesen wurden.

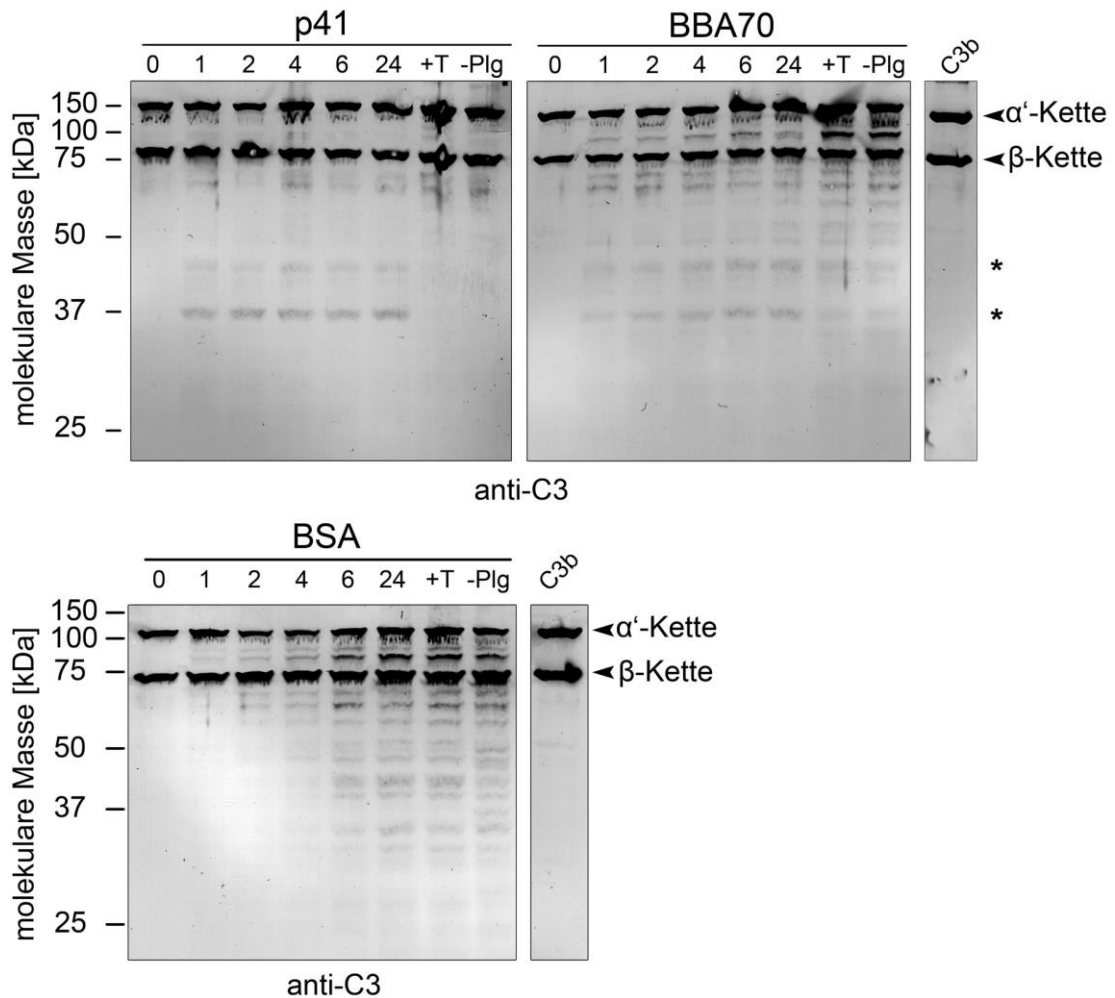


Abb. 30. Degradation von Komplement C3b durch p41-gebundenes Plasmin. p41, BBA70 sowie BSA (500 ng) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindestellen wurde mit 1 μ g Plasminogen pro Vertiefung inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte, wonach ein Reaktionsmix bestehend aus dem Aktivator u-PA sowie 20 μ g/ml C3b zugesetzt wurde. Die Reaktionen wurden bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten (Inkubationszeiträume sind in Stunden angegeben) durch Zugabe von Inkubationspuffer für die SDS-PAGE terminiert. Nach Auftrennung der Proteine und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran konnten C3b und dessen Degradationsprodukte in der Westernblot-Analyse durch ein polyklonales anti-C3 Antiserum detektiert werden. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche. Spezifische Abbauprodukte mit apparenten molekularen Massen von 37 kDa und 43 kDa sind durch Sterne markiert. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist jeweils links angegeben.

Wie in Abb. 30 zu erkennen, führte das an p41 und BBA70 gebundene, aktivierte Plasmin zur Spaltung von C3b und zur Generation spezifischer Abbauprodukte mit apparenten molekularen Massen von 37 kDa und 43 kDa (markiert durch Sterne in Abb. 30). Für BSA ließ sich kein prominenter Abbau von C3b beobachten. Die Ergebnisse des C3b-Degradations-Assays lassen

vermuten, dass p41 durch Bindung von Plasminogen und der nachfolgenden Aktivierung zu Plasmin das Komplementsystem auf der Stufe der C3-Aktivierung negativ regulieren kann.

3.5.8 Inhibitorische Wirkung von p41 auf humanes Komplement

Um die Auswirkung von p41 auf das humane Komplementsystem eingehender zu untersuchen, wurde eine Reihe von Zell-basierenden, hämolytischen Tests durchgeführt (vergleiche Abschnitt 2.14.3). Diese Tests sollten Aufschluss über die inhibitorische Aktivität von p41 auf den alternativen, den klassischen sowie auf den terminalen Weg geben. Dabei wurde p41 initial in unterschiedlicher Konzentration mit NHS-Mg-EGTA (alternativer Weg) oder NHS (klassischer Weg) vorinkubiert. Zur Untersuchung des alternativen Weges dienten Kaninchenerythrozyten. Um eine gleichzeitige Aktivierung des klassischen Weges zu unterbinden und falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde Mg-EGTA-Puffer verwendet. Um den Effekt von p41 auf den klassischen Weg zu untersuchen, wurden mit Ambozeptor behandelte Schaferythrozyten eingesetzt, die nicht den alternativen Weg aktivieren. Anstelle von NHS wurden gereinigte Komplementkomponenten zur Untersuchung des terminalen Weges verwendet. Dabei wurde p41 mit C7, C8 und C9 vorinkubiert und schließlich mit Schaferythrozyten versetzt, welche mit dem C5b-6 Komplex vorbehandelten wurden.

Falls p41 inhibitorische Aktivität auf die zu untersuchenden Aktivierungswege ausübt, dann sollten die Erythrozyten vor Komplement-vermittelter Lyse geschützt sein. Sollte p41 keinen Einfluss auf die untersuchten Aktivierungswege besitzen, dann würde es nach Inkubation zu einer Freisetzung von Hämoglobin kommen, die sich photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 414 nm ermitteln lässt. Um die maximale Hämolyse im alternativen und klassischen Weg zu bestimmen, wurden Erythrozyten jeweils mit unbehandeltem NHS inkubiert. Zur Bestimmung der maximalen Hämolyse im terminalen Weg wurden mit C5b-6 vorbehandelte Schaferythrozyten mit C7, C8 und C9 inkubiert. Als Positivkontrollen dienten die natürlichen Regulatoren der jeweiligen Aktivierungswege: Für den

alternativen Weg wurden FH und FI verwendet, für die Untersuchung des klassischen Weges C4BP und FI, und für den terminalen Weg der Komplementinhibitor Vitronektin.

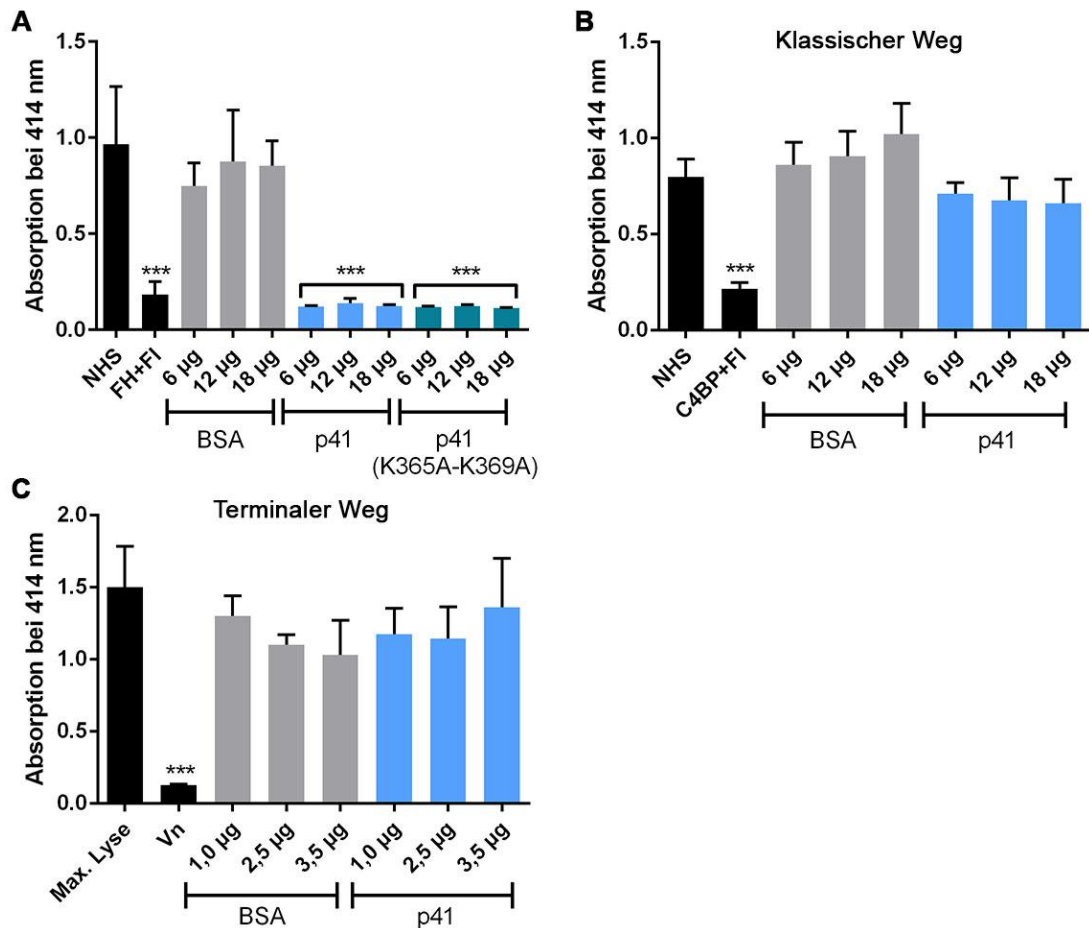


Abb. 31. Inhibition von Komplement durch p41 im Zell-basierten hämolytischen Assay.

(A) Inhibition des alternativen Weges. Unterschiedliche Mengen an p41, p41 (K365A-K369A) sowie BSA wurden mit 7,5% (v/v) NHS in Mg-EGTA Puffer vorinkubiert. Nach Zugabe von 50 µl einer Suspension von Kaninchenerythrozyten wurde für weitere 30 min inkubiert. Die Erythrozyten wurden im Anschluss durch Zentrifugation sedimentiert und die Absorption der Überstände bei 414 nm wurde ermittelt. (NHS) Maximale Hämolyse, (FH+FI) Regulatoren des alternativen Weges (je 5 µg) wurden als Positivkontrolle eingesetzt. (B) Untersuchung des Einflusses von p41 auf den klassischen Weg. Steigende Mengen von p41 und BSA wurden mit 50 µl einer 1:30 Verdünnung von NHS in GVB⁺⁺-Puffer vorinkubiert. Im Anschluss wurden 30 µl einer Suspension von sensitivierten Schaferythrozyten zugesetzt und weitere 30 min inkubiert. Nach Sedimentierung der Erythrozyten durch Zentrifugation wurde die Absorption der Überstände bei 414 nm ermittelt. (NHS) Maximale Hämolyse, (C4BP+FI) Regulatoren des klassischen Weges dienten als Positivkontrolle (je 5 µg). (C) Untersuchung des Einflusses von p41 auf den terminalen Weg. Steigende Mengen an p41 und BSA wurden mit C7, C8 und C9 vorinkubiert. Anschließend wurden 30 µl einer einer Suspension von C5b-6 vorbehandelten Schaferythrozyten zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Erythrozyten wurden durch Zentrifugation sedimentiert und die Absorption der Überstände bei 414 nm wurde ermittelt. (NHS) Maximale Hämolyse, (Vn) Vitronektin (2,5 µg) diente als Positivkontrolle. Balkendiagramme zeigen Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. (***) $p \leq 0,001$.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 31 (vorherige Seite) zusammengefasst. In vorgehenden Versuchen mit Proteinen von *B. burgdorferi* konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 40-120 µg/ml ausreichen, um einen Komplement-inhibitorischen Effekt im hämolytischen Assay zu beobachten [181], daher wurden entsprechende Konzentrationen von p41 eingesetzt. Während p41 im hämolytischen Assay keinen Einfluss auf den klassischen sowie den terminalen Weg zeigte, ist in Abb. 31 A deutlich zu sehen, dass der alternative Weg bereits mit der Zugabe von 6 µg p41 signifikant inhibiert wurde, was einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Um herauszufinden, ob dieser drastische Effekt mit der Bindung von humanem Plasminogen durch p41 korreliert, wurde zusätzlich p41 mit der vierfachen Aminosäuresubstitution K365A-K369A untersucht. Dieses modifizierte Protein war in vorhergehenden Versuchen nicht in der Lage, Plasminogen zu binden (Abschnitt 3.5.4). Überraschenderweise war auch p41 (K365A-K369A) dazu in der Lage, den alternativen Weg in gleicher Weise wie p41 zu inhibieren.

3.5.9 Bindung von Komplementkomponenten an p41

Da der im hämolytischen Test beobachtete inhibitorische Effekt von p41 auf den alternativen Weg vermutlich nicht auf der Bindung von Plasminogen basierte (vergleiche 3.5.8), wurde im Weiteren die Bindung von Komplementkomponenten des alternativen Wegs (C3 und C3b) sowie von C5 an p41 mittels ELISA untersucht (2.14.2). Dazu wurden 500 ng gereinigtes p41 und Gelatine (Negativkontrolle) auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer abgesättigt und schließlich wurde pro Vertiefung 1 µg der gereinigten Komplementkomponenten C3, C3b oder C5 zugesetzt. Nach Inkubation wurde Bindung der Komplementkomponenten mittels spezifischer polyklonaler Antiseren detektiert. Wie in Abb. 32 zu erkennen, band p41 an die Komplementkomponenten des alternativen Weges C3, C3b sowie C5.

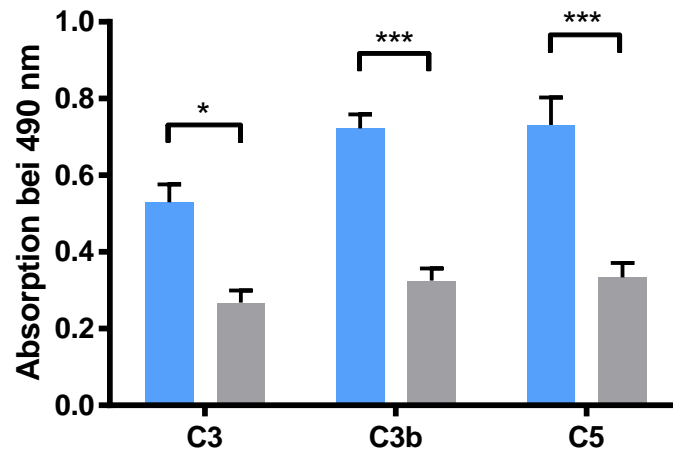


Abb. 32. Bindung von Komplementkomponenten an p41. Gereinigtes p41 (■) sowie Gelatine (■) als Negativkontrolle wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach dem Blockieren freier Bindestellen wurde mit 1 µg pro Vertiefung C3, C3b oder C5 inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde Bindung von C3 und C3b mit einem polyklonalen anti-C3 Antiserum (1:1000) und Bindung von C5 mit einem polyklonalen anti-C5 Antiserum (1:1000) detektiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, als Triplikat durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Mittelwerte. *) $p \leq 0,05$, ***) $p \leq 0,001$.

Da p41 C3, C3b und C5 bindet, sollte im weiteren Verlauf geklärt werden, ob die Interaktion mit den Komplementkomponenten sowie mit Plasminogen über überlappende oder distinkte Bindungsstellen erfolgt. Hierzu wurden kompetitive ELISA-Experimente durchgeführt (2.14.2). Nach Immobilisieren von p41 wurden pro Vertiefung 1 µg Plasminogen oder 1 µg der Komplementkomponenten C3, C3b oder C5 zugesetzt. Parallel wurde Plasminogen zusammen mit äquimolaren Mengen von C3, C3b oder C5 zugesetzt. Nach Inkubation wurde in den parallelen Reaktionsansätzen entweder Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum oder Bindung von Komplementkomponenten mit den entsprechenden polyklonalen Antiseren detektiert. Plasminogen als auch C3, C3b oder C5 konnten simultan an p41 binden, sodass vermutet werden kann, dass die Bindungsstellen für Plasminogen und die jeweiligen Komplementkomponenten nicht miteinander überlappen (Abb. 33).

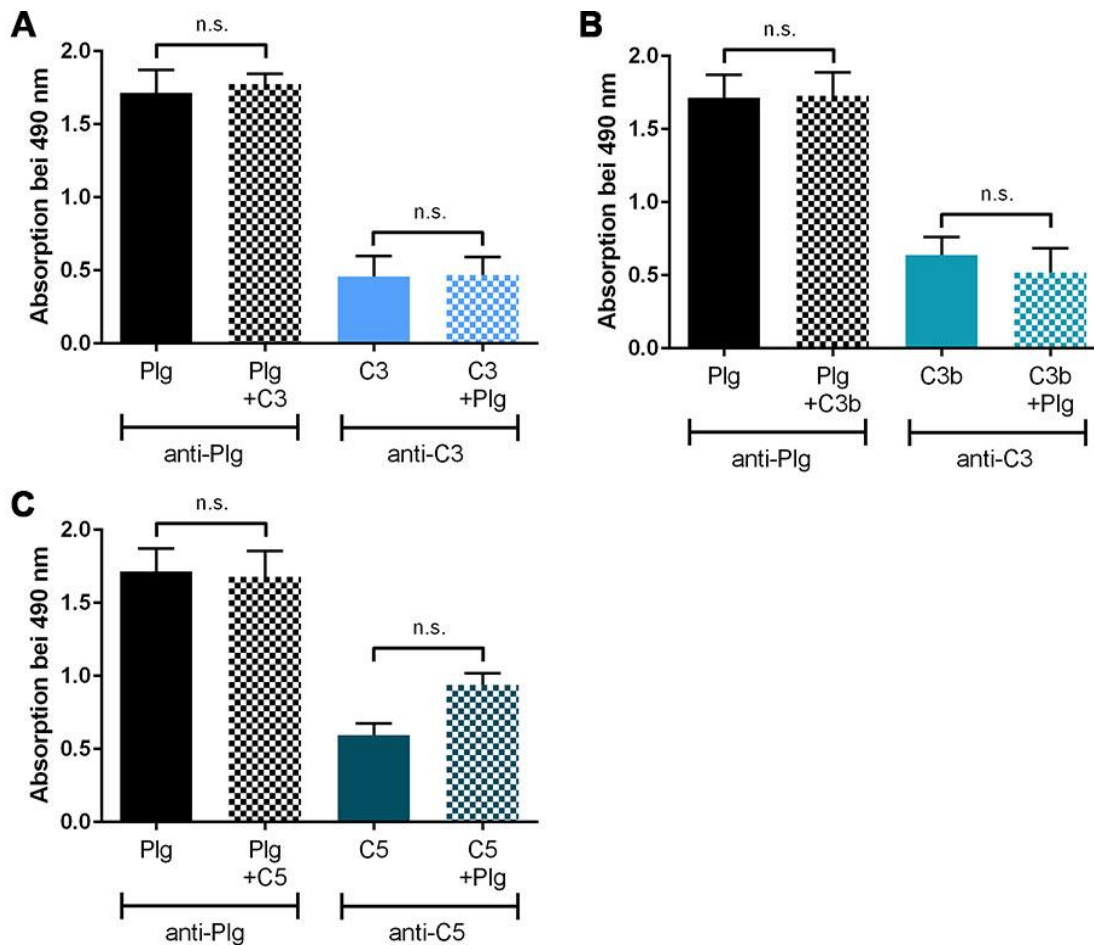


Abb. 33. Simultane Bindung von Plasminogen und Komplementkomponenten an p41. p41 (500 ng) wurde auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen erfolgte die Zugabe von 1 µg Plasminogen (■), 1 µg C3 (■), 1 µg C3b (■) oder 1 µg C5 (■) (ausgefüllte Balken) bzw. die Zugabe von Plasminogen, zusammen mit äquimolaren Mengen der jeweiligen Komplementkomponenten (gemusterte Balken). Reaktionsansätze wurden für 1 h bei RT inkubiert. In parallelen Ansätzen wurde danach entweder die Bindung von Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg) oder die Bindung der Komplement-komponenten C3, C3b (anti-C3) bzw. C5 (anti-C5) detektiert. Gezeigt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen, jeweils als Triplikat durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Mittelwerte. Abweichungen der Mittelwerte waren in der statistischen Analyse (Einfaktorieller ANOVA-Test mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni bzw. ungepaarter t-Test) nicht signifikant.

3.5.10 Charakterisierung des Bindungsepitops monoklonaler anti-p41

Antikörper und Nachweis von p41 in verschiedenen

A. *baumannii*-Stämmen

Im Rahmen dieser Studie standen 10 verschiedene Hybridomaüberstände zur Verfügung, die monoklonale Antikörper gegen p41 enthielten. Diese wurden von Prof. Dr. R. Wallich (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung

gestellt. Zunächst wurden alle Antikörper auf ihre Reaktivität gegen p41 sowie C-terminal verkürzte p41-Konstrukte mittels Lineblot-Analyse untersucht, um die entsprechenden Bindungsepitope zu lokalisieren. Hierzu wurden die Proteine per Mikrodistributions-verfahren auf eine Nitrocellulosemembran gesprüht (2.16.2). Nach Trocknung der Membran wurden freie Bindungsstellen blockiert und einzelne Streifen mit Hybridomaüberständen inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde mit einem sekundären anti-Maus Antikörper inkubiert und Antigen-Antikörper-Komplexe mittels TMB visualisiert.

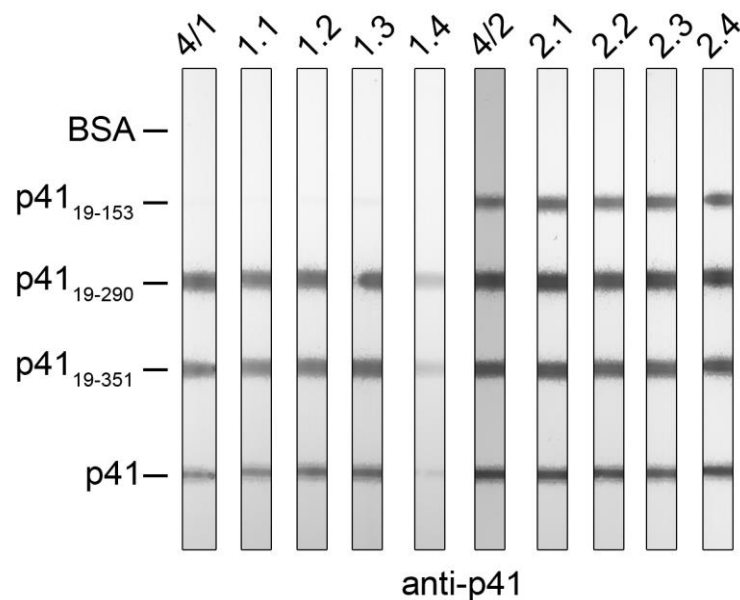


Abb. 34. Spezifität von monoklonalen anti-p41 Antikörpern. Gereinigtes p41 sowie C-terminal verkürzte Konstrukte und BSA wurden per Mikrodistributionsverfahren auf eine Nitrocellulosemembran appliziert. Die Konzentration der Proteine pro Streifen betrug 250 ng. Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurden die Streifen mit Hybridomaüberständen (1:10 in RecomBlot Waschpuffer) und anschließend mit einem anti-Maus Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:1000 in RecomBlot Waschpuffer) inkubiert. Durch Zugabe von TMB konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe visualisiert werden. (4/1) und (4/2): Polyklonale Hybridomaüberstände. (1.1-1.4): Monospezifische Subklone von 4/1 und (2.1-2.4): Monospezifische Subklone von 4/2.

Wie in Abb. 34 zu erkennen, reagierten die Überstände 4/1 und die monospezifischen Subklone 1.1 bis 1.4 mit p41 sowie den C-terminal verkürzten Konstrukten p41₁₉₋₃₅₁ und p41₁₉₋₂₉₀. Gegen p41₁₉₋₁₅₃ sowie BSA zeigte sich keine Reaktivität. Der Hybridomaüberstand 4/2 und die zugehörigen

monospezifischen Subklone 2.1 bis 2.4 reagierten gegen p41 sowie alle drei C-terminal verkürzten Konstrukte p41₁₉₋₃₅₁, p41₁₉₋₂₉₀ und p41₁₉₋₁₅₃. Gegen BSA zeigten auch diese Antikörper keine Kreuzreaktivität. Basierend auf den Daten der Lineblot-Analyse lässt sich vermuten, dass alle monoklonalen Antikörper im N-terminalen Bereich des p41-Proteins binden. Im Falle von 4/1 und den zugehörigen Subklonen müssen die Bindungsepitope der Antikörper zwischen den Aminosäure-Resten 153 und 290 lokalisiert sein, während die Bindungsepitope der Antikörper in Überstand 4/2 und den zugehörigen Subklonen im Bereich zwischen den Aminosäure-Resten 19 und 153 liegen.

Nach Lokalisation der Bindungsepitope wurden die monoklonalen Antikörper zum Nachweis des p41-Proteins in den Zellextrakten verschiedener *A. baumannii*-Stämme sowie klinischer Isolate verwendet. Hierzu wurden Zellextrakte verschiedener *A. baumannii*-Stämme, lösliche Proteine von *A. baumannii* ATCC 19606 (hydrophile Phase), Membranpräparationen von *A. baumannii* ATCC 19606 (hydrophobe Phase) und gereinigtes p41 per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Absättigen freier Bindungsstellen wurde p41 mit dem Hybridomaüberstand 4/1 (anti-p41) detektiert.

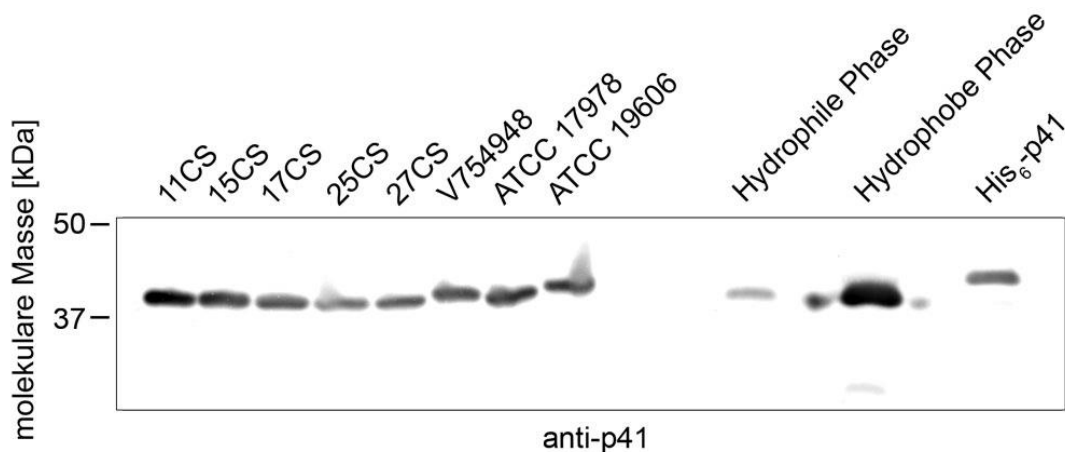


Abb. 35. Nachweis von p41 in verschiedenen *A. baumannii* Stämmen. Zellextrakte von verschiedenen *A. baumannii*-Stämmen (je 10 µg), lösliche Proteine von ATCC 19606 (hydrophile Phase), Membranpräparationen von ATCC 19606 (hydrophobe Phase) (je 10 µg) sowie gereinigtes, mit einer Hexahistidin-Sequenz versehenes p41 (250 ng, His₆-p41) wurden per SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen wurde p41 mit dem Hybridomaüberstand 4/1 (1:100 in RecombLot Waschpuffer) detektiert. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Aus Abb. 35 geht hervor, dass p41 von allen untersuchten klinischen *A. baumannii*-Isolaten sowie von Stamm ATCC 17978 und von Referenzstamm ATCC 19606 produziert wird. In allen Fällen reagierte der anti-p41 Antikörper mit Proteinen von apparenten molekularen Massen von etwa 41 kDa. Die Westernblot-Analyse der hydrophilen Phase bei dem Referenzstamm ATCC 19606, welche die löslichen Proteine enthält sowie der hydrophoben Phase, welche die Membranproteine enthält, ergab zudem Aufschluss über die Lokalisierung von p41. Der anti-p41 Antikörper reagierte stark mit einem Protein mit einer apparenten molekularen Masse von etwa 41 kDa in der hydrophoben Phase, während er nur schwach mit einem Protein in der hydrophilen Phase reagierte. Erwartungsgemäß reagierte der anti-p41 Antikörper mit gereinigtem p41, welches als zusätzliche Kontrolle diente. Der geringfügige Unterschied der molekularen Massen der nativen p41-Proteine der untersuchten *A. baumannii*-Stämme und dem gereinigten p41-Protein lässt sich durch die zusätzliche Hexahistidin-Sequenz sowie die Faktor Xa Proteaseschnittstelle am N-Terminus des gereinigten Proteins erklären.

3.5.11 Lokalisation von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii* ATCC 19606

Zum *in situ* Nachweis von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii* ATCC 19606 diente der Protease-Assay (2.16.6). Hierbei wurden 2×10^8 *A. baumannii*-Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, in PBS aufgenommen und mit verschiedenen Konzentrationen der Protease Trypsin bzw. Proteinase K inkubiert. Die Sensitivität von p41 gegenüber den Proteasen konnte indirekt über eine Far-Westernblot-Analyse sowie über eine Westernblot-Analyse (Abschnitt 2.14.1) mit einem spezifischen anti-p41 Antikörper nachgewiesen werden. Bei Oberflächenständigkeit von p41 sollten infolge des proteolytischen Abbaus die Antikörper nicht bzw. mit reduzierter Intensität mit den jeweiligen Proteinen reagieren.

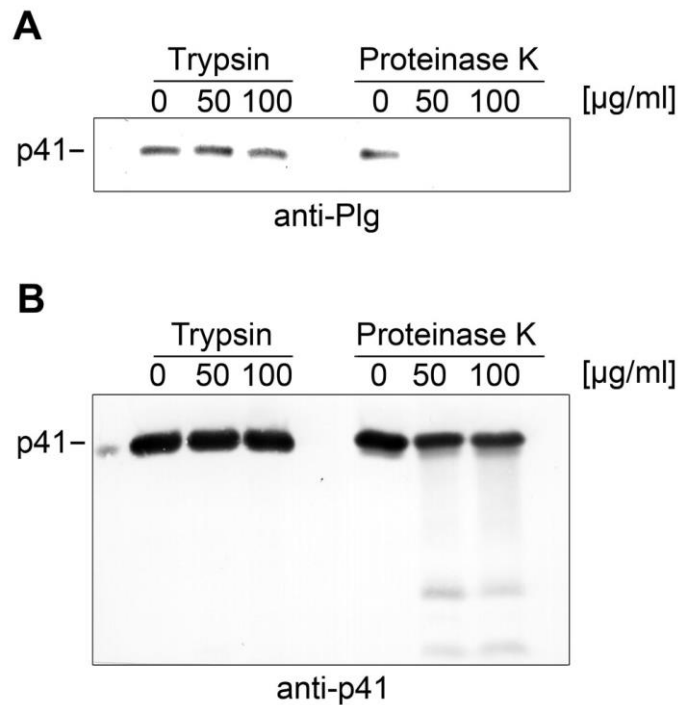


Abb. 36. Indirekter Nachweis der Membranständigkeit von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii* ATCC 19606. *A. baumannii*-Zellen (2×10^8) wurden mit 50 bzw. 100 µg/ml Trypsin oder Proteinase K für 2 h bei 24 °C inkubiert. Reaktionen wurden durch Zugabe von Proteaseinhibitoren terminiert und die Zellen durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE separiert. **(A)** Far-Westernblot-Analyse. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese mit 20 µg/ml Plasminogen inkubiert. Bindung von Plasminogen an p41 wurde dann mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (anti-Plg, 1:1000) nachgewiesen. **(B)** Westernblot-Analyse. p41 wurde mit dem Hybridomaüberstand 4/1 (1:100 verdünnt in RecomBlot Waschpuffer) detektiert.

Wie in Abb. 36 A zu sehen, zeigte die Inkubation mit Trypsin keine Auswirkung auf die Bindung von Plasminogen an p41. Wurden die *A. baumannii*-Zellen jedoch mit der weniger spezifischen Protease Proteinase K inkubiert, reagierte der anti-Plasminogen Antikörper nach Inkubation mit Plasminogen nicht mehr mit p41. Die Westernblot-Analyse zeigt, dass nach Inkubation mit Trypsin der anti-p41 Antikörper mit einem Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 41 kDa reagierte. Die Reaktion des anti-p41 Antikörpers mit p41 nach Inkubation mit Proteinase K war jedoch in ihrer Intensität geringfügig reduziert. Zudem konnte das Auftreten spezifischer Abbauprodukte beobachtet werden (Abb. 36 B). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass zumindest der C-Terminus von p41, welcher essentiell für die Bindung von Plasminogen ist, auf der Oberfläche von *A. baumannii* exponiert ist.

Um einen weiteren Hinweis für die Membranständigkeit von p41 zu erhalten, wurde ein Immunfluoreszenztest durchgeführt (vergleiche 2.15.2).

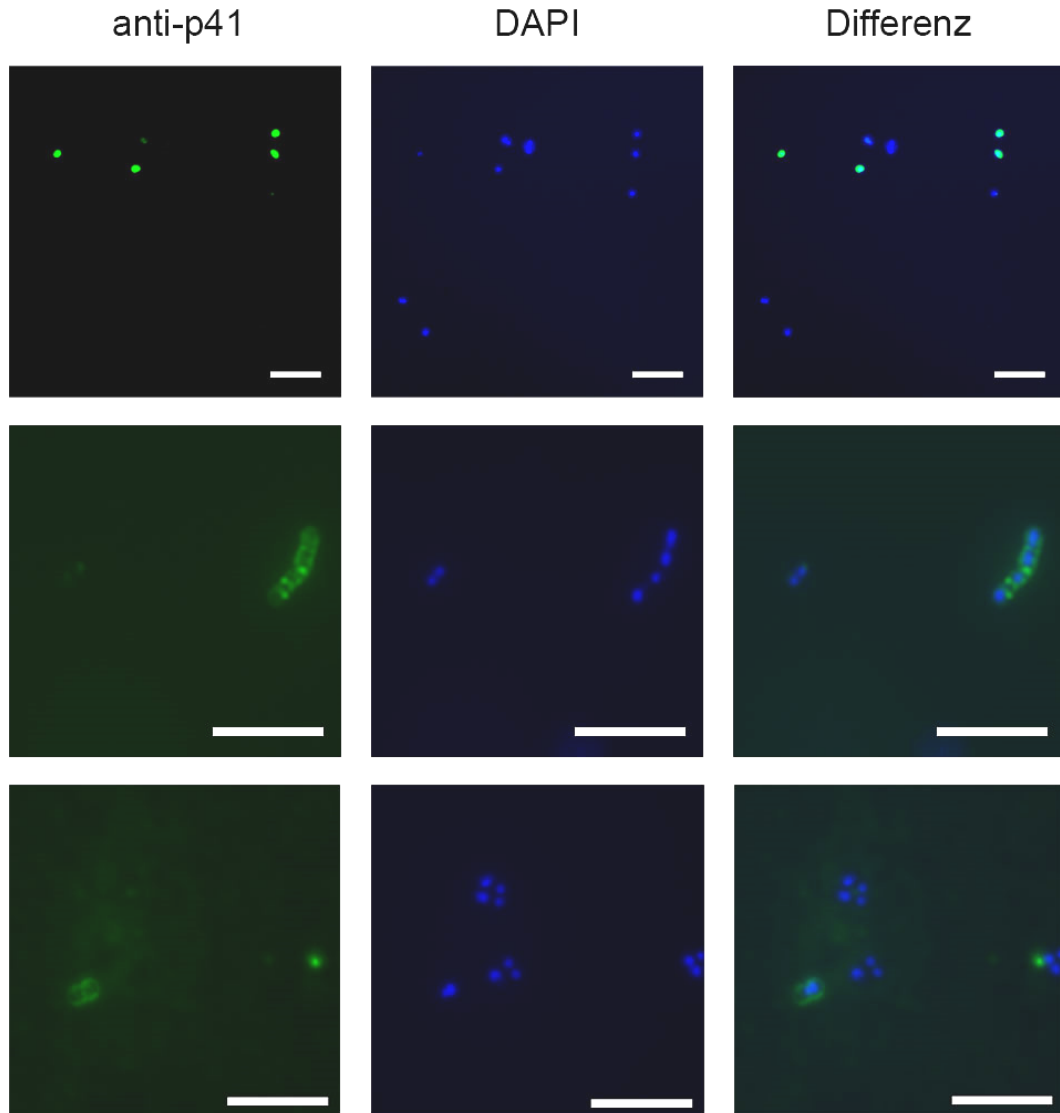


Abb. 37. Nachweis von p41 bei *A. baumannii* ATCC 19606 mittels Immunfluoreszenz-mikroskopie. *A. baumannii*-Zellsuspensionen wurden auf Glasobjektträger appliziert, getrocknet, mit Methanol fixiert und mit einem polyklonalen anti-p41 Antiserum (1:100) sowie einem Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus Antikörper (1:1000) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit ProLong Gold antifade reagent DAPI (Life Technologies) überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt. Die fluoreszenzbasierte Auswertung erfolgte mit einem Zeiss AxioImager M2 mit Spot RT3 Kamera (Visitron Systems). p41 erscheint grün und die bakterielle DNA blau. Das obere Panel zeigt *A. baumannii*-Zellen bei 630x Vergrößerung, das mittlere und untere Panel zeigen *A. baumannii*-Zellen bei 1800x Vergrößerung. Skalierungsbalken entsprechen 15 μ m.

A. baumannii-Zellsuspensionen wurden auf Glasobjektträger appliziert und über Nacht getrocknet. Nach Fixierung mit Methanol wurden die Objektträger mit einem polyklonalen anti-p41 Antiserum inkubiert. Die Objektträger wurden nach mehreren Waschschritten mit einem anti-Maus Alexa Fluor 488-Konjugat inkubiert. Es folgten weitere Waschschriffe, wonach die Objektträger mit ProLong Gold antifade reagent DAPI (Life Technologies) überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt wurden. Die Auswertung der Präparate erfolgte anschließend am Fluoreszenzmikroskop.

Wie im oberen Panel von Abb. 37 zu erkennen, reagierte das anti-p41 Antiserum nur mit vereinzelt *A. baumannii*-Zellen. Im mittleren und unteren Panel von Abb. 37 sind *A. baumannii*-Zellen, mit denen das anti-p41 Antiserum reagierte, stark vergrößert dargestellt. Anhand dieser Aufnahmen lässt sich vermuten, dass das p41-Protein nicht zytosolisch, sondern in bzw. auf der bakteriellen Membran konzentriert ist. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden vitale *A. baumannii*-Zellen mittels Durchfluss-zytometrie analysiert (vergleiche 2.15.1).

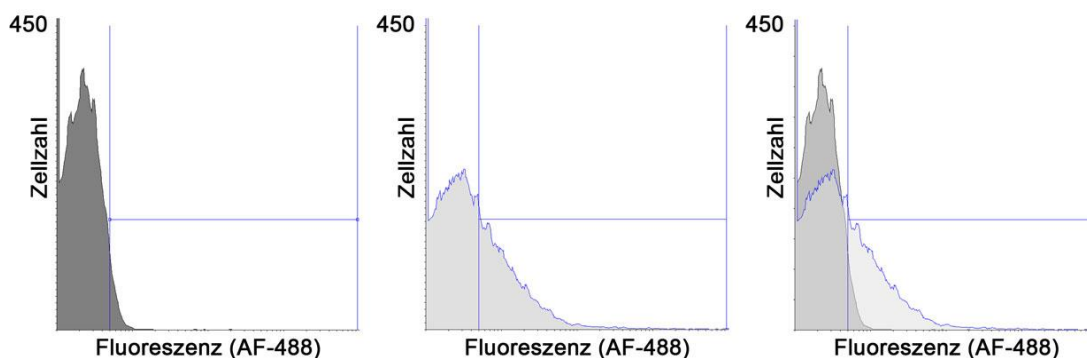


Abb. 38. Nachweis von p41 auf der Oberfläche von vitalen *A. baumannii*-Zellen. Bakterienzellen (5×10^8) wurden nach Blockieren freier Bindungsstellen mit einem anti-p41 Immunsereum (1:25) für 1 h inkubiert. Im Anschluss an mehrere Waschschriffe erfolgte die Inkubation mit einem anti-Maus Alexa Fluor-488 Konjugat. Nach PFA Fixierung wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen (50000 Zellen pro Reaktionsansatz). Das linke Histogramm zeigt die Hintergrundfluoreszenz der *A. baumannii*-Zellen, welche nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden (Negativkontrolle). Im mittleren Histogramm ist die Fluoreszenz von Zellen zu sehen, welche mit dem anti-p41 Immunsereum und dem Alexa Fluor 488-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert wurden. In der rechten Abbildung ist die Überlagerung beider Histogramme dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche.

Hierzu wurden die Bakterienzellen sedimentiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen mit einem anti-p41 Immunsereum inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen erfolgte die Inkubation mit einem Alexa Fluor-488-konjugierten anti-Maus Antiserum. Nach Inkubation wurden die Zellen mehrfach gewaschen und mit PFA fixiert. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer.

In Abb. 38 sind repräsentative Ergebnisse der zytometrischen Analysen dargestellt. p41 konnte bei durchschnittlich 31% ($\pm 1,2\%$) der gemessenen *Acinetobacter*-Zellen auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Zusammen mit den Daten der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sowie des Protease-Assays legen diese Versuche nahe, dass p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii* lokalisiert ist.

3.5.12 Generierung einer p41-Deletionsmutante von *A. baumannii*

ATCC 19606 durch markerlose Inaktivierung

Um die physiologische Relevanz von p41 als neu identifiziertes Komplement- und Plasminogen-bindendes Protein von *A. baumannii* eingehender zu untersuchen, wurde eine isogene Mutante hergestellt, in welcher das p41-kodierende Gen (HMPREF0010_01565) inaktiviert wurde. Hierzu wurde ein von J. Stahl (Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt) etabliertes, markerloses Mutagenesesystem verwendet [282]. Zunächst wurden etwa 1,5 kBp lange Regionen stromaufwärts (Amplifikat I) und stromabwärts (Amplifikat II) des p41-kodierenden Gens mittels PCR amplifiziert. Die hierzu genutzten Starteroligonukleotide sind in Tab. 13 aufgelistet. Nach Aufreinigung der PCR-Amplifikate wurden das Amplifikat I mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Pst*I und das Amplifikat II mit *Bam*HI und *Not*I hydrolysiert. Nach Aufreinigung der Reaktionen wurden beide Fragmente in den zuvor mit *Pst*I und *Not*I hydrolysierten Vektor pBIISK_ *sacBkanR* ligiert. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert (2.12.1) und auf Kanamycin-supplementierten LB-Agarplatten selektioniert.

Von den selektionierten Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert, die inserierten DNA-Fragmente mittels Restriktionsanalyse kontrolliert und ausgewählte Plasmide sequenziert. Nach Auswertung der Sequenzen wurden ausschließlich Plasmide ohne zusätzliche Mutationen im Leserahmen für die Transformation von *A. baumannii* verwendet. Kompetente Zellen von *A. baumannii* ATCC 19606 wurden schließlich mit 3 µg Plasmid-DNA durch Elektroporation transformiert (2.12.3).

Die Integration des Vektors in das Genom von *A. baumannii*, durch homologe Rekombination (Abb. 39 A), wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Bei *A. baumannii*-Klonen mit positiver Integration erfolgte eine Gegenselektion in LB-Medium mit 10% Sucrose. Das Genprodukt des negativen Selektionsmarkers *sacB* bildet mit Sucrose ein Toxin, welches die bakterielle Membran destabilisiert [289]. Somit werden durch Kultivierung in LB-Medium mit 10% Sucrose *A. baumannii*-Klone selektioniert, welche das zuvor integrierte Plasmid aus dem Genom segregiert haben. Je nachdem wie die Segregation erfolgte, sollte im Anschluss entweder das unveränderte Wildtyp-Gen vorliegen, oder das mit dem Plasmid eingebrachte Gen, welches die gewünschte Deletion trägt (Abb. 39 B und C). In LB-Medium mit 10% Sucrose angewachsene *A. baumannii*-Zellen wurden seriell verdünnt und auf mit 10% Sucrose supplementierten LB-Agarplatten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Angewachsene Kolonien wurden parallel auf LB-Agarplatten sowie Kanamycin-supplementierten LB-Agarplatten ausgestrichen. Klone, welche das Plasmid erfolgreich segregierten, zeigten deutliches Wachstum auf LB-Agarplatten, während auf mit Kanamycin supplementierten LB-Agarplatten kein Wachstum erfolgte. Mit den auf diese Weise erhaltenen Segreganten wurde erneut eine Kolonie-PCR durchgeführt, um zu überprüfen, dass diese nicht das Wildtyp-Gen, sondern die gewünschte Deletion im p41-kodierenden Gen trugen. Von *A. baumannii*-Klonen mit der entsprechenden Deletion wurde schließlich genomische DNA isoliert (2.11.8). Diese diente als Matrize für die PCR-Amplifikation mit den Starteroligonukleotiden p41 control fwd und p41 control rev (vergleiche Tab. 13). Die Amplifikate wurden anschließend sequenziert, um sicherzustellen, dass die *A. baumannii*-Klone die gewünschte Deletion trugen und dass im Klonierungsprozess keine zusätzlichen

Mutationen eingebracht wurden. Die so generierte *A. baumannii*-Mutante wird im Folgenden als *A. baumannii* ATCC 19606 $\Delta p41$ bezeichnet.

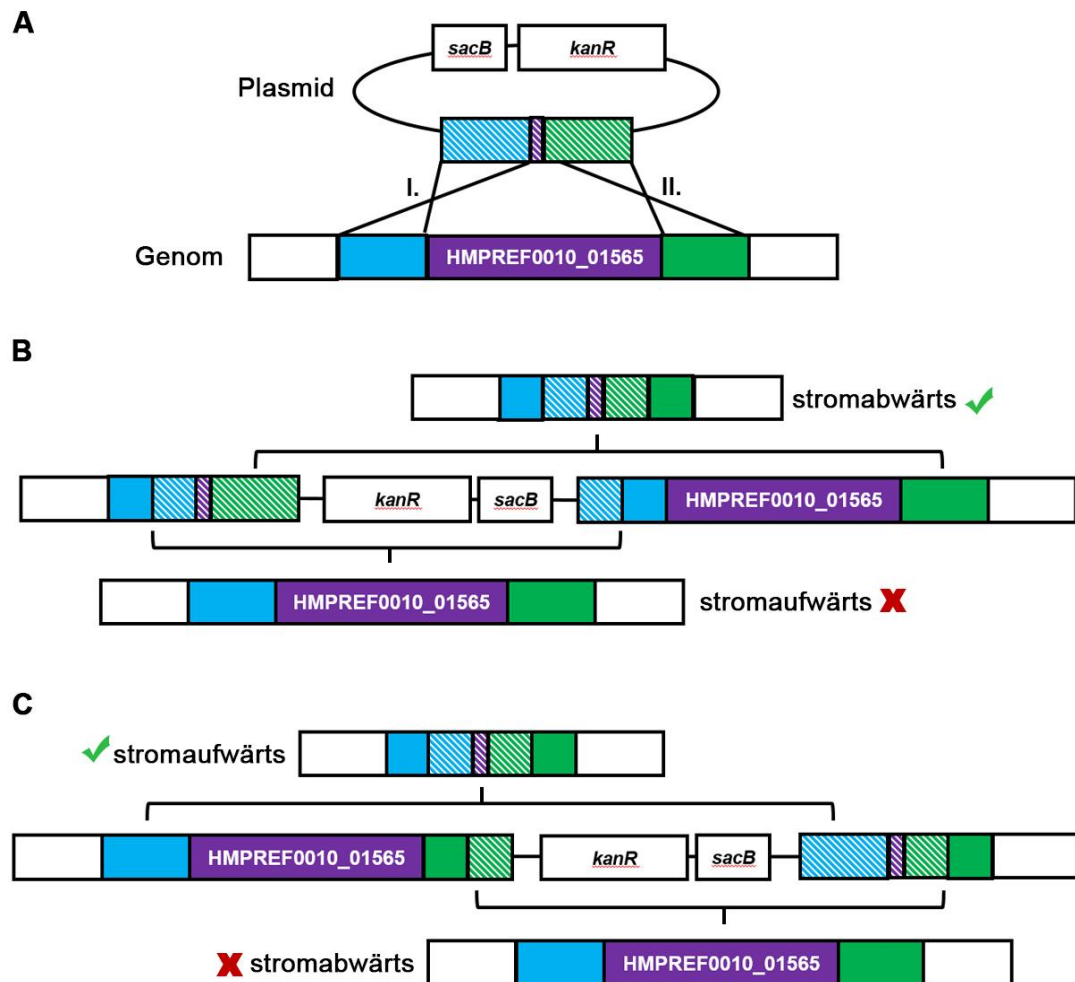


Abb. 39. Markerloses Mutagenese-System zur Inaktivierung des p41-kodierenden Gens in *A. baumannii*. *A. baumannii* wird mit einem sich nicht replizierenden Plasmid transformiert, welches eine verkürzte, nicht funktionale Version des p41-kodierenden Gens (HMPREF0010_01565, in violett dargestellt), sowie stromaufwärts (blau) und stromabwärts (grün) liegende Regionen enthält. Zudem enthält das Plasmid den positiven Selektionsmarker *kanR* sowie *sacB* als negativen Selektionsmarker. Durch Kanamycin werden Klone selektiert, welche das Plasmid durch einfache homologe Rekombination über die stromaufwärts- (I.) oder stromabwärts-Region (II.) des p41-kodierenden Gens in das Genom integriert haben (**A**). Integration durch Rekombination in der stromaufwärts-Region ist in (**B**) dargestellt, Integration durch Rekombination in der stromabwärts-Region in (**C**). Nach Gegenselektion mit Sucrose kann das Plasmid über die stromaufwärts- bzw. stromabwärts-Region segregiert werden. Dabei verbleibt im Genom von *A. baumannii* entweder das Wildtyp-Gen (HMPREF0010_01565) oder das verkürzte, nicht funktionale Gen. Bereiche genomischen Ursprungs sind ausgefüllt, Bereiche plasmidischen Ursprungs sind schraffiert dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Nakashima et al., 2014 [290].

3.5.13 Charakterisierung der $\Delta p41$ -Mutante von *A. baumannii*

ATCC 19606

Mittels Westernblot-Analyse wurde die durch markerlose Inaktivierung generierte p41-Deletionsmutante von *A. baumannii* ATCC 19606 ($\Delta p41$) zunächst auf Produktion des p41-Proteins hin untersucht. Hierzu wurden Zellextrakte des *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyps und der Mutante $\Delta p41$ sowie gereinigtes p41 per SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Freie Bindungsstellen wurden abgesättigt und p41 wurde mit dem Hybridomaüberstand 4/1 (anti-p41) nachgewiesen.

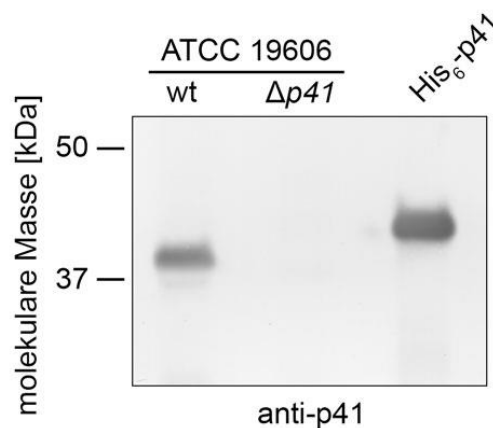


Abb. 40. Charakterisierung der p41-Deletionsmutante von *A. baumannii* ATCC 19606. Zellextrakte des *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyps (wt) und der Mutante $\Delta p41$ (je 10 μ g) sowie gereinigtes, mit einer Hexahistidin-Sequenz versehenes p41 (250 ng, His₆-p41) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Freie Bindungsstellen wurden blockiert und p41 wurde mit dem Hybridomaüberstand 4/1 (anti-p41, 1:100 verdünnt in RecombiBlot Waschpuffer) detektiert. Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben.

Aus Abb. 40 geht hervor, dass die Inaktivierung des p41-kodierenden Gens in *A. baumannii* ATCC 19606 erfolgreich war und die Deletionsmutante $\Delta p41$ im Gegensatz zum Wildtyp kein p41-Protein mehr produzierte. Erwartungsgemäß reagierte der anti-p41 Antikörper mit gereinigtem p41, welches als zusätzliche Kontrolle diente.

3.5.14 Wachstum der $\Delta p41$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp

Um auszuschließen, dass Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und der Mutante $\Delta p41$ nachfolgende Untersuchungen beeinflussen, wurde das Wachstum beider Stämme in LB-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm kontinuierlich verfolgt.

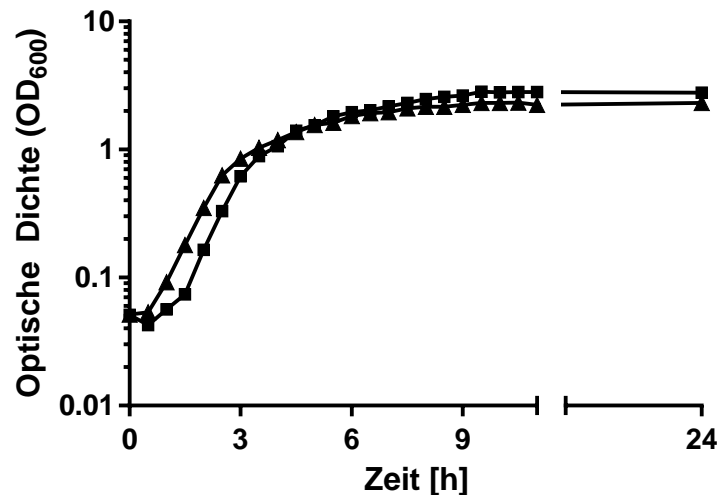


Abb. 41. Wachstum von *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und $\Delta p41$ Mutante in LB-Medium. Bakterienkulturen wurden zu Beginn des Versuchs auf eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,05$ eingestellt und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde alle 30 min photometrisch ermittelt. (■) *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp, (▲) Deletionsmutante $\Delta p41$. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten Experimenten.

Wie Abb. 41 zeigt, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wachstum des Wildtyps und der Mutante zu beobachten. Allerdings scheint die „lag“-Phase bei der Mutante $\Delta p41$ kürzer als beim Wildtyp zu sein, denn das exponentielle Wachstum setzte bei der $\Delta p41$ -Mutante etwa 30 min früher ein.

Für weitergehende, vergleichende Untersuchungen mit vitalen Zellen des *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyps und der $\Delta p41$ Mutante sollte zuvor die Korrelation zwischen optischer Dichte bei 600 nm und der Lebendzellzahl untersucht werden. Hierzu wurden *Acinetobacter*-Kulturen auf eine optische Dichte von 0,8 eingestellt und mehrere Verdünnungsreihen in PBS auf Mueller-

Hinton Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Agarplatten bei 37 °C über Nacht konnte dann die Lebendzellzahl ermittelt werden.

Tab. 22. Lebendzellzahlbestimmung von *A. baumannii*-Zellen

Stamm	LZZ bei OD₆₀₀ 0,8
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 wt	3,1 x 10 ⁸ /ml
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta p41$	5,6 x 10 ⁸ /ml

Aus Tab. 22 geht hervor, dass bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,8 ein leichter Unterschied in der Lebendzellzahl zwischen Wildtyp und $\Delta p41$ Mutante bestand. Diese Ergebnisse ermöglichten es, bei nachfolgenden Untersuchungen entsprechende Volumina an Bakterienkulturen einzusetzen, dass diese eine annähernd gleiche Anzahl an vitalen *A. baumannii*-Zellen enthielten.

3.5.15 Bindung von Plasminogen an *A. baumannii* $\Delta p41$

Nachfolgend wurde die p41-Deletionsmutante von *A. baumannii* ATCC 19606 auf ihre Fähigkeit, Plasminogen zu binden untersucht (Abschnitt 2.14.2). Dazu wurden 1 x 10⁹ Zellen von *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp sowie der Mutante $\Delta p41$ pro Vertiefung auf Mikrotiterplatten immobilisiert und freie Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde pro Vertiefung 1 µg Plasminogen zugesetzt. Nach Inkubation für 1 h sowie mehreren Waschschritten wurde die Bindung von Plasminogen durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum detektiert.

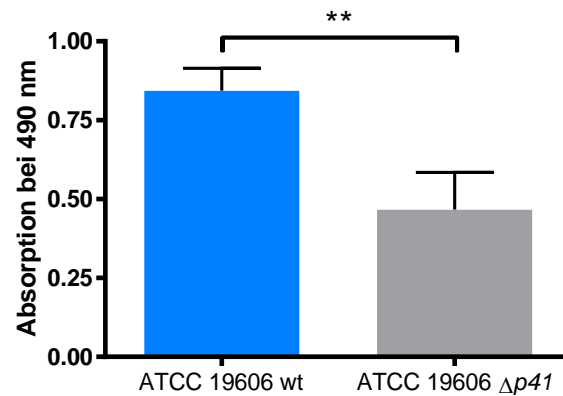


Abb. 42. Plasminogen-Bindung an *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und Mutante $\Delta p41$. *A. baumannii*-Zellen (1×10^9) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde mit $1 \mu\text{g}$ Plasminogen inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde gebundenes Plasminogen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert. Gezeigt sind Mittelwerte mindestens dreier unabhängiger Experimente, jeweils als Triplikat durchgeführt. Balken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte. **) $p \leq 0,01$ (ungepaarter t-Test). (wt): Wildtyp.

Aus Abb. 42 geht hervor, dass die Deletion des p41-kodierenden Gens zu einer signifikanten Reduktion der Bindung von Plasminogen an *A. baumannii*-Zellen führte. Dies untermauert die Bedeutung von p41 als Plasminogen-bindendes Protein von *A. baumannii*. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Bindung von Plasminogen an vitale *A. baumannii*-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

3.5.16 Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bindung von Plasminogen an *A. baumannii* $\Delta p41$

Die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten dienen einerseits zur Bestätigung der bereits mittels ELISA generierten Ergebnisse, andererseits sollte die Auswirkung der Deletion des p41-kodierenden Gens auf die Bindung von Plasminogen durch vitale *A. baumannii*-Zellen anhand einer weiteren Methode untermauert werden.

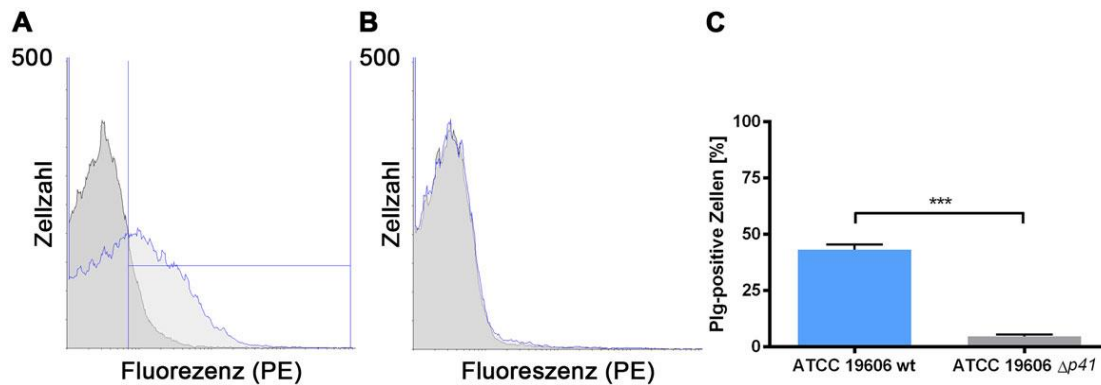


Abb. 43. Analyse der Plasminogen-Bindung an vitale *A. baumannii*-Zellen mittels Durchfluss-zytometrie. Zellen (5×10^8) von *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp (A) und Mutante $\Delta p41$ (B) wurden in PBS (schwarze Linie, dunkelgrau hinterlegtes Histogramm in A und B) oder in PBS mit 100 µg/ml Plasminogen (blaue Linie, hellgrau hinterlegtes Histogramm in A und B) für 1 h inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Zellen zunächst mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) und dann mit einem anti-Ziege Phycoerythrin-Konjugat (PE, 1:25) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten und PFA-Fixierung wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt, die Histogramme in (A) und (B) zeigen repräsentative Ergebnisse. (C) Statistische Auswertung der Durchflusszytometrischen Messungen. Die Balkendiagramme entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Messungen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte. (***) $p \leq 0,001$ (ungepaarter t-Test). (wt): Wildtyp.

Hierbei wurden der *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und die Mutante $\Delta p41$ bis zur späten logarithmischen Phase in LB-Medium angezüchtet und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Pro Reaktionsansatz wurden 5×10^8 Zellen eingesetzt und mit 100 µg/ml Plasminogen inkubiert. Nach mehreren, gründlichen Waschschritten wurden die Zellen mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum inkubiert. Es folgten weitere Waschschrritte und die Inkubation mit einem anti-Ziege Phycoerythrin-Konjugat. Nach erneutem Waschen und PFA-Fixierung wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert (2.15.1).

Wie in Abb. 43 A zu entnehmen, waren nicht alle Zellen des Wildtyps in der Lage, Plasminogen zu binden. Im Vergleich dazu konnte bei der Mutante $\Delta p41$ keine Bindung von Plasminogen an die *A. baumannii*-Zellen beobachtet werden (Abb. 43 B). Die statistische Auswertung mehrerer unabhängiger Versuche ergab, dass durchschnittlich 43,2% ($\pm 2,2\%$) der gemessenen Bakterienzellen des Wildtyps Plasminogen binden konnten, während nur 4,7% ($\pm 1,5\%$) der Zellen der Mutante $\Delta p41$ positiv waren.

3.5.17 Überleben von *A. baumannii* $\Delta p41$ in normalem Humanserum

Die erhobenen Daten zeigen anschaulich und überzeugend, dass die generierte $\Delta p41$ Mutante unfähig ist, Plasminogen zu binden. Um zu beantworten, inwiefern sich dieser Defekt auf das Überleben der Mutante in normalem Humanserum auswirkt, wurden Serumresistenztests (Abschnitt 2.16.8) durchgeführt. Zellen des *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyps sowie der Mutante $\Delta p41$ wurden bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach einem Waschschriff mit PBS wurde die optische Dichte der Kulturen auf 0,8 eingestellt. Volumina entsprechend einer Zellzahl von 5×10^7 Zellen wurden dann mit NHS (100%) bzw. unterschiedlichen Serumverdünnungen (10-90%) für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden serielle Verdünnungsreihen der einzelnen Reaktionsansätze in PBS angefertigt und jeweils 100 μ l der Suspensionen auf Antibiotika-freie Mueller-Hinton-Agarplatten ausplattiert.

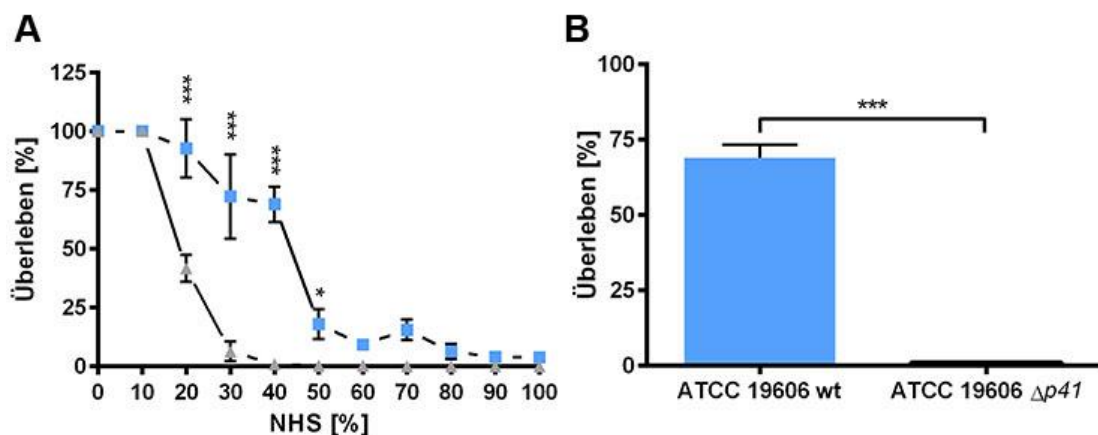


Abb. 44. Überleben von *A. baumannii* ATCC 19606 und Mutante $\Delta p41$ in NHS. *A. baumannii*-Zellen (5×10^7) des ATCC 19606 Wildtyps (■) und $\Delta p41$ (▲) wurden in steigenden NHS-Konzentrationen für 2 h bei 37 °C inkubiert (A). Nach Inkubation wurden serielle Verdünnungen in PBS hergestellt und auf Mueller-Hinton-Agarplatten ausplattiert. Am Folgetag konnten die entsprechenden Lebendzellzahlen bestimmt werden. Zur Umrechnung in Prozent wurden die absoluten Lebendzellzahlen des Wildtyps und der Mutante in NHS auf Kontrollen bezogen, bei denen die Bakterienzellen in PBS inkubiert wurden. Messpunkte repräsentieren Mittelwerte von mindestens fünf unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte. (B) Überleben des *A. baumannii* Wildtyps und der Mutante $\Delta p41$ in 40% NHS. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen, Fehlerbalken zeigen Standardabweichung der Mittelwerte. (wt): Wildtyp *) $p \leq 0,05$ und ***) $p \leq 0,001$.

Nach Ermittlung der Lebendzellzahl zeigte sich kein Unterschied im Überleben zwischen dem *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und der Mutante bei Serumkonzentrationen von bis zu 10% (Abb. 44 A). Ab einer Serumkonzentration von 20% ergab sich ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Wildtyp und der $\Delta p41$ Mutante. So überlebten bei 40% NHS noch 69% ($\pm 4,3\%$) der Zellen des Wildtyps bezogen auf die Kontrolle in PBS (Abb. 44 B). Im Gegensatz dazu lag das Überleben der Mutante $\Delta p41$ bei einer Serumkonzentration von 40% bei nur 1% ($\pm 0,2\%$) bezogen auf die entsprechende PBS-Kontrolle. Bei Serumkonzentrationen oberhalb 50% war allerdings der Unterschied im Überleben zwischen dem Wildtyp und der Mutante nicht mehr statistisch signifikant. Dennoch zeigen die Untersuchungen zur Serumresistenz deutlich, dass p41 eine wichtige Rolle für das Überleben von *A. baumannii* in humanem Serum zukommt.

3.5.18 Vergleichende Untersuchungen zur Transmigration von

***A. baumannii* ATCC 19606 und Mutante $\Delta p41$ durch Endothel-Monolayer**

Bindung von Plasminogen und die nachfolgende Aktivierung zu Plasmin unterstützt bei einer Reihe von pathogenen Mikroorganismen die Dissemination im Wirt, etwa bei der Transmigration durch Endothelschichten [291, 292]. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Frage nach der Auswirkung der Deletion des p41-kodierenden Gens auf die Transmigrationseffizienz von *A. baumannii*. Zur Beantwortung dieser Frage wurden humane Endothelzellen (HUVEC) im oberen Teil eines Transwell-Einsatzes ausgesät und die Zellen bis zur Konfluenz bei 37 °C inkubiert. Der *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und die $\Delta p41$ Mutante wurden bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und auf eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt. Volumina entsprechend $2,5 \times 10^7$ Zellen wurden abgenommen und mit 100 µg/ml Plasminogen inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Zellen mit dem Aktivator u-PA behandelt. Nach einer Inkubation von 1 h erfolgten erneut mehrere Waschschriffe, wonach die *A. baumannii*-Zellen in

Infektionsmedium resuspendiert und die HUVEC-Zellen mit Bakterien infiziert wurden (MOI von 100). Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde das Zellkulturmedium aus dem unteren Teil des Transwell-Einsatzes entnommen (Abschnitt 2.16.9). Nach dem Herstellen serieller Verdünnungen in PBS wurden diese zur Bestimmung der Lebendzellzahl auf Mueller-Hinton-Agarplatten ausplattiert. Die Ergebnisse des Transmigrations-Assays sind in Abb. 45 zusammengestellt.

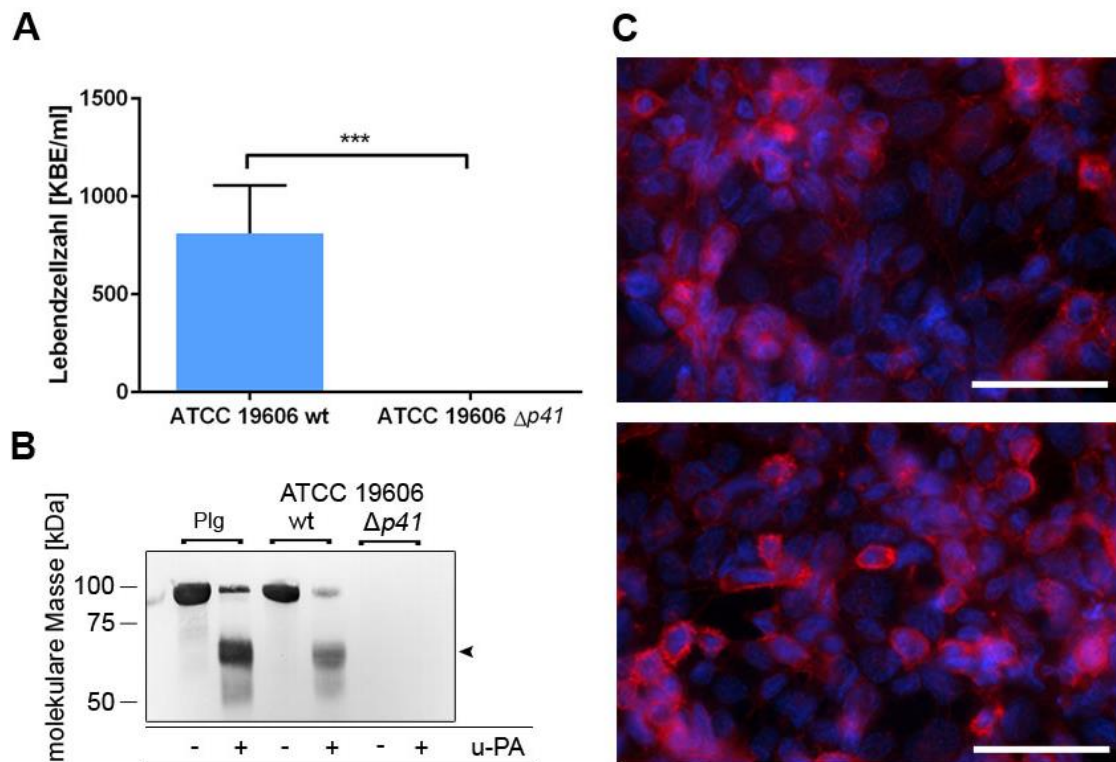


Abb. 45. Transmigration von *A. baumannii* durch Endothelzell-Monolayer. *A. baumannii*-Zellen ($2,5 \times 10^7$) wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Plasminogen inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Zellen mit dem Plasminogen-Aktivator u-PA inkubiert. Es folgten erneute Waschschritte wonach konfluente Endothelzellen mit den vorbehandelten *A. baumannii*-Zellen für 2 h bei 37 °C infiziert wurden (MOI von 100). Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium aus dem unteren Teil des Transwell-Einsatzes entfernt, seriell verdünnt und auf Mueller-Hinton-Agarplatten ausplattiert. **(A)** Lebendzellzahl (KBE/ml) von *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp und $\Delta p41$ Mutante nach Transmigration durch Endothelzell-Monolayer. **(B)** Westernblot-Analyse zur Kontrolle der Plasminogen-Bindung und Aktivierung. Nach Inkubation mit Plasminogen bzw. Plasminogen und u-PA wurden *A. baumannii*-Zellen per Ultraschall aufgeschlossen und die Zellextrakte per SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran konnte an die Bakterienzellen gebundenes Plasminogen (92 kDa) bzw. Plasmin (66 kDa, Pfeilspitze) durch Inkubation mit einem polyklonalen anti-Plasminogen Antiserum (1:1000) detektiert werden. (Plg: 2,5 μg gereinigtes Plasminogen diente als Positivkontrolle). Der Größenstandard Precision Protein Plus Standard Dual Color (Bio-Rad) ist links angegeben. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (630x vergrößert) der Transwell-Membran zum Nachweis der Konfluenz der Endothelzellen. Nach Blockieren freier Bindungsstellen und permeabilisieren der Zellmembran mit Triton X-100 wurde F-Aktin mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (rot) und DNA mit dem Farbstoff DAPI (blau) angefärbt. Der Skalierungsbalken entspricht 50 μm .

Die Ermittlung der Lebendzellzahl aus dem unteren Teil des Transwell-Einsatzes ergab nach 2 h Infektionszeit durchschnittlich 811 KBE/ml (± 123 KBE/ml) für den *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp. Von der Mutante $\Delta p41$ konnten keine lebenden Zellen im unteren Teil des Transwell-Einsatzes nachgewiesen werden (Abb. 45 A). Um nachträglich zu bestätigen, dass die humanen Endothelzellen für diesen Versuch tatsächlich einen homogenen Monolayer ausbildeten, wurden die Transwell-Membranen im Anschluss an die Infektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie vorbereitet (Abschnitt 2.16.10). Nach Blockieren freier Bindungsstellen und Permeabilisieren der Zellmembranen wurde das Aktin-Zytoskelett mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (rot) und DNA mit DAPI (blau) visualisiert. Wie in Abb. 45 C zu sehen, bildeten die Endothelzellen neben einem homogenen Monolayer teilweise überlagerte Schichten. Die Zellen oberhalb des Monolayers waren besser für die Färbung zugänglich und erscheinen in der Abbildung intensiver, wobei der darunterliegende Monolayer entsprechend weniger intensiv gefärbt erscheint.

Zur Kontrolle der Bindung und Aktivierung von p41-gebundenem Plasminogen wurden *A. baumannii*-Zellen entweder nur mit Plasminogen oder mit Plasminogen und dem Aktivator u-PA inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mit Inkubationspuffer für die SDS-PAGE versetzt und auf ein Polyacrylamidgel appliziert. Nach Auftrennung der Proben und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte eine Westernblot-Analyse (Abschnitt 2.16.9) wobei Plasminogen (92 kDa) bzw. Plasmin (66 kDa) durch ein polyklonales anti-Plasminogen Antiserum nachgewiesen wurden. Aus Abb. 45 B geht hervor, dass die Zellen des Wildtyps in der Lage waren, Plasminogen zu binden, welches durch Inkubation mit dem Aktivator u-PA zu Plasmin umgesetzt wurde. Für die Mutante $\Delta p41$ konnte weder Bindung von Plasminogen noch aktives Plasmin nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Interaktion von p41 mit Plasminogen eine relevante Rolle bei der Transmigration von *A. baumannii* durch das Endothel spielt und untermauert außerdem die Bedeutung von p41 als zentrales Plasminogen-bindendes Protein.

4 Diskussion

4.1 Resistenz von *A. baumannii* gegenüber der angeborenen Immunabwehr

A. baumannii ist in der Lage, auf belebten und unbelebten Oberflächen zu überleben und im Menschen schwerwiegende Infektionen hervorzurufen, die sich aufgrund der Multiresistenz antibiotisch nur sehr eingeschränkt therapieren lassen. Neben der Eigenschaft gegenüber den klinisch wichtigsten Antibiotikaklassen resistent zu sein, besitzt *A. baumannii* die Fähigkeit, auch in Gegenwart von humanem Serum zu überleben.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist das Wissen über die determinierenden Faktoren der Serumresistenz von *A. baumannii* unzureichend. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Serumresistenz von klinischen *A. baumannii*-Isolaten zeigten, dass deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten hinsichtlich ihres Überlebens in Gegenwart von humanem Komplement bestehen. Aus diesem Grund lassen sich die Isolate in die Kategorien Serum-sensibel, intermediär Serum-resistent und Serum-resistent klassifizieren [216]. Dieses Phänomen wurde unabhängig von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [215]. Das Ausmaß der Serumresistenz von *A. baumannii* scheint direkt mit dem Überleben der Bakterien zu korrelieren und beeinflusst maßgeblich den Infektionsverlauf, wie Untersuchungen mit infizierten Mäusen zeigten. Verschiedene untersuchte hypervirulente und virulente *A. baumannii*-Stämme waren allesamt resistent gegenüber der Komplement-vermittelten Bakteriolyse während avirulente Stämme hingegen einen Komplement-sensiblen Phänotyp aufwiesen [293].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *A. baumannii* ATCC 19606 in humanem Serum bis zu einer Konzentration von 20% überlebt, die Überlebensrate jedoch ab 30% deutlich abnimmt. Bei 50% NHS überlebten nur noch ca. 20% der *A. baumannii*-Zellen (Abb. 44 A). Vergleichbare Ergebnisse erzielten ebenfalls Kim et al. für diesen Referenzstamm [109].

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii* beschrieben, welche die Serumresistenz beeinflussen (vergleiche Tab. 3). Neben der Polysaccharidkapsel [111], LPS [110] sowie die Bildung von Biofilm [215], der als sterische Barriere für den lytischen Komplementkomplex fungiert, wird dem äußeren Membranprotein OmpA eine wichtige Rolle für die Immunevasion zugesprochen. Bereits 2009 wurde gezeigt, dass dieses Protein den zentralen Komplementregulator des alternativen Weges, Faktor H, binden kann [109] und dass eine OmpA-defiziente Mutante im Vergleich zum Wildtyp einen Serum-sensitiven Phänotyp aufweist. Die Bindung von FH an OmpA wurde in der betreffenden Studie unter denaturierenden Bedingungen, mittels Far-Westernblot-Analyse, nachgewiesen. Kontroverse Ergebnisse zur FH-Bindung wurden von King et al. publiziert, die vitale *A. baumannii*-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersuchten [215]. Frühere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass vitale *A. baumannii*-Zellen keinen FH binden können [216]. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bindung von FH an *A. baumannii*-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. A1 und Abb. A2 im Anhang), so dass davon auszugehen ist, dass planktonische *A. baumannii*-Zellen tatsächlich nicht in der Lage sind, diesen Komplementregulator an ihrer Zelloberfläche zu binden.

Bislang konnte kein Pathogenitätsfaktor identifiziert werden, der alleine in der Lage ist, Komplementresistenz bei *A. baumannii* zu vermitteln. Die bisher beschriebenen Mutanten weisen lediglich eine attenuierte bzw. herabgesetzte Resistenz auf, was auf einen multifaktoriellen Mechanismus schließen lässt, bei dem verschiedene Faktoren die Komplementresistenz determinieren. Neben den „klassischen“ Mechanismen der Serumresistenz sowie der Komplementinaktivierung bei Gram-negativen Bakterien, scheinen weitere, bislang noch wenig beachtete Mechanismen eine Rolle zu spielen. Dazu zählt z. B. die Bindung von Plasminogen an *A. baumannii* als weitere Option der Immunevasion. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für *A. baumannii* erstmals eine direkte Interaktion mit Plasminogen nachgewiesen und insgesamt drei Plasminogen-bindende Proteine identifiziert werden: der Translations-Elongationsfaktor Tuf, das äußere Membranprotein OmpW sowie p41 als ein Protein von bisher unbekannter Funktion (Abschnitt 3.2).

4.2 Plasminogen-bindende Proteine von *A. baumannii*

4.2.1 Der Translations-Elongationsfaktor Tuf

Der Translations-Elongationsfaktor Tuf ist ein ubiquitär vorkommendes, hochkonserviertes und hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiertes Protein. Seine Aufgabe in der Bakterienzelle besteht darin, an Amino-acyl tRNAs zu binden, diese zum Ribosom zu transportieren [294] und die Verlängerung von Polypeptidketten zu kontrollieren [295]. Zusätzlich unterstützt Tuf als Chaperon die Faltung und Renaturierung von Proteinen [296, 297]. Für *Bacillus subtilis* konnte für das zytoplasmatisch-lokalisierte Tuf gezeigt werden, dass dieses mit dem Aktin-ähnlichen Protein MreB interagiert und eine Rolle bei der Formgebung der Bakterienzelle spielt [298].

Darüber hinaus scheint Tuf bei einer Reihe von humanpathogenen Mikroorganismen auf der Zelloberfläche lokalisiert zu sein, wo es als „Moonlighting“-Protein mit unterschiedlichen Liganden interagiert. Für Tuf von *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* und *L. interrogans* konnte eine Bindung sowohl an humanes Plasminogen als auch an FH nachgewiesen werden [248, 274, 275]. Tuf von *M. tuberculosis* bindet Plasminogen [273] sowie Fibronectin [299] und für Tuf von *A. baumannii* wurde gezeigt, dass dieses ebenfalls Fibronectin binden kann [276]. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob Tuf von *A. baumannii* (Tuf_{Ab}) auch mit Plasminogen interagiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Tuf_{Ab} sowohl unter denaturierenden Bedingungen in der Far-Westernblot-Analyse, als auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen an humanes Plasminogen bindet (Abschnitt 3.4.2). Im direkten Vergleich zeigten sich nur geringfügige Unterschiede in der Bindungskapazität zwischen Tuf_{Ab} und Tuf von *S. pneumoniae* (Tuf_{Sp}) (Abb. 10). Weiterhin ließ sich eine dosisabhängige Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} nachweisen. Die Dissoziationskonstante für die Interaktion von Tuf_{Ab} mit Plasminogen konnte mit 57 nM (\pm 15 nM) kalkuliert werden und liegt damit in derselben Größenordnung wie die Dissoziationskonstanten anderer Plasminogen-bindender Proteine, wie etwa der Enolase oder DnaK von *Bifidobacterium animalis* mit

Dissoziationskonstanten von 42 nM bzw. 11 nM [271, 300], oder BBA70 von *B. burgdorferi* mit 55 nM [262].

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Interaktion von Tuf_{Ab} mit Plasminogen teilweise durch Lysin-Reste vermittelt wird. So konnte die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} durch die Zugabe des Lysin-Analogons Tranexamsäure zwar signifikant inhibiert werden, allerdings lag die Plasminogen-Bindung an Tuf_{Ab} bei 50 mM Tranexamsäure immer noch bei 45% des Ausgangswertes (Abb. 11 A). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bindung nicht nur über Wechselwirkungen mit Lysin-Resten, sondern zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst wird. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich für andere Proteine, die mit Plasminogen interagieren. Faktor Xa bindet beispielsweise unabhängig von Lysin-Resten an den N-Terminus von Plasminogen, allerdings finden zusätzlich weitere, von Lysin-Resten abhängige Interaktionen zwischen Faktor Xa und den Kringle-Domänen von Plasminogen statt [301]. Auch scheint die Bindung von Tuf_{Ab} an Plasminogen nur bedingt von ionischen Wechselwirkungen geprägt zu sein. Bei neutralem pH sind Lysin-Reste positiv geladen. Sofern die Interaktion über Lysin-Reste vermittelt wird, sollte die Erhöhung der Ionenstärke zu einer Reduktion der Bindung führen. Eine Erhöhung der NaBr-Konzentration führte tatsächlich zu einer signifikanten Abnahme der Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab}. Bei einer Konzentration von 1 M NaBr betrug die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} allerdings immer noch 51% des Ausgangswertes. D.h., dass eine vollständige Inhibition weder mit Tranexamsäure noch durch NaBr erzielt werden konnte und andere Wechselwirkungen bei der Protein-Protein-Interaktion eine Rolle spielen müssen. Anstatt NaCl wurde NaBr für diese Untersuchungen verwendet, da Chlorid-Anionen die geschlossene Form von Plasminogen begünstigen [229] und ausgeschlossen werden sollte, dass sich diese Eigenschaft negativ auf die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} auswirkt. Während für Tuf_{Pa} der Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung von Plasminogen bislang nicht untersucht wurde, konnte für Tuf_{Sp} gezeigt werden, dass die Plasminogen-Bindung zumindest teilweise von der Ionenstärke abhängt [248]. Für Tuf von *L. interrogans* (Tuf_{Li}) wurde hingegen gezeigt, dass die Bindung unabhängig von der Ionenstärke ist [274]. Die Reduktion der Bindung auf die Hälfte des

Ausgangswertes durch NaBr untermauert die Vermutung, dass weitere, nicht-ionische Interaktionen eine Rolle für die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} spielen.

Die Aktivierung von an Tuf gebundenem Plasminogen durch die natürlichen Aktivatoren u-PA oder t-PA ist ein wesentliches Kriterium für die biologische Relevanz der Interaktion dieser beiden Moleküle. Einen ersten Hinweis lieferte ein Plasminogen-Aktivierungs-Assay mit dem chromogenen Substrat S-2251. Diese Substanz wird durch aktiviertes Plasmin gespalten, wodurch es zu einer Farbänderung kommt, welche durch Messung der Absorption bei 405 nm verfolgt werden kann. Die gemessenen Extinktionswerte sollten daher mit der Plasminaktivität korrelieren. Wie in Abb. 12 gezeigt, ließ sich Tuf_{Ab}-gebundenes Plasminogen durch u-PA aktivieren. In weiterführenden Untersuchungen konnte zudem bestätigt werden, dass an Tuf_{Ab} gebundenes Plasminogen nach Aktivierung sein physiologisches Substrat, Fibrinogen degradiert, was anhand des charakteristischen Degradationsmusters in der Westernblot-Analyse deutlich zu erkennen ist (vergleiche Abb. 13). Interessanterweise ist ein Abbau von Fibrinogen nach 6 h auch in Ansätzen mit Tranexamsäure nachweisbar. Da Tranexamsäure die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab} nicht vollständig inhibiert, ist davon auszugehen, dass noch ausreichend Plasminogen gebunden wird, um Fibrinogen über diesen langen Inkubationszeitraum zu degradieren.

Plasmin ist in der Lage, eine Reihe von Komplementkomponenten zu degradieren [243, 244]. Um zu prüfen, ob an Tuf_{Ab} gebundenes Plasmin die zentrale Komplementkomponente C3b abbauen kann, wurde ein C3b-Degradations-Assay durchgeführt (Abb. 14). Nach Aktivierung von Plasminogen ließen sich deutliche C3b-Degradationsfragmente detektieren. Diese zeigten sich auch bei Tuf_{Sp} und Tuf_{Lp}. Über die Zeit war eine Zunahme der Degradationsprodukte von C3b zu beobachten. Auch in Kontrollansätzen, bei denen Plasminogen zusammen mit Tranexamsäure zugesetzt wurde, zeigte sich eine partielle Degradation von C3b, was darauf zurückzuführen ist, dass Tranexamsäure die Bindung von Plasminogen an Tuf_{Ab}, sowie an Tuf_{Sp} und Tuf_{Lp} nicht vollständig inhibiert. Für Ansätze mit BSA konnte keine prominente Degradation von C3b beobachtet werden, allerdings traten in der

Kontrollreaktion mit Tranexamsäure nach 24 Stunden Abbauprodukte auf. Der Grund hierfür ist unklar. Da Plasminogen in keinem der Ansätze an BSA binden konnte, sollte besonders in Gegenwart von Tranexamsäure keine Bindung und entsprechend Aktivierung zu Plasmin zu beobachten sein. Eine Verunreinigung von C3b mit Plasminogen ist auszuschließen, da in den Kontrollreaktionen ohne Plasminogen kein Abbau von C3b detektiert werden konnte. Der beobachtete Abbau von C3b in diesem Reaktionsansatz konnte daher nur als Artefakte gewertet werden. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, dass an Tuf_{Ab} gebundenes Plasmin die Komplementkomponente C3b inaktivieren kann und somit potentiell an der Komplementresistenz von *A. baumannii* beteiligt ist.

Um als „Moonlighting“-Protein Plasminogen zu binden, muss Tuf_{Ab} auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* lokalisiert sein. Mittels Durchflusszytometrie konnte Tuf_{Ab} bei 39,9% (\pm 4,9%) der *A. baumannii*-Zellen auf der Oberfläche nachgewiesen werden (Abschnitt 3.4.9). Unabhängig von diesen Ergebnissen konnte die Lokalisation von Tuf_{Ab} auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* von Dallo et al. durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden. Tuf_{Ab} ist ebenfalls ein Bestandteil von Vesikeln der äußeren Membran [276, 302]. Zusammengenommen sprechen diese Daten dafür, dass Tuf_{Ab} neben seiner Rolle als zytoplasmatischer Translations-Elongationsfaktor als „Moonlighting“-Protein andere Funktionen auf der äußeren Membran und in Membranvesikeln ausübt.

Durch den Sequenzvergleich der Tuf-Proteine von *A. baumannii*, *L. pneumophila*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Leptospira interrogans* und *E. coli* ließen sich insgesamt zwölf konservierte Lysin-Reste identifizieren (Abb. A3 im Anhang). Abb. 46 zeigt ein Oberflächenmodell, basierend auf der 3D Struktur des Tuf-Proteins von *E. coli* [303], wobei konservierte Lysin-Reste in blau dargestellt sind. Die exponierten Lysin-Reste von Tuf könnten potentiell als Liganden für Plasminogen fungieren, wobei besonders die Lysin-Reste an den Positionen 10, 265 und 314 in Regionen des Proteins mit stärkerer positiver Ladung lokalisiert sind (Abb. 46 B). Letztere könnten für Wechselwirkungen mit Plasminogen verantwortlich sein, welche von der Ionenstärke beeinflusst werden. Bis auf Tuf von *E. coli* wurde für alle in der Sequenzanalyse

vergleichenen Tuf-Proteine gezeigt, dass sie Plasminogen binden [248, 274, 275].

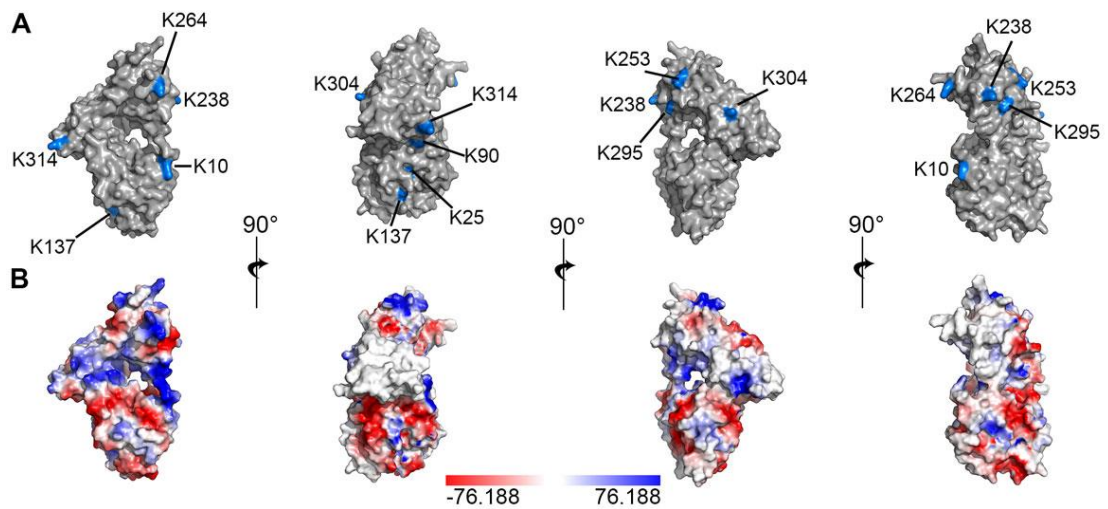


Abb. 46. 3D-Struktur von *E. coli* Translations-Elongationsfaktor Tuf. 3D-Struktur des Tuf-Proteines von *E. coli* in seiner GDP-gebundenen Form. (A) Aminosäuresequenzvergleiche der Tuf-Proteine verschiedener Mikroorganismen (Abb. A3 im Anhang) ergaben insgesamt zwölf konservierte Lysin-Reste, welche in blau hervorgehoben sind. (B) Modell zur Ladungsverteilung im Tuf-Protein von *E. coli*. Die Abbildung wurde mit PyMOL, Version 1.3, basierend auf der PDB Datei 2FX3 [303] erstellt.

Mit einer vergleichenden Sequenzanalyse der sechs Tuf-Proteine ließen sich Identitäten zwischen 67% bis 85% kalkulieren (vergleiche Tab. 23).

Tab. 23. Identitätsmatrix für Tuf-Proteine verschiedener Mikroorganismen, basierend auf dem Sequenzvergleich mit Clustal Omega 1.2.1.

	Tuf _{Ab}	Tuf _{Ec}	Tuf _{Pa}	Tuf _{Lp}	Tuf _{Li}	Tuf _{Sp}
Tuf _{Ab}	100,00	85,03	82,58	80,81	71,46	71,32
Tuf _{Ec}	85,03	100,00	85,03	82,49	73,35	73,72
Tuf _{Pa}	82,58	85,03	100,00	84,85	72,47	69,04
Tuf _{Lp}	80,81	82,49	84,85	100,00	74,75	72,84
Tuf _{Li}	71,46	73,35	72,47	74,75	100,00	67,42
Tuf _{Sp}	71,32	73,72	69,04	72,84	67,42	100,00

Neben der Fähigkeit, Plasminogen zu binden konnte für Tuf_{Pa}, Tuf_{Sp} und Tuf von *Leptospira interrogans* (Tuf_{Li}) eine Bindung von Komplementregulator FH

nachgewiesen werden. Das an diese Proteine gebundene FH zeigte Komplement-regulatorische Aktivität und war in der Lage, in Gegenwart von FI, C3b zu spalten [248, 274, 275]. Sowohl gereinigtes Tuf_{Ab} als auch Tuf_{Lp} sind in der Lage, FH zu binden (Abb. 15). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung steht die Tatsache, dass eine Bindung dieses Komplementregulators an vitale *A. baumannii*-Zellen im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. A1 und Abb. A2 im Anhang). In der Literatur finden sich Beispiele für bakterielle Proteine, die sich in den Bindungseigenschaften zwischen dem nativen Protein und dem gereinigtem Protein unterscheiden. So bindet gereinigtes ErpA, ErpC sowie ErpP von *B. burgdorferi* FH sowie die FH-verwandten Proteine FHR-1 und FHR-2 [304-306]. In der nativen Form, auf der Borrelienoberfläche, sind diese Proteine jedoch nicht in der Lage FH zu binden [304, 305]. Analog dazu interagiert gereinigtes Tuf_{Ab} zwar mit FH, allerdings besteht durchaus die Möglichkeit, dass Tuf_{Ab} auf der Oberfläche von *A. baumannii* nicht in der Lage ist, mit diesem Komplementregulator zu interagieren. Die Bedingungen auf der Zelloberfläche könnten sich völlig anders darstellen als bei *in vitro* Versuchen mit gereinigten Proteinen. Zudem ist unklar, welche Mengen von Tuf_{Ab} auf der Oberfläche von *A. baumannii* vorhanden sind. Weiterhin ist nicht geklärt, wie „Moonlighting“-Proteine, eingeschlossen Tuf_{Ab}, auf die Zelloberfläche gelangen und ob diese im Laufe der Sekretion prozessiert werden. Auch dadurch könnte Tuf_{Ab} die Fähigkeit verlieren, auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* mit FH zu interagieren. Tuf_{sp} und Tuf_{Pa} interagieren mit FH über die N-terminalen SCRs 6-7 sowie über die C-terminalen SCRs 18-20 [248, 275]. Die N-terminalen SCRs 1-4 bleiben somit frei und können ihre Komplement-regulatorische Aktivität entfalten. Die Bindung einzelner SCRs an Tuf_{Ab} konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, zudem konnte kein Nachweis für die Kofaktor-Aktivität von Tuf_{Ab}-gebundenem FH erbracht werden, da in allen durchgeführten Versuchen auch in Reaktionsansätzen mit BSA (Negativkontrolle) Kofaktor-Aktivität zu beobachten war (Abb. 16). Somit bleibt die Relevanz der Interaktion von Tuf_{Ab} mit FH weiterhin unklar.

Der Vergleich der Tuf-Proteine von pathogenen Mikroorganismen mit *E. coli* wirft die Frage auf, inwiefern die Tuf-Proteine von apathogenen

Mikroorganismen mit Plasminogen interagieren können. Bisher gibt es hierzu keine Untersuchungen, obwohl anzunehmen ist, dass Bindung von Plasminogen durch exponierte Lysin-Reste grundsätzlich möglich wäre. Wenn dies der Fall ist, würde nicht die Fähigkeit von Tuf an sich mit Plasminogen zu interagieren zur Pathogenität beitragen, sondern möglicherweise die Lokalisation von Tuf auf der Zelloberfläche. Es ist unwahrscheinlich, dass die Rolle von Tuf als „Moonlighting“-Protein und die Lokalisation auf der Zelloberfläche nur auf pathogene Mikroorganismen beschränkt ist. Es könnte daher angenommen werden, dass sowohl bei pathogenen als auch bei apathogenen Mikroorganismen Tuf als „Moonlighting“-Protein auf der Zelloberfläche lokalisiert ist und dass die Bindung von Plasminogen durch Tuf eine eher unterstützende Funktion zu anderen Plasminogen-bindenden Proteinen ausübt. Die Interaktion von Tuf mit Plasminogen würde somit nur unter spezifischen Bedingungen, etwa bei immunsupprimierten Patienten zum pathogenen Potential bestimmter Mikroorganismen beitragen („Tipping the balance“).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass Tuf_{Ab} an humanes Plasminogen bindet. An dieser Interaktion sind Lysin-Reste sowie elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt. An Tuf_{Ab}-gebundenes Plasminogen ist für den Aktivator u-PA zugänglich und kann zu Plasmin aktiviert werden. Funktionelle Analysen bewiesen, dass das an Tuf_{Ab}-gebundene Plasmin in der Lage war, das chromogene Substrat S-2251, das physiologische Substrat Fibrinogen sowie die Komplementkomponente C3b proteolytisch zu degradieren. Der Nachweis von Tuf_{Ab} auf der Zelloberfläche lässt vermuten, dass dieses Molekül zur Pathogenität von *A. baumannii* beitragen kann. Um die physiologische Relevanz der Plasminogen-Bindung an Tuf zu untersuchen, müsste eine „loss of function“-Mutante generiert werden. Aufgrund der essentiellen Funktion von Tuf_{Ab} als Translations-Elongationsfaktor lassen sich jedoch keine überlebensfähigen Deletionsmutanten herstellen. Daher bleibt die physiologische Bedeutung von Tuf_{Ab} als Plasminogen-bindendes „Moonlighting“-Protein *in vivo* unklar.

4.2.2 Das Plasminogen-bindende p41-Protein von *A. baumannii*

4.2.2.1 Interaktion von p41 mit Plasminogen

In der vorliegenden Arbeit konnte mit p41 ein neuartiges Plasminogen-bindendes Protein von *A. baumannii* identifiziert werden. Dieses Lipoprotein (HMPREF0010_01565) ist in der Datenbank BioCyc als Hitzeschockprotein annotiert und hat bislang keine weitere bekannte Funktion. Nach Identifizierung mittels Massenspektrometrie wurde mit einer Hexahistidin-Sequenz versehenes p41 in *E. coli* produziert. Gereinigtes p41 konnte humanes Plasminogen sowohl unter denaturierenden Bedingungen als auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen binden (Abschnitt 3.5.2). Die Bindung von Plasminogen an p41 zeigte einen dosisabhängigen Verlauf wobei die Dissoziationskonstante für die p41-Plasminogen-Interaktion 36 nM (\pm 6 nM) beträgt. Damit liegt die Dissoziationskonstante in derselben Größenordnung wie der für Tuf_{Ab} ermittelte K_d -Wert und ist somit vergleichbar zu anderen bakteriellen Plasminogen-bindenden Proteinen mit Dissoziationskonstanten von 9,3 nM [234] bis 125 nM [267].

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von p41 mit Plasminogen ebenfalls durch Lysin-Reste vermittelt wird, wurden weiterführende Experimente durchgeführt. In Gegenwart von steigenden Konzentrationen des Lysin-Analogons Tranexamsäure zeigte sich eine deutliche und kontinuierliche Abnahme der Plasminogen-Bindung an p41 (Abschnitt 3.5.3). Bei einer Konzentration von 1 mM Tranexamsäure sank die Bindung auf 16% des Ausgangswertes, ein deutlicher Hinweis, dass Lysin-Reste für die Interaktion von p41 mit Plasminogen eine essentielle Rolle spielen. Interessante Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen der Bindungsnatur mittels Erhöhung der Ionenstärke durch NaBr erzielt: Die Erhöhung der Ionenstärke mit bis zu 1 M NaBr zeigte keine signifikante Auswirkung auf die Bindung von Plasminogen an p41. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei anderen Plasminogen-bindenden Proteinen gemacht. So ist sowohl die Bindung von Plasminogen an Tuf von *L. interrogans* [274], als auch an das Borrelienprotein ErpP [257] von der Ionenstärke unabhängig, obwohl in beiden Fällen die Bindung durch Lysine vermittelt wird. Am C-Terminus von p41 befinden sich

vier Lysin-Reste, die von einem Prolin-Rest unterbrochen werden (KKPKK). Es ist denkbar, dass die starke ionische Wechselwirkung selbst bei einer Konzentration von 1 M NaBr unbeeinflusst bleibt. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von NaBr in Wasser konnte die Auswirkung von höheren Konzentrationen auf die p41-Plasminogen-Bindung jedoch nicht untersucht werden. Allerdings hätten diese Ergebnisse rein akademischen Wert, da entsprechende Konzentrationen weit entfernt von den physiologischen Bedingungen wären.

Um die Plasminogen-interagierenden Domänen zu identifizieren, wurden eine Reihe von C-terminal verkürzten p41 Konstrukten generiert und auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht. Insgesamt wurden drei Konstrukte analysiert: Dem Konstrukt p41¹⁹⁻³⁵¹ fehlte der C-Terminus mit einer α -helikalen Region und insgesamt vier Lysin-Resten. Dem Konstrukt p41¹⁹⁻²⁹⁰ fehlten zwei weitere α -Helices und sechs weitere Lysin-Reste. Einem letzten Konstrukt, p41¹⁹⁻¹⁵³, schließlich fehlten nochmals drei α -helikale Regionen und weitere zehn Lysin-Reste (Abb. 22). Eine Deletion von 18 Aminosäure-Resten führte bereits zu einer signifikanten Reduktion der Plasminogen-Bindung (vergleiche Abschnitt 3.5.4), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die C-terminal lokalisierten Lysin-Reste wesentlich an der Bindung beteiligt sind. Weitere Deletionen führten zu keinem vollständigen Verlust der Bindung. Möglicherweise wurden durch die Deletionen zuvor nicht exponierte Bindestellen mit geringer Bindungsspezifität zugänglich. Dennoch lässt sich sagen, dass Lysin-Reste im C-Terminus von p41 essentiell für die Bindung von Plasminogen sind. Auch bei anderen bakteriellen Proteinen sind Lysin-Reste in C-terminalen α -Helices lokalisiert, durch welche eine Bindung an Plasminogen vermittelt wird, wie z. B. bei der Enolase von *S. pneumoniae* [264] oder dem BBA70 Lipoprotein von *B. burgdorferi* [262].

Durch die gravierenden Veränderungen im p41-Protein besteht die Möglichkeit, dass die generierten C-terminal verkürzten p41-Konstrukte nicht korrekt gefaltet sind und daher die einzelnen Konstrukte keine Bindung von Plasminogen mehr aufwiesen. Um strukturelle Veränderungen im Gesamtprotein nach Möglichkeit auszuschließen und gleichzeitig die für die Plasminogen-Bindung verantwortlichen Lysin-Reste einzugrenzen, wurden die

vier am C-Terminus lokalisierten Lysin-Reste durch Alanin-Reste substituiert. Durch *in vitro* Mutagenese wurden p41-Proteine mit einzelnen Aminosäureaustauschen (K365A, K366A, K368A und K369A), mit zweifachen Substitutionen (K365A/K366A und K368A/K369A) sowie vierfachem Austausch (K365A-K369A) generiert und auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber Plasminogen hin untersucht. Vierfache Substitutionen an den Positionen 365-369, die Doppelsubstitution an den Positionen 368 und 369 sowie die einzelne Substitution an Position 369 führten allesamt zum deutlichen Verlust der Bindung an Plasminogen (Abb. 26). Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Plasminogen an p41 (K369A) auf 50% des Ausgangswertes reduziert war und die Bindung an p41 (K368A/K369A) sowie p41 (K365A-K369A) nur noch 25% des Ausgangswertes betrug (Abb. 27). Lysin-Reste spielen bei einer Vielzahl von Plasminogen-bindenden Proteinen verschiedener Bakterien eine essentielle Rolle für die Bindung von Plasminogen [197, 252, 257, 262, 275, 307]. Für p41 konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden, dass bereits der Austausch eines einzelnen Lysin-Restes an Position 369 mit einer Reduktion der Plasminogen-Bindung auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes einherging, während die gleichzeitige Substitution der beiden C-terminalen Lysin-Reste, K368A und K369A eine weitere Reduktion der Plasminogen-Bindung bewirkte. Man hätte erwarten können, dass die Substitution der Aminosäure-Reste K368 bzw. K369 durch die C-terminalen Lysin-Reste K365 sowie K366 kompensiert werden könnte. Möglicherweise stehen jedoch nicht alle vier C-terminalen Lysin-Reste für die Interaktion mit Plasminogen zur Verfügung. Innerhalb des potentiellen C-terminalen Bindungsmotiv (KKPKK) ist ein Prolin-Rest lokalisiert, welches als „Helix-Brecher“ gilt. Es ist deshalb denkbar, dass dieser Prolin-Rest die Sekundärstruktur der putativen C-terminalen α -Helix unterbricht, wodurch nur die letzten beiden Lysin-Reste, an Position K368 und K369 frei zugänglich wären. Außerdem könnte durch die Substitution mit Alanin die Nettoladung des Bindungsmotivs stark beeinträchtigt werden. Allerdings sprechen die Versuche zur Charakterisierung der Plasminogen-Bindung eher gegen diese Annahme. Falls die Bindung stark von der positiven Ladung der C-terminalen Lysin-Reste abhängt, dann wäre zu erwarten, dass mit steigender Ionenkonzentration die Plasminogen-Bindung abnimmt, was jedoch nicht der Fall war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch die *in vitro* Mutagenese gewonnenen Daten eindeutig zeigen, dass die Aminosäure-Reste K368 und K369 für die Bindung von Plasminogen an p41 essentiell sind.

Plasminogen verfügt über mehrere Lysin-Bindestellen in seinen fünf Kringle-Domänen (Abb. 3). Somit stellte sich die Frage nach der mit p41 interagierenden Kringle-Domäne. Um dies zu beantworten, wurde eine Reihe von Bindungsstudien mit unterschiedlichen Plasminogen-Konstrukten durchgeführt (Abschnitt 3.5.5). Diese Studien ergaben, dass p41 signifikant an rekombinantes Plasminogen, bestehend aus Kringle-Domäne 1 bis 5 sowie der Proteasedomäne (K1-5-P) bindet. Eine Bindung von p41 an ein Plasminogen-Konstrukt, das aus den beiden Kringle-Domänen 4 und 5 sowie der Proteasedomäne (K4-5-P) besteht, konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Konstrukte bestehend aus Kringle-Domäne 3 bis 5 und der Proteasedomäne (K3-5-P) sowie Kringle-Domäne 5 und der Proteasedomäne (K5-P) zeigten keine Bindung. Eine weitere Eingrenzung der interagierenden Domäne war nicht möglich, weil das Fragment bestehend aus den Kringle-Domänen 2 bis 5 und der Proteasedomäne (K2-5-P) nicht zur Verfügung stand. Qualitativ erscheint die Interaktion von p41 mit K1-5-P stärker als die mit K4-5-P. Dies ist vermutlich der höheren Affinität der Lysin-Bindestelle (17 μM für Kringle 1 im Vergleich zu 36 μM für Kringle 4) in Kringle-Domäne 1 geschuldet. Die Lysin-Bindestelle in Kringle-Domäne 4 sollte in dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Glu-Plasminogen für eine Bindung nicht zugänglich sein, wird jedoch durch eine Konformationsänderung in Lys-Plasminogen frei [223, 308]. Auch durch Interaktion von Glu-Plasminogen mit anderen Proteinen, wie z. B. Fibrin, kann es zu Konformationsänderungen kommen, die die Lysin-Bindestelle in Kringle-Domäne 4 zugänglich machen [309, 310]. Es ist möglich, dass durch Deletion der ersten drei Kringle-Domänen in Konstrukt K4-5-P die Bindestelle in Kringle 4 frei exponiert ist und daher an p41 binden kann. In dem Fragment K3-5-P scheint dies interessanterweise nicht der Fall zu sein. Eine Bindung über Kringle 3 war nicht zu erwarten, da die Affinität der Lysin-Bindestelle in Kringle 3 extrem gering ist [226]. Allerdings scheint in diesem Konstrukt Kringle 4 ebenfalls nicht für eine Bindung an p41 zugänglich zu sein. Es ist möglich, dass das Fragment K3-5-P durch Deletion der Kringle-Domänen

1 und 2 eine unterschiedliche Konformation einnimmt, bei der die Kringle-Domäne 3 die Lysin-Bindestelle in Kringle-Domäne 4 sterisch „abschirmt“, beispielsweise durch das Fehlen der intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Kringle 2 und Kringle 3 (vergleiche Abb. 3) und deshalb p41 nicht binden kann. Eine andere Möglichkeit wäre, dass dieses Fragment nicht korrekt gefaltet ist und aus diesem Grund p41 keinen Zugang besitzt. Insgesamt zeigten die Bindungsstudien mit unterschiedlichen Plasminogen-Konstrukten, dass p41 mit Lysin-Bindestellen in den Kringle-Domänen 1 und 4 interagieren kann. Bei einem Verlust von Kringle-Domäne 1 kann p41 augenscheinlich noch über eine Bindestelle niedrigerer Affinität in Kringle-Domäne 4 binden, sofern diese zur Verfügung steht. Auch bei anderen bakteriellen Plasminogen-bindenden Proteinen, z. B. bei Streptokokken oder Borrelien, scheint Kringle-Domäne 4 eine wichtige Rolle für die Interaktion mit den jeweiligen bakteriellen Proteinen zu spielen [262, 311], was die Bedeutung dieser Proteindomäne für die Protein-Protein-Interaktion hervorhebt.

Funktionelle Analysen sollten klären, ob das an p41 gebundene Plasminogen für den Aktivator u-PA zugänglich ist und zu Plasmin aktiviert werden kann. Dazu wurden Fibrinogen-Degradations-Assays durchgeführt. Eine Degradation von Fibrinogen, als physiologisches Substrat, ermöglichte somit einen Rückschluss auf die Aktivierung von an p41 gebundenem Plasminogen. Die Effizienz dieser Interaktion zeigte sich bereits nach einer Inkubationszeit von 20 min. Innerhalb dieses Zeitraumes war die α -Kette von Fibrinogen in Gegenwart von p41 sowie BBA70, welches als Positivkontrolle verwendet wurde, nahezu restlos degradiert (Abb. 29). In den Reaktionsansätzen mit p41 konnte nach 2 h eine vollständige Degradation der α -, β -, und γ -Kette nachgewiesen werden. Diese Versuche zeigten, dass an p41 gebundenes Plasminogen für den Aktivator u-PA zugänglich ist und zu Plasmin aktiviert werden kann, welches effizient Fibrinogen abbaut.

Da die Serinprotease Plasmin eine breite Substratspezifität besitzt und ebenfalls eine Reihe von Komplementkomponenten degradiert [243, 244] wurde der Frage nachgegangen, ob an p41 gebundenes Plasminogen nach Aktivierung die Komplementkomponente C3b inaktiviert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen bewiesen tatsächlich, dass das an p41

gebundene Plasminogen nach Aktivierung die Komplementkomponente C3b degradiert (Abb. 30). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass p41 durch Bindung von Plasminogen zur Komplementresistenz und zur Immunevasion von *A. baumannii* beitragen kann.

4.2.2.2 Interaktionen von p41 mit Komplementkomponenten

Um den Einfluss von p41 auf das humane Komplementsystem genauer zu analysieren, wurden Zell-basierende hämolytische Assays durchgeführt. Während p41 keinerlei Einfluss auf den klassischen Weg sowie den terminalen Weg zeigte, wurde die Komplement-vermittelte Hämolyse nach Aktivierung des alternativen Weges hingegen schon bei der geringsten Konzentration durch p41 signifikant inhibiert (Abb. 31 A). Die Stärke der Inhibition war vergleichbar zur Positivkontrolle, in der der alternative Weg durch FH und FI reguliert und inaktiviert wurde. Auch p41 (K365A-K369A) inhibierte die Komplement-vermittelte Hämolyse im alternativen Weg signifikant. Da dieses p41-Konstrukt nicht in der Lage ist Plasminogen zu binden, lässt sich folgern, dass die beobachtete Inhibition des alternativen Weges nicht auf die Plasminogen-Bindung zurückzuführen ist. Ein Einfluss von FH ist ebenfalls auszuschließen, da p41 nicht an diesen wichtigen Komplementregulator bindet (Abb. A4 im Anhang). Die Tatsache, dass keine Inhibition des klassischen Aktivierungsweges zu beobachten war (Abb. 31 B) legt nahe, dass p41 nicht mit Komponenten des klassischen Weges wie C1q, C2 oder C4 interagiert. Eine Interaktion von p41 mit den Komplementkomponenten C7, C8 oder C9 konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da auch die Aktivierung des terminalen Weges von p41 unbeeinflusst blieb (Abb. 31 C).

Eine Möglichkeit, den inhibitorischen Effekt auf den alternativen Weg zu erklären, wäre durch die direkte Interaktion von p41 mit Komplementkomponenten dieses Aktivierungsweges. Daher wurden Bindungsstudien mit p41 und den Komplementkomponenten C3, C3b und C5 durchgeführt. Diese ergaben, dass p41 sowohl an C3, als auch an C3b und C5 binden kann (vergleiche Abb. 32). Die beiden Komplementkomponenten C3 und C5 zeigen eine hohe Sequenzidentität und auch strukturell weisen sie eine

hohe Ähnlichkeit auf [312]. Diese strukturelle Homologie könnte die Bindung von p41 an diese Komplementkomponenten erklären. Tatsächlich interagieren eine Reihe pathogener Mikroorganismen direkt mit C3, C3b sowie C5 und inhibieren dadurch den alternativen Weg der Komplementkaskade. YadA von *Yersinia enterocolitica* bindet beispielsweise direkt an C3b sowie inaktives C3b (iC3b) und kann über diesen Komplex zusätzlich FH rekrutieren, wodurch sich ein tripartiter Komplex ausbildet [313]. Staphylokokken produzieren die Proteine EfbC und Ecb, welche in der Lage sind, C3 sowie alle C3d-enthaltenden C3 Moleküle zu binden (C3b, iC3b und C3d) und dadurch die C3-Konvertase des alternativen Weges inhibieren [314, 315]. Das Glykoprotein C (gC) von HSV Typ I bindet ebenfalls C3b, iC3b und C3c sowie C5 und inhibiert dadurch die C3-Konvertase des alternativen Weges [316]. *C. albicans* sekretiert das Pra1 Protein, welches C3 bindet und dessen Spaltung durch die C3-Konvertase zu C3b und C3a blockiert [317]. Alle diese Beispiele untermauern, dass die direkte Interaktion von bakteriellen Proteinen mit C3 und C5 eine weit verbreitete Strategie darstellt, die anscheinend auch *A. baumannii* zur Evasion von Komplement nutzt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bindungsstellen der jeweiligen Komplementkomponenten nicht mit der Bindestelle von Plasminogen überlappen und daher C3, C3b oder C5 simultan mit Plasminogen gebunden wird (Abb. 33). Dass Plasminogen und Komplementkomponenten über distinkte Bindestellen mit ihren jeweiligen Liganden interagieren, konnte auch für andere bakterielle Proteine, wie z. B. die Phosphoglycerat-Kinase von *S. pneumoniae*, gezeigt werden [318]. Obwohl die direkte Interaktion von p41 mit den drei genannten Komplementkomponenten ausreicht, um den alternativen Weg zu inhibieren, könnte die simultane Bindung von Plasmin und C3, C3b oder C5 an p41 einen verstärkenden inhibitorischen Effekt ermöglichen, indem die Komplementkomponenten in unmittelbare räumliche Nähe der Serinprotease gebracht werden.

Viele Plasminogen-bindende Proteine humanpathogener Mikroorganismen interagieren mit einer Reihe von Komplementkomponenten und Regulatoren. So binden die Tuf-Proteine von *S. pneumoniae*, *L. interrogans* und

P. aeruginosa zusätzlich zu Plasminogen auch den Komplementregulator FH [248, 274, 275]. Die Phosphoglycerat-Kinase von *S. pneumoniae* ist ein weiteres Beispiel für ein „Moonlighting“-Protein, welches Plasminogen und den Plasminogen-Aktivator t-PA bindet und zudem mit den Komplementkomponenten C5, C7 und C9 interagiert und die Assemblierung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 sowie die Polymerisation von C9 inhibiert [318]. CRASP-orthologe Proteine von Borrelien können neben Plasminogen ebenfalls FH binden [181] und das prototypische CRASP-1 Protein, CspA von *B. burgdorferi* LW2 interagiert neben Plasminogen, FH und FHL-1 auch mit den Komplementkomponenten C7 sowie C9, wodurch die Formation des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 inhibiert wird [319]. Alle diese Beispiele zeigen, dass bakterielle Plasminogen-bindende Proteine oftmals multifunktionelle Eigenschaften besitzen und neben Plasminogen mit Komplementregulatoren und weiteren Komplementkomponenten interagieren können. Das Zusammenspiel vieler Faktoren und Liganden macht es jedoch schwierig, die Beteiligung einzelner Interaktionspartner und ihre Relevanz im Rahmen der Immunevasion des jeweiligen Mikroorganismus genauer zu analysieren und zu klären.

Grundsätzlich gibt es Überlappungen zwischen der Komplementkaskade und dem fibrinolytischen System, so ist beispielsweise die Komplementkomponente C7 in der Lage Plasminogen zu binden [320] und Faktor B, eine Protease die an der Generierung der C3-Konvertase des alternativen Weges beteiligt ist, kann Plasminogen durch proteolytische Spaltung zu aktivem Plasmin umsetzen [321]. Dieser „Crosstalk“ zwischen den beiden Kaskaden macht deutlich, dass es sich um hochkomplexe, verzweigte Systeme handelt. Pathogene Mikroorganismen haben eine Reihe von oftmals überlappenden Mechanismen entwickelt, um durch Interferenz mit dem fibrinolytischen System und Komplement die angeborene Immunantwort des Wirts zu modulieren, regulieren, inaktivieren und dadurch der Bakteriolyse zu entgehen [322].

4.2.3 Vorkommen von p41 bei klinischen *A. baumannii*-Isolaten

Mittels monoklonaler Antikörper konnte p41 bei allen analysierten Stämmen, mit Ausnahme der Mutante $\Delta p41$ nachgewiesen werden. Obwohl der anti-p41 Antikörper in der Westernblot-Analyse mit vergleichbarer Intensität mit den p41-Proteinen der einzelnen *A. baumannii*-Stämmen reagierte (Abb. 35), war die Intensität der Antikörper-Antigen-Reaktionen mit dem anti-Plasminogen Antikörper in der Far-Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Plasminogen-Bindung bei den klinischen Isolaten 15CS und 25CS sowie beim Referenzstamm ATCC 19606 deutlich schwächer als bei den klinischen Isolaten 11CS und V754948 (Abb. 6 A). Ein Sequenzvergleich der p41-Proteine mehrerer *A. baumannii*-Stämme zeigte jedoch, dass vor allem die Plasminogen-bindenden C-Termini zu 100% identisch sind (Abb. A5 im Anhang).

4.2.4 Membranständigkeit von p41 in *A. baumannii*

Untersuchungen von Membranfraktionen des *A. baumannii*-Referenzstammes ATCC 19606 identifizierten p41 in der hydrophoben Phase (Abb. 35). Sequenzanalysen ließen zudem vermuten, dass p41 in der äußeren Membran von *A. baumannii* lokalisiert sein sollte. Daher wurde ein Protease-Assay zum *in situ* Nachweis von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii* ATCC 19606 durchgeführt. Wie in Abb. 36 zu sehen ist, hatte Trypsin keinen Effekt auf die Plasminogen-Bindung an p41 bzw. das p41-Protein an sich. Nach Behandlung mit Proteinase K war bereits ab 50 $\mu\text{g/ml}$ keine Plasminogen-Bindung mehr zu beobachten. Die Intensität der Antikörper-Antigen-Reaktion mit dem anti-p41 Antikörper zeigte eine leichte Reduktion. Zudem war das Auftreten spezifischer Abbauprodukte zu beobachten. Da die Bindung von Plasminogen an p41 über die C-terminalen Lysin-Reste K368 und K369 erfolgt, kann gefolgert werden, dass eine proteolytische Degradation des C-Terminus durch Proteinase K zum Verlust der Plasminogen-Bindung führt. Dass der anti-p41 Antikörper in der Westernblot-Analyse trotzdem mit dem p41-Protein reagierte, wenn auch mit leicht verminderter Intensität, lässt sich dadurch erklären, dass die Antikörper gegen p41 allesamt im N-terminalen Bereich des Proteins binden (Abb. 34).

Während die Ergebnisse des Protease-Assays zumindest für eine Lokalisation der Plasminogen-bindenden Region auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* sprechen, müssen sie dennoch mit Vorsicht interpretiert werden. Bei vergleichbaren Studien wurden stets periplasmatische Proteine als Kontrolle verwendet, um sicherzugehen, dass die äußere Membran der zu untersuchenden Bakterien vor der Inkubation mit den Proteasen intakt war [304, 305]. Da für *A. baumannii* keine Antikörper gegen gut charakterisierte periplasmatische Proteine vorlagen, musste auf eine entsprechende Kontrolle verzichtet werden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Degradation von p41 auf die Instabilität der äußeren Membran zurückgeht. In diesem Fall könnten auch periplasmatisch-lokalisierte Proteine proteolytisch degradiert werden.

Um weitere Hinweise auf die Lokalisation von p41 zu erhalten, wurden daher Immunfluoreszenz-Tests mit einem polyklonalen anti-p41 Antiserum durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten nur wenige p41-produzierende Bakterienzellen (Abb. 37). In diesen Bakterienzellen war p41 jedoch nicht im Zytoplasma sondern in der Membran lokalisiert. Letztlich kann eine periplasmatische Lokalisation des Proteins jedoch basierend auf den Immunfluoreszenz-Tests nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (Abb. 38) ergaben, dass bei durchschnittlich 31% der gemessenen *A. baumannii*-Zellen p41 auf der Oberfläche lokalisiert ist. Als weitere Kontrolle wurden Bakterienzellen nach einem ersten Inkubationsschritt permeabilisiert und nochmals mit dem anti-p41 Immunserum sowie einem Cy-3-markierten, sekundären anti-Maus Antikörper inkubiert. Hierdurch sollte Aufschluss darüber erhalten werden, ob p41 im Periplasma lokalisiert ist. Allerdings wurden in diesen Versuchen keine über die Hintergrundfluoreszenz hinausgehenden Werte gemessen (Ergebnisse nicht gezeigt), was gegen eine periplasmatische Lokalisation von p41 sprechen würde.

Grundsätzlich sind die Mehrzahl der Lipoproteine bei Gram-negativen Bakterien in der periplasmatischen Seite der äußeren oder der inneren Membran verankert, [323, 324]. Bakterielle Lipoproteine verfügen über eine N-terminale

Signalsequenz von ca. 20 Aminosäure-Resten [325]. Der C-Terminus der Signalsequenz, die so genannte Lipobox, ist für Sekretion der Lipoproteine durch die innere Membran essentiell [326]. Die Sequenz der Lipobox kann bei einigen Mikroorganismen, wie etwa bei Spirochäten, von der klassischen Sequenz anderer Gram-negativer Bakterien (Abb. 47) abweichen [327].

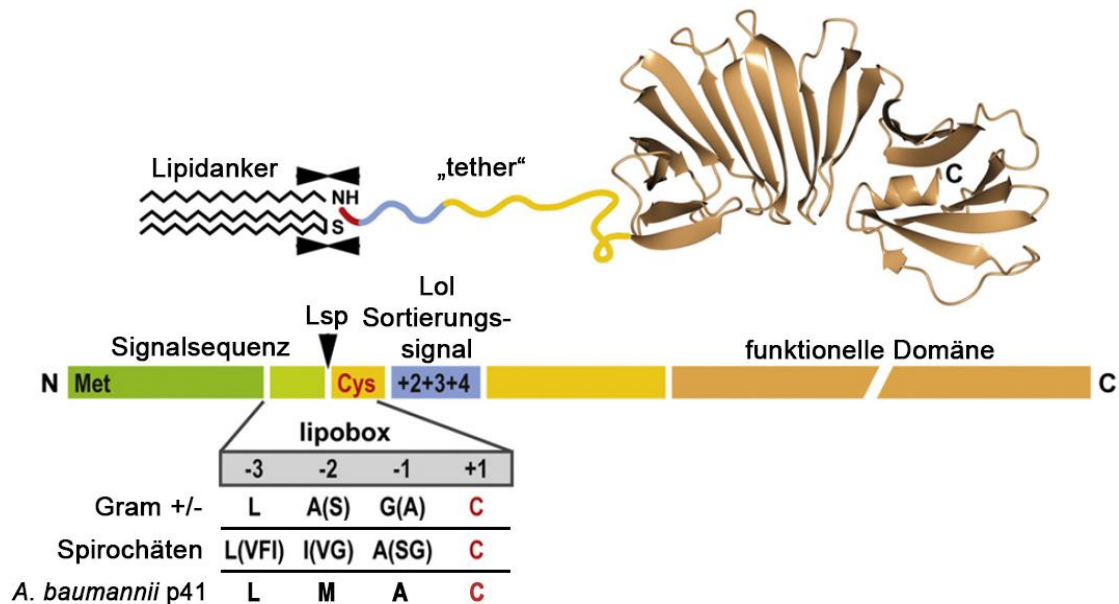


Abb. 47. Übersicht der Struktur bakterieller Lipoproteine. Lipoproteine werden im Zytoplasma als Prä-Pro-Lipoproteine translatiert. Sie haben eine aus ca. 20 Aminosäure-Resten bestehende N-terminale Signalsequenz (grün). Der C-terminale Bereich der Signalsequenz, die Lipobox enthält das Signal für den Export der Lipoproteine durch die innere Membran. Die N-terminale Signalsequenz wird durch Signalpeptidase II (Lsp, Lipoprotein Signalpeptidase) abgespaltet. Aminosäure-Reste an Position +2, +3 und/oder +4 nach dem Cystein-Rest an Position +1, welches den Lipidanker trägt, bedingen die Lokalisierung von Lipoproteinen in der inneren oder äußeren Membran (Lol Sortierungssignal, blau unterlegt). Ein Asparagin-Rest an Position +2 fungiert bei den meisten Mikroorganismen als Signal zur Retention von Lipoproteinen in der inneren Membran. Der Bereich C-terminal des Sortierungssignals weist zumeist keine traditionelle Sekundärstruktur auf und dient als flexible „tether“-Region (gelb), während die funktionelle Domäne bakterieller Lipoproteine zumeist im C-terminalen Bereich lokalisiert ist (orange). Die Abbildung wurde modifiziert nach [323].

Die Lipobox von p41 hat die Sequenz L-M-A-C und unterscheidet sich somit ebenfalls leicht von der klassischen Sequenz L-A(S)-G(A)-C. Während die Lipobox die Sekretion durch die innere Membran kontrolliert, wird die endgültige Lokalisation der Lipoproteine durch die so genannte „+2 Regel“ bedingt. Ein Asparagin-Rest an Position +2 nach dem Cystein-Rest, welcher den Membrananker trägt, führt zur Verankerung von Lipoproteinen in der

inneren Membran. Jeder andere Aminosäure-Rest an dieser Position führt zur Lokalisation in der äußeren Membran [328]. Weitere Studien konnten zeigen, dass es Ausnahmen bei der „+2 Regel“ gibt. So können auch die Aminosäure-Reste Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Glycin und Prolin an Position +2 zum Verbleib in der inneren Membran führen, wenn an Position +3 zusätzlich ein Asparagin-Rest lokalisiert ist [329]. Für *P. aeruginosa* konnte zudem gezeigt werden, dass ein Lysin-Rest an Position +3 zusammen mit einem Serin-Rest an Position +4 verantwortlich für das Verbleiben von Lipoproteinen in der inneren Membran ist [330]. In der Aminosäuresequenz fehlt p41 ein Asparagin-Rest an Position +2 der N-terminal lokalisierten Lipobox, bzw. andere oben aufgeführte Aminosäure-Reste, welche bei Gram-negativen Bakterien als Signal für die Retention von Lipoproteinen in der inneren Membran gelten [324, 331]. Aus diesem Grund scheint eine Lokalisation von p41 in der zytoplasmatischen Membran eher unwahrscheinlich. Gesetzt den Fall, dass p41 in der äußeren Membran verankert ist, bleibt trotzdem die Frage, ob das Protein auf der periplasmatischen Seite, oder auf der äußeren Seite der Zellmembran lokalisiert ist. Während es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Studien zur Lokalisierung von Lipoproteinen auf der äußeren Membran von *A. baumannii* gibt, ließen sich bei *E. coli* nur 4 von insgesamt 90 Lipoproteinen auf der Zelloberfläche nachweisen [332, 333], u. a. das prototypische Lipoprotein Lpp [334]. Auch bei anderen Gram-negativen Bakterien gibt es Beispiele für Lipoproteine, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, etwa die Pullulanase Pula von *Klebsiella oxytoca* [335], die Eisen-„scavenging“ Proteine LbpB und TbpB von *N. gonorrhoeae* [336-338], die Phospholipase VolA von *Vibrio cholerae* [339], die Protease NalP von *N. meningitidis* [340, 341] oder das Adhäsın JlpA von *Campylobacter jejuni* [342, 343].

Die Mechanismen, die dazu führen, dass die oben genannten Lipoproteine durch die äußere Membran transportiert und auf der Zelloberfläche exponiert werden, unterscheiden sich in all den zuvor genannten Beispielen bzw. sind nicht immer aufgeklärt. Pula von *K. oxytoca* wird durch das sogenannte Pul Sekretionssystem sekretiert, ein Multiproteinkomplex, welcher evolutionär mit einem Typ-II-Sekretionssystem verwandt ist [344, 345]. NalP von *N. meningitidis* ist ein Lipoprotein mit typischen C-terminalen Translokator- und N-terminalen

„Passenger“-Domänen, wie sie in anderen Autotransportern Gram-negativer Bakterien zu finden sind und die über Typ-V-Sekretionssysteme sekretiert werden [341]. Im Gegensatz zu anderen Gram-negativen Bakterien sind bei *B. burgdorferi* über zwei Drittel der 120 Lipoproteine auf der Zelloberfläche lokalisiert [323]. Für Borrelien wird die Existenz eines „Flippase“-Komplexes postuliert, welcher Lipoproteine, die im Periplasma von Chaperonen gebunden sind, durch die äußere Membran transloziert und sie zugleich in der Membran verankert [323, 346-348]. Diese Beispiele aus anderen Organismen zeigen, dass Lipoproteine Gram-negativer Bakterien grundsätzlich auf der Zelloberfläche lokalisiert sein können. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen, des Protease-Assays und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie legen nahe, dass p41 bzw. der Plasminogen-bindende C-Terminus zumindest bei einigen *A. baumannii*-Zellen auf der Oberfläche lokalisiert ist.

Zusammenfassend konnte p41 als neues, bisher unbekanntes Plasminogen-bindendes Protein von *A. baumannii* identifiziert werden. Die Interaktion von p41 mit Plasminogen erfolgt dabei über die C-terminalen Lysin-Reste K368 und K369 und scheint von der Ionenstärke unabhängig zu sein. Die Kringle-Domänen 1 und 4 von Plasminogen sind bei der Bindung involviert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass an p41-gebundenes Plasminogen zugänglich für den Aktivator u-PA ist und zu Plasmin umgesetzt werden kann. Plasmin, gebunden an p41, war in der Lage, sowohl das physiologische Substrat Fibrinogen als auch die zentrale Komplementkomponente C3b zu degradieren. Unabhängig von der Bindung von Plasminogen konnte gezeigt werden, dass gereinigtes p41 direkt mit den Komplementkomponenten C3, C3b und C5 interagiert und die hämolytische Aktivität des alternativen Weges inhibiert. Untersuchungen zur Oberflächenständigkeit von p41 ergaben erste Hinweise darauf, dass zumindest der Plasminogen-bindende C-Terminus auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* lokalisiert ist.

4.2.5 Inaktivierung des p41-kodierenden Gens in *A. baumannii*

ATCC 19606

Um die physiologische Relevanz der Interaktionen von p41 mit Plasminogen sowie den Komplementkomponenten C3, C3b und C5 beurteilen zu können, wurde das p41-kodierende Gen im *A. baumannii* Referenzstamm ATCC 19606 inaktiviert. Die resultierende Mutante, $\Delta p41$, wurde auf deren Fähigkeit, Plasminogen auf der Zelloberfläche zu binden, untersucht. Wie Abb. 42 zeigt, führte die Deletion des p41-kodierenden Gens zu einer signifikanten Reduktion der Plasminogen-Bindung, was die Bedeutung dieses Proteins für die Interaktion mit wirtsspezifischen Serumproteinen unterstreicht. Dieses Ergebnis ist zudem ein weiteres Indiz dafür, dass zumindest die Plasminogen-bindende Domäne von p41 auf der Oberfläche von *A. baumannii* ATCC 19606 lokalisiert sein muss, da sich ansonsten die Deletion des p41-kodierenden Gens nicht negativ auf die Bindung auswirken sollte. Die Tatsache, dass die $\Delta p41$ Mutante im ELISA noch Plasminogen binden konnte spricht ebenfalls dafür, dass *A. baumannii* weitere Plasminogen-bindende Proteine auf der Zelloberfläche besitzt, wie z. B. Tuf_{Ab} oder OmpW.

Interessanterweise lieferten Untersuchungen zur Plasminogen-Bindung durch vitale *A. baumannii*-Zellen mittels Durchflusszytometrie kontroverse Ergebnisse. Wie Abb. 43 zeigt, waren durchschnittlich 43,2% der Zellen der Gesamtpopulation beim Wildtyp *A. baumannii* ATCC 19606 in der Lage, Plasminogen auf der Zelloberfläche zu binden. Bei der Mutante $\Delta p41$ hingegen waren durchschnittlich nur noch 4,7% der Gesamtpopulation positiv. Die Tatsache, dass nur etwa die Hälfte der Zellpopulation positiv waren und dass nur bei wenigen Zellen p41 in den Immunfluoreszenz-Tests sowie mittels Durchflusszytometrie detektiert werden konnte (Abschnitt 3.5.11), könnte ein Hinweis darauf sein, dass das p41-kodierende Gen unter den gewählten Versuchsbedingungen stochastisch exprimiert wird. Für diese Untersuchungen wurden *A. baumannii*-Zellen bis zur späten logarithmischen Phase kultiviert (Abschnitt 2.15.1) und p41 wurde nicht von allen *A. baumannii*-Zellen produziert. Tatsächlich wurde für ein Serum-resistentes *A. baumannii* Isolat gezeigt, dass das p41-kodierende Gen dieses Stammes (A1S_1027) bei

Wachstum in humanem Serum um einen Faktor von 7,9 stärker exprimiert wird, im Vergleich zu Zellen, welche in LB-Medium kultiviert wurden [349]. Zudem konnten Geisinger et al. kürzlich zeigen, dass *A. baumannii*-Zellen in Gegenwart subinhibitorischer Konzentrationen bestimmter Antibiotika die Produktion von Kapsel-Exopolysacchariden stark erhöhen, was mit einer erhöhten Resistenz gegenüber den verwendeten Antibiotika einhergeht. Die entsprechenden Bakterienzellen waren resistenter gegenüber dem bakteriolytischen Effekt von humanem Serum und überlebten besser in einem Mausmodell [350]. Beide zuvor genannten Studien legen nahe, dass Stressfaktoren wie subinhibitorische Konzentrationen bestimmter Antibiotika oder Wachstum in der Gegenwart von NHS zur vermehrten Produktion spezifischer Pathogenitätsfaktoren in *A. baumannii* führen können. Vor diesem Hintergrund wäre es sinnvoll, die Expression des p41-kodierenden Gens bzw. die Produktion des p41-Proteins unter verschiedenen experimentellen Bedingungen eingehender zu untersuchen. Grundsätzlich sprechen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie dafür, dass p41 unter den gewählten Versuchsbedingungen das primäre Plasminogen-bindende Protein von *A. baumannii* ist und Tuf_{Ab} sowie OmpW eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Der Einfluss der Plasminogen-Bindung sowie Bindung der Komplementkomponenten C3, C3b und C5 an p41 auf das Überleben von *A. baumannii* in NHS wurde mit Hilfe von Serumresistenz-Tests untersucht (Abb. 44). Die Überlebensrate von *A. baumannii* ATCC 19606 Wildtyp blieb in Gegenwart von 20% NHS unbeeinflusst. Ansteigende Konzentrationen führten zum drastischen Absinken der Überlebensrate. In Gegenwart von 50% NHS überlebten noch etwa 20% der Zellen des Wildtyps. Die Mutante $\Delta p41$ zeigte eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber NHS. Bei einer Konzentration von 40% NHS überlebte nur 1% der Zellen der Mutante, verglichen mit 69% des Wildtyps. Diese Untersuchungen zeigen, dass p41 maßgeblich zum Überleben von *A. baumannii* in humanem Serum beiträgt. Allerdings erlauben sie keinen Rückschluss darauf, ob die Serumresistenz durch die Bindung von Plasminogen und anschließende Proteolyse von Komplementkomponenten, die direkte Interaktion mit C3, C3b bzw. C5, oder einer Kombination beider

Möglichkeiten verursacht wird. Auf den ersten Blick legen die Ergebnisse der hämolytischen Tests nahe, dass gereinigtes p41 den alternativen Weg unabhängig von der Bindung an Plasminogen inhibiert, vermutlich durch direkte Interaktion mit C3, C3b und C5. Eine Möglichkeit, wie p41 die hämolytische Aktivität des alternativen Weges unabhängig von Plasminogen inhibiert, bestünde darin, dass an p41 gebundene Komplementkomponenten (C3, C3b) nicht mehr in ausreichender Konzentration vorhanden wären, um in die C3-Konvertase des alternativen Weges inkorporiert zu werden. Die Tatsache, dass der klassische Weg nicht durch p41 inhibiert wird legt nahe, dass die Interaktion mit C5 eine untergeordnete Rolle gegenüber der Bindung von C3 bzw. C3b spielt. Würde durch die Interaktion von p41 mit C5 die Assemblierung des terminalen Komplementkomplexes (C5b-9) beeinträchtigt oder inhibiert, müsste p41 auch die Hämolyse durch den klassischen Weg inhibieren, da beide Aktivierungswege mit der Assemblierung des terminalen Komplexes konvergieren. Es ist möglich, dass im hämolytischen Assay die Effizienz der Aktivierung des klassischen Weges so hoch ist, dass die Interaktion von p41 mit C5 nicht ausreicht, um die Komplementkaskade negativ zu regulieren. D.h., dass der Regulierung des alternativen Weges, vor allem durch die direkte Interaktion von p41 mit C3/C3b und der möglichen Inhibition der C3-Konvertase größere Bedeutung zukommt. Diese Vermutung erscheint auch vor dem Hintergrund plausibel, dass *A. baumannii*-Zellen primär über den alternativen Weg durch Komplement abgetötet werden [109, 215]. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die direkte Interaktion von humanpathogenen Mikroorganismen mit C3, C3b und C5 (Abschnitt 4.2.2.2). Die beobachtete, Plasminogen-unabhängige, Inhibition des alternativen Weges stellt sicherlich ein Indiz für die Komplement-inhibitorischen Eigenschaften von p41 dar. Dieser interessante Aspekt müsste in zukünftigen Analysen weiterverfolgt werden, um die Bedeutung von p41 als weiteren Pathogenitätsfaktor von *A. baumannii* zu untermauern.

Neben der initialen Adhäsion spielen Faktoren, die die Dissemination von *A. baumannii* begünstigen bzw. begründen eine wesentliche Rolle im Infektionsprozess. Aus diesem Grund wurde die Relevanz der Plasminogen-Bindung durch p41 für die Fähigkeit von *A. baumannii* Endothelzell-Monolayer

zu durchdringen, untersucht. Plasminogen-behandelte Zellen des Wildtyps konnten durch einen Endothelzell-Monolayer transmigrieren, während Zellen der Mutante $\Delta p41$ hierzu nicht in der Lage waren (Abb. 45). Mit durchschnittlich 800 KBE/ml konnten nur wenige Zellen des Wildtyps nach 2 h Inkubation durch den Endothelzell-Monolayer transmigrieren. Für *A. baumannii* wurde gezeigt, dass nur etwa 10% Zellen des Ausgangsinokulums an A549 Lungenepithelzellen adhäreren [351]. Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HUVEC Endothelzellen liegt die Rate der adhärerenden *A. baumannii*-Zellen bei ungefähr 10% (Persönliche Mitteilung, M. Weidensdorfer). Nur Zellen, welche adhäreren, können in einem weiteren Schritt auch durch das Endothel transmigrieren. Kontrollversuche bestätigten, dass Wildtyp-Zellen nach Behandlung mit Plasminogen und u-PA sowohl Plasminogen als auch Plasmin auf ihrer Zelloberfläche gebunden hatten, während für die Mutante $\Delta p41$ weder Plasminogen noch Plasmin nachgewiesen werden konnte. Viele pathogene Mikroorganismen nutzen Plasminogen als Protease mit breitem Wirkspektrum, um im humanen Wirt zu persistieren. Dies konnte z. B. für Borrelien, Leptospiren und Streptokokken gezeigt werden [291, 292, 352-354]. *B. burgdorferi*, der Erreger der Borreliose, nutzt die Bindung und Aktivierung von Plasminogen aus, um Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin und Vitronectin abzubauen [352], sowie für die Transmigration durch Endothelzell-Monolayer [291]. Auch bei der Transmigration durch die Blut-Hirn-Schranke scheint Plasminogen eine Rolle zu spielen [355]. Auch *L. interrogans*, der Erreger der Leptospirose, nutzt die Bindung von Plasmin zur Transmigration [292]. Die Bindung von Plasminogen an *S. pneumoniae* verstärkt die Transmigration im Vergleich zu unbehandelten Bakterienzellen [353]. Der Verlust des Plasminogen-Bindeproteins PavB führt zu einer verzögerten Transmigration von *S. pneumoniae* durch epitheliale Zellen der Lunge [354]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Bindung von Plasminogen *Streptococcus canis* befähigt, Fibrin-Thromben aufzulösen [356]. Im Hintergrund der aufgeführten Szenarien scheint die Interaktion mit Plasminogen für *A. baumannii* von besonderer Bedeutung zu sein, da die Bindung eine effizientere Transmigration durch das Endothel erlaubt und zur besseren Dissemination der Bakterienzellen im Wirt beitragen könnte.

Grundsätzlich untermauern die mit der $\Delta p41$ Mutante durchgeführten Untersuchungen die physiologische Relevanz der Interaktion von p41 mit humanem Plasminogen insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass die Deletion des p41-kodierenden Gens zu einem signifikanten Defekt im Überleben von *A. baumannii* in der Gegenwart von humanem Serum führt und sich zudem negativ auf die Fähigkeit der Bakterienzellen auswirkt, Endothelzell-Monolayer zu durchdringen. Der Umkehrschluss legt somit nahe, dass Bindung von Plasminogen eine wichtige Rolle für das Überleben sowie für die Dissemination von *A. baumannii* im humanen Wirt spielt.

4.3 Physiologische Rolle der Plasminogen-Bindung

Plasminogen-bindende Proteine wurden für eine Vielzahl humanpathogener Mikroorganismen beschrieben, u. a. Translations-Elongationsfaktor Tuf von *P. aeruginosa* [275], das PE Protein von *H. influenzae* [252], Lsa20 von *L. interrogans* [307], die CRASP-Proteine (complement regulator-acquiring surface protein) von *B. burgdorferi* [256, 257], die Enolasen von *S. pneumoniae* und *N. meningitidis* [264, 270] sowie Gpm1p und Pra1 von *C. albicans* [195, 197].

Grundsätzlich kann gebundenes Plasminogen unterschiedliche Funktionen erfüllen. Eine Funktion ist die Adhäsion an Wirtszellen. So dient Plasminogen als „molekulare Brücke“ und vermittelt die Bindung von pathogenen Mikroorganismen wie *S. pneumoniae* an Lungenepithelzellen [357]. Neben der Adhäsion und der Transmigration besitzt Plasmin(ogen) durch seine Komplement-inhibitorische Aktivität [243, 244] eine unterstützende Funktion bei der Evasion der angeborenen Immunantwort durch pathogenen Mikroorganismen. So haben Hollands et al. gezeigt, dass Streptokokken der Gruppe A mit Hilfe von Plasmin befähigt sind, antimikrobielle Peptide, wie das von Epithelzellen produzierte Cathelicidin, zu degradieren [358]. Zusätzlich kann Plasminogen nach Aktivierung zu Plasmin auch bei der Evasion der adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen, indem Plasmin Immunglobuline degradiert [359]. Somit trägt die Interaktion mit Plasminogen zur Pathogenität einer Reihe von Mikroorganismen bei.

In dieser Arbeit konnte für *A. baumannii* erstmals eine Interaktion mit Plasminogen nachgewiesen werden. Zudem wurden drei Plasminogen-bindende Proteine identifiziert, der Translations-Elongationsfaktor Tuf, das äußere Membranprotein OmpW sowie p41 als ein Protein von bisher unbekannter Funktion (vergleiche Abschnitt 3.2). Die Identifizierung mehrerer Plasminogen-bindender Proteine in einem Organismus lässt auf funktionelle Redundanz schließen. Diese Redundanz kann auch bei anderen humanpathogenen Bakterien beobachtet werden. So wurden für *B. burgdorferi* bisher neun Plasminogen-bindende Proteine beschrieben [256-262, 267-269]. Der Bindung von Plasminogen an *B. burgdorferi* kommt besondere Bedeutung zu, da für diesen Organismus bislang nur eine einzige oberflächenständige Protease beschrieben wurde, welche durch Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix zur Dissemination der Spirochäten beitragen könnte [360].

A. baumannii besitzt mindestens zwei unterschiedliche Proteasen, die sekretiert werden. Für die Serinprotease PKF wird eine Rolle bei der Komplementresistenz von *A. baumannii* diskutiert, da eine PKF-defiziente Mutante deutlich schlechter in der Gegenwart von NHS überlebte. Diese Protease inhibiert spezifisch den alternativen Weg [100]. Eine weitere Protease von *A. baumannii* ist die Zink-abhängige Metallo-Endopeptidase CpaA [361]. Dieses Enzym scheint gezielt die Koagulationskaskade des Wirts anzugreifen, indem Faktor V und Fibrinogen proteolytisch gespalten werden, was zu einer signifikanten Reduktion der Gerinnungsaktivität von humanem Plasma führt. Durch die Bindung von Plasminogen verfügt *A. baumannii* über eine zusätzliche, oberflächenexponierte Protease. Dabei kann Plasminogen ähnliche Funktionen ausüben wie die beiden einzelnen, sekretierten Proteasen und verfügt sowohl über komplementregulatorische Eigenschaften durch die Spaltung von C3b, als auch über gerinnungshemmende Eigenschaften durch die Spaltung von Fibrinogen. *A. baumannii* scheint eine Strategie zu verfolgen, bei der unterschiedliche Mechanismen ineinandergreifen, um sich vor Bakteriolyse zu schützen. Einige bereits identifizierte Pathogenitätsfaktoren von *A. baumannii* scheinen einen Einfluss auf das Überleben der Bakterien in humanem Serum zu haben (vergleiche Abschnitt 1.4). Diese Strategie

erscheint sinnvoll, da sich *A. baumannii* somit nicht auf einen einzigen Faktor „festlegt“. In der Lunge ist die Konzentration an Komplementproteinen grundsätzlich niedriger [362]. Bei Pneumonien könnten daher sterische Barrieren wie die Polysaccharidkapsel ausreichenden Schutz gegenüber Komplement bieten. Im Blut dagegen liegt eine hohe Konzentration an Komplement vor, so dass *A. baumannii* während der Dissemination auf weitere Schutzmechanismen angewiesen ist. Im Blut liegt Plasminogen in hohen Konzentrationen vor und Endothelzellen sezernieren zudem Plasminogen-Aktivatoren [363]. Somit wäre in diesen Situationen die Bindung von Plasminogen eine sinnvolle Strategie, um der Komplement-vermittelten Bakteriolyse zu entkommen. Ein multifaktorieller Ansatz zur Überwindung von Komplement würde *A. baumannii* zudem weniger anfällig dafür machen, einzelne Proteine etwa durch Mutation zu verlieren.

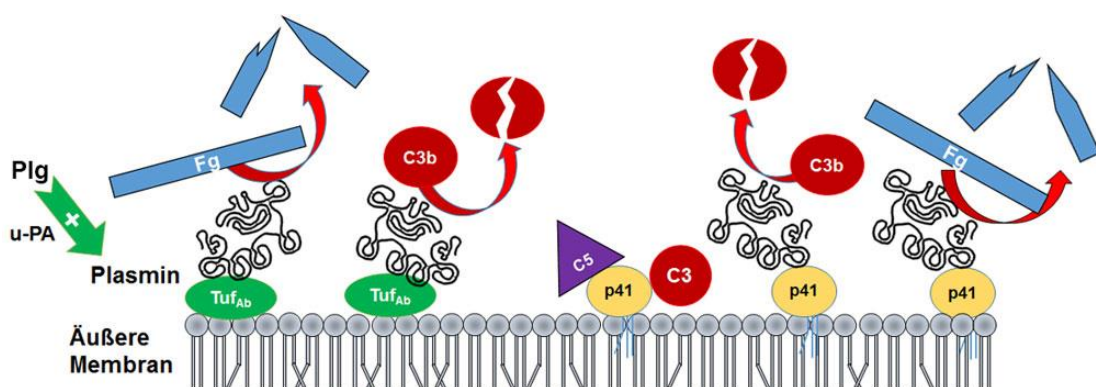


Abb. 48. Schematisches Modell der Interaktionen von *A. baumannii* mit Plasminogen. Plasminogen (Plg) kann auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* nach Bindung an Tuf_{Ab} oder p41 zu Plasmin aktiviert werden und nachfolgend Fibrinogen (Fg) oder C3b spalten. Zudem interagiert p41 direkt mit C3, C3b oder C5 (Mitte). Die Bindung dieser Komplementkomponenten an p41 könnte zur Inhibition der C3- bzw. der C5-Konvertase des alternativen Weges führen. Die Abbildung wurde modifiziert nach [262].

Abb. 48 zeigt schematisch, wie Tuf_{Ab} und p41 durch Interaktion mit Plasminogen sowie p41 ebenfalls durch direkte Interaktion mit den Komplementkomponenten C3, C3b und C5 zur Evasion des Komplementsystems und zur Dissemination im Wirt beitragen könnten: Gebundenes Plasminogen wird durch Aktivatoren wie u-PA zu Plasmin aktiviert. Die resultierende Degradation von Fibrinogen oder anderen

Komponenten der extrazellulären Matrix ermöglicht *A. baumannii* bei der Dissemination im Wirt zu persistieren, während die proteolytische Spaltung von C3b zur Serumresistenz von *A. baumannii* beiträgt. Durch direkte Interaktion von p41 mit C3, C3b und C5 könnte zusätzlich die Formation der C3-, als auch der C5-Konvertase des alternativen Weges inhibiert werden, wodurch die Aktivierung des terminalen Weges unterbunden wird.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Interaktion von *A. baumannii* mit humanem Plasminogen untersucht. Mit dem Translations-Elongationsfaktor Tuf_{Ab}, dem äußeren Membranprotein OmpW sowie dem Lipoprotein p41 konnten insgesamt drei Plasminogen-bindende Proteine von *A. baumannii* identifiziert werden. Außerdem wurde ein grundlegender Beitrag zur funktionellen Charakterisierung von Tuf_{Ab} sowie p41 von *A. baumannii* erbracht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass gereinigtes Tuf_{Ab} humanes Plasminogen bindet und diese Interaktion teilweise durch Lysin-Reste vermittelt und von der Ionenstärke beeinflusst ist. An Tuf_{Ab}-gebundenes Plasminogen war für den Plasminogen-Aktivator u-PA zugänglich und konnte zu Plasmin aktiviert werden, welches das chromogene Substrat S-2251, das physiologische Substrat Fibrinogen und die zentrale Komplementkomponente C3b proteolytisch spaltete. Schließlich konnte Tuf_{Ab} als „Moonlighting“-Protein auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* identifiziert werden.

Für das Lipoprotein p41 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass dieses an Plasminogen bindet. Die Bindung von Plasminogen an p41 erfolgte ebenfalls über Lysin-Reste, zeigte sich allerdings von der Ionenstärke unbeeinflusst. Im Fall von p41 konnte mit Hilfe von C-terminal verkürzten p41-Konstrukten gezeigt werden, dass C-terminale Lysin-Reste an der Bindung von Plasminogen beteiligt sind. Weitere Versuche mit p41-Proteinen, bei welchen vier C-terminale Lysin-Reste durch Alanin-Reste substituiert wurden, ergaben, dass die beiden Lysin-Reste K368 und K369 essentiell für die Bindung von Plasminogen an p41 sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl Kringle-

Domäne 1 als auch Kringle-Domäne 4 von Plasminogen bei der Interaktion mit p41 involviert sind. An p41 gebundenes Plasminogen ließ sich durch u-PA zu Plasmin aktivieren, welches Fibrinogen sowie die zentrale Komplementkomponente C3b degradierte. p41 ist außerdem in der Lage, die Komplementkomponenten C3, C3b und C5 zu binden und den alternativen Weg zu inhibieren. Zudem ergaben Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise darauf, dass zumindest die Plasminogen-bindende Region auf der Zelloberfläche von *A. baumannii* lokalisiert ist.

Die Inaktivierung des p41-kodierenden Gens führte zu einer signifikanten Abnahme im Überleben von *A. baumannii*-Zellen in der Gegenwart von NHS. Zudem zeigte die Mutante $\Delta p41$ einen Defekt in der Plasmin-abhängigen Transmigration durch einen Endothelzell-Monolayer. Beide Versuche untermauern die physiologische Relevanz für die Interaktion von *A. baumannii* mit Plasminogen.

6 Anhang

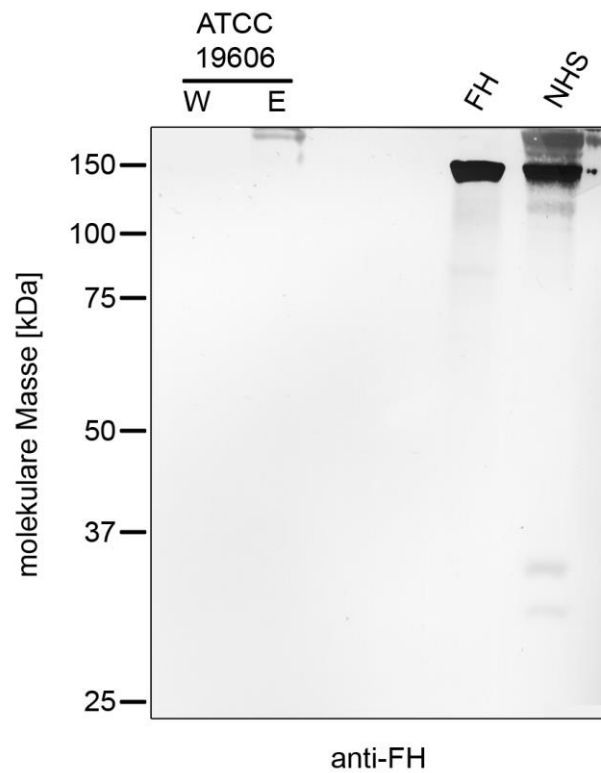


Abb. A1. Bindung von Komplementregulatoren der FH-Familie an vitale *A. baumannii*-Zellen. Vitale *A. baumannii*-Zellen (1×10^9) wurden mit hitzeinaktiviertem NHS inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der an die Oberfläche der Bakterienzellen gebundenen Proteine. Gezeigt ist eine Westernblot-Analyse der vierten Waschfraktion (W) sowie der Eluatfraktion (E) des Referenzstammes ATCC 19606. Als Kontrollen dienten 500 ng gereinigter FH (FH) sowie normales Humanserum (NHS, 2 μ l 1:10 verdünnt). FH wurde mit einem polyklonalen anti-FH Antiserum (1:1000) detektiert.

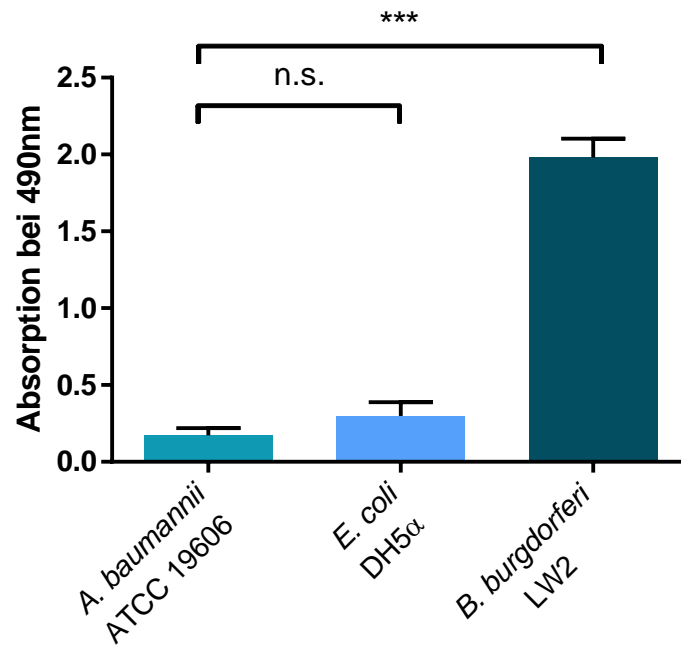


Abb. A2. Bindung von Komplementregulator FH an *A. baumannii* ATCC 19606 im ELISA. *A. baumannii*-Zellen (1×10^9) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde mit $1 \mu\text{g}$ FH pro Vertiefung inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde Bindung von FH mit einem polyklonalen anti-FH Antikörper (1:1000) detektiert. Der *E. coli*-Stamm DH5α (1×10^9) diente als Negativkontrolle, *B. burgdorferi* LW2 (5×10^7) als Positivkontrolle. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Triplikat. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. *** $p \leq 0,001$; n.s.) nicht signifikant.

TufAb	MAKAKFERNKPHVNVGTIGHVDHGKTTTLAAIATICAKTYGG-EA--KDYSQIDSAPEEK	57
TufLp	MAKEKFERKPKPHVNVGTIGHVDHGKTTTLAAITTIMAKKYGG-TA--KAYDQIDAAPEER	57
TufSp	MAKEKYDRSKPHVNIGTIGHVDHGKTTTLAAITTVLARLPSSVNVQPKDYASIDAAPEER	60
TufPa	MAKEKFERKPHVNVGTIGHVDHGKTTTLAAALTKVCSDTWGG-SA--RAFDQIDNAPEEK	57
TufLi	MAKEKFDKPKPHLNVGTIGHVDHGKTTTLAAITTTLAKAIGG-KNKAVAYDQIDNAPEEK	59
TufEc	MSKEKKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTTLAAITTVLAKTYGG-AA--RAFDQIDNAPEEK	57
	: *: :*.***:*.*****:*****:.. : . :.* ****:	
TufAb	ARGITINTSHVEYDSPTRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVCAATDGPMPQTR	117
TufLp	ERGITINTAHVEYESASRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVSAADGMPMPQTR	117
TufSp	ERGITINTAHVEYETEKRHYAHIDAPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVASTDGPMPQTR	120
TufPa	ARGITINTSHVEYDSAVRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVCSAADGMPMPQTR	117
TufLi	ARGITITATSHQEYETANRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDAAILVVSATDGPMPQTK	119
TufEc	ARGITINTSHVEYDTPTRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTR	117
	***** *: * *: : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
TufAb	EHILLSRQVGVPYIVFVFNKCDLVDD---EELLELVEMEVRELLSTYDFPGDDTPVIRGS	174
TufLp	EHILLSRQVGVPYIVFVFNKADMVDD---PELLELVEMEVRDLLSSYDFPGDDIPVVGGS	174
TufSp	EHILLSRQVGVKHLIVFMNKVDLVDD---EELLELVEMEIRDLLSEYDFPGDDLPVIQGS	177
TufPa	EHILLSRQVGVPYIVFVFNKADMVDD---AEELLELVEMEVRDLLNTYDFPGDDTPIIIGS	174
TufLi	EHILLARQVGVPYIVFVFNKADMLAADERAEMIEMVEMDVRELLNKYSFPGDTPPIVHGS	179
TufEc	EHILLGRQVGVPYIVFVFNKCDMVDD---EELLELVEMEVRELLSQYDFPGDDTPVIRGS	174
	***** .***** : : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
TufAb	ALAALNGEAG-PYGEESVLALVAALDSYIPEPERAIDKAFLMPIEDVFSISGRGTVVVTGR	233
TufLp	ALKALEGEDS-DIGVKAIEKLVETMDSYIPEPVRNIDKPFLLPIEDVFSISGRGTVVVTGR	233
TufSp	ALKALEGDSKY--EDIVMELMNTVDEYIPEPERDTPKPLLLPVEDVFSITGRGTVASGR	234
TufPa	ALMALEGKDDNGIGVSAVQKLVELTDSYIPEPVRVIDQPFLLMPIEDVFSISGRGTVVVTGR	234
TufLi	AVKALEGDES-EIGMPAILKLMEALDFVNPVKRVIDKPFLLMPVEDVFSITGRGTVATGR	238
TufEc	ALKALEGDAAE-W--EAKIILELAGFLDSYIPEPERAIDKPFLLPIEDVFSISGRGTVVVTGR	231
	*: * : * . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
TufAb	VEAGI IKV GEEVEIVGIKD-TVKT TTVGVEMFRKLLDEGRAGENCGILLRGTKREEVQRG	292
TufLp	VESGIVKVGEEVEIVGIRD-TQKTTC TGVEMFRKLLDEGRAGDNVGVLLRGTKRDEVERG	292
TufSp	IDRGIVKVNDIEIIVGIKEETQKAVVTGVEMFRKQLDEGLAGDNVGVLLRGVQRDEIERG	294
TufPa	VERGI IKV QEEVEIVGIKA-TTKTTC TGVEMFRKLLDEGRAGENVGILLRGTKREDVERG	293
TufLi	VEQGVLVNDEVEIIGIRP-TTKT TTVTG IEMFRKLLDQAEAGDNIGALLRGTKKEEIERG	297
TufEc	VERGI IKV GEEVEIVGIKE-TQKSTCTGVEMFRKLLDEGRAGENVGVLLRGIKREEIERG	290
	: : * : * * : * : * * : * * : * * . * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
TufAb	QVLAKPGTIKPHTKFEAEVYVLSKEEGRHTPFNGYRQPQFYFRITDVTGAIQLKEGVEM	352
TufLp	QVLAKPGTIKPHTKFEAEVYVLSKEEGRHTPFFNGYRQPQFYFRITDVTGTCDLPSGVEM	352
TufSp	QVIAKPGSINPHTKFKGEVYILTKEEGRHTPFFNRYRQPQFYFRITDVTGSIELPAGTEM	354
TufPa	QVLAKPGTIKPHTKFECEVYVLSKEEGRHTPFFKGYRQPQFYFRITDVTGNCELPEGVEM	353
TufLi	QVLAKPGSITPHKFAAEVYVLTKEEGRHTPFINNRYRQPQFYFRITDVTGVCNLPNGVEM	357
TufEc	QVLAKPGTIKPHTKFESEVYVLSKDEEGRHTPFFKGYRQPQFYFRITDVTGTIELPEGVEM	350
	** : * * * : * . * * . * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
TufAb	VMPGDNVEMVELIHP IAMDGLRFAIREGGRTVGAGVVAKVTA	396
TufLp	VMPGDNVQLVVSLHAPIAMDEGLRFAIREGGRTVGAGVVAKIE	396
TufSp	VMPGDNVTIDVELIHP IAVEQGTTF SIREGGRTVSGMVTEIEA	398
TufPa	VMPGDNIKVVTLIAPIAMEDGLRFAIREGGRTVGAGVVAKIE	397
TufLi	VMPGDNVSLTVELISPIAMDKGLKFAIREGGRTIGSGVVAEITE	401
TufEc	VMPGDNIKVVTLIHP IAMDGLRFAIREGGRTVGAGVVAKVLS	394
	***** : * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	

Abb. A3. Aminosäuresequenzvergleich der Tuf-Proteine verschiedener Mikroorganismen. Verglichen wurden die Sequenzen der Tuf-Proteine von *A. baumannii* (Tuf_{Ab}, AIS05611.1), *L. pneumophila* (Tuf_{Lp}, YP_094371.1), *S. pneumoniae* (Tuf_{Sp}, ABJ53652.1), *P. aeruginosa* (Tuf_{Pa}, AJD61976.1), *Leptospira interrogans* (Tuf_{Li}, AAS71428.1) und *E. coli* (Tuf_{Ec}, EDU63199.1). Insgesamt fanden sich zwölf konservierte Lysin-Reste (in schwarz hervorgehoben). Der Vergleich wurde durchgeführt mit Clustal Omega 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). (*) Konservierter Aminosäure-Rest, (:) Aminosäure-Reste mit stark ähnlichen Eigenschaften, Score > 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix, (.) Aminosäure-Reste mit nur schwach ähnlichen Eigenschaften, Score < 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix.

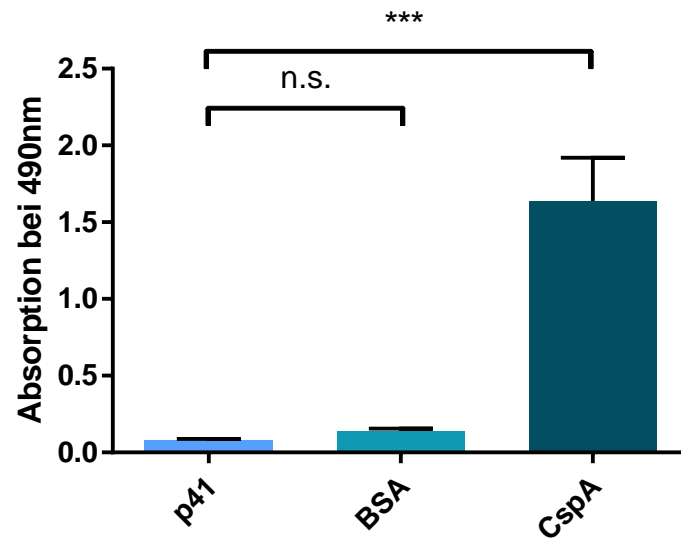


Abb. A4. Bindung von Komplementregulator FH an p41. Gereinigtes p41, CspA (Positivkontrolle) und BSA (500 ng) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen wurde pro Kavität 1 μg FH hinzugegeben. Es folgten mehrere Waschschriffe, wonach gebundener FH mit einem polyklonalen anti-FH Antiserum (1:1000) detektiert wurde. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen, jeweils als Triplikat durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. (***) $p \leq 0,001$; n.s.) nicht signifikant.

p41_19606	MKIKYLILALLPFSLMACQTVSNTQAPIVSEQQQNLATTLSEYAWTYQNV	50
p41_17978	MKIKYLILALLPFSLMACQTVSNTQAPIVSEQQQNLATTLSEYAWTYQNV	50
p41_25CS	MKIKYLILALLPFSLMACQTVSNTQAPIVSEQQQNLATTLSEYAWTYQNV	50
p41_11CS	MKIKYLILALLPFSLMACQTVSNTQAPIVSEQRQNLATTLSEYAWTYQNV	50
p41_V754948	MKIKYLILALLPFSLMACQTVSNTQAPIVSEQQQNLATTLSEYAWTYQNV *****:*****	50
p41_19606	KASKPLILNFNADGKLAINTGCNGQGGTWKVEGNQLVTSPLASTMMACQD	100
p41_17978	KASKPLILNFNADGKLAINTGCNGQGGTWKVEGNQLVTSPLASTMMACQD	100
p41_25CS	KASKPLILNFNADGKLAINTGCNGQGGTWKVEGNQLVTSPLASTMMACQD	100
p41_11CS	KASKPLILNFNADGKLAINTGCNGQGGTWKVEGNQLVTSPLASTMMACQD	100
p41_V754948	KASKPLILNFNADGKLAINTGCNGQGGTWKVEGNQLVTSPLASTMMACQD *****:*****	100
p41_19606	DLMKQEQLSNSIFSEAKLPIEISNNNGQVILSVTDKAGQKHIFQGEKATN	150
p41_17978	DLMKQEQLSNSIFSEAKLPIEISNNNGQVILSVTDKAGQKHIFQGEKATN	150
p41_25CS	DLMKQEQLSNSIFSEAKLPIEISNNNGQVILSVTDKAGQKHIFQGEKATN	150
p41_11CS	DLMKQEQLSNSIFSEAKLPIEISNNNGQVILSVTDKAGQKHIFQGEKATN	150
p41_V754948	DLMKQEQLSNSIFSEAKLPIEISNNNGQVILSVTDKAGQKHIFQGEKATN *****:*****	150
p41_19606	TQALTDYSWSYQPENTKKPIVLNFTNDRLSIDTGCNRQGTTWKVENNTIV	200
p41_17978	TQALTDYSWSYQPENTKKPIVLNFTNDRLSIDTGCNRQGTTWKVENNTIV	200
p41_25CS	TQALTDYSWSYQPENTKKPIVLNFTNDRLSIDTGCNRQGTTWKVENNTIV	200
p41_11CS	TQALTDYSWSYQPENTKKPIVLNFTNDRLSIDTGCNRQGTTWKVENNTIV	200
p41_V754948	TQALTDYSWSYQPENTKKPIVLNFTNDRLSIDTGCNRQGTTWKVENNTIV *****:*****	200
p41_19606	TTDVMSTMACEPALMKQEQFSSSLFQKRAIPFELNTTNVDQPTLTVADA	250
p41_17978	TTDVMSTMACEPALMKQEQFSSSLFQKRAIPFELNTTNVDQPTLTVADA	250
p41_25CS	TTDVMSTMACEPALMKQEQFSSSLFQKRAIPFELNTTNVDQPTLTVADA	250
p41_11CS	TTDVMSTMACEPALMKQEQFSSSLFQKRAIPFELNTTNVDQPTLTVADA	250
p41_V754948	TTDVMSTMACEPALMKQEQFSSSLFQKRAIPFELNTTNVDQPTLTVADA *****:*****	250
p41_19606	QGQKYTFTGKMTPEAKYQSEGKTVFLEVAPETKSCSGVAPQTCIQVREVK	300
p41_17978	QGQKYTFTGKMTPEAKYQSEGKTVFLEVAPETKSCSGVAPQTCIQVREVK	300
p41_25CS	QGQKYTFTGKMTPEAKYQSEGKTVFLEVAPETKSCSGVAPQTCIQVREVK	300
p41_11CS	QGQKYTFTGKMTPEAKYQSEGKTVFLEVAPETKSCSGVAPQTCIQVREVK	300
p41_V754948	QGQKYTFTGKMTPEAKYQSEGKTVFLEVAPETKSCSGVAPQTCIQVREVK *****:*****	300
p41_19606	YDDKGVKTYADKNWSLYYGQIEGFEHNPQRVILRVKRFEVKNPAADQSS	350
p41_17978	YDDKGVKTYADKNWSLYYGQIEGFEHNPQRVILRVKRFEVKNPAADQSS	350
p41_25CS	YDDKGVKTYADKNWSLYYGQIEGFEHNPQRVILRVKRFEVKNPAADQSS	350
p41_11CS	YDDKGVKTYADKNWSLYYGQIEGFEHNPQRVILRVKRFEVKNPAADQSS	350
p41_V754948	YDDKGVKTYADKNWSLYYGQIEGFEHNPQRVILRVKRFEVKNPAADQSS *****:*****	350
p41_19606	QADVLDMVVEQELVKKPKK	369
p41_17978	QADVLDMVVEQELVKKPKK	369
p41_25CS	QADVLDMVVEQELVKKPKK	369
p41_11CS	QADVLDMVVEQELVKKPKK	369
p41_V754948	QADVLDMVVEQELVKKPKK *****	369

Abb. A5. Vergleich der Aminosäuresequenzen der p41-Proteine unterschiedlicher *A. baumannii*-Isolate. Verglichen wurden die Sequenzen des Referenzstammes ATCC 19606, sowie der klinischen Isolate ATCC 17978, 25CS, 11CS und V754948. Der Vergleich wurde durchgeführt mit Clustal Omega 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Nicht konservierte Aminosäure-Reste sind in schwarz hervorgehoben. (*) Konservierter Aminosäure-Rest, (:) Aminosäure-Reste mit stark ähnlichen Eigenschaften, Score > 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix, (.) Aminosäure-Reste mit nur schwach ähnlichen Eigenschaften, Score < 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix.

p41-kodierende Sequenz

Die für p41-kodierende Sequenz des *A. baumannii* Referenzstammes ATCC 19606 (HMPREF0010_01565) wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und ist im Folgenden angegeben:

```
ATG AAA ATT AAA TAT TTA ATT CTT GCG TTA TTA CCT TTT TCT
TTG ATG GCG TGT CAA ACA GTT TCA AAC ACT CAA GCT CCA ATT
GTA TCT GAG CAA CAA CAA AAT TTG GCT ACT ACT TTA AGT GAA
TAT GCT TGG ACT TAT CAA AAT GTA AAA GCA TCT AAG CCA CTT
ATT CTT AAC TTT AAT GCA GAC GGT AAA TTA GCA ATT AAC ACT
GGC TGT AAT GGC CAA GGC GGT ACT TGG AAA GTT GAA GGC AAC
CAA CTT GTA ACT TCT CCA CTT GCA TCA ACA ATG ATG GCT TGC
CAA GAC GAT TTA ATG AAA CAA GAA CAA TTG TCT AAT AGC ATC
TTT AGT GAA GCG AAA TTG CCA ATC GAA ATT AGT AAT AAC AAT
GGT CAG GTA ATC TTA AGC GTG ACA GAT AAA GCA GGT CAA AAG
CAT ATT TTC CAA GGC GAA AAA GCA ACT AAT ACT CAA GCT TTA
ACT GAT TAT TCA TGG TCA TAC CAA CCT GAA AAT ACT AAA AAG
CCG ATT GTT CTT AAC TTT ACA AAC GAC CGT TTA TCG ATT GAT
ACA GGT TGT AAC CGC CAA GGC ACC ACT TGG AAA GTT GAA AAC
AAT ACG ATT GTA ACG ACT GAT GTC ATG TCA ACT ATG ATG GCT
TGT GAA CCT GCT TTA ATG AAA CAG GAA CAA TTC TCT AGC AGC
CTC TTC CAA AAA CGT GCG ATT CCA TTT GAA CTC AAT ACA ACA
AAT GTT GAT CAA CCA ACA TTG ACA GTA GCT GAT GCT CAA GGT
CAG AAA TAT ACG TTC ACA GGT AAA ATG ACA CCT GAA GCA AAA
TAT CAA TCT GAA GGT AAA ACT GTT TTC CTT GAA GTA GCG CCA
GAA ACT AAA TCT TGT ACG GGT GTT GCA CCA CAA ACT TGC TTG
CAA GTT CGT GAA GTT AAA TAT GAT GAC AAA GGC GTA AAA ACT
TAC GCT GAC AAA AAC TGG TCA TTA TAT TAT GGT CAA ATC GAA
GGT TTT GAA CAC AAT CCA AAC CAA CGC GTA ATC TTA CGT GTA
AAA CGT TTT GAA GTG AAA AAT CCA GCA GCA GAT CAA TCT AGC
CAA GCA GAT GTG TTA GAT ATG GTT GTA GAA CAA GAA CTC GTT
AAA AAG CCT AAA AAA TAA
```

7 Literaturverzeichnis

1. Beijerinck, M. (1911) Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. Amsterdam* 1092-1103.
2. Brisou, J. und Prevot, A.R. (1954) [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **86**: 722-728.
3. Baumann, P., Doudoroff, M. und Stanier, R.Y. (1968) A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* **95**: 1520-1541.
4. Peleg, A.Y., Seifert, H. und Paterson, D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 538-582.
5. Rossau, R., A. van Landschoot., M. Gillis, and J. de Ley (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 310-319.
6. Visca, P., Seifert, H. und Towner, K.J. (2011) *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBMB Life* **63**: 1048-1054.
7. Gerner-Smidt, P. (1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2680-2685.
8. Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I. und Ursing, J. (1991) Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 277-282.
9. McConnell, M.J., Actis, L. und Pachon, J. (2013) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 130-155.
10. Baumann, P. (1968) Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* **96**: 39-42.
11. Fournier, P.E. und Richet, H. (2006) The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 692-699.
12. Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H. und Pitt, T. (1999) Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 179-183.
13. Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I. und Vaneechoutte, M. (1997) Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2819-2825.
14. Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T.J., Bernardis, A.T., Nemeč, A. und Towner, K.J. (2005) Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 329-332.

15. Tjernberg, I. und Ursing, J. (1989) Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97**: 595-605.
16. 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 description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 228-240.
17. Carr, E.L., Kampfer, P., Patel, B.K., Gurtler, V. und Seviour, R.J. (2003) Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 953-963.
18. Nemec, A., Musilek, M., Maixnerova, M., De Baere, T., van der Reijden, T.J., Vaneechoutte, M. und Dijkshoorn, L. (2009) *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 118-124.
19. Nemec, A., Musilek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., Zdrahal, Z., Vaneechoutte, M. und Dijkshoorn, L. (2010) *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 896-903.
20. Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., Van Der Reijden, T.J., Jezek, P. und Vaneechoutte, M. (2003) *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1563-1567.
21. Nishimura, Y., Kanzaki, H. und Iizuka, H. (1988) Taxonomic studies of *Acinetobacter* species based on the electrophoretic analysis of enzymes. *J. Basic Microbiol.* **28**: 363-370.
22. Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T.J. und Dijkshoorn, L. (2001) *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1891-1899.
23. Kim, D., Baik, K.S., Kim, M.S., Park, S.C., Kim, S.S., Rhee, M.S., Kwak, Y.S. und Seong, C.N. (2008) *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J. Microbiol.* **46**: 396-401.
24. Vaneechoutte, M., Tjernberg, I., Baldi, F., Pepi, M., Fani, R., Sullivan, E.R., van der Toorn, J. und Dijkshoorn, L. (1999) Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as '*Acinetobacter venetianus* sp. nov.' belong to the same genomic species. *Res. Microbiol.* **150**: 69-73.
25. Bouvet, P.J. und Jeanjean, S. (1989) Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.* **140**: 291-299.
26. Gerner-Smidt, P. und Tjernberg, I. (1993) *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS* **101**: 826-832.

27. Joly-Guillou, M.L. (2005) Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 868-873.
28. Bergogne-Berezin, E. und Towner, K.J. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 148-165.
29. Roca, I., Espinal, P., Vila-Farres, X. und Vila, J. (2012) The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front. Microbiol.* **3**: 148.
30. Dijkshoorn, L., Nemec, A. und Seifert, H. (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 939-951.
31. Wisplinghoff, H., Perbix, W. und Seifert, H. (1999) Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clin. Infect. Dis.* **28**: 59-66.
32. Prashanth, K. und Badrinath, S. (2006) Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. *Indian J. Med. Microbiol.* **24**: 39-44.
33. Falagas, M.E., Karveli, E.A., Kelesidis, I. und Kelesidis, T. (2007) Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 857-868.
34. Falagas, M.E. und Rafailidis, P.I. (2007) Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit. Care* **11**: 134.
35. CDC (2004) *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**: 1063-1066.
36. Oncul, O., et al. (2002) Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J. Hosp. Infect.* **51**: 47-51.
37. Breslow, J.M., Monroy, M.A., Daly, J.M., Meissler, J.J., Gaughan, J., Adler, M.W. und Eisenstein, T.K. (2011) Morphine, but not trauma, sensitizes to systemic *Acinetobacter baumannii* infection. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **6**: 551-565.
38. Antunes, L.C., Visca, P. und Towner, K.J. (2014) *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis* **71**: 292-301.
39. Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J. und Hawkey, P.M. (1998) Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1938-1941.
40. Gayoso, C.M., Mateos, J., Mendez, J.A., Fernandez-Puente, P., Rumbo, C., Tomas, M., Martinez de Ilarduya, O. und Bou, G. (2014) Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* **13**: 460-476.
41. CDC (2013) Antibiotic resistance threats in the United States.

42. Carbonne, A., Naas, T., Blanckaert, K., Couzigou, C., Cattoen, C., Chagnon, J.L., Nordmann, P. und Astagneau, P. (2005) Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J. Hosp. Infect.* **60**: 14-18.
43. Celenza, G., Pellegrini, C., Caccamo, M., Segatore, B., Amicosante, G. und Perilli, M. (2006) Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 975-978.
44. Endimiani, A., et al. (2007) Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2211-2214.
45. Huang, Z.M., Mao, P.H., Chen, Y., Wu, L. und Wu, J. (2004) [Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *acinetobacter baumannii*]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **25**: 425-427.
46. Hujer, K.M., et al. (2005) Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2941-2948.
47. Hujer, K.M., et al. (2006) Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 4114-4123.
48. Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y. und Yu, Y. (2011) Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 1255-1259.
49. Choi, S.H., et al. (2006) Clinical characteristics and outcomes of bacteremia caused by *Acinetobacter* species other than *A. baumannii*: comparison with *A. baumannii* bacteremia. *J Infect Chemother* **12**: 380-386.
50. Kaase, M., Nordmann, P., Wichelhaus, T.A., Gatermann, S.G., Bonnin, R.A. und Poirel, L. (2011) NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 1260-1262.
51. Lee, K., Lee, W.G., Uh, Y., Ha, G.Y., Cho, J., Chong, Y. und Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance, G. (2003) VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 868-871.
52. Nemeč, A., Krizová, L., Maixnerová, M., Diancourt, L., van der Reijden, T.J., Brisse, S., van den Broek, P. und Dijkshoorn, L. (2008) Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 484-489.
53. Clark, R.B. (1996) Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**: 245-251.

54. Dupont, M., Pages, J.M., Lafitte, D., Siroy, A. und Bollet, C. (2005) Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* **4**: 2386-2390.
55. Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M.C., Ayala, J.A., Perea, E.J. und Pascual, A. (2003) Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 565-574.
56. Limansky, A.S., Mussi, M.A. und Viale, A.M. (2002) Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4776-4778.
57. Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorsselaer, A., Boyer-Mariotte, S., Jouenne, T. und De, E. (2006) Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J. Proteome Res.* **5**: 3385-3398.
58. Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S. und Opferkuch, W. (1991) Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* **37**: 405-412.
59. Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T. und Nordmann, P. (2005) Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3198-3202.
60. Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D. und Seifert, H. (2004) Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 821-823.
61. Magnet, S., Courvalin, P. und Lambert, T. (2001) Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3375-3380.
62. Peleg, A.Y., Adams, J. und Paterson, D.L. (2007) Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2065-2069.
63. Hamouda, A. und Amyes, S.G. (2004) Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 695-696.
64. Seward, R.J. und Towner, K.J. (1998) Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* **4**: 248-254.
65. Vila, J., Ruiz, J., Goni, P. und Jimenez de Anta, T. (1997) Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**: 757-762.

66. Su, X.Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. und Tsuchiya, T. (2005) AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4362-4364.
67. Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P. und Dijkshoorn, L. (2004) Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* **53**: 1233-1240.
68. Tsakris, A., Ikonomidis, A., Pournaras, S., Tzouveleki, L.S., Sofianou, D., Legakis, N.J. und Maniatis, A.N. (2006) VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 981-983.
69. Doi, Y., Adams, J.M., Yamane, K. und Paterson, D.L. (2007) Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 4209-4210.
70. Lee, H., Yong, D., Yum, J.H., Roh, K.H., Lee, K., Yamane, K., Arakawa, Y. und Chong, Y. (2006) Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**: 305-312.
71. Yamane, K., Wachino, J., Doi, Y., Kurokawa, H. und Arakawa, Y. (2005) Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 951-953.
72. Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E. und Dalsgaard, A. (2000) Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* **49**: 929-936.
73. Ribera, A., Roca, I., Ruiz, J., Gibert, I. und Vila, J. (2003) Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 477-480.
74. Ribera, A., Ruiz, J. und Vila, J. (2003) Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2310-2312.
75. Ruzin, A., Keeney, D. und Bradford, P.A. (2007) AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 1001-1004.
76. Adams, M.D., Nickel, G.C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A.R., Jacobs, M.R. und Bonomo, R.A. (2009) Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3628-3634.
77. Arroyo, L.A., Herrera, C.M., Fernandez, L., Hankins, J.V., Trent, M.S. und Hancock, R.E. (2011) The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 3743-3751.

78. Fournier, P.E., et al. (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* **2**: e7.
79. Iacono, M., et al. (2008) Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2616-2625.
80. Bou, G. und Martinez-Beltran, J. (2000) Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 428-432.
81. Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P. und 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**: 3298-3304.
82. Nemeč, A., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., van den Broek, P.J. und Dijkshoorn, L. (2007) Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**: 483-489.
83. Göttig, S., Gruber, T.M., Higgins, P.G., Wachsmuth, M., Seifert, H. und Kempf, V.A. (2014) Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**: 2578-2579.
84. Taccone, F.S., Rodriguez-Villalobos, H., De Backer, D., De Moor, V., Deviere, J., Vincent, J.L. und Jacobs, F. (2006) Successful treatment of septic shock due to pan-resistant *Acinetobacter baumannii* using combined antimicrobial therapy including tigecycline. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**: 257-260.
85. Valencia, R., et al. (2009) Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **30**: 257-263.
86. Palmen, R., Vosman, B., Buijsman, P., Breek, C.K. und Hellingwerf, K.J. (1993) Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 295-305.
87. Porstendorfer, D., Gohl, O., Mayer, F. und Averhoff, B. (2000) ComP, a pilin-like protein essential for natural competence in *Acinetobacter* sp. Strain BD413: regulation, modification, and cellular localization. *J. Bacteriol.* **182**: 3673-3680.
88. Bacher, J.M., Metzgar, D. und de Crecy-Lagard, V. (2006) Rapid evolution of diminished transformability in *Acinetobacter baylyi*. *J. Bacteriol.* **188**: 8534-8542.
89. Vanechoutte, M., Young, D.M., Ornston, L.N., De Baere, T., Nemeč, A., Van Der Reijden, T., Carr, E., Tjernberg, I. und Dijkshoorn, L. (2006) Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 932-936.

90. Imperi, F., Antunes, L.C., Blom, J., Villa, L., Iacono, M., Visca, P. und Carattoli, A. (2011) The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life* **63**: 1068-1074.
91. Rice, L.B. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **197**: 1079-1081.
92. Smani, Y., Lopez-Rojas, R., Dominguez-Herrera, J., Docobo-Perez, F., Marti, S., Vila, J. und Pachon, J. (2012) In vitro and in vivo reduced fitness and virulence in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**: E1-4.
93. Eveillard, M., Soltner, C., Kempf, M., Saint-Andre, J.P., Lemarie, C., Randrianarivelo, C., Seifert, H., Wolff, M. und Joly-Guillou, M.L. (2010) The virulence variability of different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. *J. Infect.* **60**: 154-161.
94. Choi, C.H., Lee, J.S., Lee, Y.C., Park, T.I. und Lee, J.C. (2008) *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* **8**: 216.
95. Choi, C.H., Lee, E.Y., Lee, Y.C., Park, T.I., Kim, H.J., Hyun, S.H., Kim, S.A., Lee, S.K. und Lee, J.C. (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**: 1127-1138.
96. Gaddy, J.A., Tomaras, A.P. und Actis, L.A. (2009) The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **77**: 3150-3160.
97. Clemmer, K.M., Bonomo, R.A. und Rather, P.N. (2011) Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* **157**: 2534-2544.
98. Knapp, S., Wieland, C.W., Florquin, S., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Tshimbalanga, N., Akira, S. und van der Poll, T. (2006) Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**: 122-129.
99. Bentancor, L.V., Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., Pier, G.B. und Maira-Litran, T. (2012) Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* **194**: 3950-3960.
100. King, L.B., Pangburn, M.K. und McDaniel, L.S. (2013) Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation. *J. Infect. Dis.* **207**: 1128-1134.
101. Jacobs, A.C., et al. (2010) Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect. Immun.* **78**: 1952-1962.
102. Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S. und Snyder, M. (2010) Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog.* **6**: e1000834.

103. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A. und Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 234-258.
104. Russo, T.A., MacDonald, U., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, I.J., Sauberan, S.L., Luke, N.R., Schultz, L.W. und Umland, T.C. (2009) Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* **199**: 513-521.
105. Jin, J.S., Kwon, S.O., Moon, D.C., Gurung, M., Lee, J.H., Kim, S.I. und Lee, J.C. (2011) *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One* **6**: e17027.
106. Rumbo, C., Fernandez-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F. und Bou, G. (2011) Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 3084-3090.
107. Aisen, P., Leibman, A. und Zweier, J. (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**: 1930-1937.
108. Gaddy, J.A., Arivett, B.A., McConnell, M.J., Lopez-Rojas, R., Pachon, J. und Actis, L.A. (2012) Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect. Immun.* **80**: 1015-1024.
109. Kim, S.W., et al. (2009) Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **301**: 224-231.
110. Luke, N.R., et al. (2010) Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect. Immun.* **78**: 2017-2023.
111. Russo, T.A., Luke, N.R., Beanan, J.M., Olson, R., Sauberan, S.L., MacDonald, U., Schultz, L.W., Umland, T.C. und Campagnari, A.A. (2010) The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect. Immun.* **78**: 3993-4000.
112. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. und Lambris, J.D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**: 785-797.
113. Schafer, D.P. und Stevens, B. (2010) Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 476-481.
114. Nozaki, M., et al. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 2328-2333.

115. Jalili, A., Marquez-Curtis, L., Shirvaikar, N., Wysoczynski, M., Ratajczak, M. und Janowska-Wieczorek, A. (2010) Complement C1q enhances homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells. *Transfusion (Paris)* **50**: 2002-2010.
116. Jalili, A., Shirvaikar, N., Marquez-Curtis, L., Qiu, Y., Korol, C., Lee, H., Turner, A.R., Ratajczak, M.Z. und Janowska-Wieczorek, A. (2010) Fifth complement cascade protein (C5) cleavage fragments disrupt the SDF-1/CXCR4 axis: further evidence that innate immunity orchestrates the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp. Hematol.* **38**: 321-332.
117. Reca, R., Wysoczynski, M., Yan, J., Lambris, J.D. und Ratajczak, M.Z. (2006) The role of third complement component (C3) in homing of hematopoietic stem/progenitor cells into bone marrow. *Adv. Exp. Med. Biol.* **586**: 35-51.
118. Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Strey, C.W., Foukas, P.G., Gerard, C., Gerard, N., Wetsel, R.A. und Lambris, J.D. (2009) The regulation of liver cell survival by complement. *J. Immunol.* **182**: 5412-5418.
119. MacLaren, R., Cui, W. und Cianflone, K. (2008) Adipokines and the immune system: an adipocentric view. *Adv. Exp. Med. Biol.* **632**: 1-21.
120. Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Rossi, V. und Fontecilla-Camps, J.C. (2002) Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity. *Mol. Immunol.* **39**: 383-394.
121. Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Gregory, L.A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J.C. und Arlaud, G.J. (2004) Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* **25**: 368-373.
122. Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J. und Keeble, A.H. (2010) Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* **215**: 1-11.
123. Sjoberg, A.P., Trouw, L.A. und Blom, A.M. (2009) Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* **30**: 83-90.
124. Kjaer, T.R., Thiel, S. und Andersen, G.R. (2013) Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol.* **56**: 222-231.
125. Fujita, T. (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 346-353.
126. Jack, D.L., Klein, N.J. und Turner, M.W. (2001) Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol. Rev.* **180**: 86-99.
127. Nadesalingam, J., Dodds, A.W., Reid, K.B. und Palaniyar, N. (2005) Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J. Immunol.* **175**: 1785-1794.

128. Bexborn, F., Andersson, P.O., Chen, H., Nilsson, B. und Ekdahl, K.N. (2008) The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol. Immunol.* **45**: 2370-2379.
129. Pangburn, M.K., Schreiber, R.D. und Muller-Eberhard, H.J. (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J. Exp. Med.* **154**: 856-867.
130. Xu, Y., Narayana, S.V. und Volanakis, J.E. (2001) Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol. Rev.* **180**: 123-135.
131. Pangburn, M.K., Schreiber, R.D. und Muller-Eberhard, H.J. (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* **146**: 257-270.
132. Hourcade, D.E. (2008) Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr. Drug Targets* **9**: 158-164.
133. Harboe, M. und Mollnes, T.E. (2008) The alternative complement pathway revisited. *J. Cell. Mol. Med.* **12**: 1074-1084.
134. Muller-Eberhard, H.J. (1985) The killer molecule of complement. *J. Invest. Dermatol.* **85**: 47s-52s.
135. Bhakdi, S. und Tranum-Jensen, J. (1991) Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today* **12**: 318-320; discussion 321.
136. Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.O., Ager, R.R., Reis, E.S. und Kohl, J. (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol. Immunol.*
137. Kohl, J. (2001) Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol. Immunol.* **38**: 175-187.
138. Hourcade, D., Liszewski, M.K., Krych-Goldberg, M. und Atkinson, J.P. (2000) Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology* **49**: 103-116.
139. Zipfel, P.F. und Skerka, C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **9**: 729-740.
140. Beinrohr, L., Dobo, J., Zavodszky, P. und Gal, P. (2008) C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol. Med.* **14**: 511-521.
141. Blom, A.M., Villoutreix, B.O. und Dahlback, B. (2004) Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol. Immunol.* **40**: 1333-1346.
142. Józsi, M. und Zipfel, P.F. (2008) Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol.* **29**: 380-387.

143. Zipfel, P.F. und Skerka, C. (1999) FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol. Today* **20**: 135-140.
144. McRae, J.L., Cowan, P.J., Power, D.A., Mitchelhill, K.I., Kemp, B.E., Morgan, B.P. und Murphy, B.F. (2001) Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J. Biol. Chem.* **276**: 6747-6754.
145. Zipfel, P.F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S.T., Meri, S., Brade, V., Kraiczy, P., Noris, M. und Remuzzi, G. (2002) Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 971-978.
146. Estaller, C., Koistinen, V., Schwaeble, W., Dierich, M.P. und Weiss, E.H. (1991) Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule. *J. Immunol.* **146**: 3190-3196.
147. Kühn, S., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (1995) Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J. Immunol.* **155**: 5663-5670.
148. Alsenz, J., Lambris, J.D., Schulz, T.F. und Dierich, M.P. (1984) Localization of the complement-component-C3b-binding site and the cofactor activity for factor I in the 38kDa tryptic fragment of factor H. *Biochem. J.* **224**: 389-398.
149. Zipfel, P.F. und Skerka, C. (1994) Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* **15**: 121-126.
150. Zipfel, P.F., Jokiranta, T.S., Hellwage, J., Koistinen, V. und Meri, S. (1999) The factor H protein family. *Immunopharmacology* **42**: 53-60.
151. Pangburn, M.K., Pangburn, K.L., Koistinen, V., Meri, S. und Sharma, A.K. (2000) Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: interactions among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement. *J. Immunol.* **164**: 4742-4751.
152. Heinen, S., et al. (2009) Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* **114**: 2439-2447.
153. Eberhardt, H.U., et al. (2013) Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS One* **8**: e78617.
154. McRae, J.L., et al. (2005) Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J. Immunol.* **174**: 6250-6256.
155. Murphy, B., Georgiou, T., Machet, D., Hill, P. und McRae, J. (2002) Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits. *Am. J. Kidney Dis.* **39**: 24-27.

156. Johnson, E., Berge, V. und Hogasen, K. (1994) Formation of the terminal complement complex on agarose beads: further evidence that vitronectin (complement S-protein) inhibits C9 polymerization. *Scand. J. Immunol.* **39**: 281-285.
157. Podack, E.R., Preissner, K.T. und Muller-Eberhard, H.J. (1984) Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Suppl.* **284**: 89-96.
158. Noel, G.J., Brittingham, A., Granato, A.A. und Mosser, D.M. (1996) Effect of amplification of the Cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **64**: 4769-4775.
159. Pomakova, D.K., Hsiao, C.B., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, U., Keynan, Y. und Russo, T.A. (2012) Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**: 981-989.
160. Erwin, A.L., et al. (2006) Role of IgtC in resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2866 to human serum. *Infect. Immun.* **74**: 6226-6235.
161. Erwin, A.L., Bonthuis, P.J., Geelhood, J.L., Nelson, K.L., McCrea, K.W., Gilsdorf, J.R. und Smith, A.L. (2006) Heterogeneity in tandem octanucleotides within *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide biosynthetic gene *losA* affects serum resistance. *Infect. Immun.* **74**: 3408-3414.
162. Joiner, K.A., Schmetz, M.A., Goldman, R.C., Leive, L. und Frank, M.M. (1984) Mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing: inserted C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infect. Immun.* **45**: 113-117.
163. Berends, E.T., Dekkers, J.F., Nijland, R., Kuipers, A., Soppe, J.A., van Strijp, J.A. und Rooijackers, S.H. (2013) Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. *Cell. Microbiol.* **15**: 1955-1968.
164. Joiner, K.A., Brown, E.J. und Frank, M.M. (1984) Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **2**: 461-491.
165. Domenech, M., Ramos-Sevillano, E., Garcia, E., Moscoso, M. und Yuste, J. (2013) Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **81**: 2606-2615.
166. Jensen, E.T., Kharazmi, A., Garred, P., Kronborg, G., Fomsgaard, A., Mollnes, T.E. und Hoiby, N. (1993) Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb. Pathog.* **15**: 377-388.
167. Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V. und Zipfel, P.F. (2001) Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **69**: 7800-7809.
168. Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V. und Zipfel, Peter F. (2001) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1674-1684.

169. Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P.F. und Brade, V. (2001) Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Intern Immunopharmacol* **1**: 393-401.
170. Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P.F. und Brade, V. (2002) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: insufficient killing of the pathogens by complement and antibody. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 141-146.
171. Kraiczy, P., Skerka, C., Zipfel, P.F. und Brade, V. (2002) Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: a new protein family involved in complement resistance. *Wien Klin Wochenschr* **114**: 568-573.
172. Cordes, F.S., et al. (2004) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of BbCRASP-1, a complement regulator-acquiring surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**: 929-932.
173. Hartmann, K., et al. (2006) Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. *Mol. Microbiol.* **61**: 1220-1236.
174. Kraiczy, P., Rossmann, E., Brade, V., Simon, M.M., Skerka, C., Zipfel, P.F. und Wallich, R. (2006) Binding of human complement regulators FHL-1 and factor H to CRASP-1 orthologs of *Borrelia burgdorferi* Wien. *Klin. Wochenschr.* **118**: 669-676.
175. Kraiczy, P., Schreiber, J., Skerka, C., Haupt, K., Brade, V., Wallich, R. und Zipfel, P.F. (2007) Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H. *9th International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases*. Jena, Germany. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
176. Kraiczy, P., et al. (2007) Antibodies against *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 (CspZ) as a serological marker of human Lyme disease. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**:484-491
177. Bykowski, T., Woodman, M.E., Cooley, A.E., Brissette, C.A., Wallich, R., Brade, V., Kraiczy, P. und Stevenson, B. (2008) *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**: 249-256.
178. Kraiczy, P., et al. (2009) Mutational analyses of the BbCRASP-1 protein of *Borrelia burgdorferi* identify residues relevant for the architecture and binding of host complement regulators FHL-1 and factor H. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 255-268.
179. Brooks, C.S., Vuppala, S.R., Jett, A.M., Alitalo, A., Meri, S. und Akins, D.R. (2005) Complement regulator-acquiring surface protein 1 imparts resistance to human serum in *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* **175**: 3299-3308.
180. Kenedy, M.R., Vuppala, S.R., Siegel, C., Kraiczy, P. und Akins, D.R. (2009) CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **77**: 2773-2782.

181. Hammerschmidt, C., Koenigs, A., Siegel, C., Hallström, T., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P.F. und Kraiczy, P. (2014) Versatile roles of CspA orthologs in complement inactivation of serum-resistant Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* **82**: 380-392.
182. Wallich, R., Pattathu, J., Kitiratschky, V., Brenner, C., Zipfel, P.F., Brade, V., Simon, M.M. und Kraiczy, P. (2005) Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infect. Immun.* **73**: 2351-2359.
183. Herzberger, P., et al. (2007) Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infect. Immun.* **75**: 4817-4825.
184. Herzberger, P., et al. (2009) Identification and characterization of the factor H and FHL-1 binding complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 141-154.
185. Hallström, T., Trajkovska, E., Forsgren, A. und Riesbeck, K. (2006) *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *J. Immunol.* **177**: 430-436.
186. Hallström, T., Blom, A.M., Zipfel, P.F. und Riesbeck, K. (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J. Immunol.* **183**: 2593-2601.
187. Hallström, T. und Riesbeck, K. (2010) *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol.* **18**: 258-265.
188. Hammerschmidt, S., Agarwal, V., Kunert, A., Haelbich, S., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (2007) The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC Protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J. Immunol.* **178**: 5848-5858.
189. Jarva, H., Jokiranta, T.S., Würzner, R. und Meri, S. (2003) Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol. Immunol.* **40**: 95-107.
190. Blom, A.M., Rytönen, A., Vasquez, P., Lindahl, G., Dahlback, B. und Jonsson, A.B. (2001) A novel interaction between type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the human complement regulator C4B-binding protein. *J. Immunol.* **166**: 6764-6770.
191. Ngampasutadol, J., Ram, S., Gulati, S., Agarwal, S., Li, C., Visintin, A., Monks, B., Madico, G. und Rice, P.A. (2008) Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion. *J. Immunol.* **180**: 3426-3435.
192. Ram, S., et al. (2001) Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* **193**: 281-295.

193. Nordstrom, T., Blom, A.M., Forsgren, A. und Riesbeck, K. (2004) The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J. Immunol.* **173**: 4598-4606.
194. Luo, S., Blom, A.M., Rupp, S., Hipler, U.C., Hube, B., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (2011) The pH-regulated Antigen 1 of *Candida albicans* Binds the Human Complement Inhibitor C4b-binding Protein and Mediates Fungal Complement Evasion. *J. Biol. Chem.* **286**: 8021-8029.
195. Luo, S., Poltermann, S., Kunert, A., Rupp, S. und Zipfel, P.F. (2009) Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol. Immunol.* **47**: 541-550.
196. Meri, T., Hartmann, A., Lenk, D., Eck, R., Wurzner, R., Hellwage, J., Meri, S. und Zipfel, P.F. (2002) The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect. Immun.* **70**: 5185-5192.
197. Poltermann, S., Kunert, A., von der Heide, M., Eck, R., Hartmann, A. und Zipfel, P.F. (2007) Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **282**: 37537-37544.
198. Rooijackers, S.H., van Kessel, K.P. und van Strijp, J.A. (2005) Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol.* **13**: 596-601.
199. Sharp, J.A., Echague, C.G., Hair, P.S., Ward, M.D., Nyalwidhe, J.O., Geoghegan, J.A., Foster, T.J. und Cunnion, K.M. (2012) *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One* **7**: e38407.
200. Vogl, G., et al. (2008) Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: the mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. *Mol. Immunol.* **45**: 1485-1493.
201. Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M. und Meri, S. (2008) *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog.* **4**: e1000140.
202. Hong, Y.Q. und Ghebrehiwet, B. (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**: 133-138.
203. Tang, A., Caballero, A.R., Marquart, M.E. und O'Callaghan, R.J. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* small protease (PASP), a keratitis virulence factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**: 2821-2828.
204. Molla, A., Akaike, T. und Maeda, H. (1989) Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase from *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* **57**: 1868-1871.
205. Oda, T., Kojima, Y., Akaike, T., Ijiri, S., Molla, A. und Maeda, H. (1990) Inactivation of chemotactic activity of C5a by the serratial 56-kilodalton protease. *Infect. Immun.* **58**: 1269-1272.

206. Tsao, N., Tsai, W.H., Lin, Y.S., Chuang, W.J., Wang, C.H. und Kuo, C.F. (2006) Streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves properdin and inhibits complement-mediated opsonophagocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**: 779-784.
207. Akesson, P., Sjöholm, A.G. und Björck, L. (1996) Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J. Biol. Chem.* **271**: 1081-1088.
208. Serruto, D., Rappuoli, R., Scarselli, M., Gros, P. und van Strijp, J.A. (2010) Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 393-399.
209. Joiner, K., Brown, E., Hammer, C., Warren, K. und Frank, M. (1983) Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. *J. Immunol.* **130**: 845-849.
210. Hook, L.M., Lubinski, J.M., Jiang, M., Pangburn, M.K. und Friedman, H.M. (2006) Herpes simplex virus type 1 and 2 glycoprotein C prevents complement-mediated neutralization induced by natural immunoglobulin M antibody. *J. Virol.* **80**: 4038-4046.
211. Kostavasili, I., Sahu, A., Friedman, H.M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. und Lambris, J.D. (1997) Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *J. Immunol.* **158**: 1763-1771.
212. Lubinski, J., Nagashunmugam, T. und Friedman, H.M. (1998) Viral interference with antibody and complement. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**: 329-337.
213. Rux, A.H., Lou, H., Lambris, J.D., Friedman, H.M., Eisenberg, R.J. und Cohen, G.H. (2002) Kinetic analysis of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 binding to heparin, heparan sulfate, and complement component C3b. *Virology* **294**: 324-332.
214. Inal, J.M. und Sim, R.B. (2000) A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Lett.* **470**: 131-134.
215. King, L.B., Swiatlo, E., Swiatlo, A. und McDaniel, L.S. (2009) Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **55**: 414-421.
216. Frohnmüller, K. (2012) Vergleichende Untersuchungen zur Komplementresistenz von *Acinetobacter baumannii*. (Bachelorarbeit) *Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene*. Universitätsklinikum Frankfurt, Goethe Universität, Frankfurt am Main.
217. Robbins, K.C. und Summaria, L. (1976) Plasminogen and plasmin. *Methods Enzymol.* **45**: 257-273.
218. Henkin, J., Marcotte, P. und Yang, H.C. (1991) The plasminogen-plasmin system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **34**: 135-164.
219. Ponting, C.P., Marshall, J.M. und Cederholm-Williams, S.A. (1992) Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **3**: 605-614.

220. Bachmann, F. (1994) Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin. In *Hemostasis and Thrombosis*, Bloom, A.L., Forbes, C.D., Thomas, D.P., Tuddenham, E.G.D., Editor. Churchill Livingstone, Edinburgh. Seite 575-613.
221. Lijnen, H.R. (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* **86**: 324-333.
222. Axelsson, F. (1995) Plasminogen Product Monograph, Chromogenix AB. Version 1.1, Mölndal, Sweden.
223. Lerch, P.G., Rickli, E.E., Lergier, W. und Gillissen, D. (1980) Localization of individual lysine-binding regions in human plasminogen and investigations on their complex-forming properties. *Eur. J. Biochem.* **107**: 7-13.
224. Wu, H.L., Chang, B.I., Wu, D.H., Chang, L.C., Gong, C.C., Lou, K.L. und Shi, G.Y. (1990) Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* **265**: 19658-19664.
225. Thewes, T., Constantine, K., Byeon, I.J. und Llinas, M. (1990) Ligand interactions with the kringle 5 domain of plasminogen. A study by ¹H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **265**: 3906-3915.
226. Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B. und Rickli, E.E. (1994) Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for omega-aminocarboxylic acids. *Eur. J. Biochem.* **219**: 455-462.
227. Wiman, B., Lijnen, H.R. und Collen, D. (1979) On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta* **579**: 142-154.
228. Fredenburgh, J.C. und Nesheim, M.E. (1992) Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**: 26150-26156.
229. Urano, T., Chibber, B.A. und Castellino, F.J. (1987) The reciprocal effects of epsilon-aminohexanoic acid and chloride ion on the activation of human Glu-plasminogen by human urokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 4031-4034.
230. Stack, S., Gonzalez-Gronow, M. und Pizzo, S.V. (1991) The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**: 58-62.
231. Dano, K., Andreasen, P.A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S. und Skriver, L. (1985) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**: 139-266.
232. Mayer, M. (1990) Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. *Clin. Biochem.* **23**: 197-211.

233. Lijnen, H.R., Bachmann, F., Collen, D., Ellis, V., Pannekoek, H., Rijken, D.C. und Thorsen, S. (1994) Mechanisms of plasminogen activation. *J. Intern. Med.* **236**: 415-424.
234. Lijnen, H.R., De Cock, F., Van Hoef, B., Schlott, B. und Collen, D. (1994) Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase. *Eur. J. Biochem.* **224**: 143-149.
235. Young, K.C., Shi, G.Y., Wu, D.H., Chang, L.C., Chang, B.I., Ou, C.P. und Wu, H.L. (1998) Plasminogen activation by streptokinase via a unique mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**: 3110-3116.
236. Lahteenmaki, K., Kuusela, P. und Korhonen, T.K. (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 531-552.
237. Salonen, E.M., Zitting, A. und Vaheri, A. (1984) Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. *FEBS Lett.* **172**: 29-32.
238. Salonen, E.M., Saksela, O., Vartio, T., Vaheri, A., Nielsen, L.S. und Zeuthen, J. (1985) Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J. Biol. Chem.* **260**: 12302-12307.
239. Kost, C., Benner, K., Stockmann, A., Linder, D. und Preissner, K.T. (1996) Limited plasmin proteolysis of vitronectin. Characterization of the adhesion protein as morpho-regulatory and angiostatin-binding factor. *Eur. J. Biochem.* **236**: 682-688.
240. Preissner, K.T. (1990) Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 966-971.
241. Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. und Underwood, P.A. (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* **271**: 10079-10086.
242. Hantai, D. und Festoff, B.W. (1987) Degradation of muscle basement membrane zone by locally generated plasmin. *Exp. Neurol.* **95**: 44-55.
243. Pillemer, L., Ratnoff, O.D., Blum, L. und Lepow, I.H. (1953) The inactivation of complement and its components by plasmin. *J. Exp. Med.* **97**: 573-589.
244. Barthel, D., Schindler, S. und Zipfel, P.F. (2012) Plasminogen is a complement inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**: 18831-18842.
245. Foley, J.H., Peterson, E.A., Lei, V., Wan, L.W., Krisinger, M.J. und Conway, E.M. (2014) Interplay between fibrinolysis and complement: Plasmin cleavage of iC3b modulates immune responses. *J. Thromb. Haemost.*
246. Ly, D., et al. (2014) Plasmin(ogen) acquisition by group A *Streptococcus* protects against C3b-mediated neutrophil killing. *J. Innate Immun.* **6**: 240-250.
247. Ullberg, M., Kronvall, G. und Wiman, B. (1989) New receptor for human plasminogen on gram positive cocci. *APMIS* **97**: 996-1002.

248. Mohan, S., Hertweck, C., Dudda, A., Hammerschmidt, S., Skerka, C., Hallström, T. und Zipfel, P.F. (2014) Tuf of *Streptococcus pneumoniae* is a surface displayed human complement regulator binding protein. *Mol. Immunol.* **62**: 249-264.
249. Kuusela, P. und Saksela, O. (1990) Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*. Increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. *Eur. J. Biochem.* **193**: 759-765.
250. Hallström, T., Morgelin, M., Barthel, D., Raguse, M., Kunert, A., Hoffmann, R., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (2012) Dihydrolipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a surface-exposed immune evasion protein that binds three members of the factor H family and plasminogen. *J. Immunol.* **189**: 4939-4950.
251. Ullberg, M., Kronvall, G., Karlsson, I. und Wiman, B. (1990) Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **58**: 21-25.
252. Barthel, D., Singh, B., Riesbeck, K. und Zipfel, P.F. (2012) *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. *J. Immunol.* **188**: 379-385.
253. Ringner, M., Valkonen, K.H. und Wadstrom, T. (1994) Binding of vitronectin and plasminogen to *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **9**: 29-34.
254. Verma, A., Brissette, C.A., Bowman, A.A., Shah, S.T., Zipfel, P.F. und Stevenson, B. (2010) Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect. Immun.* **78**: 2053-2059.
255. Vieira, M.L., Atzingen, M.V., Oliveira, T.R., Oliveira, R., Andrade, D.M., Vasconcellos, S.A. und Nascimento, A.L. (2010) In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One* **5**: e11259.
256. Hallström, T., Haupt, K., Kraiczy, P., Hortschansky, P., Wallich, R., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (2010) Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J. Infect. Dis.* **202**: 490-498.
257. Brissette, C.A., et al. (2009) *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect. Immun.* **77**: 300-306.
258. Hu, L.T., Pratt, S.D., Perides, G., Katz, L., Rogers, R.A. und Klempner, M.S. (1997) Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **65**: 4989-4995.
259. Fuchs, H., Wallich, R., Simon, M.M. und Kramer, M.D. (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 12594-12598.
260. Lagal, V., Portnoi, D., Faure, G., Postic, D. und Baranton, G. (2006) *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect* **8**: 645-652.

261. Onder, O., Humphrey, P.T., McOmber, B., Korobova, F., Francella, N., Greenbaum, D.C. und Brisson, D. (2012) OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* **287**: 16860-16868.
262. Koenigs, A., et al. (2013) BBA70 of *Borrelia burgdorferi* is a novel plasminogen-binding protein. *J. Biol. Chem.* **288**: 25229-25243.
263. Huberts, D.H. und van der Klei, I.J. (2010) Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**: 520-525.
264. Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. und Hammerschmidt, S. (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* **40**: 1273-1287.
265. Kolberg, J., Aase, A., Bergmann, S., Herstad, T.K., Rodal, G., Frank, R., Rohde, M. und Hammerschmidt, S. (2006) *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology* **152**: 1307-1317.
266. Pancholi, V. und Fischetti, V.A. (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**: 14503-14515.
267. Floden, A.M., Watt, J.A. und Brissette, C.A. (2011) *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS One* **6**: e27502.
268. Toledo, A., Coleman, J.L., Kuhlow, C.J., Crowley, J.T. und Benach, J.L. (2012) The enolase of *Borrelia burgdorferi* is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* **80**: 359-368.
269. Nogueira, S.V., Smith, A.A., Qin, J.H. und Pal, U. (2012) A Surface Enolase Participates in *Borrelia burgdorferi*-Plasminogen Interaction and Contributes to Pathogen Survival within Feeding Ticks. *Infect. Immun.* **80**: 82-90.
270. Knaust, A., Weber, M.V., Hammerschmidt, S., Bergmann, S., Frosch, M. und Kurzai, O. (2007) Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**: 3246-3255.
271. Candela, M., et al. (2009) Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology* **155**: 3294-3303.
272. Matta, S.K., Agarwal, S. und Bhatnagar, R. (2010) Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**: 2111-2120.
273. Xolalpa, W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M. und Espitia, C. (2007) Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* **7**: 3332-3341.
274. Wolff, D.G., et al. (2013) Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. *PLoS One* **8**: e81818.

275. Kunert, A., et al. (2007) Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J. Immunol.* **179**: 2979-2988.
276. Dallo, S.F., Zhang, B., Denno, J., Hong, S., Tsai, A., Haskins, W., Ye, J.Y. und Weitao, T. (2012) Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. *ScientificWorldJournal* **2012**: 128705.
277. Piechaud, M. und Second, L. (1951) [Studies of 26 strains of *Moraxella lwoffii*]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **80**: 97-99.
278. Göttig, S., Pfeifer, Y., Wichelhaus, T.A., Zacharowski, K., Bingold, T., Averhoff, B., Brandt, C. und Kempf, V.A. (2010) Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.* **10**: 828-829.
279. Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T.A., Göttig, S., Hunfeld, K.P., Seifert, H., Witte, W. und Higgins, P.G. (2011) Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 1998-2001.
280. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
281. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
282. Stahl, J. (2013) Metabolische Adaptation von *Acinetobacter baumannii* an den menschlichen Wirt. (Masterarbeit) *Abteilung für Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik, Institut für Molekulare Biowissenschaften*. Goethe Universität, Frankfurt am Main.
283. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P. und Lopez, R. (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **41**: W597-600.
284. Bertani, G. (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.* **186**: 595-600.
285. Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
286. Radolf, J.D., Chamberlain, N.R., Clausell, A. und Norgard, M.V. (1988) Identification and localization of integral membrane proteins of virulent *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by phase partitioning with the nonionic detergent triton X-114. *Infect. Immun.* **56**: 490-498.
287. Czupalla, C.J., Liebner, S. und Devraj, K. (2014) In vitro models of the blood-brain barrier. *Methods Mol. Biol.* **1135**: 415-437.
288. Zheng, L., Baumann, U. und Raymond, J.L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**: e115.

289. Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E. und Hoch, J.A. (1983) Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 1424-1431.
290. Nakashima, N. und Miyazaki, K. (2014) Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int. J. Mol. Sci.* **15**: 2773-2793.
291. Coleman, J.L., Sellati, T.J., Testa, J.E., Kew, R.R., Furie, M.B. und Benach, J.L. (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect. Immun.* **63**: 2478-2484.
292. Vieira, M.L., Alvarez-Flores, M.P., Kirchgatter, K., Romero, E.C., Alves, I.J., de Moraes, Z.M., Vasconcellos, S.A., Chudzinski-Tavassi, A.M. und Nascimento, A.L. (2013) Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. *Infect. Immun.* **81**: 1764-1774.
293. Bruhn, K.W., et al. (2014) Host Fate is Rapidly Determined by Innate Effector-Microbial Interactions During *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. *J. Infect. Dis.* **211**: 1296-1305.
294. Krab, I.M. und Parmeggiani, A. (2002) Mechanisms of EF-Tu, a pioneer GTPase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**: 513-551.
295. Abel, K. und Jurnak, F. (1996) A complex profile of protein elongation: translating chemical energy into molecular movement. *Structure* **4**: 229-238.
296. Caldas, T.D., El Yaagoubi, A. und Richarme, G. (1998) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* **273**: 11478-11482.
297. Richarme, G. (1998) Protein-disulfide isomerase activity of elongation factor EF-Tu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 156-161.
298. Defeu Soufo, H.J., Reimold, C., Linne, U., Knust, T., Gescher, J. und Graumann, P.L. (2010) Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 3163-3168.
299. Balasubramanian, S., Kannan, T.R. und Baseman, J.B. (2008) The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infect. Immun.* **76**: 3116-3123.
300. Candela, M., Centanni, M., Fiori, J., Biagi, E., Turrone, S., Orrico, C., Bergmann, S., Hammerschmidt, S. und Brigidi, P. (2010) DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts. *Microbiology* **156**: 1609-1618.
301. Grundy, J.E., Hancock, M.A., Meixner, S.C., MacKenzie, R.C., Koschinsky, M.L. und Prydzial, E.L. (2007) Plasminogen binds to plasmin-modulated factor Xa by Ca²⁺- and C-terminal lysine-dependent and -independent interactions. *Thromb. Haemost.* **97**: 38-44.

302. Kwon, S.O., Gho, Y.S., Lee, J.C. und Kim, S.I. (2009) Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* **297**: 150-156.
303. Heffron, S.E., Moeller, R. und Journak, F. (2006) Solving the structure of *Escherichia coli* elongation factor Tu using a twinned data set. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**: 433-438.
304. Hammerschmidt, C., Hallström, T., Skerka, C., Wallich, R., Stevenson, B., Zipfel, P.F. und Kraiczy, P. (2012) Contribution of the infection-associated complement regulator-acquiring surface protein 4 (ErpC) to complement resistance of *Borrelia burgdorferi*. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**: 349657.
305. Siegel, C., et al. (2010) Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* **5**: e13519.
306. Kraiczy, P. und Stevenson, B. (2013) Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: Structure, function and regulation of gene expression. *Ticks Tick Borne Dis.* **4**: 26-34.
307. Mendes, R.S., Von Atzingen, M., de Moraes, Z.M., Goncalves, A.P., Serrano, S.M., Asega, A.F., Romero, E.C., Vasconcellos, S.A. und Nascimento, A.L. (2011) The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infect. Immun.* **79**: 4657-4667.
308. Chang, Y., Mochalkin, I., McCance, S.G., Cheng, B., Tulinsky, A. und Castellino, F.J. (1998) Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen. *Biochemistry* **37**: 3258-3271.
309. Weisel, J.W., Nagaswami, C., Korsholm, B., Petersen, L.C. und Suenson, E. (1994) Interactions of plasminogen with polymerizing fibrin and its derivatives, monitored with a photoaffinity cross-linker and electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **235**: 1117-1135.
310. Weisel, J.W. und Petersen, I.C. (1996) Plasminogen conformations. *Ukr. Biokhim. Zh.* **68**: 41.
311. Joshi, K.K., Nanda, J.S., Kumar, P. und Sahni, G. (2012) Substrate kringle-mediated catalysis by the streptokinase-plasmin activator complex: critical contribution of kringle-4 revealed by the mutagenesis approaches. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**: 326-333.
312. Perkins, S.J., Smith, K.F., Nealis, A.S., Lachmann, P.J. und Harrison, R.A. (1990) Structural homologies of component C5 of human complement with components C3 and C4 by neutron scattering. *Biochemistry* **29**: 175-180.
313. Schindler, M.K., Schutz, M.S., Muhlenkamp, M.C., Rooijackers, S.H., Hallström, T., Zipfel, P.F. und Autenrieth, I.B. (2012) *Yersinia enterocolitica* YadA mediates complement evasion by recruitment and inactivation of C3 products. *J. Immunol.* **189**: 4900-4908.

314. Jongerius, I., Garcia, B.L., Geisbrecht, B.V., van Strijp, J.A. und Rooijackers, S.H. (2010) Convertase inhibitory properties of Staphylococcal extracellular complement-binding protein. *J. Biol. Chem.* **285**: 14973-14979.
315. Jongerius, I., Kohl, J., Pandey, M.K., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A. und Rooijackers, S.H. (2007) Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J. Exp. Med.* **204**: 2461-2471.
316. Lubinski, J.M., et al. (2002) *Herpes simplex* virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J. Virol.* **76**: 9232-9241.
317. Luo, S., Hartmann, A., Dahse, H.M., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (2010) Secreted pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* blocks activation and conversion of complement C3. *J. Immunol.* **185**: 2164-2173.
318. Blom, A.M., Bergmann, S., Fulde, M., Riesbeck, K. und Agarwal, V. (2014) *Streptococcus pneumoniae* phosphoglycerate kinase is a novel complement inhibitor affecting the membrane attack complex formation. *J. Biol. Chem.* **289**: 32499-32511.
319. Hallström, T., Siegel, C., Morgelin, M., Kraiczy, P., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (2013) CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway. *MBio* **4**: e00481-13
320. Reinartz, J., Hansch, G.M. und Kramer, M.D. (1995) Complement component C7 is a plasminogen-binding protein. *J. Immunol.* **154**: 844-850.
321. Sundsmo, J.S. und Wood, L.M. (1981) Activated factor B (Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* **127**: 877-880.
322. Berends, E.T., Kuipers, A., Ravesloot, M.M., Urbanus, R.T. und Rooijackers, S.H. (2014) Bacteria under stress by complement and coagulation. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 1146-1171.
323. Zuckert, W.R. (2014) Secretion of bacterial lipoproteins: through the cytoplasmic membrane, the periplasm and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 1509-1516.
324. Narita, S., Matsuyama, S. und Tokuda, H. (2004) Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **182**: 1-6.
325. Von Heijne, G. (1989) The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.* **2**: 531-534.
326. Sankaran, K.W. (1993) Bacterial lipoproteins, in *Lipid modifications of proteins*, M.J. Schlesinger, Editor. CRC Press, Boca Raton. Seite 163-181.
327. Setubal, J.C., Reis, M., Matsunaga, J. und Haake, D.A. (2006) Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiology* **152**: 113-121.
328. Yamaguchi, K., Yu, F. und Inouye, M. (1988) A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* **53**: 423-432.

329. Seydel, A., Gounon, P. und Pugsley, A.P. (1999) Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol. Microbiol.* **34**: 810-821.
330. Lewenza, S., Mhlanga, M.M. und Pugsley, A.P. (2008) Novel inner membrane retention signals in *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J. Bacteriol.* **190**: 6119-6125.
331. Yamaguchi, M., Hatefi, Y., Trach, K. und Hoch, J.A. (1988) Amino acid sequence of the signal peptide of mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase as determined from the sequence of its messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 24-29.
332. Brokx, S.J., Ellison, M., Locke, T., Bottorff, D., Frost, L. und Weiner, J.H. (2004) Genome-wide analysis of lipoprotein expression in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* **186**: 3254-3258.
333. Tokuda, H., Matsuyuma S., Tanaka-Masuda K. (2007) Structure, function and transport of lipoproteins in *Escherichia coli*. In *The Periplasm*, E. M., Editor. ASM Press, Herndon, VA. Seiten 67-79.
334. Cowles, C.E., Li, Y., Semmelhack, M.F., Cristea, I.M. und Silhavy, T.J. (2011) The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **79**: 1168-1181.
335. d'Enfert, C., Ryter, A. und Pugsley, A.P. (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J.* **6**: 3531-3538.
336. Anderson, J.E., Sparling, P.F. und Cornelissen, C.N. (1994) Gonococcal transferrin-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. *J. Bacteriol.* **176**: 3162-3170.
337. Ostberg, K.L., DeRocco, A.J., Mistry, S.D., Dickinson, M.K. und Cornelissen, C.N. (2013) Conserved regions of gonococcal TbpB are critical for surface exposure and transferrin iron utilization. *Infect. Immun.* **81**: 3442-3450.
338. Pettersson, A., Prinz, T., Umar, A., van der Biezen, J. und Tommassen, J. (1998) Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 599-610.
339. Pride, A.C., Herrera, C.M., Guan, Z., Giles, D.K. und Trent, M.S. (2013) The outer surface lipoprotein VolA mediates utilization of exogenous lipids by *Vibrio cholerae*. *MBio* **4**: e00305-00313.
340. Roussel-Jazede, V., Grijpstra, J., van Dam, V., Tommassen, J. und van Ulsen, P. (2013) Lipidation of the autotransporter NalP of *Neisseria meningitidis* is required for its function in the release of cell-surface-exposed proteins. *Microbiology* **159**: 286-295.
341. van Ulsen, P., van Alphen, L., ten Hove, J., Fransen, F., van der Ley, P. und Tommassen, J. (2003) A Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol. Microbiol.* **50**: 1017-1030.

342. Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P. und Chan, V.L. (2001) JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **39**: 1225-1236.
343. Kawai, F., Paek, S., Choi, K.J., Prouty, M., Kanipes, M.I., Guerry, P. und Yeo, H.J. (2012) Crystal structure of JlpA, a surface-exposed lipoprotein adhesin of *Campylobacter jejuni*. *J. Struct. Biol.* **177**: 583-588.
344. Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
345. Pugsley, A.P., Poquet, I. und Kornacker, M.G. (1991) Two distinct steps in pullulanase secretion by *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **5**: 865-873.
346. Chen, S., Kumru, O.S. und Zuckert, W.R. (2011) Determination of *Borrelia* surface lipoprotein anchor topology by surface proteolysis. *J. Bacteriol.* **193**: 6379-6383.
347. Chen, S. und Zuckert, W.R. (2011) Probing the *Borrelia burgdorferi* surface lipoprotein secretion pathway using a conditionally folding protein domain. *J. Bacteriol.* **193**: 6724-6732.
348. Schulze, R.J., Chen, S., Kumru, O.S. und Zuckert, W.R. (2010) Translocation of *Borrelia burgdorferi* surface lipoprotein OspA through the outer membrane requires an unfolded conformation and can initiate at the C-terminus. *Mol. Microbiol.* **76**: 1266-1278.
349. Jacobs, A.C., Sayood, K., Olmsted, S.B., Blanchard, C.E., Hinrichs, S., Russell, D. und Dunman, P.M. (2012) Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **64**: 403-412.
350. Geisinger, E. und Isberg, R.R. (2015) Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* **11**: e1004691.
351. Zimble, D.L., Arivett, B.A., Beckett, A.C., Menke, S.M. und Actis, L.A. (2013) Functional features of TonB energy transduction systems of *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Immun.* **81**: 3382-3394.
352. Coleman, J.L., Roemer, E.J. und Benach, J.L. (1999) Plasmin-coated *Borrelia burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* **67**: 3929-3936.
353. Attali, C., Durmort, C., Vernet, T. und Di Guilmi, A.M. (2008) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect. Immun.* **76**: 5350-5356.
354. Jensch, I., et al. (2010) PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. *Mol. Microbiol.* **77**: 22-43.
355. Grab, D.J., et al. (2005) *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **73**: 1014-1022.

356. Fulde, M., Rohde, M., Hitzmann, A., Preissner, K.T., Nitsche-Schmitz, D.P., Nerlich, A., Chhatwal, G.S. und Bergmann, S. (2011) SCM, a novel M-like protein from *Streptococcus canis*, binds (mini)-plasminogen with high affinity and facilitates bacterial transmigration. *Biochem. J.* **434**: 523-535.
357. Bergmann, S., Schoenen, H. und Hammerschmidt, S. (2013) The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**: 452-462.
358. Hollands, A., Gonzalez, D., Leire, E., Donald, C., Gallo, R.L., Sanderson-Smith, M., Dorrestein, P.C. und Nizet, V. (2012) A bacterial pathogen co-opts host plasmin to resist killing by cathelicidin antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **287**: 40891-40897.
359. Vieira, M.L., de Moraes, Z.M., Vasconcellos, S.A., Romero, E.C. und Nascimento, A.L. (2011) In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb. Pathog.* **51**: 360-365.
360. Russell, T.M., Delorey, M.J. und Johnson, B.J. (2013) *Borrelia burgdorferi* BbHtrA degrades host ECM proteins and stimulates release of inflammatory cytokines in vitro. *Mol. Microbiol.* **90**: 241-251.
361. Tilley, D., Law, R., Warren, S., Samis, J.A. und Kumar, A. (2014) CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiol. Lett.* **356**: 53-61.
362. Watford, W.T., Ghio, A.J. und Wright, J.R. (2000) Complement-mediated host defense in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**: 790-798.
363. Levin, E.G., Santell, L. und Osborn, K.G. (1997) The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 2)**: 139-148.

Danksagung

Zu allererst gilt mein Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Peter Kraiczy, für die Vergabe des interessanten Themas, die Unterstützung und ausgezeichnete Betreuung des Projektes, sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge, nicht nur wissenschaftlicher Natur und das Schaffen einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre. Des Weiteren danke ich ihm für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf, dem Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt, danke ich herzlich für die fortlaufende Finanzierung meiner Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter und die Schaffung der guten Rahmenbedingungen am Institut.

Prof. Dr. Volker Müller, Leiter der Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe Universität Frankfurt, danke ich für die Betreuung meiner Dissertation als Erstgutachter des Fachbereichs Biowissenschaften, seine sorgfältige Durchsicht der vorliegenden Arbeit sowie für seine Gesprächsbereitschaft und Unterstützung bei der Vorbereitung auf die Disputation.

Julia Stahl, M.Sc. und Prof. Dr. Beate Averhoff, von der Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik des Instituts für Molekulare Biowissenschaften der Goethe Universität Frankfurt, danke ich herzlich für die gute Kooperation bei der Generierung der Deletionsmutante $\Delta p41$. Julia Stahl danke ich besonders für ihre vielen Tips und Ratschläge bei der Arbeit mit *Acinetobacter*.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Peter F. Zipfel, Dr. T. Hallström, Prof. Dr. R. Wallich und Jüri Habicht für die gute Kooperation mit ihren jeweiligen Instituten und die Bereitstellung zahlreicher rekombinanter Proteine und Antikörper, ohne die diese Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht zustande gekommen wäre. Auch danke ich ihnen für die zahlreichen freundlichen Emails, Gespräche und Ratschläge.

Dr. Dr. Stephan Göttig und Prof. Dr. Thomas Wichelhaus sowie den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppen danke ich für die freundliche Kooperation, ihre Hilfsbereitschaft und Ratschläge.

Ich danke Axel Teegler, Jessica Günnewig, Denia Frank, Wibke Ballhorn und Sara Christ für die tatkräftige praktische Unterstützung im Labor, für fachliche Hilfestellungen, ihre Gesprächsbereitschaft und das Beitragen zum stets angenehmen Arbeitsklima an unserem Institut. Ganz besonders danke ich auch Dr. Claudia Hammerschmidt für ihre freundschaftliche Unterstützung und die vielen konstruktiven Ratschläge und Gespräche.

Grundsätzlich danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt für ihre Hilfsbereitschaft und für ihren Beitrag zum sehr guten Arbeitsklima.

Für ihre Unterstützung und sicherlich auch Ablenkung außerhalb des Laboralltags möchte ich mich bei allen meinen Freunden und Verwandten herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern, die mir immer viel Geduld und Verständnis entgegenbringen und stets ein offenes Ohr für alle meine Anliegen haben. Ich danke ihnen allen für ihre bedingungslose Unterstützung und konstante Ermutigung sowie für das Ermöglichen meines Studiums.

Publikationen

Eingereicht – Koenigs, A., Zipfel, P.F. und Kraiczy, P. Translation elongation factor Tuf of *Acinetobacter baumannii* is a plasminogen binding protein. *PLoS One*.

Eingericht – Hammerschmidt, C., Klevenhaus, Y., Koenigs, A., Hallström, T., Fingerle, V., Skerka, C., Pos, K.M., Zipfel, P.F., Wallich, R. und Kraiczy, P. BGA66 and BGA71 are novel pathogenic determinants contributing in immune evasion of neuroinvasive *Borrelia bavariensis*. *J. Infect. Dis.*

Klingler, F.M., Wichelhaus, T.A., Frank, D., Bernal, J.C., El-Delik, J., Müller, H.F., Sjuts, H., Göttig, S., Koenigs, A., Pos, K.M., Pogoryelov, D. und Proschak, E. (2015) Approved drugs containing thiols as inhibitors of metallo- β -lactamases: a strategy to combat multidrug-resistant bacteria. *J. Med. Chem.* **58**: 3626-3630.

Hammerschmidt, C., Koenigs, A., Siegel, C., Hallström, T., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P.F. und Kraiczy, P. (2014) Versatile roles of CspA orthologs in complement inactivation of serum-resistant Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* **82**: 380-392.

Koenigs, A., Hammerschmidt, C., Jutras, B.L., Pogoryelov, D., Barthel, D., Skerka, C., Kugelstadt, D., Wallich, R., Stevenson, B., Zipfel, P.F. und Kraiczy, P. (2013) BBA70 of *Borrelia burgdorferi* is a novel plasminogen-binding protein. *J. Biol. Chem.* **288**: 25229-25243.

Beiträge auf Kongressen

21. – 23. Juni 2010, Bad Urach. „Interaction of CRASP-1 orthologs with plasminogen“. Symposium der DGHM Fachgruppe „Mikrobielle Pathogenität“.

24. – 26. März 2011, Weimar. „Identification of PbpA, a novel plasminogen-binding protein of *Borrelia burgdorferi*“. International Jena symposium on tick-borne diseases.

25. – 28. September 2011, Essen. „Identification of a novel plasminogen-binding protein of *Borrelia burgdorferi*“. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie.

22. – 27. Januar 2012, Ventura, USA. „Identification of a novel plasminogen-binding protein of *Borrelia burgdorferi*“. Gordon research conference – biology of spirochetes.

18. – 21. März 2012, Tübingen. „CspA of *Borrelia burgdorferi* is a regulator of the alternative pathway“. Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie.

18. – 20. Juni 2012, Bad Urach. „Complement-regulator acquiring surface protein-1 (CspA) of *Borrelia burgdorferi* is a regulator of the alternative pathway“. Symposium der DGHM Fachgruppe „Mikrobielle Pathogenität“.

30. September – 03. Oktober 2012, Hamburg. „Complement-regulator acquiring surface protein-1 (CspA) of *Borrelia burgdorferi* is a regulator of the alternative pathway“. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie.

21. – 23. März 2013, Weimar. „*Borrelia burgdorferi* CspA regulates the alternative pathway of complement“. International Jena symposium on tick-borne diseases.

21. – 25. Juli 2013, Leipzig. „CspA orthologs of serum-resistant Lyme disease spirochetes are multifunctional complement inhibitory molecules“. 5. Kongress europäischer Mikrobiologen (FEMS).

18. – 21. August 2013, Boston, USA. „Differential adhesion of Lyme disease spirochetes to human keratinocytes“. 13th International conference on Lyme borreliosis (ICLB).

11. – 14. September 2013, Mainz. „Complement inactivation by CspA orthologs of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia spielmanii*“. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie.

19. – 24. Januar 2014, Ventura, USA. „Lyme disease spirochetes differentially adhere to human keratinocytes“. Gordon research conference – biology of spirochetes.

16. – 18. Juni 2014, Bad Urach. „Identification and functional characterization of plasminogen-binding proteins of *Acinetobacter baumannii*“. Symposium der DGHM Fachgruppe „Mikrobielle Pathogenität“.

05. – 08. Oktober 2014, Dresden. „Identification and functional characterization of plasminogen-binding proteins of *Acinetobacter baumannii*“. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie.

17. November 2014, Frankfurt am Main. „Identification and functional characterization of plasminogen-binding proteins of *Acinetobacter baumannii*“. Kick-off Meeting der Forschergruppe FOR2251/1 – Adaptation and persistence of the emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*.