

**Metabolische Adaptation von *Acinetobacter baumannii*  
an den humanen Wirt:  
Rolle von Trimethylammoniumverbindungen,  
Phospholipiden und Aromaten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe – Universität

in Frankfurt am Main

von

Jennifer Maria Breisch

aus Hamburg

Frankfurt, 2022

(D30)

Vom Fachbereich 15 der

Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

1. Gutachter: Prof. Dr. Beate Averhoff

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaas Martinus Pos

3. Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel

Datum der Disputation: 05.12.2022

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Breisch, J., Waclawska, I. and Averhoff, B. (2018) Identification and characterization of a carnitine transporter in *Acinetobacter baumannii*. *MicrobiologyOpen* **8**: e00752.
2. Breisch, J. and Averhoff, B. (2020) Identification of osmo-dependent and osmo-independent betaine-choline-carnitine transporters in *Acinetobacter baumannii*: role in osmostress protection and metabolic adaptation. *Environ Microbiol* **22**: 2724-2735.
3. Pfefferle, K., Lopalco, P., Breisch, J., Siemund, A., Corcelli, A. and Averhoff, B. (2020) In vivo synthesis of monolysocardiolipin and cardiolipin by *Acinetobacter baumannii* phospholipase D and effect on cationic antimicrobial peptide resistance. *Environ Microbiol* **22**: 5300-5308.
4. Breisch, J., Bendel, M. and Averhoff, B. (2021) The choline dehydrogenase BetA of *Acinetobacter baumannii*: a flavoprotein responsible for osmotic stress protection. *Environ Microbiol* **24**: 1052-1061.
5. Breisch, J., Huber, L. S., Kraiczy, P. and Averhoff, B. (2021) The  $\beta$ -keto adipate pathway of *Acinetobacter baumannii* is involved in complement resistance and affects resistance against aromatic antibiotics. *Environ Microbiol Rep* **14**: 170-178.
6. Djahanschiri, B., Di Venanzio, G., Distel, S., Breisch, J., Dieckmann, M., Goesmann, A., Averhoff, B., Goettig, S., Wilharm, G., Feldman, M. and Ebersberger I. (2022) Evolutionarily stable gene clusters shed light on the common grounds of pathogenicity in the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. *Plos Genetics* *in press*
7. Breisch, J., Schumm, C., Poehlein, A., Daniel, R. and Averhoff, B. (2022) The carnitine degradation pathway of *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence. *Environ Microbiol* *in press*

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> , ein humanpathogenes Bakterium.....	1
1.2. Adaptation von <i>A. baumannii</i> an den humanen Wirt und klinische Habitate .....	2
1.3. Adaptationsmechanismen von <i>A. baumannii</i> an trockene oder hyperosmotische Bedingungen.....	4
1.4. Die <i>de novo</i> -Synthese von kompatiblen Soluten in <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 .....	7
1.5. Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain .....	9
1.6. Die Aufnahme von kompatiblen Soluten .....	10
1.7. Der Nutzen von kompatiblen Soluten als Kohlenstoffquelle.....	12
1.8. Der Abbau von aromatischen Verbindungen .....	14
1.8.1. Der $\beta$ -Ketoacidweg .....	16
1.8.1.1. Der Protocatechuat-Zweig.....	18
1.8.1.2. Der Catechol-Zweig .....	19
1.9. Die Rolle der Phospholipasen bei der Adaptation von <i>A. baumannii</i> an den menschlichen Wirt.....	20
1.10. Zielsetzungen dieser Arbeit.....	22
2. Material und Methoden .....	24
2.1. Verwendete Organismen, Plasmide und Starteroligonukleotide.....	24
2.2. Kultivierung von Mikroorganismen.....	33
2.2.1. Sterilisation.....	33
2.2.2. Kultivierung von Mikroorganismen in Komplexmedium.....	33
2.2.3. Kultivierung von Mikroorganismen in Mineralmedium .....	33
2.2.4. Medienzusätze und Antibiotika.....	35
2.2.4. Bestimmung der Zelldichte .....	35
2.2.5. Stammhaltung.....	35
2.3. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	36

---

2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion .....	36
2.3.2. Restriktionsverdau mittels Restriktionsenzymen .....	37
2.3.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	37
2.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten .....	37
2.3.5. Isolierung von Plasmid-DNA .....	37
2.3.6. Isolierung von chromosomaler DNA .....	38
2.3.7. Isolierung von RNA .....	38
2.3.8. cDNA-Synthese .....	39
2.3.9. Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA .....	39
2.3.10. Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	39
2.3.11. Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -Zellen .....	39
2.3.12. Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -Zellen .....	40
2.3.13. Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> MKH13- und BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3)-Zellen .....	40
2.3.14. Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> MKH13- und BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3)- Zellen .....	40
2.3.15. Herstellung elektrokompetenter <i>A. baumannii</i> ATCC 19606-Zellen .....	41
2.3.16. Transformation elektrokompetenter <i>A. baumannii</i> ATCC 19606-Zellen .....	41
2.3.17. Lagerung von DNA, cDNA und RNA .....	42
2.3.18. Transkriptomanalysen .....	42
2.4. Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	43
2.4.1. Heterologe Produktion der BCCT aus <i>A. baumannii</i> in <i>E. coli</i> MKH13 .....	43
2.4.2. Heterologe Produktion des Regulators CarR aus <i>A. baumannii</i> in <i>E. coli</i> BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3) .....	43
2.4.3. Heterologe Produktion von BetA aus <i>A. baumannii</i> in <i>E. coli</i> BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3) .....	44
2.5. Aufreinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> mittels Ni-NTA .....	44
2.5.1. Aufreinigung des Regulators CarR aus <i>E. coli</i> BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3) .....	44
2.5.2. Aufreinigung von BetA aus <i>E. coli</i> BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3) .....	45

---

2.6. Standardmethoden für das Arbeiten mit Proteinen .....	45
2.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	45
2.6.2. Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western Blot.....	47
2.6.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford.....	48
2.6.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Schmidt.....	48
2.6.5. Flavin-Nachweis in Proteinen .....	48
2.7. Standardmethoden für das Arbeiten mit Lipiden .....	49
2.7.1. Extraktion des Gesamtlipidpools aus <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	49
2.7.2. Extraktion von Lipid A aus <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	49
2.7.3. Analyse der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie .....	50
2.7.4. Analyse von Lipid A mittels Dünnschichtchromatographie .....	51
2.8. Markerlose Mutagenese von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 .....	51
2.9. Phänotypisierung der Deletionsmutanten.....	52
2.9.1. Wachstumsstudien unter verschiedenen Bedingungen .....	52
2.9.2. Wachstum in menschlichen Körperflüssigkeiten.....	53
2.9.3. Komplementresistenztest .....	54
2.9.4. Infektionsstudien in <i>Galleria mellonella</i> -Larven.....	55
2.9.5. Antibiotikaresistenztest .....	56
2.10. Transportstudien mit radioaktiv markierten Substraten in <i>E. coli</i> MKH13-Zellen.....	56
2.11. Bestimmung des Gesamt-ATP-Gehaltes in ganzen Zellen .....	57
2.12. Messung der Cholin-Oxidation mittels Sauerstoffelektrode.....	58
2.14. „Electrophoretic Mobility Shift“-Analysen (EMSA).....	58
2.15. Verwendete Chemikalien .....	59
3. Ergebnisse .....	60
3.1. Die Rolle des kompatiblen Solutes Glycinbetain und seines Vorläufers Cholin in der Osmostress Adaptation von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 .....	60
3.1.1. Cholin und Glycinbetain werden unter hyperosmotischen Bedingungen durch BCCT aufgenommen.....	60

---

3.1.2. Vergleich der Transportraten der BCCT in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.....	62
3.1.3. Cholin wird über das <i>betIBA</i> -Cluster zu Glycinbetain oxidiert .....	64
3.1.3.1. <i>In silico</i> Analyse des <i>betIBA</i> -Clusters .....	64
3.1.3.2. Einfluss von Cholin auf das Wachstum der <i>ΔbetA</i> -Mutante unter Salzstress .....	66
3.1.4. Biochemische Charakterisierung der Cholin-Dehydrogenase BetA .....	69
3.1.4.1. Aufreinigung der Cholin-Dehydrogenase BetA.....	69
3.1.4.2. BetA ist eine membranständige Cholin-Dehydrogenase .....	71
3.1.4.3. Die Salzabhängigkeit der Cholin-Dehydrogenase .....	71
3.1.4.4. Effekt des pH-Wertes und der Substratkonzentration auf die Cholin-Dehydrogenase-Aktivität von BetA .....	72
3.1.4.5. BetA wird stimuliert durch Glutamat, jedoch nicht durch andere kompatible Solute .....	74
3.1.4.6. BetA nutzt FAD als Cofaktor.....	75
3.2. Die Oxidation von Cholin, dem Vorläufer des kompatiblen Solutes Glycinbetain, führt zu einem Energiegewinn in <i>A. baumannii</i> .....	76
3.2.1. Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain führt zur ATP-Synthese.....	77
3.2.2. Phosphatidylcholin dient als natürliche Cholinquelle im menschlichen Wirt .....	79
3.3. Die Rolle von Cholin und Glycinbetain in der Virulenz von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 .....	80
3.3.1. Die BCCT haben keinen Einfluss auf die Virulenz von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 .....	81
3.3.2. Der Regulator BetI des Cholin-Oxidationsweges spielt keine Rolle in der Virulenz von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	85
3.4. Aufnahme und Nutzung von Carnitin als Kohlenstoffquelle.....	88
3.4.1. Der BCCT Aci01347 ist essenziell für die Aufnahme von Carnitin.....	88
3.4.2. Aci01347 ist kein Carnitin:γ-Butyrobetain-Antiporter .....	91
3.4.3. Organisation der Gene des Abbauweges von Carnitin.....	92

---

3.4.4. Der Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin läuft über D-Malat als Zwischenprodukt .....	94
3.4.5. Die Gene für den Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin über D-Malat bilden ein Operon.....	98
3.4.6. Die Gene mit Funktion im Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin werden durch den transkriptionellen Regulator CarR positiv reguliert .....	99
3.5. Identifizierung von CarR-Bindestellen vor den Strukturgenen des Carnitin-Operons	102
3.5.1. Überproduktion, Aufreinigung und Lagerung des Regulators CarR .....	102
3.5.2. CarR bindet an den Stromaufwärtsbereich des <i>mdh</i> -Gens.....	105
3.5.3. CarR bindet konstitutiv an die DNA .....	108
3.6. Die Rolle von Carnitin in der Virulenz von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	109
3.6.1. Der Abbau von Carnitin hat einen Einfluss auf die Virulenz von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 .....	109
3.6.2. Die Bildung von TMA spielt eine Rolle bei der Abtötung von <i>G. mellonella</i> -Larven nach Infektion mit <i>A. baumannii</i> .....	112
3.7. Acetylcarnitin, Carnitin und D-Malat induzieren die Expression verschiedener Gene mit Rolle in der Virulenz.....	114
3.8. Die Rolle der PLD in der Gewinnung von Energiequellen und der Antibiotikaresistenz von <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	116
3.8.1. Die PLDs sind nicht essenziell für die Freisetzung von Cholin aus Phosphatidylcholin.....	116
3.8.2. Die PLDs sind essenziell für die Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMPs) .....	118
3.8.3. Cardiolipin spielt keine Rolle in der Lipid A-Modulierung.....	120
3.9. Die Nutzung aromatischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequellen von <i>A. baumannii</i> AYE und ihre Rolle bei der Virulenz von <i>A. baumannii</i> .....	122
3.9.1. <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 baut unterschiedliche aromatische Verbindungen über den $\beta$ -Ketoacidweg ab.....	124
3.9.2. Der $\beta$ -Ketoacidweg spielt eine Rolle bei der Komplementresistenz von <i>A. baumannii</i> AYE .....	126



---

3.9.3. Der $\beta$ -Ketoacidweg ist nicht essenziell für das Wachstum in Blutserum .....	127
3.9.4. <i>p</i> -Hydroxybenzoat und Protocatechuat stimulieren die Komplementresistenz von <i>A. baumannii</i> .....	128
3.9.4. Der $\beta$ -Ketoacidweg ist nicht essenziell für die Persistenz oder das Wachstum in menschlichem Urin .....	131
3.9.5. Der $\beta$ -Ketoacidweg ist wichtig für die Resistenz gegenüber aromatischen Antibiotika.....	132
4. Diskussion .....	134
4.1. Die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umwelt – nur eine Osmostressantwort? .....	134
4.1.1. Die BCCT als essenzielle Aufnahmesysteme für kompatible Solute in <i>A. baumannii</i> sind auch unter isoosmotischen Bedingungen aktiv .....	136
4.1.2. Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain.....	137
4.1.4. Die Oxidation von Cholin führt zu einem energetischen Vorteil im menschlichen Wirt.....	139
4.1.3. Carnitin wird von <i>A. baumannii</i> nicht als kompatibles Solut verwendet.....	141
4.2. Stimulieren Trimethylammoniumverbindungen die Virulenz von Pathogenen?.....	147
4.3. Die Rolle der Membranzusammensetzung von <i>A. baumannii</i> in der Antibiotikaresistenz .....	151
4.4. Der $\beta$ -Ketoacidweg spielt eine Rolle bei der Virulenz von <i>A. baumannii</i> .....	154
4.4.1. Die Rolle der Stoffwechselwege von Aromaten in der Virulenz von <i>A. baumannii</i> .....	155
4.4.1. Die Rolle von Stoffwechselwegen für Aromaten in der Virulenz verschiedener Pathogene .....	156
5. Zusammenfassung.....	160
6. Anhang .....	163
7. Literaturverzeichnis.....	167
Danksagung.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Lebenslauf.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ABC-Transporter	„ATP-binding-cassette transporter“
ACB-Komplex	<i>A. calcoaceticus-baumannii</i> -Komplex
BCCT	Betain/Cholin/Carnitin-Transporter
Bp	Basenpaare
BSA	„Bovine-Serum-Albumin“
CAMP	Kationische antimikrobielle Peptide
CL	Cardiolipin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DES	Diethylstilbestrol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMSA	„Electro mobility shift assay“
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
kb	Kilobasenpaare
LOS	Lipidoligosaccharidschicht
LPS	Lipidpolysaccharidschicht
MLCL	Monolysocardiolipin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHS	„Normal human serum“
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphoethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PLP	Patatin-ähnliches Protein
PMS	Phenazinmethosulfat
PQQ	Pyrrolochinolinchinon

---

RIN	RNA Integritätszahl
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRA	„Sequence Read Archive“
SSS	„Sodium-Solute-Symporter“
SV	Säulenvolumen
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
TCS	Tetrachlorosalicylanilid
TMA	Trimethylamin
VOC	„Vicinal oxygen chelate“
WHO	„World Health Organization“

## 1. Einleitung

### 1.1. *Acinetobacter baumannii*, ein humanpathogenes Bakterium

*Acinetobacter baumannii* ist ein mesophiles, obligat aerobes, Gram-negatives, stäbchenförmiges, Katalase-positives, Oxidase-negatives und nicht flagelliertes Bakterium, welches zur Gattung *Acinetobacter* gehört. Die Gattung *Acinetobacter* wurde erstmal 1956 beschrieben und gehört der Ordnung *Pseudomonadales* an und der Familie der *Moraxallaceae* (Brisou und Prevot, 1954; Rossau *et al.*, 1991). Bis heute wurden für diese Gattung über 50 verschiedene Spezies identifiziert (Harding *et al.*, 2018). Hierzu gehören sowohl nicht-pathogene Bodenbakterien, wie beispielsweise *Acinetobacter baylyi* (Bouvet und Grimont, 1986), *Acinetobacter calcoaceticus* (Bouvet und Grimont, 1986) oder *Acinetobacter radioresistens* (Pessione und Giunta, 1997), aber auch humanpathogene Bakterien, wie *A. baumannii* (Bouvet und Grimont, 1986), *Acinetobacter pittii* (Nemec *et al.*, 2011) oder *Acinetobacter nosocomialis* (Nemec *et al.*, 2011). Vier *Acinetobacter* Spezies, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* und *A. calcoaceticus*, sind phänotypisch kaum voneinander zu unterscheiden und wurden zu dem *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* Komplex (ACB-Komplex) zusammengefasst (Gerner-Smidt, 1992). Die Problematik ist besonders aus klinischer Sicht nicht zu unterschätzen, da die Unterscheidung, zwischen der nicht pathogenen Spezies *A. calcoaceticus* und den drei humanpathogenen Spezies auf Intensivstationen in Krankenhäusern von immenser Bedeutung ist (Howard *et al.*, 2012).

*A. baumannii* ist eines der prominentesten humanpathogenen Bakterien in der aktuellen Zeit. Die Fähigkeit dieses Organismus, über Monate auf trockenen Oberflächen, wie beispielsweise Türklinken, medizinischem Equipment, Kleidung oder Krankenhausbetten zu überdauern und die rasche Entwicklung von Antibiotikaresistenzen führten dazu, dass die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *A. baumannii* 2018 auf Platz eins der höchsten Kategorie „critical“ für pathogene Mikroorganismen wählte. Für diese mikrobiellen Erreger ist es von höchster Bedeutung, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln (Tacconelli *et al.*, 2018). Zudem wurde *A. baumannii* 2008 der Gruppe der ESKAPE-Organismen zugeordnet, welche sich auszeichnet durch multiresistente Erreger, die im häufigen Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen stehen. ESKAPE stellt hierbei ein Akronym da, gebildet aus den Anfangsbuchstaben der zugehörigen Gattungen (*Enterokokken*, *Staphylokokkus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacterales*) (Rice, 2008).

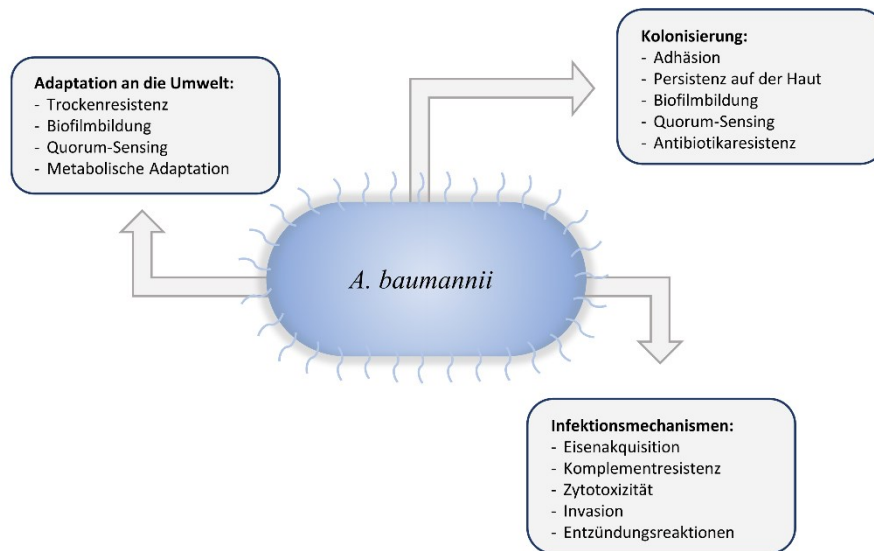
Im Menschen löst das opportunistisch pathogene Bakterium *A. baumannii* vor allem Infektionen der Atemwege, des Urinaltrakts und von Wunden aus, kann jedoch auch zu Pneumonien und Sepsis führen (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Vor allem immunsupprimierte Menschen nach längeren Operationen oder mit Vorerkrankungen sind hiervon betroffen (Montefour *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2008). Interessanterweise hat *A. baumannii* trotz seines Infektionserfolges im humanen Wirt nur eine geringe Anzahl von Virulenzfaktoren. Hierzu zählen einige Proteine der äußeren Membran, wie z. B. OmpA und Omp34, welche Apoptose im Wirt induzieren (Choi *et al.*, 2008; Rumbo *et al.*, 2014), OmpW mit einer Rolle in der Antibiotikaresistenz und der Eisenaufnahme (Huang *et al.*, 2015; Catel-Ferreira *et al.*, 2016) und SurA, dessen Rolle bislang unbekannt ist (Liu *et al.*, 2016). Weiterhin konnten verschiedene Sekretionssysteme (Typ I, II, VI, V und VI) in *A. baumannii* mit einer Rolle in der Virulenz identifiziert werden und die Kapsel des Gram-negativen Bakteriums (Morris *et al.*, 2019), sowie eine Reihe verschiedener Phospholipasen, deren Rolle im späteren Verlauf dieser Arbeit genauer erläutert wird (Stahl *et al.*, 2015; Fiester *et al.*, 2016). Die Übertragung von *A. baumannii* erfolgt durch den direkten oder indirekten Kontakt von Personen, aber auch über Aerosole (McConnell *et al.*, 2013). Hierbei geht eine besonders große Gefahr von den langen Überdauerungsperioden des Bakteriums auf trockenen Oberflächen aus, da eine Übertragung durch die Berührung von klinischem Equipment, Türklinken oder Kleidung über einen äußerst langen Zeitraum möglich ist (Zeidler und Müller, 2019). Die Behandlung erfolgt meist durch eine Therapie mit dem Antibiotikum Colistin, jedoch nimmt auch hier die Resistenz von *A. baumannii* gegenüber dieses „last resort antibiotic“ bedrohlich zu (Al-Sweih *et al.*, 2011). Gegenüber herkömmlichen Antibiotika der Klasse der Carbapenemen liegen in vielen Ländern die Resistenzen bereits bei über 50 % (Gogou *et al.*, 2011; Llaca-Díaz *et al.*, 2012). Diese beunruhigenden Fakten machen die Forschung nach alternativen Behandlungsmethoden und das Verstehen der Virulenzstrategien von *A. baumannii* besonders wichtig.

## **1.2. Adaptation von *A. baumannii* an den humanen Wirt und klinische Habitate**

Die Adaptation von humanpathogenen Mikroorganismen an wechselnde Umweltbedingungen und Nährstoffknappheit ist für den Erfolg des Bakteriums von enormer Bedeutung. Bei der Kolonisierung verschiedener Kompartimente im Menschen und der Krankenhausumgebung sind nicht immer perfekte Wachstumsbedingungen für Bakterien gegeben. Das Überdauern auf trockenen Oberflächen erfordert Anpassungsmechanismen, die ein Austrocknen der Zelle verhindern (Zeidler und Müller, 2019). Für das Überleben in Bereichen, in denen nicht immer

optimale Substrate, wie beispielsweise Zucker oder Komponenten des Citratsäurezyklus (TCA-Zyklus), vorhanden sind, müssen die Zellen auf alternative Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen zurückgreifen können. Dies setzt das Vorhandensein verschiedener Stoffwechselwege voraus (Peleg *et al.*, 2012). Um einer Eisenlimitierung entgegenzuwirken, brauchen diese Mikroorganismen Siderophore, die, selbst bei geringen Eisen-Konzentrationen, die Aufnahme von Eisen ermöglichen (McMahon *et al.*, 2007). Des Weiteren ist der Erfolg von humanpathogenen Bakterien stark abhängig von der Ausbildung direkter und indirekter Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen (Abb. 1) (Wu *et al.*, 2008).

*A. baumannii* ist optimal an den humanen Wirt, aber auch an klinische Habitate, mit geringer Wasseraktivität und limitiertem Nährstoffangebot angepasst. Metabolisch ist *A. baumannii* sehr versatil und kann eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen nutzen. Hierzu zählen unter anderem Aminosäuren, Zucker, Trimethylammonium-Komponenten, aromatische Verbindungen, Alkohole, Fettsäuren und viele mehr, die später detaillierter besprochen werden (Peleg *et al.*, 2012). Weiterhin hat *A. baumannii* bestimmte Aufnahmesysteme für die Akquirierung von Eisen im Wirt entwickelt. Obwohl Eisen zumeist in hohen Konzentrationen im Menschen vorkommt, ist die Aufnahme für Mikroorganismen an bestimmte zelluläre Prozesse geknüpft, da Eisen (III) unter oxischen Bedingungen eine geringe Löslichkeit zeigt und Eisen an Chelatoren, wie beispielsweise Häm oder Ferritin, gebunden ist. *A. baumannii* kann Eisen durch Siderophore aufnehmen, genauer: das Siderophor Acinetobactin oder Fimsbactin. Mit Hilfe dieser Eisen-Chelatoren kann *A. baumannii* Eisen aus der Umwelt aufnehmen (Yamamoto *et al.*, 1994; Sheldon und Skaar, 2020). Aber nicht nur Eisen (III) gilt als natürliche Eisenquelle für dieses Pathogen, über bestimmte Transportsysteme kann es ebenfalls Eisen (II) (Antunes *et al.*, 2011) und auch Häm (Zimbler *et al.*, 2009) als Eisenspeicher aufnehmen. Neben der metabolischen Diversität und der Eisenaufnahmesysteme spielen bei der Adaptation an den humanen Wirt auch die Ausbildung von Biofilmen (López-Martín *et al.*, 2021) und die Adhäsion an eukaryotische Zellen (Zarrilli, 2016) sowie die bemerkenswert gute Entwicklung von Antibiotikaresistenzen eine große Rolle. Dabei wird davon ausgegangen, dass bei der Akquirierung von Resistenzgenen die natürliche DNA-Aufnahme, z. B. durch die natürliche Transformation oder Konjugation, eine Rolle spielt (Naiemi *et al.*, 2005).

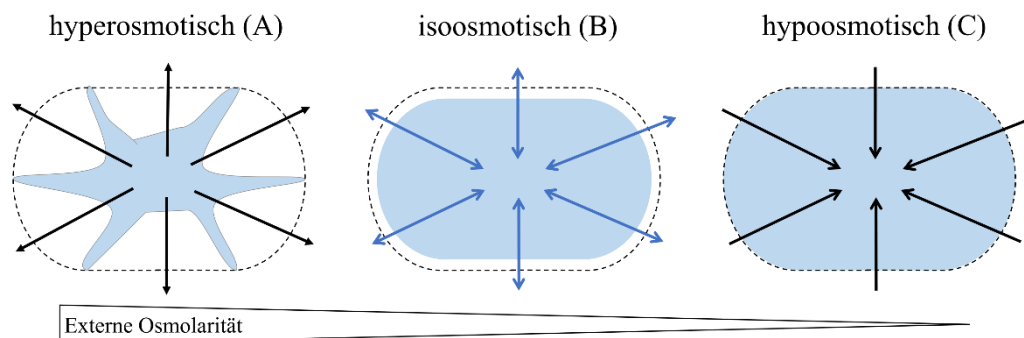


**Abb. 1. Adaptationsstrategien von *A. baumannii* an den menschlichen Wirt und seine Umgebung.** Für weitere Informationen s. Kapitel 1.2. Die Infektionsmechanismen werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert. Abbildung angelehnt an die Abbildung im DFG Forschergruppenantrag „FOR 2251“.

### 1.3. Adaptationsmechanismen von *A. baumannii* an trockene oder hyperosmotische Bedingungen

Eine weitere Strategie für die Anpassung an den humanen Wirt und die Krankenhausumgebung ist die überaus hohe Resistenz gegenüber hohen Salzkonzentrationen, die insbesondere bei Harnwegsinfektionen von Vorteil ist, und die hohe Resistenz gegenüber geringer Wasseraktivitäten, wie sie z. B. auf trockenen Oberflächen vorherrschen (Jawad *et al.*, 1996; Wendt *et al.*, 1997). Da diese Adaptionsmechanismen auch in dieser Arbeit behandelt werden, wird hierauf im Folgenden genauer eingegangen. Bakterien nutzen für die Adaptation an unterschiedliche Osmolaritäten in der Umgebung verschiedene Mechanismen, um dem unkontrollierten Wasser In- oder Efflux entgegen wirken zu können. Eine Kontrolle des intrazellulären Wasserhaushaltes über Wassertransportsysteme oder Kanäle ist bis heute nicht bekannt (Kempf und Bremer, 1998; Wood, 1999; Bremer und Krämer, 2000; Wood *et al.*, 2001; Cronan, 2003; Altendorf *et al.*, 2009; Bremer und Krämer, 2019). In der Natur kann man zwischen drei verschiedenen osmotischen Zuständen unterscheiden (Abb. 2): 1. hyperosmotische Bedingungen, unter denen die extrazelluläre Konzentration an osmotisch aktiven Stoffen höher ist als im intrazellulären Raum; 2. isosmotische Bedingungen, bei denen die Konzentration der Osmolyte intra- und extrazellulär ausgeglichen ist und 3. hypoosmotische Bedingungen, bei denen in der Umgebung weniger osmotisch aktive Substanzen vorliegen als innerhalb der Zelle (Csonka, 1989; Galinski und Trüper, 1994; Roeßler und Müller, 2001; Oren,

2013; Booth, 2014). Diese Dysbalance in der intra- und extrazellulären Konzentration von Osmolyten unter hypo- oder hyperosmotischen Bedingungen wird durch einen raschen Wasser Ein- bzw. Ausstrom ausgeglichen, da die Zellmembran semipermeabel und damit durchlässig für Wassermoleküle ist, nicht jedoch für andere Substanzen (Wood, 1999; Spitzer und Poolman, 2009). Dieser Wasserinflux bei niedrigen extrazellulären Konzentrationen an Osmolyten sorgt für einen drastischen Anstieg des zellulären Turgors, wodurch die Zellen zu platzen drohen (Booth und Blount, 2012; Booth, 2014; Cox *et al.*, 2018). Der rapide Wasserefflux unter hyperosmotischen Bedingungen hingegen hat die entgegengesetzte Wirkung: der Zellturgor bricht ein und das Zellvolumen sinkt, wodurch zelluläre Prozesse beeinträchtigt sind und die Zelle austrocknet (Bremer und Krämer, 2000; Wood, 2011).



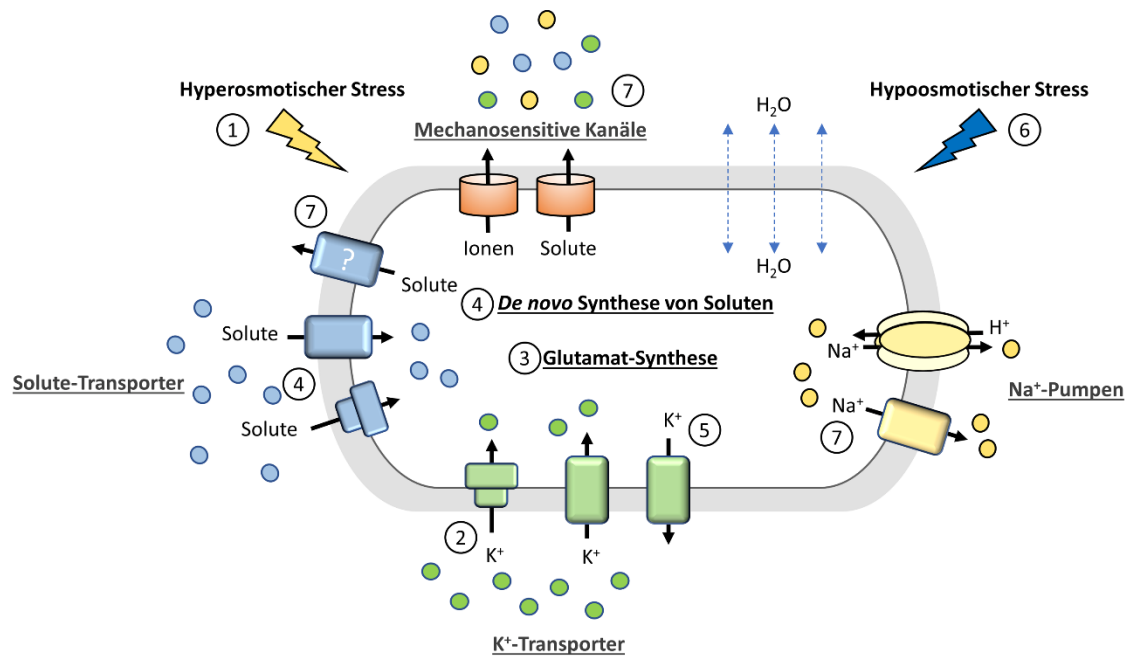
**Abb. 2. Schematische Darstellung des Wasserstroms entlang des Konzentrationsgradienten der Membran unter hyperosmotischen (A), isoosmotischen (B) und hypoosmotischen (C) Bedingungen.** Die schwarzen Pfeile stellen den Wasserstrom primär in eine Richtung dar und die blauen Pfeile einen ausgeglichenen Wasserein- und -ausstrom. Unter hyperosmotischen Bedingungen, also bei einer hohen externen Osmolarität, strömt das Wasser aus der Zelle und der Turgor bricht zusammen, wodurch sich die Zelle zusammenzieht und der cytoplasmatische Raum sich verkleinert. Unter isoosmotischen Bedingungen ist der Wasserstrom entlang der Membran ausgeglichen und der Turgor ist optimalen. Unter hypoosmotischen Bedingungen, wenn die externe Osmolarität besonders gering ist, strömt Wasser in die Zelle und der Turgor erhöht sich dramatisch, sodass das Volumen des Cytoplasmas ansteigt und die Zelle zu platzen droht (Breisch, 2017).

Um dieser unkontrollierten Wasserdiffusion entgegenzuwirken, haben Mikroorganismen eine Reihe von Strategien entwickelt. Zwei der bekanntesten Taktiken, solchen harschen Bedingungen Stand zu halten, sind zum einen die „Salz-in-Cytoplasma“-Strategie und zum anderen die Akkumulation von kompatiblen Soluten. Bei der „Salz-in-Cytoplasma“-Strategie wird KCl in molaren Konzentrationen im Cytoplasma akkumuliert. Zumeist wird diese Strategie von halophilen Mikroorganismen genutzt. Hierbei müssen alle zellulären Prozesse an Hochsalz-Bedingungen angepasst sein (Galinski und Trüper, 1994; Epstein, 2003; Gunde-



Cimerman *et al.*, 2018). Die weiter verbreitete Methode in allen drei Domänen des Lebens ist die Akkumulation von kompatiblen Soluten. Diese Solute oder ihre Vorläufer werden entweder über die intrazelluläre *de novo*-Synthese oder über die direkte Aufnahme durch spezifische Transporter aus der Umwelt akkumuliert (Roessler und Müller, 2001; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Kompatible Solute sind kleine, lösliche Substanzen, die selbst in hohen Konzentrationen nicht mit dem zellulären Metabolismus interferieren – kurz: kompatibel mit dem Stoffwechsel der Zelle sind (Kempf und Bremer, 1998; Bremer und Krämer, 2000; Wood *et al.*, 2001; Burg und Ferraris, 2008; Empadinhas und da Costa, 2008). Diese Solute erhalten unter hyperosmotischen Bedingungen das Zellvolumen und stabilisieren die Proteine, Membranen und den Zellturgor, wodurch nur ausgewählte Stoffe als kompatible Solute in Frage kommen (Arakawa und Timasheff, 1985; Record *et al.*, 1998; Yancey, 2005; Ignatova und Gierasch, 2006; Street *et al.*, 2006; Rösigen, 2007; Capp *et al.*, 2009). Hierzu zählen zumeist Zucker (Trehalose), Polyole (Mannitol), Aminosäuren (Glutamat) und deren Derivate (Ectoin) sowie Trimethylammoniumverbindungen (Glycinbetain) (Empadinhas und da Costa, 2008).

Auch *A. baumannii* nutzt diese Strategie zur Anpassung an wechselnde Osmolaritäten in der Umwelt (Zeidler *et al.*, 2017; Zeidler *et al.*, 2018; Zeidler und Müller, 2018; 2019; Breisch und Averhoff, 2020; König *et al.*, 2020; Breisch *et al.*, 2021) (Abb. 3). Bei hohen Konzentrationen von Osmolyten in der extrazellulären Umgebung kommt es in einem ersten Schritt zum Import von Kaliumionen, um möglichst schnell die intra- und extrazelluläre Dysbalance auszugleichen (König *et al.*, 2020). Des Weiteren wird Glutamat akkumuliert, als Gegenion zu den positiv geladenen Kaliumionen (Dinnbier *et al.*, 1988; Booth und Higgins, 1990; Whatmore *et al.*, 1990; Kempf und Bremer, 1998). Dieser schnelle Anstieg der intrazellulären  $K^+$ -Konzentration führt zur Aktivierung von kompatiblen Solute-Transportern und anderer zellulärer Prozesse für die Adaptation an diese Bedingungen, wie es bereits für *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* gezeigt wurde (Booth und Higgins, 1990; Csonka und Epstein, 1996; Epstein, 2003; Lee und Gralla, 2004; Gralla und Vargas, 2006). Anschließend kommt es zu einem Export der  $K^+$ -Ionen und kompatible Solute werden akkumuliert (König *et al.*, 2020). Unter hypoosmotischen Bedingungen, wenn die externe Osmolarität abnimmt, können diese akkumulierten kompatiblen Solute über mechanosensitive Kanäle exportiert werden, wodurch sich die Konzentration an Osmolyten in der Zelle verringert und ein Wassereinstrom verhindert wird (Berrier *et al.*, 1992; Levina *et al.*, 1999; Booth und Blount, 2012; Booth, 2014). Spezifische Exporter für kompatible Solute sind bislang nicht beschrieben. Für *A. baumannii* wurden bis heute weder Exporter noch mechanosensitive Kanäle für die schnelle Reduktion der Konzentration kompatibler Solute identifiziert (Abb. 3).



**Abb. 3. Adaptationsmechanismen von *A. baumannii* an osmotischen Stress.** Bei einem Anstieg der externen Osmolarität (1) nimmt *A. baumannii* in einem ersten Schritt Kaliumionen über spezifische primär aktive oder sekundär aktive Transporter auf (2). Der plötzliche Anstieg der Konzentration an positiven Kaliumionen im Cytoplasma führt zu der Akkumulation von negativ geladenen Glutamationen als Gegenion (3). Des Weiteren induziert die hohe Kalium-Konzentration in der Zelle die Aufnahme oder *de novo* Synthese von kompatiblen Soluten, wie Glycinbetain, Trehalose oder Mannitol (4). Während der Akkumulation dieser kompatiblen Solute kommt es zu einem Export der Kaliumionen, sodass im Cytoplasma primär kompatible Solute zum Ausgleich der hohen Konzentration an osmotisch aktiven Substanzen in der Umwelt vorliegen (5). Kommt es nun zu einer schnellen Verringerung der externen Osmolarität, sodass hypoosmotische Bedingungen vorliegen (6), werden die akkumulierten kompatiblen Solute und zusätzlich im Cytoplasma vorliegende Ionen rasch in den extrazellulären Raum entlassen (7). Hierbei spielen mechanosensitive Kanäle eine wichtige Rolle, aber auch spezifische Exporter für Natrium- oder Kaliumionen. Exporter für kompatible Solute konnten bis heute nicht beschrieben werden (Zeidler und Müller, 2019; Breisch und Averhoff, 2020; König *et al.*, 2020; 2021).

#### 1.4. Die *de novo*-Synthese von kompatiblen Soluten in *A. baumannii* ATCC 19606

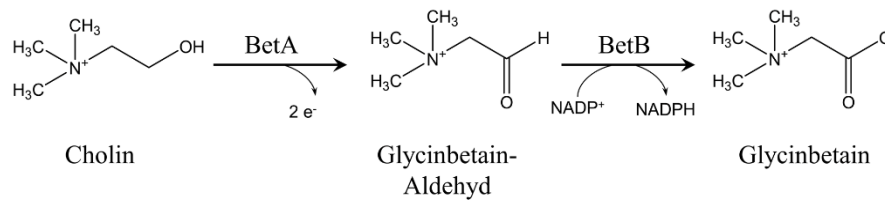
Wie bereits zuvor beschrieben, erfolgt die finale Adaptation an hyperosmotische Bedingungen in *A. baumannii* über die Akkumulation von kompatiblen Soluten (Zeidler *et al.*, 2017; Zeidler *et al.*, 2018; Zeidler und Müller, 2018; 2019; Breisch und Averhoff, 2020; König *et al.*, 2020; Breisch *et al.*, 2021). *A. baumannii* kann kompatible Solute sowohl intrazellulär *de novo* synthetisieren oder direkt über spezifische Transporter aus der Umwelt aufnehmen (Zeidler und Müller, 2018; 2019; Breisch und Averhoff, 2020; Breisch *et al.*, 2021). Hierbei ist die direkte Aufnahme aus energetischen Gründen bevorzugt (Oren, 1999; Zeidler und Müller, 2019),

jedoch ist die Abundanz dieser Solute in der Umwelt wechselnd, wodurch die *de novo* Synthese ebenfalls essenziell ist. Unter hyperosmotischen Bedingungen und in Abwesenheit des kompatiblen Solute Glycinbetain oder seines Vorläufers Cholin synthetisiert *A. baumannii* Glutamat, Mannitol und Trehalose (Zeidler *et al.*, 2017; Zeidler *et al.*, 2018). Die Synthese von Mannitol und Trehalose ist bereits gut untersucht. Mannitol wird über Mannitol-1-Phosphat aus Fruktose-6-Phosphat durch das bifunktionelle Enzym MtlD gebildet. Die MtlD ist eine Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase/Phosphatase, welche ausschließlich in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen aktiv ist. Hier induzieren hohe Salzkonzentrationen die Dimerisierung des Enzyms, wodurch die Dehydrogenase- und Phosphatase-Aktivität stimuliert wird (Tam *et al.*, 2022). Aber nicht nur auf enzymatischer Ebene wird dieses Enzym reguliert, auch die Expression des Gens ist abhängig von der Salzkonzentration und von der Glycinbetain- oder Cholin-Konzentration (Zeidler *et al.*, 2018). Ähnliches konnte ebenfalls für die Enzyme der Trehalose-Biosynthese festgestellt werden. Trehalose wird über die Enzyme OtsA und OtsB gebildet, wobei OtsA, eine Trehalose-6-Phosphat-Synthase, UDP-Glukose und Glukose-6-Phosphat zu Trehalose-6-Phosphat umwandelt und OtsB, eine Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase, anschließend Trehalose-6-Phosphat zu Trehalose dephosphoryliert (Giæver *et al.*, 1988; Hubloher *et al.*, 2020). Die gleichnamigen Gene *otsA* und *otsB* werden ausschließlich unter hyperosmotischen Bedingungen oder unter Hitzestress (Wachstum bei 45 °C) exprimiert. Eine Inhibierung der Expression in Anwesenheit anderer kompatibler Solute konnte allerdings nicht beschrieben werden (Zeidler *et al.*, 2017). Diese strikte Regulation, sowohl auf Expressionsebene als auch auf Aktivitätsebene, ist essenziell für die Sicherstellung, dass bei Anwesenheit anderer Solute die energetisch kostspielige *de novo*-Synthese nicht stattfindet und damit unter solch harschen Bedingungen möglichst viel Energie gespeichert wird (Oren, 1999; Zeidler und Müller, 2019). Die Synthese von Glutamat wurde bis heute in *A. baumannii* noch nicht genauer charakterisiert. Aus bioinformatischen Analysen konnten zwei mögliche Synthesewege postuliert werden: entweder über eine Glutamat-Dehydrogenase oder über die beiden Enzyme Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase. Nachdem für beide Synthesewege alle Gene im Genom identifiziert werden konnten, sind weitere experimentelle Studien nötig, um zu klären, ob beide Glutamat-Synthesewege ablaufen (Zeidler und Müller, 2019).

### 1.5. Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain

Kompatible Solute müssen nicht unbedingt vollständig neu synthetisiert oder direkt aus der Umwelt aufgenommen werden, es können auch Vorläufersubstanzen aus der Umwelt aufgenommen werden und diese anschließend in der Zelle zu den kompatiblen Soluten umgewandelt werden (Robinson und Roberts, 1997; Sand *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, 2016). Ein Beispiel hierfür ist die Aufnahme von Cholin. Cholin ist eine Trimethylammoniumverbindung, welche in die Zelle transportiert wird und anschließend über Glycinbetain-Aldehyd zu Glycinbetain oxidiert wird (Gadda und McAllister-Wilkins, 2003; Sand *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, 2016). Bis heute sind vier Enzym-Systeme bekannt, die diese Oxidationsreaktion katalysieren: eine cytoplasmatische Typ-III-Alkohol-Dehydrogenase, welche die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain-Aldehyd katalysiert im Zusammenspiel mit einer Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase, welche anschließend Glycinbetain-Aldehyd zu Glycinbetain umwandelt, wie beispielsweise in *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996); eine lösliche Cholin-Oxidase, welche zumeist beide Oxidationsschritte katalysiert, wie in *Arthrobacter globiformis* (Ikuta *et al.*, 1977); eine lösliche Cholin-Monooxygenase im Zusammenspiel mit einer Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase, wie häufig in Pflanzen (Rathinasabapathi *et al.*, 1997) oder eine Membran-assoziierte Cholin-Dehydrogenase in Kombination mit einer löslichen Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase, wie in *E. coli* und *P. aeruginosa* (Landfald und Strøm, 1986; Russell und Scopes, 1994).

Auch in *A. baylyi* wurde die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain bereits gut untersucht (Scholz *et al.*, 2016). Cholin wird über die Cholin-Dehydrogenase BetA zu Glycinbetain-Aldehyd oxidiert und anschließend über die Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase BetB weiter zu Glycinbetain umgewandelt, wodurch zwei NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert werden (Abb. 4) (Scholz *et al.*, 2016). Der Elektronenakzeptor der Cholin-Dehydrogenase BetA ist bis heute unbekannt und die Lokalisation des Enzyms wurde noch nicht analysiert. Im Genom von *A. baylyi* liegen die Gene für die Oxidation von Cholin in einem Operon und unter der Kontrolle eines transkriptionellen Regulators der TetR-Familie, BetI. Dieser Repressor reprimiert die Expression des *betIBA*-Operons in Abwesenheit von Cholin und NaCl, wobei die Anwesenheit von NaCl jedoch nur zu einer geringen Zunahme des Transkriptes führt und nicht generell die Expression induziert (Scholz *et al.*, 2016). Für den engen Verwandten *A. baumannii* konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass Cholin zu einer erhöhten Salztoleranz führt und die Gene des *betIBA*-Clusters wie die Gene in *A. baylyi* organisiert sind (Scholz *et al.*, 2016; Breisch und Averbhoff, 2020). Dies indiziert, dass Cholin von *A. baumannii* ebenfalls über BetA und BetB zu Glycinbetain oxidiert wird.



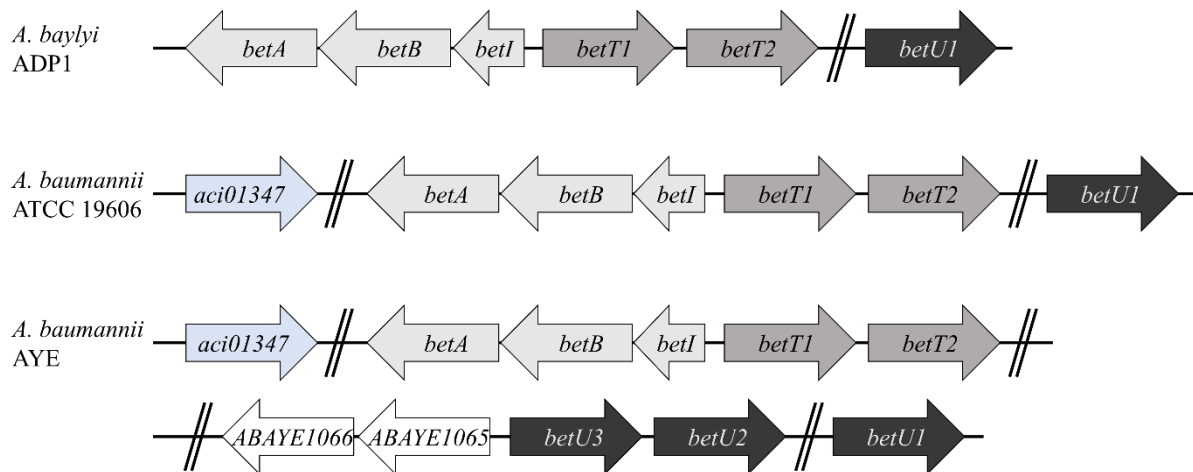
**Abb. 4. Biosynthese von Glycinbetain aus Cholin in *A. baylyi*.** Für weitere Erklärungen, siehe Text. BetA: Cholin-Dehydrogenase, BetB: Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase.

## 1.6. Die Aufnahme von kompatiblen Soluten

Die Aufnahme von kompatiblen Soluten erfolgt sowohl über primär aktive Transporter als auch über sekundär aktive Transporter (Kempf und Bremer, 1998; Bremer und Krämer, 2000; Wood *et al.*, 2001; Altendorf *et al.*, 2009; Krämer, 2009; Hoffmann und Bremer, 2017). Primär aktive Transporter, wie beispielsweise die der Familie der „ATP-Binding-Cassette“ (ABC)-Transporter, transportieren ihre Substrate unter direktem Energieverbrauch. Hierbei werden zwei ATP für die Aufnahme eines Substratmoleküls hydrolysiert (Lycklama *et al.*, 2018). Gut untersucht wurde diese Transporterfamilie in Bezug auf die Aufnahme von kompatiblen Soluten bereits in *B. subtilis*, wobei OpuA essenziell für die Aufnahme von Glycinbetain und Prolin-Betain ist, OpuB die Vorläufer für Glycinbetain, Cholin und Glycinbetain-Aldehyd transportiert und OpuC ein sehr breites Substratspektrum von unter anderem Ectoin, Carnitin und Glycinbetain hat (Hoffmann und Bremer, 2017). Ebenfalls gut untersucht in *B. subtilis* ist der sekundär aktive Transporter OpuE, welcher zu der Transporterfamilie der „Natrium-Solute-Symporter“ (SSS) gehört und der ausschließlich Prolin transportiert (Hoffmann und Bremer, 2017).

Eine weitere Superfamilie von Transportern für die Aufnahme von kompatiblen Soluten sind die sekundär aktiven Betain/Cholin/Carnitin-Transporter (BCCT) (Ziegler *et al.*, 2010). Diese Transporterfamilie spielt die größte Rolle bei der Aufnahme von kompatiblen Soluten in *A. baumannii* (Breisch *et al.*, 2018; Breisch und Averhoff, 2020). Im Genom von verschiedenen *Acinetobacter* Spezies sind unterschiedlich viele BCCT-Gene vorhanden. Während nicht virulente Spezies drei unterschiedliche BCCT besitzen, nimmt die Anzahl der Transporter mit steigender Virulenz zu. *A. baylyi*, ein Bodenbakterium, besitzt zwei Cholin-spezifische Transporter, BetT1 und BetT2 und einen Glycinbetaintransporter, ACIAD3460 (BetU1). In *A. baumannii* ATCC 19606, dem Typ-Stamm mit geringer Virulenz, konnten ebenfalls diese zwei Cholin-spezifischen Transporter (BetT1 und BetT2), ein Glycinbetain-spezifischer (BetU1) und ein zusätzlicher, Carnitin-spezifischer BCCT (Aci01347) charakterisiert werden.

In dem klinischen Isolat *A. baumannii* AYE konnten zusätzlich zu den vier in *A. baumannii* ATCC 19606 detektierten BCCT zwei weitere Glycinbetaintransporter (BetU2 und BetU3) identifiziert werden (Abb. 5) (Breisch und Averhoff, 2020).



**Abb. 5. Organisation der Gene des Cholin-Oxidationsweges und der assoziierten BCCT-Gene in *A. baylyi* ADP1, *A. baumannii* ATCC 19606 und *A. baumannii* AYE.** Hellgrau hinterlegte Gene des *betIBA*-Clusters sind essenziell für die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain, dunkelgrau hinterlegte Gene sind Gene der Cholin-spezifischen BCCT, schwarz hinterlegte Gene sind Gene der Glycinbetain-spezifischen BCCT und blau hinterlegte Gene sind Gene der Carnitin-spezifischen Transporter. ABAYE1066 und ABAYE1065, kodieren für ein zweites potenzielles Cluster für die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain. Das Gen *ABAYE1066* ist als Aldehyd-Dehydrogenase und *ABAYE1065* als Cholin-Monooxygenase annotiert.

Glycinbetain-spezifische BCCT transportieren ihr Substrat meistens entgegen des Konzentrationsgefälles durch die Membranen im Symport mit  $\text{Na}^+$ -Ionen, wohingegen Cholin-spezifische BCCT den Vorläufer für Glycinbetain, häufig mit  $\text{H}^+$ -Ionen als Symporter transportieren. Carnitin wird zu meist von Substrat:Produkt-Antiportern mit  $\gamma$ -Butyrobetain transportiert (Ziegler *et al.*, 2010).

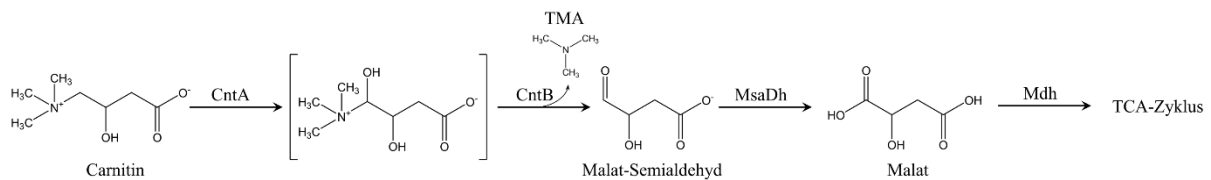
Die Aktivität der BCCT ist stark abhängig von der externen Osmolarität. BCCT haben unterschiedlich lange C-Termini, welche als Sensor für wechselnde osmotische Bedingungen fungieren. So sind BCCT mit einem langen C-Terminus zumeist Osmostress-abhängig und solche mit einem kurzen C-Terminus Osmostress-unabhängig (Tøndervik und Strøm, 2007; Chen und Beattie, 2008; Ziegler *et al.*, 2010). Auch für die BCCT aus *A. baumannii* konnte dies bereits gezeigt werden. Während die Transporter BetT1, Aci01347 und BetU3 einen kurzen C-Terminus haben und die höchste Aktivität unter isoosmotischen Bedingungen zeigen

(0,2 osmol/kg), ist die Aufnahme von Cholin oder Glycinbetain durch die Transporter BetT2 und BetU1 bei 0,6 osmol/kg und bei BetU2 bei 0,8 osmol/kg am effektivsten, korrespondierend mit einem langen C-Terminus (Breisch *et al.*, 2018; Breisch und Averhoff, 2020). Der C-Terminus interagiert unter isoosmotischen Bedingungen mit der Membran und verschließt so den Aufnahmekanal, während er sich unter hyperosmotischen Bedingungen von der Membran löst und den Kanal freigibt (Ziegler *et al.*, 2010). Die Frage nach der physiologischen Rolle des Osmostress-unabhängigen Cholintransporters BetT1 und des Osmostress-unabhängigen Glycinbetaintransporters BetU3 konnte allerdings bislang noch nicht geklärt werden. Der BCCT Aci01347 stellte sich in weiteren Versuchen als Carnitin-spezifischer Transporter heraus, wie zuvor beschrieben, und nicht als Cholintransporter (Breisch *et al.*, 2018). Da Carnitin nicht als kompatibles Solut für *A. baumannii* dient und bereits beschrieben wurde, dass diese Trimethylammoniumverbindung als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann (Zhu *et al.*, 2014), wurde davon ausgegangen, dass dieser BCCT keine Rolle in der Adaptation an trockene oder hyperosmotische Bedingungen spielt, sondern für die Nutzung von Carnitin als Kohlenstoffquelle wichtig ist.

### 1.7. Der Nutzen von kompatiblen Soluten als Kohlenstoffquelle

Bereits 1977 konnte gezeigt werden, dass *A. calcoaceticus* mit L-Carnitin als Kohlenstoffquelle wachsen kann (Kleber *et al.*, 1977). *A. calcoaceticus* weist hierbei einen ganz charakteristischen Abbauweg auf und unterscheidet sich damit beispielsweise von *E. coli*, der Carnitin primär unter anaeroben Bedingungen über Crotonobetain zu  $\gamma$ -Butyrobetain verstoffwechselt (Jung *et al.*, 1990b; Kleber, 1997; Meadows und Wargo, 2015). Bei der Nutzung von Carnitin als Kohlenstoffquelle von *A. calcoaceticus* bildet sich im Medium Trimethylamin (TMA), wodurch postuliert wurde, dass im ersten Schritt die C-N-Bindung im Carnitin angegriffen wird (Kleber *et al.*, 1977) und nicht, wie bekannt aus anderen Organismen, wie beispielsweise in *P. aeruginosa*, die Hydroxylgruppe des Carnitins durch eine Carnitin-Dehydrogenase oxidiert wird (Aurich und Kleber, 1970). Auch beim Abbau von Carnitin durch *A. baumannii* wird zunächst die C-N-Bindung gespalten. So konnten Zhu und Mitarbeiter 2014 ein spezifisches Gencluster identifizieren, das für eine Rieske-Oxygenase mit zugehöriger Reduktase (*cntAB*), eine potenzielle Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase (*msadh*), eine potenzielle Malat-Dehydrogenase (*mdh*), eine potenzielle Hydrolase (*hyd*) und dem entsprechenden BCCT (*aci01347*) kodieren (Zhu *et al.*, 2014). Aufgrund der abgeleiteten Genprodukte ließ sich der in Abb. 6 dargestellte Abbauweg für Carnitin postulieren. Allerdings ist bisher nur für CntAB

gezeigt, dass es sich um eine Oxidoreduktase handelt, welche Carnitin zu Malat-Semialdehyd und TMA umwandelt und die Funktion der weiteren Enzyme wurde ausschließlich postuliert. Carnitin kann entweder direkt aus der Umwelt aufgenommen werden (Breisch *et al.*, 2018) oder über das im Menschen häufig vorkommende Acetylcarnitin (Klepochova *et al.*, 2017), welches durch die Hydrolase zu Carnitin umgewandelt wird. Carnitin wird über die NADH-abhängige Rieske-Oxygenase und der dazugehörigen Reduktase dann zu Malat-Semialdehyd und TMA abgebaut und Malat-Semialdehyd wird anschließend über die Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase weiter zu Malat oxidiert, welches in den TCA-Zyklus eingespeist wird (Zhu *et al.*, 2014; Massmig *et al.*, 2020). Dies konnte bereits in den 60er Jahren auch für *Serratia marcescens* beschrieben werden (Unemoto *et al.*, 1966).



**Abb. 6. Postulierter Abbauweg für Carnitin in *A. baumannii*.** Für weitere Erklärungen, siehe Text. CntA: Rieske-Oxygenase, CntB: Reduktase, MsaDH: Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Mdh: Malat-Dehydrogenase, TMA: Trimethylamin.

Interessanterweise funktioniert die Rieske-Oxidoreduktase CntAB analog zu der Oxidoreduktase GbcAB aus *P. aeruginosa*, welche die Demethylierung von Glycinbetain katalysiert (Wargo *et al.*, 2008; Meadows und Wargo, 2015). Jedoch konnte für *A. baumannii* das Wachstum mit Glycinbetain oder seines Vorläufers Cholin als Kohlenstoffquelle nicht nachgewiesen werden, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass diese Oxidoreduktase hoch spezifisch für Carnitin ist und keine weiteren Trimethylammoniumverbindungen abbaut (Stahl *et al.*, 2015). Die Nutzung von Carnitin als Kohlenstoffquelle könnte zu einem metabolischen Vorteil von *A. baumannii* im humanen Wirt führen, da Carnitin im Menschen sehr abundant ist. In einem durchschnittlichen, 70 kg schweren Erwachsenen sind insgesamt ca. 100 mmol Carnitin nachweisbar. Hiervon sind 98 % in den Muskeln, 0,6 % in extrazellulären Flüssigkeiten und 1,6 % in der Leber und in der Niere zu finden (Engel und Rebouche, 1984). Darüber hinaus hat der Abbau von Carnitin zu TMA und Malat auch Konsequenzen für den humanen Wirt. Die Freisetzung von TMA während der Verstoffwechslung von Carnitin steht im direkten Zusammenhang mit der kardiovaskulären Gesundheit des Menschen. Das freigesetzte TMA wird in der Leber durch hepatische, Flavin-



abhängige Monooxygenasen zu Trimethylamin-N-oxid (TMAO) umgewandelt wird, welches äußerst toxisch für den Menschen ist (Koeth *et al.*, 2013; Tang und Hazen, 2014; Tang *et al.*, 2014; Miao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015b; Senthong *et al.*, 2016; Massmig *et al.*, 2020). Dementsprechend könnte die Umwandlung von Carnitin zu der Produktion des potenziellen sekundären Virulenzfaktors TMA führen.

### 1.8. Der Abbau von aromatischen Verbindungen

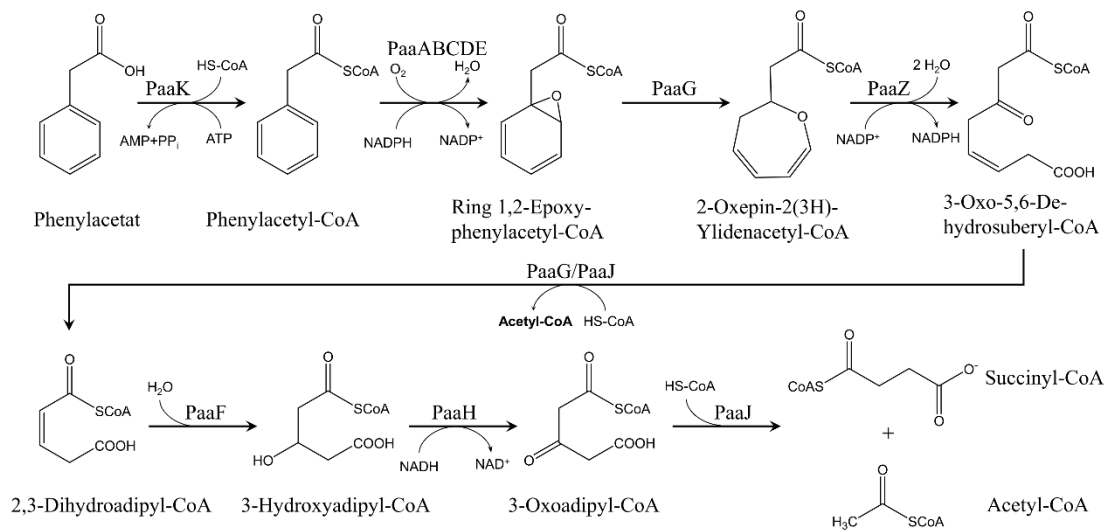
Aber nicht nur die Nutzung von Carnitin als Kohlenstoffquelle könnte für *A. baumannii* einen metabolischen Vorteil im humanen Wirt bieten. Auch die Nutzung von aromatischen Verbindungen als Wachstumssubstrate, die das Vorhandensein spezieller Abbauwege voraussetzt, die nicht in allen Vertretern des menschlichen Mikrobioms vertreten sind, könnte wichtig für die metabolische Adaptation von *A. baumannii* sein. Auf Grund der außerordentlich hohen Stabilität durch die delokalisierten  $\pi$ -Elektronen in aromatischen Verbindungen, sind für den Abbau spezielle Enzyme notwendig, die in einem ersten Schritt den aromatischen Ring des Substrates durch Hydroxylierung aktivieren (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010; Pieper *et al.*, 2010). Enzyme für die Aktivierung des aromatischen Ringes sind zumeist Oxygenasen drei verschiedener Klassen: Rieske-nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen (Gibson und Parales, 2000), Flavoprotein-Monooxygenasen (van Berkel *et al.*, 2006) und lösliche, eisenhaltige Multikomponenten-Oxygenasen (Leahy *et al.*, 2003). In einem zweiten Schritt wird der di- oder trihydroxylierte aromatische Ring durch Dioxygenasen gespalten (Perez-Pantoja *et al.*, 2012). Da einige Intermediate, die während des Abbaus von aromatischen Verbindungen gebildet werden, toxisch für die bakterielle Zelle sind, liegen die Gene für den Abbau von Aromaten meistens in einer transkriptionellen Einheit und unter der Kontrolle desselben Regulators (Parsek *et al.*, 1992; Schweigert *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002). Die am weitesten verbreiteten Gencluster für den Abbau von aromatischen Verbindungen sind hierbei das *paa*-Operon, das für den Phenylacetat-Stoffwechselweg kodiert (Teufel *et al.*, 2010), das *hmg*-Operon, das für den Homogentisat-Stoffwechselweg kodiert (Arias-Barrau *et al.*, 2004), das *gen*-Operon, das für den Gentisat-Stoffwechselweg kodiert (Chao und Zhou, 2013) und die beiden Gencluster *cat* und *pca*, die für die Enzyme des Catechol- und des Protocatechuat-Zweiges des  $\beta$ -Ketoacidatweges kodieren (Williams und Kay, 2008). In diese vier zentralen Abbauwege münden die meisten peripheren Stoffwechselwege, die für die Umsetzung von aromatischen Substraten zu den zentralen Intermediaten Phenylacetat, Homogentisat, Gentisat, Protocatechuat oder Catechol essenziell sind. Die Gene der peripheren Stoffwechselwege

liegen dabei oft in unmittelbarer Nähe zu den Genclustern der zentralen Abbauwege und stehen häufig unter der Kontrolle derselben Regulatoren (Williams und Kay, 2008; Pérez-Pantoja *et al.*, 2010; Perez-Pantoja *et al.*, 2012; Diaz *et al.*, 2013).

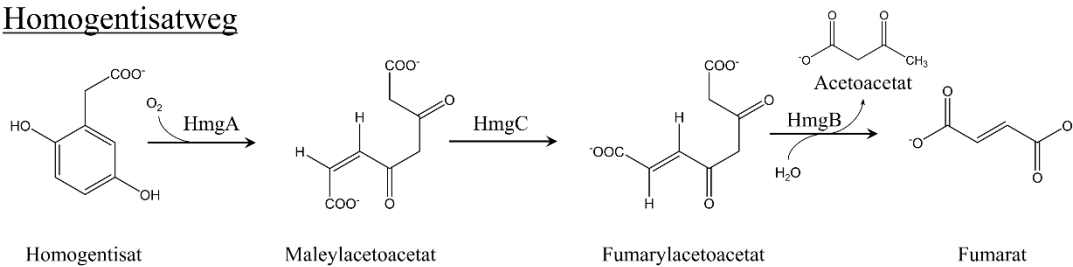
Der Phenylacetatweg ist wichtig für den Abbau von Phenylamin, Styren und Phenylacetaldehyd (Luengo *et al.*, 2001; Navarro-Llorens *et al.*, 2005; Erb *et al.*, 2008; Teufel *et al.*, 2010). Die jeweiligen Substrate werden über periphere Stoffwechselwege zu Phenylacetat umgewandelt und anschließend wird das Phenylacetat zu zwei Molekülen Acetyl-CoA und einem Molekül Succinyl-CoA verstoffwechselt (Abb. 7 A). Die entstehenden Produkte können dann direkt in den TCA-Zyklus eingespeist werden. Dieser Stoffwechselweg ist bereits in *A. baumannii* experimentell nachgewiesen worden (Cerqueira *et al.*, 2014) und steht in direktem Zusammenhang mit der Virulenz, da Phenylacetat als Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten wirkt und diese bei Akkumulation stimuliert. Der Abbau dieses Signalstoffes schützt das Pathogen demnach vor der Immunantwort des Menschen (Bhuiyan *et al.*, 2016).

In den Homogentisat-Weg gehen häufig aromatische Aminosäuren, wie beispielsweise Phenylalanin und Tyrosin, ein, wobei die Aminosäuren zu 4-Hydroxyphenylpyruvat umgewandelt werden und unmittelbar im Anschluss daran zu Homogentisat verstoffwechselt werden, durch die Fe<sup>2+</sup>-abhängige nicht-Häm-Eisen-Oxygenase, HppDO, wie z. B. in *Pseudomonas putida* gezeigt (Fitzpatrick, 2003; Arias-Barrau *et al.*, 2004). Homogentisat wird anschließend über den Homogentisatweg zu Fumarat und Acetoacetat umgesetzt, wie in Abb. 7 B dargestellt (Arias-Barrau *et al.*, 2004). Der Gentisatweg ist dem Homogentisatweg sehr ähnlich. Verschiedene polycyclische aromatische Verbindungen, 3-Hydroxybenzoat und einige phenolische Verbindungen, wie z. B. 3-Hydroxybenzoat oder Salicylsäure werden zu Gentisat abgebaut und anschließend zu Fumarat und Pyruvat umgewandelt (Abb. 7 C) (Poh und Bayly, 1980; Lee *et al.*, 2011; Tittabutr *et al.*, 2011; Chao und Zhou, 2013).

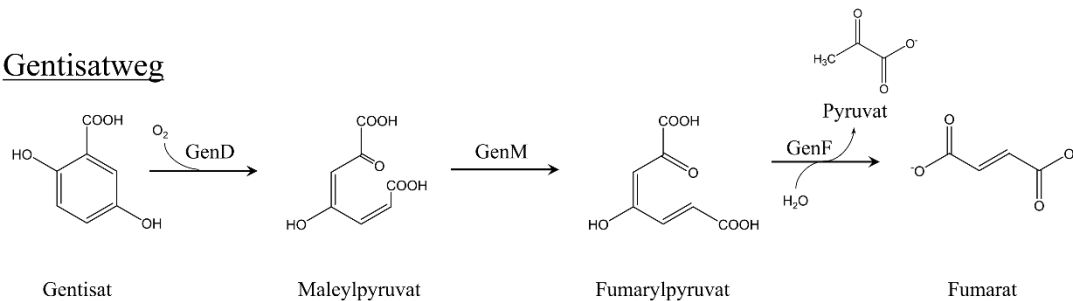
**A Phenylacetatweg**



**B Homogentisatweg**



**C Gentisatweg**

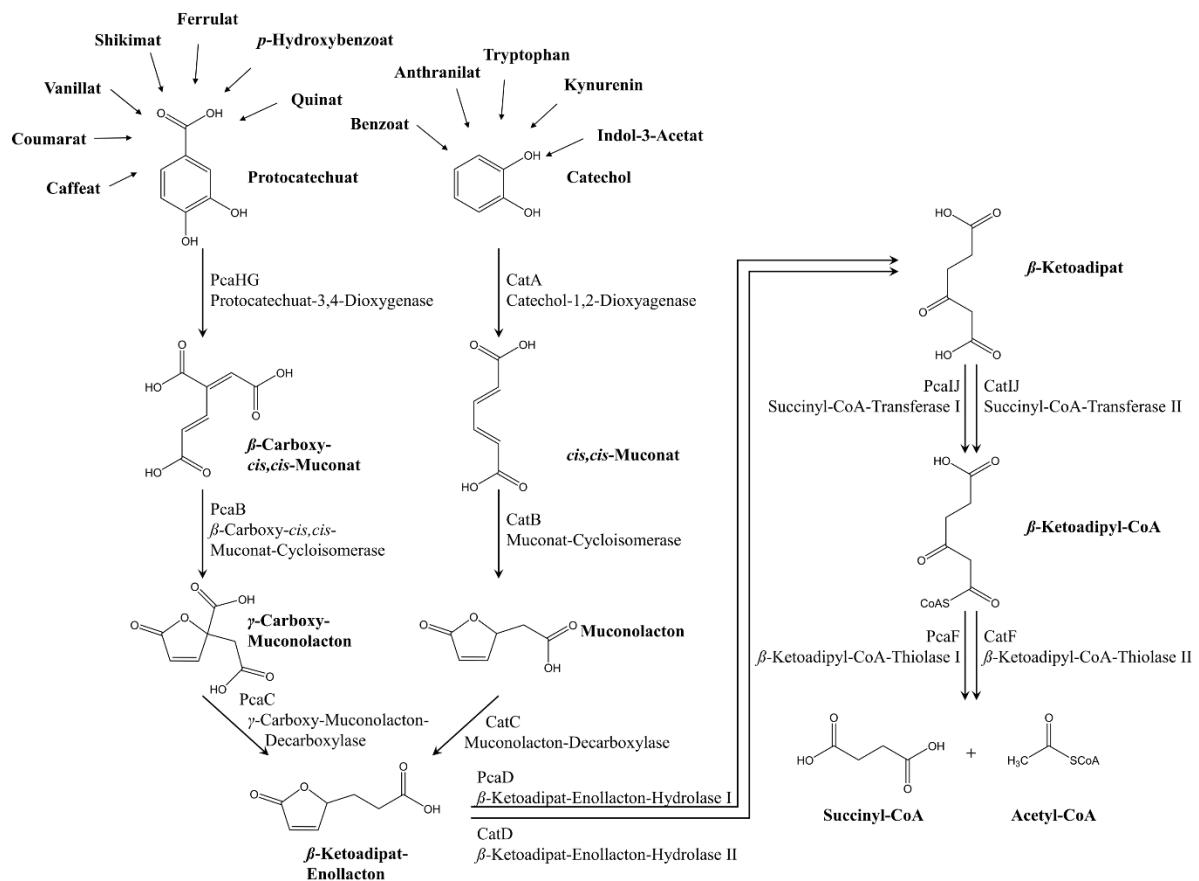


**Abb. 7. Zentrale Abbauwege für aromatische Verbindungen.** Dargestellt sind der Phenylacetatweg (A) aus *E. coli* (Teufel *et al.*, 2010), der Homogentisatweg (B) aus *P. putida* (Arias-Barrau *et al.*, 2004) und der Gentisatweg (C) aus *Corynebacterium glutamicum* (Chao und Zhou, 2013).

**1.8.1. Der  $\beta$ -Ketoacidweg**

Der  $\beta$ -Ketoacidweg ist der zentrale Abbauweg einer Vielzahl aromatischer Verbindungen und besteht aus zwei Zweigen, in die jeweils unterschiedliche Verbindungen münden (Williams und Kay, 2008). So werden phenolische Verbindungen, wie beispielsweise *p*-Hydroxybenzoat, eine Vielzahl von Ligninmonomeren oder *p*-Kresol zu Protocatechuat umgewandelt und andere aromatische Verbindungen, wie z. B. Anthranilat, Anilin, Benzoat, Phenol und auch

Tryptophan werden zu Catechol prozessiert (Harwood und Parales, 1996). Protocatechuat und Catechol werden dann anschließend über einen eigenen Zweig zu dem zentralen Intermediat  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton und über die  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton-Hydrolase weiter zu  $\beta$ -Keto adipat verstoffwechselt. Über eine Succinyl-CoA-Transferase wird das  $\beta$ -Keto adipat zu  $\beta$ -Keto adipyl-CoA umgesetzt, welches anschließend über die  $\beta$ -Keto adipyl-CoA-Thiolase zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA prozessiert wird, welches in den TCA-Zyklus eingespeist wird (Abb. 8) (Ornston und Stanier, 1966; Williams und Kay, 2008). Die spezifischen Reaktionsschritte des Abbaus von Protocatechuat und Catechol werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.



**Abb. 8. Der  $\beta$ -Keto adipatweg in *A. baylyi*.** Dargestellt sind die Intermediate und die beteiligten Enzyme des Abbaus von Protocatechuat, einschließlich der Abkürzungen der Genprodukte des *pca*-Operons und die Enzyme des Abbauweges von Catechol, einschließlich der Genprodukte des *cat*-Operons (Williams und Kay, 2008).

Der  $\beta$ -Ketoacidweg wurde bereits in einigen Organismen wie beispielsweise *P. putida* (Ornston und Stanier, 1966), *A. calcoaceticus* (Canovas und Stanier, 1967), *A. baylyi* (Williams und Kay, 2008), *Agrobacterium tumefaciens* (Parke und Ornston, 1986) und *Burkholderia cenocepacia* (Zylstra *et al.*, 1989b; a) sehr gut untersucht, jedoch gibt es nicht viele Studien zu *A. baumannii*. Die jeweiligen *pca*- und *cat*-Gencluster sind ebenfalls im Genom von *A. baumannii* vorhanden und mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte innerhalb einer Masterarbeit in unserer Arbeitsgruppe bereits die Funktion einiger Gene bestimmt werden (Huber, 2020). So wurde z. B. durch Mutantenstudien gezeigt, dass Benzoat über den Catechol-Zweig und *p*-Hydroxybenzoat über den Protocatechuat-Zweig des  $\beta$ -Ketoacidweges abgebaut werden. Die Produkte der Gene in *A. baumannii* haben sehr hohe Ähnlichkeiten zu den Enzymen des  $\beta$ -Ketoacidweges in *A. baylyi*, und es kann davon ausgegangen werden, dass sich der Stoffwechselweg in den beiden Organismen nicht grundlegend unterscheidet. Erwähnenswert hierbei ist allerdings, dass das Regulatorgen *pcaU*, dessen Genprodukt die Expression der Gene für die Nutzung von Protocatechuat aktiviert (Gerischer *et al.*, 1998) und welches in umgekehrter Orientierung unmittelbar vor dem *pca*-Gencluster liegt, in *A. baumannii* AYE 9,29 kb stromabwärts des Operons lokalisiert ist. Zwischen dem *pca*-Gencluster und *pcaU* befinden sich die Strukturgene für den Abbau von Quinat.

#### 1.8.1.1. Der Protocatechuat-Zweig

Wie bereits zuvor erwähnt, ist Protocatechuat eines der Hauptsubstrate des  $\beta$ -Ketoacidweges, aber es können auch weitere Substrate über periphere Stoffwechselwege zu Protocatechuat umgewandelt werden und anschließend über diesen Zweig in den zentralen Metabolismus eingespeist werden. So werden carboxylierte Säuren, wie z. B. *p*-Hydroxybenzoat, Vanillat oder Shikimat und Quinat, welche zu Dehydroshikimat umgesetzt werden, über drei verschiedene Wege zu Protocatechuat prozessiert (DiMarco *et al.*, 1993; Elsemore und Ornston, 1994; 1995; Segura *et al.*, 1999; Morawski *et al.*, 2000; Parke und Ornston, 2003; Smith *et al.*, 2003; Parke und Ornston, 2004). *p*-Hydroxybenzoat wird über die *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PobA), eine Flavoprotein-Monooxygenase, direkt zu Protocatechuat umgewandelt (Schreuder *et al.*, 1989; DiMarco *et al.*, 1993). Vanillat wird über eine Demethylase (VanAB), die aus zwei Untereinheiten besteht, zu Protocatechuat umgesetzt (Segura *et al.*, 1999; Morawski *et al.*, 2000). Quinat und Shikimat werden über die Genprodukte des *quiABC*-Operons zu Protocatechuat umgesetzt. Dabei wird Quinat mittels der Quinat-Dehydrogenase (QuiA) zu Dehydroquinat bzw. Dehydroshikimat oxidiert. Dehydroquinat wird

anschließend über die Dehydroquinat-Dehydratase (QuiB) weiter zu Dehydroshikimat umgewandelt, ebenso wie Shikimat, welches anschließend zu Protocatechuat durch die Dehydroshikimat-Dehydratase (QuiC) metabolisiert wird (Elsemore und Ornston, 1994; 1995). Über periphere Stoffwechselwege, die zum Intermediat Protocatechuat führen, werden ebenfalls Derivate der *p*-Hydroxymzimtsäure (Chlorogenat, Caffeat, Ferrulat und *p*-Coumarat) verstoffwechselt und das *hca*-Operon kodiert für die beteiligten Enzyme (Parke und Ornston, 2003; Smith *et al.*, 2003; Parke und Ornston, 2004). Chlorogenat wird über die Chlorogenat-Esterase (HcaG) zu Quinat und Caffeat gespalten (Smith *et al.*, 2003). Caffeat kann anschließend direkt weiter zu Protocatechuat umgewandelt werden, Ferrulat wird zu Vanillat metabolisiert und *p*-Coumarat wird durch eine Acyl-CoA-Ligase (HcaC), eine bifunktionelle Hydratase-Lyase (HcaA) und eine Aldehyd-Dehydrogenase (HcaB) zu *p*-Hydroxybenzoat prozessiert (Parke und Ornston, 2003; Smith *et al.*, 2003; Parke und Ornston, 2004).

Protocatechuat wird anschließend über drei Reaktionen zu dem gemeinsamen Metaboliten des Protocatechuat- und Catechol-Zweiges,  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton, abgebaut. PcaHG, die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, spaltet hierbei den aromatischen Ring und formt  $\beta$ -Carboxy-*cis,cis*-Muconat, welches dann über die  $\beta$ -Carboxy-*cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase (PcaB) zu  $\gamma$ -Carboxy-Muconolacton lactonisiert wird und weiter zu  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton decarboxyliert wird über die  $\gamma$ -Carboxy-Muconolacton-Decarboxylase (PcaC). Die weitere Umsetzung des  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton zu den Metaboliten des TCA-Zyklus, Succinyl-CoA und Acetyl-CoA erfolgt anschließend wie zuvor beschrieben (Abb. 8) (Williams und Kay, 2008).

### 1.8.1.2. Der Catechol-Zweig

Auch in den Catechol-Zweig des  $\beta$ -Keto adipatweges münden einige periphere Stoffwechselwege. So werden drei verschiedene carboxylierte Säuren: Benzoat, Anthranilat und Salicylat entweder über zwei Reaktionen oder direkt zu Catechol metabolisiert (Neidle *et al.*, 1987; Neidle *et al.*, 1991; Neidle *et al.*, 1992; Bundy *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Eby *et al.*, 2001; Karlsson *et al.*, 2002). Benzoat wird mittels der Genprodukte des *benABCD*-Operons zu 1,2-Dihydro-1,2-Dihydroxybenzoat umgewandelt und anschließend zu Catechol oxidiert. Diese Reaktionen werden durch die Rieske-[2Fe-2S]-Benzoat-Dioxygenase, BenABC und die 1,2-Dihydro-1,2-Dihydroxybenzoat-Dehydrogenase, BenD katalysiert (Neidle *et al.*, 1987; Neidle *et al.*, 1991; Neidle *et al.*, 1992). Zu Benzoat können aber auch die aromatischen Alkohole der Benzylester umgesetzt werden, katalysiert wird dies durch die Genprodukte des

*areABC*-Operons (Jones *et al.*, 1999). Die Esterase AreA formt hierbei aus dem Benzylester den Benzylalkohol, welcher weiter über die Benzylalkohol-Dehydrogenase AreB zu Benzaldehyd metabolisiert wird und anschließend mittels der Benzaldehyd-Dehydrogenase AreC zu Benzoat umgewandelt wird (Jones *et al.*, 1999). Anthranilat und Salicylat werden direkt durch die Rieske-Anthranilat-Dioxygenase AntABC (Bundy *et al.*, 1998) und die Flavoprotein-Monooxygenase Salicylat-1-Hydroxylase (SalA) (Jones *et al.*, 2000) zu Catechol metabolisiert. Über Salicylat können ebenfalls auch weitere aromatische Säuren der Benzylester über eine Esterase (SalE) in den Catechol-Zweig eingespeist werden.

Catechol wird dann anschließend über drei Reaktionen zu  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton abgebaut. Die Catechol-1,2-Dioxygenase CatA spaltet in einer ersten Reaktion den aromatischen Ring zu *cis,cis*-Muconat, welches weiter über die Muconat-Cycloisomerase (CatB) zu Muconolacton lactonisiert wird. Anschließend wandelt die Muconolacton-Isomerase (CatC) diesen Metaboliten zu  $\beta$ -Keto adipat-Enollacton um, welches weiter zu den Endprodukten des  $\beta$ -Keto adipatweges Succinyl-CoA und Acetyl-CoA wie zuvor beschrieben verstoffwechselt wird (Abb. 8).

### **1.9. Die Rolle der Phospholipasen bei der Adaptation von *A. baumannii* an den menschlichen Wirt**

Die Nutzung von verschiedenen Kohlenstoffverbindungen ist abhängig vom Vorhandensein der entsprechenden Enzyme und Stoffwechselwege. Essenzielle Enzyme, die an der Bereitstellung von gleich mehreren Substraten beteiligt sind, sind die Phospholipasen (Titball, 1998). Phospholipasen hydrolysieren Phospholipide und werden anhand der Hydrolyseposition am Phospholipid in vier verschiedene Klassen unterteilt: Patatin-ähnliche (PLP)-Phospholipasen, welche acetylierte Phospholipide unspezifisch schneiden, Phospholipasen A (PLA), welche Fettsäureketten am Glycerin hydrolysieren, Phospholipasen C (PLC), welche die phosphorylierte Kopfgruppe abschneiden und Phospholipasen D (PLD), welche essenziell für die Freisetzung von unphosphorylierten Kopfgruppen aus Phospholipiden sind (Titball, 1998).

Phospholipide *per se* können ebenfalls, wie aromatische Verbindungen oder Trimethylammoniumverbindungen, als Kohlenstoffquelle genutzt werden (Sun *et al.*, 2014). Hierbei können die Fettsäureketten des Lipids abgespalten und verstoffwechselt werden, wie es bereits für *A. baumannii* gezeigt werden konnte (Stahl *et al.*, 2015). Phosphatidylcholin, das

im Menschen am häufigsten vorkommende Phospholipid (50 % des Phospholipidgehaltes im Menschen, in Lungen-Epithelzellen sogar 80 % (Bernhard *et al.*, 2001; Vance, 2008)) kann von *A. baumannii* als Kohlenstoffquelle genutzt werden. In detaillierten Analysen konnte ebenfalls bestimmt werden, welche Komponente dieses Phospholipids als Wachstumssubstrat genutzt werden kann. Während *A. baumannii* in Anwesenheit von Glycerin oder Cholin keine Zunahme in der Zellzahl zeigte, wuchs es auf Palmitat, die am häufigsten vorkommende Fettsäure in Phosphatidylcholin, bis zu einer Zellzahl von  $5 \times 10^8$  Zellen/ml. Die essenzielle Phospholipase für die Nutzung der Fettsäureketten konnte bisher jedoch noch nicht identifiziert werden (Stahl *et al.*, 2015). Phosphatidylcholin kann aber nicht nur als Kohlenstoffquelle dienen. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Phospholipid unter hyperosmotischen Bedingungen als Cholin-Reservoir dient, welches dann den Vorläufer für das kompatible Solut Glycinbetain bereitstellt (Kiewietdejonge *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Fitzsimmons *et al.*, 2012; Sand *et al.*, 2013; Wargo, 2013a; Scholz *et al.*, 2016).

Auch bei der Akquirierung von Eisen spielen die Phospholipasen eine Rolle. Eisen liegt im Menschen zumeist intrazellulär gebunden an Hämin, Hämoglobin oder Ferritin vor und kann von nicht invasiven Bakterien im Wirt erst nach Lyse der Wirtszelle aufgenommen werden (Yeoh-Ellerton und Stacey, 2003; Fiester und Actis, 2013). Sowohl für PLCs als auch für PLDs konnte bereits eine destabilisierende Wirkung auf die Membran der Wirtszelle im Fall von *Vibrio cholerae* beschrieben werden (Stoebner und Payne, 1988). Hier wird die Lyse der Zelle durch die Phospholipasen initiiert und anschließend kann das Bakterium das freigesetzte Eisen aufnehmen. Lytische Phospholipasen, welche für die Lyse der Wirtszelle während der Akquirierung von Eisen essenziell sind, sind auch ein wichtiger Virulenzfaktor in Pathogenen. Nicht nur für die Phospholipasen aus *V. cholerae* konnte solch ein zytolytischer Effekt bereits gezeigt werden, gleiches konnte ebenfalls für die PLA von *S. marcescens* dokumentiert werden, welche sowohl einen Einfluss auf die hämolytische als auch zytolytische Aktivität des Bakteriums hat, genauso wie die PLC aus *Clostridium perfringens*. Hier führte die Deletion der PLC zu einer verminderten Zytotoxizität, Gewebszerstörung und Nekrose durch das Pathogen (Schmiel und Miller, 1999; Shimuta *et al.*, 2009). Auch für *A. baumannii* konnte gezeigt werden, dass die PLCs und die PLDs einen wichtigen Einfluss auf die Virulenz haben (Stahl *et al.*, 2015; Fiester *et al.*, 2016).

Im Genom von *A. baumannii* konnten vier verschiedene PLP-Phospholipasen, eine PLA, zwei Phosphatidylcholin-spezifische PLCs und drei verschiedene PLDs identifiziert werden (Stahl *et al.*, 2015; Fiester *et al.*, 2016). Während über die Rolle der PLP-Phospholipasen und der PLA nicht viel bekannt ist, konnten für die PLC1 und PLC2, wobei die PLC1 hierbei primär als



Virulenzfaktor beschrieben wurde, ein Einfluss auf die Infektion von *Galleria mellonella*-Larven gezeigt werden. Weiterhin spielen diese PLCs ebenfalls eine Rolle in der zytolytischen und zytotoxischen Aktivität von *A. baumannii*, die Invasionsfähigkeit in bronchial Epithelzellen und HeLa-Zellen sowie in der Serumresistenz (Camarena *et al.*, 2010; Fiester *et al.*, 2016). Des Weiteren konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Expression der PLC1 von Eisen und verschiedenen Stressfaktoren beschrieben werden, welche als generelle Induktoren von Virulenzfaktoren gelten (Fiester *et al.*, 2016). Und auch die PLDs spielen eine essenzielle Rolle in der Virulenz, so konnte in einer Dreifachmutante von *A. baumannii* ein signifikant verringerter Infektionserfolg in *G. mellonella*-Larven festgestellt werden und ein Einfluss auf die Invasion des Organismus in Lungen-Epithelzellen (Stahl *et al.*, 2015).

Die PLDs spielen nicht nur eine Rolle in der Virulenz von *A. baumannii*, sie sind auch essenziell für die Membranzusammensetzung (Pfefferle *et al.*, 2020). Die Membran von diesem Bakterium besteht aus insgesamt sechs verschiedenen Phospholipiden: Cardiolipin (CL), Monolysocardiolipin (MLCL), Phosphatidylethanolamin (PE), welche den Hauptteil der Phospholipide der Membran ausmachen, gefolgt von Phosphatidylglycerol (PG) und weiterhin in sehr geringen Konzentrationen zu finden sind Acyl-PG und Lyso-PE (Lopalco *et al.*, 2017). Während die Phospholipide PE, PG, Acyl-PG und Lyso-PE auch in Abwesenheit der PLDs in den Membranen von *A. baumannii* zu finden sind, konnten CL und MLCL in der  $\Delta pld123$ -Mutante nicht mehr detektiert werden (Pfefferle *et al.*, 2020). Da die Membranzusammensetzung im direkten Zusammenhang mit der Antibiotikaresistenz von Bakterien steht, kann spekuliert werden, dass die PLDs auch einen Einfluss auf die Ausbildung von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen haben (Sohlenkamp und Geiger, 2016). Hierzu ist bis heute allerdings noch nichts in *A. baumannii* bekannt.

### **1.10. Zielsetzungen dieser Arbeit**

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, weitere Einblicke in die Rolle der sekundär aktiven Solute-Transporter (BCCT) bei der Osmostressresistenz zu gewinnen. Darüber hinaus sollte die Rolle dieser Transporter bei der Adaptation von *A. baumannii* an den humanen Wirt aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte der Stoffwechselweg von Carnitin, seine Regulation und die Rolle dieses Stoffwechselweges bei der Virulenz aufgeklärt werden. Ein weiteres Ziel war die Klärung der Frage, ob der  $\beta$ -Ketoacidweg, der zentrale Abbauweg für Aromaten in *A. baumannii*, eine Rolle bei der Persistenz im humanen Wirt spielt. Außerdem sollte die Frage

geklärt werden, ob das in den Membranen von *A. baumannii* detektierte CL eine Rolle bei den Antibiotikaresistenzen und bei der Modulierung von Lipid A spielt.

Für die Analysen der Rolle der Glycinbetain- und Cholintransporter bei der Osmostressantwort sollte eine vierfache BCCT-Mutante in dem *A. baumannii*-Stamm ATCC 19606 erstellt werden und dessen Phänotyp in Wachstumsstudien unter Hochsalz analysiert werden. Des Weiteren sollte diese Mutante auf ihre Virulenz in *G. mellonella* überprüft werden. Die Frage, ob die BCCT eine Rolle bei der Persistenz im humanen Wirt spielen, sollten Wachstumsversuche in verschiedenen humanen Flüssigkeiten und Komplementresistenztest klären. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung der Gene, welche essenziell für die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain sind. Hierfür sollte eine markerlose Cholin-Dehydrogenase (*betA*)-Deletionsmutante erstellt werden und in Wachstumsstudien charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die Cholin-Dehydrogenase in *E. coli* überproduziert, aufgereinigt und das Enzym biochemisch charakterisiert werden.

Zur Aufklärung des Stoffwechselweges von Carnitin und seiner Regulation sollten Mutantenstudien durchgeführt werden. Hierfür sollten verschiedene markerlose Deletionsmutanten der potenziellen Strukturgene und des Regulatorgens erstellt und in Wachstumsstudien untersucht werden. Weiterhin sollte das Regulatorprotein überproduziert und aufgereinigt werden und in DNA-Bindestudien die Bindestelle des Regulators vor dem Carnitin-Cluster identifiziert werden. Darüber hinaus sollte durch *G. mellonella*-Infektionsstudien mit dem Wildtyp und Carnitin-Stoffwechselmutanten die Rolle von Carnitin bei der Virulenz von *A. baumannii* analysiert werden.

Die Rolle des  $\beta$ -Ketoacidweges bei der Adaptation von *A. baumannii* an den menschlichen Wirt und während der Ausbildung von Antibiotikaresistenzen des multiresistenten Pathogens sollte mit Hilfe von zuvor generierten Deletionsmutanten analysiert werden. Dafür sollte die bereits vorliegenden Mutanten des Catechol- und des Protocatechuat-Zweiges im Rahmen dieser Arbeit auf die Persistenz in humanem Blutserum mit aktivem Komplementsystem untersucht werden. Die Rolle des Abbauweges für Aromaten bei der Antibiotikaresistenz von *A. baumannii* sollte durch die Analyse der Überlebensrate dieser Mutanten in Anwesenheit aromatischer Antibiotika untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Organismen, Plasmide und Starteroligonukleotide

Die für diese Arbeit verwendeten Mikroorganismen und ihr zugehöriger Geno- bzw. Phänotyp sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1. Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp <sup>a</sup> bzw. Phänotyp <sup>b</sup>	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYAargF)U169, hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>-</sup>), λ<sup>-</sup></i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25 Δ(putPA)101 Δ(proP)2 Δ(proU)</i>	(Haardt <i>et al.</i> , 1995)
<i>E. coli</i> BL21 STAR <sup>TM</sup> (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Typstamm, isoliert aus menschlichem Urin	(Bouvet und Grimont, 1986)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>bcct</i>	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>betT1</i> (HMPREF0010_01463, <i>betT2</i> (HMPREF0010_01464), <i>aci01347</i> (HMPREF0010_01347) und <i>betU1</i> (HMPREF0010_03536)	Diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>aci01347</i>	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>aci01347</i> (HMPREF0010_01347)	(Breisch <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>mdh</i>	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>mdh</i> (HMPREF0010_01346)	Diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>hyd</i>	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>hyd</i> (HMPREF0010_01348)	(Breisch <i>et al.</i> , 2022b)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>betT1/betT2/aci01347</i>	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>betT1</i> (HMPREF0010_01463, <i>betT2</i> (HMPREF0010_01464), und <i>aci01347</i> (HMPREF0010_01347)	(Breisch und Averhoff, 2020)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Δ <i>carR</i>	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>carR</i> (HMPREF0010_01345)	Diese Arbeit

<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta betA$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>betA</i> (HMPREF0010_01461)	Diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta betI$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>betI</i> (HMPREF0010_01460)	Diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta lpxL$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>lpxL</i> (HMPREF0010_01807)	Diese Arbeit
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld1$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>pld1</i> (HMPREF0010_00607)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld2$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>pld2</i> (HMPREF0010_03706)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld3$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>pld3</i> (HMPREF0010_02731)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld12$	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>pld1</i> (HMPREF0010_00607) und <i>pld2</i> (HMPREF0010_03706)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld13$	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>pld1</i> (HMPREF0010_00607) und <i>pld3</i> (HMPREF0010_02731)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld23$	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>pld2</i> (HMPREF0010_03706) und <i>pld3</i> (HMPREF0010_02731)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta pld123$	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>pld1</i> (HMPREF0010_00607), <i>pld2</i> (HMPREF0010_03706) und <i>pld3</i> (HMPREF0010_02731)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 $\Delta plc12$	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>plc1</i> (HMPREF0010_03297) und <i>plc2</i> (HMPREF0010_00294)	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. baumannii</i> AYE	Typstamm, isoliert aus menschlichem Urin	(Poirel <i>et al.</i> , 2003)
<i>A. baumannii</i> AYE comMR	<i>A. baumannii</i> AYE mit deletierter AbaR-Resistenzinsel	(Godeux <i>et al.</i> , 2020)
<i>A. baumannii</i> AYE comMR $\Delta catA$	Markerlose Deletionsmutante in dem Gen <i>catA</i> (ABAYE1718)	(Breisch <i>et al.</i> , 2022a)
<i>A. baumannii</i> AYE comMR $\Delta pcaHG$	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>pcaH</i> (ABAYE1680) und <i>pcaG</i> (ABAYE1681)	(Breisch <i>et al.</i> , 2022a)

<i>A. baumannii</i> AYE comMR $\Delta$ <i>pcaHG/catA</i>	Markerlose Deletionsmutante in den Genen <i>catA</i> (ABAYE1718), <i>pcaH</i> (ABAYE1680) und <i>pcaG</i> (ABAYE1681)	(Breisch <i>et al.</i> , 2022a)
---	---	------------------------------------

<sup>a</sup> Genotypbezeichnungen: (Bachmann, 1990)

<sup>b</sup> Phänotypbezeichnungen: Kan<sup>r</sup>, Kanamycinresistenz; Amp<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz; *sacB*, Levansucrase

Die verwendeten Klonierungsvektoren und rekombinanten Plasmide sind den Tab. 2 bis Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 2. Verwendete Klonierungsvektoren

Vektor	Genotyp <sup>a</sup> bzw. Phänotyp <sup>b</sup>	Größe [Bp]	Referenz
pBAD/HisA	<i>araBAD</i> -Promotor; N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag; <i>araC</i> , Amp <sup>r</sup>	4102	Invitrogen
pBIISK_ <i>sacBkanR</i>	T7-Promotor, <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>lac</i> -Promotor, f1 Origin, Amp <sup>r</sup>	5364	(Stahl <i>et al.</i> , 2015)
pT7-7	T7-Promotor; ColE1-origin; Amp <sup>r</sup>	2488	(Tabor und Richardson, 1985)
pVRL1	<i>rrnB</i> -Terminator; Nickase-Gen; oriAb; <i>parE2</i> ; <i>paa2</i> ; ColE1-ori; <i>lac</i> -Promotor; <i>lacZ</i> $\alpha$ ; Gm <sup>r</sup>	7276	(Lucidi <i>et al.</i> , 2018)

<sup>a</sup> Genotypbezeichnungen: (Bachmann, 1990)

<sup>b</sup> Phänotypbezeichnungen: Kan<sup>r</sup>, Kanamycinresistenz; Amp<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz; *sacB*, Levansucrase; Gm<sup>r</sup>, Gentamycinresistenz

Tab. 3. Rekombinante Plasmide für die Erstellung markerloser Deletionsmutanten in *A. baumannii* ATCC 19606 und für die Komplementation von Mutanten

Vektor	Genotyp <sup>a</sup> bzw. Phänotyp <sup>b</sup>	Verwendete Schnittstellen	Referenz
pBIISK_ <i>sacB/kanR</i> _ <i>betU1</i>	pBIISK_ <i>sacBkanR</i> mit 1701 Bp stromauf- von <i>betU1</i> und 1719 Bp stromabwärts Bereich von <i>betU1</i> über <i>NotI</i> und <i>PstI</i> eingefügt	<i>NotI</i> , <i>PstI</i>	(Breisch und Aaverhoff, 2020)
pBIISK_ <i>sacB/kanR</i> _ <i>betA</i>	pBIISK_ <i>sacBkanR</i> mit 1613 Bp stromauf- und 1589 Bp stromabwärts Bereich von <i>betA</i> über <i>NotI</i> und <i>PstI</i> eingefügt	<i>NotI</i> , <i>PstI</i>	Diese Arbeit
pBIISK_ <i>sacB/kanR</i> _ <i>betI</i>	pBIISK_ <i>sacBkanR</i> mit 1556 Bp stromauf- und 1553 Bp stromabwärts Bereich von <i>betI</i> über <i>NotI</i> und <i>BamHI</i> eingefügt	<i>NotI</i> , <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pBIISK_ <i>sacB/kanR</i> _ <i>carR</i>	pBIISK_ <i>sacBkanR</i> mit 1288 Bp stromauf- und 1385 Bp stromabwärts Bereich von <i>carR</i> über <i>NotI</i> und <i>PstI</i> eingefügt	<i>XbaI</i> , <i>SacI</i>	Diese Arbeit
pBIISK_ <i>sacB/kanR</i> _ <i>mdh</i>	pBIISK_ <i>sacBkanR</i> mit 1559 Bp stromauf- und 1523 Bp stromabwärts Bereich von <i>mdh</i> über <i>NotI</i> und <i>PstI</i> eingefügt	<i>NotI</i> , <i>PstI</i>	Diese Arbeit
pBIISK_ <i>sacB/kanR</i> _ <i>lpxL</i>	pBIISK_ <i>sacBkanR</i> mit 1549 Bp stromauf- und 1653 Bp stromabwärts Bereich von <i>lpxL</i> über <i>NotI</i> und <i>PstI</i> eingefügt	<i>NotI</i> , <i>PstI</i>	Diese Arbeit
pVRL1_ <i>aci01347</i>	Gm <sup>r</sup> , <i>Aci01347</i> (HMPREF0010_01463) mit eigenem Promotor	<i>NotI</i> , <i>PstI</i>	Diese Arbeit

<sup>a</sup> Genotypbezeichnungen: (Bachmann, 1990)

<sup>b</sup> Phänotypbezeichnungen: Kan<sup>r</sup>, Kanamycinresistenz; Amp<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz; *sacB*, Levansucrase; Gm<sup>r</sup>, Gentamycinresistenz

Tab. 4. Rekombinante Plasmide für die heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli* BL21 STAR™ (DE3)

Vektor	Genotyp <sup>a</sup> bzw. Phänotyp <sup>b</sup>	Verwendete Schnittstellen	Referenz
pBAD/HisA_ <i>betT1</i>	Amp <sup>r</sup> , BetT1 (HMPREF0010_01463) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>SacI</i> , <i>HindIII</i>	(Breisch und Averhoff, 2020)
pBAD/HisA_ <i>betT2</i>	Amp <sup>r</sup> , BetT2 (HMPREF0010_01464) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>	(Breisch und Averhoff, 2020)
pBAD/HisA_ <i>betU1</i>	Amp <sup>r</sup> , BetU1 (HMPREF0010_03536) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>	(Breisch und Averhoff, 2020)
pBAD/HisA_ <i>aci01347</i>	Amp <sup>r</sup> , <i>Aci01347</i> (HMPREF0010_01347) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>	(Breisch <i>et al.</i> , 2018)
pBAD/HisA_ <i>betU2</i>	Amp <sup>r</sup> , BetU2 (ABAYE1063) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>	(Breisch und Averhoff, 2020)
pBAD/HisA_ <i>betU3</i>	Amp <sup>r</sup> , BetU3 (ABAYE1064) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>XhoI</i> , <i>PstI</i>	(Breisch und Averhoff, 2020)
pBAD/HisA_ <i>carR</i>	Amp <sup>r</sup> , CarR (HMPREF0010_01345) mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	<i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>	Diese Arbeit
pT7-7_ <i>betA_his</i>	Amp <sup>r</sup> , BetA (HMPREF0010_01461) mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	Gibson	(Breisch <i>et al.</i> , 2021)

<sup>a</sup> Genotypbezeichnungen: (Bachmann, 1990)

<sup>b</sup> Phänotypbezeichnungen: Amp<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz

Die verwendeten Starteroligonukleotide sind in den Tab. 5 bis Tab. 9 in 5'-3'-Richtung aufgelistet. Komplementäre Basen sind großgeschrieben, die Restriktionsschnittstellen kursiv und unterstrichen und die zusätzlich hinzugefügten Basen sind kleingeschrieben. Alle verwendeten Starteroligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) bestellt.

Tab. 5. Verwendete Starteroligonukleotide für die Erstellung der Konstrukte zur markerlosen Mutagenese

Name	Sequenz 5' → 3' Richtung	Verwendungszweck	Schnittstelle	Zielsequenz
<i>carR</i> _up_for_ _XbaI	<i>gacttctaga</i> ACCGATGTCGTC CACTGCATC	Deletion <i>carR</i>	<i>Xba</i> I	<i>carR</i>
<i>carR</i> _up_rev_ _NotI	<i>gcatgcccgc</i> CCACGATTGC AGGCGATGGC	Deletion <i>carR</i>	<i>Not</i> I	<i>carR</i>
<i>carR</i> _do_for_ _NotI	<i>gcatgcccgc</i> CTGCTACCTT GTGCAAGGCC	Deletion <i>carR</i>	<i>Not</i> I	<i>carR</i>
<i>carR</i> _do_rev_ _SacI	<i>gactgagtc</i> CGGCTATGTAGC TCAGTTG	Deletion <i>carR</i>	<i>Sac</i> I	<i>carR</i>
<i>mdh</i> _up_for_ _NotI	<i>ctgagcccgc</i> GCAATGGATG TTCTTAGCAG	Deletion <i>mdh</i>	<i>Not</i> I	<i>mdh</i>
<i>mdh</i> _up_rev_ _BamHI	<i>ctgaggatcc</i> GCTTCCTTCACA CCTTCGAC	Deletion <i>mdh</i>	<i>Bam</i> HI	<i>mdh</i>
<i>mdh</i> _do_for_ _BamHI	<i>ctgaggatcc</i> CGCTATGGAATA ACGCCATC	Deletion <i>mdh</i>	<i>Bam</i> HI	<i>mdh</i>
<i>mdh</i> _do_rev_ _PstI	<i>ctgactgcag</i> CAGAATAATCAC GATGAATG	Deletion <i>mdh</i>	<i>Pst</i> I	<i>mdh</i>
<i>betI</i> _up_for_ _NotI	<i>gttagcccgc</i> AAGACTGCTC GGCATATGTG	Deletion <i>betI</i>	<i>Not</i> I	<i>betI</i>
<i>betI</i> _up_rev_ _BamHI	<i>gttaggatcc</i> CAAGCCTTTGCA GGAGAGAC	Deletion <i>betI</i>	<i>Bam</i> HI	<i>betI</i>
<i>betI</i> _do_for_ _BamHI	<i>gttggatcc</i> TCTTCACGGCGC ACATGCTC	Deletion <i>betI</i>	<i>Bam</i> HI	<i>betI</i>
<i>betI</i> _do_rev_ _BamHI	<i>ggccggatcc</i> AGGGAGATATT CGAGTAATTTG	Deletion <i>betI</i>	<i>Bam</i> HI	<i>betI</i>
<i>betA</i> _up_for_ _NotI	<i>gaatgcccgc</i> AACGTGTATC AATATGTGGTACAG	Deletion <i>betA</i>	<i>Not</i> I	<i>betA</i>
<i>betA</i> _up_rev_ _BamHI	<i>gactggatcc</i> TTGCCGAGAAAA TTGCAGAC	Deletion <i>betA</i>	<i>Bam</i> HI	<i>betA</i>
<i>betA</i> _do_for_ _BamHI	<i>gaaggatcc</i> CTAACAGTTTGC CTGAGCAATC	Deletion <i>betA</i>	<i>Bam</i> HI	<i>betA</i>



<i>betA</i> _do_rev_ _PstI	gtttctgcagCGAACAAGCCTT TGCAGGAGAG	Deletion <i>betA</i>	<i>PstI</i>	<i>betA</i>
<i>lpxL</i> _up_for_ PstI	gctactgcagGCACTTTCTGGT GGTGAGCGTAATC	Deletion <i>lpxL</i>	<i>PstI</i>	<i>lpxL</i>
<i>lpxL</i> _up_rev_ BamHI	gatcgggatccAAACTCACCGGG CGTATAAGGCTGC	Deletion <i>lpxL</i>	<i>BamHI</i>	<i>lpxL</i>
<i>lpxL</i> _do_for_ BamHI	ggccgggatccAAACACGTCCA GAGGGATATGAAGAG	Deletion <i>lpxL</i>	<i>BamHI</i>	<i>lpxL</i>
<i>lpxL</i> _do_rev_ NotI	attagcggccgcGTTGGTATTCC TGTAGAAGGCTTAGC	Deletion <i>lpxL</i>	<i>NotI</i>	<i>lpxL</i>

Tab. 6. Verwendete Starteroligonukleotide für die Erstellung der Konstrukte für die Komplementation von deletierten Genen

Name	Sequenz 5' → 3' Richtung	Verwendungszweck	Schnittstelle	Zielsequenz
<i>aci01347</i> _for_ _BamHI	catgggatccCGCCATCCAAA AATGGATGT	Komplementation Aci01347	<i>BamHI</i>	<i>aci01347</i>
<i>aci01347</i> _rev_ _PstI	catgctgcagCTAGCTGGTTT TTCTATCCAG	Komplementation Aci01347	<i>PstI</i>	<i>aci01347</i>
P_ <i>aci01347</i> _for_ _NotI	catggcggccgcTCAATTCATC TGCAACATCCC	Komplementation Aci01347	<i>NotI</i>	Promotor <i>aci01347</i>
P_ <i>aci01347</i> _rev_ _BamHI	catgggatccTCACACCTTCG ACTAATATCC	Komplementation Aci01347	<i>BamHI</i>	Promotor <i>aci01347</i>

Tab. 7. Verwendete Starteroligonukleotide für die Erstellung der Konstrukte zur heterologen Produktion von Proteinen in *E. coli* BL21 STAR™ (DE3)

Name	Sequenz 5'→3' Richtung	Verwendungszweck	Schnittstelle	Zielsequenz
<i>carR</i> _for_ <i>Sac</i> I	<i>gatcgagctc</i> GTGAATAATCTA CCTAACCTATC	Überexpression von <i>carR</i>	<i>Sac</i> I	<i>carR</i>
<i>carR</i> _rev_ <i>Ec</i> oRI	<i>gcgcggaattc</i> TTATAGAAAGAC TTTTTCAGGCGG	Überexpression von <i>carR</i>	<i>Eco</i> RI	<i>carR</i>

Tab. 8. Verwendete Starteroligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz 5'→3' Richtung	Verwendungszweck	Schnittstelle	Zielsequenz
pBAD_seq_for	AGATTAGCGGATCCTA CCTG	Sequenzierung pBAD/HisA	-	pBAD_ HisA
pBAD_seq_rev	CAGACCGCTTCTGCGTT CTG	Sequenzierung pBAD/HisA	-	pBAD_ HisA
<i>carR</i> _ctr_for	CAGTAATACTGGGGTT GTA	Sequenzierung Deletion <i>carR</i>	-	<i>carR</i>
<i>carR</i> _ctr_rev	GCTTATAGGCTCACTTC ACCTC	Sequenzierung Deletion <i>carR</i>	-	<i>carR</i>
<i>mdh</i> _ctr_for	CGAAGATGGACACCGC AAATCATG	Sequenzierung Deletion <i>mdh</i>	-	<i>mdh</i>
<i>mdh</i> _ctr_rev	CTTTGGCATAATCCTGT ATGAG	Sequenzierung Deletion <i>mdh</i>	-	<i>mdh</i>
<i>betI</i> _ctr_for	GACGCGCAGCGAGTAC ATTC	Sequenzierung Deletion <i>betI</i>	-	<i>betI</i>
<i>betI</i> _ctr_rev	CAACAATCCCGGCAAT ATACGG	Sequenzierung Deletion <i>betI</i>	-	<i>betI</i>
<i>betA</i> _ctr_for	GATCTGAACACGTTGA CCACCTTG	Sequenzierung Deletion <i>betA</i>	-	<i>betA</i>
<i>betA</i> _ctr_rev	CGCATCCGGAAAGCCA GATTAAGG	Sequenzierung Deletion <i>betA</i>	-	<i>betA</i>
<i>lpxL</i> _ctr_for	CGATCTTAGGCGAAGT TCAGCACGAAGG	Sequenzierung Deletion <i>lpxL</i>	-	<i>lpxL</i>

<i>lpxL_ctr_rev</i>	TGGCGTATTCGACTGCA AGTTCCG	Sequenzierung Deletion <i>lpxL</i>	-	<i>lpxL</i>
---------------------	------------------------------	---------------------------------------	---	-------------

Tab. 9. Verwendete Starteroligonukleotide für Operonnachweise

Name	Sequenz 5'→3' Richtung	Operon-Funktion	Zielsequenz
01344- <i>carR_for</i>	GATTATCCGTATCAAGT TGC	Carnitin-Abbau	01344 <sup>a</sup> - <i>carR</i>
01344- <i>carR_rev</i>	ACTTGCCATAGAAGGT CAC	Carnitin-Abbau	01344 <sup>a</sup> - <i>carR</i>
<i>carR_mdh_for</i>	CCATACGACCCGTAGG CGTAC	Carnitin-Abbau	<i>carR</i> - <i>mdh</i>
<i>carR_mdh_rev</i>	AACCACGACGGAAGT GAGC	Carnitin-Abbau	<i>carR</i> - <i>mdh</i>
<i>mdh_aci01347_for</i>	CCATTGGTTTAGCGGCA TCG	Carnitin-Abbau	<i>mdh</i> - <i>aci01347</i>
<i>mdh_aci01347_rev</i>	CATGACATTGTGCTGTA TTG	Carnitin-Abbau	<i>mdh</i> - <i>aci01347</i>
<i>aci01347_hyd_for</i>	GTTCTGGTGTGTCATGC TGAC	Carnitin-Abbau	<i>aci01347</i> - <i>ach</i>
<i>aci01347_hyd_rev</i>	GTGAATCGAGTCCACC TACC	Carnitin-Abbau	<i>aci01347</i> - <i>ach</i>
<i>hyd_cntA_for</i>	GCACGCCCATGCGCCG TTGT	Carnitin-Abbau	<i>ach</i> - <i>cntA</i>
<i>hyd_cntA_rev</i>	TGCTTTACCACTGCCAC TT	Carnitin-Abbau	<i>ach</i> - <i>cntA</i>
<i>cntA_msadh_for</i>	GGCAGCAACTTCATGA CAGT	Carnitin-Abbau	<i>cntA</i> - <i>msadh</i>
<i>cntA_msadh_rev</i>	AGGCTTGCCTTGCTCAA TGG	Carnitin-Abbau	<i>cntA</i> - <i>msadh</i>
<i>msadh_cntB_for</i>	CCGTACAATGGAAATT GTCC	Carnitin-Abbau	<i>msadh</i> - <i>cntB</i>
<i>msadh_cntB_rev</i>	GAAATCTGGATTTAC AGCC	Carnitin-Abbau	<i>msadh</i> - <i>cntB</i>

<i>cntB</i> _01352_for	CGCATGTGTATGTATGT GGC	Carnitin-Abbau	<i>cntB</i> – 01352 <sup>b</sup>
<i>cntB</i> _01352_rev	ATCAAAGCTCAAAAAC ACTC	Carnitin-Abbau	<i>cntB</i> – 01352 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Offener Leserahmen des Gens mit dem Lokus: HMPREF0010\_01344

<sup>b</sup> Offener Leserahmen des Gens mit dem Lokus: HMPREF0010\_01352

## 2.2. Kultivierung von Mikroorganismen

### 2.2.1. Sterilisation

Hitzeunempfindliche Lösungen wurden in einem Autoklav für 25 min bei 121 °C und 2 bar sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Sarstedt).

### 2.2.2. Kultivierung von Mikroorganismen in Komplexmedium

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli*- und *A. baumannii*-Stämme in Vollmedium erfolgte in LB-Medium nach Bertani (Bertani, 1951). Das Medium bestand aus den Komponenten: 5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton und 5 g/l Hefeextrakt. Bei der Anzucht auf festem Nährboden wurde dem Medium zusätzlich 18 g/l Agar zugefügt.

Für die Anzucht von *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> pT7-7\_*betA*\_his zur Produktion von BetA wurde 2 x YT-Medium verwendet, welches sich zusammensetzte aus 5 g/l NaCl, 16 g/l Trypton und 10 g/l Hefeextrakt.

Die Kultivierung erfolgte stets bei 37 °C und bei Flüssigkulturen schüttelnd bei 150 Upm.

### 2.2.3. Kultivierung von Mikroorganismen in Mineralmedium

Für die Anzucht von *A. baumannii* in einem definierten Medium wurde Mineralmedium (MM) verwendet. Die Komponenten sind Tab. 10 zu entnehmen.

Tab. 10. Zusammensetzung der Minerallösung und des Phosphatpuffers

Minerallösung (20x)		Phosphatpuffer (20x)	
NH <sub>4</sub> Cl	20 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	11,6 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	88 g/l
KNO <sub>3</sub>	2 g/l	NaOH	pH 6,8
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,34 g/l		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	40 mg/l		
SL 9	20 ml/l		

Die Spurenelementlösung SL9 wurde modifiziert nach Tschech und Pfennig verwendet (Tschech und Pfennig, 1984). Die Zusammensetzung ist in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11. Zusammensetzung der SL 9

SL 9	
Titriplex	12,8 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2 g/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	122 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg/l
NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36 mg/l
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg/l
CuCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	2 mg/l
HCl	pH 6,5

### 2.2.4. Medienzusätze und Antibiotika

Für die selektive Anzucht von rekombinanten Stämmen oder Mutanten mit Antibiotikaresistenzen, sowie für die Induktion der Genexpression mit Hilfe eines induzierbaren Promotors wurden dem Medium die in der Tab. 12 und Tab. 13 aufgeführten Antibiotika und Medienzusätze zugeführt.

Tab. 12. Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	<i>E. coli</i> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	<i>A. baumannii</i> [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ampicillin	100 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	100	-
Kanamycin	100 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	20	50
Gentamycin	100 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	10	100

Tab. 13. Verwendete Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration und Verwendung
IPTG	1 M	1 mM; Induktion von <i>betA</i>
Arabinose	50 % [w/v]	0,02 % [w/v]; Induktion der BCCT, <i>carR</i>
Saccharose	2,5 M	10 % [w/v]; markerlose Mutagenese

### 2.2.4. Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde mit Hilfe eines Photometers (Spectronic 200, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) die Optische Dichte der Bakterienkultur bei 600nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) bestimmt. Eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 entsprach hierbei einer Zellzahl von ca.  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml.

### 2.2.5. Stammhaltung

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden 700  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Kultur und 300  $\mu\text{l}$  86 % [v/v] Glycerin in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-70^\circ\text{C}$ .

## 2.3. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als Startsequenzen wurden die in den Tab. 5 bis Tab. 9 aufgeführten Starteroligonukleotide verwendet und als Polymerase wurde stets die Phusion<sup>®</sup> „High-Fidelity“ DNA-Polymerase von New England Biolabs<sup>®</sup> Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet.

Die Starteroligonukleotidpaare wurden komplementär zu dem Anfang und dem Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes entworfen und bei Notwendigkeit um zusätzliche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme am 5'-Ende erweitert, die für eine spätere Ligation im Zuge der Klonierung von rekombinanten Plasmiden wichtig waren.

Die Zusammensetzung eines beispielhaften PCR-Ansatzes und das standardmäßig verwendete PCR-Programm ist in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14. Zusammensetzung der PCR-Ansätze und das standardmäßig verwendete PCR-Programm

Komponente	Menge [µl]	Vorgang	Temp. [°C]	Zeit
vorwärts Starter-oligonukleotid (50 mM)	0,5	Initiale Denaturierung	98	5 min
rückwärts Starter-oligonukleotid (50 mM)	0,5	Denaturierung	98	30 s
DNA-Matrize (100 ng/µl)	0,25	Anlagerung	55 – 70	30 s/kb
dNTPs (2 mM)	4	Verlängerung	72	30 s
5 x Phusion <sup>®</sup> GC-Puffer	10	Finale Verlängerung	72	5 min
Phusion <sup>®</sup> „High-Fidelity“ DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5			
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad. 50 µl			

### **2.3.2. Restriktionsverdau mittels Restriktionsenzymen**

Der Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte stets unter Verwendung von Restriktionsenzymen von New England Biolabs® Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA) und nach Herstellerangaben für zwei Stunden bei 37 °C. Die Restriktionsenzyme wurden anschließend hitzeinaktiviert, durch die Inkubation bei 80 °C über 20 min.

### **2.3.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Vektoren und rekombinante Plasmide, welche nach erfolgreichem Restriktionsverdau mit einem DNA-Fragment ligiert werden sollten, wurden zusätzlich für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Die Dephosphorylierung erfolgte mittels alkalischer Phosphatase von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben.

### **2.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation eines Vektors mit einem DNA-Fragment erfolgte mittels T4 DNA-Ligase von New England Biolabs® (Ipswich, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur für eine Stunde. Das Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor betrug stets 1:3, 1:5 und 1:7 (Vektor:Insert). Die Ligase wurde anschließend für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

### **2.3.5. Isolierung von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Zellen einer 5 ml Übernachtskultur in 2 ml-Schritten abzentrifugiert (1 min, 133000 Upm; Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, aufgeschlossen und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) extrahiert.



### 2.3.6. Isolierung von chromosomaler DNA

Die Isolierung von chromosomaler DNA erfolgte standardmäßig aus einer 5 ml Übernachtkultur mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook *et al.*, 1989).

### 2.3.7. Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA wurden 5 ml MM mit Carnitin als Kohlenstoffquelle über Nacht bei 37 °C angezogen und 2 ml dieser Kultur am nächsten Morgen geerntet (1 min, 13300 Upm, 4 °C, Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Das resultierende Zellpellet wurde anschließend in 2 ml Tri-Reagenz (TRI Reagent<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) rückgelöst und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und anschließend für 15 sek stark geschüttelt und erneut 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte über Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4 °C, Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) und die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu der wässrigen Phase wurden 500 µl Isopropanol gegeben, invertiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausfallende RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 12000 g, 4 °C, Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) und mit 1 ml 75 % [v/v] Ethanol gewaschen (5 min, 12000 g, 4 °C, Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Anschließend wurde die RNA bei 37 °C getrocknet und für 15 min bei 55 °C in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> rückgelöst.

Im Anschluss daran folgte ein DNase-Verdau zur Beseitigung von DNA-Verunreinigungen. Der DNase-Verdau erfolgte nach Herstellerangaben für 2 x 30 min bei 37 °C mit der TURBO<sup>™</sup> DNase von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA). Nach den ersten 30 min wurden erneut 2 µl Turbo<sup>™</sup> DNase zum Reaktionsansatz gegeben.

Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA erneut, wie oben beschrieben, aufgereinigt, in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> rückgelöst und für die cDNA-Synthese verwendet. Alle Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und das verwendete H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> wurde doppelt autoklaviert eingesetzt, zur Sicherstellung der RNase-Freiheit.

### 2.3.8. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe der M-MLV Reversen Transkriptase von Promega (Madison, Wisconsin, USA) nach Herstellerangaben.

### 2.3.9. Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA erfolgte mittels Spektralphotometer (NanoDrop™ 2000/200c Spektralphotometer, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durch die Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Des Weiteren wurde die Reinheit des DNA- oder RNA-Gemisches mit Hilfe des Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 beschreibt eine sehr reine Probe.

### 2.3.10. Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Verwendet wurden 0,8 %ige Agarosegele (0,8 % [w/v] Agarose in 1 x TAE-Puffer (50 x TAE: 50 mM EDTA, 2 M Tris, 57,1 ml/L Essigsäure, pH 8,0)), versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und die DNA-Proben wurden mit 6 x Probenpuffer (0,1 M EDTA, 150 mg/L Ficoll 400 DL, 1 g/L Bromphenolblau) versetzt. Der Probenpuffer lag in der Endkonzentration einfach vor. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 120 V über 1 h in 1 x TAE-Puffer. Als Größenstandard diente der „GeneRuler™“ 1 kb-DNA-Standard (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die DNA konnte im Anschluss mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, unter UV-Licht detektiert werden.

### 2.3.11. Herstellung chemokompetenter *E. coli* DH5α-Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter *E. coli* DH5α-Zellen wurden 5 ml LB-Medium über Nacht mit dem Stamm bei 37 °C und 150 Upm innokuliert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit Hilfe der Übernachtskultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 – 0,6 wurden die Zellen geerntet (10 min, 4000 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) und in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM CaCl<sub>2</sub> in 20 % [v/v] Glycerin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut unter denselben

Bedingungen abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut in 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung rückgelöst und für 1 – 2 h auf Eis inkubiert. Nach dem Aliquotieren der Zellen in 100 µl Portionen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### **2.3.12. Transformation chemokompetenter *E. coli* DH5α-Zellen**

Für die Transformation von chemokompetenten *E. coli* DH5α-Zellen wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem jeweiligen Ligationsansatz oder 200 ng Plasmid-DNA vermenget. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C. Die Zellen wurden erneut für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C schüttelnd bei 150 Upm regeneriert. Im Anschluss daran wurden die Zellen auf LB-Platten mit dem jeweiligen Selektionszusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.3.13. Herstellung chemokompetenter *E. coli* MKH13- und BL21 STAR™ (DE3)-Zellen**

Für die Herstellung chemokompetenter *E. coli* MKH13- und BL21 STAR™ (DE3)-Zellen wurden die Stämme über Nacht in 20 ml LB-Medium innokuliert und anschließend 100 ml LB-Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 angeimpft und bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 wurde die Flüssigkultur in 1 ml Aliquots in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (2 min, 13300 Upm, 4 °C; Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) und in 100 µl TSS-Medium (LB-Medium mit dem Zusatz von: 10 % [w/v] PEG-8000, 5 % [v/v] DMSO, 15 % [v/v] Glycerin und 500 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### **2.3.14. Transformation chemokompetenter *E. coli* MKH13- und BL21 STAR™ (DE3)-Zellen**

Für die Transformation chemokompetenter *E. coli* MKH13- und BL21 STAR™ (DE3)-Zellen wurde das entsprechende Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA versehen und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die

Zellen für 1 h bei 37 °C regeneriert. Für die Selektion der Transformanden wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionszusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.3.15. Herstellung elektrokompetenter *A. baumannii* ATCC 19606-Zellen**

Für die Transformation von *A. baumannii* ATCC 19606 wurden die Zellen in einem ersten Schritt elektrokompetent gemacht. Hierfür wurden Zellen des jeweiligen Stammes in eine 50 ml LB-Flüssigkultur überführt und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 ml LB-Medium mittels der Übernachtskultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft. Nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,45 wurden die Zellen geerntet (20 min, 4700 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) und vier Mal mit eiskaltem, sterilem Milipore-H<sub>2</sub>O gewaschen (1 x 1/2 Ausgangsvolumen, 3 x 1/4 Ausgangsvolumen). Nach einem weiteren Waschschrift mit der Hälfte des Ausgangsvolumens 10 %igem [v/v] Glycerin wurden die Zellen in 1/800 des Ausgangsvolumens 10 %igem [v/v] Glycerin resuspendiert und aliquotiert. Die 50 µl-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -65 °C gelagert.

### **2.3.16. Transformation elektrokompetenter *A. baumannii* ATCC 19606-Zellen**

Die Transformation von elektrokompetenten *A. baumannii* ATCC 19606-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 0,5 – 3 µg Plasmid-DNA zu den auf Eis aufgetauten Zellen eines Aliquots. Der Transformationsansatz wurde in eine gekühlte Küvette (2 mm Spalt, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) überführt und die Zellen wurden elektroporiert (Gene Pulser<sup>TM</sup> und Pulse Controller, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA, bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF über 4,4 – 4,8 msec). Unmittelbar danach wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C regeneriert. Die Selektion der erfolgreich transformierten Zellen erfolgte durch das Ausplattieren auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionszusatz und der Inkubation über Nacht bei 37 °C.

### 2.3.17. Lagerung von DNA, cDNA und RNA

Die Lagerung von chromosomaler DNA gelöst in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> erfolgte bei 4 °C und Plasmid-DNA, cDNA, sowie RNA wurde bei -20 °C gelagert, ebenfalls in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

### 2.3.18. Transkriptomanalysen

Für die Analyse des Transkriptoms von *A. baumannii* ATCC 19606 wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 in MM mit Na-Succinat, Acetylcarnitin, Carnitin oder D-Malat angezogen und anschließend geerntet. Geerntet wurden 2 ml der Flüssigkultur für 1 min bei 13300 Upm und 4 °C (Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Anschließend wurde das Zellpellet in 400 µl RLT-Puffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) mit β-Mercaptoethanol rückgelöst, schockgefroren und zur Analyse auf Trockeneis an die Universität Göttingen in die Abteilung für genomische und angewandte Mikrobiologie an Prof. Dr. Anja Poehlein versandt. Hier wurden die Zellen mit Hilfe einer Kugelmühle aufgeschlossen und mit 400 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit Qiagen) mit β-Mercaptoethanol (10 µl/ml) und 1200 µl 96 % [v/v] Ethanol versetzt. Für die Extraktion der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die "RNA integrity number" (RIN) wurde mittels Agilent Bioanalyzer 2100 unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits nach Herstellerangaben bestimmt (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Verbleibende genomische DNA wurde anschließend entfernt mittels TURBO DNase (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Paisley, United Kingdom) nach Herstellerangaben. Im nächsten Schritt wurde das Pan-Prokaryozes riboPOOL Kit v4 (siTOOLS BIOTECH, Planegg/Martinsried, Germany) verwendet für die Reduktion von rRNA. Für die Sequenzierung wurde eine Strang-spezifische cDNA Bibliothek generiert mit Hilfe des NEBNext Ultra II directional RNA library preparation Kits für Illumina-Sequenzierung (New England BioLabs, Frankfurt am Main, Germany). Für die Sicherstellung der Qualität und der Größe der cDNA-Sequenzen wurde der Agilent Bioanalyzer 2100 verwendet mit Hilfe des Agilent High Sensitivity DNA Kits (nach Herstellerangaben, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Die Konzentrationen der Bibliotheken wurden nach Herstellerangaben mit dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit bestimmt (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Die Sequenzierung der cDNA-Fragmente erfolgte mit dem NovaSeq 6000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) unter Verwendung des NovaSeq 6000 SP Reagent Kits v1.5 (100 cycles) und dem NovaSeq XP 2-Lane Kit v1.5 im „paired-end mode“ und mit 2x 50 Zyklen. Hierbei wurde für die Sicherstellung der Qualität der

Sequenzierungsergebnisse die Sequenziersoftware Trimmomatic-0.39 (Bolger et al., 2014) mit den Einstellungen „phred-33 score of 15“ verwendet.

Die Kartierung der Ergebnisse gegen das Referenzgenom von *A. baumannii* ATCC 19606 (Ref: NZ\_CP058289.1) wurde mit Hilfe der Software Salmon (v 1.5.2) durchgeführt (Patro et al., 2017). Die quant.sf Dateien, welche von dem Programm generiert wurden, wurden anschließend in R (v 4.0.5) (R Core Team, 2020) durch Verwendung des „tximport“-Paketes (v 1.18.0) hochgeladen (Soneson et al., 2015). Für die Normalisierung der Kopienzahlen und für die Bestimmung der Veränderung der Kopienzahlen der jeweiligen Gene wurde DeSeq2 (v 1.30.0) (Love et al., 2014) und das „apeglm“-Paket (v 1.12.0) (Zhu et al., 2019) verwendet. Gene mit einer Veränderung von einem log<sub>2</sub>-fachen Faktor von 5 und einem p-Wert von < 0.05 wurden als unterschiedlich exprimiert gewertet. Rohdaten wurden auf der Plattform „Sequence Read Archive“ (SRA) als „BioProject“: PRJNA821016 veröffentlicht.

## **2.4. Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli***

### **2.4.1. Heterologe Produktion der BCCT aus *A. baumannii* in *E. coli* MKH13**

Die Produktion der sechs verschiedenen BCCT aus *A. baumannii* ATCC 19606 (BetT1, BetT2, BetU1, Aci01347) und AYE (BetU2, BetU3) erfolgte in dem *E. coli*-Stamm MKH13, bei denen alle weiteren kompatiblen Solute-Transporter deletiert wurden (Haardt et al., 1995). Der Expressionsstamm wurde mit dem jeweiligen Expressionsplasmid (Tab. 4) transformiert und anschließend 5 ml LB-Medium mit der jeweiligen Transformande angeimpft. 100 ml LB-Medium wurden mit Hilfe der Übernachtskultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,2 innokuliert und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 – 0,8 bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Die Proteinproduktion wurde durch die Zugabe von 0,02 % [w/v] Arabinose induziert und die Zellen weitere 2,5 h bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 4700 Upm und 4 °C (MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA).

### **2.4.2. Heterologe Produktion des Regulators CarR aus *A. baumannii* in *E. coli* BL21 STAR™(DE3)**

Für die Produktion des Regulators CarR aus *A. baumannii* ATCC 19606 in *E. coli* wurde der Stamm BL21 STAR™ (DE3) mit dem Expressionsplasmid pBAD/HisA\_*carR* transformiert

und anschließend 50 ml LB-Medium mit den Transformanden über Nacht innokuliert. Mit Hilfe der Vorkultur wurde 1 L LB-Medium auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,2 angeimpft und die Expression bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,7 – 0,8 mit 0,2 % [w/v] Arabinose induziert. Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion und weiterer Inkubation bei 37 °C und 150 Upm für 20 min bei 8000 Upm und 4 °C geerntet (Avanti™ JA-10, Beckman, Brea, Kalifornien, USA). Anschließend wurde das Zellpellet in Aufschlusspuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen und das Zellpellet bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.4.3. Heterologe Produktion von BetA aus *A. baumannii* in *E. coli* BL21 STAR™ (DE3)**

Für die heterologe Produktion von BetA aus *A. baumannii* in *E. coli*, wurde der Stamm BL21 STAR™ (DE3) mit dem Expressionsplasmid pT7-7\_*betA*\_his transformiert und 50 ml LB-Medium mit einer Transformande über Nacht inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe der Vorkultur 2 L 2 x YT-Medium auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,1 angeimpft und anschließend für 48 h bei 30 °C und 150 Upm inkubiert. Nach 48 h wurde die Proteinproduktion mit 1 mM IPTG induziert und im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet (20 min, 8000 Upm, 4 °C, Avanti™ JA-10, Beckman, Brea, Kalifornien, USA). Das Zellpellet wurde in Aufschlusspuffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## **2.5. Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli* mittels Ni-NTA**

### **2.5.1. Aufreinigung des Regulators CarR aus *E. coli* BL21 STAR™ (DE3)**

Für die Aufreinigung des Regulators, CarR, wurde das in Kapitel 2.4.2. gewonnene Zellsediment auf Eis aufgetaut, in 20 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert und die Zellsuspension mit einer Spatelspitze DNase und 5 µM PMSF versetzt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels „French Press“ durch dreimaliges Durchlaufen der Zelle bei 1000 psiG, gefolgt von dem Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 40 min bei 12000 Upm und 4 °C (Avanti™ JA-25.50, Beckman, Brea, Kalifornien, USA). Das hieraus resultierende Lysat wurde erneut mit 5 µM PMSF versetzt und anschließend auf die zuvor äquilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben. Die Äquilibration der Säule erfolgte durch Waschen der Ni-NTA-Matrix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) mit 50 ml  $H_2O_{dd}$  und 50 ml Aufschlusspuffer. Verwendet wurde 1 ml Ni-NTA-Matrix, welches einem

Säulenvolumen (SV) entsprach. Nachdem das Lysat auf die Säule gegeben worden war, wurde die Säule mit 10 SV Waschpuffer 1 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,0) und Waschpuffer 2 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 70 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen. Der an das Ni-NTA-Material gebundene Regulator wurde anschließend mit 10 SV Elutionspuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 8,0) eluiert.

### **2.5.2. Aufreinigung von BetA aus *E. coli* BL21 STAR™ (DE3)**

Für die Aufreinigung von BetA wurde das in Kapitel 2.4.3. gewonnene Zellsediment auf Eis aufgetaut, in 20 ml Aufschlusspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert und die Zellsuspension mit einer Spatelspitze DNase und 5 µM PMSF versetzt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels „French Press“ durch dreimaliges Durchlaufen der Zelle bei 1000 psiG, gefolgt von dem Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 14000 Upm und 4 °C (Avanti™ JA-25.50, Beckman, Brea, Kalifornien, USA). Das hieraus resultierende Lysat wurde 30 min bei 4 °C mit dem zuvor äquilibrierten Ni-NTA-Material inkubiert. Die Äquilibration des Säulenmaterials erfolgte durch Waschen der Ni-NTA-Matrix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) mit 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 50 ml Aufschlusspuffer. Verwendet wurde 1,5 ml Ni-NTA-Matrix, welches einem Säulenvolumen (SV) entsprach. Nachdem das Lysat nach der Inkubation über die Säule gegeben worden war, wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und anschließend das Säulenmaterial mit 100 ml Waschpuffer 1 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol) und 10 ml Waschpuffer 2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 70 mM Imidazol) gewaschen. Das an das Ni-NTA-Material gebundene Protein wurde anschließend mit 10 ml Elutionspuffer 1 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol) und 10 ml Elutionspuffer 2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 800 mM Imidazol) eluiert.

## **2.6. Standardmethoden für das Arbeiten mit Proteinen**

### **2.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet, um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Hierfür wurden die Proteine durch die Zugabe von 3 x SDS-Probenauftragspuffer (1 x in der Endkonzentration; Tab. 16.) und anschließendes Erhitzen auf 95 °C für 10 min denaturiert. Zusätzlich wurde die



Eigenladung der Proteine durch das im Probenauftragspuffer enthaltene SDS maskiert, um Wechselwirkung dieser Eigenladung während der Auftrennung ausschließen zu können. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der zuvor genannten Denaturierung durch das Durchlaufen eines großporigen Sammelgels (Tab. 15.), in dem die Proteine durch die Potentialdifferenz zwischen den Folge- und Leitonen fokussiert werden und im Anschluss durch das Durchlaufen eines feineren Trenngels (Tab. 15.), welches die Proteine nach ihrer Größe trennt (Righetti, 1990). Hierfür wurde eine konstante Stromstärke von 120 V verwendet und der Laufpuffer nach Laemmli (Tab. 16).

Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung (100 ml/l Methanol, 100 ml/l Eisessig, 0,53 mg/l Serva Blue R-250; Weber und Osborn, 1969) für 1 h gefärbt und durch eine Entfärberlösung (300 ml/l Ethanol, 150 ml/l Eisessig) so lange entfärbt, bis die Proteine detektiert werden konnten. Dokumentiert wurden die Gele mit Hilfe eines Scanners.

Tab. 15. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels modifiziert nach Laemmli, 1970 (Laemmli, 1970).

Komponente	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (4 %)
30 % [w/v] Acrylamid/Bisacrylamid	22 ml	2,4 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	9,9 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	5 ml
10 % [w/v] SDS	440 µl	200 µl
Bromphenolblau	-	700 µl
TEMED	50 µl	40 µl
10 % [w/v] APS	200 µl	150 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	12,5 ml	9 ml

Tab. 16. Zusammensetzung des Laemmli-Puffers und des 3 x Probenauftragspuffers.

Laemmli-Puffer		3 x Probenauftragspuffer	
SDS	10 g	SDS	8 % [w/v]
Glycerin	30,3 g	Glycerin	24 % [w/v]
Tris-HCl, pH 8,5	144,1 g	$\beta$ -Mercaptoethanol	4 % [w/v]
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad. 1000 ml	Serva blue G-250	0,02 % [w/v]
		Tris-HCl, pH 6,8	100 mM

### 2.6.2. Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Die immunologische Detektion von Proteinen erfolgte nach dem Auftrennen der Proteine in einem SDS-Gel. Die Proteine wurden elektrophoretisch für 1 h bei 60 mA auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> 0,2  $\mu$ M NC, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, US) übertragen. Die anschließende immunologische Detektion der zu untersuchenden Proteine erfolgte nach der „Semi-Dry“-Methode (Sambrook et al., 1989). Die an einen His<sub>6</sub>-Tag gekoppelten Proteine konnten mit Hilfe von einem gegen den His<sub>6</sub>-Tag spezifisch wirkenden Antikörper nachgewiesen werden. Als Puffer diente ausschließlich Tris-gepufferte Saline mit Tween 20 (TBST: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % [v/v] Tween 20, pH 7,4).

Die Membran wurde nach der Übertragung der Proteine mit 5 % [w/v] Milchpulver (Gabler-Saliter, Milchwerk GmbH & Co. KG, Obergünzburg, DE) gelöst in TBST, über 1 h schwenkend bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Infolgedessen wurde der primäre  $\alpha$ -His-Antikörper „Anti-Polyhistidin“ (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), der spezifisch an den His<sub>6</sub>-Tag bindet, 1:2500-fach mit TBST verdünnt und die Membran für 1 h bei 4 °C in diesem inkubiert. Die Membran wurde erneut drei Mal für jeweils 10 min mit TBST gewaschen und danach der sekundäre Antikörper „Anti-Mouse IgG“ (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA), der an den primären Antikörper bindet und an eine Peroxidase gekoppelt ist, 1:10000-fach verdünnt und für 1 h mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen der Membran konnten mit Hilfe der, an den sekundären Antikörper gekoppelten, Peroxidase

die Proteine über ihren His<sub>6</sub>-Tag nachgewiesen werden. Dies erfolgte nach Standardmethoden (Thorpe et al., 1985) über Chemilumineszenz. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Hydrolyse des Luminols in der Entwicklerlösung (8 ml Lösung A (50 mg Luminol, 200 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8,6), 800 µl Lösung B (22 mg *para*-Hydroxycoumarinsäure, 20 ml DMSO) und 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wodurch Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert wird und mittels Chemilumineszenz-Imager (ECL ChemoStar, Intas, Göttingen, Deutschland) detektiert werden kann.

### **2.6.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford**

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Hierfür wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt und die OD<sub>595nm</sub> von Lösungen mit 0, 3, 6 und 9 µg BSA bestimmt.

### **2.6.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Schmidt**

Die Gesamtproteinkonzentration von Zellsuspensionen wurde nach Schmidt (Schmidt *et al.*, 1963) bestimmt. Hierfür wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt und die OD<sub>546nm</sub> von Lösungen mit 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/ml BSA bestimmt.

### **2.6.5. Flavin-Nachweis in Proteinen**

Für den Nachweis von nicht kovalent gebundenen Flavinen in Proteinen wurden die Flavine mittels TCA-Fällung (Trichloressigsäure) in Lösung gebracht. Hierbei wurde die Protein-Lösung mit 0,2 Volumen 1 M TCA versetzt und anschließend wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (5 min, 13300 Upm; Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Der Nachweis und die Charakterisierung der Flavine erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. 2 µl des Überstandes nach der TCA-Fällung wurden auf eine Kieselgur-Aluminium-Folie (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Sil G, 0,2 mm Schichtdicke, Kieselgel 60, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgetragen und jeweils 1 ng FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und FMN (Flavinmononukleotid) wurden als Standard verwendet. Für die Auftrennung der Flavine wurde ein Laufmittel verwendet, welches zu 60 % [v/v] aus *n*-Butanol, zu 15 % [v/v] aus Eisessig und zu 25 % [v/v] aus H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> besteht. Die Auftrennung erfolgte nach Äquilibrierung der Kammer mit dem Laufmittel über Nacht für ungefähr 2 h, bis die Lauffront

2/3 der Kieselgur-Aluminium-Folie überschritten hatte. Anschließend wurden die Flavine mittels UV-Licht nachgewiesen und photographisch festgehalten.

## **2.7. Standardmethoden für das Arbeiten mit Lipiden**

### **2.7.1. Extraktion des Gesamtlipidpools aus *A. baumannii* ATCC 19606**

Für die Extraktion von Lipiden wurde der jeweilige *A. baumannii* ATCC 19606-Stamm über Nacht in 100 ml LB-Medium oder MM angezogen und am nächsten Morgen geerntet (20 min, 4700 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Das Zellsediment wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Zellpellet wurde aufgetaut, in 1,4 ml Saline (0,9 % [w/v] NaCl) gelöst und die Zellsuspension in ein Glasröhrchen mit 4 ml Methanol überführt. Die Suspension wurde 15 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 2 ml Chloroform versehen und erneut für 15 min unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Zellbestandteile im nächsten Schritt sedimentiert (30 min, 3500 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), der Überstand in ein neues Glasröhrchen überführt und das resultierende Pellet erneut in 1,4 ml Saline resuspendiert und die vorherigen Schritte wiederholt. Beide Überstände wurden vereint und mit 4 ml 0,2 M KCl und 4 ml Methanol vorsichtig vermengt. Die Suspension wurde für 30 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugiert (MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) und die obere, organische Phase in ein neues Glasröhrchen überführt. Die wässrige Phase wurde mit 1 ml Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Die dabei resultierende obere, organische Phase wurde mit der zuvor entnommenen vereint und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Morgen wurde die organische Phase in ein neues Glasröhrchen überführt und die Lipide mit N<sub>2</sub> eingedampft. Anschließend wurde die Konzentration der Lipide mit Chloroform auf 10 mg/ml eingestellt und die gelösten Lipide bei -20 °C gelagert.

### **2.7.2. Extraktion von Lipid A aus *A. baumannii* ATCC 19606**

Für die Extraktion von Lipid A aus *A. baumannii* ATCC 19606 wurden 200 ml LB-Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (20 min, 4700 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), in Saline (0,9 % [w/v] NaCl) gewaschen, das Zellpellet in 2 ml

Tri-Reagenz (TRI Reagent<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) resuspendiert und für 10 – 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Chloroform zugegeben, die Suspension stark geschüttelt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt (10 min, 120000 g) und die obere, wässrige Phase in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu der organischen Phase wurden 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gegeben, erneut stark geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert, um die obere, wässrige Phase wiederholt abzunehmen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und anschließend die vereinigten wässrigen Phasen, welche die Lipidoligosaccharidschicht (LOS) enthalten im Vakuumkonzentrator (Speed Vac<sup>®</sup> TC110 Savant<sup>™</sup>, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) getrocknet. Die getrocknete LOS wurde in 500 µl 1 % [w/v] SDS in 10 mM Na-Acetat (pH 4,5) mit Hilfe eines Ultraschallbades (Bransonic<sup>®</sup> Model B200 cleaner, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gelöst, für eine Stunde bei 100 °C inkubiert und erneut im Vakuumkonzentrator (Speed Vac<sup>®</sup> TC110 Savant<sup>™</sup>, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) getrocknet. Zur Entfernung des SDS wurde das Pellet erst in 500 µl saurem Ethanol (95 % [v/v] Ethanol und 100 µl 4 M HCl) und anschließend in 500 µl 95 % [v/v] Ethanol gewaschen (10 min, 2000g; Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Diese Waschschrte wurden zweifach wiederholt und im Anschluss das gewonnene Lipid A lyophilisiert (Modulyo<sup>®</sup> Freeze Dryer, Edwards, Feldkirchen, Deutschland). Mittels Ultraschallbad (Bransonic<sup>®</sup> Model B200 cleaner, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurde das gewonnene Lipid A in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (Verhältnis 4:1) in einer Endkonzentration von 25 µg/ml gelöst.

### 2.7.3. Analyse der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie

Die Charakterisierung der Lipide aus *A. baumannii* erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Hierfür wurde eine Kieselgur-Aluminium-Platte zweimal mit einem 1:1 Chloroform-Methanol-Gemisch gewaschen und anschließend 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Laufkammer wurde 1 h mit dem Laufmittel (2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 5 ml Essigsäure, 7,5 ml Methanol und 42,5 ml Chloroform) äquilibriert und 160 µg des zu analysierenden Lipidgemisches wurden auf die gewaschene Platte aufgetragen. Anschließend wurden die Lipide für ungefähr 1 h in der Laufkammer aufgetrennt, bis die Lauffront die gesamte Platte durchlaufen hatte. Detektiert wurden die Lipide im Nachhinein mittels Molybdänblau-Färbung, indem die Platte mit der Färbelösung besprüht wurde, bis die Lipide

gut sichtbar waren. Als Standard wurde der Gesamt-Lipid-Pool von einer *A. baumannii*-Wildtyp-Kultur verwendet.

#### **2.7.4. Analyse von Lipid A mittels Dünnschichtchromatographie**

Für die Analyse der verschiedenen Lipid A-Formen aus *A. baumannii* ATCC 19606 wurden 1 mg des Gesamt-Lipid A-Pools auf die kurze Seite einer 10 x 20 cm Kieselgur-Aluminium-Platte (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Sil G, 0,2 mm Schichtdicke, Kieselgel 60, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgetragen. Die Glaskammer wurde 3 h mit dem Laufmittel (16,5 ml  $\text{ClCH}_3$ , 16,5 ml Pyridin, 5 ml 88 % [v/v] Ameisensäure, 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ ) äquilibriert und anschließend wurde die Platte in der Laufkammer für 2,5 – 3 h in dem Laufmittel inkubiert, bis die Lauffront das Ende der Platte erreicht hatte. Detektiert wurden die verschiedenen Lipid A-Formen mit *p*-Anisaldehyd (9,2 ml Ethanol, 260  $\mu\text{l}$  *p*-Anisaldehyd, 420  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100  $\mu\text{l}$  Essigsäure). Hierfür wurde die gesamte Platte in der Färbelösung getränkt und anschließend bis zum Erscheinen der Spots auf 250 °C erhitzt.

#### **2.8. Markerlose Mutagenese von *A. baumannii* ATCC 19606**

Die markerlose Mutagenese von *A. baumannii* ATCC 19606 wurde nach Stahl (Stahl *et al.*, 2015) durchgeführt. Für die markerlose Mutagenese wurde das Plasmid pBIISK\_ *sacB/kanR* verwendet mit dem 1500 Bp langen Stromaufwärts- und Stromabwärtsbereich des zu deletierenden Gens. In einem ersten Schritt wurden elektrokompetente *A. baumannii* ATCC 19606-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transformiert (Kapitel 2.3.15. und 2.3.16.). Die Transformanden wurden anschließend auf LB-Kanamycin-Platten selektioniert. Die Segregation des Plasmides und damit des Wildtyp-Gens, erfolgte durch die Gegenselektion auf Saccharose. Hierbei wurden die Integranden in 5 ml LB-Medium + 10 % [w/v] Saccharose überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf einer Agarplatte mit 10 % [w/v] Saccharose vereinzelt und die Segregation durch den Verlust der Kanamycinresistenz verifiziert. Die verwendeten Mutagenese-Plasmide sind in Tab. 3. aufgeführt. Die jeweiligen Mutanten wurden anschließend über Sequenzierungen des Genbereiches überprüft. Hierfür dienten die Starteroligonukleotide aus Tab. 8.

## 2.9. Phänotypisierung der Deletionsmutanten

### 2.9.1. Wachstumsstudien unter verschiedenen Bedingungen

Für die Analyse von Wachstumsphänotypen wurden die verschiedenen Mutanten in MM mit den jeweiligen Kohlenstoffquellen und verschiedenen Medienzusätzen angezogen und Wachstumskurven aufgenommen. Hierfür wurden in einem ersten Schritt 5 ml MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle mit dem jeweiligen Stamm angeimpft und für 8 h bei 37 °C schüttelnd bei 150 Upm inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe dieser Kultur 50 ml MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,01 inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 150 Upm angezogen. Infolgedessen wurden 100 ml MM mit entsprechender Kohlenstoffquelle und den angegebenen Zusätzen (Tab. 17) auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,1 angeimpft und das Wachstum in angemessenen Zeitintervallen photometrisch dokumentiert. Bei einer Trübung des Mediums durch jeweilige Medienzusätze wurde das Wachstum durch die Bestimmung der Lebendzellzahl analysiert. Hierfür wurden entsprechende Verdünnungsreihen in 0,9 % [w/v] NaCl angefertigt und die Lebendzellzahl nach dem Ausplattieren bestimmt. Ausplattiert wurden hierbei jeweils drei Verdünnungsstufen, bei denen 1 – 10 Kolonien auf den Platten gezählt werden konnten, 10 – 100 und 100 – 1000 Kolonien. Die Wachstumsraten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism<sup>®</sup> (GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 6.01 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA) bestimmt.

Tab. 17. Konzentrationen der verwendeten Kohlenstoffquellen und anderer Medienzusätze

Kohlenstoffquellen		Medienzusätze	
Na-Acetat	20 mM	NaCl	500 mM
Na-Succinat	20 mM	Cholin	1 mM
Carnitin	20 mM	Glycinbetain	1 mM
Acetylcarnitin	20 mM		
D-Malat	20 mM		
<i>p</i> -Hydroxybenzoat	5 mM		
Na-Benzoesäure	5 mM		
Protocatechuat	5 mM		
Phosphatidylcholin	5 % [w/v]		
Weitere aromatische Verbindungen	5 mM		

### 2.9.2. Wachstum in menschlichen Körperflüssigkeiten

Das Wachstum von verschiedenen *A. baumannii*-Stämmen in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten des Menschen, wie z. B. Urin, Wundserum oder Blutserum wurde photometrisch oder über die Lebendzellzahl festgehalten. Hierfür wurde der jeweilige Stamm in 5 ml LB-Medium über Nacht schüttelnd bei 37 °C angezogen und anschließend mittels dieser Vorkultur die jeweilige Hauptkultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft. Für die Analyse des Wachstums in Urin als Nährmedium, wurde der erste morgendliche Urin von 5 – 10 weiblichen und männlichen Personen gesammelt, vereinigt und anschließend abzentrifugiert (20 min, 8000 Upm, Avanti™ JA-10, Beckman, Brea, Kalifornien, USA). Anschließend wurde der Urin sterilfiltriert und jeweils 50 ml in sterile 250 ml Schikanekolben überführt, welche als Hauptkultur für die Wachstumskurven dienten. Die OD<sub>600nm</sub> wurde stündliche photometrisch bestimmt. Für die Analyse des Wachstums in Wundserum als Nährmedium wurde das Wundserum 1:1 mit PBS (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.9 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) verdünnt und anschließend 50 ml in 250 ml Schikanekolben überführt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte nach 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24 und 32 h wie in Kapitel 2.9.1. beschrieben. Für die Analyse des Wachstums in Blutserum als Nährmedium wurde das Blutserum („Normal



Human Serum“, EMD Millipore Corp., Massachusetts, USA) in Wachstumsversuchen mit *A. baumannii* AYE unverdünnt eingesetzt und für die Aufnahme des Wachstums von *A. baumannii* ATCC 19606 zu 50 % [v/v] mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 5 ml des Blutserums in ein Reagenzglas überführt und auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft. Die Lebendzellzahl wurde bei *A. baumannii* ATCC 19606 zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 16, 30 und 36 h bestimmt und im Fall von *A. baumannii* AYE nach 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h. Die Auszählung der Lebendzellzahl erfolgte, wie in Kapitel 2.9.1. beschrieben.

### 2.9.3. Komplementresistenztest

Für die Analyse der Komplementresistenz von *A. baumannii* und den jeweiligen Mutanten wurde menschliches Blutserum verwendet. Das Blutserum wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Kraiczy (Universitätsklinikum, Frankfurt) gestellt und wurde dort, durch das Sammeln von Blutproben verschiedener Mitarbeiter gewonnen und anschließend aufbereitet. Die Lagerung des Serums erfolgte stets bei -80 °C und während der Experimente wurde das Serum immer auf Eis gehalten, um einen Aktivitätsverlust des Komplementsystems zu vermeiden.

Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht in einer 5 ml LB-Kultur. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurde eine 20 ml LB-Kultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C schüttelnd bei 150 Upm bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 – 0,6 innokuliert. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet und zweifach mit PBS<sup>+/+</sup>-Puffer (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137,9 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen (10 min, 4700 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in PBS<sup>+/+</sup>-Puffer resuspendiert und auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 eingestellt. In der Zwischenzeit wurde das Blutserum auf Eis aufgetaut und anschließend, wie in den entsprechenden Experimenten angegeben, mit PBS<sup>+/+</sup> verdünnt. Der Zusatz von MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> ist notwendig, da das Komplementsystem nur in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> aktiv ist. 200 µl des verdünnten Blutserums wurden anschließend in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 10 µl Zellsuspension versehen. Als Kontrolle diente hier ein Reaktionsansatz mit 200 µl PBS<sup>+/+</sup> ohne Blutserum. Der Reaktionsansatz wurde stark gemischt und anschließend für 2 h bei 37 °C und 300 Upm inkubiert. Nach dieser zweistündigen Inkubation wurden 790 µl PBS<sup>+/+</sup> zum Reaktionsansatz gegeben und eine Verdünnungsreihe angefertigt, bis zu einer Verdünnungsstufe von 10<sup>-4</sup>. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-4</sup> auf LB-Platten ausplattiert und die Lebendzellzahl

bestimmt. Für die Analyse der Daten wurde das prozentuale Überleben der jeweiligen Kultur im Blutserum im Vergleich zu der Lebendzellzahl im Kontrollansatz ohne Blutserum gegen die Blutserum-Konzentration aufgetragen.

Um den Effekt von verschiedenen Substraten auf die Komplementresistenz zu untersuchen, wurden den entsprechenden Ansätzen zusätzlich 5 mM des Substrates vor der zweistündigen Inkubation zugeführt (Protocatechuat, *p*-Hydroxybenzoat oder Na-Acetat). Die Anzucht der Zellen veränderte sich hierbei nicht.

#### **2.9.4. Infektionsstudien in *Galleria mellonella*-Larven**

Für die Analyse des Einflusses bestimmter Gene auf die Virulenz von *A. baumannii* wurden die verschiedenen Deletionsmutanten in Infektionsstudien mit *G. mellonella*-Larven getestet. Hierbei wurde das Überleben der Larven über mehrere Tage nach Infektion mit *A. baumannii* festgehalten.

Die Anzucht der verschiedenen Stämme erfolgte über Nacht in 5 ml LB-Medium. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurden 20 ml LB-Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 Upm schüttelnd inkubiert bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 – 1,5. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zweifach mit PBS gewaschen (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.9 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Die gewaschenen Zellen wurden in PBS aufgenommen und auf eine OD<sub>600nm</sub> von 1,5 eingestellt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension (ca. 2·10<sup>6</sup> Zellen) ins hinterste linke Bauchbein injiziert und die Larven sofort über fünf Tage bei 37 °C inkubiert und die Absterberate dokumentiert. Pro Ansatz wurden jeweils 20 etwa gleichgroße Larven (350 – 450 mg) mit derselben Zellsuspension infiziert. Als Kontrollgruppe wurden 20 Larven ausschließlich PBS injiziert und 10 Larven wurden unversehrt inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die Larven bei 4 °C gelagert und bezogen wurden die Larven von „Biosystems Technology Ltd.“ (TruLarv™, Biosystems Technology Ltd., Crediton, US) oder Zoo-Mai (Stiftstraße 16, Frankfurt am Main, Deutschland). Von jeder Zellsuspension wurde zusätzlich die Lebendzellzahl bestimmt, wie in Kapitel 2.9.1. beschrieben, zur Sicherstellung, dass dieselbe Anzahl an Zellen injiziert wurden.

Für die zusätzliche Analyse, ob bestimmte Substrate einen Einfluss auf den Infektionserfolg von *A. baumannii* in *G. mellonella*-Larven haben, wurde den Larven zusätzlich 10 µl einer 5 mM Stammlösung des jeweiligen Substrates injiziert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe

ausschließlich mit dem Substrat mitgeführt. Als Substrate wurden D-Malat, Carnitin und Acetylcarnitin getestet.

### 2.9.5. Antibiotikaresistenztest

Für die Untersuchung der Effekte von verschiedenen Gendeletionen in *A. baumannii* auf die Antibiotikaresistenz des Stammes wurden die jeweiligen Mutanten über Nacht in 5 ml LB-Medium oder MM angezogen und die stationären Kulturen am nächsten Morgen mit Saline (0,9 % NaCl) auf eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 verdünnt. Mittels der Zellsuspensionen wurden anschließend Verdünnungsreihen angefertigt bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-7</sup> und jeweils 5 µl jeder Verdünnung auf eine LB-Platte bzw. MM-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum getropft. Verwendet wurden Antibiotikakonzentrationen, bei denen das Wachstum bereits gehemmt wurde, jedoch noch nicht völlig zum Erliegen kam. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend fotografisch festgehalten.

### 2.10. Transportstudien mit radioaktiv markierten Substraten in *E. coli* MKH13-Zellen

Die Transportstudien mit radioaktiv markiertem Substrat erfolgten unter Einsatz von *E. coli* MKH13-Zellen. Die Gene der Transporter wurden in diesem Expressionsstamm, wie in Kapitel 2.4.1. beschrieben, während des Wachstums in LB-Medium exprimiert und anschließend wurden die Zellen geerntet und in 25 ml Ax-Puffer zweifach gewaschen (100 mM NaCl, 25 mM KPi-Puffer (814 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 186 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)). Nach dem Waschen der Zellen wurde die Zellsuspension auf eine OD<sub>600nm</sub> von 3,0 eingestellt und 1:1 mit dem Puffer Bx verdünnt. Der Puffer Bx entsprach dem Puffer Ax eingestellt mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 30, Genotec) auf verschiedene Osmolalitäten mit 1 M KCl. In der Endkonzentration befanden sich in der 1:1 verdünnten Zellsuspension 0,2 osmol/kg, 0,4 osmol/kg, 0,6 osmol/kg, 0,8 osmol/kg oder 1 osmol/kg.

Für die Transportstudien wurden 10 ml der Zellsuspensionen für 3 min bei 37 °C inkubiert und anschließend der Transport durch die Zugabe von 1 µCi [<sup>14</sup>C]-Substrat und 500 µM des unmarkierten Substrates, in der Endkonzentration, gestartet. Sowohl Cholin als auch Glycinbetain und Carnitin wurden als [<sup>14</sup>C]-Isotop der Marke Moravek (Biotrend, Köln, DE) eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 200 µl der Zellsuspension entnommen und durch einen Nitrocellulosefilter (Ø 0,45 µM, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE) filtriert.

Die Zellen wurden mit 5 ml 0,6 M KPi-Puffer gewaschen und durch die Inkubation des Filters für 30 min in Szintillationsflüssigkeit aufgelöst. Die Zerfälle pro Minute (cpm) in der Lösung wurden im Szintillationszähler (Wallac, 1409 DSA) gemessen und anschließend daraus die Konzentration des aufgenommenen Substrates berechnet.

Für die Bestimmung der  $K_M$ -Werte wurde die Substratkonzentration des unmarkierten Substrates von 0 – 500  $\mu\text{M}$ , wie angegeben, variiert und die Transportrate gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Der  $K_M$ -Wert wurde anschließend mittels GraphPad Prism<sup>®</sup> (GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 6.01 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA) bestimmt.

### **2.11. Bestimmung des Gesamt-ATP-Gehaltes in ganzen Zellen**

Die Bestimmung des Gesamt-ATP-Gehaltes von *A. baumannii* unter verschiedenen Bedingungen wurde mit ganzen Zellen durchgeführt. Hierfür wurden 500 ml MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle und 20 mM Cholin, zur Induktion der Expression der Gene für die Cholin-Oxidation, auf eine  $OD_{600\text{nm}}$  von 0,1 angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und einmal mit PBS (2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137,9 mM NaCl, 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) gewaschen (20 min, 4700 Upm, 4 °C; MegaStar 1.6R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Das Zellsediment wurde in 2 ml PBS aufgenommen, die Proteinkonzentration nach Schmidt (Kapitel 2.6.4.) bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt.

Anschließend wurden 10 ml dieser Zellsuspension für 10 min auf 37 °C erwärmt und für die Bestimmung des Ausgangsgehaltes an ATP drei Proben á 400  $\mu\text{l}$  entnommen und zu 150  $\mu\text{l}$  3 M Perchlorsäure gegeben. Die ATP-Produktion wurde durch die Zugabe von 10 mM Cholin gestartet und nach 0,5, 1, 3, 5, 10 und 20 min wurden 400  $\mu\text{l}$  entnommen und zu 150  $\mu\text{l}$  3 M Perchlorsäure gegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation der Proben in der Perchlorsäure auf Eis wurden 40  $\mu\text{l}$  einer gesättigten  $\text{KCO}_3$ -Lösung, 80  $\mu\text{l}$  TES-Puffer (pH 7,6) und 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  zugegeben. Anschließend wurden für die ATP-Bestimmung 10  $\mu\text{l}$  des zellfreien Überstandes (13300 Upm, 5 min, 4 °C; Micro Star 17R, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) mit 300  $\mu\text{l}$  Bestimmungspuffer vermengt (5 mM  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , 4mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Glycylglycin), mit 20  $\mu\text{l}$  Luziferin-Luziferase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) versetzt und die freiwerdenden Lichtblitze im Luminometer gemessen. Für die Umrechnung der Lichtblitze in die ATP-Konzentration wurde eine ATP-Eichgrade erstellt mit verschiedenen ATP-Konzentrationen.

## 2.12. Messung der Cholin-Oxidation mittels Sauerstoffelektrode

Für die Bestimmung der Cholin-Dehydrogenase-Aktivität wurde mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode der Sauerstoffverbrauch während der Oxidation von Cholin in Anwesenheit von dem primären Elektronenakzeptor Phenazinmethosulfat (PMS) gemessen. Hierbei werden die freiwerdenden Elektronen während der Oxidationsreaktion vom PMS aufgenommen und anschließend reoxidiert der Elektronenakzeptor unter Sauerstoffverbrauch. Der Verbrauch von 1  $\mu\text{mol O}_2$  korrespondiert dabei mit 1 U enzymatischer Aktivität der Cholin-Dehydrogenase.

Für die Reaktion wurden 2,7 ml Sauerstoff-gesättigter Messpuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Imidazol, pH 7,0) mit 1 mM PMS und 20  $\mu\text{g}$  BetA versetzt und 3 min rührend bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 mM Cholin gestartet und der Sauerstoffverbrauch über 3 min gemessen. Für die Analyse der Salzabhängigkeit des Enzyms wurden dem Reaktionsansatz vor der Vorinkubation verschiedene Konzentrationen an NaCl oder KCl zugesetzt. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde der Messpuffer durch eine Puffermischung (50 mM Tris, 50 mM MES, 50 mM TES) ausgetauscht, deren pH-Wert zwischen 5,0 und 10,0 lag. Für die Analyse der Lokalisation von BetA wurde die spezifische Aktivität von BetA im zellfreien Rohextrakt, im Cytoplasma und in den Membranen gemessen und verglichen. Das Cytoplasma wurde mittels Ultrazentrifugation von den Membranen getrennt (40000 U<sub>pm</sub>, 1 h, 4 °C, Optima™ L-90 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA). Der  $K_M$ -Wert wurde durch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Cholin ermittelt und die hemmende bzw. stimulierende Wirkung von anderen kompatiblen Soluten auf die Enzymaktivität von BetA, wurde durch die Zugabe von dem 50-fachen Überschuss des jeweiligen Solutes vor der Vorinkubation untersucht.

## 2.14. „Electrophoretic Mobility Shift“-Analysen (EMSA)

Für die Analyse der DNA-Bindung des Regulators CarR an die DNA-Region stromaufwärts des Clusters für die Verstoffwechslung von Carnitin wurde der Regulator in *E. coli* BL21 STAR™ (DE3) produziert (Kapitel 2.4.2.), aufgereinigt (Kapitel 2.5.1.) und anschließend in verschiedenen Konzentrationen mit dem entsprechenden DNA-Fragment inkubiert. Für die Amplifikation des DNA-Fragments wurden die Starteroligonukleotide *carR\_mdh\_for* und *carR\_mdh\_rev* verwendet (Tab. 9). Der Reaktionsansatz betrug hierbei 20  $\mu\text{l}$  und eingesetzt wurden 233 fmol DNA, 2  $\mu\text{l}$  10 x EMSA-Reaktionspuffer (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M

KCl, 50 % [v/v] Glycerin, pH 8,0) und 0 – 81 pmol Protein. Für die Analyse des Effekts verschiedener Intermediate des Stoffwechselweges auf die Interaktion des Regulatorproteins CarR mit der DNA wurden zusätzlich 1 mM des Effektors hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der gesamte Reaktionsansatz mit 2 µl 10 x EMSA-Ladepuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 50 % [v/v] Glycerin, eine Spatelspitze Bromphenolblau, eine Spatelspitze Xylen-Cyanol, pH 8,0) versetzt und auf das native Polyacrylamidgel aufgetragen (2 ml 10 x TAE, 2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 15,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 0,5 ml 10 % [w/v] APS, 12 µl TEMED; vor der Zugabe des TEMED wurde die Lösung 15 min mit N<sub>2</sub> durchgast). Das Gel wurde in 1 x TAE-Puffer (10 x TAE: 400 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8,0) für 2 – 3 min bei 300 V einlaufen gelassen und anschließend bei 150 V bis zur Gelbfärbung der Bromphenolblau-Lauffront (20 – 30 min) laufen gelassen. Die DNA wurde in einem Ethidiumbromidbad für 5 min angefärbt und mittels UV-Licht detektiert.

### **2.15. Verwendete Chemikalien**

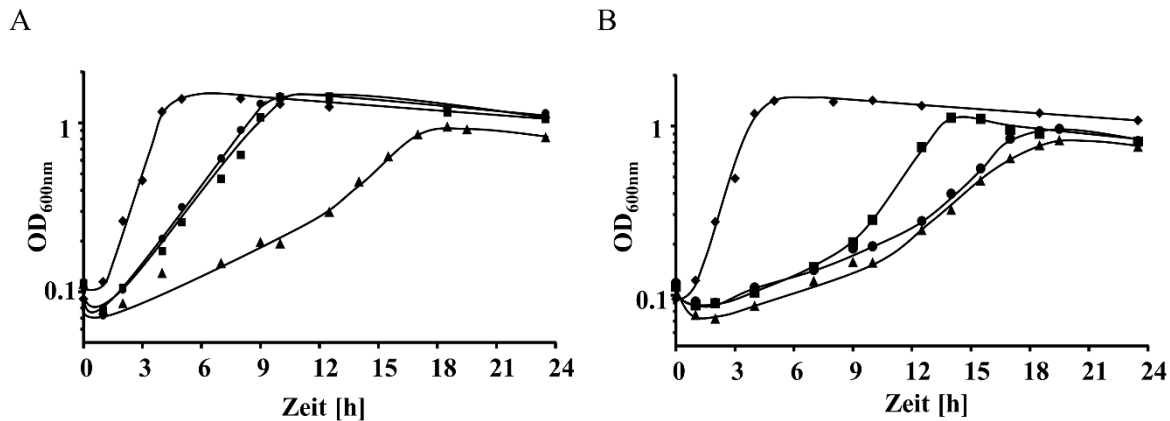
Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen stammen, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Rolle des kompatiblen Solute Glycinbetain und seines Vorläufers Cholin in der Osmostress Adaptation von *A. baumannii* ATCC 19606

##### 3.1.1. Cholin und Glycinbetain werden unter hyperosmotischen Bedingungen durch BCCT aufgenommen

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass *A. baumannii* ATCC 19606 vier verschiedene BCCT besitzt, die entweder für die Aufnahme von Cholin oder Glycinbetain verantwortlich sind. Die Transporter BetT1, BetT2 und Aci01347 sind Osmostress-abhängige (BetT2) bzw. -unabhängige Cholintransporter (BetT1, Aci01347) und der sekundär aktive Transporter BetU1 ist ein Osmostress-abhängiger Glycinbetaintransporter (Breisch *et al.*, 2018; Breisch und Averhoff, 2020). Um zu überprüfen, ob weitere Gene für beispielsweise primär aktive Transporter für die Aufnahme von Cholin oder Glycinbetain im Genom von *A. baumannii* ATCC 19606 vorhanden sind, wurde eine BCCT-Vierfachmutante generiert und in Wachstumsstudien unter Salzstress analysiert. In der Vierfachmutante wurden die Gene *betT1*, *betT2*, *betU1* und *aci01347* markerlos deletiert und die Deletionen mittels Sequenzierung überprüft. Für die Erstellung dieser Mutante wurde die markerlose Dreifachmutante  $\Delta betT1/betT2/aci01347$  (Breisch *et al.*, 2018; Breisch und Averhoff, 2020) und das Plasmid pBIISK\_ *sacB/kanR\_betU1* (Breisch und Averhoff, 2020) verwendet. Das Plasmid enthielt zum einen 1500 Bp des flankierenden Stromaufwärts- und Stromabwärtsbereichs des Gens *betU1* und zum anderen eine Kanamycin-Kassette und das Gen der Levansucrase. Die Kanamycin-Kassette wurde als Selektionsmarker während der Integration verwendet und über die Levansucrase konnte die Segregation durch Zugabe von Saccharose, welche in das toxische Endprodukt Levan umgewandelt wird, eingeleitet werden. Über die flankierenden Bereiche wurde das gesamte Plasmid mittels homologer Rekombination in den Genlokus von *betU1* eingebracht und die Integranden wurden über die Aufnahme der Kanamycin-Kassette selektioniert. Im Folgenden wurde, über Gegenselektion mit Saccharose, das Plasmid erneut über homologe Rekombination aus dem Genom segregiert und die markerlose Mutante mittels Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurde das Wachstum dieser  $\Delta bcct$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in MM unter iso- und hyperosmotischen Bedingungen und in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 1 mM Cholin oder Glycinbetain untersucht (Abb. 9).



**Abb. 9. Die Rolle der BCCT bei der Akkumulation des kompatiblen Solutes Glycinbetain oder des Vorläufers Cholin unter hyperosmotischen Bedingungen.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp (A) und die  $\Delta bcct$ -Deletionsmutante (B) wurden in MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle angezogen und der Effekt verschiedener Medienzusätze analysiert (MM:  $\blacklozenge$ ; MM + 500 mM NaCl:  $\blacktriangle$ ; MM + 500 mM NaCl + 1 mM Cholin:  $\bullet$ ; MM + 500 mM NaCl + 1 mM Glycinbetain:  $\blacksquare$ ). Die Anzucht erfolgte schüttelnd bei 37 °C und über 24 h. Die OD<sub>600nm</sub> wurde stündlich dokumentiert. Dargestellt wurde jeweils eine representative Kurve aus drei biologischen Replikaten.

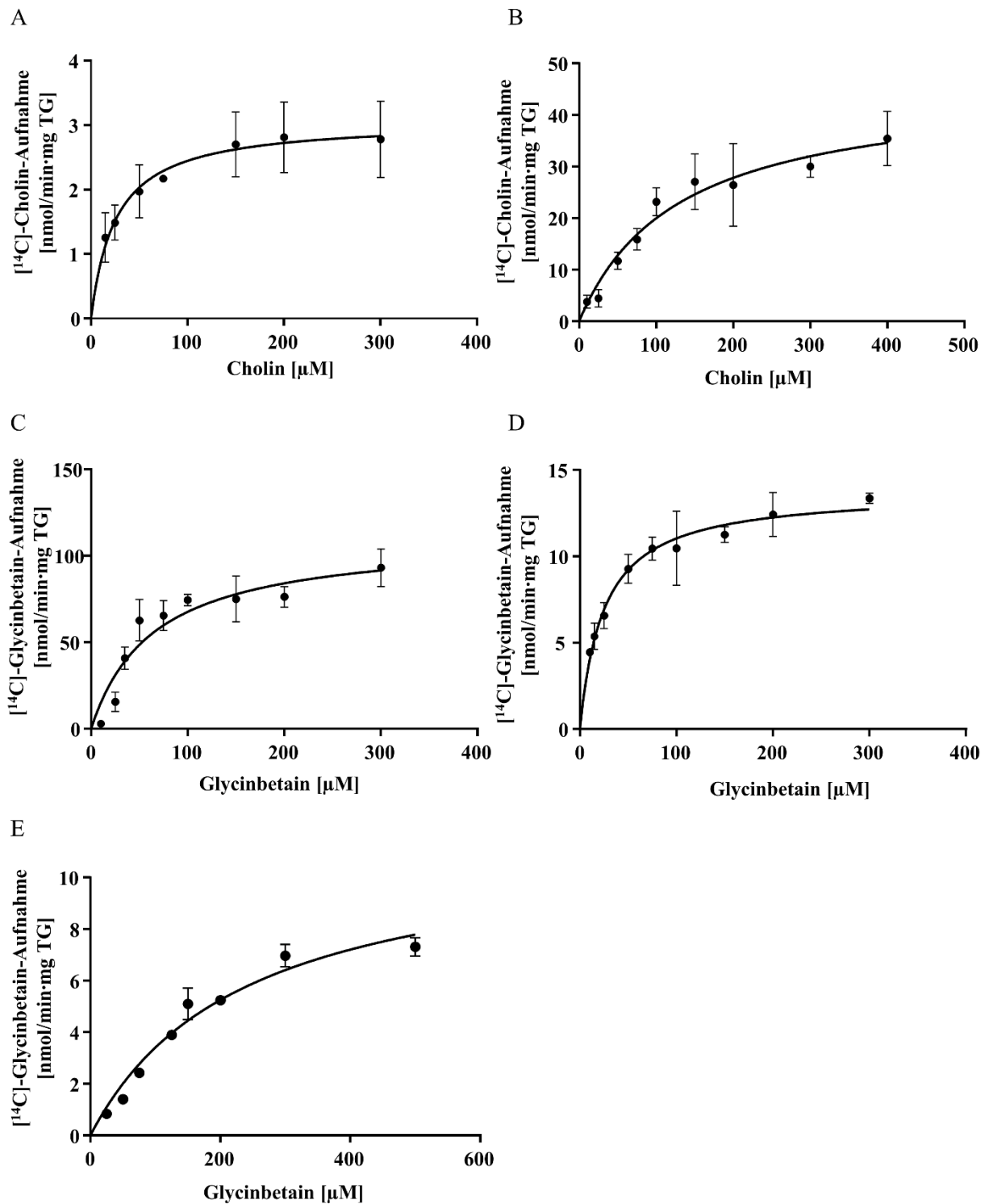
Bei einem Vergleich des Wachstums des Wildtyps (Abb. 9 A) mit dem Wachstum der  $\Delta bcct$ -Mutante (Abb. 9 B) zeigte sich, dass die Deletion der vier BCCT keinen Effekt auf das Wachstum in MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle hatte. Sowohl für den Wildtyp als auch für die  $\Delta bcct$ -Mutante konnte unter diesen Bedingungen eine Wachstumsrate von  $0,8 \text{ h}^{-1}$  bestimmt werden. Auch in Anwesenheit von 500 mM NaCl unterschieden sich die Wachstumsraten des Wildtyps und der  $\Delta bcct$ -Mutante nicht (Wildtyp:  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ,  $\Delta bcct$ :  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ), wohingegen die Zugabe von 1 mM Cholin zum MM mit 500 mM NaCl und 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle zu deutlichen Unterschieden führte. Während der Wildtyp in Anwesenheit von Cholin und Hochsals eine Wachstumsrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  aufwies, konnte das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen der  $\Delta bcct$ -Mutante durch die Zugabe von Cholin nicht verbessert werden ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ). Durch die Zugabe des kompatiblen Solutes Glycinbetain unter hyperosmotischen Bedingungen konnte die Wachstumsrate des Wildtyps auf  $0,4 \text{ h}^{-1}$  gesteigert werden, während für die  $\Delta bcct$ -Mutante nur eine geringe Zunahme der Wachstumsrate von  $0,2 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,3 \text{ h}^{-1}$  ermittelt werden konnte. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die  $\Delta bcct$ -Deletionsmutante keine weiteren Transporter für die Aufnahme von Cholin besitzt, da das Wachstum unter Salzstress durch die Zugabe von Cholin, dem Vorläufer des kompatiblen Solutes Glycinbetain, nicht verbessert werden konnte. Die leichte Steigerung der Wachstumsrate der Mutante unter hyperosmotischen Bedingungen in Anwesenheit von



Glycinbetain spricht für das Vorhandensein weiterer primär oder sekundär aktiver Transporter für die Aufnahme von Glycinbetain in *A. baumannii* ATCC 19606.

### 3.1.2. Vergleich der Transportraten der BCCT in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

In Genomanalysen wurden in dem virulenteren *A. baumannii* Stamm AYE zwei weitere BCCT detektiert, BetU2 und BetU3 und durch Transportstudien konnte gezeigt werden, dass beide Transporter Glycinbetain transportieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass einer dieser BCCT Osmostress-abhängig (BetU2) und einer Osmostress-unabhängig (BetU3) ist (Breisch und Averhoff, 2020). Das Vorhandensein verschiedener Transporter mit gleichem Substratspektrum, wie es für die Glycinbetaintransporter BetU1, BetU2 und BetU3 in *A. baumannii* AYE und für die Cholintransporter BetT1 und BetT2 in *A. baumannii* AYE und ATCC 19606 der Fall ist, führte zu der Frage, ob diese Transporter unterschiedliche Transportraten und damit unterschiedliche Affinitäten zu ihren Substraten aufweisen. Für die Bestimmung der Transportraten wurden die jeweiligen Transporter in dem *E. coli*-Stamm MKH13 überproduziert und anschließend die  $K_M$ -Werte der verschiedenen Transporter in Zellsuspensionsexperimenten bestimmt. Hierbei wurden die Transporter BetT1, BetT2 und BetU1 aus den *A. baumannii* Stamm ATCC 19606 untersucht und die Transporter BetU2 und BetU3 aus *A. baumannii* AYE. Die Gene der Transporter lagen bereits in dem Vektor pBAD\_HisA kloniert vor und das Plasmid wurde anschließend in *E. coli* MKH13 transformiert (Breisch und Averhoff, 2020). Die Anzucht, Induktion und Vorbereitung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.4.1. beschrieben und die Messung der Transportraten erfolgte mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen und in Gegenwart von radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-Cholin oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Glycinbetain, wie in Kapitel 2.10. beschrieben. Die Messungen erfolgten unter den bereits bestimmten optimalen osmotischen Bedingungen. Hierbei zeigten die Transporter BetT1 und BetU3 die höchste Aktivität von 5,3 nmol Cholin/min·mg TG (BetT1) und 14,2 nmol Glycinbetain/min·mg TG (BetU3) bei einer externen Osmolalität von 0,2 osmol/kg, die Transporter BetT2 und BetU1 bei 0,6 osmol/kg, mit 25,6 nmol Cholin/min·mg TG bzw. 35,7 nmol Glycinbetain/min·mg TG und der Transporter BetU2 bei 0,8 osmol/kg mit 27,5 nmol Glycinbetain/min·mg TG (Breisch und Averhoff, 2020). Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10.** Die Transportraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration der BCCT BetT1 (A), BetT2 (B), BetU1 (C) aus *A. baumannii* ATCC 19606 und BetU2 (D) und BetU3 (E) aus *A. baumannii* AYE. Die rekombinanten *E. coli* MKH13-Stämme wurden in LB-Medium angezogen, geerntet und in KP<sub>i</sub>-Puffer resuspendiert (Kapitel 2.4.1. und 2.10.). Anschließend wurden unter den optimalen osmotischen Bedingungen (0,2 osmol/kg: BetT1, BetU3; 0,6 osmol/kg: BetT2, BetU1; 0,8 osmol/kg: BetU2) die Transportraten der Transporter in Anwesenheit von verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Die Aufnahme wurde gestartet durch die Zugabe von 1  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat und den angegebenen Substratkonzentrationen von nicht-markiertem Cholin oder Glycinbetain. Dargestellt wurde der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

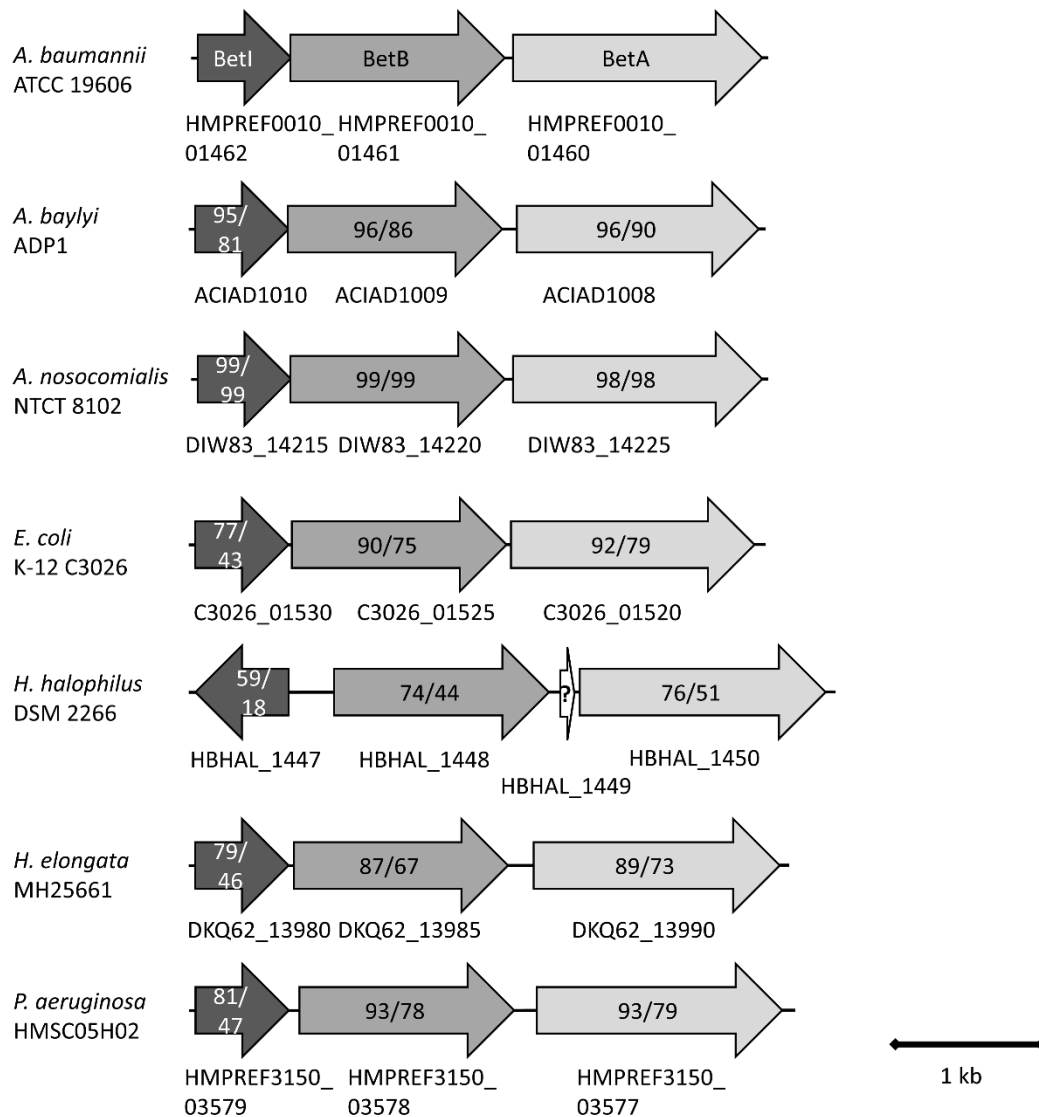
Wie in Abb. 10 dargestellt, nahm der Cholintransporter BetT1 (Abb. 10 A), bei einer Osmolalität von 0,2 osmol/kg, Cholin mit einer deutlich geringeren Transportrate (2,7 nmol/min·mg TG) auf als BetT2 (34 nmol/min·mg TG) bei 0,6 osmol/kg (Abb. 10 B). Die  $K_M$ -Werte der beiden Transporter wurden mit Hilfe von GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 6.01 berechnet und unterschieden sich ebenfalls. Die  $K_M$ -Werte lagen bei 25,6  $\mu$ M für BetT1 und 129,2  $\mu$ M für BetT2. Obwohl der Cholintransporter BetT1 eine deutlich langsamere Aufnahme von Cholin zeigte, hatte dieser Transporter eine fünffach höhere Affinität zu seinem Substrat. Anders hingegen war es bei den Transportern für das kompatible Solut Glycinbetain. Für die Osmostress-abhängigen Transporter BetU1 (0,6 osmol/kg; Abb. 10 C) und BetU2 (0,8 osmol/kg; Abb. 10 D) konnten  $K_M$ -Werte von 64,5  $\mu$ M und 24,8  $\mu$ M ermittelt werden, während für den Osmostress-unabhängigen Transporter BetU3 (0,2 osmol/kg; Abb. 10 E) ein  $K_M$ -Wert von 237,2  $\mu$ M ermittelt wurde. Die Aufnahmeraten der Transporter unterscheiden sich ebenfalls stark, bei BetU1 konnten Aufnahmeraten von bis zu 100 nmol/min·mg TG festgestellt werden, wohingegen die Transporter BetU2 und BetU3 Glycinbetain deutlich langsamer transportieren, mit Aufnahmerate bis zu 12 nmol/min·mg TG und 7 nmol/min·mg TG. Diese Studien zeigten, dass die Osmostress-abhängigen Glycinbetaintransporter eine deutlich höhere Affinität zu ihrem Substrat haben und damit eine schnelle Aufnahme des kompatiblen Solutes unter hyperosmotischen Bedingungen, selbst bei niedrigen Glycinbetain-Konzentrationen in der Umwelt, gewährleisten. Die Aufnahme von Glycinbetain unter isoosmotischen Bedingungen ist hingegen abhängig von den Konzentrationen dieses Substrates in der Umgebung.

### 3.1.3. Cholin wird über das *betIBA*-Cluster zu Glycinbetain oxidiert

#### 3.1.3.1. *In silico* Analyse des *betIBA*-Clusters

Das kompatible Solut Glycinbetain kann nicht nur direkt aus der Umgebung aufgenommen werden, es wird auch durch die Oxidation seines Vorläufers Cholin synthetisiert. Aus anderen Organismen, wie beispielsweise *A. baylyi*, ist bekannt, dass diese Oxidation über die Genprodukte des *betIBA*-Clusters abläuft. Auch im Genom von *A. baumannii* ATCC 19606 konnte dieses Cluster detektiert werden. Stromaufwärts der Gene der Cholintransporter BetT1 und BetT2 liegen drei Gene, die für die Cholin-Dehydrogenase, BetA, die Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase, BetB, und den transkriptionellen Regulator der TetR-Familie, BetI, kodieren. Die Proteine haben große Ähnlichkeit zu den Genprodukten des *betIBA*-Clusters aus

*A. baylyi* ADP1, mit Identitäten und Ähnlichkeiten von 90 % und 96 % für *betA*, 86 % und 96 % für *betB* und 81 % und 95 % für *betI*. Die Genprodukte haben ebenfalls große Ähnlichkeiten zu den Genprodukten des *betIBA*-Clusters in anderen Bakterien, in denen dieser Oxidationsweg bereits beschrieben wurde, wie z. B. in *A. nosocomialis*, *E. coli* oder *P. aeruginosa* (Abb. 11).

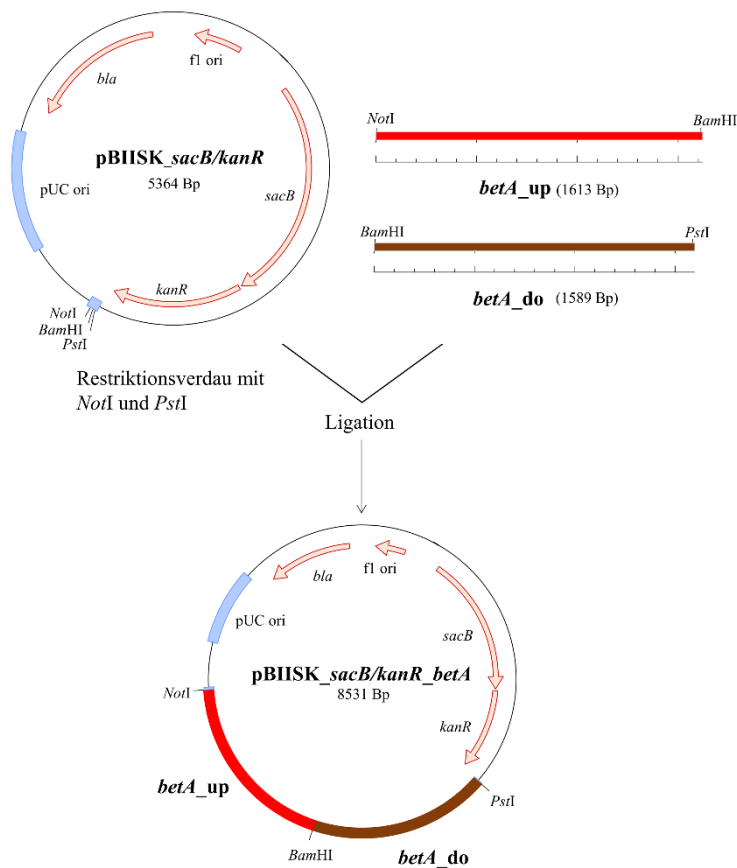


**Abb. 11. Genetische Organisation des *betIBA*-Clusters in *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. nosocomialis*, *E. coli*, *Halobacillus halophilus*, *Halomonas elongata* und *P. aeruginosa*.** Die Gene, welche für die Enzyme des Cholin-Oxidationsweges kodieren sind bei verschiedenen Bakterien in einem Cluster lokalisiert. *betA* kodiert hierbei für die Cholin-Dehydrogenase, *betB* für die Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase und *betI* für den transkriptionellen Regulator der TetR-Familie des Clusters. Die Ähnlichkeiten und Identitäten der Proteine zu den Proteinen aus *A. baumannii* ATCC 19606 sind in den Pfeilen angegeben (Ähnlichkeit/Identität).

Um die Funktion des *betIBA*-Clusters eindeutig zu klären, sollten Mutantenstudien durchgeführt werden. Dafür sollte zunächst eine markerlose  $\Delta betA$ -Mutante in *A. baumannii* ATCC 19606 generiert werden und der Phänotyp der Mutante analysiert werden.

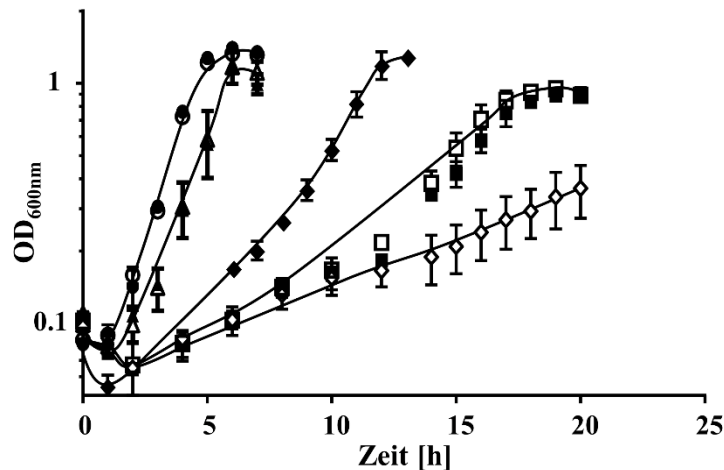
### 3.1.3.2. Einfluss von Cholin auf das Wachstum der $\Delta betA$ -Mutante unter Salzstress

Für die Analyse der Rolle des *betIBA*-Clusters bei der Cholin-Oxidation in *A. baumannii* ATCC 19606 wurde eine markerlose Deletionsmutante des Gens *betA* erstellt, welches für die potenzielle Cholin-Dehydrogenase kodiert. Hierfür wurde das Plasmid pBIISK\_*sacB/kanR/betA* nach dem Klonierungsschema in Abb. 12 erstellt und anschließend mit Hilfe des Plasmides das Gen *betA* markerlos deletiert. Die markerlose Deletion erfolgte über eine doppelte homologe Rekombination, durch den 1500 Bp Stromauf- und Stromabwärtsbereich des Gens *betA*. Für die Selektion auf Integration des Plasmides in das Genom wurde die Kanamycinresistenz verwendet, die von der Kanamycin-Kassette innerhalb des Plasmides vermittelt wird und für die Segregation des Gens und des Plasmides wurde die von dem *sacB* Gen vermittelte Toxizität von Saccharose genutzt (Stahl *et al.*, 2015). Die erfolgreiche Deletion wurde mittels Sequenzierung verifiziert.



**Abb. 12** Klonierungsschema des Plasmides *pBIISK\_sacB/kanR\_betA* für die markerlose Deletion des Gens *betA* in *A. baumannii* ATCC 19606. Die Stromaufwärts- (*betA\_up*) und Stromabwärtsbereiche (*betA\_do*) des Gens *betA* wurden mit Hilfe der Starteroligonukleotide *betA\_up\_for\_NotI* und *betA\_up\_rev\_BamHI*, sowie *betA\_do\_for\_BamHI* und *betA\_do\_rev\_PstI* amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *PstI* in den Vektor *pBIISK\_sacB/kanR* kloniert.

Anschließend wurde das Wachstum der  $\Delta betA$ -Mutante in MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle und in An- und Abwesenheit von 500 mM NaCl und mit bzw. ohne 1 mM Cholin oder Glycinbetain untersucht (Abb. 13).



**Abb. 13. Die Rolle von BetA bei der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain unter hyperosmotischen Bedingungen.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp (gefüllte Symbole) und die  $\Delta betA$ -Deletionsmutante (offene Symbole) wurden in MM mit 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle angezogen und der Effekt von Hochsalm, Cholin und Glycinbetain analysiert (MM: ●/○; MM + 500 mM NaCl: ■/□; MM + 500 mM NaCl + 1 mM Cholin: ◆/◇; MM + 500 mM NaCl + 1 mM Glycinbetain: ▲/△). Die Anzucht erfolgte schüttelnd bei 37 °C und über 20 h. Die OD<sub>600nm</sub> wurde stündlich dokumentiert. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Durch den Vergleich des Wachstums des Wildtyps und der  $\Delta betA$ -Mutante (Abb. 13) war ersichtlich, dass die Deletion der Cholin-Dehydrogenase keinen Einfluss auf das Wachstum in MM ohne Hochsalm hatte. Der Wildtyp und die Deletionsmutante wiesen jeweils eine Wachstumsrate von  $0,65 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,64 \text{ h}^{-1}$  auf. Unter Salzstress, welcher induziert wurde durch die Zugabe von 500 mM NaCl, konnte eine verminderte Wachstumsrate bei beiden Stämmen detektiert werden, die jeweils vergleichbar war ( $0,21 \text{ h}^{-1}$  für den Wildtyp und  $0,24 \text{ h}^{-1}$  für  $\Delta betA$ ). Unter Hochsalm und in Anwesenheit von Glycinbetain wiesen der Wildtyp und die  $\Delta betA$ -Mutante vergleichbare Wachstumsraten von  $0,68 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,71 \text{ h}^{-1}$  auf. Die Aufnahme des kompatiblen Solutes Glycinbetain war somit in der  $\Delta betA$ -Mutante nicht beeinträchtigt. Ein deutlicher Unterschied war allerdings ersichtlich, bei dem Wachstum des Wildtyps und der  $\Delta betA$ -Mutante in MM mit 500 mM NaCl und 1 mM Cholin. Während der Wildtyp hier eine verbesserte Wachstumsrate von  $0,36 \text{ h}^{-1}$  aufwies im Vergleich zum Wachstum unter Salzstress ohne Cholin, wuchs die Deletionsmutante lediglich mit einer Wachstumsrate von  $0,07 \text{ h}^{-1}$ , sodass sich das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen durch die Anwesenheit von Cholin sogar verlangsamte. Diese Befunde führen zu dem Schluss, dass die  $\Delta betA$ -Mutante Cholin nicht zu Glycinbetain oxidieren kann und somit kein Ausgleich des hyperosmotischen Stresses möglich war. Viel mehr führte die Akkumulation von Cholin sogar zu einer Beeinträchtigung des Wachstums. Solch ein wachstumsinhibitorischer Effekt durch die

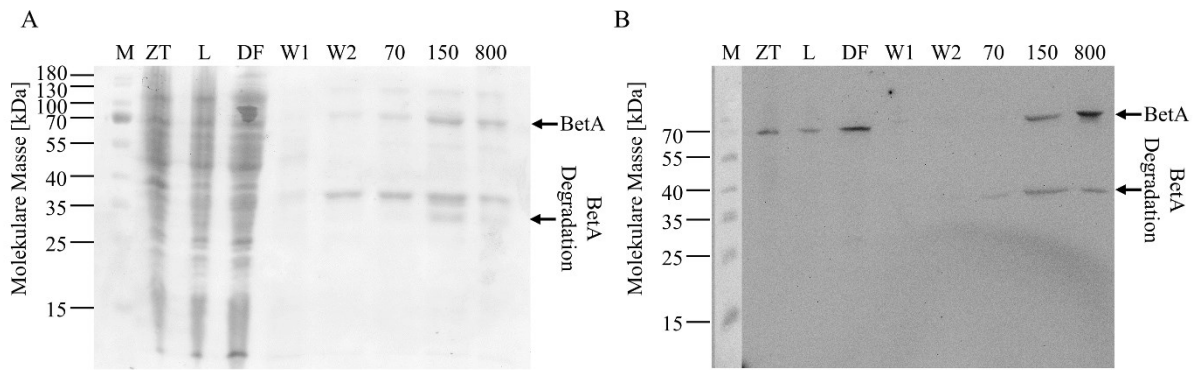
intrazelluläre Akkumulation von positiv geladenem Cholin konnte ebenfalls für andere Organismen wie *B. subtilis* beschrieben werden (Boch *et al.*, 1996).

### **3.1.4. Biochemische Charakterisierung der Cholin-Dehydrogenase BetA**

#### **3.1.4.1. Aufreinigung der Cholin-Dehydrogenase BetA**

Zur biochemischen Charakterisierung der Cholin-Dehydrogenase aus *A. baumannii* wurde BetA in *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> (DE3) überproduziert und anschließend aufgereinigt, wie in Kapitel 2.4.3. und 2.5.2. beschrieben. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe eines C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags und Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Hierfür wurde in einem ersten Schritt die Cholin-Dehydrogenase in den Vektor pT7-7 kloniert und der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag über die Starteroligonukleotide angefügt (Breisch *et al.*, 2021). Anschließend wurde das Plasmid in den *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> (DE3)-Stamm transformiert, das Protein nach der Expression partiell aufgereinigt und mittels immunologischer Detektion verifiziert. Die Überprüfung des Reinigungserfolgs erfolgte über Auftrennung im SDS-Gel und anschließendem Western Blot (Abb. 14). Anschließend wurden mit der partiell aufgereinigten Cholin-Dehydrogenase Aktivitätsbestimmungen mit Hilfe einer Clark Sauerstoffelektrode durchgeführt (Kapitel 2.12.). In diesen Aktivitätstests konnten das pH-Optimum, die Salzabhängigkeit, die Substratspezifität und die Substrataffinität in Form des K<sub>M</sub>-Wertes bestimmt werden. Die zelluläre Lokalisation von BetA wurde durch die Bestimmung der Cholin-Dehydrogenase-Aktivität im Lysat und den Membranen von Zellen, nach Produktion von BetA, ermittelt.





**Abb. 14. Aufreinigung von BetA aus *E. coli* BL21 STAR™ (DE3) mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.** Die Expression und Produktion von BetA erfolgte während der Anzucht in 2 x YT-Medium bei 30 °C. Die Zellen wurden 48 h inkubiert und anschließend die Expression von *betA* durch die Zugabe von 1 mM IPTG für eine Stunde induziert. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und das zellfreie Lysat für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet. Aufgetragen wurden die Zelltrümmer nach dem Aufschluss (ZT), das geklärte Lysat (L), der Durchfluss nach dem Auftragen des Lysats auf die Matrix (DF), die erste Waschfraktion (W1), die zweite Waschfraktion (W2), die Waschfraktion mit 70 mM Imidazol (70) und die Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol (150), sowie 800 mM Imidazol (800). Als Größenstandard (M) wurde der „PreStained Protein Standard“ von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (A) und die Detektion der Proteine auf dem Western Blot (B) erfolgte nach Angaben in Kapitel 2.6.2. Die Pfeile kennzeichnen das Zielprotein BetA bei 64 kDa und das Abbauprodukt von BetA bei 35 kDa. Der Größenstandard wurde mit M gekennzeichnet.

Wie in Abb. 14 ersichtlich, konnte nach der Überproduktion von BetA und der anschließenden Ernte und dem Aufschluss der Zellen das Zielprotein sowohl in den Zelltrümmern (Abb. 14 A, Spur: ZT) als auch im Lysat (Spur: L) detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass nicht alle Zellen vollständig aufgeschlossen wurden und somit teilweise Zielprotein mit abzentrifugiert wurde. Nachdem das geklärte Lysat auf die Ni-NTA-Matrix gegeben wurde, konnte im Durchfluss weiterhin BetA detektiert werden (Spur: DF), da die Bindekapazität der Säule erreicht war. Im Anschluss daran wurde das Säulenmaterial mit dem gebundenen Zielprotein dreifach gewaschen, wodurch ausschließlich Verunreinigungen entfernt wurden (Spuren: W1, W2, 70). Anschließend wurde das Zielprotein in zwei Schritten eluiert. Sowohl bei der Elution mit 150 mM Imidazol (Spur: 150) als auch bei der Elution mit 800 mM Imidazol (Spur: 800) konnte BetA mit einer ermittelten molekularen Masse von 64 kDa erfolgreich von der Säule gelöst werden (Abb. 14 A und B). Während dieser Reinigung konnte eine Degradation von BetA (35 kDa BetA-Protein) festgestellt werden. Die höchste Aktivität konnte mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests, wobei der Sauerstoffverbrauch, während der BetA-abhängigen Cholin-Oxidation gemessen wurde (Kapitel 2.12.), in der Elutionsfraktion

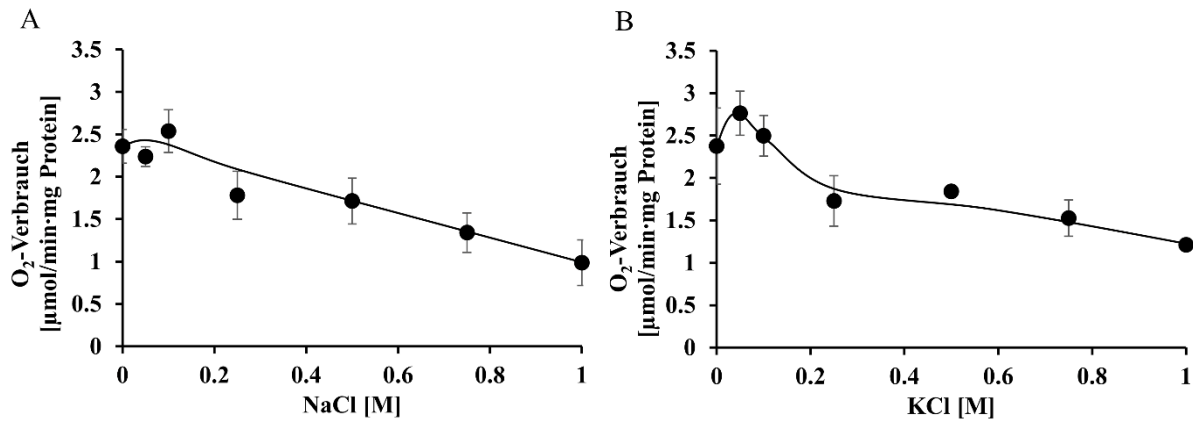
gemessen werden, die mit 800 mM Imidazol gewonnen wurde. Hierbei lag die Aktivität von BetA bei  $1,37 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$ , während die BetA-abhängige Sauerstoffverbrauchsrate der ersten Elutionsfraktion lediglich bei  $0,33 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$  lag.

#### **3.1.4.2. BetA ist eine membranständige Cholin-Dehydrogenase**

Zur Überprüfung der Lokalisation der Cholin-Dehydrogenase wurde die BetA-abhängige Sauerstoffverbrauchsrate im zellfreien Rohextrakt, im Lysat und in den Membranen gemessen und miteinander verglichen. Hierfür wurde ein gekoppelter Aktivitätstest verwendet, bei dem die Elektronen, die während der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain-Aldehyd frei werden, auf den alternativen Elektronenakzeptor PMS übertragen werden. Der Elektronenakzeptor wird reduziert und reoxidiert danach spontan wieder unter Sauerstoffverbrauch. Dieser Sauerstoffverbrauch konnte mit Hilfe einer Clark Sauerstoffelektrode gemessen werden. Eine Einheit enzymatischer Aktivität entsprach in diesen Tests, der Umsetzung von einem  $\mu\text{mol O}_2/\text{min}$ . Bei den Messungen der Aktivität im zellfreien Rohextrakt konnte ein Cholin-abhängiger Sauerstoffverbrauch von  $291 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$  festgestellt werden, woraus sich eine spezifische Aktivität von  $0,5 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$  errechnen ließ. Nach der Trennung von den Membranen und dem Cytoplasma durch Ultrazentrifugation konnten anschließend im Cytoplasma lediglich 13 % ( $39 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$ ) der Gesamtaktivität festgestellt werden, wohingegen in den Membranen 73 % ( $213 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$ ) detektiert werden konnten. Dieses Ergebnis führte zu dem Schluss, dass die Cholin-Dehydrogenase membranassoziiert vorliegt. Dieser Befund war überraschend, da in *in silico* Analysen keine Membrandomänen oder Membrananker identifiziert werden konnten (Breisch *et al.*, 2021).

#### **3.1.4.3. Die Salzabhängigkeit der Cholin-Dehydrogenase**

Im Folgenden sollte der Effekt der Salzkonzentration auf die Cholin-Dehydrogenase-Aktivität analysiert werden. Für die Untersuchungen der Salzabhängigkeit von BetA wurde der Sauerstoffverbrauch während der Oxidation von Cholin durch BetA in Anwesenheit verschiedener NaCl- oder KCl-Konzentrationen analysiert (Abb. 15).

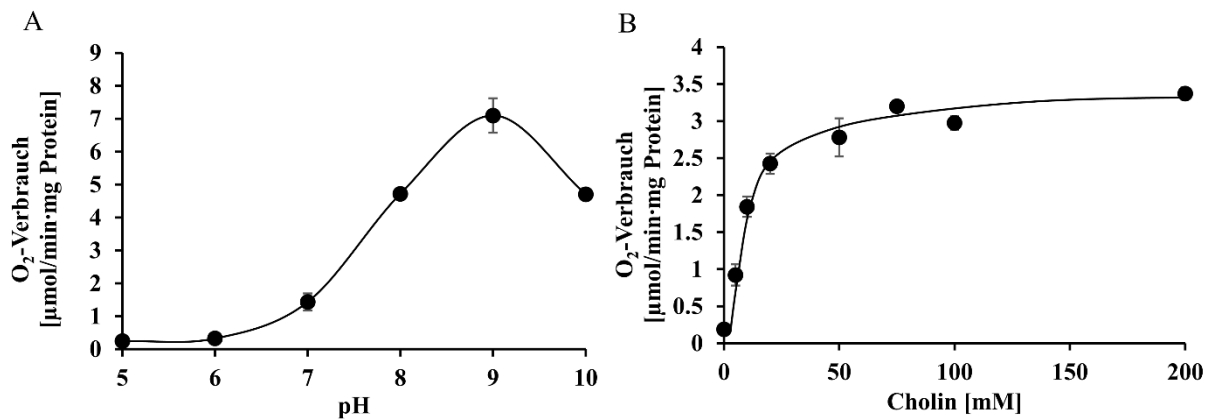


**Abb. 15. Die Salzabhängigkeit der Cholin-Dehydrogenase.** Die Aufnahme der Sauerstoffverbrauchsrate erfolgte nach der dreiminütigen Inkubation von 20 μg BetA in 2,7 ml Sauerstoff-gesättigtem Puffer A (Kapitel 2.12.) mit 1 mM PMS und 0 – 1 M NaCl (A) oder 0 – 1 M KCl (B). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 mM Cholin gestartet und der Cholin-abhängige Sauerstoffverbrauch über 3 min gemessen. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Abb. 15 ist ersichtlich, dass die Cholin-Dehydrogenase BetA die größte Aktivität in Abwesenheit von NaCl und in Anwesenheit von 50 mM KCl zeigte (Abb. 15 A). Der Sauerstoffverbrauch, während der BetA-abhängigen Cholin-Oxidation lag ohne die Zugabe von NaCl bei 2,4 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein, während die Sauerstoffverbrauchsrate mit steigenden NaCl-Konzentrationen immer weiter abfiel bis zu einem Minimum von 0,98 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein bei 1 M NaCl. Ähnliches konnte bei der Analyse der Abhängigkeit von BetA von KCl beobachtet werden (Abb. 15 B). Die Sauerstoffverbrauchsrate in Abwesenheit von KCl betrug 2,4 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein, bei der Zugabe von 50 mM KCl stieg die Aktivität um 0,4 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein an und fiel bei hohen KCl-Konzentrationen, ebenso wie bei hohen NaCl-Konzentrationen, wieder deutlich ab (1,2 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein).

#### 3.1.4.4. Effekt des pH-Wertes und der Substratkonzentration auf die Cholin-Dehydrogenase-Aktivität von BetA

Die Identifizierung des pH-Optimums der Cholin-Dehydrogenase und die Charakterisierung der Substratabhängigkeit von BetA erfolgte mittels Aktivitätsanalysen des Enzyms bei verschiedenen pH-Werten (Abb. 16 A) und in Anwesenheit von verschiedenen Substratkonzentrationen bei pH 7,0 (Abb. 16 B).



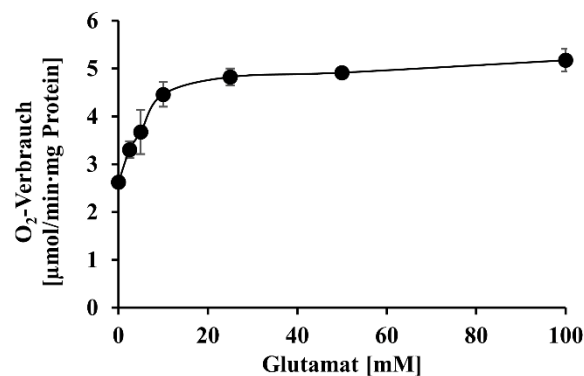
**Abb. 16. Abhängigkeit der Cholin-Dehydrogenase-Aktivität vom pH-Wert (A) und der Substratkonzentration (B).** Die Bestimmung des pH-Optimums (A) erfolgte durch die Aufnahme der Sauerstoffverbrauchsrate nach der dreiminütigen Inkubation von 20 μg BetA und 1 mM PMS in 2,7 ml Sauerstoff-gesättigtem Puffer B (Kapitel 2.12.) bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 mM Cholin gestartet und der Sauerstoffverbrauch über 3 min gemessen. Die Bestimmung der Abhängigkeit der Cholin-Dehydrogenase-Aktivität von der Substratkonzentration (B) erfolgte durch die Aufnahme der Sauerstoffverbrauchsrate nach der dreiminütigen Inkubation von 20 μg BetA und 1 mM PMS in 2,7 ml Sauerstoff-gesättigtem Puffer A (Kapitel 2.12.). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von unterschiedlichen Cholin-Konzentrationen gestartet und der Sauerstoffverbrauch über 3 min gemessen. Dargestellt wurde der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Eine Analyse des BetA-abhängigen Sauerstoffverbrauches bei verschiedenen pH-Werten ergab, dass die Cholin-Dehydrogenase die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 9,0 zeigte (Abb. 16 A). Die Sauerstoffverbrauchsrate lag bei diesem basischen pH-Wert bei 7,1 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein. Saurere pH-Werte führten zu einem deutlichen Aktivitätsverlust mit einer minimalen Sauerstoffverbrauchsrate von 0,2 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein (pH 5,0) und ein basischerer pH-Wert von 10,0 führte zu einem Aktivitätsverlust von 2,4 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein.

In Abb. 16 B wurde die Abhängigkeit der BetA-Aktivität von der Substratkonzentration dargestellt. Die Sauerstoffmessungen ergaben, dass die maximale Sauerstoffverbrauchsrate bei einer Substratkonzentration von 75 mM erreicht wurde (3,2 μmol O<sub>2</sub>/min·mg Protein). Des Weiteren wurde mittels GraphPad Prism<sup>®</sup> (Version 6.01) ein K<sub>M</sub>-Wert von 10,3 mM berechnet, welcher vergleichbar ist mit K<sub>M</sub>-Werten anderer Cholin-Dehydrogenasen, wie beispielsweise aus *Halomonas elongata* (11,6 mM) oder *E. coli* (1,5 mM) (Landfald und Strøm, 1986; Gadda und McAllister-Wilkins, 2003).

### 3.1.4.5. BetA wird stimuliert durch Glutamat, jedoch nicht durch andere kompatible Solute

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, nutzt *A. baumannii* neben Glycinbetain auch die kompatiblen Solute Mannitol, Trehalose und Glutamat. Um zu untersuchen, ob die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain durch die Anwesenheit von anderen kompatiblen Soluten beeinflusst wird, wurde der BetA-abhängige Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit der in *A. baumannii* detektierten kompatiblen Solute Glutamat, Mannitol und Trehalose untersucht. Des Weiteren wurde die Produkthemmung durch die Anwesenheit von Glycinbetain analysiert. Die Sauerstoffverbrauchsrate in Abwesenheit von anderen Soluten lag bei einem pH-Wert von 7,0 und nach Zugabe von 5 mM Cholin bei  $1,3 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg}$  Protein. Die Inkubation von BetA mit der 50-fachen Konzentration von Mannitol oder Trehalose führte zu vergleichbaren Werten von  $1,2 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg}$  Protein (Mannitol) und  $1,3 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg}$  Protein (Trehalose), nach Zugabe von 5 mM Cholin. Im Gegensatz dazu konnte durch die Vorinkubation von BetA mit Glutamat die Sauerstoffverbrauchsrate und damit die BetA-Aktivität um  $0,9 \mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg}$  Protein gesteigert werden. Für einen genaueren Einblick in die stimulierende Wirkung von Glutamat auf BetA wurde der BetA-abhängige Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von verschiedenen Glutamat-Konzentrationen (zugegeben vor der Vorinkubation) getestet (Abb. 17).

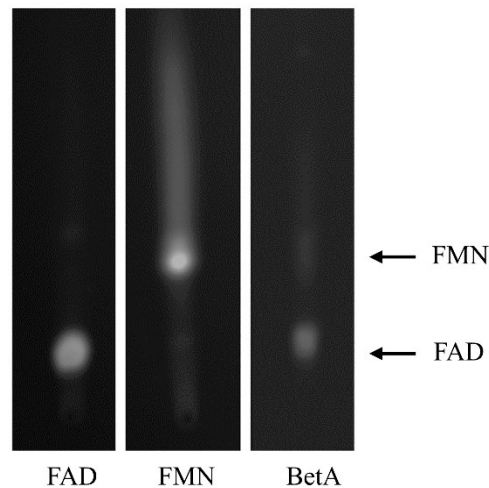


**Abb. 17. Stimulierung der Cholin-Dehydrogenase-Aktivität durch Glutamat.** Die Aufnahme der Sauerstoffverbrauchsrate erfolgte nach der dreiminütigen Vorinkubation von  $20 \mu\text{g}$  BetA in  $2,7 \text{ ml}$  Sauerstoff-gesättigtem Puffer A (Kapitel 2.12.) mit  $1 \text{ mM}$  PMS und  $0 - 100 \text{ mM}$  Glutamat. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von  $20 \text{ mM}$  Cholin gestartet und der Sauerstoffverbrauch über  $3 \text{ min}$  gemessen. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Die maximale Sauerstoffverbrauchsrate konnte bei einer Glutamat-Konzentration von 25 mM festgestellt werden (Abb. 17), mit einer 1,8-fachen Zunahme der Sauerstoffverbrauchsrate von 2,6  $\mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$  auf 4,8  $\mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$ . Die Inkubation von BetA mit Glycinbetain führte zu einer Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate um 50 % (0,6  $\mu\text{mol O}_2/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$ ). Somit kommt es durch Glycinbetain zur Produktinhibierung der Cholin-Dehydrogenase.

#### 3.1.4.6. BetA nutzt FAD als Cofaktor

In *in silico* Analysen der Cholin-Dehydrogenase BetA konnte eine typische Sekundärstruktur für die Bindung von Cofaktoren identifiziert werden. Das Vorhandensein einer Rossmann-Faltung und die typische Glycin-Box G-X-G-X-X-G am N-Terminus des Proteins spricht für die kovalente oder nicht-kovalente Bindung eines FADs, als Elektronenakzeptor für die freiwerdenden Elektronen während der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain-Aldehyd. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die BetA-Proteinlösung auf die Präsenz von Flavinen untersucht. Hierfür wurde das aufgereinigte Protein mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt und der Überstand anschließend mittels einer Dünnschichtchromatographie analysiert. Vorhandene Flavine konnten anschließend mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Diese dünnschichtchromatographische Auftrennung und die Detektion von Flavinen sind in Abb. 18 gezeigt.



**Abb. 18. Die Cholin-Dehydrogenase bindet FAD als Cofaktor.** Die durch BetA gebundenen Flavine wurden über eine TCA-Fällung aus dem Protein gelöst und anschließend über eine Dünnschichtchromatographie analysiert. 2 nmol BetA wurden gefällt und der Überstand auf die Kieselgur-Aluminium-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurden 60 % [v/v] n-Butanol, 15 % [v/v] Eisessig und 25 % [v/v] H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verwendet und als Standard wurden 1 nmol FAD und 1 nmol FMN aufgetragen. Die Detektion der Flavine erfolgte mittels UV-Licht.

Hierbei wurde ersichtlich, dass FAD als Cofaktor von BetA gebunden wird (Abb. 18). Die linken Spuren zeigen das Laufverhalten von FAD und FMN auf der Kieselgur-Aluminium-Folie. Bei Betrachtung der rechten Spur wird deutlich, dass das Flavin in BetA auf der Höhe von FAD läuft, woraus geschlossen werden kann, dass FAD der Cofaktor von BetA ist.

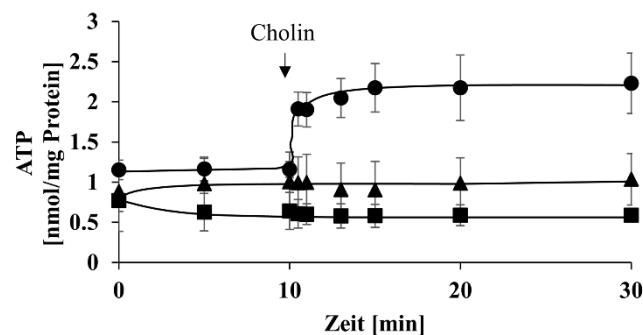
### 3.2. Die Oxidation von Cholin, dem Vorläufer des kompatiblen Solute Glycinbetain, führt zu einem Energiegewinn in *A. baumannii*

*A. baumannii* ATCC 19606 hat nicht nur Osmostress-abhängige, sekundär aktive Cholintransporter, sondern ebenfalls einen Osmostress-unabhängigen BCCT, bezeichnet als BetT1. Dies ließ die Frage aufkommen, wofür dieses Bakterium Cholin unter isoosmotischen Bedingungen akkumuliert und ob *A. baumannii* ATCC 19606 möglicherweise einen energetischen Vorteil hat durch die Cholin-Oxidation im humanen Wirt. Gleiches galt für den Osmostress-unabhängigen Transporter Aci01347, der in ersten Analysen als Cholin-spezifischer Transporter identifiziert wurde. Konkurrenzexperimente konnten in vorherigen Studien allerdings zeigen, dass die Cholin-Aufnahme durch diesen Transporter in Anwesenheit von Carnitin gehemmt wurde, wodurch vermutet wurde, dass dieser Transporter für die

Aufnahme von Carnitin wichtig ist, eine Trimethylammoniumverbindung welche als Kohlenstoffquelle von *A. baumannii* ATCC 19606 genutzt werden kann (Zhu *et al.*, 2014).

### 3.2.1. Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain führt zur ATP-Synthese

Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain wird katalysiert über die membranassoziierte Cholin-Dehydrogenase BetA und über die Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase BetB. Während dieses Oxidationsweges werden vier Elektronen generiert, die anschließend möglicherweise in die Atmungskette eingespeist werden und durch das dadurch entstehende Protonengefälle die ATP-Synthase antreiben. Für die Überprüfung, ob die Cholin-Oxidation zur ATP-Synthese führt und damit einen energetischen Vorteil für *A. baumannii* ATCC 19606 unter isoosmotischen Bedingungen bietet, wurde die ATP-Synthese von Zellsuspensionen in Anwesenheit von Cholin mit dem Wildtyp und der  $\Delta bcct$ -Mutante, welche kein Cholin mehr aufnehmen kann, da alle BCCT deletiert wurden, analysiert (Abb. 19).



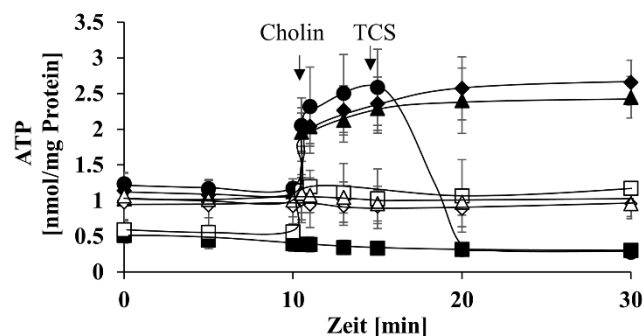
**Abb. 19. Cholin-abhängige ATP-Synthese des *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyps und der  $\Delta bcct$ -Mutante.** Die Zellen wurden in MM mit 12 mM Na-Succinat als Kohlenstoffquelle (Wildtyp: ■) oder mit 20 mM Cholin als zusätzliche Energiequelle (Wildtyp: ●;  $\Delta bcct$ : ▲) angezogen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen wie in Kapitel 2.11. beschrieben erstellt. Die ATP-Synthese wurde durch die Zugabe von 10 mM Cholin nach einer zehnmütigen Vorinkubation der Zellen bei 37 °C gestartet. Dargestellt wurde der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Diese Zellsuspensionsexperimente zeigten, dass die Zugabe von Cholin zu den ruhenden Zellen, die zuvor auf Succinat in Gegenwart von Cholin angezogen wurden, zu einer Zunahme des zellulären ATP-Gehaltes führte (Abb. 19). Der ATP-Gehalt der Zellen blieb konstant über 10 min bei einem Wert von 1,3 nmol/mg Protein und stieg dann, unmittelbar nach der Zugabe



von Cholin, auf einen Wert von 2,1 nmol/mg Protein an. Diese ATP-Zunahme konnte allerdings nur für Zellen beobachtet werden, welche in der Gegenwart von Cholin angezogen wurden, da der *betIBA*-Cluster nur in Anwesenheit von Cholin exprimiert wird (Abb. 19). Die ruhenden Zellen, welche in Abwesenheit von Cholin angezogen wurden, zeigten nach der Zugabe von Cholin einen gleichbleibenden zellulären ATP-Gehalt von 0,6 nmol/mg Protein. Als Kontrolle wurde außerdem die  $\Delta bcct$ -Mutante getestet, welche kein extrazelluläres Cholin mehr aufnehmen kann, da alle BCCT deletiert wurden. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Cholin angezogen und anschließend die intrazelluläre ATP-Zunahme in den ruhenden Zellen durch die Zugabe von Cholin analysiert (Abb. 19). Dieses Experiment zeigte deutlich, dass ohne die Aufnahme von Cholin keine Cholin-abhängige Zunahme des ATP-Gehaltes stattfand. Der intrazelluläre ATP-Gehalt blieb auch nach der Zugabe von Cholin konstant bei einem Wert von 1 nmol/mg Protein. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die gebildeten Elektronen während der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain für die ATP-Synthese von *A. baumannii* ATCC 19606 genutzt werden können.

Für die Analyse, ob diese Cholin-abhängige ATP-Synthese durch die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase, angetrieben durch das chemiosmotische Potenzial, katalysiert wurde, wurden zusätzliche Inhibitorstudien durchgeführt (Abb. 20).



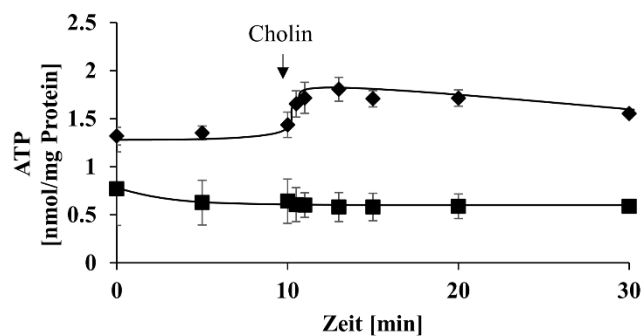
**Abb. 20. Inhibitorstudien der Cholin-abhängigen ATP-Synthese mit *A. baumannii* ATCC 19606-Zellsuspensionen.** Die Zellen wurden in MM mit 12 mM Na-Succinat als Kohlenstoffquelle und mit 20 mM Cholin als zusätzliche Energiequelle angezogen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen wie in Kapitel 2.11. beschrieben erstellt. Die ATP-Synthese wurde durch die Zugabe von 10 mM Cholin nach einer zehnmütigen Vorinkubation der Zellen bei 37 °C und in Anwesenheit von 30 μM TCS (■), 30 μM Valinomycin + 0,2 M KCl (□), 300 μM DES (◇), 300 μM DCCD (△), 30 μl 100 % Ethanol (◆) oder in Abwesenheit von Inhibitoren (▲) gestartet. Zusätzlich wurde die ATP-Synthese in Zellen ohne Vorinkubation mit Inhibitor und der Zugabe von 30 μM TCS fünf Minuten nach dem Start der ATP-Synthese durch die Zugabe von 10 mM Cholin (●) untersucht. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Die Zugabe der Protonophoren Valinomycin und Tetrachlorosalicylanilid (TCS) führte zu einer Inhibierung der Cholin-abhängigen ATP-Synthese (Abb. 20). Bei einer Zugabe von TCS zu Beginn des Experimentes konnte keine ATP-Synthese nach der Zugabe von Cholin festgestellt werden und der intrazelluläre ATP-Gehalt lag konstant bei 0,3 nmol/mg Protein. Bei einer Zugabe von TCS 15 min nach dem Start und damit fünf Minuten nach der Cholin-Zugabe, stieg der ATP-Gehalt erst von 1,2 nmol/mg Protein auf 2,8 nmol/mg Protein an und fiel anschließend, unmittelbar nach der Zugabe von TCS, auf 0,3 nmol/mg Protein ab. Ähnliches konnte ebenfalls bei der Zugabe von Valinomycin beobachtet werden. Nach der Zugabe von Cholin zu den, mit Valinomycin und KCl vorinkubierten Zellen, stieg der ATP-Gehalt minimal von 0,6 nmol/mg Protein auf 1,1 nmol/mg Protein an und stagnierte dann. Die Protonophor-abhängige Inhibierung der Cholin-abhängigen ATP-Synthese zeigte damit deutlich, dass die ATP-Synthese über einen Protonengradienten getrieben wird und damit, dass die Elektronen der Cholin-Oxidation über die Atmungskette über die Membran transportiert werden und somit ein chemiosmotisches Potenzial erzeugen für den Antrieb der ATP-Synthase. Wie in Abb. 20 gezeigt, ist die Zunahme des intrazellulären ATP-Gehaltes ebenfalls in Anwesenheit der bekannten  $F_1F_0$ -ATP-Synthase-Inhibitoren Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) (Altendorf, 1977; Fillingame, 1997) und Diethylstilbestrol (DES) (McEnery und Pedersen, 1986) vollständig inhibiert. Dies führte zu dem Schluss, dass die Cholin-abhängige ATP-Synthese über eine  $F_1F_0$ -ATP-Synthase katalysiert wird. Da alle Inhibitoren in Ethanol gelöst vorlagen, wurde als Kontrolle ebenfalls die ATP-Synthese nach Zugabe von Cholin in Anwesenheit von Ethanol untersucht und ein Effekt durch Ethanol konnte hierbei ausgeschlossen werden (Abb. 20). Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die bei der Cholin-Oxidation freiwerdenden Elektronen in die Atmungskette geleitet werden und anschließend die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase über einen elektrochemischen Gradienten antreiben.

### 3.2.2. Phosphatidylcholin dient als natürliche Cholinquelle im menschlichen Wirt

Um einen Zusammenhang des energetischen Vorteils dieser Cholin-Oxidation unter isoosmotischen Bedingungen und der Anpassung von *A. baumannii* ATCC 19606 an den humanen Wirt zu analysieren, wurde ebenfalls getestet, ob das Pathogen Cholin aus dem im Menschen in hohen Konzentrationen vorkommenden Lipid, Phosphatidylcholin gewinnen kann. Da die Fettsäuren des Phosphatidylcholins als Kohlenstoffquelle für diesen Organismus genutzt werden können (Stahl *et al.*, 2015), konnte Phosphatidylcholin nicht an Stelle des Cholins zu den Zellsuspensionsexperimenten gegeben werden, da die Fettsäureketten zur ATP-

Synthese genutzt werden würden. Wie jedoch schon zuvor beschrieben, findet die Cholin-abhängige ATP-Synthese ausschließlich in Zellen statt, die zuvor in Anwesenheit von Cholin gezogen wurden. Dementsprechend wurde getestet, ob die Zugabe von Phosphatidylcholin während des Wachstums des Wildtyps in MM zu einer Induktion des *betIBA*-Clusters führt und demnach anschließend zur Cholin-abhängigen ATP-Synthese in den ruhenden Zellen (Abb. 21).



**Abb. 21. Cholin-abhängige ATP-Synthese nach der Induktion des *betIBA*-Clusters durch Phosphatidylcholin.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp wurde in MM mit 0,5 % Phosphatidylcholin (◆) oder mit 12 mM Na-Succinat (■) als Kohlenstoffquelle angezogen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen, wie in Kapitel 2.11. beschrieben, erstellt. Die ATP-Synthese wurde durch die Zugabe von 10 mM Cholin nach einer zehninminütigen Vorinkubation der Zellen bei 37 °C gestartet. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

In den auf Na-Succinat gezogenen Zellen konnte keine ATP-Synthese nach der Zugabe von Cholin zu der Zellsuspension dokumentiert werden (Abb. 21). Der intrazelluläre ATP-Gehalt blieb konstant bei 0,6 nmol/mg Protein. Anders hingegen verhielt es sich bei den ruhenden Zellen, welche zuvor in MM mit 10 % Phosphatidylcholin als Kohlenstoffquelle angezogen wurden. Der ATP-Gehalt der Zellsuspension betrug 1,4 nmol/mg Protein und stieg nach der Zugabe von Cholin auf einen Wert von 1,8 nmol/mg Protein an. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Phosphatidylcholin als natürliche Cholinquelle im humanen Wirt dient und die Expression des *betIBA*-Cluster induzieren kann.

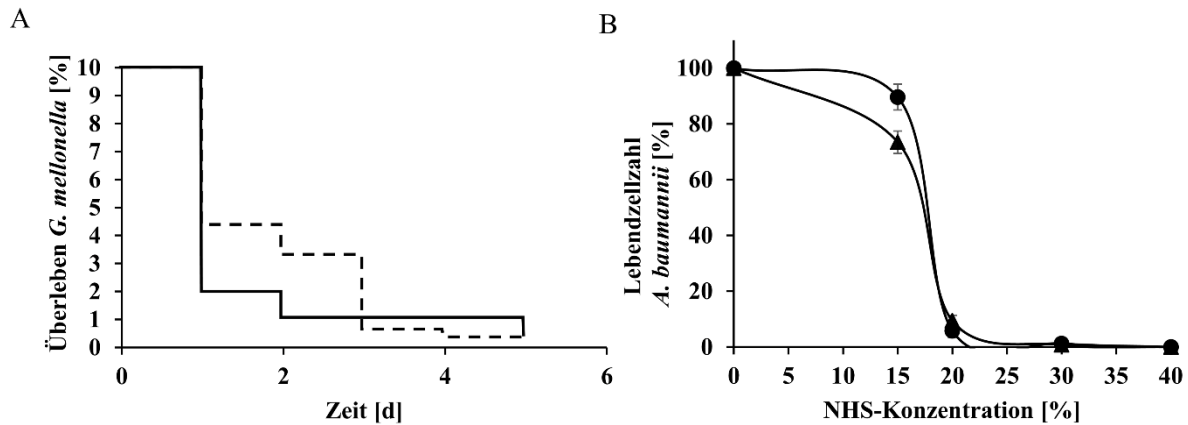
### 3.3. Die Rolle von Cholin und Glycinbetain in der Virulenz von *A. baumannii* ATCC 19606

Wie gezeigt, führt die Aufnahme und die Oxidation von Cholin zu einem energetischen Vorteil für *A. baumannii* ATCC 19606. Da Cholin in Form von Phosphatidylcholin eine weit

verbreitete Energiequelle im menschlichen Wirt darstellt und die Anzahl der BCCT mit steigender Virulenz in den verschiedenen *Acinetobacter* Spezies steigt (Breisch und Averhoff, 2020), lag die Vermutung nahe, dass diese Transporter oder der *betIBA*-Gencluster, welcher für die Cholin-Oxidation verantwortlich ist, einen Einfluss auf die Virulenz oder die Persistenz von *A. baumannii* im Wirt haben. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte eine  $\Delta betI$ -Regulatormutante mit einem Defekt in der Regulation der Expression des *betIBA*-Clusters generiert werden und verschiedene Virulenz- und Persistenzstudien mit dieser Mutante und der  $\Delta bcct$ -Vierfachmutante durchgeführt werden.

### 3.3.1. Die BCCT haben keinen Einfluss auf die Virulenz von *A. baumannii* ATCC 19606

Für die Analyse der Rolle der BCCT bei der Virulenz von *A. baumannii* ATCC 19606 wurden der Wildtyp und die  $\Delta bcct$ -Vierfachmutante in *G. mellonella*-Infektionsstudien und Komplementresistenztests untersucht. Hierfür wurden der Wildtyp und die  $\Delta bcct$ -Mutante in LB-Medium bis zur exponentiellen Phase angezogen, geerntet und, wie in Kapitel 2.9.3. und 2.9.4. beschrieben, mit PBS oder PBS<sup>+/+</sup> auf eine bestimmte OD<sub>600nm</sub> eingestellt. Die mit PBS erstellten Zellsuspensionen wurden anschließend verwendet, um *G. mellonella*-Larven zu infizieren. Hierbei wurden den Larven ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen injiziert und diese danach über fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Das Überleben der Larven wurde protokolliert und ist in Abb. 22 A dargestellt. Für die Analyse der Komplementresistenz wurden die, mit PBS<sup>+/+</sup> erstellten Zellsuspensionen über zwei Stunden bei 37 °C in Blutserum mit aktiven Komplementsystem inkubiert. Eine Kontrolle wurde analog ohne Blutserum inkubiert. Die Ergebnisse des Versuches zur Komplementresistenz sind in Abb. 22 B dargestellt.



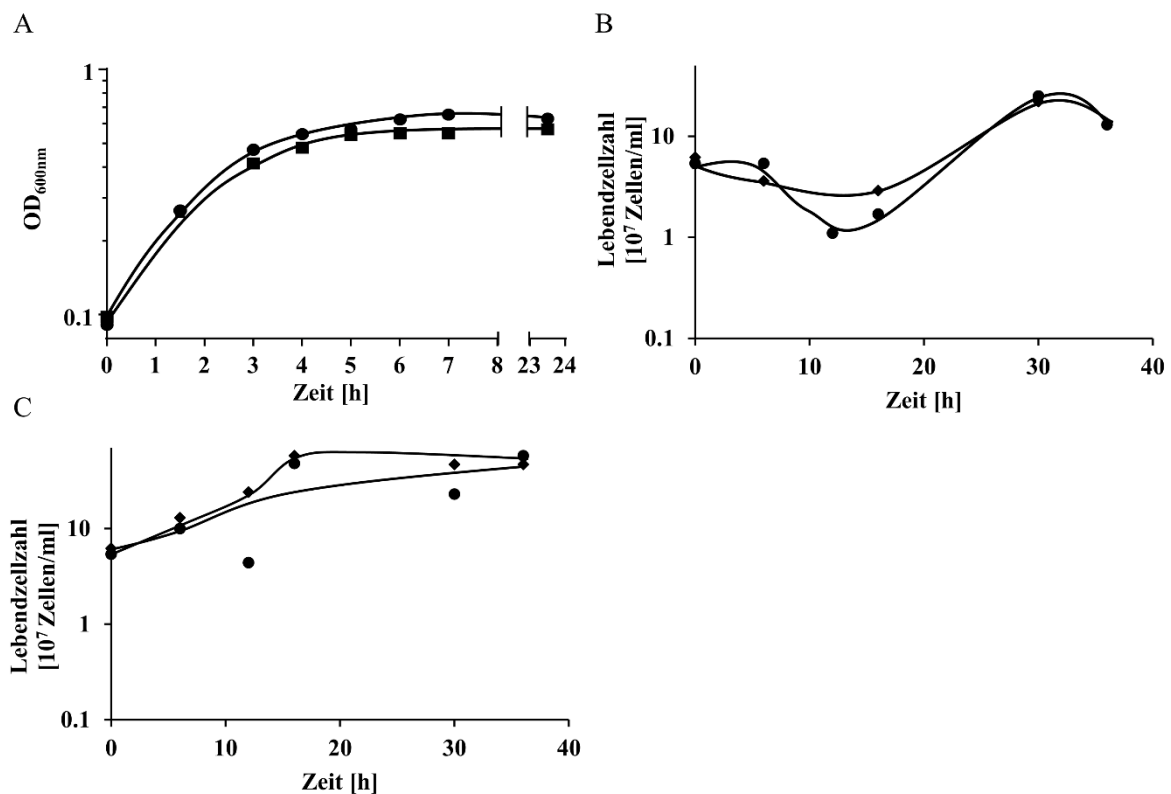
**Abb. 22.** Die Rolle der BCCT bei der Infektion von *G. mellonella*-Larven (A) und der Resistenz von *A. baumannii* gegen das Komplementsystem im Blutserum (B). Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp und die  $\Delta bcct$ -Mutante wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit PBS oder PBS<sup>+/+</sup> auf die jeweilige OD<sub>600nm</sub> eingestellt (Kapitel 2.9.3. und 2.9.4.). Anschließend wurden die Zellsuspensionen verwendet um *G. mellonella*-Larven mit ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen zu infizieren und das Überleben der Larven zu dokumentieren (A: Wildtyp: durchgezogene Linie,  $\Delta bcct$ : gestrichelte Linie) oder die Überlebensrate (%) nach zweistündiger Inkubation in unterschiedlichen NHS-Konzentrationen zu analysieren (B: Wildtyp: ●;  $\Delta bcct$ : ▲). Dargestellt wurde jeweils der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Der Vergleich der Überlebensraten der *G. mellonella*-Larven, welche entweder mit dem Wildtyp infiziert wurden oder mit der  $\Delta bcct$ -Vierfachmutante, zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22 A). Von den Larven, welche mit dem Wildtyp infiziert wurden, starben innerhalb von 24 h 80 %. Nach 48 h konnte bereits nur noch ein Überleben von 10 % dokumentiert werden. Nach fünf Tagen konnte keine lebende Larve mehr dokumentiert werden. Ähnliches konnte bei den mit der  $\Delta bcct$ -Mutante infizierten Larven beobachtet werden. 24h nach der Infektion starben bereits 60 % der Larven und weitere 24 h später konnte bereits nur noch eine Überlebensrate von 30 % nachgewiesen werden. Nach drei Tagen fiel die Überlebensrate weiter auf 8 %. Nach vier Tagen konnte keine lebende Larve mehr dokumentiert werden. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die BCCT keinen Einfluss auf den Infektionserfolg von *A. baumannii* ATCC 19606 haben.

Die Versuche zur Komplementresistenz in Abb. 22 B ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der  $\Delta bcct$ -Mutante und dem Wildtyp. Nach zweistündiger Inkubation der beiden Stämme in 15 % NHS sank die Lebendzellzahl des Wildtyps von 100 % auf 89,5 %. Gleiches konnte ebenfalls für die Mutante beobachtet werden. Hier sank die Lebendzellzahl von 100 % auf 73,4 %. Die Inkubation der Stämme in 20 % NHS führte zu einer Abnahme der Lebendzellzahl, die in beiden Stämmen vergleichbar war (Wildtyp: 5,8 %;  $\Delta bcct$ : 9,3 %). Auch

bei der Inkubation in 30 % NHS konnten keine signifikanten Unterschiede vermerkt werden (Wildtyp: 1,3 %;  $\Delta bcct$ : 0,7 %). In 40 % NHS konnten keine lebenden Zellen mehr detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die BCCT keine Rolle in der Komplementresistenz spielen.

Im Folgenden wurde der Wildtyp und die Transporter-Mutante auf das Wachstum in menschlichen Flüssigkeiten, wie Urin, Blutserum mit inaktivem Komplementsystem oder Wundserum untersucht. Hierfür wurden die Stämme in LB-Medium bis zur stationären Phase angezogen, geerntet und in Saline rückgelöst. Anschließend wurden die verschiedenen Körperflüssigkeiten auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,1 angeimpft und das Wachstum entweder über die Zunahme der optischen Dichte oder die Lebendzellzahl verfolgt (Abb. 23).



**Abb. 23. Die Rolle der BCCT beim Wachstum von *A. baumannii* ATCC 19606 in humanem Urin (A), Wundserum (B) und Blutserum (C).** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp und die  $\Delta bcct$ -Mutante wurden über Nacht in LB-Medium angezogen, geerntet und in Saline oder PBS rückgelöst. Anschließend wurden 50 ml der verschiedenen Flüssigkeiten auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,1 angeimpft und die  $OD_{600nm}$  bzw. die Lebendzellzahl zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. **A:** Wachstum des *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyps (●) und der  $\Delta bcct$ -Mutante (■) in sterilfiltrierten Urin. **B:** Wachstum des *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyps (◆) und der  $\Delta bcct$ -Mutante (●) in Wundserum. **C:** Wachstum des *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyps (◆) und der  $\Delta bcct$ -Mutante (●) in hitzeinaktiviertem Blutserum.

Der Wildtyp und die  $\Delta bcct$ -Mutante zeigten keinen Unterschied im Wachstum in Urin als Kulturmedium (Abb. 23 A). Die Wachstumsrate lag bei den Stämmen bei  $0,46 \text{ h}^{-1}$  (Wildtyp) und  $0,41 \text{ h}^{-1}$  ( $\Delta bcct$ ) und beide Stämme erreichten eine finale  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,6. Somit konnte geschlossen werden, dass die BCCT von *A. baumannii* ATCC 19606 keinen Einfluss auf das Wachstum in menschlichem Urin haben.

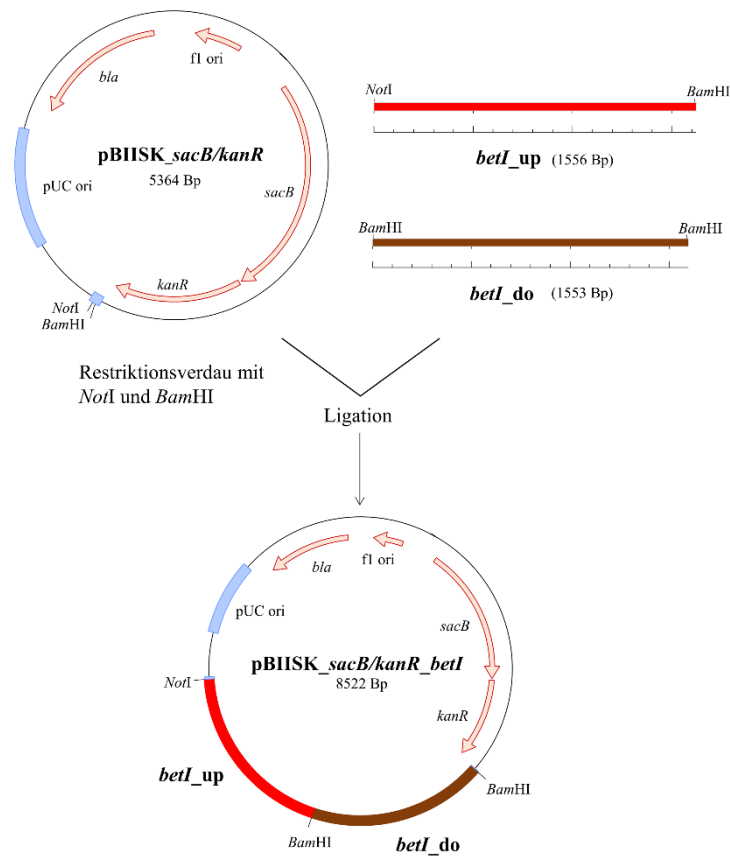
Des Weiteren wurde der Effekt der Deletion von den verschiedenen Transportern auf das Wachstum in humanem Wundserum untersucht (Abb. 23 B). Hierbei wurde die Lebendzellzahl der beiden Stämme zu unterschiedlichen Zeiten, während der Inkubation in dieser Flüssigkeit dokumentiert. Der Wildtyp zeigte nach 5 h Inkubation keine signifikante Veränderung in der Lebendzellzahl (0 h:  $5,3 \cdot 10^7$  Zellen/ml; 5 h:  $3,6 \cdot 10^7$  Zellen/ml), ebenso wie die  $\Delta bcct$ -Mutante (0 h:  $5,4 \cdot 10^7$  Zellen/ml; 5 h:  $5,4 \cdot 10^7$  Zellen/ml). Nach 12 h in humanen Wundserum bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sank die Zellzahl bei beiden Stämmen bis auf  $1,1 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp) und  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta bcct$ ). Anschließend nahm die Lebendzellzahl beider Stämme in vergleichbarem Ausmaß zu (30 h: Wildtyp:  $22 \cdot 10^7$  Zellen/ml;  $\Delta bcct$ :  $25 \cdot 10^7$  Zellen/ml) und blieb dann über die nächsten 6 h konstant (Wildtyp:  $15 \cdot 10^7$  Zellen/ml;  $\Delta bcct$ :  $15 \cdot 10^7$  Zellen/ml). Da keine signifikanten Unterschiede im Wachstum dokumentiert werden konnten, konnte ein Effekt der BCCT auf das Wachstum in humanen Wundserum ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurde das Wachstum der  $\Delta bcct$ -Mutante und des Wildtyps in hitzeinaktiviertem Blutserum verglichen (Abb. 23 C), jedoch konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Für beide Stämme wurde zum Zeitpunkt 0 h eine Lebendzellzahl von  $6,2 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp) und  $5,4 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta bcct$ ) gezählt, die innerhalb der ersten 6 h Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  auf einen Wert von  $13 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp) und  $10 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta bcct$ ) anstieg. Weitere 6 h später lag die Lebendzellzahl des Wildtyps bei  $24 \cdot 10^7$  Zellen/ml und die der Mutante bei  $4,4 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Die Zellzahl stieg dann nach 16 h weiter an auf  $54 \cdot 10^7$  Zellen/ml für den Wildtyp und  $48 \cdot 10^7$  Zellen/ml für die  $\Delta bcct$ -Mutante und stagnierte (36 h: Wildtyp:  $47 \cdot 10^7$  Zellen/ml;  $\Delta bcct$ :  $58 \cdot 10^7$  Zellen/ml). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die BCCT keinen Einfluss auf das Wachstum in hitzeinaktiviertem Blutserum haben.

### 3.3.2. Der Regulator BetI des Cholin-Oxidationsweges spielt keine Rolle in der Virulenz von *A. baumannii* ATCC 19606

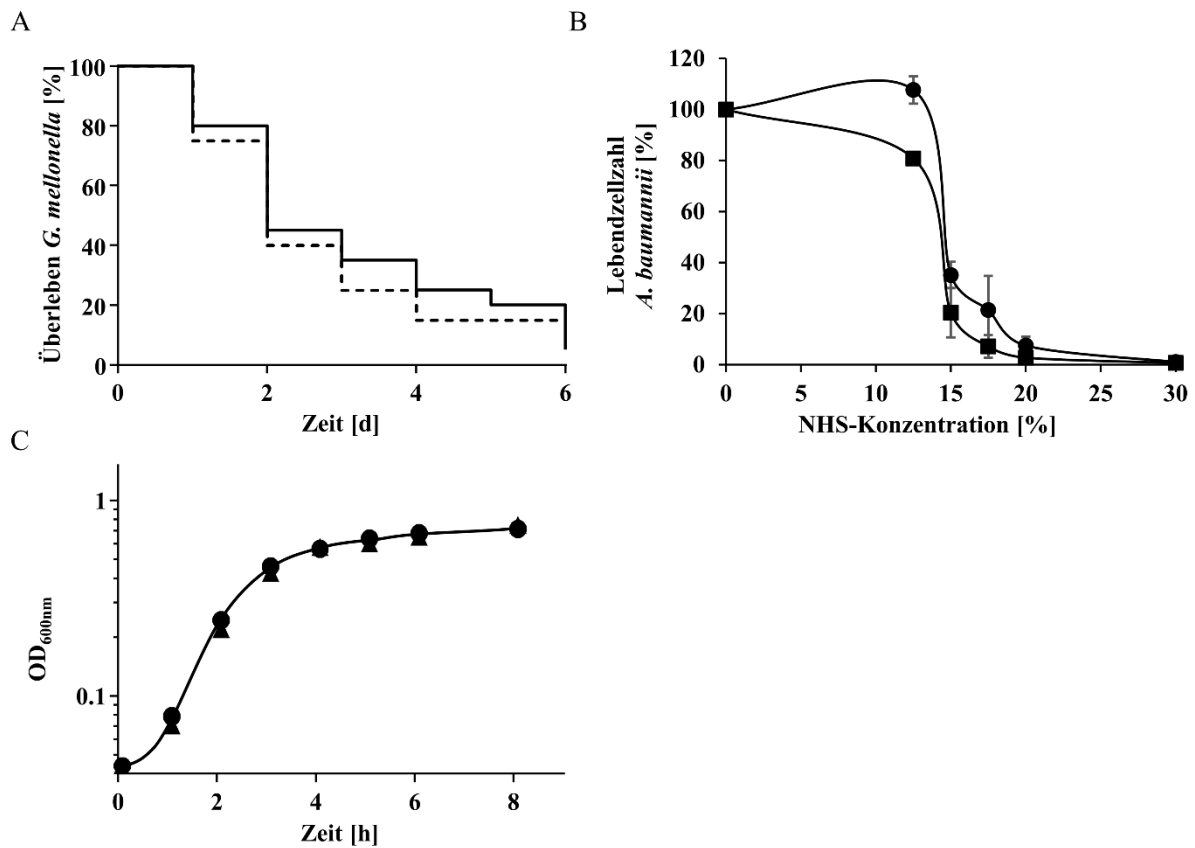
Zusätzlich wurde getestet, ob der Regulator BetI des Cholin-Oxidationsweges weitere Gene mit essenzieller Rolle bei der Persistenz und Virulenz von *A. baumannii* in Anwesenheit von Cholin reguliert. Für *A. baylyi* konnte bereits gezeigt werden, dass BetI ein Transkriptionsrepressor des *betIBA*-Operons ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cholin als Effektor für diesen Regulator fungiert (Scholz *et al.*, 2016). Die große Aminosäuren-Identität von BetI aus *A. baylyi* ADP1 und *A. baumannii* ATCC 19606 von 81 %, zusammen mit der analogen Organisation der Gene innerhalb des *betIBA*-Clusters ließen vermuten, dass BetI in *A. baumannii* ebenfalls ein Transkriptionsrepressor ist. Im Folgenden sollten mit Hilfe einer  $\Delta betI$ -Deletionsmutante, die Rolle des Regulators des Cholin-Oxidationsweges bei der Virulenz in *G. mellonella*-Larven, der Persistenz in Blutserum und in humanem Urin analysiert werden. Hierfür wurde eine  $\Delta betI$ -Deletionsmutante erstellt und anschließend in *G. mellonella*-Infektionsstudien, in Komplementresistenztest und im Wachstum in Urin analysiert. Für die Erstellung dieser Deletionsmutante wurde das Plasmid pBIISK\_ *sacB/kanR\_betI* nach dem Klonierungsschema in Abb. 24 generiert und anschließend über Sequenzierung überprüft. Das Plasmid wurde in den *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp transformiert und über homologe Rekombination in den *betI*-Genlokus integriert. Die Segregation des Plasmides und des *betI*-Gens erfolgte über die Gegenselektion auf Saccharose. Der Erfolg der Deletion wurde per Sequenzierung verifiziert.





**Abb. 24. Klonierungsschema des Plasmides pBIISK\_sacB/kanR\_betI für die markerlose Deletion des Gens *betI* in *A. baumannii* ATCC 19606.** Die Stromaufwärts- (*betI\_up*) und Stromabwärtsbereiche (*betI\_do*) des Gens *betI* wurden mit Hilfe der Starteroligonukleotide *betI\_up\_for\_NotI* und *betI\_up\_rev\_BamHI*, sowie *betI\_do\_for\_BamHI* und *betI\_do\_rev\_BamHI* amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *BamHI* in den Vektor pBIISK\_sacB/kanR kloniert.

Nach der erfolgreichen Deletion des Regulorgens *betI* wurden der Wildtyp und die  $\Delta betI$ -Mutante in LB-Medium bis zur jeweiligen  $OD_{600nm}$  angezogen, geerntet und mit Saline, PBS oder PBS<sup>+/+</sup> auf die jeweilige  $OD_{600nm}$  eingestellt (Kapitel 2.9.2.-2.9.4.). Das Überleben der infizierten *G. mellonella*-Larven ist in Abb. 25 A dargestellt, die Überlebensrate von *A. baumannii* in verschiedenen NHS-Konzentration in Abb. 25 B und das Wachstum in menschlichem Urin in Abb. 25 C.



**Abb. 25. Die Rolle von BetI bei der Infektion von *G. mellonella*-Larven (A), bei der Komplementresistenz (B) und beim Wachstum in menschlichem Urin (C) von *A. baumannii* ATCC 19606.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp und die  $\Delta betI$ -Mutante wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit Saline, PBS oder PBS<sup>+/+</sup> auf die jeweilige OD<sub>600nm</sub> eingestellt (Kapitel 2.9.2.-2.9.4.). Anschließend wurden die Zellsuspensionen verwendet um *G. mellonella*-Larven zu infizieren und das Überleben der Larven zu dokumentieren (A: Wildtyp: durchgezogene Linie,  $\Delta betI$ : gestrichelte Linie), die Überlebensrate (%) in NHS zu analysieren (B: Wildtyp: ●;  $\Delta betI$ : ▲), oder das Wachstum in Urin über die Verfolgung der OD<sub>600nm</sub> über die Zeit zu beobachten (C: Wildtyp: ●;  $\Delta betI$ : ▲). Dargestellt wurde jeweils der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Die  $\Delta betI$ -Mutante zeigte keine Unterschiede in der Infektion von *G. mellonella*-Larven im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 25 A). Nach der Infektion der Larven mit ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen des jeweiligen Stammes konnte für den Wildtyp nach 24 h ein Überleben von 80 % der Larven festgestellt werden, ebenso wie für die  $\Delta betI$ -Mutante (78 %). Nach 48 h überlebten noch 45 % der Larven, die mit dem Wildtyp infiziert wurden und 40 % der Larven, die mit der Mutante infiziert wurden. Nach drei Tagen lag die Überlebensrate der Larven, infiziert mit dem Wildtyp, bei 38 % und die der Larven, infiziert mit der  $\Delta betI$ -Mutante bei 25 %. Nach vier Tagen starben weitere 10 % der Larven mit Wildtyp-Injektion, bis nach sechs Tagen keine lebendigen Larven mehr gezählt werden konnten. Nach vier Tagen lag die Überlebensrate der Larven mit  $\Delta betI$ -Injektion bei 18 % und viel bis zum sechsten Tag nicht weiter ab. Diese Ergebnisse zeigten

deutlich, dass die Deletion des Regulators BetI zu keiner Veränderung der Virulenz von *A. baumannii* bei der *G. mellonella*-Infektion führte.

Auch die Persistenz der  $\Delta betI$ -Mutante in NHS mit aktivem Komplementsystem war nicht beeinträchtigt im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 25 B). Nach der Inkubation der beiden Stämme in 12,5 % NHS konnte für den Wildtyp ein leichter Anstieg in der Lebendzellzahl auf 107,7 % dokumentiert werden im Vergleich zu der Zellzahl nach der Inkubation in PBS<sup>+/+</sup> (100 %). Während nach der Inkubation der  $\Delta betI$ -Mutante in 12,5 % NHS die Zellzahl geringfügig abnahm und nur 80,8 % der Zellen überlebten. Nach der zweistündigen Inkubation des Wildtyps in 15 % NHS sank die Überlebensrate des Wildtyps auf 35,1 % und nach einer Inkubation in 17,5 % NHS bis auf 21,4 %. Gleiches galt für die  $\Delta betI$ -Mutante, bei der unter diesen Bedingungen ähnliche Überlebensraten von 20,3 % (15 % NHS) und 7,1 % (17,5 % NHS) dokumentiert werden konnten. In Anwesenheit von höheren NHS-Konzentrationen sank die Überlebensrate weiter auf unter 10 % bei beiden Stämmen (20% NHS: 7,4 % der Wildtyp-Zellsuspension überlebte und 2,7 % der  $\Delta betI$ -Zellsuspension; 30 % NHS: 0,7 % Wildtyp und 0,6 %  $\Delta betI$ ). Diese Studien zeigten, dass der Regulator BetI keinen Einfluss auf die Persistenz von *A. baumannii* in Blutserum mit aktiven Komplementsystem hatte.

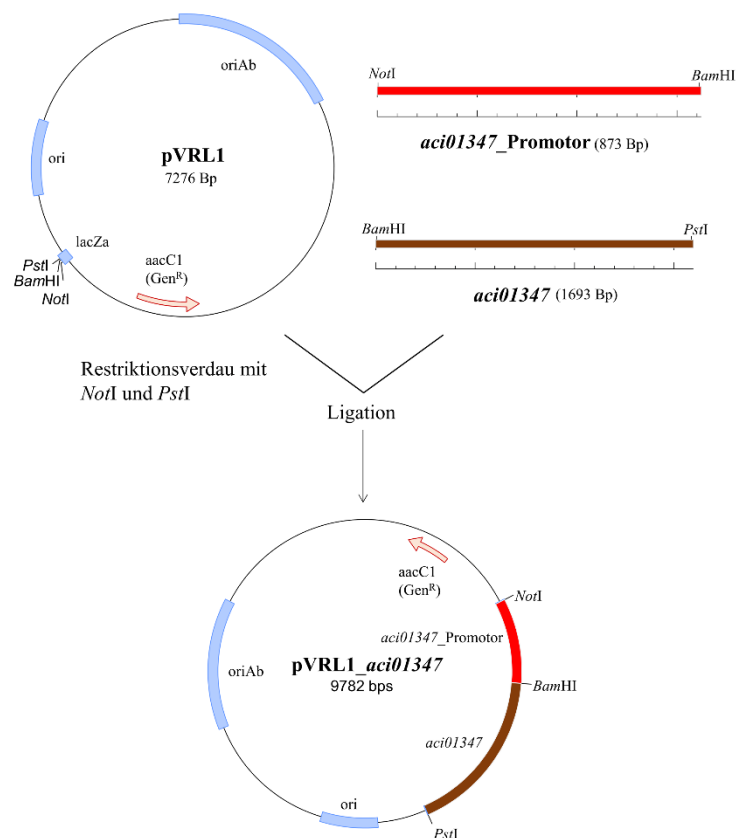
Der Vergleich des Wachstums des Wildtyps und der  $\Delta betI$ -Mutante in menschlichem Urin zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Adaptionszeit, der Wachstumsrate und der finalen OD<sub>600nm</sub> (Abb. 25 C). Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante hatten eine Wachstumsrate von 0,75 h<sup>-1</sup> bzw. 0,79 h<sup>-1</sup> und erreichten jeweils nach 5 h die stationäre Phase mit einer OD<sub>600nm</sub> von 0,75 bzw. 0,67. Daraus konnte geschlossen werden, dass BetI keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. baumannii* in Urin hatte.

### **3.4. Aufnahme und Nutzung von Carnitin als Kohlenstoffquelle**

#### **3.4.1. Der BCCT Aci01347 ist essenziell für die Aufnahme von Carnitin**

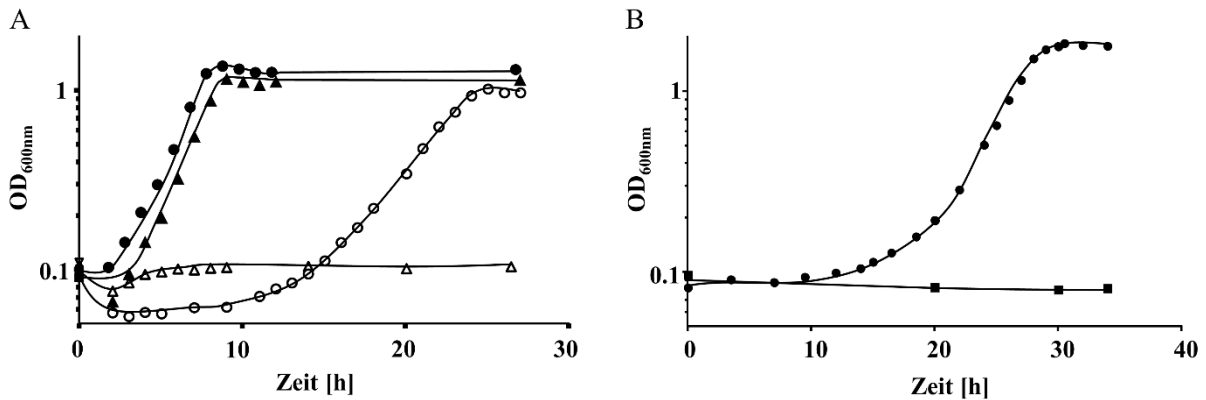
In vorangegangenen Studien einer anderen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass *A. baumannii* mit Carnitin als Kohlenstoffquelle wächst (Zhu *et al.*, 2014). Innerhalb der Arbeitsgruppe Averhoff konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Cholin-Aufnahme mittels des Transporters Aci01347 durch Carnitin gehemmt wird (Breisch *et al.*, 2018). Dies führte zu der Vermutung, dass Aci01347 nicht primär für die Akkumulation von Cholin wichtig ist, sondern vielmehr ein Carnitintransporter ist (Breisch *et al.*, 2018). Um diese Annahme zu

überprüfen, wurde bereits eine  $\Delta aci01347$ -Deletionsmutante in *A. baumannii* ATCC 19606 erstellt und auf das Wachstum in MM mit Carnitin als Kohlenstoffquelle untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die  $\Delta aci01347$ -Mutante nicht mehr mit Carnitin wuchs (Breisch, 2017). Dies führte zu dem Schluss, dass Aci01347 ein sekundärer Carnitintransporter ist. Für die Analyse der Wachstumsparameter von *A. baumannii* ATCC 19606 mit Carnitin als Kohlenstoffquelle wurde das Wachstum des Wildtyps und der Deletionsmutante in MM mit Carnitin als Kohlenstoffquelle über die Zeit aufgenommen. Zur eindeutigen Klärung der Rolle von Aci01347 in der Aufnahme von Carnitin sollte die  $\Delta aci01347$ -Mutante komplementiert werden. Für die Komplementation wurde das Transportergen *aci01347* in den Vektor pVRL1 mit seinem nativen Promotor kloniert und über Sequenzierung verifiziert. Das Klonierungsschema ist in Abb. 26 dargestellt.



**Abb. 26. Klonierungsschema des Plasmids pVRL1\_aci01347 für die Komplementation der  $\Delta aci01347$ -Mutante.** Der Promotorbereich des Carnitin-Clusters (*aci01347\_Promotor*) und das Gen *aci01347* (*aci01347*) wurden mit Hilfe der Starteroligonukleotide P\_aci01347\_for\_NotI und P\_aci01347\_rev\_BamHI, sowie *aci01347\_for\_BamHI* und *aci01347\_rev\_PstI* (Tab. 6) amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *PstI* in den Vektor pVRL1 kloniert.

Das Wachstum des Wildtyps und der Deletionsmutante in MM mit Carnitin oder Na-Acetat als Kontrolle ist in Abb. 27 A gezeigt und das Wachstum der komplementierten Deletionsmutante, sowie der Mutante mit dem Vektor pVRL1 in MM mit Carnitin in Abb. 27 B.



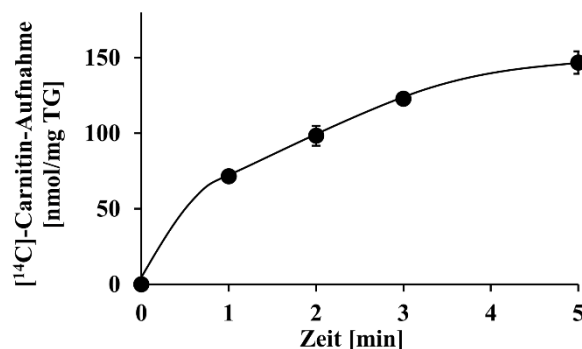
**Abb. 27. *Aci01347* ist essenziell für das Wachstum von *A. baumannii* ATCC 19606 mit Carnitin.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp (●/○) und die  $\Delta aci01347$ -Deletionsmutante (▲/△) wurden in MM mit 20 mM Na-Acetat (gefüllte Symbole) oder 20 mM Carnitin (offene Symbole) angezogen (A). Die Anzucht erfolgte schüttelnd bei 37 °C und über 28 h. Die OD<sub>600nm</sub> wurde stündlich dokumentiert. Die mit dem Plasmid pVRL1\_ *aci01347* komplementierte  $\Delta aci01347$ -Mutante (●) und dem Kontrollstamm  $\Delta aci01347$  mit dem Vektor pVRL1 (■) wurden in MM mit 20 mM Carnitin als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von 100 µg/ml Gentamycin angezogen (B). Die Anzucht erfolgte schüttelnd bei 37 °C und über 34 h. Dargestellt ist jeweils eine representative Wachstumskurve aus drei biologischen Replikaten.

Die Deletion des Gens *aci01347* hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. baumannii* in MM mit Na-Acetat als Kohlenstoffquelle (Abb. 27 A). Sowohl der Wildtyp als auch die  $\Delta aci01347$ -Mutante zeigten unter diesen Bedingungen eine Wachstumsrate von  $0,6 \text{ h}^{-1}$ . Anders hingegen war es beim Wachstum in MM mit Carnitin als Kohlenstoffquelle. Während der Wildtyp eine Wachstumsrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  zeigte, konnte bei der Deletionsmutante selbst nach 27 h keine Zunahme in der OD<sub>600nm</sub> festgestellt werden. Der Wildtyp wies durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle von Na-Acetat auf Carnitin eine Adaptationszeit von ca. 10 h auf. Bei Betrachtung der Wachstumskurve in Abb. 27 B, in der das Wachstum der komplementierten Deletionsmutante dargestellt wurde, ist ersichtlich, dass durch die Komplementation der  $\Delta aci01347$ -Mutante das Wachstum in MM mit Carnitin als Kohlenstoffquelle wieder hergestellt werden kann. Die Wachstumsrate der komplementierten  $\Delta aci01347$ -Mutante betrug  $0,3 \text{ h}^{-1}$  und war damit vergleichbar mit der des Wildtyps ( $0,4 \text{ h}^{-1}$ ). Die Adaptationszeit betrug hierbei ebenfalls ca. 10 h. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass für die

Komplementation mit pVRL1\_aci01347 der native Promotor des Gens verwendet wurde. Die Transformation des Vektors pVRL1 hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutante in MM mit Carnitin als Kohlenstoffquelle. Hier konnte ebenfalls nach 32 h keine Zunahme der OD<sub>600nm</sub> beobachtet werden. Diese Studien zeigen damit eindeutig, dass der BCCT Aci01347 für die Aufnahme von Carnitin als Kohlenstoffquelle essenziell ist.

### 3.4.2. Aci01347 ist kein Carnitin:γ-Butyrobetain-Antiporter

Da die Aufnahme von Carnitin in anderen Organismen meistens über einen Carnitin:γ-Butyrobetain-Antiporter verläuft, sollte durch Transportstudien mit radioaktiv markiertem Carnitin untersucht werden, ob Aci01347 ebenfalls ein Carnitin:γ-Butyrobetain-Antiporter ist. Hierfür wurde der Transporter in *E. coli* MKH13-Zellen produziert und anschließend die Aufnahme von Carnitin in Zellsuspensionsexperimenten mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Carnitin in Abwesenheit von γ-Butyrobetain analysiert (Abb. 28).



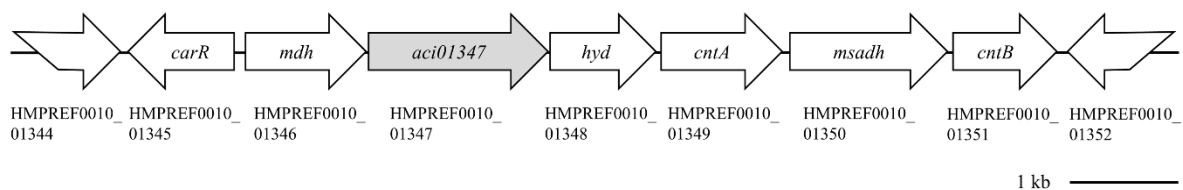
**Abb. 28. Der BCCT Aci01347 transportiert Carnitin.** Die Produktion des Transporters in *E. coli* MKH13-Zellen und die Transportstudien mit Zellsuspensionen erfolgte wie in den Kapiteln 2.4.1. und 2.10. beschrieben. Die Osmolalität im Puffer Ax wurde mit KCl auf 0,2 osmol/kg eingestellt. Nach einer dreiminütigen Inkubation unter schütteln wurde die Aufnahme von Carnitin durch die Zugabe von 1 μCi [<sup>14</sup>C]-Carnitin und 500 μM nicht-markiertem Carnitin gestartet und über 5 min gemessen. Die eingesetzten Zellen hatten ein Trockengewicht von 0,34 mg. Dargestellt wurde der ±S.E.M. aus drei biologischen Replikaten.

Diese Transportstudien mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Carnitin zeigten, dass Aci01347 Carnitin transportiert (Abb. 28). Nach einer dreiminütigen Inkubation der *E. coli* MKH13-Zellen bei 37 °C wurde Carnitin zugegeben und die Aufnahme von 147 nmol Carnitin/mg TG dokumentiert. Da die Zellen in Abwesenheit von γ-Butyrobetain gezogen worden war und auch

in diesen Aufnahmestudien kein  $\gamma$ -Butyrobetain zusätzlich zugeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme von Carnitin keinem Antiport-Mechanismus unterlag. Die zusätzliche Aufnahme von Cholin über diesen Transporter unterstützt die These, dass Aci01347 ein Symporter ist, bei dem die Aufnahme von Cholin oder Carnitin an den Transport von Protonen gekoppelt ist (Ziegler *et al.*, 2010).

### 3.4.3. Organisation der Gene des Abbauweges von Carnitin

Wie bereits in der Einleitung in Abb. 6 dargestellt, wird in *A. baumannii* ein Abbauweg für Carnitin über Malat-Semialdehyd zu Malat postuliert. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass Malat über eine Malat-Dehydrogenase anschließend zu Oxaloacetat umgesetzt wird (Zhu *et al.*, 2014). Hierbei liegen alle Gene, dessen Genprodukte essenziell für diesen Abbauweg sind innerhalb eines Genclusters zusammen mit dem *aci01347* Gen, welches für den Carnitintransporter kodiert (Abb. 29).



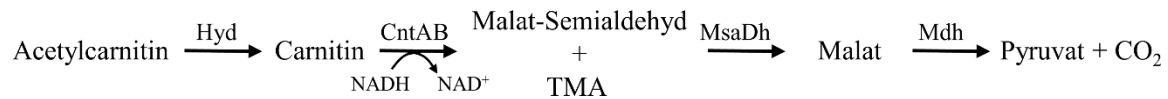
**Abb. 29. Die genetische Organisation der Gene des Abbauweges für Carnitin.** Der potenzielle Regulator des Clusters liegt in umgekehrter Orientierung vor dem Gencluster (*carR*). Unmittelbar stromaufwärts vor dem Transportergen (*aci01347*) liegt das Gen einer potenziellen Malat-Dehydrogenase (*mdh*) und stromabwärts des Transportergens liegt das Gen einer potenziellen Hydrolase (*hyd*) und die Gene des Proteinkomplexes CntAB (*cntA*, *cntB*) und einer potenziellen Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase (*msadh*). Weiterhin ist stromaufwärts des Regulatorgens in umgekehrter Orientierung ein hypothetisches Protein (HMPREF0010\_01344) und stromabwärts des Clusters ebenfalls ein hypothetisches Protein in umgekehrter Orientierung (HMPREF0010\_01352) vorhanden.

Die Gene des Abbauweges für Carnitin liegen stromauf- und stromabwärts des Gens des Carnitintransporters Aci01347. Stromaufwärts von *aci01347* liegt das Gen einer potenziellen Malat-Dehydrogenase (*mdh*; HMPREF0010\_01346), welche große Ähnlichkeiten zu dem D-Malat Enzym aus *Rhodobacter capsulatus* (90 % Ähnlichkeit und 72 % Identität) und zu der Tartrat-Dehydrogenase aus *P. aeruginosa* (90 % Ähnlichkeit und 70 % Identität) hat. Diese Enzyme sind unter anderem essenziell für die Umsetzung von D-Malat zu Pyruvat und zeigen

keine Aktivität gegenüber L-Malat (Tipton und Peisach, 1990; Martínez-Luque *et al.*, 2001). Es wurde vermutet, dass dieses als Tartrat-Dehydrogenase annotierte Protein das Intermediat des Abbauweges für Carnitin, Malat, umwandelt (Zhu *et al.*, 2014). Stromabwärts von *aci01347* liegt das Gen einer potenziellen Hydrolase (*hyd*; HMPREF0010\_01348), für die postuliert wird, dass sie wichtig für den Abbau von Acetylcarnitin ist. Das Genprodukt mit 324 Aminosäuren zeigte größte Ähnlichkeiten zu einem lipolytischen Protein aus *P. aeruginosa* (62,2 % Ähnlichkeit und 41,7 % Identität), dessen Funktion jedoch nicht aufgeklärt ist. Weiterhin liegt das Gen einer Rieske-Oxygenase (*cntA*; HMPREF0010\_01349) und der dazugehörigen Reduktase (*cntB*; HMPREF0010\_01351), die bereits als essenziell für den Abbau von Carnitin zu Malat-Semialdehyd (Abb. 6) charakterisiert wurden (Zhu *et al.*, 2014) und das Gen einer potenziellen Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase (*msadh*; HMPREF0010\_01350) stromabwärts des Hydrolase-Gens. Vor diesem Gencluster in umgekehrter Orientierung befindet sich ein transkriptioneller Regulator der LysR-Familie. Dieser Regulator mit 326 Aminosäuren zeigt größte Ähnlichkeiten zu dem transkriptionellen Regulator der LysR-Familie aus *E. coli*, welcher die Expression einer D-Malat-Dehydrogenase positiv reguliert (76,8 % Ähnlichkeit und 46,4 % Identität). Die Ähnlichkeit und die Lokalisation dieses potenziellen Regulatorgens führten zu der Vermutung, dass dieser eine Rolle bei der Regulation der Gene mit Funktion im Abbau von Carnitin spielt.

Für den Abbau von Carnitin wurde postuliert, dass Carnitin über den Proteinkomplex CntAB zu Malat-Semialdehyd umgewandelt wird und anschließend über eine Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase weiter zu Malat oxidiert wird, welches in den TCA-Zyklus eingespeist wird. Die Ähnlichkeit der Malat-Dehydrogenase, dessen Gen innerhalb des Carnitin-Clusters lokalisiert ist, zu der Tartrat-Dehydrogenase aus *P. aeruginosa* lässt jedoch vermuten, dass Malat weiterhin zu Pyruvat umgewandelt wird und anschließend in den TCA-Zyklus eingespeist wird (Abb. 30). Allerdings ist dieser Abbauweg bislang experimentell nicht aufgeklärt.

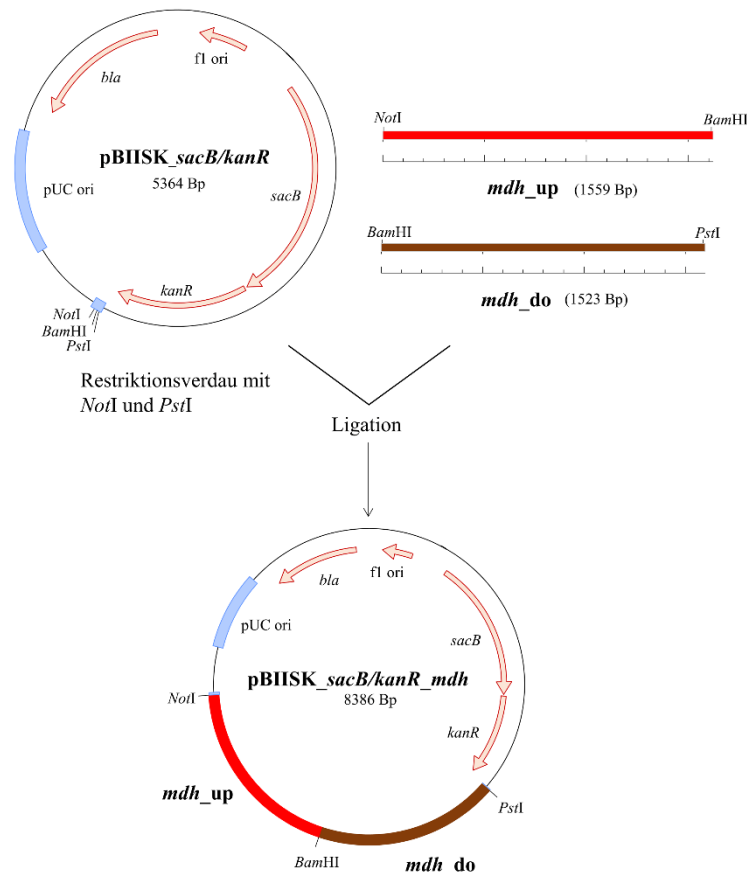




**Abb. 30. Postulierter Abbauweg für Acetylcarnitin und Carnitin über Malat-Semialdehyd und Malat zu Pyruvat.** Acetylcarnitin wird über die Acetylcarnitin-Hydrolase (Hyd) zu Carnitin umgewandelt, welches anschließend über den Proteinkomplex CntAB unter dem Verbrauch von NADH zu Malat-Semialdehyd und TMA verstoffwechselt wird. TMA wird aus der Zelle segregiert und Malat-Semialdehyd weiter zu Malat durch die Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase (MsaDh) abgebaut. Malat wird über die Malat-Dehydrogenase (Mdh) zu Pyruvat oxidiert, welches in den TCA-Zyklus eingespeist wird.

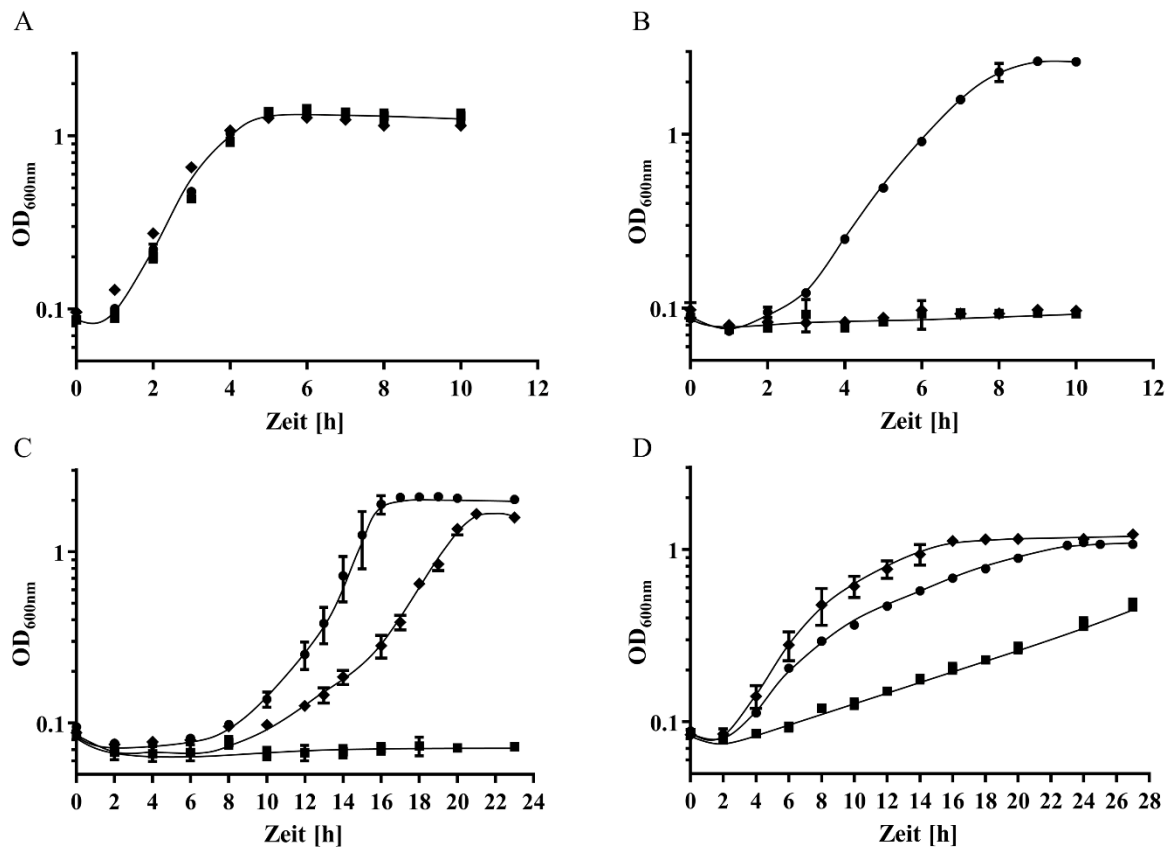
#### 3.4.4. Der Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin läuft über D-Malat als Zwischenprodukt

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte gezeigt werden, dass *cntA* und *cntB* für eine Carnitin-Oxidoreduktase kodieren, die für die Umsetzung von Carnitin zu Malat-Semialdehyd und TMA verantwortlich ist. Das Spaltprodukt TMA konnte dabei nachgewiesen werden (Zhu *et al.*, 2014). Die Funktion aller weiteren Gene dieses Genclusters war allerdings experimentell nicht bewiesen. In den folgenden Analysen sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob das als potenzielle Malat-Dehydrogenase annotierte Gen *mdh* für die Umsetzung von Carnitin essenziell ist. Enzyme dieser Klassen sind beteiligt an der Umsetzung von Tartrat zu Dihydroxyfumarat, Meso-Tartrat zu D-Glycerat und von D-Malat zu Pyruvat (Tipton und Peisach, 1990). Des Weiteren zeigt diese potenzielle Malat-Dehydrogenase große Ähnlichkeiten zu der D-Malat-Dehydrogenase aus *R. capsulatus*, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben. Die D-Malat-Dehydrogenase aus *R. capsulatus* ist wichtig für die Umsetzung von D-Malat zu Pyruvat und zeigt keine Aktivität gegenüber L-Malat (Martínez-Luque *et al.*, 2001). Hierdurch stellte sich die Frage, ob der Abbau von Carnitin nicht über L-Malat, sondern über D-Malat verläuft und diese Dehydrogenase spezifisch für die Umwandlung von D-Malat zu Pyruvat ist. Deshalb, sollte eine  $\Delta mdh$ -Mutante erstellt und in Wachstumsanalysen getestet werden. Für die Deletion der Malat-Dehydrogenase wurde das Plasmid pBIISK\_ *sacB/kanR\_mdh* kloniert (Abb. 31) und wurde, wie in Kapitel 2.3.17. beschrieben, erst über die Selektion mit Kanamycin in das Genom des Wildtyps integriert, und anschließend über Gegenselektion mit Hilfe der Levansucrase, mit dem zu deletierenden Gen wieder segregiert. Der Erfolg der Deletion wurde über Sequenzierung überprüft.



**Abb. 31. Klonierungsschema des Plasmides *pBIISK\_sacB/kanR\_mdh* für die markerlose Deletion des Gens *mdh* in *A. baumannii* ATCC 19606.** Die Stromaufwärts- (*mdh\_up*) und Stromabwärtsbereiche (*mdh\_do*) des Gens *mdh* wurden mit Hilfe der Starteroligonukleotide *mdh\_up\_for\_NotI* und *mdh\_up\_rev\_BamHI*, sowie *mdh\_do\_for\_BamHI* und *mdh\_do\_rev\_PstI* (Tab. 5) amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *PstI* in den Vektor *pBIISK\_sacB/kanR* kloniert.

Für die Aufklärung der Funktion des *mdh*-Gens beim Abbau von Carnitin wurden Wachstumsstudien mit der generierten  $\Delta mdh$ -Mutante durchgeführt. In diesen Wachstumsstudien wurde ebenfalls eine zuvor generierte markerlose  $\Delta hyd$ -Mutante eingeschlossen (Schumm, 2021). Bei dem Gen *hyd* handelt es sich um das Gen einer potenziellen Acetylcarnitin-Hydrolase. Getestet wurden die  $\Delta hyd$ - und die  $\Delta mdh$ -Deletionsmutante auf das Wachstum im Vergleich zum *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp in MM mit Acetylcarnitin, Carnitin und D-Malat als Wachstumssubstrate. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 32 dargestellt.



**Abb. 32. Funktion der Malat-Dehydrogenase und der Acetylcarnitin-Hydrolase bei dem Abbau von Carnitin und Acetylcarnitin.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp (●), die  $\Delta hyd$ -Mutante (◆) und die  $\Delta mdh$ -Mutante (■) wurden in MM mit 20 mM Na-Acetat (A), 20 mM Acetylcarnitin (B), 20 mM Carnitin (C) oder 20 mM D-Malat (D) angezogen. Die Anzucht erfolgte schüttelnd bei 37 °C und über den angegebenen Zeitraum. Die OD<sub>600nm</sub> wurde stündlich oder im zwei-Stunden-Takt dokumentiert. Dargestellt wurde jeweils der  $\mp$ S.E.M. aus drei biologischen Replikaten.

In den Wachstumsanalysen der Stämme *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp, der  $\Delta hyd$ - und der  $\Delta mdh$ -Mutante in MM mit Na-Acetat, Acetylcarnitin, Carnitin oder D-Malat als Kohlenstoffquellen (Abb. 32 A-D) konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp auf allen Substraten wuchs. Anders hingegen war es bei den jeweiligen Mutanten. Auf Na-Acetat (Abb. 32 A) wuchsen alle Stämme vergleichbar bis zu einer finalen OD<sub>600nm</sub> von 1,2 – 1,3 (Tab. 18) und zeigten eine Wachstumsrate von 0,8 – 0,9 h<sup>-1</sup> (Tab. 18). In MM mit Acetylcarnitin als Kohlenstoffquelle (Abb. 32 B) zeigte ausschließlich der Wildtyp Wachstum bis zu einer finalen OD<sub>600nm</sub> von 2,6 und mit einer Wachstumsrate von 0,6 h<sup>-1</sup>. Die  $\Delta hyd$ - und die  $\Delta mdh$ -Mutante stagnierten bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,1 nach dem Animpfen. Bei der Verwendung von Carnitin als Kohlenstoffquelle in MM (Abb. 32 C) wuchsen der Wildtyp und die  $\Delta hyd$ -Mutante bis zu einer vergleichbaren finalen OD<sub>600nm</sub> von 2,0 und 1,6 und zeigten ähnliche Wachstumsraten von 0,5 h<sup>-1</sup> (Wildtyp) und 0,4 h<sup>-1</sup> ( $\Delta hyd$ ), wobei die Acetylcarnitin-Hydrolase-Mutante eine längere

Adaptationszeit hatte an dieses Substrat im Vergleich zum Wildtyp. Diese verlängerte Adaptationszeit könnte auf die Veränderung der transkriptionellen Einheit und durch die Deletion des Gens im Carnitin-Cluster zurückzuführen sein. Für das Wachstum in MM und D-Malat als Kohlenstoffquelle (Abb. 32 D) wurden für den Wildtyp und die  $\Delta hyd$ -Mutante ebenfalls ähnliche Wachstumsraten gefunden (Tab. 18). Die  $\Delta mdh$ -Mutante zeigte dahingegen ein deutlich langsames Wachstum mit D-Malat mit 0,08 Teilungen pro Stunde. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das aufgenommene D-Malat möglicherweise durch eine der weiteren Malat-Dehydrogenasen im Genom von *A. baumannii* (HMPREF0010\_02683, HMPREF0010\_02340, HMPREF0010\_01459, HMPREF0010\_03198) mit einer geringeren Rate umgesetzt werden könnte oder durch eine Racemase zu L-Malat umgewandelt wurde, welches über eine L-Malat-Dehydrogenase verstoffwechselt werden kann. Allerdings konnte in Genomanalysen keine Racemase gefunden werden.

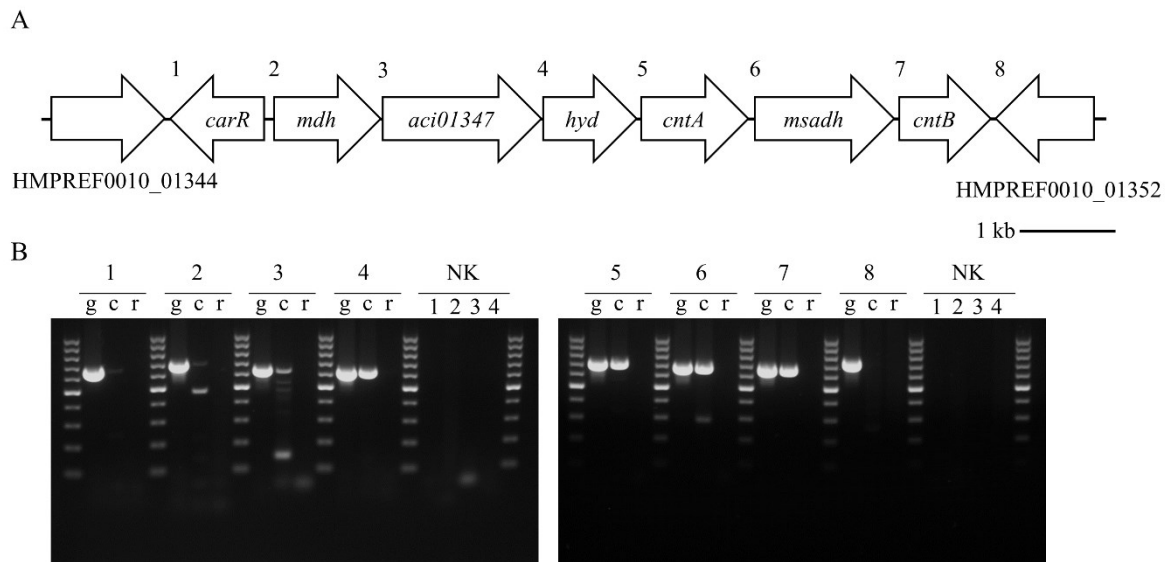
Tab. 18. Wachstumsparameter des *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyps, der  $\Delta hyd$ - und der  $\Delta mdh$ -Mutanten beim Wachstum in MM mit Na-Acetat, Acetylcarnitin, Carnitin oder D-Malat als Kohlenstoffquelle.

<b>Stamm</b>	<b>Na-Acetat</b> [OD <sub>600nm</sub> / h <sup>-1</sup> ]	<b>Acetylcarnitin</b> [OD <sub>600nm</sub> / h <sup>-1</sup> ]	<b>Carnitin</b> [OD <sub>600nm</sub> / h <sup>-1</sup> ]	<b>D-Malat</b> [OD <sub>600nm</sub> / h <sup>-1</sup> ]
Wildtyp	1,2 / 0,8	2,6 / 0,6	2,0 / 0,5	1,1 / 0,2
$\Delta hyd$	1,2 / 0,8	- / -	1,6 / 0,4	1,2 / 0,3
$\Delta mdh$	1,3 / 0,9	- / -	0,07 / -	0,47 / 0,08

Diese Wachstumsanalysen zeigten eindeutig, dass das Gen *mdh* für den Abbau von Carnitin und Acetylcarnitin essenziell ist und damit, dass D-Malat ein zentrales Intermediat des Carnitin Stoffwechsels ist. Weiterhin konnte die Funktion der Acetylcarnitin-Hydrolase in der Umwandlung von Acetylcarnitin zu Carnitin bestätigt werden. Carnitin wird anschließend über den Proteinkomplex CntAB zu Malat-Semialdehyd verstoffwechselt. Das Malat-Semialdehyd wird über die Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase weiter zu D-Malat oxidiert, welches über die Malat-Dehydrogenase zu Pyruvat umgewandelt wird (Abb. 30).

### 3.4.5. Die Gene für den Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin über D-Malat bilden ein Operon

Für die Überprüfung, ob die essenziellen Gene für den Abbau von Carnitin als eine transkriptionelle Einheit exprimiert werden, wurden die intergenen Bereiche des potenziellen Operons mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Hierfür wurde die RNA isoliert, wie in Kapitel 2.3.7. beschrieben, in cDNA umgewandelt und diese anschließend als Matrize für die PCR verwendet. Als PCR-Kontrolle wurden die intergenen Bereiche ebenfalls an genomischer DNA vervielfacht. Das Ergebnis des Operonnachweises ist in Abb. 33 B dargestellt. Die verwendeten Starteroligonukleotidsequenzen sind in Tab. 9 aufgelistet und die intergenen Bereiche wurden in der Abb. 33 A mit 1 – 8 gekennzeichnet.

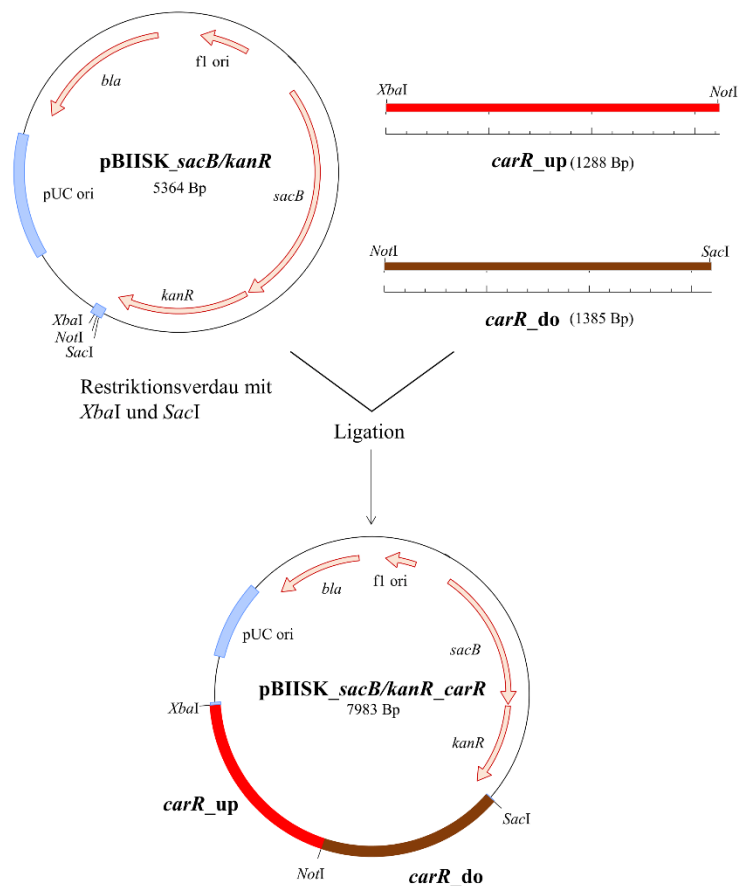


**Abb. 33. Die Gene für den Abbau von Carnitin bilden eine transkriptionelle Einheit.** Die RNA von *A. baumannii* ATCC 19606 wurde, wie in Kapitel 2.3.7. beschrieben, extrahiert und in cDNA überschrieben (Kapitel 2.3.8.). Anschließend wurden, mit Hilfe der cDNA und der genomischen DNA, die intergenen Bereiche zwischen den jeweiligen Genen amplifiziert. Als Kontrolle diente H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> oder RNA an Stelle der DNA. Verwendet wurden für die indizierten intergenen Bereiche (A) die Starteroligonukleotidpaare 01344-*carR*\_for und 01344-*carR*\_rev (1), *carR*\_mdh\_for und *carR*\_mdh\_rev (2), *mdh*\_aci01347\_for und *mdh*\_aci01347\_rev (3), *aci01347*\_hyd\_for und *aci01347*\_hyd\_rev (4), *hyd*\_cntA\_for und *hyd*\_cntA\_rev (5), *cntA*\_msadh\_for und *cntA*\_msadh\_rev (6), *msadh*\_cntB\_for und *msadh*\_cntB\_rev (7), sowie *cntB*\_01352\_for und *cntB*\_01352\_rev (8). Die Amplifikation der intergenen Bereiche erfolgte an der cDNA (c), der genomischen DNA als Kontrolle (g), RNA zur Kontrolle der Reinheit der RNA (r) und ohne die Zugabe einer Matrize (NK). Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch analysiert (B). Als Größenstandard diente der 100 Bp-DNA-Standard von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Bei Verwendung der cDNA als Matrize in der PCR konnten alle intergenen Bereiche zwischen den Genen *mdh* und *cntB* amplifiziert werden (Abb. 33, Spuren 3-7). Für die Vervielfachung des intergenen Bereiches zwischen dem Gen HMPREF0010\_01344 und dem Regulatorgen *carR* wurde ein Produkt von 659 Bp erwartet (Spur 1). Dieses PCR-Produkt konnte bei Verwendung der chromosomalen DNA detektiert werden, jedoch nicht in der PCR mit cDNA als Matrize. Gleiches konnte ebenfalls für die Vervielfachung des Bereiches zwischen *carR* und *mdh* beobachtet werden (Spur 2, 693 bp). Bei Verwendung von chromosomaler DNA konnte ein Fragment mit der apparenten Länge nachgewiesen werden, wohingegen die PCR mit cDNA zu keinem Produkt führte. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der entgegengesetzten Orientierung von *carR* und *mdh*, die daher keinesfalls cotranskribiert werden können. Für die intergenen Bereiche zwischen den Genen, welche für Proteine mit Rolle im Abbau von Carnitin kodieren, wurden Fragmente mit einer Länge von 633 Bp (Spur 3), 619 Bp (Spur 4), 700 Bp (Spur 5), 667 Bp (Spur 6) und 659 Bp (Spur 7) erwartet. Hierbei konnte in allen PCR-Ansätzen, sowohl mit chromosomaler DNA als auch mit cDNA als Matrize, ein Produkt erhalten werden mit der apparenten Größe. Für den intergenen Bereich zwischen dem *cntB*-Gen und dem Gen HMPREF0010\_01352 wurde ein Fragment mit der Länge von 719 Bp erwartet, welches in der PCR mit chromosomaler DNA detektiert werden konnte, jedoch nicht in der Amplifikation des Fragments mit cDNA als Matrize (Spur 8). Zusammenfassend führen diese Erkenntnisse zu dem Schluss, dass die Gene *mdh* – *cntB*, die wichtig für den Abbau von Carnitin sind, eine transkriptionelle Einheit bilden.

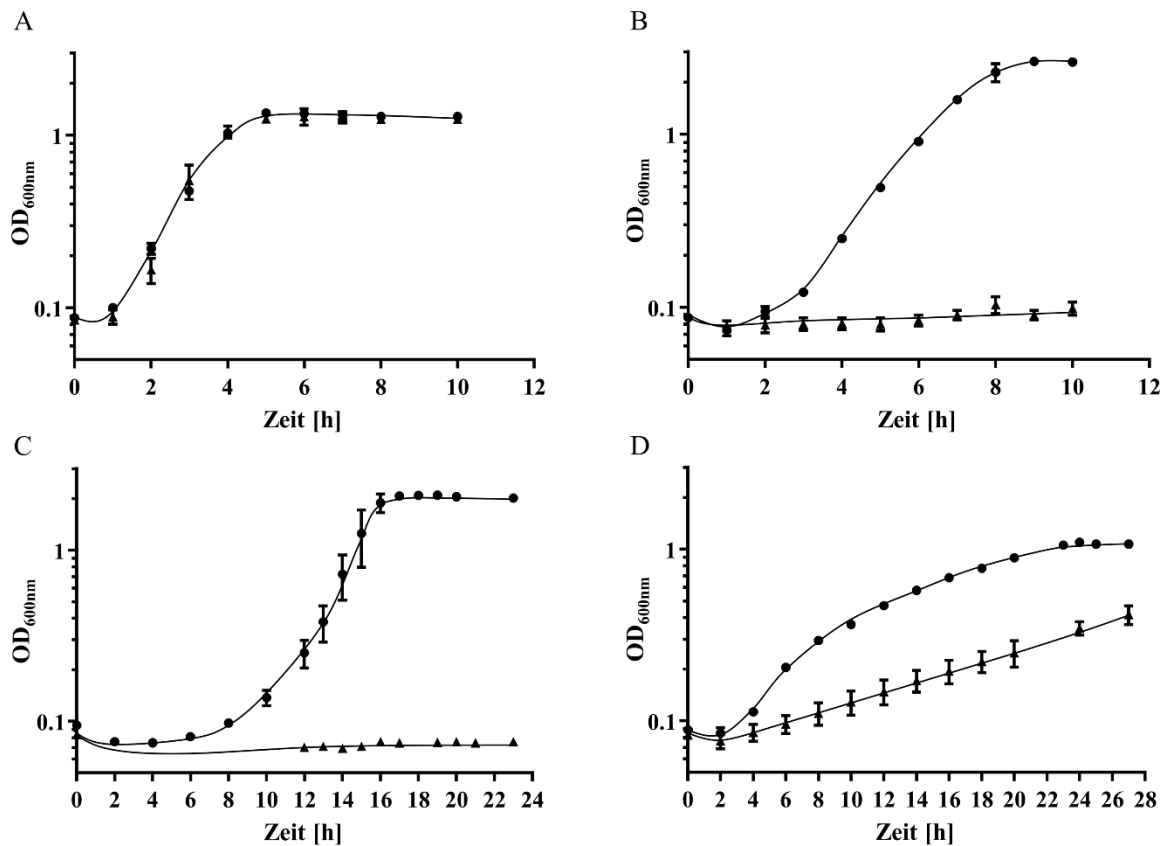
#### **3.4.6. Die Gene mit Funktion im Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin werden durch den transkriptionellen Regulator CarR positiv reguliert**

Zur Analyse der Regulation des Abbauweges wurde das potenzielle Regulatorgen *carR* deletiert und die Deletionsmutante in Wachstumsanalysen untersucht. Für die Deletion des Regulators wurde das Plasmid pBIISK\_ *sacB/kanR\_carR* generiert (Abb. 34) und, wie in Kapitel 2.8. beschrieben, in das Genom des Wildtyps integriert. Die Kanamycin-Kassette des Plasmides wurde hierbei als Selektionsmarker verwendet. Anschließend wurde über Gegenselektion mit Hilfe der Levansucrase das Plasmid zusammen mit dem zu deletierenden Gen wieder segregiert. Der Erfolg der Deletion wurde über Sequenzierung überprüft.



**Abb. 34. Klonierungsschema des Plasmides pBIISK\_sacB/kanR\_carR für die markerlose Deletion des Gens *carR* in *A. baumannii* ATCC 19606.** Die Stromaufwärts- (*carR\_up*) und Stromabwärtsbereiche (*carR\_do*) des Gens *carR* wurden mit Hilfe der Starteroligonukleotide *carR\_up\_for\_XbaI* und *carR\_up\_rev\_NotI*, sowie *carR\_do\_for\_NotI* und *carR\_do\_rev\_SacI* amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SacI* in den Vektor pBIISK\_sacB/kanR kloniert.

Um zu überprüfen, ob der transkriptionelle Regulator das Carnitin-Operon reguliert, wurde die markerlose  $\Delta carR$ -Mutante in Wachstumsanalysen auf das Wachstum in MM mit 20 mM Na-Acetat, Acetylcarnitin, Carnitin oder D-Malat als Kohlenstoffquelle getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt.



**Abb. 35. Die Rolle von CarR bei der Regulation der Gene mit Funktion im Abbau von Carnitin.**

Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp (●) und die  $\Delta carR$ -Mutante (▲) wurden in MM mit 20 mM Na-Acetat (A), 20 mM Acetylcarnitin (B), 20 mM Carnitin (C) oder mit 20 mM D-Malat (D) angezogen. Die Anzucht erfolgte schüttelnd bei 37 °C und über den angegebenen Zeitrahmen. Die OD<sub>600 nm</sub> wurde stündlich oder im zwei-Stunden-Takt dokumentiert. Dargestellt wurde der  $\mp$ S.E.M. aus drei biologischen Replikaten.

Der Vergleich des Wachstums des Wildtyps und der  $\Delta carR$ -Deletionsmutante in MM mit Na-Acetat als Kohlenstoffquelle zeigte keine Unterschiede (Abb. 35 A). Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante wuchsen mit einer Wachstumsrate von  $0,7 \text{ h}^{-1}$ . Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Deletion des Regulatorgens keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. baumannii* auf Kohlenstoffquellen hat, die nicht im Carnitin-Metabolismus involviert sind. Anders hingegen war es beim Wachstum mit Acetylcarnitin, Carnitin oder D-Malat als Kohlenstoffquellen. Während der Wildtyp mit Acetylcarnitin unmittelbar nach der Überführung der Zellen in das Medium mit einer Wachstumsrate von  $0,8 \text{ h}^{-1}$  begann zu wachsen, konnte für die  $\Delta carR$ -Mutante selbst nach 10 h keine Zunahme in der Zellzahl beobachtet werden (Abb. 35 B). Ähnlich verhielt es sich für das Wachstum der beiden Stämme mit Carnitin als Kohlenstoffquelle. Der Wildtyp fing nach einer zehnstündigen Adaptationszeit



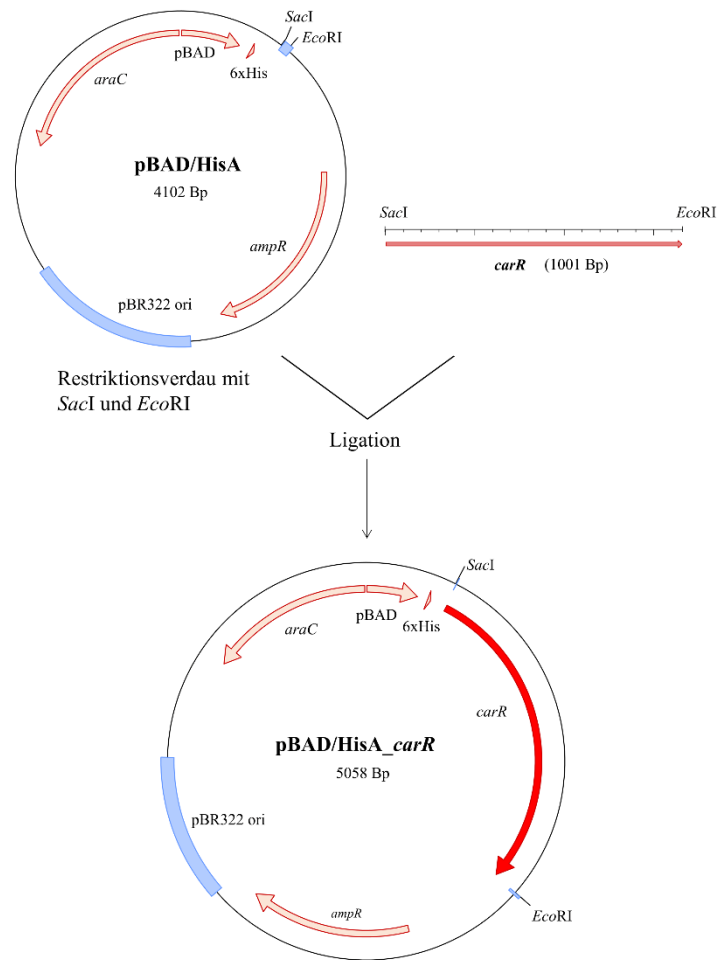
mit einer Wachstumsrate von  $0,5 \text{ h}^{-1}$  an zu wachsen, während die  $\Delta carR$ -Mutante selbst nach 23 h keine Zunahme in der  $OD_{600\text{nm}}$  zeigte (Abb. 35 C). Anders als in den Wachstumsversuchen mit Carnitin oder Acetylcarnitin zeigte die  $\Delta carR$ -Mutante mit D-Malat als Kohlenstoffquelle Wachstum. Die Wachstumsrate lag dabei mit  $0,07 \text{ h}^{-1}$  deutlich unter der des Wildtyps ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ). Dieses langsame Wachstum der Mutante kann, wie bereits für die  $\Delta mdh$ -Mutante beschrieben (Abb. 32 D), auf das Vorhandensein weiterer Malat-Dehydrogenasen im Genom von *A. baumannii* ATCC 19606 zurückzuführen sein, die mit einer deutlich geringeren Aktivität D-Malat umsetzen könnten (Kapitel 3.4.4.) oder einer Racemase, welche D-Malat zu L-Malat umwandelt, welches anschließend über eine L-Malat-Dehydrogenase in den TCA-Zyklus eingespeist wird. Zusammenfassend führen die Wachstumsversuche zu dem Schluss, dass CarR essenziell ist für die Induktion der Expression der Gene mit Funktion im Abbau von Acetylcarnitin und Carnitin.

### 3.5. Identifizierung von CarR-Bindestellen vor den Strukturgenen des Carnitin-Operons

In weiteren Studien sollte die CarR Binderegion vor den Genen mit Funktion im Abbau von Carnitin analysiert werden. Hierfür wurde der Regulator CarR in *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> (DE3) heterolog produziert und anschließend mittels des N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der aufgereinigte Regulator wurde dann verwendet, um über EMSA die CarR-Binderegion von dem Operon einzugrenzen und die Effektoren des Regulators zu identifizieren.

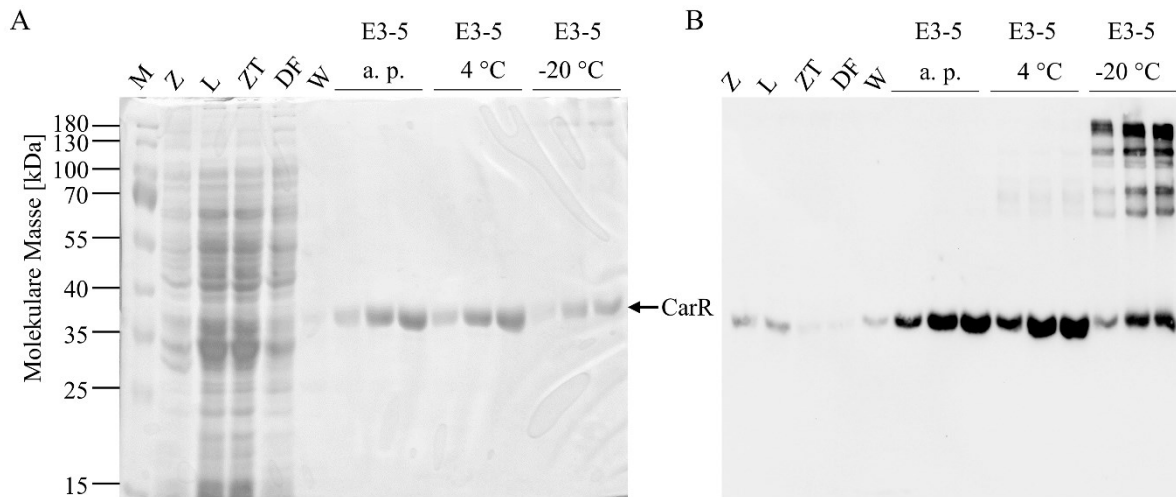
#### 3.5.1. Überproduktion, Aufreinigung und Lagerung des Regulators CarR

Für die Identifizierung der CarR-Binderegion vor den Genen des Carnitin-Operons wurde das Gen des Regulators *carR* in den Vektor pBAD\_HisA über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *EcoRI* kloniert. Anschließend wurde das Plasmid pBAD/HisA\_*carR* in den Produktionsstamm *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> (DE3) transformiert. Die Vorgehensweise der Klonierung ist in Abb. 36 dargestellt und der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung überprüft.



**Abb. 36. Klonierungsschema des Plasmides pBAD/HisA\_carR für die Expression des carR-Gens und Produktion von CarR in *E. coli* BL21 STAR™ (DE3).** Das Gen *carR* wurde mit Hilfe der Starteroligonukleotide *carR\_for\_SacI* und *carR\_rev\_EcoRI* amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *EcoRI* in den Vektor pBAD/hisA kloniert.

Die Produktion des Regulators erfolgte durch die Anzucht des rekombinanten Stammes *E. coli* BL21 STAR™ (DE3) (pBAD/HisA\_carR) in LB-Medium bei 37 °C und 130 Upm. Die Expression von *carR* wurde bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,7 – 0,8 mit 0,02 % Arabinose induziert. Nach einer dreistündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und der Regulator aus dem zellfreien Lysat über den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags mittels einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Erfolg dieser Reinigung wurde anschließend in einem SDS-Gel und einem Western Blot überprüft (Abb. 37 A, B). Für die Analyse der Stabilität des CarR-Proteins wurde der Regulator bei verschiedenen Temperaturen gelagert und nach 24 h auf Degradierung untersucht (Abb. 37 A, B).



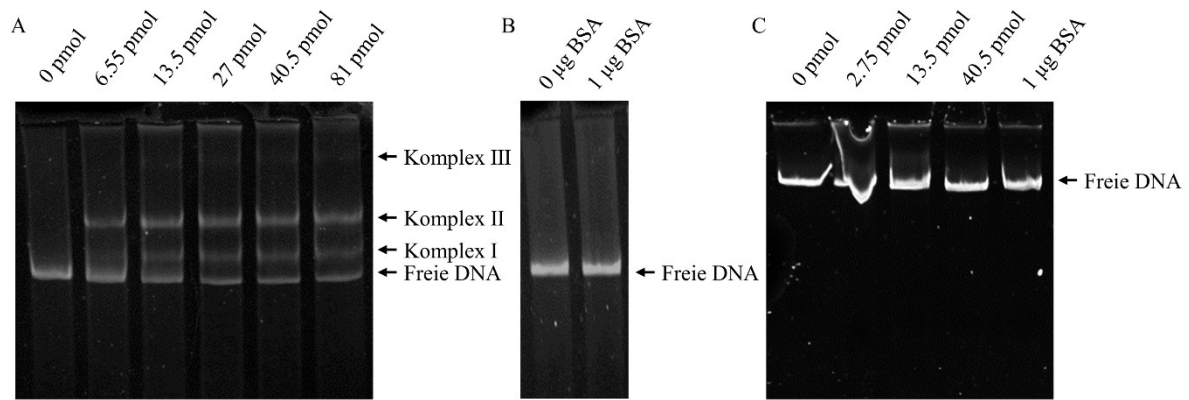
**Abb. 37. Überprüfung der heterologen Produktion und Aufreinigung von CarR.** Die Produktion von CarR erfolgte während der Anzucht von *E. coli* BL21 STAR™ (DE3) (pBAD/HisA\_ *carR*) in LB-Medium bei 37 °C. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,7 inkubiert und anschließend wurde die Expression von *carR* durch die Zugabe von 0,02 % Arabinose für drei Stunden induziert. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschossen und das zellfreie Lysat für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet. Aufgetragen wurden die Zellen nach der Ernte (Z), das geklärte Lysat (L), die Zelltrümmer nach dem Aufschluss (ZT), der Durchfluss nach dem Auftragen des Lysats auf die Matrix (DF), die Waschfraktion (W) und die Elutionsfraktionen 3 – 5 unmittelbar nach der Reinigung (a.p.) und 24 h nach der Reinigung, gelagert bei 4 °C oder bei -20 °C. Als Größenstandard (M) wurde der „PreStained Protein Standard“ von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (A) und die Detektion der Proteine auf dem Western Blot (B) erfolgte nach Angaben in Kapitel 2.6.2. Der Pfeil kennzeichnet das Zielprotein CarR.

In der Spur Z (Abb. 37 A, B) wurden die Zellen nach der Expression des Regulatorgens aufgetragen. Wie im Western Blot (Abb. 37 B) ersichtlich, konnte in den Zellen ein Protein mit der apparenten Masse von 37 kDa detektiert werden, welche mit der abgeleiteten molekularen Masse von CarR übereinstimmt (37 kDa). Nach dem Aufschluss wurden das Lysat (Spur: L) und die abgetrennten Zelltrümmer (Spur: ZT) analysiert. Hierbei konnte das Zielprotein im Lysat, nicht jedoch in den Zelltrümmern detektiert werden, woraus zu schließen ist, dass der Regulator löslich im Cytoplasma vorlag. Anschließend wurde das zellfreie Lysat auf das Ni-NTA-Material gegeben und der Durchfluss analysiert. Im Durchfluss (Spur: DF) konnte CarR nicht nachgewiesen werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass das gesamte Protein an die Matrix gebunden hatte. Für das Entfernen von Verunreinigungen wurde das Ni-NTA-Material gewaschen, wobei geringe Mengen des Zielproteins in der Waschfraktion gefunden wurden, woraus geschlossen werden konnte, dass die Bindekapazität der Säule nahezu erreicht war und dementsprechend schwach gebundenes Protein bzw. ungebundenes CarR-Protein mit

dem Waschen heruntergespült wurde. In den Elutionsfraktionen 3 – 5 (Spuren: a.p.) konnte das Zielprotein sowohl durch Proteinfärbung als auch im Wester Blot in sehr reiner Form nachgewiesen werden. Abbauprodukte oder Aggregationen konnten unmittelbar nach der Aufreinigung nicht detektiert werden. Nach der Lagerung über 24 h bei -20 °C (Spuren: -20 °C) wurden allerdings in allen drei Elutionsfraktionen CarR-Komplexe detektiert, welche selbst nach der Zugabe von SDS bestehen blieben. Nahezu keine CarR-Aggregate traten nach der Lagerung bei 4 °C auf. Im Folgenden wurde der Regulator nach der Reinigung bei 4 °C gelagert.

### 3.5.2. CarR bindet an den Stromaufwärtsbereich des *mdh*-Gens

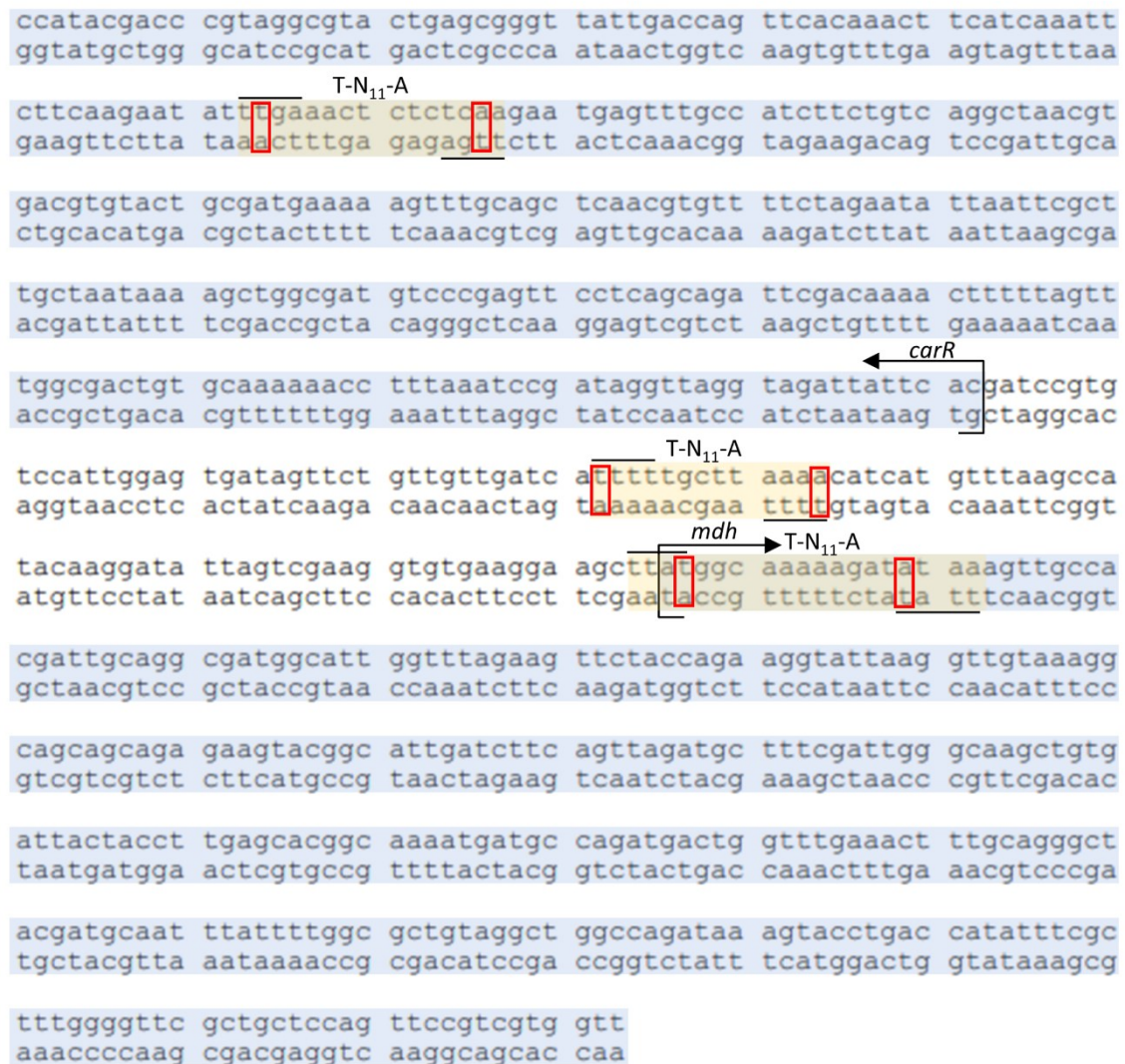
Für die Analyse der Binderegion des Regulators CarR wurden DNA-Bindestudien mit dem aufgereinigten CarR-Protein durchgeführt. Hierfür wurde ein 693 Bp DNA-Fragment, welches 300 Bp des 5'-Endes des ersten Gens des Carnitin-Operons (*mdh*) und 300 Bp des 5'-Endes des stromaufwärts liegenden Gens (*carR*) einschloss. Dieses 693 Bp lange DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert. Als Startsequenzen dienten die in der Tab. 10 aufgelisteten Starteroligonukleotide *carR\_mdh\_for* und *carR\_mdh\_rev*. Für die Analyse des Bindeverhaltens von CarR an dieses DNA-Fragment wurden 233 fmol DNA mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen inkubiert und anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel (PAGE) das Laufverhalten der DNA untersucht. Das Ergebnis dieser nativen PAGE ist in Abb. 38 A dargestellt. Zusätzlich wurde die Spezifität der Bindung des Regulators getestet. Dafür wurde ein beliebiges DNA-Fragment (1613 Bp lang) mit vergleichbarer Proteinmenge inkubiert und die Bindung von CarR an dieses DNA-Fragment untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 38 B dargestellt.



**Abb. 38. Analyse der Bindung von CarR an ein 693 Bp langes DNA-Fragment des Stromaufwärtsbereiches des Carnitin-Operons.** **A:** Das eingesetzte 693 Bp lange DNA-Fragment wurde mit Hilfe des Starteroligonukleotidpaares *carR\_mdh\_for* und *carR\_mdh\_rev* amplifiziert und in jedem Reaktionsansatz wurden 233 fmol DNA eingesetzt. Die Proteinmengen wurden variiert wie angegeben. **B:** Das eingesetzte 693 Bp lange DNA-Fragment wurde mit Hilfe des Starteroligonukleotidpaares *carR\_mdh\_for* und *carR\_mdh\_rev* amplifiziert und in jedem Reaktionsansatz wurden 233 fmol DNA eingesetzt und in An- oder Abwesenheit von 1 µg BSA inkubiert. **C:** Das eingesetzte 1613 Bp lange DNA-Fragment wurde mit Hilfe des Starteroligonukleotidpaares *betaA\_up\_for\_NotI* und *betaA\_up\_rev\_BamHI* amplifiziert und in jedem Reaktionsansatz wurden 233 fmol DNA eingesetzt. Die Proteinmengen wurden variiert wie angegeben. Als BSA-Kontrolle wurden 1 µg BSA eingesetzt. Die Detektion erfolgte nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid über 5 min mittels UV-Licht.

Ab einer Konzentration von 6,55 pmol CarR konnte ein Retardieren des DNA-Fragments mit der potenziellen Binderegion für CarR festgestellt werden. Es traten zwei Proteinkomplexe, Komplex II und ein etwas kleinerer Komplex I auf (Abb. 38 A). Mit steigender Proteinkonzentration nahm die Menge der Komplexe zu. Ab 40,5 pmol CarR trat ein weiterer, deutlich größerer Komplex auf (Komplex III, Abb. 38 A). Die unterschiedlichen Protein-DNA-Komplexe spiegeln möglicherweise die Bindung von mehreren Regulator-Molekülen wider. Im ersten detektierten Komplex könnte CarR einfach gebunden vorliegen. Im zweiten Komplex könnte CarR doppelt und im dritten Komplex dreifach an die DNA binden. Dies deutet auf das Vorhandensein mehrerer Bindestellen in diesem DNA-Fragment hin. Transkriptionelle Regulatoren der LysR-Familie binden an palindromische DNA-Sequenzen mit dem Motiv T-N<sub>11</sub>-A (Maddocks und Oyston, 2008). In *in silico* Analysen des DNA-Fragmentes konnten drei potenzielle Bindestellen identifiziert werden, welche orange markiert in Abb. 39 dargestellt sind. Jede der potenziellen Bindestellen zeigt in der palindromischen Sequenz, am 5'- und 3'-Ende, das spezifische T-N<sub>11</sub>-A-Motiv, welches für die Bindung für transkriptionelle Regulatoren der LysR-Familie spezifisch ist (Parsek *et al.*, 1994; Maddocks und Oyston, 2008).

Ob CarR tatsächlich spezifisch an diese potenziellen Bindestellen bindet, muss allerdings in weiteren zukünftigen Experimenten genauer analysiert werden.



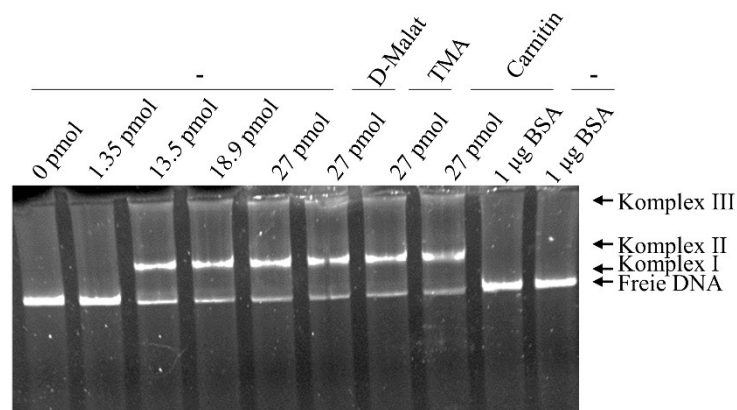
**Abb. 39. *In silico* Analyse des für die EMSA-Studien eingesetzten DNA-Fragmentes.** Der Genstart des Regulators *carR* und der Malat-Dehydrogenase *mdh* wurden mit schwarzen Pfeilen markiert und die Gene blau hinterlegt. Die potenziellen Bindestellen wurden orange hinterlegt und die palindromische Sequenz unter- bzw. überstrichen. Das charakteristische T-N<sub>11</sub>-A-Motiv wurde mit Hilfe der roten Kästen markiert.

Für die Analyse, ob an das eingesetzte DNA-Fragment Proteine unspezifisch binden, wurde das 693 Bp lange DNA-Fragment zusätzlich mit 1 µg BSA inkubiert (Abb. 38 B). Hierbei konnte kein Retardieren der DNA festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von CarR an das 693 Bp lange DNA-Fragment spezifisch ist. Zusätzlich wurde die Spezifität der Bindung von CarR durch die Verwendung eines 1613 Bp langen DNA-Fragment außerhalb des

Carnitin-Operons getestet (Abb. 38 C). In diesem Experiment wurde der Stromaufwärtsbereich des Gens der Cholin-Dehydrogenase *BetA* eingesetzt, welcher mit den Starteroligonukleotiden *pBIISK\_betA\_for\_NotI* und *pBIISK\_betA\_for\_BamHI* amplifiziert wurde (Tab. 5). Hierbei konnte jedoch selbst nach der Inkubation von hohen Proteinkonzentrationen mit der DNA, kein Retardieren dieser beobachtet werden (Abb. 38 C), wodurch eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden konnte.

### 3.5.3. *CarR* bindet konstitutiv an die DNA

Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Ausgangssubstrat des Abbauweges für Carnitin und dessen Intermediate D-Malat und TMA auf die Bindung von *CarR* an die DNA haben. Hierfür wurden 27 pmol *CarR* mit 233 fmol DNA in An- oder Abwesenheit von Carnitin, D-Malat oder TMA inkubiert (Abb. 40). TMA ist kein Intermediat des Stoffwechselweges, sondern ein toxisches Endprodukt, welches aus der Zelle exportiert wird, während des Wachstums auf Carnitin.



**Abb. 40. Einfluss von Carnitin, D-Malat und TMA auf die Bindung von *CarR* an den Stromaufwärtsbereich des Carnitin-Operons.** Das eingesetzte 693 Bp-DNA-Fragment wurde mit Hilfe des Starteroligonukleotidpaares *carR\_mdh\_for* und *carR\_mdh\_rev* amplifiziert und in jedem Reaktionsansatz wurden 233 fmol DNA eingesetzt. Die Proteinmengen wurden variiert wie angegeben. D-Malat, TMA oder Carnitin wurden in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Als BSA-Kontrolle wurden 1 µg BSA an Stelle von *CarR* verwendet. Die Detektion erfolgte nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid über 5 min mittels UV-Licht.

Die An- oder Abwesenheit von D-Malat, Carnitin oder TMA im Reaktionsansatz hatte keinen Effekt auf die Bindung von *CarR* an die DNA-Region zwischen dem Regulatorgen und dem

Gen der Malat-Dehydrogenase (Abb. 40). Bei einem Vergleich des Laufverhaltens der DNA in Abwesenheit des Regulators konnte ausschließlich freie DNA detektiert werden, ebenfalls nach der Inkubation mit 1,35 pmol CarR, da diese Konzentration nicht ausreichend war, um den Protein-DNA-Komplex nachweisen zu können. Nach einer Zugabe von 13,5 pmol CarR zu der freien DNA konnten die drei Komplexe I, II und III (vgl. mit Abb. 38) deutlich detektiert werden. Die Zugabe von verschiedenen Intermediaten zu den EMSA-Reaktionsansätzen führte zu einem Retardieren der DNA, das vergleichbar war mit dem der Ansätze ohne potenzielle Effektoren (Abb. 38). Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Anwesenheit von D-Malat, Carnitin oder TMA keinen Einfluss auf die Bindung von CarR an die DNA hat und indiziert, dass CarR konstitutiv an diese bindet.

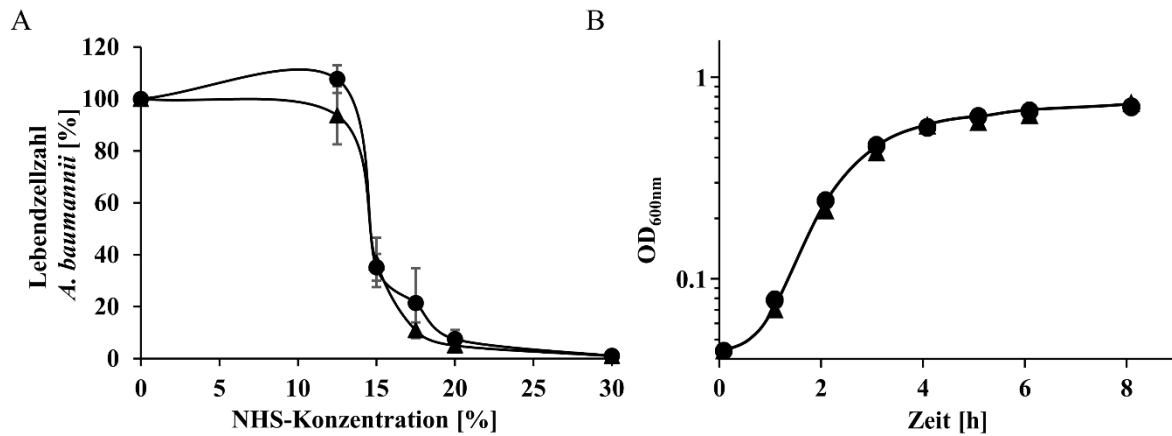
### **3.6. Die Rolle von Carnitin in der Virulenz von *A. baumannii* ATCC 19606**

Die Verwendung von Carnitin als Kohlenstoffquelle ist ein Alleinstellungsmerkmal der pathogenen *Acinetobacter* Spezies, wie *A. baumannii*, innerhalb des ACB-Komplexes. *A. calcoaceticus*, der einzige nicht-pathogene Vertreter innerhalb des ACB-Komplexes besitzt das verantwortliche Operon für die Aufnahme und den Abbau von Carnitin nicht (Breisch *et al.*, 2018; Djahanschiri *et al.*, 2022). Carnitin ist in den Muskeln und im Herzen eine weit verbreitete Kohlenstoffquelle und um zu untersuchen, ob der Abbauweg für Carnitin einen Einfluss auf die Virulenz oder die Persistenz von *A. baumannii* im Wirt hat, wurde die zuvor beschriebene  $\Delta carR$ -Mutante in verschiedenen Pathogenitätsstudien untersucht.

#### **3.6.1. Der Abbau von Carnitin hat einen Einfluss auf die Virulenz von *A. baumannii* ATCC 19606**

Innerhalb dieser Arbeit wurde analysiert, ob der Abbau von Carnitin einen Einfluss auf die Virulenz und die Persistenz von *A. baumannii* hat. Hierfür wurde die Regulatormutante  $\Delta carR$  und der Wildtyp in *G. mellonella*-Infektionsstudien (Abb. 42; Abb. 43), Komplementresistenztests (Abb. 41 A) und Wachstumsanalysen in menschlichem Urin (Abb. 41 B) getestet und miteinander verglichen.





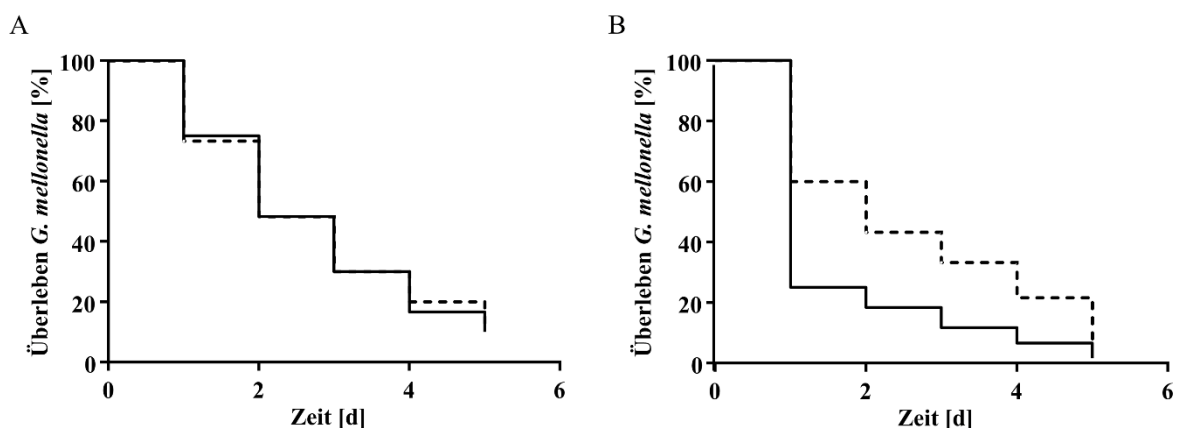
**Abb. 41. Die Rolle des Abbauweges für Carnitin von *A. baumannii* ATCC 19606 in der Komplementresistenz (A) und beim Wachstum in menschlichem Urin (B).** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp und die  $\Delta carR$ -Mutante wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit Saline oder PBS<sup>+/+</sup> auf die jeweilige OD<sub>600nm</sub> eingestellt (Kapitel 2.9.2. – 2.9.3.). Anschließend wurden die Zellsuspensionen verwendet um die Überlebensrate (%) in NHS zu analysieren (A; Wildtyp: ●;  $\Delta carR$ : ▲), oder das Wachstum in Urin über die Verfolgung der OD<sub>600nm</sub> über die Zeit zu beobachten (B; Wildtyp: ●;  $\Delta carR$ : ▲). Dargestellt wurde jeweils der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Die Persistenz von *A. baumannii* in NHS mit aktivem Komplementsystem war nicht beeinträchtigt bei der  $\Delta carR$ -Mutante (Abb. 41 A). Nach der Inkubation der beiden Stämme in 12,5 % NHS konnte für den Wildtyp ein leichter Anstieg in der Lebendzellzahl dokumentiert werden auf 107,7 % im Vergleich zu der Zellzahl nach der Inkubation in PBS<sup>+/+</sup> (100 %). Die  $\Delta carR$ -Mutante zeigte hingegen nach der Inkubation in 12,5 % NHS eine geringfügige Abnahme in der Zellzahl auf 93,7 %. Nach der zweistündigen Inkubation des Wildtyps in 15 % NHS sank die Überlebensrate des Wildtyps auf 35,1 % und nach einer Inkubation in 17,5 % NHS bis auf 21,4 %. Gleiches galt für die  $\Delta carR$ -Mutante, bei der unter diesen Bedingungen ähnliche Überlebensraten von 37 % (15 % NHS) und 10,9 % (17,5 % NHS) dokumentiert werden konnten. In Anwesenheit von höheren NHS-Konzentrationen sank die Überlebensrate weiter auf unter 10 % bei beiden Stämmen (20% NHS: 7,4 % der Wildtyp-Zellsuspension überlebte und 5 % der  $\Delta carR$ -Zellsuspension; 30 % NHS: 0,7 % Wildtyp und 1 %  $\Delta carR$ ). Diese Studien zeigten, dass der Regulator CarR keinen Einfluss auf die Persistenz von *A. baumannii* in Blutserum mit aktiven Komplementsystem hatte.

Der Vergleich des Wachstums des Wildtyps und der  $\Delta carR$ -Mutante in menschlichem Urin zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Adaptionszeit, der Wachstumsrate und der finalen OD<sub>600nm</sub> (Abb. 41 B). Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante hatten eine Wachstumsrate von 0,75 h<sup>-1</sup> bzw. 0,77 h<sup>-1</sup> und erreichten jeweils nach 5 h die stationäre Phase

mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,75 bzw. 0,79. Demnach konnte geschlossen werden, dass CarR keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. baumannii* ATCC 19606 in menschlichem Urin hatte.

Des Weiteren wurde in den folgenden Analysen die Rolle von *carR* beim Infektionserfolg von *A. baumannii* ATCC 19606 in einem *G. mellonella*-Infektionsmodell untersucht. Hierfür wurde die Überlebensrate der *G. mellonella*-Larven nach Infektion mit dem Wildtyp oder der  $\Delta carR$ -Mutante in Ab- oder Anwesenheit von Carnitin analysiert und die Ergebnisse sind in Abb. 42 dargestellt.



**Abb. 42. Rolle des Abbauweges für Carnitin bei der Abtötung von *G. mellonella*-Larven durch *A. baumannii* in Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von Carnitin.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp und die  $\Delta carR$ -Mutante wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit PBS (A) oder PBS mit 5 mM Carnitin (B) auf eine  $OD_{600nm}$  von 1,5 eingestellt (Kapitel 2.9.4.). Anschließend wurden die Zellsuspensionen verwendet um *G. mellonella*-Larven zu infizieren und das Überleben der Larven zu dokumentieren (Wildtyp: durchgezogene Linie,  $\Delta carR$ : gestrichelte Linie). Pro Ansatz wurden 20 Larven mit der jeweiligen Zellsuspension infiziert. Pro Larve wurden ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen injiziert. Dargestellt wurde jeweils der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

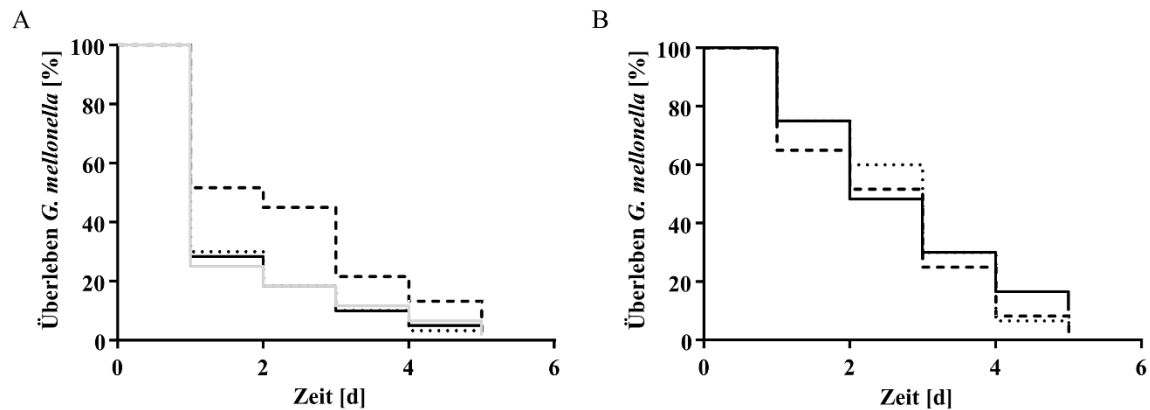
Die Infektion der *G. mellonella*-Larven mit der  $\Delta carR$ -Mutante führte zu keinem Unterschied im Überleben der Larven im Vergleich zum Wildtyp in Abwesenheit von Carnitin (Abb. 42 A). Nach der Infektion der Larven mit dem jeweiligen Stamm konnte für den Wildtyp nach 24 h ein Überleben von 80 % der Larven festgestellt werden, ebenso wie nach Infektion mit der  $\Delta carR$ -Mutante (70 %). Nach 48 h überlebten noch 75 % der Larven, die mit dem Wildtyp infiziert worden waren und 74 % der Larven, die mit der Mutante infiziert worden waren. Nach drei Tagen lag die Überlebensrate der Larven, infiziert mit dem Wildtyp, bei 45 % und der Larven, infiziert mit der  $\Delta carR$ -Mutante, bei 45 %. Nach vier Tagen starben weitere 10 % der Larven mit Wildtyp-Injektion, bis nach fünf Tagen noch 10 % der Larven überlebten. Nach vier

Tagen lag die Überlebensrate der Larven mit  $\Delta carR$ -Injektion bei 35 % und fiel bis zum sechsten Tag täglich jeweils um 10 % weiter ab.

Bei einer Infektion der Larven mit rund  $2 \cdot 10^6$  Zellen und zusätzlich 5 mM Carnitin wurden hingegen andere Ergebnisse ermittelt (Abb. 42 B) und ein statistisch relevanter Phänotyp für die  $\Delta carR$ -Mutante dokumentiert ( $P \leq 0.05$ ). Für den Wildtyp konnte nach 24 h ein Absterben der Larven von 75 % festgehalten werden und an jedem weiteren Tag starben weitere 5 %, bis nach fünf Tagen keine überlebenden Larven mehr gefunden werden konnten. Die  $\Delta carR$ -Mutante, welche kein Carnitin mehr verstoffwechseln konnte (Abb. 35 C), führte hingegen zu einem geringeren Absterben. Nach 24 h starben 40 % der Larven. Nach 48 h starben 57 % und anschließend starben täglich weitere 5 %, bis eine Überlebensrate von 22 % an Tag vier erreicht war. Am fünften Tag überlebten noch 7 % der *G. mellonella*-Larven. Ein Kontrollexperiment, in dem den Larven ausschließlich Carnitin injiziert wurde, zeigte kein Absterben der Larven. Diese Ergebnisse zeigten, dass der Carnitinstoffwechsel eine Rolle beim Überleben der Larven nach Infektion mit *A. baumannii* spielt.

### **3.6.2. Die Bildung von TMA spielt eine Rolle bei der Abtötung von *G. mellonella*-Larven nach Infektion mit *A. baumannii***

Die oben genannten Befunde lassen sich durch zwei unterschiedliche Abläufe erklären: 1. Die Umsetzung von Carnitin und damit die Bildung von TMA führen zu einem erhöhten Absterben der *G. mellonella*-Larven oder 2. Der Regulator CarR spielt eine Rolle bei der Regulation von weiteren Virulenzgenen, die zu einem Anstieg der Sterberate führen. Um Hinweise zu erhalten, ob das gebildete TMA die Ursache für die geringere Anzahl an überlebenden Larven war, wurde die  $\Delta hyd$ -Mutante in Anwesenheit von Acetylcarnitin in *G. mellonella*-Infektionsstudien getestet. Diese Deletionsmutante kann Acetylcarnitin nicht weiter zu Carnitin verstoffwechseln (Abb. 32 B), wodurch kein TMA freigesetzt wird. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 43 dargestellt.



**Abb. 43. Die Rolle von TMA bei der Abtötung von *G. mellonella*-Larven nach Infektion mit *A. baumannii*.** **A:** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp und die  $\Delta hyd$ -Mutante wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit PBS mit 5 mM Acetylcarnitin oder 5 mM Carnitin auf eine  $OD_{600nm}$  von 1,5 eingestellt (Kapitel 2.9.4.). Anschließend wurden die Zellsuspensionen verwendet um *G. mellonella*-Larven zu infizieren und das Überleben der Larven zu dokumentieren (Wildtyp + 5 mM Carnitin: durchgezogene, graue Linie,  $\Delta hyd$  + 5 mM Carnitin: gepunktete Linie, Wildtyp + 5 mM Acetylcarnitin: durchgezogene, schwarze Linie,  $\Delta hyd$  + 5 mM Acetylcarnitin: gestrichelte Linie). **B:** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp wurde in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und in PBS (durchgezogene Linie), PBS mit 5 mM D-Malat (gepunktete Linie) oder mit 5 mM Na-Acetat (gestrichelte Linie) auf eine  $OD_{600nm}$  von 1,5 eingestellt (Kapitel 2.9.4.). Anschließend wurden die Zellsuspensionen verwendet um *G. mellonella*-Larven zu infizieren und das Überleben der Larven zu dokumentieren. Pro Ansatz wurden 20 Larven mit der jeweiligen Zellsuspension infiziert. Pro Larve wurden ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen injiziert. Dargestellt wurde jeweils der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Die Anwesenheit von Acetylcarnitin während der Infektion der *G. mellonella*-Larven mit dem Wildtyp zeigte einen vergleichbaren Effekt auf das Überleben der Larven, wie die Anwesenheit von Carnitin (Abb. 43). Beide Substrate führten während der Infektion zu derselben Abnahme in der Anzahl überlebender *G. mellonella*-Larven. Demgegenüber führte die Infektion von *G. mellonella*-Larven mit der  $\Delta hyd$ -Deletionsmutante in Anwesenheit von Acetylcarnitin zu einer signifikanten Zunahme in der Anzahl überlebender Larven (Abb. 43 A;  $P \leq 0.05$ ). Während nach 24 h nur noch 75 % der Larven mit Wildtyp-Injektion überlebten, überlebten nach 24 h noch 60 % der mit der  $\Delta hyd$ -Deletionsmutante infizierten Larven. 48 h nach der Infektion mit dem Wildtyp sank die Anzahl der überlebenden Larven auf 18 %, während nach einer Infektion mit der  $\Delta hyd$ -Mutante noch 49 % der Larven überlebten. Auch nach drei Tagen war die Überlebensrate der Larven mit  $\Delta hyd$ -Injektion deutlich höher, mit einem Wert von 35 % überlebender Larven im Vergleich mit der Larvengruppe mit Wildtyp-Injektion (13 %). Nach vier Tagen näherte sich die Zahl der überlebenden Larven an ( $\Delta hyd$ : 18 %; Wildtyp: 7 %) und nach fünf Tagen konnte in beiden Infektionsgruppen eine Überlebensrate von nahe null

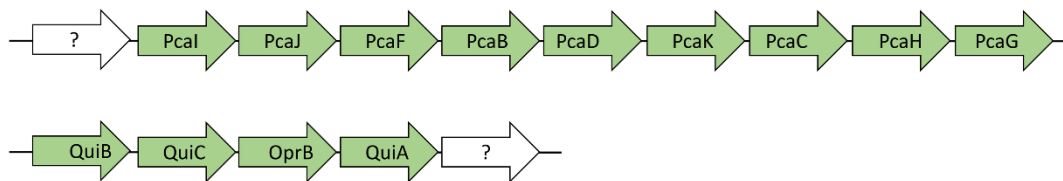
dokumentiert werden ( $\Delta hyd$ : 3 %; Wildtyp: 2 %). Im Vergleich dazu, zeigte die Infektion der *G. mellonella*-Larven mit der  $\Delta hyd$ -Deletionsmutante in Anwesenheit von Carnitin ein vergleichbares Absterben der Larven, wie nach der Infektion mit dem Wildtyp in Anwesenheit von Carnitin, da die Mutante Carnitin weiterhin zu TMA und Malat-Semialdehyd umsetzen kann. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das durch den Carnitinstoffwechsel gebildete TMA zum Absterben der *G. mellonella*-Larven beiträgt. Weiterhin wurde diese Annahme bestätigt durch die vergleichbare Abnahme der Anzahl überlebender Larven nach Infektion mit dem Wildtyp und in Anwesenheit von D-Malat oder Na-Acetat (Abb. 43 B). Das Absterben der *G. mellonella*-Larven nach der Infektion war innerhalb dieses Experimentes vergleichbar mit dem Absterben der Larven nach Infektion mit dem Wildtyp und in Abwesenheit zusätzlicher Kohlenstoffquellen. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass nicht die Anwesenheit der zusätzlichen Kohlenstoffquelle zu einem verstärkten Infektionserfolg führt, sondern die Bildung von TMA.

### **3.7. Acetylcarnitin, Carnitin und D-Malat induzieren die Expression verschiedener Gene mit Rolle in der Virulenz**

Weiterhin wurde getestet, ob Acetylcarnitin, Carnitin oder D-Malat, neben ihrer Funktion als Kohlenstoffquelle gegebenenfalls auch eine Rolle bei der Induktion der Expression nicht mit dem Carnitinstoffwechsel verknüpfter Stoffwechselprozesse spielen. Hierfür wurde *A. baumannii* ATCC 19606 in MM mit 20 mM Carnitin, 20 mM Acetylcarnitin oder 20 mM D-Malat angezogen und das Transkriptom der Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase analysiert. Die Transkriptmengen wurden mit den Transkriptmengen von Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase, die mit Na-Succinat als Kohlenstoffquelle gewachsen waren, verglichen. Diese Studien zeigten, dass die Expression von 57 verschiedenen Genen durch Carnitin, Acetylcarnitin und D-Malat induziert wurde und die Transkripte der jeweiligen Gene um einen  $\log_2$ -Faktor von mindestens 5 erhöht waren (Anhang, Tab. 20). Von diesen 57 verschiedenen Genen wurde die Expression von 40 Genen in Gegenwart von Acetylcarnitin, Carnitin und D-Malat verstärkt, die Expression von vier Genen nur in Anwesenheit von Acetylcarnitin, die Expression von sechs Genen nur bei Wachstum mit Carnitin und die Expression von sieben Genen bei Wachstum mit D-Malat (Anhang, Tab. 20). Neben einer Reihe von Genen, von denen die Funktion der Genprodukte unbekannt ist oder dessen Funktion nur potenziell annotiert wurde, waren die Gene des Carnitin-Operons in ihrer Expression verstärkt ( $\log_2$ -Faktor von 4,86 – 8,87) und zusätzlich die Gene des *pca*-Clusters für den Abbau

von Protocatechuat ( $\log_2$ -Faktor von 1,38 – 5,23), des *paa*-Clusters für den Abbau von Phenylacetat ( $\log_2$ -Faktor von 1,09 – 5,94) und eines potenziellen Clusters für die Umsetzung von Homogentisat, einem zentralen Intermediat des L-Phenylalanin-, L-Tyrosin- und 3-Hydroxyphenylacetat-Abbaus ( $\log_2$ -Faktor von 3,06 – 6,52) (Abb. 44). Die  $\log_2$ -fache Veränderung der Transkriptmenge wurde für die jeweiligen Gene in der Tab. 20 angegeben.

Protocatechuat- und Quinat-Abbau (HMPREF0010\_00439-HMPREF0010\_00452):



Phenylacetatweg (HMPREF0010\_01077-HMPREF0010\_001087):



Homogentisatweg (HMPREF0010\_03420-HMPREF0010\_03425):



**Abb. 44. Genetische Organisation der Gene der Aromatenabbauwege, die während des Wachstums mit Carnitin, Acetylcarnitin oder D-Malat in ihrer Expression verstärkt sind.** Dargestellt wurde das Genclusters verantwortlich für den Abbau von Protocatechuat, den Phenylacetatweg und den Homogentisatweg. Die Stoffwechselwege mit den verantwortlichen Enzymen sind Abb. 7 und Abb. 8 zu entnehmen.

Des Weiteren sind ebenfalls die Gene kodierend für transkriptionelle Regulatoren in ihrer Expression verstärkt, die Gene von verschiedenen Transporterproteinen, Proteinen mit Funktion im Kupfer- und Quecksilber-Transport, Signalproteinen, Pyruvat-Decarboxylasen, Acetyl-CoA-Hydrolasen, Acetaldehyd-Dehydrogenasen und viele weitere Gene. Der Zusammenhang dieser Gene und den zugehörigen Stoffwechselwegen mit dem Carnitinstoffwechsel ist allerdings noch nicht weiter untersucht worden.

### **3.8. Die Rolle der PLD in der Gewinnung von Energiequellen und der Antibiotikaresistenz von *A. baumannii* ATCC 19606**

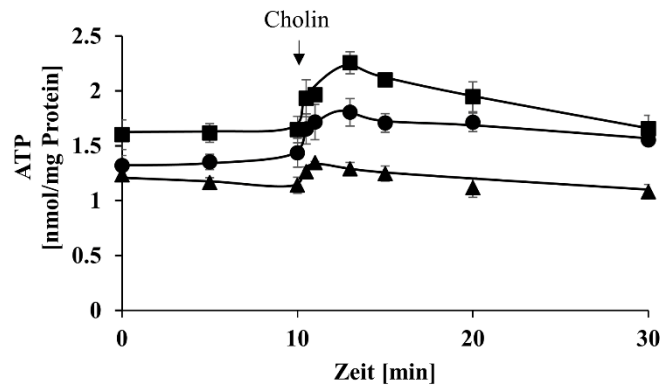
Wie bereits in dieser Arbeit in Kapitel 3.2. gezeigt, kann Cholin als zusätzliche Energiequelle von *A. baumannii* genutzt werden. Hierbei werden die freiwerdenden Elektronen während der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain durch die Genprodukte des *betIBA*-Clusters in die Atmungskette geschleust, wodurch ein elektrochemischer Gradient entlang der Membran aufgebaut wird. Dieser elektrochemische Gradient treibt anschließend die F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATP-Synthase an und führt zur Generierung von ATP. Eine natürliche Cholinquelle im menschlichen Wirt ist das Phosphatidylcholin, welches 70 % der Lipide in Lungen-Epithelzellen ausmacht (Zachowski, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzucht von *A. baumannii* mit Phosphatidylcholin als Kohlenstoffquelle zur Induktion der Cholin-Dehydrogenase führte, da diese Zellen ebenfalls einen Cholin-abhängigen Anstieg des ATP-Gehaltes aufwiesen (Kapitel 3.2.2.). Dies indiziert die Freisetzung von Cholin, während des Wachstums auf Phosphatidylcholin. Die Freisetzung von Phospholipid-Kopfgruppen erfolgt über PLCs und PLDs. Während die PLCs die Kopfgruppe phosphoryliert abschneiden, sind die PLDs essenziell für die Freisetzung unphosphorylierter Kopfgruppen (Titball, 1998). In *A. baumannii* gibt es insgesamt zwei verschiedene PLCs und drei verschiedene PLDs, allerdings ist bis heute für *A. baumannii* noch nicht bekannt, welche der Phospholipasen für die Umsetzung von Phosphatidylcholin essenziell ist.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die PLDs eine Rolle bei der Nutzung von Cholin aus dem Phospholipid Phosphatidylcholin spielen und damit wichtig sind für die Adaptation von *A. baumannii* ATCC 19606 an den menschlichen Wirt. Des Weiteren konnte innerhalb der Arbeitsgruppe Averhoff bereits gezeigt werden, dass die PLDs essenziell für die Bildung von CL und MLCL sind (Pfefferle *et al.*, 2020) und es sollte untersucht werden, ob das über die PLDs generierte CL eine Rolle in der Modulierung von Lipid A hat und demnach wichtig ist für die Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMPs).

#### **3.8.1. Die PLDs sind nicht essenziell für die Freisetzung von Cholin aus Phosphatidylcholin**

Wie zuvor beschrieben, findet die Cholin-abhängige ATP-Synthase ausschließlich in Zellsuspensionen statt, in denen die Expression des *betIBA*-Clusters während des Wachstums durch die Anwesenheit von Cholin induziert wurde (Abb. 19). Dementsprechend konnte mit

Hilfe der PLD- und PLC-Mutanten getestet werden, ob Cholin während des Wachstums auf Phosphatidylcholin als Kohlenstoffquelle weiterhin von diesem Phospholipid abgespalten wird und damit zur Induktion des *betIBA*-Clusters führt. Die Expression des *betIBA*-Clusters wurde mit Hilfe der Cholin-abhängigen ATP-Synthese, in der  $\Delta pld123$ - und der  $\Delta plc12$ -Mutante verfolgt und ist in Abb. 45 dargestellt.



**Abb. 45. Analyse der Cholin-abhängigen ATP-Synthese des *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyps, sowie der  $\Delta pld123$ - und  $\Delta plc12$ -Mutanten.** Der *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp (●) und die  $\Delta pld123$ - (■), sowie  $\Delta plc12$ -Mutanten (▲) wurden in MM mit 0,5 % Phosphatidylcholin als Kohlenstoffquelle angezogen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen, wie in Kapitel 2.11. beschrieben, erstellt. Die ATP-Synthese wurde gestartet durch die Zugabe von 10 mM Cholin nach einer zehnmütigen Vorinkubation der Zellen bei 37 °C. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

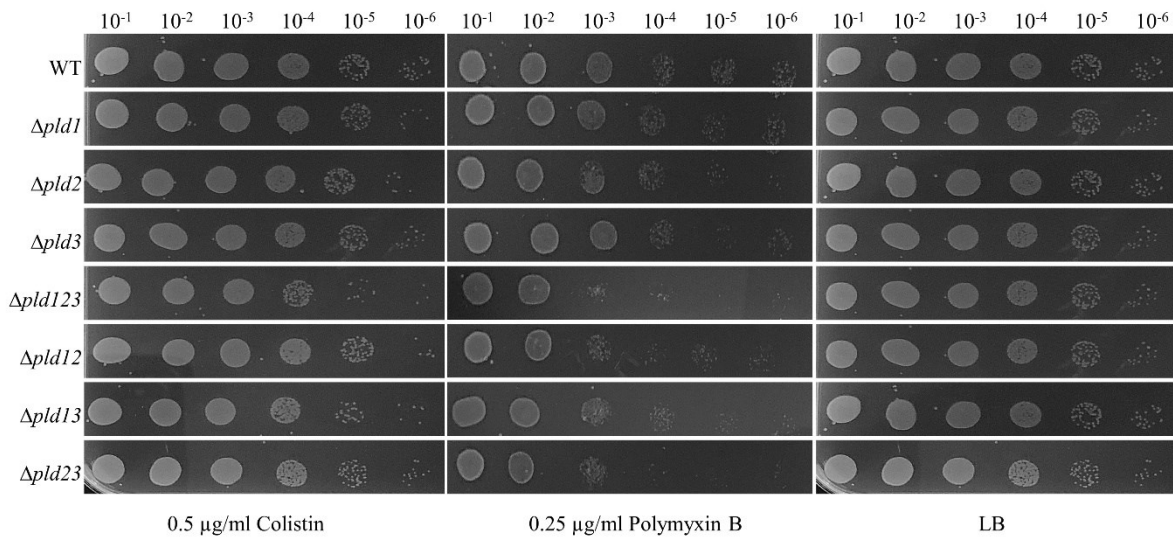
Nach der Zugabe von Cholin zu der Zellsuspension konnte für den Wildtyp eine Zunahme des intrazellulären ATP-Gehaltes von 0,4 nmol ATP/mg Protein dokumentiert werden (Abb. 45). Der ATP-Gehalt stieg hierbei von 1,43 nmol/mg Protein auf 1,8 nmol/mg Protein an. Eine ähnliche Zunahme von 0,7 nmol ATP/mg Protein konnte ebenfalls für die  $\Delta pld123$ -Mutante beobachtet werden, hier lag der ATP-Gehalt vor der Zugabe von Cholin bei 1,6 nmol/mg Protein und stieg dann auf 2,3 nmol/mg Protein an. Diese Ergebnisse indizieren, dass die PLD-Dreifachmutante nicht in der Cholin-Oxidation beeinträchtigt war und somit die drei PLDs nicht essenziell für die Freisetzung von Cholin aus Phosphatidylcholin sind. In den Zellsuspensionen der  $\Delta plc12$ -Mutante konnte lediglich eine Zunahme des ATP-Gehaltes der Zellen von 0,2 nmol ATP/mg Protein detektiert werden. Der ATP-Gehalt stieg hierbei von 1,2 nmol/mg Protein auf 1,4 nmol/mg Protein an. Der minimale Anstieg des ATP-Gehaltes in der PLC-Doppelmutante könnte durch geringe Cholin-Verunreinigungen des verwendeten



Phosphatidylcholins erklärt werden. Diese Ergebnisse indizieren, dass die PLCs eine Rolle in der Freisetzung von Cholin aus Phosphatidylcholin spielen, wobei hierbei Phosphorylcholin freigesetzt wird, welches zusätzlich zu Cholin weiter gespalten werden muss (Garrido *et al.*, 1990).

### **3.8.2. Die PLDs sind essenziell für die Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMPs)**

In vorangegangenen Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass die PLDs eine Rolle in der Synthese von CL und MLCL spielen, da die PLD-Dreifachmutante kein CL und MLCL mehr bildeten (Pfefferle *et al.*, 2020). Die Zusammensetzung der Membran spielt eine große Rolle bei der Resistenz gegenüber CAMPs, deren Wirkung auf der Destabilisierung der äußeren Membran beruht (Boll *et al.*, 2015). Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob das CL oder MLCL eine Rolle in der Antibiotikaresistenz gegenüber CAMPs spielt. Hierfür wurde die Hemmung des Wachstums des Wildtyps und der unterschiedlichen PLD-Mutanten in Anwesenheit verschiedener CAMPs untersucht. Die verschiedenen Stämme wurden in LB-Medium bis zur stationären Phase angezogen, geerntet und anschließend mit Saline auf eine  $OD_{600nm}$  von 1,0 eingestellt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf LB-Platten mit Colistin oder Polymyxin B getropft. Zur Wachstumskontrolle wurde ebenfalls eine Platte ohne Antibiotikazusatz angefertigt. Das Wachstum der Stämme auf den verschiedenen Platten ist in Abb. 46 dargestellt.

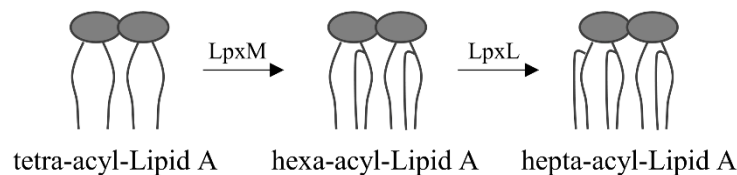


**Abb. 46. Die Deletion der PLDs hat einen Einfluss auf die CAMP-Resistenz von *A. baumannii* ATCC 19606.** Die *A. baumannii* ATCC 19606-Stämme wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium angezogen, geerntet und mit Saline auf eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 eingestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup>) und 5 µl der angegebenen Verdünnungen auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum getropft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

In diesen Resistenzstudien konnte für die  $\Delta pld123$ -Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber Colistin und Polymyxin B festgestellt werden (Abb. 46). Während der Wildtyp und die  $\Delta pld$  Einfach- und Doppelmutanten ( $\Delta pld1$ ,  $\Delta pld2$ ,  $\Delta pld3$ ,  $\Delta pld12$ ,  $\Delta pld13$ ,  $\Delta pld23$ ) keinen signifikanten Unterschied im Wachstum in Anwesenheit von Colistin zeigten und Kolonien bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-6</sup> ausbildeten, konnten für die  $\Delta pld123$ -Dreifachmutante nur noch in der 10<sup>-4</sup>- und ganz schwach in der 10<sup>-5</sup>-Verdünnung Kolonien detektiert werden. Ähnliches konnte ebenfalls für das Wachstum der jeweiligen Mutanten in Anwesenheit von Polymyxin B gezeigt werden. Hier wurden für den Wildtyp und die  $\Delta pld1$ -,  $\Delta pld2$ -,  $\Delta pld3$ -,  $\Delta pld12$ -, sowie  $\Delta pld13$ -Mutanten Kolonien bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-6</sup> gefunden, wohingegen für die  $\Delta pld23$ - und der  $\Delta pld123$ -Mutante nur noch in der 10<sup>-3</sup>-Verdünnung Koloniewachstum detektiert werden konnte. Auf der Kontrollplatte ohne Antibiotikum wuchsen alle Stämme bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-6</sup>. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die PLDs eine Rolle in der CAMP-Resistenz spielen. Die Rolle der PLDs bei der CAMP-Resistenz sollte im nächsten Kapitel genauer analysiert werden.

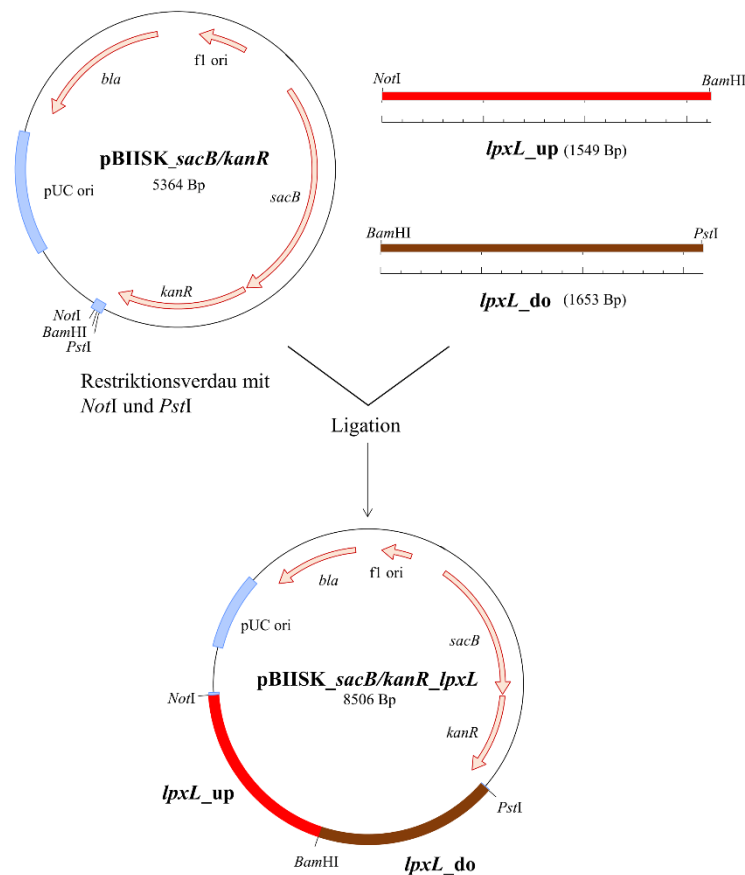
### 3.8.3. Cardiolipin spielt keine Rolle in der Lipid A-Modulierung

Da Resistenzen gegen CAMPs häufig mit der Modulierung des Lipids A der LOS der äußeren Membran im Zusammenhang stehen, wurde untersucht, ob die PLDs bzw. das durch die PLDs generierte CL eine Rolle in der Modulierung des Lipid A spielt. Lipid A liegt in *A. baumannii* unter Standardbedingungen hepta-acetyliert vor (Boll *et al.*, 2015). Das Lipid A-Syntheseenzym LpxM überträgt hierbei zwei Lauroylgruppen auf das Glycolipid mit vier Acylketten und anschließend wird die letzte Acylkette über das Enzym LpxL übertragen (Boll *et al.*, 2015), sodass sieben Acylketten an das Lipid A gebunden vorliegen (Abb. 47). Dies führt zu einer verbesserten Resistenz gegenüber CAMPs (Boll *et al.*, 2015). Allerdings ist in *A. baumannii* bislang nicht bekannt, was der Acylkettendonator für die Synthese von Lipid A ist.



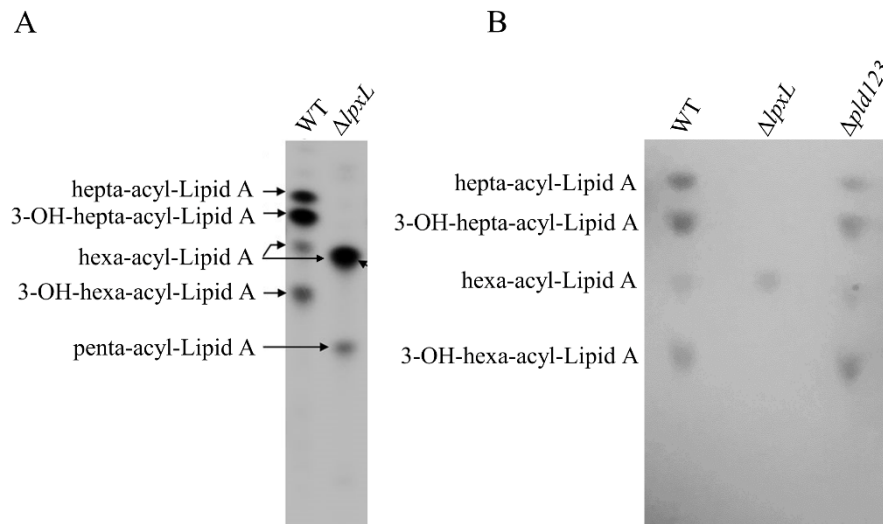
**Abb. 47. Rolle von LpxM und LpxL in der Lipid A-Modulierung und die verschiedenen Acetylierungszustände des Lipid A.** LpxM überträgt zwei Acylketten auf das tetra-acyl-Lipid A und anschließend überträgt LpxL eine weitere Acylkette auf das entstandene hexa-acyl-Lipid A. Der Acylkettendonator für diese Reaktionen ist in *A. baumannii* bislang unbekannt.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die freiwerdende Acylkette während der Bildung von MLCL aus CL für die Lipid A-Modulierung verwendet wird. Hierfür wurde das Lipid A aus dem Wildtyp und der  $\Delta pld123$ -Mutante, sowie einer  $\Delta lpxL$ -Mutante zur Kontrolle extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Für die Generierung der  $\Delta lpxL$ -Mutante, welche Defekt ist in der vollständigen Acetylierung des Lipid A wurde das Plasmid pBIISK\_ *sacB/kanR\_lpxL*, wie in Abb. 48 beschrieben, kloniert und anschließend über Sequenzierung überprüft. Die Deletion des Gens erfolgte dann wie in Kapitel 2.3.17. beschrieben und wurde ebenfalls mittels Sequenzierung verifiziert.



**Abb. 48. Klonierungsschema des Plasmides pBIISK\_sacB/kanR\_lpxL für die markerlose Deletion des Gens *lpxL* in *A. baumannii* ATCC 19606.** Die Stromaufwärts- (*lpxL\_up*) und Stromabwärtsbereiche (*lpxL\_do*) des Gens *lpxL* wurden mit Hilfe der Starteroligonukleotide *lpxL\_up\_for\_NotI* und *lpxL\_up\_rev\_BamHI*, sowie *lpxL\_do\_for\_BamHI* und *lpxL\_do\_rev\_PstI* amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *PstI* in den Vektor pBIISK\_sacB/kanR kloniert.

Die Extraktion von Lipid A erfolgte mittels Chloroform, wie in Kapitel 2.7.2. beschrieben. Die anschließende analytische Dünnschichtchromatographie des extrahierten Lipid A gelöst in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (Verhältnis 4:1) erfolgte unter der Verwendung von 16,5 ml  $\text{ClCH}_3$ , 16,5 ml Pyridin, 5 ml 88 % [v/v] Ameisensäure, 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  als Laufmittel. Die Färbung der unterschiedlich acetylierten Lipid A-Formen aus den verschiedenen *A. baumannii* ATCC 19606-Stämmen erfolgte mit *p*-Anisaldehyd und ist in Abb. 49 dargestellt. Als Referenz wurde die analytische Dünnschichtchromatographie der Lipid A-Formen aus *A. baumannii* nach Boll *et al.* verwendet und das Laufverhalten der Lipid A-Formen der jeweiligen Mutanten mit den von Boll und Kollegen detektierten Lipid A-Formen verglichen (Boll *et al.*, 2015).



**Abb. 49. Unterschiedlich acetylierte Lipid A-Formen im *A. baumannii* ATCC 19606-Wildtyp, der  $\Delta lpxL$ - und  $\Delta pld123$ -Mutanten. A:** Referenz-Dünnschichtchromatographie angepasst nach Boll *et al.* (Boll *et al.*, 2015). 3-OH-Lipid A-Varianten beschreiben das jeweilige Lipid A mit einer hydroxylierten Acylkette. **B:** Das Lipid A wurde aus den verschiedenen *A. baumannii* ATCC 19606-Stämmen extrahiert, wie in Kapitel 2.7.2. beschrieben. Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden 1  $\mu$ g Lipid A aufgetragen. Als Laufmittel wurden 16,5 ml  $ClCH_3$ , 16,5 ml Pyridin, 5 ml 88 % [v/v] Ameisensäure, 2 ml  $H_2O_{dd}$  verwendet. Gefärbt wurde das Lipid A mittels *p*-Anisaldehyd durch das Erhitzen auf 250 °C bis zum sichtbar werden der Spots.

Hierbei war ersichtlich, dass die Deletion der PLDs keinen Effekt auf die Modulation des Lipid A hatte (Abb. 49). Für den Wildtyp konnten zwei Lipid A-Varianten mit sowohl sieben als auch sechs Acylketten detektiert werden. Dieselben Lipid A-Varianten wurden ebenfalls für die  $\Delta pld123$ -Mutante gefunden. Die  $\Delta lpxL$ -Mutante zeigte ein verändertes Lipid A-Muster während der Dünnschichtchromatographie. Hier konnte lediglich hexa-acetyliertes Lipid A detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Deacetylierung des CL zu MLCL keinen Einfluss auf die Lipid A-Modulation hat.

### 3.9. Die Nutzung aromatischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequellen von *A. baumannii* AYE und ihre Rolle bei der Virulenz von *A. baumannii*

Die Nutzung alternativer Kohlenstoff- und Energiequellen, wie z. B. Cholin oder Carnitin ermöglicht die Anpassung von Pathogenen an die unterschiedlichen Kompartimente des humanen Wirtes. Neben Cholin und Carnitin kommen aber auch aromatische Verbindungen, wie beispielsweise die Aminosäuren Tryptophan oder Phenylalanin im humanen Wirt vor, welche ebenfalls weitverbreitete Kohlenstoff- und Energiequellen für humanpathogene

Mikroorganismen sind. Außerdem kommen aromatische Komponenten in großen Mengen im Blut vor, wie z. B. Hormone und Signalmoleküle. Da nur einige Bakterien Aromaten verstoffwechseln können, würde die Nutzung aromatischer Verbindungen einen Vorteil für *A. baumannii* im humanen Wirt bieten.

Wie bereits in der Einleitung erläutert, konnten die Gene für die Schlüsselenzyme des  $\beta$ -Ketoacidweges, eines zentralen Abbauweges von Aromaten, bereits im Genom von *A. baumannii* AYE detektiert werden. Um zu untersuchen, ob *A. baumannii* aromatische Verbindungen über den  $\beta$ -Ketoacidweg abbaut und ob dieser Stoffwechselweg eine Rolle bei der Virulenz von *A. baumannii* spielt, wurden im Rahmen einer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe Averhoff bereits verschiedene Deletionsmutanten erstellt (Huber, 2020) und in Wachstums- und Virulenzstudien analysiert. Wie zuvor beschrieben (Kapitel 1.9.), besteht der  $\beta$ -Ketoacidweg aus zwei Zweigen, über die jeweils unterschiedliche Substrate zu dem Intermediat  $\beta$ -Ketoacid-Enollacton umgesetzt werden. Für die Analyse der Funktionen der jeweiligen Zweige wurde in den Vorarbeiten eine Deletionsmutante erstellt, mit einem Defekt in dem Schlüsselenzym des Protocatechuat-Zweiges, der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (PcaHG) und eine weitere mit einem Defekt in dem Schlüsselenzym des Catechol-Zweiges, der Catechol-1,2-Dioxygenase (CatA). Außerdem wurde eine Doppelmutante erstellt, welche sowohl einen Defekt im *pcaHG*-Gen als auch im *catA*-Gen hatte. In vorangegangenen Wachstumsanalysen konnte innerhalb der Arbeit zusätzlich gezeigt werden, dass der *A. baumannii* AYE Wildtyp auf den aromatischen Substraten *p*-Hydroxybenzoat, Benzoat, Kynureninsäure, Quinat, Phenylalanin, Tyrosin und Indol-3-Acetat wächst, jedoch kein Wachstum mit den Substraten Phenylacetat, Tryptophan, Benzylalkohol, Benzylacetat, Ferrulat, Styren, Toluol, Salicylat, Mandelat, Zimtsäure, Folsäure zeigte. Weiterhin wurde beschrieben, dass die  $\Delta$ *catA*-Mutante kein Wachstum mit Benzoat zeigte und die  $\Delta$ *pcaHG*-Mutante nicht mehr auf *p*-Hydroxybenzoat (Huber, 2020).

Im Folgenden sollten im Rahmen dieser Arbeit das Wachstum der vorliegenden  $\Delta$ *pcaHG*- und  $\Delta$ *catA*-Deletionsmutante mit Substraten des  $\beta$ -Ketoacidweges als Kohlenstoffquellen getestet werden, um die Rolle der beiden Schlüsselenzyme beim Abbau der Aromaten zu ermitteln. Darüber hinaus sollte die Rolle der Schlüsselenzyme und damit der beiden Zweige des  $\beta$ -Ketoacidweges bei der Persistenz in Blutserum mit aktivem Komplementsystem oder in menschlichem Urin ermittelt werden. Des Weiteren sollte die Resistenz dieser Mutanten gegenüber aromatischen Antibiotika untersucht werden.

### 3.9.1. *A. baumannii* ATCC 19606 baut unterschiedliche aromatische Verbindungen über den $\beta$ -Ketoacidweg ab

Um die Frage zu klären, welche aromatischen Kohlenstoffquellen über einen der beiden Zweige des  $\beta$ -Ketoacidweges abgebaut werden, wurden der *A. baumannii* AYE-Wildtyp, die  $\Delta pcaHG$ -Mutante, die  $\Delta catA$ -Mutante und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Doppelmutante in 5 ml MM mit verschiedenen Kohlenstoffquellen angezogen und überprüft, ob die optische Dichte zunahm. In diesen Versuchen wurden jedoch keine Wachstumskurven aufgenommen. Als potenzielle Wachstumssubstrate wurden *p*-Hydroxybenzoat, Benzoat, Benzylacetat, Benzylalkohol, Quinat, Indol-3-Acetat, Kynureninsäure, Kynurenin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Anthranilsäure, Ferrulat, Styren, Toluol, Salicylsäure, Mandelsäure, Zimtsäure, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat und Folsäure getestet. Der Wildtyp zeigte eine Zunahme der optischen Dichte auf den Substraten *p*-Hydroxybenzoat, Benzoat, Quinat, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat, Ferrulat, Indol-3-Acetat, Tryptophan, Anthranilsäure, Phenylalanin, Tyrosin, Kynurenin und Kynureninsäure, während die Doppelmutante nur noch Kynureninsäure, Tyrosin und Phenylalanin verstoffwechseln konnte (Tab. 19). Dies führte zu dem Schluss, dass der  $\beta$ -Ketoacidweg für die Umsetzung von Kynureninsäure, Tyrosin und Phenylalanin nicht essenziell ist, aber für die Umsetzung der Substrate *p*-Hydroxybenzoat, Benzoat, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat, Ferrulat, Indol-3-Acetat, Kynurenin, Tryptophan, Anthranilsäure und Quinat wichtig ist. Für die  $\Delta catA$ -Mutante konnte keine Zunahme in der OD<sub>600nm</sub> mit Benzoat, Indol-3-Acetat, Tryptophan, Anthranilsäure und Kynurenin als Kohlenstoffquelle beobachtet werden. Das Wachstum mit *p*-Hydroxybenzoat, Quinat, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat und Ferrulat blieb jedoch uneingeschränkt durch die Mutation (Tab. 19). Für die  $\Delta pcaHG$ -Mutante konnte nur noch Wachstum mit Benzoat, Indol-3-Acetat, Tryptophan, Anthranilsäure und Kynurenin beobachtet werden, nicht jedoch auf *p*-Hydroxybenzoat, Quinat, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat oder Ferrulat als Substrat (Tab. 19). Diese Erkenntnisse führten zu dem Schluss, dass *A. baumannii* AYE *p*-Hydroxybenzoat, Quinat, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat und Ferrulat über den Protocatechuat-Zweig des  $\beta$ -Ketoacidweg abbaut (Tab. 19) und Benzoat, Kynurenin, Tryptophan, Anthranilsäure und Indol-3-Acetat über den Catechol-Zweig (Tab. 19). Beim Wachstum mit Na-Acetat als Kohlenstoffquelle zeigte keine der Mutanten, wie erwartet, einen eingeschränkten Wachstumsphänotyp.

Tab. 19. Wachstum von *A. baumannii* AYE und der  $\Delta catA$ -,  $\Delta pcaHG$  und  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutanten auf verschiedenen aromatischen Verbindungen in MM.

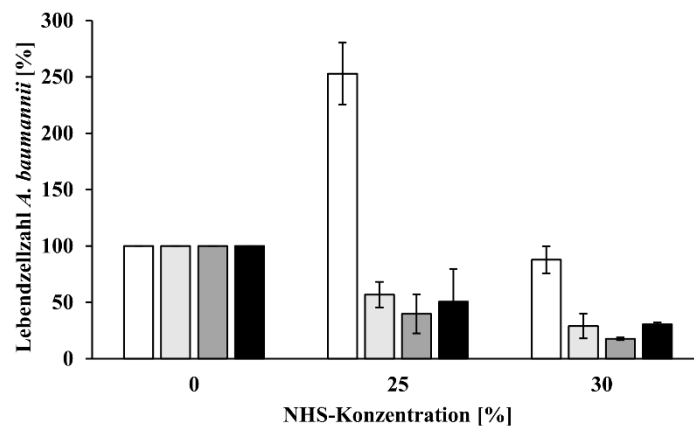
<b>Substrat<sup>a</sup></b>	<b>Wildtyp</b>	<b><math>\Delta catA</math></b>	<b><math>\Delta pcaHG</math></b>	<b><math>\Delta pcaHG/catA</math></b>
Na-Acetat	+	+	+	+
Benzoat	+	-	+	-
<i>p</i> -Hydroxybenzoat	+	+	-	-
Kynurenin	+	-	+	-
Kynureninsäure	+	+	+	+
Vanillinsäure	+	+	-	-
Coumarinsäure	+	+	-	-
Quinat	+	+	-	-
Ferrulat	+	+	-	-
Caffeat	+	+	-	-
Indol-3-Acetat	+	-	+	-
Anthranilsäure	+	-	+	-
Phenylalanin	+	+	+	+
Tyrosin	+	+	+	+
Tryptophan	+	-	+	-
Toluol	-	-	-	-
Folsäure	-	-	-	-
Mandelsäure	-	-	-	-
Zimtsäure	-	-	-	-
Salicylsäure	-	-	-	-
Benzylacetat	-	-	-	-
Benzylalkohol	-	-	-	-

<sup>a</sup>Für die Wachstumsstudien wurden 20 mM Na-Acetat als Kohlenstoffquelle und 5 mM aller anderen Substrate verwendet; +=Wachstum; -=kein Wachstum



### 3.9.2. Der $\beta$ -Ketoacidweg spielt eine Rolle bei der Komplementresistenz von *A. baumannii* AYE

Die Resistenz pathogener Bakterien gegenüber des Komplementsystems in humanem Blutserum spielt eine große Rolle im Infektionsprozess. Im Folgenden sollte die Rolle des  $\beta$ -Ketoacidweges bei der Komplementresistenz von *A. baumannii* AYE untersucht werden. Hierfür wurden der Wildtyp, die  $\Delta pcaHG$ -, die  $\Delta catA$ - und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante in LB-Medium angezogen, in der exponentiellen Phase geerntet und mit PBS<sup>+/+</sup> auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 eingestellt. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden anschließend für zwei Stunden bei 37 °C entweder in PBS mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> (PBS<sup>+/+</sup>) oder in verschiedenen Konzentrationen humanen Blutserums (NHS) inkubiert. Der Zusatz von MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> war essenziell in diesem Experiment, da das Komplementsystem nur in Anwesenheit dieser Salze aktiv ist. Nach der zweistündigen Inkubation wurde die Überlebensrate des Wildtyps und der Mutanten analysiert (Abb. 50).



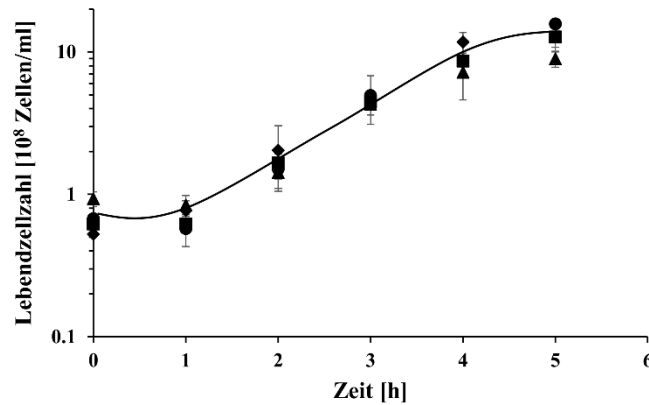
**Abb. 50. Effekt der *catA*- und *pcaHG*-Mutation auf die Lebendzellzahl von *A. baumannii* AYE in Blutserum mit aktivem Komplementsystem.** Die verschiedenen *A. baumannii* AYE-Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit PBS<sup>+/+</sup> auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 eingestellt. Anschließend wurden 5  $\mu$ l der Zellsuspensionen in verschiedenen NHS-Konzentrationen für zwei Stunden inkubiert und die Lebendzellzahl bestimmt. Aufgetragen wurden die Überlebensraten in % verglichen mit der PBS<sup>+/+</sup>-Kontrolle (Wildtyp: weiss;  $\Delta pcaHG$ : dunkelgrau,  $\Delta catA$ : hellgrau;  $\Delta pcaHG/catA$ : schwarz). 100 % war gleichzusetzen mit einer Lebendzellzahl von ca.  $7 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Die Inkubation des Wildtyps in 25 % NHS für 2 h führte zu einer Verdreifachung der Lebendzellzahl im Vergleich zu der Lebendzellzahl nach Inkubation ohne NHS (Abb. 50). Die Inkubation des Wildtyps in 30 % NHS führte zu einer leichten Abnahme der Lebendzellzahl

um 13 %. Anders hingegen war es bei den verschiedenen Deletionsmutanten. Während der Wildtyp eine Zunahme in der Zellzahl zeigte bei geringen NHS-Konzentrationen, konnte hier bereits eine deutliche Abnahme der Lebendzellzahl in allen drei Deletionsmutanten vermerkt werden. Die  $\Delta catA$ -Deletionsmutante zeigte eine Überlebensrate von 56,8 %, die  $\Delta pcaHG$ -Mutante eine Überlebensrate von 39,8 % und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Deletionsmutante hatte eine ähnliche Überlebensrate von 50,6 %. Bei steigender NHS-Konzentration (30 %) überlebten nur noch 29,9 % ( $\Delta catA$ ), 17,7 % ( $\Delta pcaHG$ ) und 30,5 % ( $\Delta pcaHG/catA$ ) der jeweiligen Zellsuspension. Dieses Experiment zeigte deutlich, dass die Deletion des Catechol- oder des Protocatechuat-Zweiges einen Einfluss auf das Überleben von *A. baumannii* in Blutserum mit aktivem Komplementsystem hat. Da der Wildtyp allerdings eine Zunahme in der Zellzahl nach der Inkubation in 25 % NHS zeigte und damit unter diesen Bedingungen Wachstum nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob dieser beobachtete Phänotyp daraus resultierte, dass die Deletionsmutanten die aromatischen Verbindungen im Blutserum nicht mehr verstoffwechseln konnten oder ob tatsächlich die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem durch die Deletionen beeinträchtigt wurde. Um diese Frage zu klären, wurde getestet, ob das Wachstum im Blutserum mit inaktivem Komplementsystem in den jeweiligen Deletionsmutanten beeinträchtigt ist und ob sich das Überleben verstärken lässt durch die Zugabe von aromatischen Verbindungen zur Zellsuspension.

### 3.9.3. Der $\beta$ -Ketoacidweg ist nicht essenziell für das Wachstum in Blutserum

Um den Einfluss des  $\beta$ -Ketoacidweges auf das Wachstum von *A. baumannii* AYE in Blutserum zu untersuchen, wurden der Wildtyp, die  $\Delta catA$ , die  $\Delta pcaHG$  und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutanten über 5 h in hitzeinaktiviertem Blutserum schüttelnd bei 37 °C inkubiert und stündlich die Lebendzellzahl bestimmt. Die Lebendzellzahlen wurden anschließend gegen die Zeit semilogarithmisch aufgetragen (Abb. 51).



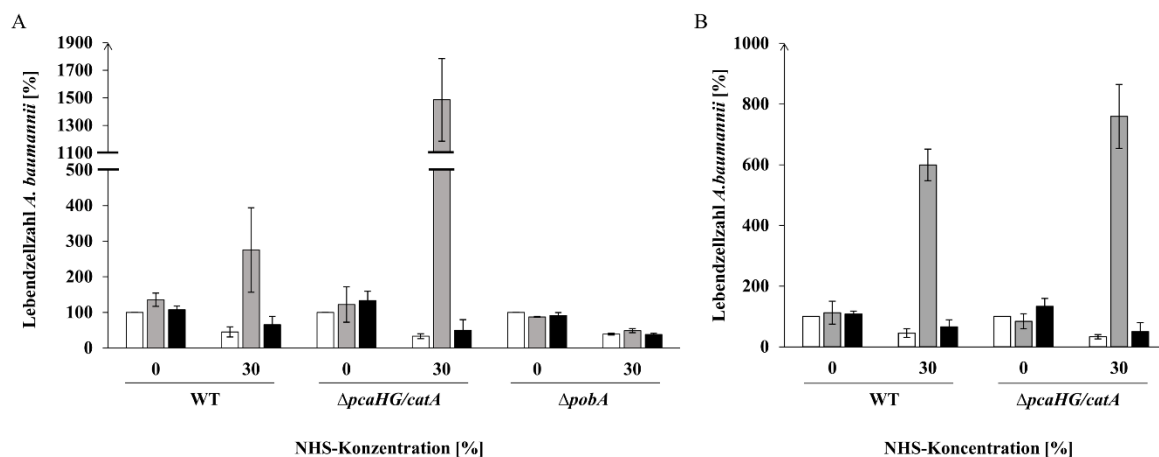
**Abb. 51. Die Gene *catA* und *pcaHG* haben keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. baumannii* AYE in Blutserum mit inaktivem Komplementsystem.** Die verschiedenen *A. baumannii* AYE-Stämme wurden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen, geerntet und in PBS rückgelöst. Anschließend wurden 5 ml hitzeinaktiviertes Blutserum auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 eingestellt und stündlich die Lebendzellzahl bestimmt. Die Lebendzellzahl wurden semilogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Wildtyp: ●; Δ*pcaHG*: ■, Δ*catA*: ▲; Δ*pcaHG/catA*: ◆). Dargestellt wurde der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Im Vergleich der Zellzahlzunahme des Wildtyps, der Δ*catA*-, der Δ*pcaHG*- und der Δ*pcaHG/catA*-Mutante über 5 h in hitzeinaktiviertem Blutserum konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum der verschiedenen Stämme dokumentiert werden (Abb. 51). Nachdem das Blutserum mit  $0,5 - 1 \cdot 10^8$  Zellen/ml inokuliert wurde, stieg die Zellzahl kontinuierlich in allen vier Kulturen über 5 h auf eine Lebendzellzahl von  $9 - 13 \cdot 10^8$  Zellen/ml an. Hierbei erreichte der Wildtyp eine maximale Zellzahl von  $12,75 \cdot 10^8$  Zellen/ml, die Δ*catA*-Mutante eine maximale Zellzahl von  $12,85 \cdot 10^8$  Zellen/ml, die Δ*pcaHG*-Mutante ging in die stationäre Phase über bei  $8,95 \cdot 10^8$  Zellen/ml und die Zellzahl der Δ*pcaHG/catA*-Doppelmutante stagnierte bei  $15,75 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Hieraus konnte gefolgert werden, dass der  $\beta$ -Ketoacidatweg keinen Einfluss auf die Nutzung von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Blutserum hat.

### 3.9.4. *p*-Hydroxybenzoat und Protocatechuat stimulieren die Komplementresistenz von *A. baumannii*

Da in den Wachstumsanalysen des Wildtyps und der verschiedenen  $\beta$ -Ketoacidat-Stoffwechselwegmutanten kein Phänotyp im Wachstum in inaktivem, humanem Blutserum beobachtet werden konnte, wurde getestet, ob die Anwesenheit von *p*-Hydroxybenzoat oder Protocatechuat eine Rolle in der Komplementresistenz von *A. baumannii* AYE spielt. Da die Gene des  $\beta$ -Ketoacidatweges nicht dauerhaft exprimiert werden, sondern erst in Anwesenheit

der jeweiligen Substrate induziert werden, würde die Anwesenheit von *p*-Hydroxybenzoat oder Protocatechuat zu einer erhöhten Menge an Transkript führen. Der Effekt der Anwesenheit dieser beiden Aromaten auf die Komplementresistenz wurde im Folgenden analysiert. Hierfür wurde der Wildtyp und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante in LB-Medium bis zur exponentiellen Phase angezogen, anschließend geerntet und mit PBS<sup>+/+</sup> auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden in PBS<sup>+/+</sup> oder in 30 % NHS in Anwesenheit und Abwesenheit von 5 mM *p*-Hydroxybenzoat oder Protocatechuat zwei Stunden inkubiert und die Lebendzellzahl bestimmt. Um ausschließen zu können, dass die zusätzliche Kohlenstoffquelle in der Zellsuspension zu einer erhöhten Lebendzellzahl führt, wurde eine Kontrolle mit Na-Acetat anstatt *p*-Hydroxybenzoat oder Protocatechuat durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurde eine  $\Delta pobA$ -Mutante untersucht, in der das Schlüsselenzym für den Abbau von *p*-Hydroxybenzoat, die *p*-Hydroxybenzoat-Dehydrogenase, deletiert wurde, um differenzieren zu können, ob *p*-Hydroxybenzoat möglicherweise einen inhibitorischen Effekt auf das Komplementsystem hat. Das prozentuale Überleben der jeweiligen Zellsuspensionen wurde in Abb. 52 abgebildet.

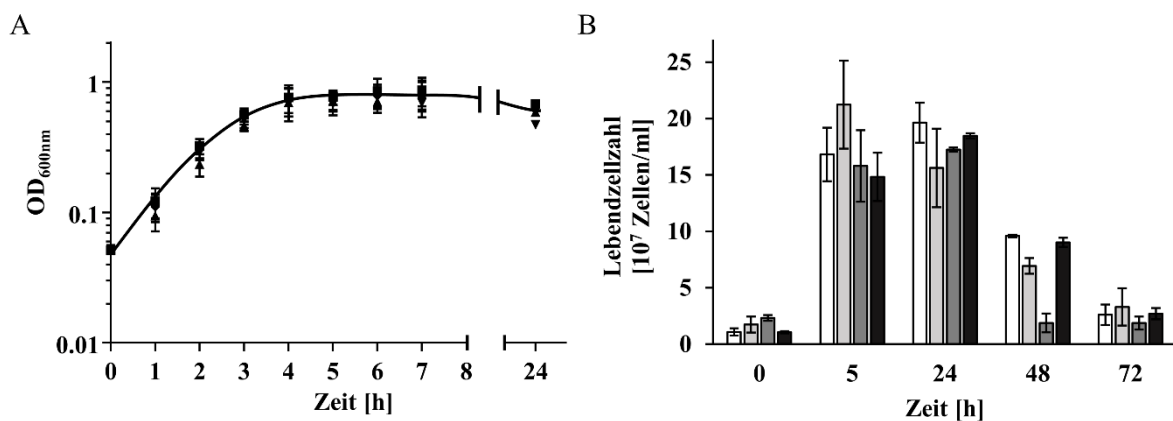


**Abb. 52. Die intrazelluläre Akkumulation von Protocatechuat fördert das Überleben von *A. baumannii* AYE in Blutserum mit aktivem Komplementsystem.** Die verschiedenen *A. baumannii* AYE-Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C angezogen, geerntet und mit PBS<sup>+/+</sup> auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 eingestellt. Anschließend wurden 5  $\mu$ l der Zellsuspensionen in verschiedenen NHS-Konzentrationen und in Ab- bzw. Anwesenheit von 5 mM *p*-Hydroxybenzoat, Protocatechuat oder 5 mM Na-Acetat zwei Stunden inkubiert und die Lebendzellzahl bestimmt. **A:** Inkubation der Zellen in PBS<sup>+/+</sup> (0) oder 30 % NHS (30) in der Ab- (weiss) oder Anwesenheit von *p*-Hydroxybenzoat (grau) oder Na-Acetat (schwarz). **B:** Inkubation der Zellen in PBS<sup>+/+</sup> (0) oder 30 % NHS (30) in der Ab- (weiss) oder Anwesenheit von Protocatechuat (grau) oder Na-Acetat (schwarz). Aufgetragen wurden die Überlebensraten in % verglichen zu der PBS<sup>+/+</sup>-Kontrolle. 100 % war gleichzusetzen mit einer Lebendzellzahl von ca.  $7 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Dargestellt wurde der  $\mp$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Der Wildtyp zeigte nach der Inkubation in 30 % NHS eine Abnahme der Lebendzellzahl von 54,8 % (Abb. 52 A). Dieser Effekt war ebenfalls zu beobachten in Anwesenheit von Na-Acetat (65,7 %). Im Gegenteil dazu konnte nach der Inkubation in 30 % NHS und in Anwesenheit von 5 mM *p*-Hydroxybenzoat eine Zunahme der Lebendzellzahl um 175,2 % auf 275,2 % beobachtet werden (Abb. 52 A). Dieser Effekt konnte auch in der  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante nachgewiesen werden, jedoch in einem drastischeren Ausmaß. Hier lag die Lebendzellzahl der Mutante in 30 % NHS und in Anwesenheit von 5 mM *p*-Hydroxybenzoat bei 1485,4 %. Die Zugabe von Na-Acetat hatte ebenfalls in der Mutante keine Auswirkungen auf die Lebendzellzahl (Abb. 52 A). Hier persistierten sowohl in Abwesenheit von *p*-Hydroxybenzoat oder Na-Acetat 33 % der Zellen als auch in Anwesenheit von 5 mM Na-Acetat 50 % der Zellen. Gleiches konnte für die Kontrollansätze ohne NHS festgestellt werden. Die Zugabe von zusätzlichen Kohlenstoffquellen während der Inkubation der Zellen in PBS<sup>+/+</sup> führte weder beim Wildtyp noch bei der Mutante zu einer Zunahme der Lebendzellzahl (Abb. 52 A). Ähnlich verhielt es sich auch bei der  $\Delta pobA$ -Mutante, welche nach der Inkubation in 30 % NHS mit oder ohne Na-Acetat bzw. *p*-Hydroxybenzoat Überlebensraten von 39 % (ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle), 48,9 % (*p*-Hydroxybenzoat) und 38,2 % (Na-Acetat) zeigte (Abb. 52 A). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Protocatechuat die Komplementresistenz von *A. baumannii* fördert, *p*-Hydroxybenzoat allerdings nicht. Dies korrespondiert mit dem Effekt, hervorgerufen durch die Anwesenheit von Protocatechuat während der Inkubation in NHS (Abb. 52 B). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Anwesenheit von Protocatechuat die Lebendzellzahl des Wildtyps und der  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante erhöhte und sogar zu Wachstum im Blutserum führte. In beiden Ansätzen konnte eine Zunahme der Lebendzellzahl um 600 % (Wildtyp) und 760 % ( $\Delta pcaHG/catA$ ) beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Anwesenheit von *p*-Hydroxybenzoat einen stimulierenden Effekt auf die Komplementresistenz hat. Der deutlich stärkere Einfluss von *p*-Hydroxybenzoat auf die Lebendzellzahl der Doppelmutante spricht dafür, dass die Akkumulation von Protocatechuat, welches durch das Fehlen des Enzyms PcaHG nicht weiter umgesetzt werden konnte, diese Stimulation verursacht. Diese Hypothese wird ebenfalls bestätigt, durch das Ausbleiben dieses Effekts in der  $\Delta pobA$ -Mutante, welche kein *p*-Hydroxybenzoat mehr umsetzen kann. Dies indiziert, dass das *p*-Hydroxybenzoat keine inhibitorische Wirkung auf das Komplementsystem *per se* hat und dass bei Abwesenheit von Protocatechuat die Persistenzfähigkeit des Stammes nicht stimuliert werden konnte.

### 3.9.4. Der $\beta$ -Ketoacidweg ist nicht essenziell für die Persistenz oder das Wachstum in menschlichem Urin

Des Weiteren sollte getestet werden, ob der  $\beta$ -Ketoacidweg eine Rolle beim Wachstum oder der Persistenz in menschlichem Urin spielt. Hierfür wurde der *A. baumannii* AYE-Wildtyp und die  $\Delta catA$ -, die  $\Delta pcaHG$ - und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutanten in LB-Medium bis zur stationären Phase angezogen und anschließend in sterilfiltrierten Morgenurin überführt. Das Wachstum wurde über die  $OD_{600nm}$  über die Zeit festgehalten und die Wachstumskurve ist in Abb. 53 A dargestellt. Die Persistenz wurde durch die Bestimmung der Lebendzellzahl über mehrere Tage untersucht und in Abb. 53 B gezeigt.



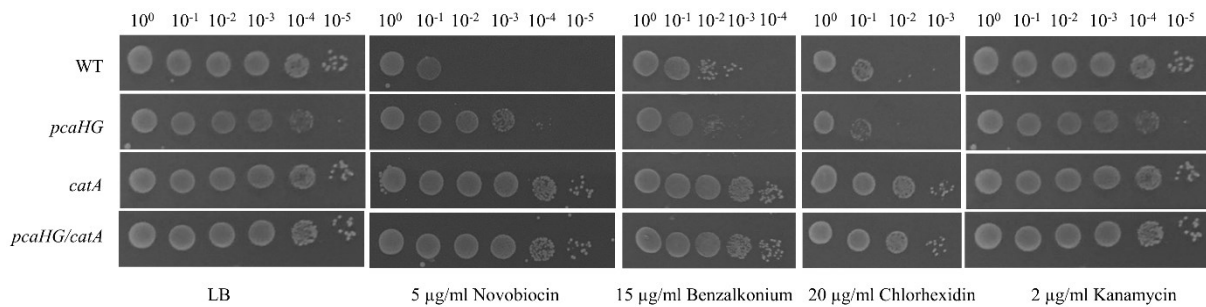
**Abb. 53. Die Rolle von PcaHG und CatA beim Wachstum (A) und der Persistenz (B) von *A. baumannii* AYE in menschlichem Urin.** Die verschiedenen *A. baumannii* AYE-Stämme wurden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen, geerntet und in Saline rückgelöst. Anschließend wurden 50 ml sterilfiltrierter Morgenurin auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,5 angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Die  $OD_{600nm}$  wurde stündlich gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (A: Wildtyp: ■;  $\Delta pcaHG$ : ▼;  $\Delta catA$ : ▲;  $\Delta pcaHG/catA$ : ◆). Außerdem wurde zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils die Lebendzellzahl bestimmt und ebenfalls gegen die Zeit aufgetragen (B: Wildtyp: weiß;  $\Delta pcaHG$ : dunkelgrau;  $\Delta catA$ : hellgrau;  $\Delta pcaHG/catA$ : schwarz). Dargestellt wurde der  $\pm$ S.E.M. von drei biologischen Replikaten.

Der Wildtyp und die jeweiligen Mutanten zeigten im Wachstum in menschlichem Urin keine signifikanten Unterschiede und hatten übereinstimmende Wachstumsraten (Abb. 53 A). Der Wildtyp hatte hierbei eine Wachstumsrate von  $0,77 \text{ h}^{-1}$ , ähnlich wie die  $\Delta catA$ -Mutante ( $0,74 \text{ h}^{-1}$ ), die  $\Delta pcaHG$ -Mutante ( $0,76 \text{ h}^{-1}$ ), sowie die  $\Delta pcaHG/catA$ -Doppelmutante ( $0,77 \text{ h}^{-1}$ ). Hieraus ist zu schließen, dass der  $\beta$ -Ketoacidweg keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. baumannii* AYE im Urinaltrakt des Menschen hat.

Ähnlich verhielt es sich bei der Rolle dieses Stoffwechselweges in der Persistenz unter diesen Bedingungen. Nach der Inokulation des Urins mit den jeweiligen Stämmen konnten Lebendzellzahlen von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp),  $1,7 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta catA$ ),  $2,3 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG$ ) und  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG/catA$ ) ermittelt werden. Diese stiegen in vergleichbaren Verhältnissen bis zum Erreichen der stationären Phase (5 h) auf  $16,8 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp),  $21,3 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta catA$ ),  $15,8 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG$ ) und  $14,8 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG/catA$ ) an. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Kulturen bei  $37^\circ\text{C}$  kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Lebendzellzahl in allen vier Kulturen ( $19,6 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp),  $15,6 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta catA$ ),  $17,2 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG$ ) und  $18,4 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG/catA$ )). Anschließend kam es nach 48 h zum Absterben der Kulturen jedoch ohne bemerkenswerten Unterschied zwischen dem Wildtyp und den verschiedenen Mutanten. Beim Wildtyp sank die Lebendzellzahl auf  $9,6 \cdot 10^7$  Zellen/ml, ebenso wie bei der  $\Delta catA$  ( $6,9 \cdot 10^7$  Zellen/ml), der  $\Delta pcaHG$  ( $1,9 \cdot 10^7$  Zellen/ml) und der  $\Delta pcaHG/catA$ -Doppelmutante ( $9 \cdot 10^7$  Zellen/ml). Selbst nach 72 h konnten weiterhin keine signifikanten Unterschiede vermerkt werden ( $2,6 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Wildtyp),  $3,3 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta catA$ ),  $1,9 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG$ ) und  $2,7 \cdot 10^7$  Zellen/ml ( $\Delta pcaHG/catA$ )). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass weder der Catechol- noch der Protocatechuat-Zweig des  $\beta$ -Ketoacidweges eine Rolle in der Persistenz in menschlichem Urin spielen.

### **3.9.5. Der $\beta$ -Ketoacidweg ist wichtig für die Resistenz gegenüber aromatischen Antibiotika**

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der  $\beta$ -Ketoacidweg eine Rolle in der Resistenz gegenüber aromatischen antimikrobiellen Verbindungen, wie z. B. Novobiocin, Benzalkonium oder Chlorhexidin spielt. Hierfür wurde die Hemmung des Wachstums des Wildtyps und der  $\Delta catA$ -,  $\Delta pcaHG$ - und der  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante in Anwesenheit verschiedener aromatischer und nicht-aromatischer Antibiotika untersucht. Die verschiedenen Stämme wurden in MM mit Na-Acetat als Kohlenstoffquelle und *p*-Hydroxybenzoat, sowie Benzoat zur Induktion der Genexpression der zu untersuchenden Gene, bis zur stationären Phase angezogen, geerntet und anschließend mit Saline auf eine  $OD_{600\text{nm}}$  von 1,0 eingestellt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf MM-Platten mit den aromatischen Antibiotika Novobiocin, Benzalkonium und Chlorhexidin oder dem nicht-aromatischen Antibiotikum Kanamycin getropft. Zur Wachstumskontrolle wurde ebenfalls eine Platte ohne Zusatz eines Antibiotikums angefertigt. Das Wachstum der Stämme auf den verschiedenen Platten ist in Abb. 54 gezeigt.



**Abb. 54. Die Deletion von *catA* und *pcaHG* hat einen Einfluss auf die Resistenz von *A. baumannii* AYE gegenüber aromatischen Antibiotika.** Die *A. baumannii* AYE comMR-Stämme wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium angezogen, geerntet und mit Saline auf eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 eingestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup>) und 5 µl der angegebenen Verdünnungen auf MM-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum getropft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp, der  $\Delta catA$ -,  $\Delta pcaHG$ - und der  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante auf der MM-Platte ohne Antibiotikazusatz festgestellt (Abb. 54). Alle vier Stämme zeigten eine Koloniebildung bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-5</sup>. In Anwesenheit von Novobiocin kam es jedoch zu signifikanten Wachstumsunterschieden. Wohingegen beim Wildtyp lediglich Wachstum bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-1</sup> nachgewiesen werden konnte, konnten für die  $\Delta pcaHG$ -Mutante noch in der 10<sup>-3</sup>-Verdünnung Wachstum detektiert werden und für die  $\Delta catA$ - und die  $\Delta pcaHG/catA$ -Mutante sogar bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-5</sup>. Ähnliches wurde ebenfalls für das Wachstum der verschiedenen Stämme in Anwesenheit von Benzalkonium und Chlorhexidin beobachtet. Während der Wildtyp ausschließlich bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-3</sup> (Benzalkonium) bzw. 10<sup>-1</sup> (Chlorhexidin) Kolonien formte, ähnlich wie die  $\Delta pcaHG$ -Mutante (Benzalkonium: 10<sup>-2</sup>; Chlorhexidin: 10<sup>-1</sup>), wurde für die Stämme  $\Delta catA$  und  $\Delta pcaHG/catA$  eine Koloniebildung noch bis zu einer Verdünnung von bis zu 10<sup>-3</sup> (Benzalkonium) bzw. 10<sup>-4</sup> (Chlorhexidin) detektiert. Die Anwesenheit von Kanamycin führte zu keinen signifikanten Unterschieden im Wachstum der jeweiligen Stämme. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die Mutanten eine stärkere Resistenz gegenüber aromatischen Antibiotika aufwiesen als der Wildtyp. Dies indiziert, dass sowohl der Catechol- als auch der Protocatechuat-Zweig des  $\beta$ -Ketoacidweges einen Einfluss auf die Resistenzen von *A. baumannii* gegenüber den aromatischen Antibiotika Benzalkonium, Novobiocin und Chlorhexidin haben.



## 4. Diskussion

*A. baumannii* gehört seit einigen Jahren zu den sechs häufigsten nosokomialen Erregern weltweit (Lowman *et al.*, 2008; Lob *et al.*, 2016; Giammanco *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017; Wieland *et al.*, 2018). Durch seine Fähigkeit besonders schnell Antibiotikaresistenzen auszubilden und aufgrund der hohen Mortalitätsrate bei einer Infektion von immunsupprimierten Menschen ist das Finden neuer Behandlungsmöglichkeiten von *A. baumannii*-Infektionen von immenser Wichtigkeit (Tacconelli *et al.*, 2018). Jedoch ist bis heute nur wenig bekannt über die molekularen Grundlagen der Virulenzstrategien und Pathogenitätsfaktoren dieses Bakteriums (Meumann *et al.*, 2019). In dieser Arbeit wurde die Rolle verschiedener Stoffwechselwege und Anpassungsmechanismen von *A. baumannii* bei der Virulenz und der Adaptation an den menschlichen Wirt untersucht. Darüber hinaus wurde die Anpassung von *A. baumannii* an hyperosmotische Bedingungen durch die Aufnahme des kompatiblen Solutes Glycinbetain und seines Vorläufers Cholin analysiert. Des Weiteren wurde ein für den ACB-Komplex spezifischer Abbauweg für Carnitin, sowie der  $\beta$ -Ketoadipatweg und dessen Wirkung auf die Virulenz des Pathogens untersucht. Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Rolle der PLDs bei der Resistenz gegenüber CAMPs und der Einfluss des  $\beta$ -Ketoadipatweges auf die Wirkung aromatischer Antibiotika analysiert.

### 4.1. Die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umwelt – nur eine Osmostressantwort?

Unter hyperosmotischen Bedingungen ist die Aufnahme und die *de novo*-Synthese von kompatiblen Soluten eine weit verbreitete Osmostressantwort von Mikroorganismen (Roeßler und Müller, 2001; Empadinhas und da Costa, 2008; Oren, 2008; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Bei einem Anstieg der externen Osmolarität gerät die intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration an osmotisch aktiven Substanzen in ein Ungleichgewicht. Dadurch kommt es zu einem massiven Wasserausstrom aus der Zelle und der zelluläre Turgor bricht zusammen – die Zelle vertrocknet (Bremer und Krämer, 2000; Wood, 2011; Bremer und Krämer, 2019). Um diesem rapiden Wasserausstritt entgegenzuwirken, akkumulieren Bakterien in einem ersten Schritt Kaliumionen und anschließend kompatible Solute, wie Glutamat, um den Überschuss an positiv geladenen Teilchen in der Zelle auszugleichen (Kempf und Bremer, 1998; Bremer und Krämer, 2000; Wood *et al.*, 2001). Für *A. baumannii* und auch andere Organismen, wie z. B. *E. coli*, *Salmonella enterica* oder *S. aureus* konnte bereits gezeigt werden, dass die

Aufnahme von Kaliumionen unter hyperosmotischen Bedingungen primär über drei Kaliumtransporter verläuft, einem ATP-getriebenen primär aktiven Transporter (Kdp) und zwei sekundär aktiven Transportern Kup und Trk (Epstein und Kim, 1971; Su *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2011; König *et al.*, 2021). Anschließend werden Solute-Synthesewege und Solute-Transporter über die hohen intrazellulären Kalium-Konzentrationen aktiviert und die Akkumulation von kompatiblen Soluten initiiert, gefolgt von einem Export der Kaliumionen (König *et al.*, 2020).

Aber diese Anpassungsmechanismen sind nicht nur essenziell für das Überleben unter hyperosmotischen Bedingungen, die Kaliumtransporter Kdp, Kup und Trk spielen ebenfalls als essenzielle Faktoren beim Infektionserfolg von *A. baumannii* eine Rolle (König *et al.*, 2021). So führte die Deletion dieser Transporter sowohl zu einer verminderten Adaptationsfähigkeit an den menschlichen Wirt als auch zu einem reduzierten Abtöten von *G. mellonella*-Larven. Erklärt wurde dies durch die eingeschränkte Fähigkeit Aminosäuren zu verstoffwechseln und reaktiven Sauerstoffspezies standzuhalten (König *et al.*, 2021). Auch die Gene für die Enzyme des Syntheseweges des kompatiblen Solutes Trehalose spielen eine Rolle bei der Infektion von *A. baumannii* (Gebhardt *et al.*, 2015). So führte z. B. die Deletion des *otsB*-Gens, welches für die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase kodiert, zu einer geringeren Virulenz von *A. baumannii* bei der Infektion von *G. mellonella*-Larven.

Für Glycinbetain konnte bis heute keine Rolle in der Virulenz von *A. baumannii* beschrieben werden, allerdings wurde Glycinbetain als „Host-sensing“-Faktor in *P. aeruginosa* postuliert (Wargo, 2013b). Hier aktiviert Glycinbetain die Expression des Gens der PLC, die bereits als Virulenzfaktor in diesem Organismus charakterisiert wurde. Zudem ist es erwähnenswert, dass in *A. baumannii* doppelt so viele BCCT für die Aufnahme von Glycinbetain oder seines Vorläufers Cholin detektiert werden konnten, wie in dem nicht pathogenen Vertreter dieser Gattung *A. baylyi* (Breisch *et al.*, 2018; Breisch und Averhoff, 2020). Diese Tatsache spricht ebenfalls für eine weitere Funktion von Glycinbetain in der Adaptation an den Menschen und in der Virulenz, jedoch wurden bis heute hierzu keine Studien durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben erste Einblicke in die Rolle von kompatiblen Soluten bei der Adaptation an den humanen Wirt und in der Virulenz von *A. baumannii* und werden im Folgenden diskutiert.

#### **4.1.1. Die BCCT als essenzielle Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *A. baumannii* sind auch unter isoosmotischen Bedingungen aktiv**

Für die Analyse der Rolle der BCCT bei der Virulenz von *A. baumannii* wurde in vorherigen Analysen bereits die Aktivität der verschiedenen Transporter unter unterschiedlichen osmotischen Bedingungen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Aktivität von drei der sechs BCCT Osmostress-unabhängig ist und sie ihr Substrat unter isoosmotischen Bedingungen (0,2 osmol/kg) in die Zelle transportieren. Zwei dieser Transporter wurden als Cholin-spezifisch charakterisiert (BetT1 und Aci01347) und einer als Glycinbetain-spezifisch (BetU3). In Kompetitionsstudien konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass der vermeintliche Cholintransporter Aci01347 eine höhere Affinität zu Carnitin aufwies (Breisch *et al.*, 2018; Breisch und Averhoff, 2020). Dieser Transporter konnte in dieser Arbeit in Transportstudien als Carnitin-spezifischer Transporter charakterisiert werden, wird aber erst später weitergehend diskutiert. Die Identifizierung von Osmostress-unabhängigen BCCT spricht damit für eine Rolle von Glycinbetain, Cholin und Carnitin über die Adaptation an Salzstress hinaus.

Des Weiteren wurde die Affinität der BCCT BetT1, BetT2, BetU1, BetU2 und BetU3 zu ihren jeweiligen Substraten, Cholin oder Glycinbetain, in dieser Arbeit analysiert, um diese in Zusammenhang mit den Cholin- und Glycinbetain-Konzentrationen im Menschen zu bringen. Die  $K_M$ -Werte der verschiedenen Transporter lagen zwischen 25 – 250  $\mu\text{M}$  und damit im Rahmen der Konzentrationen von Glycinbetain (35  $\mu\text{M}$ ) und Cholin (8  $\mu\text{M}$ ) im Menschen (Melse-Boonstra *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der Osmostress-unabhängige Cholintransporter BetT1 trotz höherer Affinität zu seinem Substrat (25,6  $\mu\text{M}$  im Gegensatz zu BetT2 129,2  $\mu\text{M}$ ) eine deutlich geringere Aufnahmezeit zeigte. Dies ist nicht verwunderlich, da die intrazelluläre Akkumulation von positiv-geladenem Cholin toxisch auf die Zelle wirkt (Boch *et al.*, 1996) und dementsprechend die Oxidation zu Glycinbetain dauerhaft gewährleistet sein muss, um einen Überschuss an intrazellulärem Cholin zu vermeiden.

Die Affinität der BCCT zu ihren Substraten zusammen mit den Konzentrationen im humanen Wirt führen zu dem Schluss, dass die BCCT nicht nur in hyperosmotischen Kompartimenten des Menschen aktiv Cholin oder Glycinbetain in die Zelle transportieren, wie beispielsweise im Urinaltrakt (400 mM NaCl  $\approx$  0,8 osmol/kg) oder im Intestinaltrakt (300 mM NaCl  $\approx$  0,6 osmol/kg), sondern auch in den weniger „salzigen“ Habitaten im Menschen, wie z. B. in der Blutbahn (150 mM NaCl  $\approx$  300 osmol/kg) (Chowdhury *et al.*, 1996; Culham *et al.*, 2001). Da *A. baumannii* bekannt ist für das Auslösen von Blutinfektionen und davon auszugehen ist,

dass diese Transporter unter den Bedingungen in der Blutbahn aktiv sind, ist eine Rolle der Glycinbetain- und Cholintransporter bei der Pathogenese nicht auszuschließen.

#### 4.1.2. Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain

Die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain spielt, wie die Aufnahme von Glycinbetain, eine große Rolle bei der Adaptation an hyperosmotische Bedingungen (Kempf und Bremer, 1998; Wood *et al.*, 2001; Empadinhas und da Costa, 2008). Wie zuvor beschrieben, nimmt *A. baumannii* Cholin unter Salzstress aus der Umwelt auf und nutzt das Cholin-Oxidationsprodukt Glycinbetain anschließend als kompatibles Solut (Breisch und Averhoff, 2020). Die essenziellen Gene für die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain liegen im Genom innerhalb eines Clusters (*betIBA*-Cluster) (Scholz *et al.*, 2016; Breisch und Averhoff, 2020). In *A. baylyi* wurde die Oxidation von Cholin bereits untersucht. Cholin wird über die Cholin-Dehydrogenase BetA zu Glycinbetain-Aldehyd oxidiert und anschließend durch die Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase BetB weiter zu Glycinbetain oxidiert (Scholz *et al.*, 2016). Mit Hilfe einer in dieser Arbeit generierten  $\Delta betA$ -Deletionsmutante konnte in Wachstumsanalysen dieser Oxidationsweg auch für *A. baumannii* bestätigt werden. Hierbei zeigte diese Deletionsmutante eine verringerte Wachstumsrate unter Hochsalz in Gegenwart von Cholin im Vergleich zum Wildtyp. Weiterhin war die Wachstumsrate der  $\Delta betA$ -Mutante unter diesen Bedingungen sogar geringer im Vergleich zum Wachstum der Mutante unter Hochsalz und in Abwesenheit von Cholin. Diese Beobachtung war zu erwarten, da diese Mutante kein Glycinbetain mehr synthetisieren konnte und die intrazelluläre Akkumulation von positiv geladenem Cholin toxisch für die Zelle ist, wie bereits für *B. subtilis* gezeigt wurde (Boch *et al.*, 1996).

Des Weiteren wurde die Cholin-Dehydrogenase in *E. coli* produziert, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain ausschließlich unter hyperosmotischen Bedingungen stattfindet oder ob das Enzym ebenfalls unter isoosmotischen Bedingungen aktiv ist. Bis heute gibt es in der Literatur nicht viele biochemische Informationen über dieses Enzym, da die Aufreinigung und die anschließende Lagerung der Cholin-Dehydrogenase schwierig ist. Dennoch konnten einige Erkenntnisse aus den drei Organismen *H. elongata*, *E. coli* und einem *Pseudomonas*-Stamm gewonnen werden (Nagasawa *et al.*, 1976; Russell und Scopes, 1994; Gadda und McAllister-Wilkins, 2003; Rajan *et al.*, 2010; Salvi und Gadda, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cholin-Dehydrogenase aus *A. baumannii* membranständig ist und nicht nur

Cholin, sondern auch Glycinbetain-Aldehyd umsetzt. Die Analyse des Umsatzes von Glycinbetain-Aldehyd zeigt eine geringere Oxidationsrate, wodurch das Vorhandensein eines weiteren Enzyms für die Umsetzung des toxischen Intermediates (Boch *et al.*, 1996) angenommen werden kann. Die ebenfalls im *betIBA*-Cluster kodierte Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase verhindert die Akkumulation von Glycinbetain-Aldehyd. Die Umsetzung von Cholin und auch Glycinbetain-Aldehyd durch die Cholin-Dehydrogenase konnte bereits für die Cholin-Dehydrogenasen aus *E. coli* und *H. elongata* beschrieben werden (Styrvold *et al.*, 1986; Gadda und McAllister-Wilkins, 2003). Der  $K_M$ -Wert für Cholin von BetA aus *A. baumannii* (10,3 mM) ist vergleichbar mit den  $K_M$ -Werten anderer Cholin-Dehydrogenasen, wie z. B. aus *H. elongata* (11,6 mM), *P. aeruginosa* (1,7 mM) oder *E. coli* (1,5 mM) (Nagasawa *et al.*, 1976; Gadda und McAllister-Wilkins, 2003; Rajan *et al.*, 2010). Auch das pH-Optimum von 9,0 der Cholin-Dehydrogenase aus *A. baumannii* stimmt mit dem der Cholin-Dehydrogenase aus *P. aeruginosa* und der Cholin-Oxidase aus *A. globiformis* überein (Nagasawa *et al.*, 1976; Ikuta *et al.*, 1977). Interessanterweise konnte allerdings bei der Salzabhängigkeit von BetA aus *A. baumannii* ein genereller Unterschied zu anderen Enzymen mit Rolle in der Adaptation an hyperosmotische Bedingungen festgestellt werden. Während die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase/Phosphatase aus *A. baumannii*, welche essenziell für die Bildung des kompatiblen Solute Mannitol ist, ausschließlich in Anwesenheit von NaCl aktiv ist (höchste Aktivität bei 700 mM und inaktiv in Abwesenheit von NaCl) (Zeidler *et al.*, 2018), zeigte die Cholin-Dehydrogenase die höchste Aktivität bei deutlich geringeren Konzentrationen von NaCl (0 mM) und KCl (50 mM). Im Gegensatz hierzu zeigen auch die Enzyme für die Synthese der kompatiblen Solute Trehalose und Glutamat aus *E. coli*, die Trehalose-Phosphat-Synthase und die Glutamat-Dehydrogenase, eine zehnfach höhere Aktivität bei hohen Kalium-Konzentrationen (Measures, 1975; Giæver *et al.*, 1988). Die hohe Aktivität der Cholin-Dehydrogenase von *A. baumannii* in Abwesenheit von NaCl, zusammen mit der Aufnahme von Cholin durch BetT1 auch bei geringen Salzkonzentrationen, indiziert, dass *A. baumannii* Cholin unter isoosmotischen Bedingungen aufnimmt und anschließend zu Glycinbetain oxidiert und damit, dass Glycinbetain und auch Cholin nicht nur unter Salzstress eine Rolle für *A. baumannii* spielen. Nichtsdestotrotz ist die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain wichtig für das Wachstum unter Hochsals, da über den Transporter BetT2 unter hyperosmotischen Bedingungen Cholin akkumuliert wird. Demnach ist es widersprüchlich, dass die Aktivität der Cholin-Dehydrogenase bei höheren Salzkonzentrationen abnimmt. Bakterien akkumulieren, bevor sie kompatible Solute synthetisieren oder aufnehmen, Kaliumionen und als Gegenion negativ geladenes Glutamat (Whatmore *et al.*, 1990; Roeßler und Müller, 2001; König *et al.*,

2020). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cholin-Dehydrogenase in Anwesenheit von Glutamat eine doppelt so hohe Aktivität wie in der Abwesenheit dieses Solutes zeigte. Demnach stimuliert nicht eine erhöhte  $K^+$ -Konzentration unter hyperosmotischen Bedingungen die Oxidation von Cholin, sondern die Akkumulation von Glutamat. In anderen Organismen, wie beispielsweise für *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass Glutamat die Expressionen von Genen mit Rolle in der Synthese von kompatiblen Soluten positiv reguliert (Csonka und Epstein, 1996; Gralla und Vargas, 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glutamat die Aktivität der Cholin-Dehydrogenase stimuliert. Demzufolge können sowohl Glutamat als auch Kaliumionen einen sogenannten „Solute-switch“ initiieren (Csonka und Epstein, 1996; Gralla und Vargas, 2006; König *et al.*, 2020).

Die Tatsache, dass die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain-Aldehyd ausschließlich in Anwesenheit von einem Elektronenakzeptor stattfindet, zeigte, dass BetA nur als Dehydrogenase fungiert und nicht wie die Cholin-Dehydrogenase aus *H. elongata* ebenfalls als Oxidase wirksam ist, die molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden kann. In den Experimenten in dieser Arbeit wurde PMS als alternativer Elektronenakzeptor verwendet, jedoch war bisher nicht bekannt, welchen Elektronenakzeptor BetA unter physiologischen Bedingungen als Cofaktor nutzt. Die Identifizierung der typischen Glycin-Box (GAGSAG) am N-Terminus (Landfald und Strøm, 1986) indiziert, dass möglicherweise FAD als Cofaktor fungiert. Jedoch konnte diese Glycin-Box ebenfalls in der Cholin-Dehydrogenase aus *H. elongata* und aus einem *Pseudomonas*-Stamm identifiziert werden, für die bisher die Rolle von FAD als Cofaktor nicht nachgewiesen ist. Für das aufgereinigte Enzym aus *H. elongata* konnte bisher kein Elektronenakzeptor gefunden werden (Gadda und McAllister-Wilkins, 2003) und für die Cholin-Dehydrogenase aus *Pseudomonas* fungiert Pyrrolochinolinchinon (PQQ) als Elektronenakzeptor (Russell und Scopes, 1994). In Cholin-Oxidase aus anderen Organismen liegt FAD als Cofaktor häufig kovalent gebunden vor (Ohta-Fukuyama *et al.*, 1980; Gadda, 2003; 2020). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FAD in der Cholin-Dehydrogenase aus *A. baumannii* in nicht-kovalent gebundener Form als Cofaktor vorliegt.

#### **4.1.4. Die Oxidation von Cholin führt zu einem energetischen Vorteil im menschlichen Wirt**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Cholin auch unter isoosmotischen Bedingungen in die Zelle transportiert und zu Glycinbetain umgesetzt wird, stellte sich die Frage, welchen Vorteil *A. baumannii* hierdurch hat. Während der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain werden vier

Elektronen freigesetzt, von denen zwei Elektronen im ersten Reaktionsschritt auf den Cofaktor FAD übertragen werden, welcher in dieser Arbeit identifiziert wurde. Die weiteren Elektronen werden in der zweiten Reaktion vermutlich auf  $\text{NADP}^+$  übertragen, wie es für *A. baylyi* bereits gezeigt wurde (Scholz *et al.*, 2016). Die freigesetzten Elektronen können dann für andere zelluläre Prozesse genutzt werden. Eine Theorie über die Nutzung dieser freiwerdenden Elektronen ist die Verwendung in der Atmungskette, wodurch ein Protonengradient an der Membran erzeugt wird, welcher die ATP-Synthese antreibt (Scholz *et al.*, 2016). Da die Cholin-Dehydrogenase in *A. baumannii* membranständig vorliegt, jedoch keinerlei Membrananker oder -helices identifiziert werden konnten, wird vermutet, dass BetA an die Proteine des Atmungskettenkomplexes bindet. In diesem Fall könnten die freiwerdenden Elektronen über das gebundene FAD in BetA direkt in die Atmungskette eingeschleust werden und anschließend die Protonen-getriebene ATP-Synthase antreiben. In dieser Arbeit konnte diese Hypothese bestätigt werden. So konnte in ruhenden Zellen, die zuvor in Anwesenheit von Cholin angezogen wurden, nach Zugabe von Cholin ein Anstieg in der intrazellulären ATP-Konzentration beobachtet werden. In Inhibitorstudien mit verschiedenen ATP-Synthase-Hemmern, Protonophoren und Ionophoren konnte eindeutig gezeigt werden, dass die freiwerdenden Elektronen während der Oxidation von Cholin zu Glycinbetain-Aldehyd, über das FAD in die Atmungskette geleitet werden und einen Protonen-getriebenen elektrochemischen Gradienten über die cytoplasmatische Membran aufbauen. Dieser Protonengradient treibt anschließend die  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase an, wodurch ATP synthetisiert wird. Inwiefern die Elektronen des zweiten Oxidationsschrittes von Glycinbetain-Aldehyd zu Glycinbetain ebenfalls für die ATP-Synthase genutzt werden, ist unklar.

Im Rahmen dieser Experimente konnten darüber hinaus Erkenntnisse über die Regulation des *betIBA*-Clusters gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Zellen, die in Anwesenheit von Cholin gewachsen waren, in der Lage waren, ATP nach Zugabe von Cholin zu erzeugen. Hieraus war zu schließen, dass die Gene des *betIBA*-Clusters in Abwesenheit von Cholin nicht exprimiert werden, wie es bereits für *A. baylyi* bekannt ist (Scholz *et al.*, 2016). Aus dem Befund, dass *A. baumannii*-Zellen, die mit Phosphatidylcholin als Kohlenstoffquelle angezogen worden waren, ebenfalls eine Cholin-abhängige ATP-Synthese zeigten, kann geschlossen werden, dass die Cholin-Kopfgruppe des Phosphatidylcholins durch Phospholipasen freigesetzt wird und als Induktor des *betIBA*-Clusters fungiert. Da Phosphatidylcholin in großen Mengen im humanen Wirt vorkommt, indiziert dies, dass die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain eine Rolle bei der energetischen Adaptation von *A. baumannii* an den menschlichen Wirt spielt. Cholin-haltige Phospholipide, wie

Phosphatidylcholin und Sphingomyelin machen den Hauptteil der Phospholipide in der Membran von eukaryotischen Zellen aus (ca. 50 – 90 %; (Zachowski, 1993)) und die Abspaltung der Cholin-haltigen Kopfgruppe durch pathogene Bakterien ist bereits im Fall von *P. aeruginosa* gut untersucht worden. Hierbei wird die Kopfgruppe über eine PLC abgespalten und das hierbei entstehende Phosphorylcholin anschließend über die Phosphorylcholin-Phosphatase zu Cholin und Phosphat umgewandelt (Holbrook *et al.*, 1991; Wargo *et al.*, 2009; Fiester *et al.*, 2016). Darüber hinaus konnte der hieran beteiligten PLC nicht nur eine Funktion bei der Spaltung von Phospholipiden zugesprochen werden, viel mehr ist diese PLC auch essenziell für die Virulenz von *P. aeruginosa* und somit das Auslösen von Lungenentzündungen (Stinson und Hayden, 1979; Lisa *et al.*, 1994b; Terada *et al.*, 1999; Wargo *et al.*, 2011). Bemerkenswert ist ebenfalls, dass die Umsetzung von Cholin zu Glycinbetain in *P. aeruginosa* als „Host-sensing“-Faktor beschrieben wurde. In Anwesenheit von Cholin oder Glycinbetain wird die Expression von Virulenzfaktoren induziert und ebenfalls das Überleben dieses Bakteriums in der Lunge während der Infektion verbessert (Wargo, 2013a).

In dieser Arbeit konnten den PLCs und PLDs aus *A. baumannii*, welche als Virulenzfaktoren bekannt sind (Stahl *et al.*, 2015; Fiester *et al.*, 2016), keine eindeutige Rolle bei der Abspaltung der Kopfgruppe von Phosphatidylcholin zugesprochen werden. Sowohl die  $\Delta plc12$ -Doppelmutante als auch die  $\Delta pld123$ -Dreifachmutante zeigten weiterhin ATP-Synthese nach dem Wachstum mit Phosphatidylcholin, wobei die ATP-Syntheserate in der  $\Delta plc12$ -Doppelmutante geringer war. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die PLCs als auch die PLDs nicht essenziell für die Abspaltung der Cholin-Kopfgruppe aus Phosphatidylcholin sind. Festzuhalten ist dennoch, dass Phosphatidylcholin als natürliche Cholinquelle für *A. baumannii* dient und die Umsetzung von Cholin zu Glycinbetain zur ATP-Synthese führt, wodurch ein energetischer Vorteil für *A. baumannii* im menschlichen Wirt entsteht.

#### **4.1.3. Carnitin wird von *A. baumannii* nicht als kompatibles Solut verwendet**

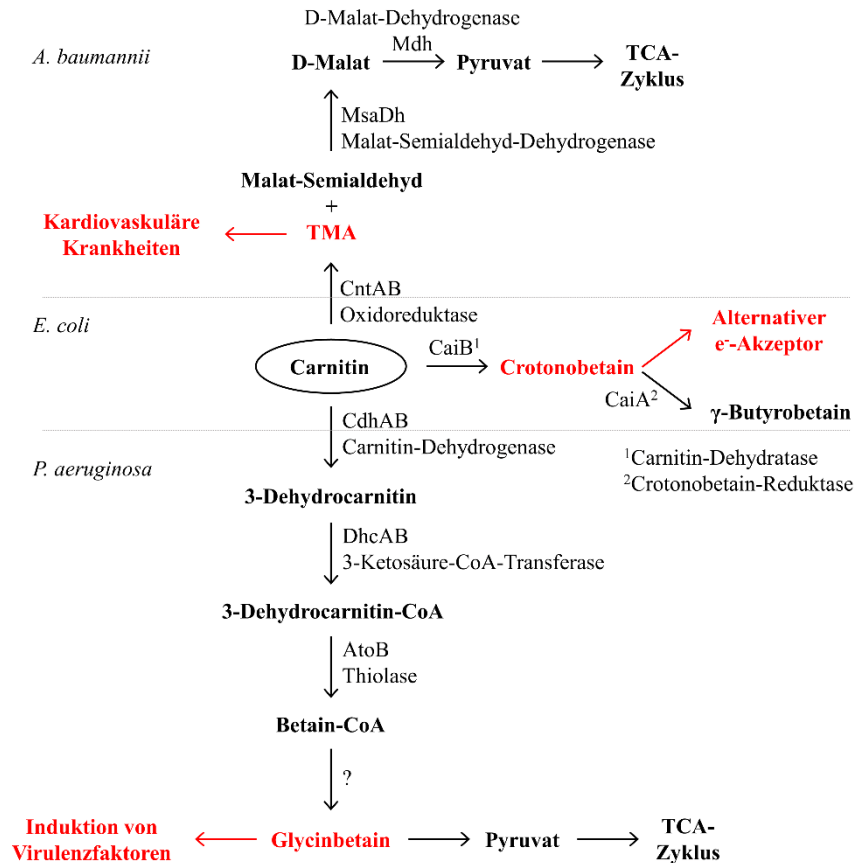
Wie in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, nimmt *A. baumannii* über die BCCT Cholin und Glycinbetain auch unter isoosmotischen Bedingungen auf. Einer der BCCT, der Osmostress-unabhängige Transporter Aci01347, welcher zuerst als Cholin-spezifisch charakterisiert wurde, konnte innerhalb dieser Arbeit als Carnitintransporter identifiziert werden. In der Literatur ist bereits bekannt, dass Carnitin entweder über primär aktive Transporter der ABC-Transporter-Familie aufgenommen wird oder über sekundär aktive



Antiporter der BCCT-Familie (Ziegler *et al.*, 2010; Meadows und Wargo, 2015). Die Aufnahme und die Rolle von Carnitin als kompatibles Solut wurde bereits in *P. aeruginosa* und in Stämmen der Familie *Enterobacteriaceae* sehr gut untersucht (Kleber *et al.*, 1967; Eichler *et al.*, 1994; Lucchesi *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2002; Wargo und Hogan, 2009; Chen *et al.*, 2010). In *P. aeruginosa* wird Carnitin über einen ABC-Transporter aufgenommen, welcher sowohl Carnitin als auch Cholin und Glycinbetain über drei verschiedene Substratbindeproteine transportiert (Chen *et al.*, 2010). Anschließend wird Carnitin intrazellulär zu Glycinbetain umgewandelt (Abb. 55), welches als kompatibles Solut fungiert (Lucchesi *et al.*, 1995). Hierbei wird Carnitin über die Carnitin-Dehydrogenase (CdhAB) zu 3-Dehydrocarnitin umgesetzt. 3-Dehydrocarnitin wird metabolisiert über die 3-Ketosäure-CoA-Transferase (DhcAB) zu 3-Dehydrocarnitin-CoA, welches über eine Thiolase (AtoB) zu Glycinbetain-CoA deacetyliert wird. Im letzten Schritt wird dieses dann über eine bislang unbekannt Acetyltransferase zu Glycinbetain umgewandelt (Abb. 55) (Wargo und Hogan, 2009). Anders hingegen ist es in *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica*. Hier wird Carnitin zwar ebenfalls über einen ABC-Transporter aufgenommen, aber fungiert direkt als kompatibles Solut und wird nicht weiter zu Glycinbetain verstoffwechselt (Park *et al.*, 1995; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). Gleiches gilt auch für *E. coli*, wobei Carnitin nur als kompatibles Solut dient. Allerdings wird in diesem Bakterium Carnitin über den BCCT CaiT aufgenommen, welcher Carnitin unter anaeroben Bedingungen in einem Antiportmechanismus in die Zelle transportiert und im Gegenzug  $\gamma$ -Butyrobetain aus der Zelle exportiert (Jung *et al.*, 1990b; a; Verheul *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2002; Meadows und Wargo, 2015). In *E. coli* wird Carnitin über CaiB zu Crotonobetain umgesetzt und über CaiA weiter zu  $\gamma$ -Butyrobetain umgewandelt (Abb. 55), welches mittels eines Produkt:Substrat-Antiporters anschließend exportiert wird (Jung *et al.*, 2002; Meadows und Wargo, 2015). Aber Carnitin kann in *E. coli* ebenfalls, primär unter hyperosmotischen Bedingungen, über den Transporter ProP akkumuliert werden (Verheul *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte für diesen Transporter ein besonders breites Substratspektrum von Prolin, Ectoin, Pipecolinsäure, Prolin-Betain, Glycinbetain, *N,N*-Dimethylglycin und 1-Carboxymethylpyridinium festgestellt werden. Allerdings wird dieser Transporter durch die Anwesenheit von Cholin gehemmt (MacMillan *et al.*, 1999). In Anbetracht der Tatsache, dass Cholin zumeist Protonen-gekoppelt über einen Symportmechanismus transportiert wird (Ziegler *et al.*, 2010), wurde postuliert, dass Carnitin ebenfalls über einen Protonengradienten in *A. baumannii* akkumuliert wird, was einen neuen Transportmechanismus für Carnitin beschreibt. Diese Vermutung wird ebenfalls bestärkt durch das Fehlen der typischen Na-Bindestellen in Aci01347, wie sie für andere BCCT mit

Natriumionen-Abhängigkeit bereits gut charakterisiert sind (Khafizov *et al.*, 2012; Breisch *et al.*, 2018). Da in dem Medium für die Transportstudien kein  $\gamma$ -Butyrobetain vorhanden war und die Gene *caiA* und *caiB* unter aeroben Bedingungen nicht exprimiert werden, konnte weiterhin ein Antiportmechanismus für diesen Transporter ausgeschlossen werden.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte in Wachstumsanalysen unter Hochsalz und in Anwesenheit von Carnitin zusätzlich gezeigt werden, dass Carnitin von *A. baumannii* nicht als kompatibles Solut verwendet wird (Breisch, 2017). Dies führte zu dem Schluss, dass Carnitin in *A. baumannii* nicht zu Glycinbetain umgewandelt wird, wie für *P. aeruginosa* beschrieben (Wargo und Hogan, 2009). Bereits 2014 konnten Zhu und Kollegen eine Rieske-Oxidoreduktase (CntAB) identifizieren, welche für die Umsetzung von Carnitin in *A. baumannii* wichtig ist (Zhu *et al.*, 2014). Carnitin wird von *A. baumannii* als Kohlenstoffquelle genutzt und zu TMA und Malat umgesetzt, wobei Malat ein Intermediat des TCA-Zyklus darstellt. Die Verwertung von Carnitin in *Acinetobacter*-Spezies wurde allerdings schon deutlich früher beobachtet. 1977 konnten Kleber und Kollegen feststellen, dass einige Trimethylammoniumverbindungen wie z. B. Carnitin und  $\gamma$ -Butyrobetain, von *A. calcoaceticus* als Kohlenstoffquellen genutzt werden können und 1994 konnten Ditullio und Kollegen den hier zu Grunde liegenden Abbauweg für Carnitin über Malat-Semialdehyd und TMA charakterisieren (Kleber *et al.*, 1977; Ditullio *et al.*, 1994). Ein analoger Abbauweg für Carnitin zu Malat-Semialdehyd über ein instabiles Intermediat und weiter zu Malat über eine Carnitin-Monooxygenase und eine Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase wurde auch für *A. baumannii* postuliert (Zhu *et al.*, 2014). Dieser Abbauweg wurde lange Zeit als sehr spezifisch für *A. calcoaceticus* angesehen und es wurde vermutet, dass der Abbau von Carnitin primär über die Umsetzung zu Glycinbetain verläuft, welches anschließend zu Pyruvat metabolisiert wird, wie für *Pseudomonas* Spezies beschrieben (Kleber, 1991). Allerdings konnten bis heute in vielen Arten des Darm-Mikrobioms Orthologe und Homologe der Rieske-Carnitin-Monooxygenase CntAB nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderem *Gammaproteobacteria* (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Providencia* und *Shigella*), *Betaproteobacteria* (*Achromobacter*) und *Firmicutes* (*Sporosarcina*) (Zhu *et al.*, 2014; Meadows und Wargo, 2015). Dies ist nicht verwunderlich, da Carnitin eine weitverbreitete Kohlenstoffquelle im humanen Wirt darstellt. In einem erwachsenen, durchschnittlich 70 kg schweren Menschen konnten bis zu 100 mmol nachgewiesen werden. Hiervon sind 98 % in den Muskeln, 0,6 % in extrazellulären Flüssigkeiten und 1,6 % in der Leber und in der Niere zu finden (Engel und Rebouche, 1984).



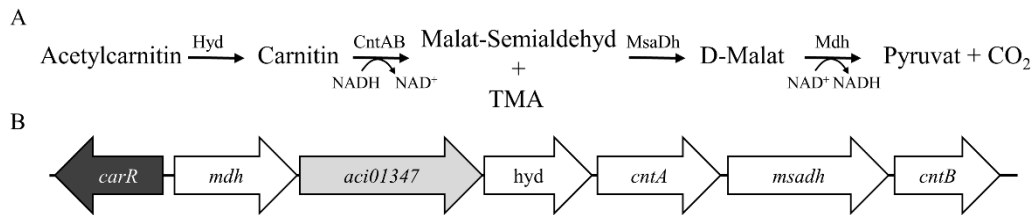
**Abb. 55. Alternative Abbauwege für Carnitin in *A. baumannii*, *E. coli* und *P. aeruginosa*.** Für weitere Erklärungen, siehe Text. Die Rolle des jeweiligen Abbauges in zellulären Prozessen wurde in rot hervorgehoben.

Das Vorkommen von unterschiedlichen Abbauegen für Carnitin in verschiedenen Organismen (Abb. 55) lässt die Frage aufkommen, welchen Vorteil die verschiedenen Abbauege haben. Der Grund für die Umwandlung von Carnitin zu  $\gamma$ -Butyrobetain unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* wurde lange Zeit nicht verstanden (Kleber, 1997; Meadows und Wargo, 2015). Crotonobetain, das Zwischenprodukt während der Umformung von Carnitin zu  $\gamma$ -Butyrobetain, konnte als alternativer Elektronenakzeptor in Anwesenheit anderer Kohlenstoffquellen identifiziert werden (Seim *et al.*, 1982a; Seim *et al.*, 1982b; Seim *et al.*, 1982c). In *P. aeruginosa* wird Carnitin, wie bereits erwähnt, durch mehrere Reaktionen zu Glycinbetain umgewandelt (Lindstedt *et al.*, 1967; Wargo und Hogan, 2009), welches anschließend verschiedene Funktionen in der Zelle übernehmen kann. Zum einen fungiert Glycinbetain als kompatibles Solut unter hyperosmotischen Bedingungen, zum anderen als Kohlenstoffquelle unter isosmotischen Bedingungen (D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Wargo und Hogan, 2009). Zudem induziert Glycinbetain eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren in

*P. aeruginosa*, wie z. B. die PLC, die Cholinesterase und die Phosphorylcholin-Phosphatase (Stinson und Hayden, 1979; Shortridge *et al.*, 1992; Fritz und Arrigoni-Martelli, 1993; Lisa *et al.*, 1994a; Lisa *et al.*, 1994b; Fitzsimmons *et al.*, 2012). Diese Umwandlung von Carnitin zu Glycinbetain ermöglicht es dem Pathogen, auch bei geringen Cholin-Konzentrationen Glycinbetain zu synthetisieren und im menschlichen Wirt die genannten Virulenzfaktoren zu exprimieren und damit den Angriff der Wirtsmembranen zu induzieren (Lucchesi *et al.*, 1995) (Abb. 55). Die Umwandlung von Carnitin zu Malat-Semialdehyd und TMA hingegen hat einen direkten Einfluss auf die Gesundheit des Menschen. Das während der Umsetzung von Carnitin gebildete TMA wird in der wirtseigenen Leber durch eine Flavin-haltige Monooxygenase zu TMAO metabolisiert (Miao *et al.*, 2015). TMAO kann dann Atherosklerose, kardiovaskuläre Krankheiten, myokardiale Infarkte und Schlaganfälle auslösen (Koeth *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014; Senthong *et al.*, 2016) (Abb. 55). Demnach beschreiben diese beiden Abbauwege nicht nur alternative Stoffwechselwege in diesen humanpathogenen Bakterien, sondern spielen auch eine Rolle bei unterschiedlichen Virulenzstrategien.

Der von Zhu und Kollegen postulierte Abbauweg für Carnitin in *A. baumannii* schloss L-Malat als Intermediat ein (Zhu *et al.*, 2014). In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass Malat-Semialdehyd nicht zu L-Malat umgewandelt und anschließend in den TCA-Zyklus eingespeist wird, sondern vielmehr zu D-Malat metabolisiert wird. D-Malat wird dann zu Pyruvat über die im selben Gencluster annotierte Malat-Dehydrogenase umgewandelt, welches dann in den TCA-Zyklus eingespeist wird (Abb. 55). Der Befund, dass eine Malat-Dehydrogenase-Mutante von *A. baumannii* weder Acetylcarnitin noch Carnitin oder D-Malat weiterhin verstoffwechseln konnte, zeigte eindeutig, dass Carnitin ausschließlich über D-Malat abgebaut und weiterhin zu Pyruvat umgewandelt wird (Abb. 56). Außerdem konnte mit Hilfe der Hydrolase-Mutante gezeigt werden, dass Acetylcarnitin von *A. baumannii* ebenfalls aufgenommen und zu Carnitin umgewandelt werden kann. Acetylcarnitin stellt eine wichtige Carnitinquelle im humanen Wirt da, da 50 – 60 % der im Menschen vorkommenden Carnitine als Acylcarnitine, wie z. B. Acetylcarnitin vorliegen (Bieber *et al.*, 1982).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gene mit Funktion im Abbau von Carnitin eine transkriptionelle Einheit bilden, welche unter der Regulation eines transkriptionellen Regulators der LysR-Familie, CarR, steht. Die Deletion des Regulators führte zu einem Ausbleiben des Wachstums auf Carnitin und D-Malat, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass CarR als Induktor fungiert, wie es für die meisten Regulatoren dieser Superfamilie beschrieben ist (Maddocks und Oyston, 2008).



**Abb. 56. Abbauweg für Carnitin und die genetische Organisation des Carnitin-Operons in *A. baumannii* ATCC 19606.** **A:** Abbauweg für Carnitin in *A. baumannii*. Für weitere Erklärungen siehe Text. Hyd: Acetylcarnitin-Hydrolase, CntAB: Rieske-Oxidoreduktase-Komplex, MsaDh: Malat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Mdh: Malat-Dehydrogenase, TMA: Trimethylamin. **B:** Carnitin-Operon. Gene welche für die Gleichnamigen Enzyme des Abbauweges für Carnitin kodieren. *carR*: Regulator der LysR-Familie, *aci01347*: Carnitin-spezifischer BCCT.

Zudem konnte in EMSA-Studien die Bindung des Regulators an die Promotorregion des Operons nachgewiesen werden, allerdings konnten keine Effektoren charakterisiert werden, da dieser Regulator konstitutiv an die DNA auch ohne Induktor bindet. Diese Beobachtung war nicht verwunderlich, da für viele Regulatoren dieser Klasse bereits beschrieben ist, dass sie konstitutiv an die DNA binden (Schell *et al.*, 1990; Hryniewicz und Kredich, 1994; Muraoka *et al.*, 2003a; Muraoka *et al.*, 2003b; Smirnova *et al.*, 2004; Monferrer *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2012). Hierbei binden zwei Dimere in Abwesenheit ihres Induktors an die ribosomalen Bindestelle und an die sogenannte Aktivierungs-Bindestelle und tetramerisieren anschließend. Dabei verursachen sie eine Krümmung der DNA, welche die Expression reprimiert (van Keulen *et al.*, 1998; Tropel und van der Meer, 2004; Maddocks und Oyston, 2008). Die Aktivierung der Expression wird anschließend durch die Bindung des Effektormoleküls induziert, indem es zu einer Konformationsänderung im Tetramer und damit zum Entspannen der DNA-Beugung kommt und die RNA-Polymerase dann an die DNA binden kann (Maddocks und Oyston, 2008).

Weiterhin wurden innerhalb dieser Arbeit das Transkriptom von *A. baumannii* ATCC 19606 bei Wachstum mit Carnitin, Acetylcarnitin und D-Malat im Vergleich zu Zellen analysiert, welche unter nicht-induzierenden Bedingungen gewachsen waren (MM mit 20 mM Succinat). Diese Studien zeigten, dass die Anwesenheit der Intermediate und Substrate des Carnitinstoffwechsels nicht nur die Expression des Carnitin-Operons induzieren, sondern zusätzlich die Expression 57 weiterer Gene. Neben einer Reihe von Genen, von denen die Funktion der Genprodukte unbekannt ist oder dessen Funktion nur potenziell annotiert wurde, konnten die Gene des *pca*-Clusters für den Abbau von Protocatechuat, des *paa*-Clusters für den

Abbau von Phenylacetat und eines potenziellen Clusters für die Umsetzung von Homogentisat, ein zentrales Intermediat des L-Phenylalanin-, L-Tyrosin- und 3-Hydroxyphenylacetat-Abbaus identifiziert werden. Die Substrate dieser Stoffwechselwege sind im humanen Wirt in hohen Konzentrationen zu finden, wodurch die Induktion dieser Stoffwechselwege für die metabolische Adaptation an den Wirt sprechen könnte, welche induziert wird durch die Anwesenheit von Carnitin. Des Weiteren sind ebenfalls die Gene von transkriptionellen Regulatoren, Transporterproteinen, Proteinen mit Funktion im Kupfer- und Quecksilber-Transport, Signalproteinen, Pyruvat-Decarboxylasen, Acetyl-CoA-Hydrolasen, Acetaldehyd-Dehydrogenasen induziert. Die Rolle der Genprodukte im Stoffwechsel und warum diese Gene durch Carnitin induziert werden, ist noch nicht weiter untersucht worden.

Zusammenfassend haben die in dieser Arbeit dargestellten Analysen zum Carnitinstoffwechsel gezeigt, dass Carnitin über den Transporter Aci01347 wahrscheinlich durch einen Protonengradienten in die Zelle transportiert wird und anschließend als Kohlenstoffquelle fungiert. Hierbei wird Carnitin über einen Rieske-Oxidoreduktase-Komplex zu Malatsemialdehyd und TMA umgewandelt und anschließend über die Malatsemialdehyd-Dehydrogenase zu D-Malat. D-Malat wird dann durch die Malat-Dehydrogenase zu Pyruvat metabolisiert und in den TCA-Zyklus eingespeist. Das entstehende TMA, welches aus der Zelle diffundiert, kann in der Leber des Menschen zu TMAO umgesetzt werden, welches zu schwerwiegenden kardiovaskulären Erkrankungen führen kann (Koeth *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Miao *et al.*, 2015; Senthong *et al.*, 2016; Massmig *et al.*, 2020). Somit stellt die Umsetzung von Carnitin durch *A. baumannii* nicht nur einen metabolischen Vorteil für das Pathogen dar, sondern kann ebenfalls zu Erkrankungen des Wirtes führen.

#### **4.2. Stimulieren Trimethylammoniumverbindungen die Virulenz von Pathogenen?**

Die Frage, ob die Trimethylammoniumverbindungen Glycinbetain, Cholin und Carnitin oder ihre Aufnahmesysteme und Synthesewege eine Rolle in der Virulenz von pathogenen Bakterien spielen, ist bereits eine vielfach untersuchte Fragestellung. In *P. aeruginosa* z. B. gibt es dafür schon zahlreiche Beweise (Lisa *et al.*, 1983; 1984; Lucchesi *et al.*, 1989; Lucchini *et al.*, 1990; Shortridge *et al.*, 1992; Lisa *et al.*, 1994a; Lisa *et al.*, 1994b; Lucchesi und Domenech, 1994; Lucchesi *et al.*, 1995). So konnte z. B. festgestellt werden, dass eine PLC und eine Phosphorylcholin-Phosphatase, dessen Genexpression durch Cholin induziert wird, eine entscheidende Rolle beim Infektionsprozess von *P. aeruginosa* spielen (Berka *et al.*, 1981; Domenech *et al.*, 1981; Berk *et al.*, 1987; Domenech *et al.*, 1991; Lisa *et al.*, 1994b; Terada *et*

*al.*, 1999; Wieland *et al.*, 2002; Wargo *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass die Kopfgruppe des Phospholipids Phosphatidylcholin über die PLC abgespalten wird (Stinson und Hayden, 1979) und anschließend das entstehende Phosphorylcholin zu Cholin und einem Phosphat mittels einer Phosphorylcholin-Phosphatase gespalten wird (Garrido *et al.*, 1990). Dies könnte zur Zerstörung der Wirtsmembran und damit zur Zellyse führen (Meyers *et al.*, 1992; Lisa *et al.*, 1994b; Wieland *et al.*, 2002; Wargo *et al.*, 2011), da in eukaryotische Zellmembranen Phosphatidylcholin in hohen Konzentrationen vorkommt (Zachowski, 1993). Die Expression der Gene der beteiligten Enzyme in *P. aeruginosa* steht unter der Kontrolle des Regulators GbdR, welcher die Expression dieser Virulenzfaktoren in Anwesenheit von Cholin und den Abbauprodukten dieser Trimethylammoniumverbindung, Glycinbetain und Dimethylglycin, induziert (Wargo *et al.*, 2009). Es konnte zudem gezeigt werden, dass nicht nur Cholin die Virulenz von *P. aeruginosa* stimuliert, sondern ebenfalls Carnitin, welches wie Cholin zu Glycinbetain umgewandelt wird (Lucchesi *et al.*, 1995; Wargo und Hogan, 2009). Gleichzeitig stimuliert Cholin nicht nur auf Expressionsebene die Produktion der PLC und der Phosphorylcholin-Phosphatase (Lisa *et al.*, 1984), sondern stimuliert auch auf Aktivitätsebene die PLC (Lucchesi *et al.*, 1989).

Und auch für weitere humanpathogene Organismen, wie für *L. monocytogenes*, *E. coli* und *S. aureus* konnten bereits Zusammenhänge zwischen der Akkumulation von kompatiblen Soluten und der Virulenz hergestellt werden (Gowrishankar und Manna, 1996; Culham *et al.*, 1998; Bayer *et al.*, 1999; Sleator *et al.*, 2001a; b; Sleator und Hill, 2002; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). So reduziert die Deletion des Carnitintransporters OpuC die Fähigkeit von *L. monocytogenes* die Leber, die Milz und den oberen Dünndarm zu kolonisieren (Sleator *et al.*, 2001c; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). In *E. coli* führt die Deletion von ProP, ein sekundär aktiver Prolin- und Glycinbetaintransporter, zu einer verminderten Überlebensfähigkeit in Blasen von Mäusen (Culham *et al.*, 1998). Zudem konnte in einem Vergleich von nicht virulenten und virulenten *E. coli*-Stämmen eine vielfach höhere Aktivität von ProU detektiert werden, ein primär aktiver Transporter für Prolin und Glycinbetain (Gowrishankar und Manna, 1996). In *S. aureus* führte die Deletion des Transporters PutP, welcher essenziell für die Aufnahme von Prolin ist, zu einer reduzierten Virulenz im Endokarditismodell (Bayer *et al.*, 1999). Der Gencluster des Prolin-Syntheseweges wurde ebenfalls bereits als essenziell für die *Listerien*-Pathogenese beschrieben. Allerdings konnte die genaue Rolle bisher nicht aufgeklärt werden (Sleator *et al.*, 2001a; b).

Nachdem bereits einige Erkenntnisse über die Rolle von Trimethylammoniumverbindungen in der Pathogenese unterschiedlicher pathogener Bakterien vorlagen, wurden innerhalb dieser

Arbeit ebenfalls die Effekte von Enzymen mit einer Rolle in der Akkumulation von Trimethylammoniumverbindungen auf die Virulenz von *A. baumannii* untersucht. Hierzu wurden die BCCT-Vierfachmutante und die Regulatormutanten, die jeweils eine Deletion des Regulators des Carnitin-Operons (CarR) und des Cholin-Oxidations-Clusters (BetI) aufwiesen, in verschiedenen Virulenzstudien analysiert. Jedoch konnte für keine der genannten Mutanten ein Phänotyp in der Komplementresistenz, der Fähigkeit, *G. mellonella*-Larven zu infizieren oder im Wachstum in menschlichen Urin unter den Standardbedingungen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse müssen jedoch nicht bedeuten, dass die BCCT oder der Regulator der Gene des Abbauweges von Carnitin bzw. der Regulator der Gene des Cholin-Oxidationsweges keine Rolle bei der Virulenz spielen. Es ist z. B. möglich, dass unter diesen Bedingungen kein Cholin oder Carnitin in der Umgebung vorhanden ist und diese Gene somit nicht exprimiert werden. Zudem könnten zusätzliche Faktoren die Expression dieser Gene unter den gegebenen Bedingungen in den Virulenzstudien hemmen. So ist in *P. aeruginosa* die Induktion der PLC nicht nur abhängig von der Cholin- bzw. der Glycinbetain-Konzentration (Sage *et al.*, 1997), sondern ebenfalls abhängig von der Phosphat-Konzentration und den vorhandenen Kohlenstoffquellen. Bei hohen Phosphat-Konzentrationen in der Umgebung und dem Vorhandensein alternativer Kohlenstoffquellen kommt es zu keiner Induktion der entsprechenden Gene, trotz Anwesenheit von Cholin oder Glycinbetain (Shortridge *et al.*, 1992; Lisa *et al.*, 1994b). Diese Beobachtung zeigt, dass die Expression der Cholin-abhängigen PLC in *P. aeruginosa* zusätzlich durch die Limitierung von Phosphat reguliert ist, da unter solchen Bedingungen Phosphat durch die Spaltung von Phosphatidylcholin zu Phosphorylcholin, welches weiter zu Cholin und Phosphat umgewandelt wird, freigesetzt wird (Liu, 1974; Shortridge *et al.*, 1992; Lisa *et al.*, 1994b). Da Phosphat im Menschen häufig nicht als freies Phosphat vorliegt, sondern an Lipide, Nukleinsäuren, Proteine und Zucker gebunden ist, sind spezielle Strategien von Bakterien essenziell, um das Wachstum und den Ablauf  $P_i$ -abhängiger zellulärer Prozesse zu gewährleisten (Lamarche *et al.*, 2008). Das Vorhandensein einer hämolysischen Phosphatidylcholin-spezifischen PLC und einer Phosphorylcholin-Phosphatase in *A. baumannii* könnte eine Rolle bei der Phosphat-Akquirierung unter Phosphatlimitierung im menschlichen Wirt spielen (Fiester *et al.*, 2016). Gestützt wird diese Hypothese weiterhin durch die Tatsache, dass *A. baumannii* limitiert in der Phosphataufnahme ist, obwohl das Bakterium alle benötigten Gene besitzt (Peleg *et al.*, 2012). Für die Analyse der Rolle der BCCT und der Enzyme sowohl für den Abbau von Carnitin als auch für die Oxidation von Cholin in der Virulenz von *A. baumannii* sind demnach Bedingungen zu wählen, unter denen die Expression der jeweiligen Gene sichergestellt ist. Hierfür sind weitere Expressionsstudien nötig

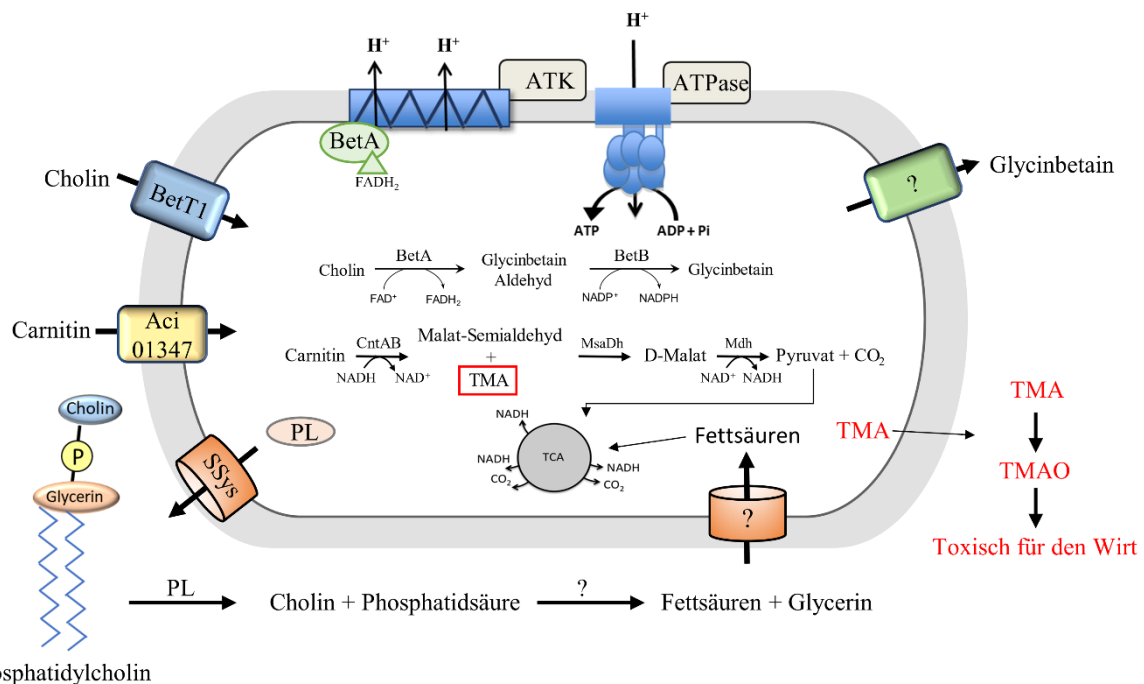


in Anwesenheit von Cholin oder Carnitin, unter Phosphat-Limitierung oder weiteren möglicherweise induzierende Bedingungen.

Der Infektionserfolg der  $\Delta carR$ -Mutante wurde weiterhin in *G. mellonella*-Virulenzstudien getestet, allerdings wurde zusätzlich Carnitin injiziert. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten eindeutig, dass die Umwandlung von Carnitin einen Einfluss auf den Infektionserfolg von *A. baumannii* hat. Die Anwesenheit von Carnitin führte zu einem signifikant verstärkten Absterben der infizierten Larven. Weiterhin zeigten diese Studien, dass dieser Effekt auf die Bildung von TMA zurückzuführen ist, da die  $\Delta hyd$ -Deletionsmutante in Anwesenheit von Acetylcarnitin zu einer deutlich verringerten Abtötung der *G. mellonella*-Larven führte und diese Mutante Acetylcarnitin nicht mehr zu TMA verstoffwechseln konnte. Die Anwesenheit von Carnitin hingegen führte nach Infektion der *G. mellonella*-Larven mit der  $\Delta hyd$ -Mutante zu der gleichen Absterberate wie nach der Infektion der Larven mit dem Wildtyp. Weiterhin ist zu testen, ob eine Phosphatlimitierung zu einem verringerten Absterben der Larven nach Infektion mit der  $\Delta betI$ - und der  $\Delta bcct$ -Mutante führt.

Zusammenfassend hatten diese Studien gezeigt, dass die Aufnahmesysteme von Trimethylammoniumverbindungen, der Carnitin-Katabolismus und die Cholin-Oxidation eine Rolle in der metabolischen Adaptation von *A. baumannii* an den menschlichen Wirt spielen. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang lässt sich folgende Adaptationsstrategie unter isoosmotischen Bedingungen im Wirt postulieren (Abb. 57). Cholin wird über den Osmostress-unabhängigen BCCT BetT1 in die Zelle aufgenommen und induziert die Expression des *betIBA*-Clusters. Die Enzyme BetA und BetB oxidieren Cholin anschließend über Glycinbetain-Aldehyd zu Glycinbetain, welches über einen bislang unbekanntem Exporter aus der Zelle exportiert wird. Die freiwerdenden Elektronen während der Oxidation von Cholin werden über das nicht-kovalent gebundene FAD in dem membranassoziierten Enzym BetA in die Atmungskette geschleust, wodurch ein Protonengradient erzeugt wird und die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase angetrieben wird. Cholin kann aus dem Phospholipid Phosphatidylcholin gewonnen werden. Die Cholin-haltige Kopfgruppe wird dabei durch eine exportierte Phospholipase (PL) freigesetzt. Der Export der Phospholipase wird über ein bislang unbekanntes Segregationssystem (SSys) katalysiert. Weiterhin können die Fettsäuren des Phosphatidylcholins abgespalten werden und als zusätzliche Energiequelle genutzt werden, da Cholin nicht als Kohlenstoffquelle dienen kann (Stahl *et al.*, 2015). Carnitin wird über den BCCT Aci01347 aufgenommen und in der Zelle anschließend zu Pyruvat über Malat-Semialdehyd und D-Malat metabolisiert, welches in den TCA-Zyklus einfließt. Das hierbei entstehende TMA wird in den extrazellulären Raum entlassen und durch die

wirtseigenen Enzyme zu TMAO umgesetzt (Miao *et al.*, 2015), welches kardiovaskuläre Krankheiten auslöst (Massmig *et al.*, 2020). Demnach bestätigt die toxische Wirkung von TMA auf den Wirt während des Abbaus von Carnitin, dass das zugehörige Operon eine Rolle in der Virulenz von *A. baumannii* spielt.



**Abb. 57. Metabolische Adaptation von *A. baumannii* an den Wirt durch die Akquirierung von Cholin und Carnitin.** Für weitere Erklärungen, siehe Text. ATK: Atmungskette, ATPase: F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase, BetA: Cholin-Dehydrogenase, BetB: Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase, CntAB: Rieske-Oxidoreduktase-Komplex, MsaDH: Malast-Semialdehyd-Dehydrogenase, Mdh: Malat-Dehydrogenase, BetT1: Cholin-spezifischer BCCT, Aci01347: Carnitin-spezifischer BCCT, SSys: Sekretionssystem, PL: Phospholipase, TMA: Trimethylamin, TMAO: Trimethylamin-N-oxid.

#### 4.3. Die Rolle der Membranzusammensetzung von *A. baumannii* in der Antibiotikaresistenz

Wie bereits beschrieben, haben die Phospholipasen einen entscheidenden Einfluss auf die Virulenz von Bakterien und Pilzen. Hierbei spielen alle Klassen der Phospholipasen eine Rolle. So ist die PLA beispielsweise in *Mycobacterium tuberculosis* (Côtés *et al.*, 2008), *Y. enterocolitica* (Schmiel *et al.*, 2000) oder *Helicobacter pylori* (Berstad *et al.*, 2002) von großer Bedeutung während der Infektion. Die PLC spielt eine Rolle in der Pathogenese von *C. perfringens* (Leslie *et al.*, 1989), *L. monocytogenes* (Schwarzer *et al.*, 1998), *P. aeruginosa*

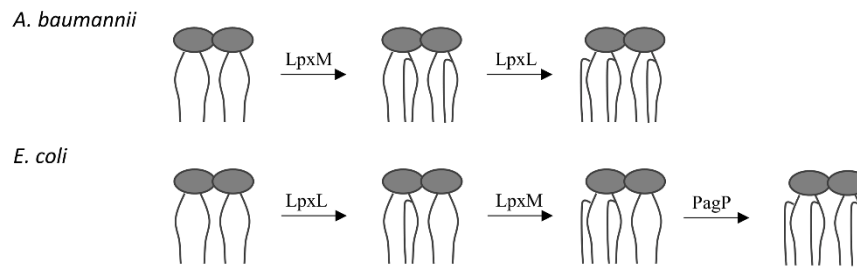
(Wargo *et al.*, 2011), *Legionella pneumophila* (Baine, 1988), sowie *A. baumannii* (Fiester *et al.*, 2016) und ebenso eine pathogenetische Wirkung der PLDs aus *M. tuberculosis* (Johansen *et al.*, 1996), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (McNamara *et al.*, 1995), *Arcanobacterium haemolyticum* (McNamara *et al.*, 1995) und *A. baumannii* (Stahl *et al.*, 2015) beschrieben werden. Die Phospholipasen sind in erster Linie essenziell für die Lyse der Wirtszelle und für das Auslösen der Immunantwort. Die Phospholipasen werden zumeist von dem Pathogen in den Wirt segregiert, sodass sie anschließend im extrazellulären Raum die Membranen der Wirtszellen angreifen und diese hydrolysieren (Baine, 1988; Gilmore *et al.*, 1989; Wazny *et al.*, 1990; Silverman *et al.*, 1992; Titball, 1993; Yozwiak und Songer, 1993; Nilius und Malfertheiner, 1996). Des Weiteren lösen die segregierten Phospholipasen die Wirtsantwort aus, indem sie die Expression der Zytokine TNF,  $\alpha$ PAF und IL-8 und die Arachidonsäurekaskade aktivieren, welche zur Zytokin-Freisetzung und zu Entzündungsreaktionen führt. Außerdem produzieren die Phospholipasen Leukotriene und Eikosanoide aus Arachidonsäure, welche die Blutgerinnung stören und Entzündungsreaktionen induzieren (Nilius und Malfertheiner, 1996; Stevens *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 1998) und produzieren zytotoxische Lysophospholipide (Flieger *et al.*, 2001).

Aber nicht nur direkt in der Virulenz spielen Phospholipasen eine wichtige Rolle, sondern sind ebenfalls essenziell für den bakteriellen Phospholipid-Metabolismus und die bakterielle Membranzusammensetzung (Liscovitch *et al.*, 2000; McDermott *et al.*, 2004; Pfefferle *et al.*, 2020). In *A. baumannii* konnte bereits beschrieben werden, dass die Deletion der PLD1, PLD2 und PLD3 zu einer veränderten Lipidkomposition führt, da in den Membranen der Dreifachmutante weder CL noch MLCL detektiert werden konnte (Pfefferle *et al.*, 2020). Dieser Befund führte zu der Frage, ob die PLDs einen Effekt auf die Antibiotikaresistenz von *A. baumannii* gegenüber membrandestabilisierenden antimikrobiellen Substanzen haben, wie z. B. CAMPs.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die PLDs eine Rolle in der Antibiotikaresistenz spielen. So hatte die *A. baumannii* ATCC 19606  $\Delta$ *pld123*-Mutante eine höhere Sensitivität gegenüber den CAMPs Colistin und Polymyxin B. CAMPs greifen die mikrobielle äußere Membran an und zerstören diese über Wechselwirkungen mit den Phospholipiden (Zavascki *et al.*, 2007). Da Resistenzen gegenüber dieser Antibiotikaklasse häufig im Zusammenhang mit einer veränderten LOS von *A. baumannii* stehen (Boll *et al.*, 2015), wurde ebenfalls postuliert, dass nicht nur die veränderte Phospholipidzusammensetzung der äußeren Membran eine Rolle in dem veränderten Wachstumsverhalten der Dreifachmutante in Anwesenheit von CAMPs spielt, sondern die PLDs möglicherweise ebenfalls einen Effekt auf die Zusammensetzung der

LOS haben. Die LOS aus *A. baumannii* besteht, anders als die Lipopolysaccharidschicht (LPS) in anderen Gram-negativen Bakterien, aus einem Membrananker (Lipid A), welcher die LOS mit der Membran verbindet und Zuckermolekülen, welche an das Lipid A gebunden sind („core sugars“). Die mit dem „core“ ligierten O-Antigen-Kohlenhydrate konnten bis heute in der LOS nicht detektiert werden und sind damit charakteristisch für die LPS (Coggins *et al.*, 2003; McClerren *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2013; Whitfield und Trent, 2014). Der Acetylierungszustand des mit der Membran verbundenen Lipid A ist spezifisch für die Wirkung von CAMPs und ist essenziell für die Ausbildung von Resistenzen (Needham und Trent, 2013; Whitfield und Trent, 2014). Unter Standardbedingungen bilden *E. coli* und andere Gram-negative Organismen hexa-acetyliertes Lipid A, was zu einem CAMP-sensitiven Phänotyp führt (Whitfield und Trent, 2014). Eine Stress-induzierte Phosphorylierungskaskade induziert die Expression von *pagP*, welches dann eine Acylkette (Palmitat) von dem Phospholipid PE auf das Lipid A überträgt und so hepta-acetyliertes Lipid A generiert (Abb. 58) (Guo *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 2000).

In *A. baumannii* konnte diese Stress-induzierte Lipid A-Modulierung nicht nachgewiesen werden. Vielmehr besitzt dieses Bakterium unter Standardbedingungen als dominante Lipid A-Form das hepta-acetylierte Lipid A. Dies resultiert daraus, dass anders als in *E. coli* das *A. baumannii* Lipid A-Syntheseenzym LpxM nicht eine, sondern zwei Lauroylgruppen auf das Glycolipid überträgt. Anschließend wird die letzte Acylkette über das Enzym LpxL übertragen, sodass sieben Acylketten an das Lipid A gebunden vorliegen (Abb. 58) und *A. baumannii*, durch die dominante hepta-acetylierte Lipid A-Form, eine stark verbesserte Resistenz gegenüber Polymyxin zeigt (Boll *et al.*, 2015). Die Reihenfolge der Acetylierung über LpxM und LpxL ist hierbei noch nicht geklärt. Bis heute konnte kein Acylkettendonator für diese Modulierung von Lipid A identifiziert werden. Da das in *A. baumannii* vorkommende MLCL ein äußerst ungewöhnliches Phospholipid in der Membran ist (Lopalco *et al.*, 2017), lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise CL als Donor dient. Der Befund in dieser Arbeit, dass die  $\Delta$ *pld123*-Mutante, die kein CL mehr produziert, keine veränderte Acetylierung des Glycolipids in der LOS aufwies, führte allerdings zu dem Schluss, dass CL nicht der Acylkettendonator bei der Lipid A-Modulierung ist.



**Abb. 58. Lipid A-Acetylierung in *A. baumannii* und *E. coli*.** In *A. baumannii* werden während der Modifizierung von Lipid A zwei Acylketten über das Enzym LpxM auf das Lipid A übertragen und eine Acylkette durch LpxL. Die Reihenfolge dieser Reaktion konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. In *E. coli* wird jeweils eine Acylkette erst durch LpxL und dann durch LpxM übertragen. Das hexa-acetylierte Lipid A ist in diesem Bakterium die überwiegend vorkommende Lipid A-Form. Stressinduziert, durch die Anwesenheit von Antibiotika beispielsweise kann eine zusätzliche Acylkette durch PagP auf das Lipid A übertragen werden. Die hepta-acetylierte Form des Lipid A fördert anschließend Antibiotikaresistenz z. B. gegenüber CAMPs.

#### 4.4. Der $\beta$ -Ketoacidweg spielt eine Rolle bei der Virulenz von *A. baumannii*

*A. baumannii* zeichnet sich dadurch aus, dass dieses Bakterium auch auf aromatischen Verbindungen wachsen kann. Die Aromaten werden über verschiedene Stoffwechselwege zu Succinyl-CoA, Acetyl-CoA, Acetoacetat oder Fumarat umgewandelt und anschließend in den TCA-Zyklus eingespeist. Die vier primären Stoffwechselwege sind der Phenylacetatweg, der Homogentisatweg, der Gentisatweg und der  $\beta$ -Ketoacidweg (Abb. 7, Abb. 8). Aber nicht nur für die Umsetzung von aromatischen Verbindungen zu Intermediaten des TCA-Zyklus sind diese Stoffwechselwege wichtig, auch bei der Pathogenese von verschiedenen bakteriellen Erregern spielen diese Abbauewege eine Rolle (Hunt *et al.*, 2004; Cardona *et al.*, 2005; Law *et al.*, 2008; Cerqueira und Peleg, 2011; Pribytkova *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2020; Maharjan *et al.*, 2021). Insbesondere konnten für den Phenylacetatweg und den  $\beta$ -Ketoacidweg bereits wichtige Rollen in der Virulenz humanpathogener Bakterien aufgeklärt werden, während dies für den Gentisat- und den Homogentisatweg bisher nicht beschrieben wurde. Jedoch konnten die Gene für den Homogentisatweg auch nicht vollständig im Genom von *A. baumannii* AYE identifiziert werden (Mungo, 2020) und für den Gentisatweg konnten keine Gene im Genom von *A. baumannii* gefunden werden und das Wachstum mit diesem Substrat nicht nachgewiesen werden (Jung *et al.*, 2011).

#### 4.4.1. Die Rolle der Stoffwechselwege von Aromaten in der Virulenz von *A. baumannii*

In *A. baumannii* wurde bisher nur die Rolle des Phenylacetatweges in der Virulenz beschrieben (Cerqueira und Peleg, 2011). Hierbei wurde ein globaler Regulator, GacS, der ebenfalls den Phenylacetatweg reguliert, in einem *C. albicans* und Maus-Septikämie-Modell untersucht. Dieser stellte sich als essenziell für die Virulenz von *A. baumannii* heraus. Eine Deletion des Regulators führte zu einem Ausbleiben der Expression der Gene des Phenylacetatweges und einem avirulenten Phänotyp. Die Deletionsmutante zeigte eine erhöhte Komplementresistenz und eine verminderte Kolonisierungsfähigkeit in der Leber und in der Milz der Maus. Die Transkriptomanalyse dieser  $\Delta gacS$ -Mutante zeigte, dass die Expression der Gene des Phenylacetatweges signifikant schwächer war. Weitere Untersuchungen in einer  $\Delta paaE$ -Deletionsmutante bestätigten, dass der beobachtete avirulente Phänotyp auf diesen Stoffwechselweg zurückzuführen ist. Nachdem Cerqueira und Kollegen spekulierten, dass die veränderte Pathogenität von der *A. baumannii*  $\Delta paaE$ -Mutante auf die Bildung von toxischen Epoxiden zurückzuführen ist, wie bereits von Law und Kollegen 2008 gezeigt, konnte 2015 ein Zusammenhang von Phenylacetat und der Immunantwort des Menschen hergestellt werden (Law *et al.*, 2008; Cerqueira *et al.*, 2014; Bhuiyan *et al.*, 2016). Hier konnte in einem Zebrafischmodell gezeigt werden, dass Phenylacetat als bakterieller Chemoattraktant wirkt und damit Neutrophile stimuliert. Neutrophile erkennen so direkt die Quelle der Infektion und damit den Erreger und können die Zelllyse einleiten und damit die Infektion eindämmen und bekämpfen (Bhuiyan *et al.*, 2016). Kürzlich konnte ein weiterer globaler Regulator identifiziert werden, welcher essenziell für die Virulenz von *A. baumannii* und dessen Stressadaptation ist und ebenfalls die Gene des Phenylacetatweges und zusätzlich des  $\beta$ -Ketoacidweges reguliert (Maharjan *et al.*, 2021). Die Deletion des Regulators DksA führte ebenfalls zu einem avirulenten Phänotyp, wobei die Mutante nicht mehr die Maus oder *G. mellonella* infizieren konnte. Zudem war die Komplementresistenz und die Antibiotikaresistenz in dieser Mutante signifikant reduziert. Transkriptomanalysen dieser Mutante zeigten, dass die Expression der Gene des Phenylacetatweges signifikant schwächer war. Außerdem konnte im Rahmen dieser Transkriptomanalyse gezeigt werden, dass die Expression des *pca*-Operons schwächer war, welches für die Enzyme des Protocatechuat-Zweiges des  $\beta$ -Ketoacidweges kodiert. Während in *A. baumannii* für den Phenylacetatweg bereits einige Erkenntnisse gewonnen wurden, ist über die Rolle des  $\beta$ -Ketoacidweges bei der Virulenz von diesem Erreger noch nichts bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Komplementresistenz in den Deletionsmutanten der Schlüsselenzyme des Protocatechuat- ( $\Delta pcaHG$ ) und des Catechol-Zweiges ( $\Delta catA$ ) signifikant beeinträchtigt war. Weiterhin führte die Zugabe von *p*-

Hydroxybenzoat oder Protocatechuat zu einer stark erhöhten Komplementresistenz des Wildtyps und zu einer noch weiter erhöhten Resistenz der  $\Delta pcaHG/catA$ -Doppelmutante, welche Protocatechuat intrazellulär akkumuliert, da der Abbau von Protocatechuat durch die Mutation unterbrochen wurde. Dies lässt darauf schließen, dass in *A. baumannii* Protocatechuat möglicherweise als Induktor von Virulenz-assoziierten Genen dient. Diese Hypothese wird weiterhin gestützt durch die Beobachtungen in der  $\Delta pobA$ -Mutante. Diese Deletionsmutante ist nicht mehr fähig, *p*-Hydroxybenzoat zu Protocatechuat umzusetzen und zeigte, wie erwartet, keinen Anstieg in der Komplementresistenz in Anwesenheit von *p*-Hydroxybenzoat. Die ausbleibende Akkumulation von intrazellulärem Protocatechuat im Wildtyp erklärt ebenfalls den geringeren Effekt von Protocatechuat auf die Komplementresistenz des Wildtyps im Vergleich zur Doppelmutante. Zusätzlich zu der möglichen Rolle von Protocatechuat bei der Induktion von Virulenz-assoziierten Genen in *A. baumannii* ist es möglich, dass das akkumulierte Protocatechuat in den Wirt segregiert wird und hier die Immunantwort direkt beeinflusst. Beide Hypothesen konnten bereits in anderen Organismen für weitere Stoffwechselprodukte von Aromaten bestätigt werden und werden im Folgenden diskutiert.

#### **4.4.1. Die Rolle von Stoffwechselwegen für Aromaten in der Virulenz verschiedener Pathogene**

In *B. cenocepacia*, ein opportunistisch pathogenes Bakterium in Mukoviszidose-Patienten und immunsupprimierten Menschen (Mahenthiralingam *et al.*, 2005; Valvano *et al.*, 2005), spielt beispielsweise der Phenylacetatweg eine entscheidende Rolle in der Virulenz (Hunt *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2008; Pribytkova *et al.*, 2014). Ähnlich wie bei *A. baumannii* zeichnet sich die Pathogenität dieses Bakteriums durch gute Persistenzstrategien unter verschiedenen Stressbedingungen aus (Maloney und Valvano, 2006; Flannagan *et al.*, 2007; Saldias *et al.*, 2008). Bei Analysen der essenziellen Gene für das Überleben unter *in vivo* Bedingungen, in einem intratrachealen Lungeninfektionsmodell in der Ratte, konnte eine Rolle des Phenylacetatweges bestätigt werden (Hunt *et al.*, 2004). Bei diesem Stoffwechselweg wird in *B. cenocepacia* Phenylacetat über vier Schritte zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA umgewandelt. Die Phenylacetyl-CoA-Ligase PaaK aktiviert in einem ersten Schritt das Phenylacetat und bildet Phenylacetyl-CoA, welches durch den Proteinkomplex PaaABCDE zu einem *cis*-Dihydrodiol-Derivat hydroxyliert wird. Anschließend wird der aromatische Ring durch PaaZ oder PaaZGJ zu 3-Hydroxyadipyl-CoA gespalten und zuletzt die entstehende aliphatische Verbindung über eine  $\beta$ -Oxidation durch PaaFH zu 3-Oxadipyl-CoA und dann

durch PaaJ zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA umgewandelt (Abb. 7) (Ferrandez *et al.*, 1998; Ismail *et al.*, 2003; Nogales *et al.*, 2007; Law *et al.*, 2008). Law und Kollegen konnten zeigen, dass die Mutation von verschiedenen Genen dieses Stoffwechselweges zu unterschiedlichen Phänotypen in der Virulenz von *B. cenocepacia* führte. So zeigten die *B. cenocepacia*  $\Delta paaA$ - und  $\Delta paaE$ -Insertionsmutanten eine signifikante Abnahme in der Fähigkeit, *Caenorhabditis elegans* zu infizieren und zu töten, während die *B. cenocepacia* Insertionsmutanten  $\Delta paaF$  und  $\Delta paaZ$  einen leichten Anstieg in der Virulenz zeigten (Law *et al.*, 2008). Der Phänotyp der *B. cenocepacia*  $\Delta paaE$ - und  $\Delta paaA$ -Mutante ist allerdings nicht auf eine verminderte Persistenz im Darm von *C. elegans* zurückzuführen, denn die Überlebensraten der Mutanten waren ähnlich zu denen des Wildtyps. Vielmehr war der Phänotyp durch die ausbleibenden regulatorischen Effekte im Wirt und im Erreger zu erklären. Die Akkumulation von Phenylacetat in *B. cenocepacia* verminderte die Expression der Gene CepI und CepR, ein Quorum-Sensing-System welches aktiv die Pathogenitätsantwort über das Signalmolekül N-Octanoyl-L-Homoserin (C8-HSL) reguliert. Zudem konnte festgestellt werden, dass der p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinaseweg (MAP-Kinase-Signalweg) in *C. elegans* für die verminderte Virulenz der *B. cenocepacia*  $\Delta paaA$ - und  $\Delta paaE$ -Deletionsmutanten verantwortlich ist (Lewenza *et al.*, 1999; Lewenza *et al.*, 2002; Law *et al.*, 2008; Uehlinger *et al.*, 2009; Subramoni und Sokol, 2012; Pribytkova *et al.*, 2014). Des Weiteren postulierten Law und Kollegen, dass die verstärkte Pathogenitätsantwort der *B. cenocepacia*  $\Delta paaF$ - und  $\Delta paaZ$ -Deletionsmutanten möglicherweise auf die Freisetzung von toxischen, hydrolysierten Phenylacetat-Zwischenprodukten zurückzuführen ist. Solche toxischen, bisher nicht identifizierten Zwischenprodukte wurden bereits im Überstand von anderen Phenylacetat-abbauenden Bakterien, wie z. B. *Azoarcus evansii* gefunden (M.S. *et al.*, 2002; Law *et al.*, 2008). Die Autoren postulierten, dass während der Umsetzung von Phenylacetyl-CoA zu den *cis*-Dihydrodiol-Derivat durch PaaABCDE toxische Epoxide entstehen, welche in der *B. cenocepacia*  $\Delta paaF$ - und  $\Delta paaZ$ -Mutante nicht weiter verstoffwechselt werden und in die Umgebung abgegeben werden. Diese freigesetzten Epoxide greifen dann den Wirt an und lösen die Immunantwort aus (Law *et al.*, 2008; Grishin *et al.*, 2011; Teufel *et al.*, 2011; Teufel *et al.*, 2012). Zwar ist der Effekt von Phenylacetat und den Derivaten dieser Verbindung auf eukaryotische Zellen wenig untersucht, jedoch sind einige Erkenntnisse bereits in der Literatur dokumentiert (Law *et al.*, 2008). Zum einen inhibiert Phenylacetat die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die Lipopolysaccharid-induzierte Expression von Cytokinen in primären Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen und zum anderen inhibiert Phenylacetat die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität des Modulators NF- $\kappa$ B, ein



wichtiger Modulator der Expression von Cytokinen und iNOS in Makrophagen (Pahan *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2007). Weiterhin ist Phenylacetat ein Ligand eines nukleären Hormonrezeptors PPAR $\gamma$  (Samid *et al.*, 2000). Eine Rolle der Epoxide im Wirt während einer *B. cenocepacia*-Infektion konnte allerdings noch nicht experimentell bewiesen werden (Law *et al.*, 2008; Pribytkova *et al.*, 2014).

Zusammenhänge des  $\beta$ -Ketoacidweges, insbesondere des Zweiges für den Abbau von *p*-Hydroxybenzoat, mit der Virulenz sind auch bereits aufgeklärt worden. So ist z. B. in *Xanthomonas campestris* der *p*-Hydroxybenzoat-Abbau essenziell für die Pathogenität dieses Pflanzenpathogens (He *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015a; Chen *et al.*, 2020). Während der Infektion von chinesischem Rettich zersetzt *X. campestris* die Zellwand des Wirtes, um Kohlenstoffquellen zu akquirieren und setzt dabei phenolische Verbindungen frei (Wang *et al.*, 2015a). Weiterhin werden phenolische Komponenten auch als Wirtsantwort auf den Erreger akkumuliert, um so phenolischen Stress zu induzieren (Chen *et al.*, 2020). Eine Deletion der Gene *pcaHG* oder *pobR* in *X. campestris* führte zu einer signifikanten Reduktion der Virulenz, da das Bakterium den phenolischen Stress nicht mehr kompensieren konnte. Erklärt wurde dies durch die fehlende Umsetzung von *p*-Hydroxybenzoat zu Protocatechuat über das Enzym PobA, dessen Produktion nicht mehr möglich war, da die Aktivierung der Genexpression durch PobR induziert wird. Weiterhin wurde der Abbau von Protocatechuat über den  $\beta$ -Ketoacidweg durch die Deletion des Gens für das Schlüsselenzym PcaHG unterbrochen. Die Akkumulation von *p*-Hydroxybenzoat führte dabei zu einer verminderten Zellzahl von *X. campestris* im chinesischen Rettich (He *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2020).

Und nicht nur *p*-Hydroxybenzoat als Substrat des  $\beta$ -Ketoacidweges hat einen Einfluss auf die Virulenz. So ist z. B. Anthranilat, welches zu Quinolon umgesetzt wird und anschließend in den Catechol-Zweig des  $\beta$ -Ketoacidweges eingespeist wird, essenziell für die Pathogenitätsantwort von z. B. *P. aeruginosa*. Anthranilat kann entweder über die Genprodukte des *antABC*-Operons zu Catechol prozessiert werden oder über den PqsABCDE-PhnAB-PqsH-Anabolismus zu dem Quorum-Sensing-Signal PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) umgesetzt werden (Rothmel *et al.*, 1990; Parsek *et al.*, 1992; Deziel *et al.*, 2004; Oglesby *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012). Die Regulation des Anthranilat-Metabolismus erfolgt in *P. aeruginosa* über MpaR. Eine Deletion des Regulators führt zu einer erhöhten Umsetzung von Anthranilat zu Catechol und damit zu einer verminderten Produktion des Signalmoleküls PQS (Wang *et al.*, 2020). Da in *Pseudomonas* eine Reihe von Virulenzfaktoren über Quorum-Sensing-Systeme reguliert werden (de Kievit und Iglewski, 2000; Fuqua *et al.*, 2001), führt demnach die Deletion dieses globalen Regulators zu einer geringeren Überlebensfähigkeit von *P. aeruginosa* im

Mausmodell. Außerdem führte die Deletion zu einer erhöhten Biofilmbildung und einer reduzierten Pyocyanin-Produktion, ein reaktiver Stoff, welcher im Wirt Sauerstoffstress induziert (Muller, 2002; Wang *et al.*, 2020). Da Catechol direkt die Immunantwort des Menschen fördert, ist die verminderte Virulenz in der *P. aeruginosa*  $\Delta$ mpaR-Mutante mit erhöhter Catechol-Produktion aus Anthranilat nicht verwunderlich (Lim do *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2018). Die verstärkte Biofilmbildung ist ebenfalls weitergehend untersucht worden und wurde erklärt durch die hemmende Wirkung von Anthranilat auf die sogenannte Pilzstruktur des Biofilms. Die gesteigerte Umsetzung von Anthranilat zu Catechol führt zu einer geringeren Konzentration an intrazellulärem Anthranilat und damit zu einer verbesserten Biofilmbildung (Kim *et al.*, 2015).

Ob möglicherweise Protocatechuat in *A. baumannii* wie Phenylacetat in *Burkholderia* (Pribytkova *et al.*, 2014) oder Anthranilat in *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 2020), Quorum-Sensing-Systeme induziert oder, ob die erhöhte Konzentration von Protocatechuat die Immunantwort des Menschen beeinflusst, bleibt weiter zu untersuchen. Jedoch indizieren die Ergebnisse in dieser Arbeit, dass der Abbau von Protocatechuat einen Einfluss auf die Komplementresistenz von *A. baumannii* hat und beschreiben damit den ersten Zusammenhang zwischen der Pathogenität von *A. baumannii* und Protocatechuat.

## 5. Zusammenfassung

- Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine markerlose Betain/Cholin/Carnitin-Transporter (BCCT)-Vierfachmutante ( $\Delta betT1/betT2/betU1/aci01347$ , im weiteren  $\Delta bcct$ ) des *A. baumannii*-Stammes ATCC 19606 generiert werden. Wachstumsversuche mit der  $\Delta bcct$ -Vierfachmutante zeigten, dass es in *A. baumannii* ATCC 19606 keine weiteren Transporter für die Aufnahme von Cholin gibt, jedoch weitere primär aktive oder sekundär aktive Transporter für die Aufnahme von Glycinbetain.
- In vorangegangenen Untersuchungen konnten die Verbindungen, welche von den unterschiedlichen Transportern in *A. baumannii* ATCC 19606 (Bet1 und BetT2: Cholin, BetU1: Glycinbetain) und *A. baumannii* AYE (BetU2 und BetU3: Glycinbetain) aufgenommen werden, identifiziert werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden die  $K_M$ -Werte der Transporter BetT1 (25,6  $\mu$ M), BetT2 (129,2  $\mu$ M), BetU1 (64,5  $\mu$ M), BetU2 (24,8  $\mu$ M) und BetU3 (237,2  $\mu$ M) bestimmt.
- *G. mellonella*-Infektionsstudien, Komplementresistenztests und Wachstumsstudien in menschlichem Urin, inaktivem Blutserum und Wundserum mit der  $\Delta bcct$ -Vierfachmutante führten zu dem Schluss, dass die BCCT keine Rolle bei der Virulenz von *A. baumannii* spielen.
- Durch Genomanalysen wurden die Gene, die für die Enzyme des Oxidationsweges von Cholin zu Glycinbetain kodieren (Cholin-Dehydrogenase (*betA*), Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase (*betB*) und ein potenzieller Regulator (*betI*) identifiziert. Die Gene sind in einem Gencluster organisiert. Für Analysen der Funktion bestimmter Gene dieses Genclusters wurde eine markerlose  $\Delta betA$ -Mutante und eine markerlose  $\Delta betI$ -Mutante generiert.
- Wachstumsstudien der  $\Delta betA$ -Mutante zeigten, dass Cholin unter Salzstress ausschließlich als Vorläufer für das kompatible Solut Glycinbetain fungiert und nicht als kompatibles Solut von *A. baumannii* ATCC 19606 genutzt werden kann.
- *G. mellonella*-Infektionsstudien, Komplementresistenztests und Wachstumsstudien in menschlichem Urin mit der  $\Delta betA$ - und der  $\Delta betI$ -Mutante führten zu dem Schluss, dass der Cholin-Oxidationsweg keine Rolle bei der Virulenz von *A. baumannii* spielt.
- Die Cholin-Dehydrogenase wurde in *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> (DE3) produziert und anschließend mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die

- biochemische Charakterisierung des Enzyms zeigte, dass BetA membranständig ist und die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 9,0 hat. Salze wie NaCl oder KCl hatten keinen Effekt auf die Aktivität des Enzyms, während Glutamat die Aktivität stimulierte. Die Zugabe von 25 mM steigerte die Aktivität um 85 %. Weiterhin konnte FAD als Cofaktor identifiziert werden und ein  $K_M$ -Wert von 10,3 mM ermittelt werden.
- Zudem konnte gezeigt werden, dass die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain unter isoosmotischen Bedingungen zu einem Anstieg der ATP-Konzentration in *A. baumannii*-Zellsuspensionen führt und damit, dass Cholin als alternative Energiequelle genutzt wird. Weiterhin konnte Phosphatidylcholin als natürliche Cholinquelle identifiziert werden. Eine Rolle der Phospholipasen D bei der Abspaltung der Cholin-Kopfgruppe des Phosphatidylcholins konnte ausgeschlossen werden.
  - Die Gene für die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain werden ausschließlich in Anwesenheit von Cholin exprimiert, jedoch unabhängig von der extrazellulären Salzkonzentration.
  - Transportstudien mit Carnitin führten zu dem Schluss, dass der BCCT Aci01347 neben Cholin ebenfalls Carnitin transportiert. Wachstumsversuche mit einer bereits erstellten  $\Delta aci01347$ -Mutante bestätigen, dass Aci01347 essenziell für die Aufnahme und anschließende Verwertung von Carnitin als Kohlenstoffquelle ist und zusammen mit den essenziellen Genen für den Carnitin-Abbau in einem Operon liegt.
  - Für die Analyse des Abbauweges von Carnitin wurden markerlose Deletionsmutanten des potenziellen Regulatorgens *carR* und des Gens der potenziellen Malat-Dehydrogenase *mdh* generiert. Wachstumsstudien mit diesen Mutanten zeigten, dass CarR als Regulator der Gene für den Abbau von Carnitin fungiert und dass Carnitin über D-Malat zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Carnitin wird hierbei über Trimethylamin und Malat-Semialdehyd zu D-Malat umgewandelt und anschließend über Pyruvat in den TCA-Zyklus eingespeist.
  - Der Regulator CarR wurde in *E. coli* BL21 STAR<sup>TM</sup> (DE3) produziert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit Hilfe von EMSA-Studien konnte die Bindestelle von CarR auf eine 634 Bp lange DNA-Sequenz stromaufwärts des Carnitin-Operons eingegrenzt werden und eine konstitutive Bindung des Regulators an diesen DNA-Abschnitt festgestellt werden.

- Durch Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass bei Wachstum mit Acetylcarnitin, Carnitin und D-Malat die Expression des Carnitin-Operons induziert wurde. Darüber hinaus wurde die Expression von Genen konservierter Aromatenabbauwege wie z. B. des Homogentisatweges, des Phenylacetatweges und des Protocatechuat-Abbaus, verstärkt exprimiert.
- In *G. mellonella*-Virulenzstudien konnte eine Rolle des Abbaus von Carnitin bei der Virulenz von *A. baumannii* nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte dieser Effekt dem entstehenden Trimethylamin zugesprochen werden.
- Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Phospholipasen D nicht essenziell für die Modulierung von Lipid A der Lipidoligosaccharidschicht von *A. baumannii* sind, jedoch eine Rolle in der Ausbildung von Resistenzen gegenüber kationischen, antimikrobiellen Peptiden spielen.
- *p*-Hydroxybenzoat, Benzoat, Quinat, Vanillinsäure, Coumarinsäure, Caffeat, Ferrulat, Indol-3-Acetat, Tryptophan, Anthranilsäure, Phenylalanin, Tyrosin, Kynurenin und Kynureninsäure wurden als Kohlenstoffquellen für *A. baumannii* AYE identifiziert.
- Komplementresistenztests zeigten, dass der Protocatechuat-Zweig des  $\beta$ -Ketoacidweges eine Rolle bei der Überdauerung von *A. baumannii* AYE in menschlichem Blutserum mit aktivem Komplementsystem spielt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Gene der Schlüsselenzyme des  $\beta$ -Ketoacidweges *PcaHG* und *CatA* die Resistenz gegenüber aromatischen Antibiotika erhöhte.

## 6. Anhang

Tab. 20. Analyse des Transkriptoms von *A. baumannii* ATCC 19606 gewachsen in MM mit Carnitin, Acetylcarnitin oder D-Malat als Kohlenstoffquelle im Vergleich zu Zellen gewachsen in MM mit Na-Succinat als Kohlenstoffquelle. Angegeben wurde die Änderung der Transkriptmenge als  $\log_2$ -Faktor. Dargestellt wurden die Gene, dessen Expression mindestens um einen  $\log_2$ -Faktor von 5 verstärkt war. Die Funktion ist die potenzielle, annotierte Funktion vorgegeben von NCBI. Die Gene des Carnitin-Operons wurden in blau hervorgehoben.

Lokus-Tag HMPREF0010_	Funktion	Carnitin [ $\log_2$ ]	Acetylcarnitin [ $\log_2$ ]	D-Malat [ $\log_2$ ]
02443	Aldehyd-aktivierendes Protein	3.08	5.51	4.58
02482	Acetyltransferase	5.22	4.21	5.17
02483	Acetyl-CoA-Hydrolase	1.42	6.28	2.77
02491	Sell-„repeat“ Protein	3.82	3.48	5.47
02582	Unbekannt	4.69	4.75	5.00
02695	Acyl-CoA-Thioesterase	5.12	4.58	4.38
02871	Putativer Transporter	6.37	0.66	0.68
02254	Pyruvat-Decarboxylase	6.23	2.07	3.54
00239	Aldehyd-Dehydrogenase	6.04	0.27	2.49
00393	Histidin-Kinase	4.54	7.29	6.76
00403	Zytochrom- BD-Oxidase Untereinheit II	1.67	4.67	2.84
00404	Zytochrom-BD-II-Oxidase Untereinheit I	2.44	5.84	3.79
00445	4-Carboxymuconolacton- Decarboxylase	3.91	3.95	5.23
00453	Transporterkomponente	6.10	6.44	5.74
00454	YeeE/YedE-Familie-Protein (Thiosulfat-Transporter)	6.58	6.96	6.82
00653	$\alpha$ -Ketoglutarat-Transporter	3.45	3.79	5.23
00673	2,3-Butandiol-Dehydrogenase	6.47	-0.60	2.75

Lokus-Tag HMPREF0010_	Funktion	Carnitin [log2]	Acetylcarnitin [log2]	D-Malat [log2]
00674	Diacetyl-Reduktase	6.70	-0.82	2.81
00675	Dihydroliipoamid-Dehydrogenase	7.15	-1.00	3.00
00676	Diaminohydroxyphosphoribosyl-aminopyrimidin-Deaminase	8.28	-0.11	4.13
00677	TPP-abhängige Acetoin-Dehydrogenase	7.44	-0.59	3.52
00678	ABC-Transporter Substratbindeprotein	6.80	-1.08	2.98
00679	Lipoyl-Synthase	5.34	-1.68	2.39
00680	Transkriptioneller Regulator	4.42	-0.37	2.35
00816	Unbekannt	5.12	4.42	3.93
00853	Unbekannt	5.48	-0.21	2.42
00910	MsrB (Peptid-Methionin (R)-S-Oxidoreduktase)	4.93	5.26	5.84
00963	LrgA (Murein-Hydrolase-Transporter)	7.45	1.51	1.80
01060	MFS Transporter-Permease	6.10	2.17	3.89
01061	Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase	5.44	0.85	1.81
01062	Carnitin-Dehydratase	5.49	0.29	1.65
01078	PaaC (3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase)	3.66	0.10	0.90
01079	Enoyl-CoA-Hydratase	3.96	-0.07	1.10
010780	Enoyl-CoA-Hydratase	3.81	-0.96	1.26
010781	PaaK (Phenylacetat-CoA-Oxygenase/Reduktase)	4.62	-0.84	1.62
010782	PaaJ (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	4.74	-0.15	2.01
010783	PaaI (Phenylacetat-Abbauprotein)	5.49	0.12	2.75
010784	PaaH (Phenylacetat-CoA-Oxygenase Untereinheit)	3.29	-1.70	1.03

Lokus-Tag HMPREF0010_	Funktion	Carnitin [log2]	Acetylcarnitin [log2]	D-Malat [log2]
010785	PaaG (Phenylacetat-CoA-Oxygenase Untereinheit)	5.64	-0.20	3.28
010786	PaaN (Enoyl-CoA-Hydratase)	5.94	0.07	3.48
01165	4-Hydroxybenzoat-Transporter	6.11	4.63	4.71
03579	Unbekannt	3.40	5.16	3.50
03634	Transkriptioneller Regulator (Cu-Export)	5.09	4.72	4.83
03149	GNAT-Familie N-Acetyltransferase	5.10	3.66	4.48
02994	MerC (Quecksilber Transporter)	7.96	6.64	7.53
02989	Cd(II)/Pb(II)-verantwortlicher transkriptioneller Regulator	5.62	4.82	5.14
01533	Esterase	-0.16	5.21	2.41
01396	Laktoylglutathion-Lyase	3.01	3.87	5.01
01388	SmpA/OmlA-Familie (bakterielles äußeres Membran- Lipoprotein)	5.73	4.49	4.47
01351	CntB (Carnitin-Reduktase)	4.86	5.04	5.25
01350	Malat-Semialdehyd- Dehydrogenase	5.47	5.50	5.85
01349	CntA (Carnitin-Monooxygenase)	6.08	6.17	6.50
01348	Acetylcarnitin-Hydrolase	5.34	5.39	6.26
01347	Aci01347 (Carnitin-Transporter)	6.47	6.54	7.46
01346	Malat-Dehydrogenase	8.49	8.25	8.87
01344	Phosphat-Porin	6.03	3.93	6.62
01719	Rhodanese	5.55	6.22	5.44
01819	Unbekannt	4.36	5.42	6.10
01899	Kation:Proton-Antiporter	4.31	4.92	5.13



Lokus-Tag HMPREF0010_	Funktion	Carnitin [log2]	Acetylcarnitin [log2]	D-Malat [log2]
03358	ABC-Transporter Substratbindeprotein	1.71	4.50	3.38
03359	Sulfonat ABC-Transporter Substratbindeprotein	1.82	4.83	4.64
03360	Alkansulfonat-Monooxygenase	1.37	4.09	3.98
03361	ABC-Transporter-Permease	2.13	4.22	4.57
03421	HmgA (Homogentisat-1,2- Dioxygenase)	6.52	5.05	4.61
03422	HmgC (Maleylacetoacetat- Isomerase)	5.39	3.89	3.06
03423	HmgB (Fumarylacetoacetase)	5.65	4.65	3.70
03424	Aminosäure-Transporter	6.00	4.94	4.10
03531	Unbekannt	4.91	4.52	4.49
03532	Hybrid Histidin- Kinase/Response-Regulator	2.73	3.53	2.18
03533	Unbekannt	1.33	6.33	3.40
03534	Kation:Acetat-Symporter	2.76	7.64	4.43
03535	Ionenkanal	1.81	1.64	2.73

## 7. Literaturverzeichnis

Al-Sweih, N.A., Al-Hubail, M.A., und Rotimi, V.O. (2011) Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother* 23: 13-16.

Altendorf, K. (1977) Purification of the DCCD-reactive protein of the energy-transducing adenosine triphosphatase complex from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 73: 271-275.

Altendorf, K., Booth, I.R., Gralla, J., Greie, J.C., Rosenthal, A.Z., und Wood, J.M. (2009) Osmotic Stress. *EcoSal Plus* 3.

Antunes, L.C., Imperi, F., Towner, K.J., und Visca, P. (2011) Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol* 162: 279-284.

Arakawa, T., und Timasheff, S.N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* 47: 411-414.

Arias-Barrau, E., Olivera, E.R., Luengo, J.M., Fernandez, C., Galan, B., Garcia, J.L., *et al.* (2004) The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 186: 5062-5077.

Aurich, H., und Kleber, H.P. (1970) Kinetics of active carnitine transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Biol Med Ger* 24: 559-568.

Baine, W.B. (1988) A phospholipase C from the Dallas 1E strain of *Legionella pneumophila* serogroup 5: purification and characterization of conditions for optimal activity with an artificial substrate. *J Gen Microbiol* 134: 489-498.

Bayer, A.S., Coulter, S.N., Stover, C.K., und Schwan, W.R. (1999) Impact of the high-affinity proline permease gene (*putP*) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Infect Immun* 67: 740-744.

Berk, R.S., Brown, D., Coutinho, I., und Meyers, D. (1987) *In vivo* studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 55: 1728-1730.

- Berka, R.M., Gray, G.L., und Vasil, M.L. (1981) Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 34: 1071-1074.
- Bernhard, W., Hoffmann, S., Dombrowsky, H., Rau, G.A., Kamlage, A., Kappler, M., *et al.* (2001) Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 725-731.
- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M., und Ghazi, A. (1992) Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur J Biochem* 206: 559-565.
- Berstad, A.E., Berstad, K., und Berstad, A. (2002) pH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 37: 738-742.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300.
- Bhuiyan, M.S., Ellett, F., Murray, G.L., Kostoulias, X., Cerqueira, G.M., Schulze, K.E., *et al.* (2016) *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *PNAS* 113: 9599-9604.
- Bieber, L.L., Emaus, R., Valkner, K., und Farrell, S. (1982) Possible functions of short-chain and medium-chain carnitine acyltransferases. *Fed Proc* 41: 2858-2862.
- Bishop, R.E., Gibbons, H.S., Guina, T., Trent, M.S., Miller, S.I., und Raetz, C.R. (2000) Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *EMBO J* 19: 5071-5080.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., und Bremer, E. (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* 178: 5121-5129.
- Boll, J.M., Tucker, A.T., Klein, D.R., Beltran, A.M., Brodbelt, J.S., Davies, B.W., und Trent, M.S. (2015) Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *MBio* 6: e00478-00415.
- Booth, I.R., und Higgins, C.F. (1990) Enteric bacteria and osmotic stress: intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? *FEMS Microbiol Rev* 6: 239-246.

- Booth, I.R., und Blount, P. (2012) The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves. *J Bacteriol* 194: 4802-4809.
- Booth, I.R. (2014) Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology. *Curr Opin Microbiol* 18: 16-22.
- Bouvet, P.J.M., und Grimont, P.A.D. (1986) Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Evol* 36: 228-240.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Breisch, J. (2017) Charakterisierung der Betain/Cholin/Carnitin-Transporter aus *Acinetobacter baumannii*. Masterarbeit, Goethe-Universität Frankfurt.
- Breisch, J., Waclawska, I., und Averhoff, B. (2018) Identification and characterization of a carnitine transporter in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiologyopen* 8: e00752.
- Breisch, J., und Averhoff, B. (2020) Identification of osmo-dependent and osmo-independent betaine-choline-carnitine transporters in *Acinetobacter baumannii*: role in osmoprotection and metabolic adaptation. *Environ Microbiol* 22: 2724-2735.
- Breisch, J., Bendel, M., und Averhoff, B. (2021) The choline dehydrogenase BetA of *Acinetobacter baumannii*: a flavo-protein responsible for osmotic stress protection. *Environ Microbiol* 24: 1052-1061.
- Breisch, J., Huber, L.S., Kraiczky, P., Hubloher, J., und Averhoff, B. (2022a) The  $\beta$ -keto adipate pathway of *Acinetobacter baumannii* is involved in complement resistance and affects resistance against aromatic antibiotics. *Environ Microbiol Rep* 14: 170-178.
- Breisch, J., Schumm, C., Poehlein, A., Daniel, R., und Averhoff, B. (2022b) The carnitine degradation pathway of *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence. *Environ Microbiol in press*.
- Bremer, E., und Krämer, R. (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes., *Bacterial stress responses*, ASM Press, Washington, DC, pp. 79-97.

Bremer, E., und Krämer, R. (2019) Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annu Rev Microbiol* 73: 313-334.

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.

Bundy, B.M., Campbell, A.L., und Neidle, E.L. (1998) Similarities between the *antABC*-encoded anthranilate dioxygenase and the *benABC*-encoded benzoate dioxygenase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Bacteriol* 180: 4466-4474.

Burg, M.B., und Ferraris, J.D. (2008) Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem* 283: 7309-7313.

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.

Canovas, J.L., und Stanier, R.Y. (1967) Regulation of the enzymes of the  $\beta$ -ketoacid pathway in *Moraxella calcoacetica*. 1. General aspects. *Eur J Biochem* 1: 289-300.

Capp, M.W., Pegram, L.M., Saecker, R.M., Kratz, M., Riccardi, D., Wendorff, T., *et al.* (2009) Interactions of the osmolyte glycine betaine with molecular surfaces in water: thermodynamics, structural interpretation, and prediction of *m*-values. *Biochemistry* 48: 10372-10379.

Cardona, S.T., Wopperer, J., Eberl, L., und Valvano, M.A. (2005) Diverse pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex strains in the *Caenorhabditis elegans* host model. *FEMS Microbiol Lett* 250: 97-104.

Catel-Ferreira, M., Marti, S., Guillon, L., Jara, L., Coadou, G., Molle, V., *et al.* (2016) The outer membrane porin OmpW of *Acinetobacter baumannii* is involved in iron uptake and colistin binding. *FEBS Lett* 590: 224-231.

Cerqueira, G.M., und Peleg, A.Y. (2011) Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB life* 63: 1055-1060.

Cerqueira, G.M., Kostoulias, X., Khoo, C., Aibinu, I., Qu, Y., Traven, A., und Peleg, A.Y. (2014) A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. *J Infect Dis* 210: 46-55.

- Chao, H., und Zhou, N.Y. (2013) GenR, an IclR-type regulator, activates and represses the transcription of *gen* genes involved in 3-hydroxybenzoate and gentisate catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 195: 1598-1609.
- Chen, B., Li, R.F., Zhou, L., Qiu, J.H., Song, K., Tang, J.L., und He, Y.W. (2020) The phytopathogen *Xanthomonas campestris* utilizes the divergently transcribed *pobA/pobR* locus for 4-hydroxybenzoic acid recognition and degradation to promote virulence. *Mol Microbiol* 114: 870-886.
- Chen, C., und Beattie, G.A. (2008) *Pseudomonas syringae* BetT is a low-affinity choline transporter that is responsible for superior osmoprotection by choline over glycine betaine. *J Bacteriol* 190: 2717-2725.
- Chen, C., Malek, A.A., Wargo, M.J., Hogan, D.A., und Beattie, G.A. (2010) The ATP-binding cassette transporter Cbc (choline/betaine/carnitine) recruits multiple substrate-binding proteins with strong specificity for distinct quaternary ammonium compounds. *Mol Microbiol* 75: 29-45.
- Choi, C.H., Hyun, S.H., Lee, J.Y., Lee, J.S., Lee, Y.S., Kim, S.A., *et al.* (2008) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol* 10: 309-319.
- Choi, H.S., Kim, J.H., Kim, S.L., Deng, H.Y., Lee, D., Kim, C.S., *et al.* (2018) Catechol derived from aronia juice through lactic acid bacteria fermentation inhibits breast cancer stem cell formation *via* modulation Stat3/IL-6 signaling pathway. *Mol Carcinog* 57: 1467-1479.
- Chowdhury, R., Sahu, G.K., und Das, J. (1996) Stress response in pathogenic bacteria. *J Biosci (Bangalore)* 21: 149-160.
- Coggins, B.E., Li, X., McClerren, A.L., Hindsgaul, O., Raetz, C.R., und Zhou, P. (2003) Structure of the LpxC deacetylase with a bound substrate-analog inhibitor. *Nat Struct Biol* 10: 645-651.
- Côtes, K., Bakala N'goma J, C., Dhouib, R., Douchet, I., Maurin, D., Carrière, F., und Canaan, S. (2008) Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 741-749.

Cox, C.D., Bavi, N., und Martinac, B. (2018) Bacterial mechanosensors. *Annu Rev Physiol* 80: 71-93.

Cronan, J.E. (2003) Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol* 57: 203-224.

Csonka, L., und Epstein, W. (1996) Osmoregulation, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ASM Press, Washington, DC, pp. 1210-1223.

Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* 53: 121-147.

Culham, D.E., Dalgado, C., Gyles, C.L., Mamelak, D., MacLellan, S., und Wood, J.M. (1998) Osmoregulatory transporter ProP influences colonization of the urinary tract by *Escherichia coli*. *Microbiology* 144 ( Pt 1): 91-102.

Culham, D.E., Lu, A., Jishage, M., Krogfelt, K.A., Ishihama, A., und Wood, J.M. (2001) The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology* 147: 1657-1670.

D'Souza-Ault, M.R., Smith, L.T., und Smith, G.M. (1993) Roles of *N*-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 59: 473-478.

de Kievit, T.R., und Iglewski, B.H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68: 4839-4849.

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., und Rahme, L.G. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *PNAS* 101: 1339-1344.

Diaz, E., Jimenez, J.I., und Nogales, J. (2013) Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr Opin Biotechnol* 24: 431-442.

Dijkshoorn, L., Nemec, A., und Seifert, H. (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5: 939-951.

- DiMarco, A.A., Averhoff, B.A., Kim, E.E., und Ornston, L.N. (1993) Evolutionary divergence of *pobA*, the structural gene encoding *p*-hydroxybenzoate hydroxylase in an *Acinetobacter calcoaceticus* strain well-suited for genetic analysis. *Gene* 125: 25-33.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., und Bakker, E.P. (1988) Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* 150: 348-357.
- Ditullio, D., Anderson, D., Chen, C.S., und Sih, C.J. (1994) L-carnitine *via* enzyme-catalyzed oxidative kinetic resolution. *Bioorg Med Chem* 2: 415-420.
- Djahanschiri, B., Di Venanzio, G., Distel, J.S., Breisch, J., Dieckmann, M.A., Goesmann, A., *et al.* (2022) Evolutionarily stable gene clusters shed light on the common grounds of pathogenicity in the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. *PLoS genetics* *in press*.
- Domenech, C.E., Garrido, M.N., Machado de Domenech, E.E., und Lisa, T.A. (1981) Acetylcholinesterase from rat red cells and cholinesterase of *Pseudomonas aeruginosa*: different types of inhibition by atropine. *Mol Cell Biochem* 34: 95-99.
- Domenech, C.E., Garrido, M.N., und Lisa, T.A. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* cholinesterase and phosphorylcholine phosphatase: two enzymes contributing to corneal infection. *FEMS Microbiol Lett* 66: 131-135.
- Eby, D.M., Beharry, Z.M., Coulter, E.D., Kurtz, D.M., Jr., und Neidle, E.L. (2001) Characterization and evolution of anthranilate 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Bacteriol* 183: 109-118.
- Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H.P., und Mandrand-Berthelot, M.A. (1994) Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 13: 775-786.
- Elsemore, D.A., und Ornston, L.N. (1994) The *pca-pob* supraoperonic cluster of *Acinetobacter calcoaceticus* contains *quiA*, the structural gene for quinate-shikimate dehydrogenase. *J Bacteriol* 176: 7659-7666.
- Elsemore, D.A., und Ornston, L.N. (1995) Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Bacteriol* 177: 5971-5978.



- Empadinhas, N., und da Costa, M.S. (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol* 11: 151-161.
- Engel, A.G., und Rebouche, C.J. (1984) Carnitine metabolism and inborn errors. *J Inherit Metab Dis* 7 Suppl 1: 38-43.
- Epstein, W., und Kim, B.S. (1971) Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 108: 639-644.
- Epstein, W. (2003) The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 75: 293-320.
- Erb, T.J., Ismail, W., und Fuchs, G. (2008) Phenylacetate metabolism in thermophiles: characterization of phenylacetate-CoA ligase, the initial enzyme of the hybrid pathway in *Thermus thermophilus*. *Curr Microbiol* 57: 27-32.
- Ferrandez, A., Minambres, B., Garcia, B., Olivera, E.R., Luengo, J.M., Garcia, J.L., und Diaz, E. (1998) Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J Biol Chem* 273: 25974-25986.
- Fiester, S.E., und Actis, L.A. (2013) Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol* 8: 353-365.
- Fiester, S.E., Arivett, B.A., Schmidt, R.E., Beckett, A.C., Ticak, T., Carrier, M.V., *et al.* (2016) Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 11: e0167068.
- Fillingame, R.H. (1997) Coupling H<sup>+</sup> transport and ATP synthesis in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J Exp Biol* 200: 217-224.
- Fitzpatrick, P.F. (2003) Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* 42: 14083-14091.
- Fitzsimmons, L.F., Hampel, K.J., und Wargo, M.J. (2012) Cellular choline and glycine betaine pools impact osmoprotection and phospholipase C production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 194: 4718-4726.

- Flannagan, R.S., Aubert, D., Kooi, C., Sokol, P.A., und Valvano, M.A. (2007) *Burkholderia cenocepacia* requires a periplasmic HtrA protease for growth under thermal and osmotic stress and for survival *in vivo*. *Infect Immun* 75: 1679-1689.
- Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Stevanovic, S., Cianciotto, N.P., und Neumeister, B. (2001) Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 183: 2121-2124.
- Fritz, I.B., und Arrigoni-Martelli, E. (1993) Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system: interactions with membranes. *Trends Pharmacol Sci* 14: 355-360.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., und Greenberg, E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35: 439-468.
- Gadda, G. (2003) pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1650: 4-9.
- Gadda, G., und McAllister-Wilkins, E.E. (2003) Cloning, expression, and purification of choline dehydrogenase from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2126-2132.
- Gadda, G. (2020) Choline oxidases. *Enzymes* 47: 137-166.
- Galinski, E.A., und Trüper, H.G. (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15: 95-108.
- Garrido, M.N., Lisa, T.A., Albelo, S., Lucchesi, G.I., und Domenech, C.E. (1990) Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase as a phosphorylcholine phosphatase activity. *Mol Cell Biochem* 94: 89-95.
- Gebhardt, M.J., Gallagher, L.A., Jacobson, R.K., Usacheva, E.A., Peterson, L.R., Zurawski, D.V., und Shuman, H.A. (2015) Joint transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. *mBio* 6: e01660-01615.
- Gerischer, U., Segura, A., und Ornston, L.N. (1998) PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. *J Bacteriol* 180: 1512-1524.
- Gerner-Smidt, P. (1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 30: 2680-2685.

Giæver, H.M., Styrvold, O.B., Kaasen, I., und Strøm, A.R. (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170: 2841-2849.

Giammanco, A., Calà, C., Fasciana, T., und Dowzicky, M.J. (2017) Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *mSphere* 2: e00310-00316.

Gibson, D.T., und Parales, R.E. (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11: 236-243.

Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J., und Goebel, W. (1989) A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *J Bacteriol* 171: 744-753.

Godeux, A.S., Svedholm, E., Lupo, A., Haenni, M., Venner, S., Laaberki, M.H., und Charpentier, X. (2020) Scarless removal of large resistance island AbaR results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 64: e00951-00920.

Gogou, V., Pournaras, S., Giannouli, M., Voulgari, E., Piperaki, E.T., Zarrilli, R., und Tsakris, A. (2011) Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J Antimicrob Chemother* 66: 2767-2772.

Gowrishankar, J., und Manna, D. (1996) How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. *Genetica* 97: 363-378.

Gralla, J.D., und Vargas, D.R. (2006) Potassium glutamate as a transcriptional inhibitor during bacterial osmoregulation. *EMBO J* 25: 1515-1521.

Grishin, A.M., Ajamian, E., Tao, L., Zhang, L., Menard, R., und Cygler, M. (2011) Structural and functional studies of the *Escherichia coli* phenylacetyl-CoA monooxygenase complex. *J Biol Chem* 286: 10735-10743.

Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., und Oren, A. (2018) Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev* 42: 353-375.

Guo, L., Lim, K.B., Poduje, C.M., Daniel, M., Gunn, J.S., Hackett, M., und Miller, S.I. (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95: 189-198.

Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E., und Bremer, E. (1995) The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 246: 783-786.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

Harding, C.M., Hennon, S.W., und Feldman, M.F. (2018) Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 16: 91-102.

Harwood, C.S., und Parales, R.E. (1996) The  $\beta$ -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* 50: 553-590.

He, Y.W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y.J., Wen, C.M., Wang, L.H., *et al.* (2006) Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol* 59: 610-622.

Hoffmann, T., und Bremer, E. (2017) Guardians in a stressful world: the Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*. *Biol Chem* 398: 193-214.

Holbrook, P.G., Pannell, L.K., und Daly, J.W. (1991) Phospholipase D-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine occurs with P-O bond cleavage. *Biochim Biophys Acta* 1084: 155-158.

Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., und Sleator, R.D. (2012) *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3: 243-250.

Hryniewicz, M.M., und Kredich, N.M. (1994) Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJIIH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176: 3673-3682.

Huang, W., Wang, S., Yao, Y., Xia, Y., Yang, X., Long, Q., *et al.* (2015) OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine* 33: 4479-4485.

- Huber, L.S. (2020) Analysen der Aromaten-Stoffwechselwege in *Acinetobacter baumannii* AYE. Masterarbeit, Goethe-Universität Frankfurt.
- Hubloher, J.J., Zeidler, S., Lamosa, P., Santos, H., Averhoff, B., und Müller, V. (2020) Trehalose-6-phosphate-mediated phenotypic change in *Acinetobacter baumannii*. *Environ Microbiol* 22: 5156-5166.
- Hunt, T.A., Kooi, C., Sokol, P.A., und Valvano, M.A. (2004) Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival *in vivo*. *Infect Immun* 72: 4010-4022.
- Ignatova, Z., und Gierasch, L.M. (2006) Inhibition of protein aggregation *in vitro* and *in vivo* by a natural osmoprotectant. *PNAS* 103: 13357-13361.
- Ikuta, S., Imamura, S., Misaki, H., und Horiuti, Y. (1977) Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J Biochem* 82: 1741-1749.
- Ismail, W., El-Said Mohamed, M., Wanner, B.L., Datsenko, K.A., Eisenreich, W., Rohdich, F., *et al.* (2003) Functional genomics by NMR spectroscopy. Phenylacetate catabolism in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 270: 3047-3054.
- Jawad, A., Heritage, J., Snelling, A.M., Gascoyne-Binzi, D.M., und Hawkey, P.M. (1996) Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 34: 2881-2887.
- Johansen, K.A., Gill, R.E., und Vasil, M.L. (1996) Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in *mycobacteria*. *Infect Immun* 64: 3259-3266.
- Jones, R.M., Collier, L.S., Neidle, E.L., und Williams, P.A. (1999) *areABC* genes determine the catabolism of aryl esters in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Bacteriol* 181: 4568-4575.
- Jones, R.M., Pagmantidis, V., und Williams, P.A. (2000) *sal* genes determining the catabolism of salicylate esters are part of a supraoperonic cluster of catabolic genes in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Bacteriol* 182: 2018-2025.
- Jung, H., Jung, K., und Kleber, H.P. (1990a) L-carnitine uptake by *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* 30: 507-514.
- Jung, H., Jung, K., und Kleber, H.P. (1990b) L-carnitine metabolization and osmotic stress response in *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* 30: 409-413.

- Jung, H., Buchholz, M., Clausen, J., Nietschke, M., Revermann, A., Schmid, R., und Jung, K. (2002) CaiT of *Escherichia coli*, a new transporter catalyzing L-carnitine/ $\gamma$ -butyrobetaine exchange. *J Biol Chem* 277: 39251-39258.
- Jung, J., Madsen, E.L., Jeon, C.O., und Park, W. (2011) Comparative genomic analysis of *Acinetobacter oleivorans* DR1 to determine strain-specific genomic regions and gentisate biodegradation. *Appl Environ Microbiol* 77: 7418-7424.
- Karlsson, A., Beharry, Z.M., Matthew Eby, D., Coulter, E.D., Neidle, E.L., Kurtz, D.M., Jr., *et al.* (2002) X-ray crystal structure of benzoate 1,2-dioxygenase reductase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Mol Biol* 318: 261-272.
- Kempf, B., und Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 170: 319-330.
- Khafizov, K., Perez, C., Koshy, C., Quick, M., Fendler, K., Ziegler, C., und Forrest, L.R. (2012) Investigation of the sodium-binding sites in the sodium-coupled betaine transporter BetP. *PNAS* 109: E3035-3044.
- Kiewietdejonge, A., Pitts, M., Cabuhat, L., Sherman, C., Kladwang, W., Miramontes, G., *et al.* (2006) Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6: 205-217.
- Kim, S.K., Im, S.J., Yeom, D.H., und Lee, J.H. (2012) AntR-mediated bidirectional activation of *antA* and *antR*, anthranilate degradative genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 505: 146-152.
- Kim, S.K., Park, H.Y., und Lee, J.H. (2015) Anthranilate deteriorates the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and antagonizes the biofilm-enhancing indole effect. *Appl Environ Microbiol* 81: 2328-2338.
- Kleber, H.P., Schöpp, W., Sorger, H., Tauchert, H., und Aurich, H. (1967) Formation of 3-dehydrocarnitine from L-carnitine through the action of a *Pseudomonas aeruginosa* enzyme. *Acta Biol Med Ger* 19: 659-667.

- Kleber, H.P., Seim, H., Aurich, H., und Strack, E. (1977) Verwertung von Trimethylammoniumverbindungen durch *Acinetobacter calcoaceticus*. Arch Microbiol 112: 201-206.
- Kleber, H.P. (1991) Metabolism of trimethylammonium compounds by *Acinetobacter*, The biology of *Acinetobacter*, FEMS Symposium, Springer, Boston, MA, pp. 403-410.
- Kleber, H.P. (1997) Bacterial carnitine metabolism. FEMS Microbiol Lett 147: 1-9.
- Klepochova, R., Valkovic, L., Gajdosik, M., Hochwartner, T., Tschan, H., Krebs, M., et al. (2017) Detection and alterations of acetylcarnitine in human skeletal muscles by <sup>1</sup>H MRS at 7 T. Invest Radiol 52: 412-418.
- Koeth, R.A., Wang, Z., Levison, B.S., Buffa, J.A., Org, E., Sheehy, B.T., et al. (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nat Med 19: 576-585.
- König, P., Averhoff, B., und Müller, V. (2020) A first response to osmotic stress in *Acinetobacter baumannii*: transient accumulation of K<sup>+</sup> and its replacement by compatible solutes. Environ Microbiol Rep 12: 419-423.
- König, P., Averhoff, B., und Müller, V. (2021) K<sup>+</sup> and its role in virulence of *Acinetobacter baumannii*. Int J Med Microbiol 311: 151516.
- Krämer, R. (2009) Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum*. Amino Acids 37: 487-497.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lamarche, M.G., Wanner, B.L., Crepin, S., und Harel, J. (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. FEMS Microbiol Rev 32: 461-473.
- Landfald, B., und Strøm, A.R. (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 165: 849-855.
- Law, R.J., Hamlin, J.N., Sivro, A., McCorrister, S.J., Cardama, G.A., und Cardona, S.T. (2008) A functional phenylacetic acid catabolic pathway is required for full pathogenicity of

*Burkholderia cenocepacia* in the *Caenorhabditis elegans* host model. J Bacteriol 190: 7209-7218.

Leahy, J.G., Batchelor, P.J., und Morcomb, S.M. (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases. FEMS Microbiol Rev 27: 449-479.

Lee, H.J., Kim, J.M., Lee, S.H., Park, M., Lee, K., Madsen, E.L., und Jeon, C.O. (2011) Gentisate 1,2-dioxygenase, in the third naphthalene catabolic gene cluster of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, has a role in naphthalene degradation. Microbiology 157: 2891-2903.

Lee, S.J., und Gralla, J.D. (2004) Osmo-regulation of bacterial transcription *via* poised RNA polymerase. Mol Cell 14: 153-162.

Leslie, D., Fairweather, N., Pickard, D., Dougan, G., und Kehoe, M. (1989) Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with a *Bacillus cereus* phospholipase C. Mol Microbiol 3: 383-392.

Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., und Booth, I.R. (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. EMBO J 18: 1730-1737.

Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P., und Sokol, P.A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J Bacteriol 181: 748-756.

Lewenza, S., Visser, M.B., und Sokol, P.A. (2002) Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol 48: 707-716.

Lim do, Y., Shin, S.H., Lee, M.H., Malakhova, M., Kurinov, I., Wu, Q., *et al.* (2016) A natural small molecule, catechol, induces c-Myc degradation by directly targeting ERK2 in lung cancer. Oncotarget 7: 35001-35014.

Lindstedt, G., Lindstedt, S., Midtvedt, T., und Tofft, M. (1967) The formation and degradation of carnitine in *Pseudomonas*. Biochemistry 6: 1262-1270.

Lisa, T.A., Garrido, M.N., und Domenech, C.E. (1983) Induction of acid phosphatase and cholinesterase activities in *Ps. aeruginosa* and their *in-vitro* control by choline, acetylcholine and betaine. Mol Cell Biochem 50: 149-155.



Lisa, T.A., Garrido, M.N., und Domenech, C.E. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase and cholinesterase induced by choline and its metabolic derivatives may contain a similar anionic peripheral site. *Mol Cell Biochem* 63: 113-118.

Lisa, T.A., Casale, C.H., und Domenech, C.E. (1994a) Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr Microbiol* 28: 71-76.

Lisa, T.A., Lucchesi, G.I., und Domenech, C.E. (1994b) Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to the choline metabolism through the action of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C. *Curr Microbiol* 29: 193-199.

Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., und Tang, X. (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* 345 Pt 3: 401-415.

Liu, D., Liu, Z.S., Hu, P., Cai, L., Fu, B.Q., Li, Y.S., *et al.* (2016) Characterization of surface antigen protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. *Vet Microbiol* 186: 126-138.

Liu, P.V. (1974) Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 130 (Issue Supplement): S94-S99.

Llaca-Díaz, J.M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., und Garza-González, E. (2012) One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy* 58: 475-481.

Lob, S.H., Hoban, D.J., Sahm, D.F., und Badal, R.E. (2016) Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 47: 317-323.

Lopalco, P., Stahl, J., Annese, C., Averhoff, B., und Corcelli, A. (2017) Identification of unique cardiolipin and monolysocardiolipin species in *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* 7: 2972.

López-Martín, M., Dubern, J.F., Alexander, M.R., und Williams, P. (2021) AbaM regulates quorum sensing, biofilm formation, and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 203: e00635-00620.

Love, M.I., Huber, W., und Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550.

Lowman, W., Kalk, T., Menezes, C.N., John, M.A., und Grobusch, M.P. (2008) A case of community-acquired *Acinetobacter baumannii* meningitis - has the threat moved beyond the hospital? *J Med Microbiol* 57: 676-678.

Lucchesi, G.I., Lisa, T.A., und Domenech, C.E. (1989) Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Microbiol Lett* 57: 335-338.

Lucchesi, G.I., und Domenech, C.E. (1994) A simple and reliable method for the purification of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C produced in a high phosphate medium containing choline. *Int J Biochem* 26: 155-162.

Lucchesi, G.I., Lisa, T.A., Casale, C.H., und Domenech, C.E. (1995) Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* 30: 55-60.

Lucchini, A.E., Lisa, T.A., und Domenech, C.E. (1990) Choline derivatives increase two different acid phosphatases in *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* 153: 596-599.

Lucidi, M., Runci, F., Rampioni, G., Frangipani, E., Leoni, L., und Visca, P. (2018) New shuttle vectors for gene cloning and expression in multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 62: e02480-02417.

Luengo, J.M., Garcia, J.L., und Olivera, E.R. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol Microbiol* 39: 1434-1442.

Lycklama, A.N.J.A., Vietrov, R., Schuurman-Wolters, G.K., und Poolman, B. (2018) Energy coupling efficiency in the type I ABC transporter GlnPQ. *J Mol Biol* 430: 853-866.

M.S., M., Ismail, W., Heider, J., und Fuchs, G. (2002) Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus evansii*. *Arch Microbiol* 178: 180-192.

MacMillan, S.V., Alexander, D.A., Culham, D.E., Kunte, H.J., Marshall, E.V., Rochon, D., und Wood, J.M. (1999) The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1420: 30-44.

Maddocks, S.E., und Oyston, P.C.F. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154: 3609-3623.

Maharjan, R., Sullivan, G., Adams, F., Delgado, N., Semenec, L., Dinh, H., *et al.* (2021) DksA is a central regulatory switch for stress protection and virulence in *Acinetobacter baumannii*. Research Square.

Mahenthiralingam, E., Urban, T.A., und Goldberg, J.B. (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3: 144-156.

Maloney, K.E., und Valvano, M.A. (2006) The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infect Immun* 74: 5477-5486.

Martínez-Luque, M., Castillo, F., und Blasco, R. (2001) Assimilation of D-malate by *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Curr Microbiol* 43: 154-157.

Massmig, M., Reijerse, E., Krausze, J., Laurich, C., Lubitz, W., Jahn, D., und Moser, J. (2020) Carnitine metabolism in the human gut: characterization of the two-component carnitine monooxygenase CntAB from *Acinetobacter baumannii*. *J Biol Chem* 295: 13065-13078.

McClerren, A.L., Endsley, S., Bowman, J.L., Andersen, N.H., Guan, Z., Rudolph, J., und Raetz, C.R. (2005) A slow, tight-binding inhibitor of the zinc-dependent deacetylase LpxC of lipid A biosynthesis with antibiotic activity comparable to ciprofloxacin. *Biochemistry* 44: 16574-16583.

McConnell, M.J., Actis, L., und Pachón, J. (2013) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37: 130-155.

McDermott, M., Wakelam, M.J., und Morris, A.J. (2004) Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* 82: 225-253.

McEnery, M.W., und Pedersen, P.L. (1986) Diethylstilbestrol. A novel F<sub>0</sub>-directed probe of the mitochondrial proton ATPase. *J Biol Chem* 261: 1745-1752.

McMahon, M.A., Xu, J., Moore, J.E., Blair, I.S., und McDowell, D.A. (2007) Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Appl Environ Microbiol* 73: 211-217.

- McNamara, P.J., Cuevas, W.A., und Songer, J.G. (1995) Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* 156: 113-118.
- Meadows, J.A., und Wargo, M.J. (2015) Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology* 161: 1161-1174.
- Measures, J.C. (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* 257: 398-400.
- Melse-Boonstra, A., Holm, P.I., Ueland, P.M., Olthof, M., Clarke, R., und Verhoef, P. (2005) Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. *Am J Clin Nutr* 81: 1378-1382.
- Meumann, E.M., Anstey, N.M., Currie, B.J., Piera, K.A., Kenyon, J.J., Hall, R.M., *et al.* (2019) Genomic epidemiology of severe community-onset *Acinetobacter baumannii* infection. *Microb Genom* 5: e000258.
- Meyers, D.J., Palmer, K.C., Bale, L.A., Kernacki, K., Preston, M., Brown, T., und Berk, R.S. (1992) *In vivo* and *in vitro* toxicity of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicol* 30: 161-169.
- Miao, J., Ling, A.V., Manthena, P.V., Gearing, M.E., Graham, M.J., Crooke, R.M., *et al.* (2015) Flavin-containing monooxygenase 3 as a potential player in diabetes-associated atherosclerosis. *Nat Commun* 6: 6498.
- Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M.A., Dix, I., Sola, M., und Uson, I. (2010) Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol Microbiol* 75: 1199-1214.
- Montefour, K., Frieden, J., Hurst, S., Helmich, C., Headley, D., Martin, M., und Boyle, D.A. (2008) *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse* 28: 15-25; quiz 26.
- Morawski, B., Segura, A., und Ornston, L.N. (2000) Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase. *J Bacteriol* 182: 1383-1389.
- Morris, F.C., Dexter, C., Kostoulias, X., Uddin, M.I., und Peleg, A.Y. (2019) The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 10: 1601.

Muller, M. (2002) Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med* 33: 1527-1533.

Mungo, E. (2020) Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zur Aufklärung des Phenylalanin- und Tyrosinkatabolismus in *Acinetobacter baumannii*. Masterarbeit, Goethe-Universität Frankfurt.

Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K., und Senda, T. (2003a) Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* 328: 555-566.

Muraoka, S., Okumura, R., Uragami, Y., Nonaka, T., Ogawa, N., Miyashita, K., und Senda, T. (2003b) Purification and crystallization of a LysR-type transcriptional regulator CBNR from *Ralstonia eutropha* NH9. *Protein Pept Lett* 10: 325-329.

Nagasawa, T., Mori, N., Tani, Y., und Ogata, K. (1976) Characterization of choline dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric Biol Chem* 40: 2077-2084.

Naiemi, N.A., Duim, B., Savelkoul, P.H., Spanjaard, L., de Jonge, E., Bart, A., *et al.* (2005) Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol* 43: 4862-4864.

Navarro-Llorens, J.M., Patrauchan, M.A., Stewart, G.R., Davies, J.E., Eltis, L.D., und Mohn, W.W. (2005) Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J Bacteriol* 187: 4497-4504.

Needham, B.D., und Trent, M.S. (2013) Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 11: 467-481.

Neidle, E., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., Rekik, M., und Harayama, S. (1992) *Cis*-diol dehydrogenases encoded by the TOL pWW0 plasmid *xyll* gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the short-chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Eur J Biochem* 204: 113-120.

Neidle, E.L., Shapiro, M.K., und Ornston, L.N. (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J Bacteriol* 169: 5496-5503.

- Neidle, E.L., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., Rejik, M., und Harayama, S. (1991) Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. *J Bacteriol* 173: 5385-5395.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., *et al.* (2011) Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Microbiol Res* 162: 393-404.
- Nilius, M., und Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori* enzymes. *Aliment Pharmacol Ther* 10 65-71.
- Nogales, J., Macchi, R., Franchi, F., Barzaghi, D., Fernández, C., García, J.L., *et al.* (2007) Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway. *Microbiology* 153: 357-365.
- Oglesby, A.G., Farrow, J.M., 3rd, Lee, J.H., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C., und Vasil, M.L. (2008) The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem* 283: 15558-15567.
- Ohta-Fukuyama, M., Miyake, Y., Emi, S., und Yamano, T. (1980) Identification and properties of the prosthetic group of choline oxidase from *Alcaligenes sp.* *J Biochem* 88: 197-203.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334-348.
- Oren, A. (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst* 4: 2.
- Oren, A. (2013) Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol* 4: 315.
- Ornston, L.N., und Stanier, R.Y. (1966) The conversion of catechol and protocatechuate to  $\beta$ -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* 241: 3776-3786.
- Pahan, K., Sheikh, F.G., Namboodiri, A.M., und Singh, I. (1997) Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 100: 2671-2679.

- Park, E.K., Rhee, H.I., Jung, H.S., Ju, S.M., Lee, Y.A., Lee, S.H., *et al.* (2007) Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. *Phytother Res* 21: 746-750.
- Park, S., Smith, L.T., und Smith, G.M. (1995) Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Appl Environ Microbiol* 61: 4378-4381.
- Parke, D., und Ornston, L.N. (1986) Enzymes of the  $\beta$ -ketoacid pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *J Bacteriol* 165: 288-292.
- Parke, D., und Ornston, L.N. (2003) Hydroxycinnamate (*hca*) catabolic genes from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are repressed by HcaR and are induced by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioesters. *Appl Environ Microbiol* 69: 5398-5409.
- Parke, D., und Ornston, L.N. (2004) Toxicity caused by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioester accumulation in mutants of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl Environ Microbiol* 70: 2974-2983.
- Parsek, M.R., Shinabarger, D.L., Rothmel, R.K., und Chakrabarty, A.M. (1992) Roles of CatR and *cis,cis*-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 174: 7798-7806.
- Parsek, M.R., Ye, R.W., Pun, P., und Chakrabarty, A.M. (1994) Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. *J Biol Chem* 269: 11279-11284.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., und Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 14: 417-419.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., und Paterson, D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538-582.
- Peleg, A.Y., de Breij, A., Adams, M.D., Cerqueira, G.M., Mocali, S., Galardini, M., *et al.* (2012) The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One* 7: e46984.

Perez-Pantoja, D., Donoso, R., Agullo, L., Cordova, M., Seeger, M., Pieper, D.H., und Gonzalez, B. (2012) Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environ Microbiol* 14: 1091-1117.

Pérez-Pantoja, D., González, B., und Pieper, D.H. (2010) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 799-837.

Pessione, E., und Giunta, C. (1997) *Acinetobacter radioresistens* metabolizing aromatic compounds. 2. Biochemical and microbiological characterization of the strain. *Microbios* 89: 105-117.

Pfefferle, K., Lopalco, P., Breisch, J., Siemund, A., Corcelli, A., und Averhoff, B. (2020) *In vivo* synthesis of monolysocardiolipin and cardiolipin by *Acinetobacter baumannii* phospholipase D and effect on cationic antimicrobial peptide resistance. *Environ Microbiol* 22: 5300-5308.

Pieper, D.H., González, B., Cámara, B., Pérez-Pantoja, D., und Reineke, W. (2010) Aerobic degradation of chloroaromatics, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 839-864.

Poh, C.L., und Bayly, R.C. (1980) Evidence for isofunctional enzymes used in *m*-cresol and 2,5-xyleneol degradation *via* the gentisate pathway in *Pseudomonas alcaligenes*. *J Bacteriol* 143: 59-69.

Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C., und Nordmann, P. (2003) Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a french hospital. *J Clin Microbiol* 41: 3542-3547.

Pribytkova, T., Lightly, T.J., Kumar, B., Bernier, S.P., Sorensen, J.L., Surette, M.G., und Cardona, S.T. (2014) The attenuated virulence of a *Burkholderia cenocepacia* *paaABCDE* mutant is due to inhibition of quorum sensing by release of phenylacetic acid. *Mol Microbiol* 94: 522-536.

R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing.



- Rajan, L.A., Joseph, T., Thampuran, N., and James, R. (2010) Functional characterization and sequence analysis of choline dehydrogenase from *Escherichia coli*. J Genet Eng Biotechnol 2010: GEBJ-12.
- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.C., Nye, G.J., *et al.* (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. PNAS 94: 3454-3458.
- Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, D.S., and Guttman, H.J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. Trends Biochem Sci 23: 143-148.
- Rice, L.B. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 197: 1079-1081.
- Robinson, P.M., and Roberts, M.F. (1997) Effects of osmolyte precursors on the distribution of compatible solutes in *Methanohalophilus portucalensis*. Appl Environ Microbiol 63: 4032-4038.
- Roeßler, M., and Müller, V. (2001) Chloride dependence of glycine betaine transport in *Halobacillus halophilus*. FEBS Lett 489: 125-128.
- Rösgen, J. (2007) Molecular basis of osmolyte effects on protein and metabolites. Methods Enzymol 428: 459-486.
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., and De Ley, J. (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int J Syst Bacteriol 41: 310-319.
- Rothmel, R.K., Aldrich, T.L., Houghton, J.E., Coco, W.M., Ornston, L.N., and Chakrabarty, A.M. (1990) Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR*: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. J Bacteriol 172: 922-931.
- Rumbo, C., Tomás, M., Fernández Moreira, E., Soares, N.C., Carvajal, M., Santillana, E., *et al.* (2014) The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. Infect Immun 82: 4666-4680.

Russell, R., und Scopes, R.K. (1994) Use of hydrophobic chromatography for purification of the membrane-located choline dehydrogenase from a *Pseudomonas* strain. *Bioseparation* 4: 279-284.

Sage, A.E., Vasil, A.I., und Vasil, M.L. (1997) Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 23: 43-56.

Saldias, M.S., Lamothe, J., Wu, R., und Valvano, M.A. (2008) *Burkholderia cenocepacia* requires the RpoN sigma factor for biofilm formation and intracellular trafficking within macrophages. *Infect Immun* 76: 1059-1067.

Salvi, F., und Gadda, G. (2013) Human choline dehydrogenase: medical promises and biochemical challenges. *Arch Biochem Biophys* 537: 243-252.

Sambrook, J., Fritsch, F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Samid, D., Wells, M., Greene, M.E., Shen, W., Palmer, C.N., und Thibault, A. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity. *Clin Cancer Res* 6: 933-941.

Sand, M., Stahl, J., Waclawska, I., Ziegler, C., und Averhoff, B. (2013) Identification of an osmo-dependent and an osmo-independent choline transporter in *Acinetobacter baylyi*: implications in osmoprotection and metabolic adaptation. *Environ Microbiol* 16: 1490-1502.

Schell, M.A., Brown, P.H., und Raju, S. (1990) Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *J Biol Chem* 265: 3844-3850.

Schmidt, K., Liaaen-Jensen, S., und Schlegel, H.G. (1963) Carotenoids in thiorhodaceae. I. Okenoneas the principal carotenoid in chromatium *Okenii perty*. *Arch Mikrobiol* 46: 117-126.

Schmiel, D.H., und Miller, V.L. (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* 1: 1103-1112.

Schmiel, D.H., Young, G.M., und Miller, V.L. (2000) The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol* 182: 2314-2320.

Scholz, A., Stahl, J., de Berardinis, V., Müller, V., und Averhoff, B. (2016) Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: identification of a glycine-betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine-betaine synthesis through a choline-responsive BetI repressor. *Environ Microbiol Rep* 8: 316-322.

Schreuder, H.A., Prick, P.A., Wierenga, R.K., Vriend, G., Wilson, K.S., Hol, W.G., und Drenth, J. (1989) Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution. Analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. *J Mol Biol* 208: 679-696.

Schumm, C. (2021) Regulation des Carnitin-Stoffwechselweges in *Acinetobacter baumannii* Masterarbeit, Goethe-Universität Frankfurt.

Schwarzer, N., Nost, R., Seybold, J., Parida, S.K., Fuhrmann, O., Krull, M., *et al.* (1998) Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor- $\kappa$ B activation, and E-selectin expression in human endothelial cells. *J Immunol* 161: 3010-3018.

Schweigert, N., Zehnder, A.J., und Eggen, R.I. (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol* 3: 81-91.

Segura, A., Bunz, P.V., D'Argenio, D.A., und Ornston, L.N. (1999) Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB*, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*. *J Bacteriol* 181: 3494-3504.

Seim, H., Löster, H., Claus, R., Kleber, H.-P., und Strack, E. (1982a) Formation of  $\gamma$ -butyrobetaine and trimethylamine from quaternary ammonium compounds structure-related to L-carnitine and choline by *Proteus vulgaris*. *FEMS Microbiol Lett* 13: 201-205.

Seim, H., Löster, H., Claus, R., Kleber, H.P., und Strack, E. (1982b) Stimulation of the anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* by reduction of L-carnitine, carnitine derivatives and structure-related trimethylammonium compounds. *Arch Microbiol* 132: 91-95.

Seim, H., Löster, H., und Kleber, H.P. (1982c) Reductive metabolism of L-carnitine and structure-related trimethylammonium compounds in *Escherichia coli*. *Acta Biol Med Ger* 41: 1009-1018.

Senthong, V., Li, X.S., Hudec, T., Coughlin, J., Wu, Y., Levison, B., *et al.* (2016) Plasma trimethylamine *N*-oxide, a gut microbe-generated phosphatidylcholine metabolite, is associated with atherosclerotic burden. *J Am Coll Cardiol* 67: 2620-2628.

Sheldon, J.R., und Skaar, E.P. (2020) *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence. *PLoS Pathog* 16: e1008995.

Shimuta, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N., und Watanabe, H. (2009) The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiol* 9: 261.

Shortridge, V.D., Lazdunski, A., und Vasil, M.L. (1992) Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 6: 863-871.

Silverman, D.J., Santucci, L.A., Meyers, N., und Sekeyova, Z. (1992) Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of *rickettsial* origin. *Infect Immun* 60: 2733-2740.

Sleator, R.D., Gahan, C.G., und Hill, C. (2001a) Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* 67: 2571-2577.

Sleator, R.D., Gahan, C.G., und Hill, C. (2001b) Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* 67: 4560-4565.

Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G., Abee, T., und Hill, C. (2001c) Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 67: 2692-2698.

Sleator, R.D., und Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26: 49-71.

Smirnova, I.A., Dian, C., Leonard, G.A., McSweeney, S., Birse, D., und Brzezinski, P. (2004) Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *J Mol Biol* 340: 405-418.

Smith, M.A., Weaver, V.B., Young, D.M., und Ornston, L.N. (2003) Genes for chlorogenate and hydroxycinnamate catabolism (*hca*) are linked to functionally related genes in the *dca-pca-qui-pob-hca* chromosomal cluster of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl Environ Microbiol* 69: 524-532.

Sohlenkamp, C., und Geiger, O. (2016) Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev* 40: 133-159.

Soneson, C., Love, M.I., und Robinson, M.D. (2015) Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* 4: 1521.

Spitzer, J., und Poolman, B. (2009) The role of biomacromolecular crowding, ionic strength, and physicochemical gradients in the complexities of life's emergence. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 371-388.

Stahl, J., Bergmann, H., Göttig, S., Ebersberger, I., und Averhoff, B. (2015) *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS One* 10: e0138360.

Stevens, D.L., Tweten, R.K., Awad, M.M., Rood, J.I., und Bryant, A.E. (1997) *Clostridial* gas gangrene: evidence that  $\alpha$  and  $\theta$  toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J Infect Dis* 176: 189-195.

Stinson, M.W., und Hayden, C. (1979) Secretion of phospholipase C by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 25: 558-564.

Stoebner, J.A., und Payne, S.M. (1988) Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 56: 2891-2895.

Street, T.O., Bolen, D.W., und Rose, G.D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *PNAS* 103: 13997-14002.

Styrvold, O.B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M.W., Bjørnsen, T., und Strøm, A.R. (1986) Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J Bacteriol* 165: 856-863.

Su, J., Gong, H., Lai, J., Main, A., und Lu, S. (2009) The potassium transporter Trk and external potassium modulate *Salmonella enterica* protein secretion and virulence. *Infect Immun* 77: 667-675.

Subramoni, S., und Sokol, P.A. (2012) Quorum sensing systems influence *Burkholderia cenocepacia* virulence. *Future Microbiol* 7: 1373-1387.

Sun, Z., Kang, Y., Norris, M.H., Troyer, R.M., Son, M.S., Schweizer, H.P., *et al.* (2014) Blocking phosphatidylcholine utilization in *Pseudomonas aeruginosa*, via mutagenesis of fatty acid, glycerol and choline degradation pathways, confirms the importance of this nutrient source *in vivo*. *PLoS One* 9: e103778.

Suzuki, K., Ichimura, A., Ogawa, N., Hasebe, A., und Miyashita, K. (2002) Differential expression of two catechol 1,2-dioxygenases in *Burkholderia* sp. strain TH2. *J Bacteriol* 184: 5714-5722.

Tabor, S., und Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *PNAS* 82: 1074-1078.

Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., *et al.* (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18: 318-327.

Tam, H.K., König, P., Himpich, S., Ngu, N.D., Abele, R., Müller, V., und Pos, K.M. (2022) Unidirectional mannitol synthesis of *Acinetobacter baumannii* MtlD is facilitated by the helix-loop-helix-mediated dimer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119: e2107994119.

Tang, W.H., und Hazen, S.L. (2014) The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J Clin Invest* 124: 4204-4211.

Tang, W.H., Wang, Z., Fan, Y., Levison, B., Hazen, J.E., Donahue, L.M., *et al.* (2014) Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol* 64: 1908-1914.

Taylor, J.L., De Silva, R.S., Kovacikova, G., Lin, W., Taylor, R.K., Skorupski, K., und Kull, F.J. (2012) The crystal structure of AphB, a virulence gene activator from *Vibrio cholerae*, reveals residues that influence its response to oxygen and pH. *Mol Microbiol* 83: 457-470.

- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., und Vasil, M.L. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 67: 2371-2376.
- Teufel, R., Mascaraque, V., Ismail, W., Voss, M., Perera, J., Eisenreich, W., *et al.* (2010) Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. *PNAS* 107: 14390-14395.
- Teufel, R., Gantert, C., Voss, M., Eisenreich, W., Haehnel, W., und Fuchs, G. (2011) Studies on the mechanism of ring hydrolysis in phenylacetate degradation: a metabolic branching point. *J Biol Chem* 286: 11021-11034.
- Teufel, R., Friedrich, T., und Fuchs, G. (2012) An oxygenase that forms and deoxygenates toxic epoxide. *Nature* 483: 359-362.
- Tipton, P.A., und Peisach, J. (1990) Characterization of the multiple catalytic activities of tartrate dehydrogenase. *Biochemistry* 29: 1749-1756.
- Titball, R.W. (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 57: 347-366.
- Titball, R.W. (1998) Bacterial phospholipases. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 27: 127S-137S.
- Tittabutr, P., Cho, I.K., und Li, Q.X. (2011) Phn and Nag-like dioxygenases metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons in *Burkholderia* sp. C3. *Biodegradation* 22: 1119-1133.
- Tøndervik, A., und Strøm, A.R. (2007) Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli*. *Microbiology* 153: 803-813.
- Tropel, D., und van der Meer, J.R. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 474-500.
- Tschech, A., und Pfennig, N. (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch Microbiol* 137: 163-167.
- Uehlinger, S., Schwager, S., Bernier, S.P., Riedel, K., Nguyen, D.T., Sokol, P.A., und Eberl, L. (2009) Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infect Immun* 77: 4102-4110.

- Unemoto, T., Hayashi, M., Miyaki, K., and Hayashi, M. (1966) Formation of trimethylamine from DL-carnitine by *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta* 121: 220-222.
- Valvano, M.A., Keith, K.E., and Cardona, S.T. (2005) Survival and persistence of opportunistic *Burkholderia* species in host cells. *Curr Opin Microbiol* 8: 99-105.
- van Berkel, W.J., Kamerbeek, N.M., and Fraaije, M.W. (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* 124: 670-689.
- van Keulen, G., Girbal, L., van den Bergh, E.R., Dijkhuizen, L., and Meijer, W.G. (1998) The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO<sub>2</sub> fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *J Bacteriol* 180: 1411-1417.
- Vance, D.E. (2008) Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 19: 229-234.
- Verheul, A., Wouters, J.A., Rombouts, F.M., and Abee, T. (1998) A possible role of ProP, ProU and CaiT in osmoprotection of *Escherichia coli* by carnitine. *J Appl Microbiol* 85: 1036-1046.
- Wang, J.Y., Zhou, L., Chen, B., Sun, S., Zhang, W., Li, M., *et al.* (2015a) A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity. *Sci Rep* 5: 18456.
- Wang, T., Qi, Y., Wang, Z., Zhao, J., Ji, L., Li, J., *et al.* (2020) Coordinated regulation of anthranilate metabolism and bacterial virulence by the GntR family regulator MpaR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 114: 857-869.
- Wang, Z., Roberts, A.B., Buffa, J.A., Levison, B.S., Zhu, W., Org, E., *et al.* (2015b) Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell* 163: 1585-1595.
- Wargo, M.J., Szwergold, B.S., and Hogan, D.A. (2008) Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. *J Bacteriol* 190: 2690-2699.
- Wargo, M.J., Ho, T.C., Gross, M.J., Whittaker, L.A., and Hogan, D.A. (2009) GbdR regulates *Pseudomonas aeruginosa* *plcH* and *pchP* transcription in response to choline catabolites. *Infect Immun* 77: 1103-1111.



Wargo, M.J., und Hogan, D.A. (2009) Identification of genes required for *Pseudomonas aeruginosa* carnitine catabolism. *Microbiology* 155: 2411-2419.

Wargo, M.J., Gross, M.J., Rajamani, S., Allard, J.L., Lundblad, L.K., Allen, G.B., *et al.* (2011) Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 345-354.

Wargo, M.J. (2013a) Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 79: 2112-2120.

Wargo, M.J. (2013b) Choline catabolism to glycine betaine contributes to *Pseudomonas aeruginosa* survival during murine lung infection. *PLoS One* 8: e56850.

Wazny, T.K., Mummaw, N., und Styr, B. (1990) Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9: 830-832.

Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., Sleator, R.D., Gahan, C.G., Hill, C., und Abee, T. (2002) Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ Microbiol* 68: 4710-4716.

Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., und Rüdén, H. (1997) Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 35: 1394-1397.

Whatmore, A.M., Chudek, J.A., und Reed, R.H. (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 136: 2527-2535.

Whitfield, C., und Trent, M.S. (2014) Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 83: 99-128.

Wieland, C.W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M.L., Dinarello, C.A., und Fantuzzi, G. (2002) Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70: 1352-1358.

Wieland, K., Chhatwal, P., und Vonberg, R.P. (2018) Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. *Am J Infect Control* 46: 643-648.

- Williams, P.A., und Kay, C.M. (2008) The catabolism of aromatic compounds by *Acinetobacter*, *Acinetobacter* Molecular Biology, Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 99-118.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., und Spellberg, B. (2017) Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev* 30: 409-447.
- Wood, J.M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 230-262.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Krämer, R., Poolman, B., van der Heide, T., und Smith, L.T. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 130: 437-460.
- Wood, J.M. (2011) Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* 65: 215-238.
- Wu, H.J., Wang, A.H., und Jennings, M.P. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12: 93-101.
- Xue, T., You, Y., Hong, D., Sun, H., und Sun, B. (2011) The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K<sup>+</sup> sensing and Agr signaling to infection programming. *Infect Immun* 79: 2154-2167.
- Yamamoto, S., Okujo, N., und Sakakibara, Y. (1994) Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol* 162: 249-254.
- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* 208: 2819-2830.
- Yeoh-Ellerton, S., und Stacey, M.C. (2003) Iron and 8-isoprostane levels in acute and chronic wounds. *J Invest Dermatol* 121: 918-925.
- Yozwiak, M.L., und Songer, J.G. (1993) Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am J Vet Res* 54: 392-397.

Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294 1-14.

Zarrilli, R. (2016) *Acinetobacter baumannii* virulence determinants involved in biofilm growth and adherence to host epithelial cells. *Virulence* 7: 367-368.

Zavascki, A.P., Goldani, L.Z., Li, J., and Nation, R.L. (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* 60: 1206-1215.

Zeidler, S., Hubloher, J., Schabacker, K., Lamosa, P., Santos, H., und Müller, V. (2017) Trehalose, a temperature- and salt-induced solute with implications in pathobiology of *Acinetobacter baumannii*. *Environ Microbiol* 19: 5088-5099.

Zeidler, S., Hubloher, J., König, P., Ngu, N.D., Scholz, A., Averhoff, B., und Müller, V. (2018) Salt induction and activation of MtlD, the key enzyme in the synthesis of the compatible solute mannitol in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiologyopen* 7: e00614.

Zeidler, S., und Müller, V. (2018) The role of compatible solutes in desiccation resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Microbiologyopen* 8: e00740.

Zeidler, S., und Müller, V. (2019) Coping with low water activities and osmotic stress in *Acinetobacter baumannii*: significance, current status and perspectives. *Environ Microbiol* 21: 2212-2230.

Zeng, D., Zhao, J., Chung, H.S., Guan, Z., Raetz, C.R., und Zhou, P. (2013) Mutants resistant to LpxC inhibitors by rebalancing cellular homeostasis. *J Biol Chem* 288: 5475-5486.

Zhang, H., Murzello, C., Sun, Y., Kim, M.S., Xie, X., Jeter, R.M., *et al.* (2010) Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1097-1104.

Zhou, X., Lou, Z., Fu, S., Yang, A., Shen, H., Li, Z., *et al.* (2010) Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J Mol Biol* 396: 1012-1024.

Zhu, A., Ibrahim, J.G., und Love, M.I. (2019) Heavy-tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences. *Bioinformatics* 35: 2084-2092.

Zhu, Y., Jameson, E., Crosatti, M., Schäfer, H., Rajakumar, K., Bugg, T.D., und Chen, Y. (2014) Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. PNAS 111: 4268-4273.

Ziegler, C., Bremer, E., und Krämer, R. (2010) The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. Mol Microbiol 78: 13-34.

Zimble, D.L., Penwell, W.F., Gaddy, J.A., Menke, S.M., Tomaras, A.P., Connerly, P.L., und Actis, L.A. (2009) Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. BioMetals 22: 23-32.

Zylstra, G.J., Olsen, R.H., und Ballou, D.P. (1989a) Genetic organization and sequence of the *Pseudomonas cepacia* genes for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of protocatechuate 3,4-dioxygenase. J Bacteriol 171: 5915-5921.

Zylstra, G.J., Olsen, R.H., und Ballou, D.P. (1989b) Cloning, expression, and regulation of the *Pseudomonas cepacia* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. J Bacteriol 171: 5907-5914.