

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Jūratė
SKERNIŠKYTĖ

Acinetobacter baumannii patogenezės
molekuliniai mechanizmai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija N 004

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014 – 2018 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų
centro Biomokslų institute

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai,
biochemija – N 004).

TURINYS

ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Hospitalinės kilmės infekcijos	10
1.1.1. <i>A. baumannii</i> sukeltamos infekcijos	11
1.1.2. <i>A. baumannii</i> dauginis atsparumas antibiotikams	13
1.2. Su virulentiškumu siejami <i>A. baumannii</i> veiksniai	18
1.2.1. Bioplėvelių formavimas	23
1.2.2. Atsakas į aplinkos stresą	25
1.2.3. Bakterijų judrumas	26
1.2.4. Šeimininko kolonizavimas	27
1.2.5. Imuninio atsako stimuliavimas	32
1.3. <i>A. baumannii</i> infekcijų gydymo perspektyvos	35
1.3.1. Naujų antimikrobinių medžiagų kombinacijos	35
1.3.2. Fagų terapija	36
1.3.3. Vakcinacija ir monokloniniai antikūnai	37
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	40
2.1. Medžiagos	40
2.2. Metodai	44
2.2.1. <i>A. baumannii</i> auginimas	44
2.2.2. Ląstelių paviršiaus hidrofobiškumo nustatymas	44
2.2.3. Bakterijų judėjimo fenotipo nustatymas	44
2.2.4. Bakterijų pelikulės įvertinimas	45
2.2.5. Džiūvimo testas	45
2.2.6. Bioplėvelės formavimo nustatymas	45
2.2.7. Bakterijų adhezijos prie plastiko nustatymas	45
2.2.8. Tyrimai su ląstelių kultūromis	46
2.2.9. Bakterijų atsparumo veršiuko serumui nustatymas	47
2.2.10. Bakterijų DNR išskyrimas	47
2.2.11. PGR ir tikro laiko PGR	47
2.2.12. <i>A. baumannii</i> ST tipų nustatymas	48
2.2.13. <i>A. baumannii</i> imliųjų (elektrokompetentinių) ląstelių ruošimas	48
2.2.14. <i>A. baumannii</i> delecinių mutantų kūrimas	48
2.2.15. Genų klonavimas	49
2.2.16. Kapsulės polisacharidų frakcionavimas	49
2.2.17. Konfokalinė skenuojanti mikroskopija	49
2.2.18. Skenuojanti elektroninė mikroskopija	50
2.2.19. Išorinės membranos pūslelių išskyrimas	50
2.2.20. Membraninių baltymų išskyrimas ir analizė	50
2.2.21. Antigenų klonavimas į raiškos vektorių ir gryninimas giminingumo chromatografijos būdu	51
2.2.22. Imunofermentinė baltymų analizė	51
2.2.23. <i>Caenorhabditis elegans</i> vaisingumo tyrimas	52
2.2.24. Pelių sepsio modelis	52
2.2.25. Pelių vakcinavimas	53
2.2.26. Bioinformatinė ir statistinė analizė	53
3. REZULTATAI	54
3.1. Ligoninėse paplitusių <i>A. baumannii</i> savybės	54
3.1.1. Judrumas ir gebėjimas sudaryti pelikulę	54
3.1.2. Sekretuojami kapsulės polisacharidai	55

3.1.3.	<i>A. baumannii</i> ląstelės paviršiaus hidrofobiškumas	56
3.1.4.	Sąveika su plastiko paviršiumi ir bioplėvelės formavimas	58
3.1.5.	Gebejimas išgyventi džiūvimo sąlygomis	59
3.1.6.	<i>A. baumannii</i> adhezija prie plaučių epitelio ląstelių	60
3.1.7.	<i>A. baumannii</i> atsparumas imuninės sistemos komponentams	61
3.1.8.	Egzopolisacharidinės kapsulės reikšmė <i>A. baumannii</i> patogenezėje	62
3.1.9.	<i>A. baumannii</i> virulentiškumas gyvūnų infekcijos modeliuose.....	63
3.1.10.	Kapsulę ir lipooligosacharidą koduojančių genomo lokusų tyrimai	66
3.1.11.	<i>A. baumannii</i> genomų sekoskaitos analizė	67
3.2.	Su virulentiškumu siejamų <i>A. baumannii</i> veiksmų paieška ir vaidmens patogenezėje tyrimas	69
3.2.1.	Išorinės membranos baltymo OmpA vaidmuo <i>A. baumannii</i> virulentinėms savybėms	72
3.2.1.1.	<i>ompA</i> reikšmė <i>A. baumannii</i> bioplėvelių formavimui ir kitoms virulentinėms savybėms	73
3.2.1.2.	OmpA baltymo konservatyvių aminorūgščių Asp268 ir Arg283 tikslinė mutagenezė	77
3.2.1.3.	OmpA reikšmė išorinės membranos pūslelių biogenezei ir atsparumui antibiotikams.....	78
3.2.2.	Blp1 reikšmė <i>A. baumannii</i> patogenezėje.....	80
3.2.2.1.	Blp1 reikšmė bioplėvelių formavimui	81
3.2.2.2.	Blp1 reikšmė adhezijai prie plaučių epitelio ląstelių	83
3.2.2.3.	Blp1 reikšmė <i>A. baumannii</i> virulentiškumui <i>in vivo</i>	83
3.3.	Blp1 baltymo kaip potencialaus vakcinos antigeno tyrimai.....	84
3.3.1.	Antiserumo indukuojama klinikinių <i>A. baumannii</i> izolatų opsonofagocitozė 86	
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	88
	IŠVADOS.....	103
	PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	104
	PADĖKA.....	106
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	107
	PRIEDAI	126

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

CFU	koloniją formuojantis vienetas (angl. <i>colony forming unit</i>)
CLSM	Konfokalinė lazerio skenuojanti mikroskopija (angl. <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
DAA	Dauginis atsparumas antibiotikams
IC	pandeminis klonas (angl. <i>international clone</i>)
kb	kilobazė
KPS	kapsulės polisacharidai
LB	Luria-Bertani mitybinė terpė
LOS	lipooligosacharidas
LPS	lipopolisacharidas
mce	žinduolių ląstelių invazijos motyvas (angl. <i>mammalian cell entry</i>)
MLST	daugybinių sekų sekoskaitos analizė (angl. <i>multiple locus sequence type</i>)
MSK	minimali slopinanti koncentracija
NDS-PAGE	natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
OMV	išorinės membranos pūslelė (angl. <i>outer membrane vesicle</i>)
O-OTazė	oligosachariltransferazė
PBP	peniciliną prijungiantis baltymas (angl. <i>penicillin binding protein</i>)
PBS	fosfatinio buferio tirpalas
PFGE	pulsuojančio lauko elektroforezė (angl. <i>pulsed field electrophoresis</i>)
PGR	polimerazės grandininė reakcija
PI	propidžio jodidas
RT-PCR	tikro laiko PGR (angl. <i>real time PCR</i>)
SNP	pavienio nukleotido polimorfizmas (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
ST	sekos tipas
TEM	transmisijos elektroninė mikroskopija
TLR	Toll receptorius (angl. <i>Toll-like receptor</i>)

IVADAS

Gram-neigiamos bakterijos *Acinetobacter baumannii* yra pasaulio ligoninėse paplitę žmogaus oportunistiniai patogenai. Bakterijos ypač pavojingos kritinių būklių ligoniams ir dažniausiai sukelia dėl plaučių ventiliavimo įgytą pneumoniją, sepsį, taip pat meningitą, endokarditą, odos bei minkštųjų audinių bei šlapimo takų infekcijas (Harding, 2018). Dėl pastarąjį dešimtmetį išaugusio atsparumo antibiotikams *A. baumannii* patenka tarp didžiausią dalį komplikacijų hospitalizuotiems pacientams sukeliančių mikroorganizmų (Giammanco ir kt., 2017). Šiuo metu plinta dauginiu atsparumu antibiotikams (DAA) pasižymintys *A. baumannii* izoliatai, kurių sukeltų infekcijų gydymas yra sudėtingas ir dažnai neveiksmingas (Holt ir kt., 2016). *A. baumannii* išplitimą ligoninėse lėmė kelių pandeminių klonų išskirtinis gebėjimas prisitaikyti prie klinikinės aplinkos (Zarrilli ir kt., 2013), iš kurių labiausiai paplitę ir didžiąją dalį visų infekcijų sukelia pirmasis ir antrasis pandeminiai klonai (angl. *international clones*, IC I ir IC II) (Zarrilli ir kt., 2013; Dahdouh ir kt., 2017).

A. baumannii pasižymi itin dideliu genomo variabilumu (Imperi ir kt., 2011; Snitkin ir kt., 2011; Eijkelkamp ir kt., 2014). Pandeminiai klonai skiriasi koduojamų virulentinių genų rinkiniais ar jų variantais, kas nulemia skirtingas kloninių izolatų virulentines savybes (Eijkelkamp ir kt., 2014). Pastaraisiais metais pasaulio ligoninėse stebimas antro pandemio klonų izolatų intensyvus plitimas, kuris siejamas su išaugusiu atsparumu karbapenemams (Kim ir kt., 2017a; Pournaras ir kt., 2017). Prie *A. baumannii* plitimo taip pat prisideda ir kiti bakterijos išvystyti, su virulentiškumu siejami molekuliniai mechanizmai – gebėjimas adhezuotis prie medicininės įrangos paviršių, atsparumas sausoms aplinkos sąlygoms, šeimininko imuninei sistemai bei sąveikos su eukariotinėmis ląstelėmis ypatumai (Harding, 2018). *A. baumannii* geba prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų. Šioms bakterijoms būdingas fenotipinių savybių keitimas, užtikrinantis išgyvenamumą tiek infekcijos židinyje, tiek už infekuoto šeimininko ribų (Tipton ir kt., 2015; Chin ir kt., 2018).

A. baumannii patogenezės mechanizmai dar gana menkai ištirti. Žinoma, kad bakterijų virulentiškumui svarbūs su ląstelės paviršiumi susiję veiksniai, pvz. bakterijų sąveiką su abiotiniais ir biologinės kilmės paviršiais lemiantys adhezinais, nuo aplinkos sąlygų apsaugantys išoriniai egzopolisacharidai, virulentinius veiksnius pernešančios išorinės membranos pūslelės ar įvairias

bakterijos savybes moduliuojantys transkripcijos reguliatoriai (Lee ir kt., 2017; Wong ir kt., 2017).

Ieškant naujų gydymo strategijų prieš DAA *A. baumannii*, reikalingi detalūs bakterijos patogenizės tyrimai (Isler ir kt., 2018). Tarp perspektyviausių, antibiotikų terapiją pakeisti galinčių gydymo būdų, yra įvardijamos aktyvi ir pasyvi imunizacijos (Dickey ir kt., 2017). Galimi antigenai turėtų būti į bakterijos išorę eksponuoti ląstelės komponentai, pasižymintys dideliu konservatyvumu ir paplitę tarp skirtingų *A. baumannii* izoliatų. Dėl gebėjimo aktyvinti imuninę sistemą, ilgi išoriniai bakterijų adhezinais šiuo metu vis dažniau tiriama kaip potencialūs vakcinų prieš bakterines infekcijas kandidatai (Badmasti ir kt., 2015; Sheel ir kt., 2016).

Ši disertacija apima Lietuvos ligoninėse cirkuliuojančių *A. baumannii* virulentinių savybių ir ląstelės paviršinių struktūrų vaidmens bakterijos patogenizėje tyrimus bei naujų vakcinų kandidatų paiešką.

Šio **darbo tikslas** buvo ištirti klinikinės kilmės *A. baumannii* savybes ir su jomis siejamus molekulinis komponentus, svarbius bakterijų virulentiškumui.

Tiksliui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

- Nustatyti pandeminiams klonams priklausančių *A. baumannii* fenotipines savybes ir atskleisti jų sąsajas su virulentiškumu;
- Nustatyti *A. baumannii* paviršiaus komponentų reikšmę virulentinėms bakterijos savybėms;
- Ištirti *A. baumannii* su ląstelės paviršiumi asocijuotą Blp1 baltymą kaip potencialų kandidatą vakcinų sukūrimui.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe pirmą kartą išsamiai apibūdintos Lietuvos ligoninėse cirkuliuojančių ir labiausiai paplitusių *A. baumannii* pandeminių klonų virulentinės savybės. Nustatyta, kad judėjimo ir pelikulės formavimo fenotipai yra išskirtinai būdingi pirmo pandeminio klonu *A. baumannii* izoliatams. Taip pat, pirmą kartą parodyta, kad pandeminių klonų izoliatai tarpusavyje skiriasi sintetinių kapsulės polisacharidų profiliu. Nustatyta, kad kapsulė yra svarbi *A. baumannii* atsparumui serumo komplemento sistemai ir infekcijai *in vivo*.

Šiame darbe parodyta, kad IC II pandeminio klonu *A. baumannii* izoliatai pasižymi skirtingomis ląstelės paviršiaus hidrofobinėmis/hidrofilinėmis savybėmis, kas lemia skirtingas šių izoliatų virulentines savybes. Hidrofilinėmis paviršiaus savybėmis pasižymintys izoliatai yra labiau atsparūs džiūvimui, pasižymi geresne adhezija prie eukariotinių ląstelių, sintetina storesnę ląstelės apvalkalo struktūrą ir yra virulentiškesni *in vivo*, tačiau formuoja plonesnę bioplėvelę nei hidrofobinėmis savybėmis pasižyminčios *A. baumannii*.

Parodyta sąsaja tarp *A. baumannii* gebėjimo formuoti bioplėvelės struktūrą ir izoliatų paplitimo ligoninėse. Išanalizavus *A. baumannii* IC II pandeminio klonu reprezentatyvių izoliatų – II-a ir II-f – genomų sekas, parodyta hidrofobinių savybių sąsaja su pernešama pACICU2 tipo plazmide.

Darbe apibūdinti nauji, su *A. baumannii* virulentiškumu siejami YgaU ir GltI baltymai. Atskleistos naujos ląstelės paviršiaus baltymų – OmpA ir Blp1 savybės: juos koduojančių genų variantų sąsaja su izoliatų kloniškumu bei genų variantų reikšmė virulentinėms savybėms.

Pirmą kartą apibūdinta OmpA baltymo sąveikos su peptidoglikanu reikšmė *A. baumannii* fiziologijai ir patogenezei – bakterijos sienelės integralumo palaikymui, ląstelės dalijimosi procesui, virulentinių savybių pasireiškimui.

Pelių sepsio modelyje, taikant aktyvią ir pasyvią imunizacijas, pirmą kartą apibūdintas antigenas – *A. baumannii* Blp1 baltymo fragmentas – kaip naujas vakcinos kandidatas prieš klinikinių izoliatų sukeltas infekcijas. Parodyta, kad antigenas veikia efektyviau nei OmpA antigenas tiek *in vitro* serumo indukuotos opsonofagocitozės atveju, tiek taikant aktyvią imunizaciją infekcijos modelyje pelėse.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- *A. baumannii* pandeminių klonų izoliatai skiriasi savo virulentinėmis savybėmis;
- *A. baumannii* paviršiaus hidrofiliškumas lemia padidėjusį bakterijų virulentiškumą, tačiau nėra palanki savybė klinikinių izoliatų išplitimui;
- *A. baumannii* OmpA, Blp1, YgaU ir GltI baltymai yra virulentiškumo veiksniai *ex vivo* ir *in vivo*;
- OmpA baltymo periplazminio domeno sąveika su peptidoglikanu lemia daugiafunkcinį baltymo vaidmenį *A. baumannii* patogenezėje;
- Blp1 baltymo C-galinis fragmentas yra efektyvus antigenas taikant aktyvią imunizaciją, o Blp1-antiserumas apsaugo nuo *A. baumannii* infekcijos pasyvios imunizacijos metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Hospitalinės kilmės infekcijos

Per pastaruosius dešimtmečius stebimas hospitalinių (ligoninėse įgytų) infekcijų skaičiaus augimas. Šio tipo infekcijos pasireiškė 7 % hospitalizuotų pacientų išsivysčiusiose šalyse ir 10 % besivystančiose šalyse (Raja Danasekaran ir Annadurai, 2014). Ypač didelis jų dažnis nustatomas intensyvios terapijos skyriuose (Vincent ir kt. 2009). Šio tipo infekcijas gali sukelti tiek virusai ar bakterijos, tiek įvairių rūšių grybeliai. Visgi didžiausią dalį visų užkratų sudaro antibiotikams atsparių bakterijų infekcijos, kurios dažnai pasibaigia mirtimi (Khan ir kt., 2017). Atsparumo antibiotikams problema ir alternatyvių gydymų būdų trūkumas nulėmė hospitalinių infekcijų išplitimą viso pasaulio ligoninėse.

Gydymo įstaigose cirkuliuojančios bakterijos pasižymi dauginiu atsparumu antibiotikams (DAA), kurį įgyja dėl intensyvaus vaistų naudojimo gydymo įstaigose. Esant antibiotikų spaudimui, padaugėja atsitiktinių mutacijų atsparumą lemiančiuose genuose dažnis ir suintensyvėja judriųjų genomo elementų pernaša tarp skirtingų bakterijų. Tokiu būdu patogeninės bakterijos geba kaupti atsparumą lemiančias genetines determinantes ir išgyventi naudojant net ir naujausios kartos antibiotikus.

Ligoninėse tarp DAA bakterijų labiausiai paplitę oportunistiniai patogenai – *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Khan ir kt., 2017). Tokios bakterijos dažniausiai nesekretuoja žmogui pavojingų toksinų ir sveikam individui pavojaus nekelia. Visgi esant nusilpusiam imunitetui žmogaus imuninė sistema nesugeba tinkamai kovoti su infekcija, todėl pasireiškia bakterinės infekcijos požymiai. Būtent dėl šios priežasties rizikos grupę užsikrėsti oportunistine infekcija sudaro ypač jauno arba senyvo amžiaus žmonės, taip pat imunosupresuoti (žmogaus imunodeficito virusą turintys ar gydomi chemoterapija) ligoninių pacientai. Oportunistinę infekciją gali sukelti tiek natūralios žmogaus mikrofloros, tiek aplinkoje randami mikroorganizmai (Brown ir kt., 2012). Oportunistiniai patogenai išsiskiria savo gebėjimu prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų. Dažniausiai tokios bakterijos geba modifikuoti savo fenotipą taip, kad galėtų išgyventi tiek infekuotame individe, tiek už šeimininko ribų (dirvožemyje ar ant įvairių paviršių).

Pastaruoju metu tarp visų hospitalines infekcijas sukeliančių ir DAA fenotipu pasižyminčių patogenų labiausiai auga *A. baumannii* sukeltų infekcijų skaičius (Giammanco ir kt., 2017). Intensyvios terapijos skyriuose iki 20 % visų infekcijų sukelia šios rūšies bakterijos (Vincent ir kt., 2009). *A. baumannii* paplitimą pasaulio ligoninėse lėmė šios bakterijos genomo plastiškumas, gebėjimas kaupti su atsparumu ir virulentiškumu susijusius genus, kitos su prisitaikymu prie aplinkos sąlygų susijusios savybės.

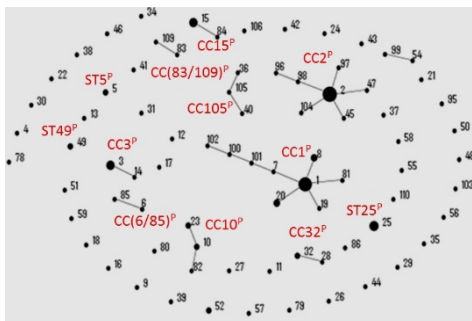
1.1.1. *A. baumannii* sukeltos infekcijos

Acinetobacter genties bakterijos yra gliukozės nefermentuojančios, aerobinės, Gram-neigiamos kokobacilos. Manoma, kad pirmasis *Acinetobacter* genties izoliatas buvo išskirtas 1914 metais ir tuo metu pavadintas *Mima polymorpha* (šiuo metu *Acinetobacter lwoffii*) (Wong ir kt., 2017). *Acinetobacter* sukeltų infekcijų skaičius pradėjo sparčiai augti apie 1960-1970 metus ir siejamas su intensyvios terapijos skyrių atsiradimu (Glew ir kt., 1977). *A. baumannii* yra didžiausiu virulentiškumo potencialu pasižymintis genties atstovas ir sudaro apie 80 % visų *Acinetobacter* sukeltų infekcijų (Joshi ir Litaje, 2013). Per pastarąjį dešimtmetį apie 40 % registruotų intensyvios terapijos pacientų mirčių atvejų susieta su *A. baumannii* sukeltų infekcijų komplikacijomis (Alsan ir Komplas, 2010). *A. baumannii* gali sukelti įvairius susirgimus, tarp kurių dažniausi negalavimai yra dėl ventiliavimo įgyta pneumonija, taip pat sepsis, meningitas, endokarditas, odos bei minkštųjų audinių ar šlapimo takų infekcijos. Nustatyta, kad bakterijos ligoninėse plinta įsitvirtindamos ant įvairių medicininių įrenginių paviršių, pvz. kateterių ar intubacijos vamzdelių (Chiang ir kt., 2018). Dėl atsparumo aplinkos sąlygoms ant tokių paviršių *A. baumannii* bakterijos, negaudamos vandens ar papildomų maisto medžiagų, sugeba išlikti gyvybingos net iki kelių mėnesių (Alsan ir Klompas, 2010).

Šiuo metu ligoninėse plinta *A. baumannii* izoliatai, priskiriami trimis pagrindiniams pandeminiams klonams IC (angl. *international clones*), iš kurių pirmo (IC I) ir antro (IC II) klonų izolatų sukeltos infekcijos sudaro didžiąją dalį (iki 99 %) visų *A. baumannii* infekcijų (D'Arezzo ir kt., 2009). Naujausių tyrimų duomenimis, ligoninėse sparčiai plinta IC II *A. baumannii* izoliatai (Gogou ir kt., 2011; Kim ir kt., 2017a; Pournaras ir kt., 2017). Tai iš dalies susiję su klonui priklausančių izolatų išskirtiniu atsparumu karbapenemų klasės antibiotikams, kurie plačiai naudojami *A. baumannii* infekcijų gydymui (žr. 1.1.2 skyrelį). Pandeminiams klonams *A. baumannii*

priskiriamos remiantis trikomponente tipavimo sistema, kuri pagrįsta reprezentatyvių genų sekų analize. Visgi dėl *A. baumannii* genomo plastiškumo, tam pačiam klonui priklausantys izoliatai gali pasižymėti gana dideliu genomų sekų variabilumu, todėl kartu su trikomponentine tipavimo sistema, taikomi ir kiti genotipavimo būdai. Pulsuojančio lauko gelio elektroforezė (angl. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) leidžia priskirti izoliatų pandeminiams klonams, bei įvertinti filogenetinį atstumą tarp izoliatų. Naudojant šį metodą, bakterijų DNR imobilizuojama agarozėje, kur nukleorūgštys hidrolizuojamos restrikcijos endonukleaze, atpažįstančia retas sekas. Kintančios krypties elektrinis laukas išskirsto didelius hidrolizuotos DNR fragmentus. Tokiu būdu, net ir vieno nukleotido pokyčiai gali pakeisti restrikcijos profilį ir pakankamu jautrumu išskirstyti izoliatų į skirtingus pulsotipus (Povilonis ir kt., 2013). Dalis *A. baumannii* izoliatų negali būti priskiriami nei vienam klonui, tokie izoliatai vadinami nekloniniais arba unikaliais izoliatais.

Be jau aprašytų tipavimo sistemų taip pat naudojamos ir kitos, pvz. rep-PCR ar amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmo tyrimu (angl. RFLP) paremti metodai. Be pilnos genomo sekoskaitos, detaliausiai bakterijų izoliatų apibūdina daugybinių sekų sekoskaitos analizė (angl. *multilocus sequence typing*, MLST). Šiuo metu paplitę du šios sistemos tipai, skirti analizuoti *A. baumannii* izoliatų: Pasteur-MLST ir Oxford-MLST sistemos (<https://pubmlst.org/abaumannii/>), kurios sekų analizei naudoja iš dalies skirtingus genų rinkinius. Remiantis analizės rezultatais izoliatai gali būti suskirstyti į vadinamuosius sekos tipus (ST). Šiuo metu Pasteur-MLST



1.1 pav. eBURST schema pagal Pastero MLST tipavimo schemą iš 129 *A. baumannii* izoliatų. ST taškų dydis atitinka lyginamąjį izoliatų kiekį. Linijomis sujungti taškai tarp skirtingų ST, turinčių tuos pačius 6-7 alelius. CC – klonų kompleksai, P – pandeminiai ST ar CC (pagal Karah, 2011).

duomenų bazėje pateikiami 1154 skirtingi *A. baumannii* ST tipai, o Oxford-MLST – 1869 ST tipai. Kai kurie ST tipai gali būti grupuojami į klonų kompleksus (angl. *clonal complexes*, CC) pagal izoliatų genetinį giminingumą (1.1 pav.). Toks didelis identifikuotų ST skaičius liudija didelį *A. baumannii* genomo plastiškumą. Europoje ir Azijoje tarp labiausiai paplitusių ST tipų yra ST1, ST2, ST45, ST54, ST85, ST368,

ST369, ST191, ST195, ST208 izoliatai (Gogou ir kt., 2011; Huang ir kt., 2014a). 2013 m. atlikto tyrimo duomenimis, pandeminiams klonams IC I ir IC II priklausantys izoliatai nustatomi visame pasaulyje, tuo tarpu IC III, CC15, CC32, ST25 ir ST52 izoliatai kol kas išskirti tik keliose Europos valstybėse, o CC79 ir ST78 tipai – atitinkamai Brazilijoje ir Italijoje (Zarrilli ir kt., 2013). Iš šių duomenų galime matyti, kad tam tikri *A. baumannii* ST tipai plačiai paplitę, tuo tarpu kiti identifikuoti tik tam tikruose regionuose.

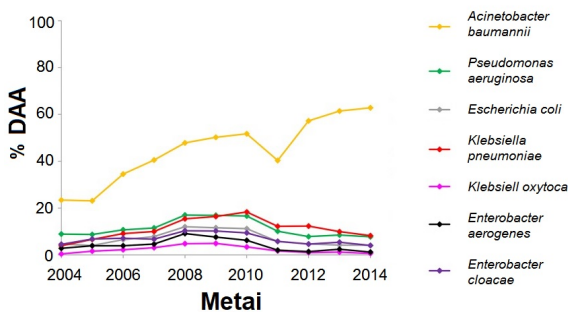
Visgi net ir remiantis visomis išvardintomis tipavimo sistemomis, įmanoma nepastebėti svarbių genomo pokyčių, kurie gali turėti įtakos *A. baumannii* su virulentiškumu siejamoms savybėms. Todėl pilna genomo sekoskaita išlieka tarp patikimiausių metodų, leidžiančių apibūdinti populiacijos genotipus.

1.1.2. *A. baumannii* dauginis atsparumas antibiotikams

DAA fenotipu pasižymintys *A. baumannii* izoliatai šiuo metu sukelia apie 60 % visų *A. baumannii* infekcijų ir ši dalis vis auga (1.2 pav.). Dar apie 1970 m. ligoninėse išskirtos *A. baumannii* buvo jautrios daugumai naudojamų antibiotikų. Šiuo metu klinikose cirkuliuojantys izoliatai įprastai būna atsparūs trijų-penkių skirtingų klasių antibiotikams, pvz. fluorochinolonams, aminoglikozidams, tetraciklinams, cefalosporinams, karbapenemams ir kt. (Giammanco ir kt., 2017). Didelį susirūpinimą kelia izoliatų, atsparių β-laktamams, fluorochinolonams ir aminoglikozidams, intensyvus plitimas. Pastaraisiais metais klinikose pradeda cirkuliuoti *A. baumannii* izoliatai, atsparūs „paskutinio pasirinkimo“ antibiotikui kolistinui (Mendelson ir kt., 2018). Higienos instituto duomenimis, Lietuvoje *Acinetobacter spp.* bakterijų sukeltos infekcijos yra dažniausios tarp visų kitų nustatytų mikroorganizmų sukeliamų hospitalinių infekcijų ir

sudaro apie 12 % visų nustatytų hospitalinių infekcijų atvejų.

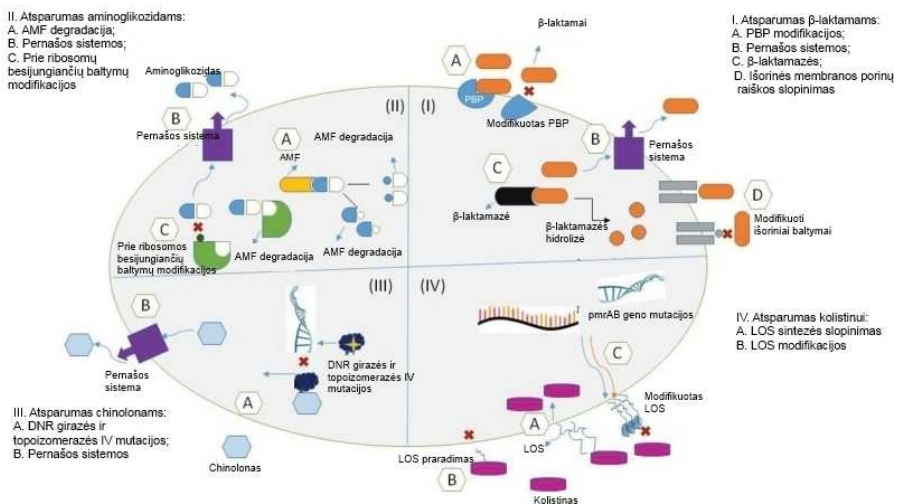
Antibiotikų poveikis gali pasižymėti bakteriostatinu (stabdo bakterijų augimą) arba baktericidiniu (sukelia ląstelių žūtį) poveikiais. Antibiotikų veikimo mechanizmai yra labai



1.2 pav. Dauginiu atsparumu pasižyminčių bakterijų procentinės dalies pokyčiai pasaulyje 2004–2014 metais (pagal Giammanco ir kt., 2017).

įvairūs. Chinolonų klasei priklausantys antibiotikai atrankiai prisijungia prie DNR girazės ar topoizomerazės IV aktyviųjų centrų ir tokiu būdu slopina DNR replikaciją. Rifampicinai jungiasi prie RNR polimerazės β subvieneto. Aminoglikozidai, tetraciklinai, chloramfenikoliai ir makrolidai slopina baltymų sintezę, prisijungdami prie ribosomos subvienetų. Sulfonamidai ir trimetoprimas bakterijoje slopina folio rūgšties biosintezę. Plačiausiai vartojama antibiotikų klasė – β -laktamai – slopina bakterijos sienelės sintezę, blokuodami transpeptidazių (PBP), atsakingų už peptidoglikano grandinių sujungimą per šoninius oligopeptidus, veikimą.

A. baumannii išvystė įvairius antibiotikų nukenksminimo mechanizmus (1.3 pav.). Antibiotikų patekimas į ląstelę gali būti ribojamas sumažinant antibiotikus pernešančių porinų (OmpF, OprD ir kt.) veiklą. Į bakterijos vidų jau patekusius junginius aktyvios pernašos būdu gali pašalinti išnešimo siurbliai (angl. *efflux pumps*). Prie *A. baumannii* atsparumo antibiotikams prisideda ir palyginus mažas išorinės membranos pralaidumas (Wong ir kt., 2017). Tą daugiausiai lemia išorinėje membranoje esantis nedidelis kiekis mažos molekulinės masės porinų. Parodyta, kad *A. baumannii* išorinės membranos pralaidumas cefalosporinams yra 2-17 kartų mažesnis palyginus su *P. aeruginosa* pralaidumu (Vila ir kt., 2007). *A. baumannii* bakterijose nuslopinta plataus substratinio specifiškumo antibiotikų nešiklių (AdeABC ir AdeIJK) raiška. Padidėjusi antibiotiko taikinio raiška taip pat gali sukelti atsparumą antibiotikams dėl funkcinio kompensavimo (Munita ir Arias, 2016). Visi šie veiksniai apsunkina antimikrobinių medžiagų veikimą.



1.3 pav. *A. baumannii* išvystyti atsparumo β -laktamų, aminoglikozidų, chinolonų ir kolistino klasių antibiotikams mechanizmai. AMF – aminoglikozidus modifikuojantys fermentai; PBP – peniciliną surišantis baltymas (pagal Asif ir kt., 2018).

Apsaugai nuo tetraciklino tarp *A. baumannii* plinta *tet* grupės genai, koduojantys antibiotikų išnašos siurblius ir apsauginius ribosomų baltymus, blokuojančius tetraciklino prisijungimą. Aminoglikozidų klasės antibiotikus bakterijos dažniausiai nukenksmina juos modifikuodamos fermentų pagalba. Tam naudojamos savitosios acetiltransferazės (AAC), nukleotidiltransferazės (ANT) ar fosfotransferazės (APH) (Van Hoek ir kt., 2011). Taip pat klinikiuose *A. baumannii* izoliatuose nustatytas *armA* genas, koduojantis 16S rRNR metilazę, kuri apsaugo nuo aminoglikozidinių antibiotikų jungimosi prie ribosomos (Doi ir kt., 2007). Prieš chinolonų klasės antibiotikus, kurie dažnai naudojami klinikoje, *A. baumannii* tampa atsparios atsiradus spontaninėms mutacijoms *gyrA* ir *parC* genuose, atitinkamai koduojančiuose DNR girazę ir topoizomerazę IV, todėl antibiotikai negali specifiskai jungtis prie šių fermentų ir tokiu būdu slopinti DNR sintezę (Ugolotti ir kt., 2016). β -laktamus bakterijos gali hidrolizuoti pasitelkdamos specifines β -laktamazės. Iš viso bakterijose nustatyta > 300 skirtingų β -laktamazių (Van Hoek ir kt., 2011). Kitas būdas nukenksminti β -laktaminių antibiotikų veikimą yra pakitusio taikinio-transpeptidazės (PBP), prie kurio negali jungtis antibiotikas, sintezė.

Iki šiol klinikoje gausiausiai vartojami antibiotikai β -laktamai, pagal savo β -laktamo žiedo modifikacijas, skirstomi į klases, iš kurių dažniausiai vartojami karbapenemai, monobaktamai, karbacefemai, oksacefenai. *A. baumannii* antibiotikus hidrolizuoja naudojamos įvairias β -laktamazės. Šie fermentai skirstomi į tipus, priklausomai nuo jų substratinio specifiskumo. *A. baumannii* savo genomuose ar plazmidėse dažniausiai koduoja cefalosporinazes (AmpC), oksacilinazes (OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-51, OXA-58), išplėsto spektro β -laktamazės (ESBL). Didžiausią susirūpinimą kelia išplitęs atsparumas karbapenemams, kuriuos hidrolizuoja karbapenemazės: serino oksacilnazės ir metalo- β -laktamazės (MBL) (Dortet ir kt., 2014). Išplėsto spektro β -laktamazės lemia didžiausią dalį *A. baumannii* atsparumo karbapenemams atvejų (Labarca ir kt., 2016). *bla*_{OXA-23} genas pirmą kartą nustatytas 1985 m. ir nuo tada izoliatai, turintys šį geną, išplito po viso pasaulio ligonines (Amudhan ir kt., 2011). Pastaruoju metu stebimas intensyvesnis *A. baumannii* izoliatų, priklausančių IC II klonui, plitimas lyginant su IC I izoliatais. Manoma, kad plitimą bent iš dalies galėjo lemti IC II izoliatuose dažniau aptinkami atsparumą karbapenemams lemiantys genai. IC II izoliatuose žymiai dažniau nustatomi karbapenemazes koduojantys genai *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24/40}, nors atsparumą aminoglikozidams lemiantys genai *aadB*, *aacC1*, *aphA6*, *aphA1* yra dažnesni IC I klonu izoliatuose, kurie, matyt, neatsveria karbapenemazių teikiamos

naudos bakterijų išlikimui klinikoje (Minandri ir kt., 2012; Povilonis ir kt., 2013; Kim ir kt. 2017b; Pournaras ir kt., 2017).

Prie *A. baumannii* atsparumo karbapenemams taip pat prisideda ir peniciliną prijungiančių baltymų (angl. *penicilin binding protein*, PBP) modifikacijos bei išorinės membranos baltymų veikimas (Zarrilli ir kt., 2013). *A. baumannii* 29 kDa CarO baltymas – išorinės membranos porinas – gali pernešti tiek meropenemą, tiek imipenemą (Catel-Ferreira ir kt., 2011), o esant antibiotikų spaudimui sumažėja CarO ar kito porino – OprD – raiška (Morán-Barrio ir kt., 2017). Neseniai nustatyta, kad *A. baumannii* AB5075 izoliatai su kai kuriais išorinės membranos poriniais (OmpA, CarO, OmpW) sąveikauja karbapenemazė OXA-23 (Wu ir kt., 2016a), kas taip pat galėtų lemti išaugusį atsparumą šios klasės antibiotikams.

Dėl išaugusio atsparumo įvairių klasių antibiotikams, šiuo metu su *A. baumannii* infekcijomis kovojama pasitelkiant kolistiną (polimiksinas E) kaip paskutinę antimikrobinę priemonę. Nors antibiotikas atrastas dar praėjusio amžiaus viduryje, dėl toksiškumo inkstams ir nervų sistemai jo buvo atsisakyta. Vis dėlto, po kurio laiko jis buvo vėl grąžintas klinikiniam naudojimui dėl DAA fenotipo atsiradimo bakterijose. Kolistinas yra polikationinis polipeptidas, turintis tiek hidrofilinę, tiek hidrofobinę sritis. Kolistinas sąveikauja su bakterijų lipopolisacharido (LPS) lipidu A išstumdamas kalcio ir magnio jonus. Be to hidrofobinės kolistino grupės įsiterpia į išorinę membraną ir taip ją destabilizuoja. Nerimą kelia tai, kad ligoninėse intensyvėjant kolistino naudojimui, atsiranda jam atsparūs izoliatai. 2017 m. duomenimis kolistinui atsparių bakterijų aptikta penkiuose žemynuose (>30 šalių) (Yi ir kt., 2017). *A. baumannii* atsparumą kolistinui įgauna naudodama du mechanizmus (Boinett ir kt., 2019). Pavienių nukleotidų mutacijos *pmrCAB* genų lokuse, kuris koduoja dvikomponentinę reguliacijos sistemą, aktyvina visą eilę genų, koduojančių LPS modifikuojančius fermentus. Suintensyvėjusi fermento fosfatidiletanolamino transferazės sintezė, aktyvina fosfoetanolamino grupės pernašą ant lipido A ir taip apsaugo bakteriją nuo kolistino poveikio (Adams ir kt., 2009). Antras mechanizmas apima pavienių nukleotidų mutacijas už lipido A sintezę atsakinguose genuose *lpxA*, *lpxC* ir *lpxD*, dėl ko bakterijos visai nustoja sintetinti lipidą A. Netekus lipooligosacharidų, sumažėja bakterijų paviršiaus neigiamas krūvis ir teigiamai įkrautas kolistinas nebegali efektyviai jungtis prie *A. baumannii* (Thi Khanh Nhu ir kt., 2016).

Prie DAA bakterijų plitimo pastaraisiais dešimtmečiais ypač prisideda judrieji genomo elementai (plazmidės, integronai, transpozonų atsparumo salos), kuriuose dažniausiai ir yra sutelkti atsparumo genai. *A. baumannii*

pasižymi ypatingu gebėjimu kaupti įvairias atsparumą antibiotikams lemiančias genetines determinantes. Integronai, kaip ir transpozonai, yra genetinės struktūros, užtikrinančios sričiai savitąją DNR rekombinaciją. Integronai koduoja integrazijų *int* genus, atsakingus už atsparumo genų įterpimą ir iškirpimą. Tarp klinikinių *A. baumannii* izoliatų labiausiai paplitę pirmos klasės integronai. Iš atsparumo genus pernešančių plazmidžių dažniausiai aptinkamos GR2 ir GR6 replikonų grupės plazmidės (Povilonis ir kt., 2013; Zarrilli ir kt., 2013). Transpozonai, koduojantys genomines atsparumo salas, gali įsiterpti į plazmides, šalia kitų jau esančių atsparumo genų ir rekombinacijos būdu juos įterpti į savo nešamą atsparumo salą. Tokiu būdu pernešamos atsparumo salos kaupia atsparumo genus ir plinta tarp skirtingų bakterijų. Dažnai tokios atsparumo salos gali koduoti įspūdingą skaičių atsparumą lemiančių genetinių determinančių. Prancūzijoje DAA fenotipu pasižyminčiame *A. baumannii* izolate buvo pirmą kartą nustatytas 86-kb regionas, vadinamas AbaR1 atsparumo sala (Fournier ir kt., 2006). Šioje saloje aptikti net 45 atsparumo genai, tarp kurių – VEB-1, AmpC, OXA-10 β-laktamazės ir įvairūs aminoglikozidus modifikuojantys fermentai bei antibiotikų išmetimo siurbliai. Vėliau nustatyta 37,8 kb atsparumo sala, pavadinta R1215, sukaupusi *aacC1*, *aadA1*, *aphA1b*, *blaTEM*, *catA1*, *sulI* ir *tetA* genus, kurie lemia atsparumą gentamicinui, streptomycinui, spektinomycinui, kanamicinui, ampicilinui, chloramfenikoliui, sulfamethoksazolui ir tetraciklinui (Blackwell ir kt., 2016). Ši sala, nors ir su savitais genetiniais skirtumais, randama IC I ir IC II klonų izoliatuose, kas liudija evoliuciškai ankstyvą atsparumo genų kaupimą *A. baumannii* genomuose. Daugybė kitų mažesnių atsparumo genų salų, pvz. ISAbal, ISAbag ir kt., buvo nustatytos įvairiose pasaulio ligoninėse išskirtuose *A. baumannii* izoliatuose (Sung ir kt., 2012; Kim ir Ko, 2015). Lietuvoje paplitusiems *A. baumannii* izoliatams taip pat būdingos atsparumo salos, siejamos su atsparumu tetraciklinams bei aminoglikozidams (Šeputienė ir kt., 2012). Be to, išskirtinai IC II izoliatuose nustatyta pAB120 plazmidė, koduojanti geną *bla_{OXA-72}*, lemiantį atsparumą karbapenemams (Povilonis ir kt., 2013). Svarbu paminėti, kad tiek atsparumo salose, tiek kituose judriuosiuose geno elementuose esančios genetinės determinantės yra linkusios persitvarkyti, kisti tarp individualių *A. baumannii* izoliatų, tokiu būdu sukuriant naujas atsparumo genų kombinacijas (Blackwell ir kt., 2016).

1.2. Su virulentiškumu siejami *A. baumannii* veiksniai

Acinetobacter spp. bakterijos aptinkamos įvairiose aplinkose – dirvožemyje, vandens telkiniuose, ant augalų ir gyvūnų, taip pat ir ant žmogaus odos. Kai kurios *Acinetobacter* rūšys, pvz. *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. nosocomialis* ir *A. pittii* gali sukelti infekcijas imunosupresuotiems individams, tačiau ligoninėse labiausiai paplitusi ir didžiausią riziką kelia *A. baumannii* (Wong ir kt., 2017). Šios rūšies bakterijos retai randamos ant žmogaus odos ar kitose aplinkose ir dažniausiai aptinkama tik ligoninėse, todėl sunku nusakyti bakterijų pirminį paplitimo šaltinį.

2007 m. atlikta pirmojo *A. baumannii* ATCC 17978 genomo sekoskaita atskleidė, kad net 17,2 % visų skaitymo rėmelių sekų yra susitelkusios 28-iose ne *A. baumannii* kilmės genetinėse salose (Smith ir kt., 2007a). Net 16-oje iš jų aptikti genai, kitose bakterijose siejami su virulentiškumu, pvz. IV tipo sekrecijos sistemos komponentai, su ląstelės sienelės sinteze siejami veiksniai, pilių sintezės komponentai, geležies įsisavinime dalyvaujantys ir su atsparumu antimikrobinėms medžiagoms susiję veiksniai (1.1 lentelė).

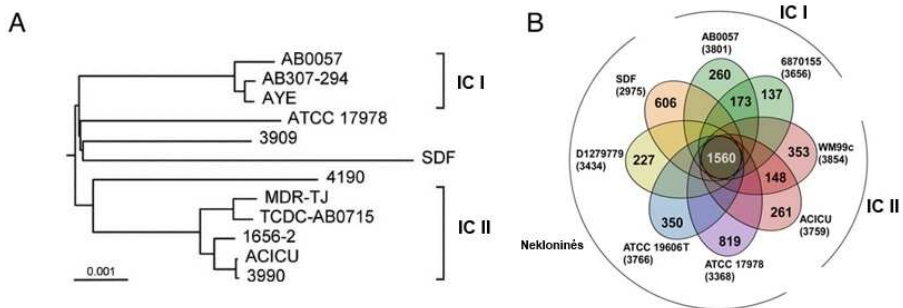
Skirtingų *A. baumannii* izoliatų genomų palyginimas atskleidė išskirtinai didelį bakterijos genomo plastiškumą. Skirtingiems izoliatams būdinga nevienoda kintamoji genomo dalis (nerandama visuose *A. baumannii* genomuose), didesnę tokio genomo dalį turėjo IC II izoliatai (Imperi ir kt., 2011).

1.1 lentelė. *A. baumannii* ATCC 17978 genome rastos ne *A. baumannii* kilmės genetinės salos. Vaidmuo patogenezėje nustatytas pagal homologiją su kitomis patogeninėmis bakterijomis arba iš funkcinių tyrimų (pagal Smith ir kt., 2007a).

Ne <i>A. baumannii</i> kilmės genetinė sala	Regionas (pradžios ir pabaigos genų nr.)	Funkcija	Galimas vaidmuo patogenezėje
1	54-70	Ląstelės sienelės apykaita	Taip
2	119-130	Autoinduktoriaus sintezė	Taip
3	213-226	Nežinomos funkcijos baltymai	Ne
4	642-748	IV tipo sekrecijos sistema	Taip
5	796-809	Aminorūgščių metabolizmas	Ne
6	981-995	Antimikrobinis atsparumas	Taip
7	1164-1192	Aminorūgščių metabolizmas	Taip
8	1382-1399	Ksenobiotikų degradacija	Ne
9	1409-1426	Ląstelės metabolizmo baltymai	Ne
10	1455-1542	Fenilacto rūgšties sintezė	Ne
11	1566-1580	Aminorūgščių metabolizmas	Ne
12	1602-1617	Taurino metabolizmas/atsparumas arsenui	Ne
13	1665-1681	Pilių sintezė ir išnaša	Taip
14	1755-1814	Nežinomos funkcijos baltymai	Taip

15	1863-1878	Vitamino B ₁₂ metabolizmas	Ne
16	1919-1934	Antimikrobinis atsparumas	Taip
17	1962-1999	Antimikrobinis atsparumas	Taip
18	2012-2103	Antimikrobinis atsparumas	Taip
19	2190-2201	Aminorūgščių metabolizmas	Taip
20	2261-2313	Nežinomos funkcijos baltymai	Taip
21	2349-2368	Geležies įsisavinimas	Taip
22	2581-2594	Antimikrobinis atsparumas	Taip
23	2659-2704	Antimikrobinis atsparumas	Taip
24	2942-2960	Ląstelės metabolizmo baltymai	Ne
25	3246-3276	Atsparumas sunkiesiems metalams	Ne
26	3346-3355	Lipidų metabolizmas	Ne
27	3600-3616	Nežinomos funkcijos baltymai	Ne
28	3760-3780	Antimikrobinis atsparumas	Taip

Atlikus filogenetinę genomų analizę, aiškiai išsiskyrė IC I ir IC II izoliatai (1.4 pav., A). *A. baumannii* turėjo vidutiniškai apie ketvirtadalį genų, unikalių kiekvienam analizuotam izoliatui, lyginant su bendru koduojančių sekų skaičiumi (1.4 pav., B). Genai, kurie buvo rasti visuose *A. baumannii* izoliatuose, buvo susiję su įvairiais ląstelės metaboliniais procesais, adhezija ir judėjimu, tarpląsteliniu jutimu (angl. *cell-cell sensing*), geležies įsisavinimu bei atsparumu antimikrobinėms medžiagoms. Taigi, didžioji dauguma su virulentiškumu susijusių genų buvo randami visuose tirtuose genomuose ir nebuvo saviti konkrečiai vienai bakterijai. Tai galėtų liudyti, kad, kitaip nei atsparumą antibiotikams lemiančių genų atveju, *A. baumannii* izoliatai nėra linkę įsisavinti naujų su virulentiškumu siejamų genų, o jų patogeniškumas pasireiškia dėl virulentinių veiksnių, kurie buvo būdingi *A. baumannii* pirmtakui, iš kurio evoliucionavo šiuo metu klinikinėje aplinkoje cirkuliuojantys izoliatai. Šią prielaidą patvirtina ir tai, kad lyginant per pastarąjį dešimtmetį išskirtus *A. baumannii* izoliatus su daugiau nei prieš penkiasdešimtmetį aptiktu ATCC 17978 izoliatu, bendras geno dydis liko beveik nepakitęs, o visi su virulentiškumu siejami genai aptinkami ir anksčiau išskirtuose izoliatuose. Vis dėlto, tarpusavyje lyginant IC I ir IC II izoliatų genomus, buvo nustatyti tam tikri pokyčiai ir genuose, susijusiuose su virulentiškumu (Eijkelkamp ir kt., 2014). IC II klonu izoliatai linkę dažniau koduoti papildomus, su virulentiškumu siejamus genus, pvz. išorinės membranos adhezinus Ata ir OmpA-17, fosfoetanolamino transferazę EptA ir už IV tipo pilių glikozilinimą atsakingą oligosachariltransferazę TfpO. Taip pat, buvo aptikti keli su virulentiškumu susiję veiksniai, daugiausia su įvairių sideroforų sintezės sistemomis susiję genai, būdingi tik konkretiems pavieniams izoliatams (Sahl ir kt., 2013).



1.4 pav. Skirtinguose *A. baumannii* genomuose koduojamų sekų palyginimas. A – pandeminiams klonams priklausančių ir unikalių izoliatų filogenetinė analizė (pagal Imperi ir kt., 2011). B – pandeminiams klonams priklausančių ir unikalių izoliatų genų persidengimai (pagal Eijkelkamp ir kt., 2014).

Siekiant nustatyti potencialius *A. baumannii* virulentiškumo veiksnius, tarpusavyje lyginti klinikinės kilmės *A. baumannii* genomai su ne antropogeninės kilmės *A. baumannii* SDF izoliato (iš blusos) genomu, taip pat su nepatogeninės dirvožemyje aptinkamos artimos rūšies – *Acinetobacter baylyi* – genomu. Rezultatai parodė, kad *A. baylyi* genomas neturėjo 475 klinikinės kilmės *A. baumannii* genų, iš kurių beveik pusės neturėjo *A. baumannii* SDF izoliatas. Vis dėlto, didžioji dauguma šių genų buvo susiję su bendrais metaboliniais procesais, transkripcijos reguliavimu ir tik keli genai buvo susiję su acilhomoserino laktono kvorumo sistema (angl. *quorum sensing system*) ir pilių komponentais. Be to, papildomi tyrimai parodė, kad *A. baumannii* bakterijoms acilhomoserino laktono kvorumo sistema nėra svarbi modelinio organizmo *Galleria mellonella* kolonizavimui (Peleg ir kt., 2009). Galiausiai, *A. baumannii* genomuose nebuvo nustatyta žinomų toksinų – citoliziniu ar hemoliziniu aktyvumu pasižyminčių baltymų – homologų. Tai rodo, kad *A. baumannii* patogeniškumas galėtų būti išreikštas tik per išskirtinį šio patogeno gebėjimą prisitaikyti prie ligoninės aplinkos ir kolonizuoti infekuotą organizmą naudojant įprastai visoms bakterijoms būdingas savybes, pvz. judėjimo, geležies įsisavinimo, kvorumo jutimo ir kitus mechanizmus. Taip pat svarbu tai, kad *A. baumannii* genomuose yra bene dvigubai daugiau transkripcijos reguliatorių, negu jų turi *A. baylyi* genomas. Todėl pagrįstai manoma, kad *A. baumannii* virulentiškumas galėtų būti skirtingos genų raiškos pasekmė (Antunes ir kt., 2014).

Su virulentiškumu susijusių *A. baumannii* genų nustatymui dažniausiai pasitelkiamos transpozonų mutantų bibliotekos, mutantinius klonus atrenkant pagal konkrečias fenotipines savybes. Deja, dėl atrankos sistemų

netobulumo (neatitikimo realioms infekcijos sąlygomis) mutantų bibliotekos nepadėjo nustatyti naujų toksinų ar patogenezės mechanizmų. Kita strategija remiasi virulentiškumo veiksnių, randamų kitose patogeninėse bakterijose, homologų paieška *A. baumannii* genomuose. Tokiu būdu buvo nustatytos, pvz. baltymų glikozilinimo ir sekrecijos sistemos (Harding ir kt., 2018a).

Iki šiol nustatyti su *A. baumannii* virulentiškumu siejami veiksniai ir jų įtaka patogenizei apibendrinti 1.2 lentelėje. Reikia pastebėti, kad dauguma iki šiol paskelbtų *A. baumannii* virulentiškumo tyrimų atlikti naudojant prieš >50 m. išskirtus, prie laboratorijos sąlygų prisitaikiusius ir mažu virulentiškumu pasižyminčius izoliatus – daugiausiai ATCC 17978 ir ATCC 19606 (Wong ir kt., 2017). Dėl genetinių ir molekulinų įrankių, tinkamų tirti klinikinius izoliatus, trūkumo, itin stokojama duomenų apie šiuo metu ligoninėse cirkuliuojančių bakterijų virulentines savybes.

1.2 lentelė. Su virulentiškumu siejami *A. baumannii* veiksniai (pagal Lee ir kt., 2017).

Virulentiškumo veiksnys	Pasiūlytas vaidmuo patogenezėje	Šaltiniai
Porinai (OmpA, Omp33-36, Omp22, CarO, OprD-like)	Adhezija ir invazija, apoptozės indukcija, atsparumas serumui, bioplėvelių formavimas, atsparumas antimikrobinėms medžiagoms	Choi ir kt., 2005; Gaddy ir kt., 2009; Kim ir kt., 2009; Lee ir kt., 2010; Fernandez-Cuenca ir kt., 2011; Smani ir kt., 2012; Rumbo ir kt., 2014; Wang ir kt., 2014; Huang ir kt., 2016
Kapsulės polisacharidai	Atsparumas serumui, išgyvenimas audinių infekcijos modelyje, bioplėvelių formavimas	Russo ir kt., 2010; Iwashiki ir kt., 2012; Lees-Miller ir kt., 2013
Fosfolipazė (PLC ir PLD)	Atsparumas serumui, invazija, išgyvenimas <i>in vivo</i>	Camarena ir kt., 2010; Jacobs ir kt., 2010; Stahl ir kt., 2015; Fiester ir kt., 2016
Bap	Bioplėvelių formavimas, adhezija	Loehfelm ir kt., 2008
Išorinės membranos pūslelės (angl. <i>outer membrane vesicle</i>, OMV)	Virulentiškumo veiksnių ir antibiotikams atsparumą lemiančių genų pernaša	Kwon ir kt., 2009; Jin ir kt., 2011; Rumbo ir kt., 2011; Moon ir kt., 2012; Jun ir kt., 2013; Li ir kt., 2015
Geležies įsisavinimo sistema (acinetobaktinas ir NfuA)	Išgyvenimas <i>in vivo</i> , atsparumas antimikrobinėms medžiagoms, infekuotų ląstelių gyvybingumo mažinimas	Gaddy ir kt., 2012; Penwell ir kt., 2012; Zimbler ir kt., 2012; Fiester ir kt., 2016; Megeed ir kt., 2016
Cinko įsisavinimo sistema (ZnuABC ir ZigA)	Išgyvenimas <i>in vivo</i>	Hood ir kt., 2012; Nairn ir kt., 2016
Magnio įsisavinimo sistema (MumC ir MumT)	Išgyvenimas <i>in vivo</i>	Juttukonda ir kt., 2016
II tipo sekrecijos	Išgyvenimas <i>in vivo</i>	Johnson ir kt., 2015;

sistema		Elhosseiny ir kt., 2016; Harding ir kt., 2016
VI tipo sekrecijos sistema	Konkuruojančių bakterijų žudymas, šeimininko kolonizavimas	Carruthers ir kt., 2013; Wright ir kt., 2014; Jones ir kt., 2015; Repizo ir kt., 2015; Ruiz ir kt., 2015
V tipo sekrecijos sistema	Bioplėvelės formavimas, adhezija	Bentancor ir kt., 2012a
Peniciliną besijungiantis baltymas 7/8 ir β-laktamazė PER-1	Atsparumas serumui, išgyvenimas <i>in vivo</i> , adhezija	Sechi ir kt., 2004; Russo ir kt., 2009
Prie plazminogeno besijungiantis baltymas CipA	Atsparumas serumui, invazija	Koenigs ir kt., 2016
Elongacijos faktorius Tuf	Atsparumas serumui	Koenigs ir kt., 2015
DNR pažaidas taisantis baltymas RecA	Atsparumas džiūvimui, išgyvenimas <i>in vivo</i>	Aranda ir kt., 2011
Šaperonas SurA1	Atsparumas serumui, išgyvenimas <i>in vivo</i>	Liu ir kt., 2016
Reguliatorių sistema GigABCD	Išgyvenimas <i>in vivo</i> , infekuotų ląstelių gyvybingumo mažinimas	Gebhardt ir kt., 2015
Streso baltymas UspA	Išgyvenimas <i>in vivo</i> , infekuotų ląstelių gyvybingumo mažinimas	Elhosseiny ir kt., 2015; Gebhardt ir kt., 2015
Dvikomponentinė sistema GacS ir PaaE	Neutrofilų aktyvinimas	Cerqueira ir kt., 2014; Gebhardt ir kt., 2015; Bhuiyan ir kt., 2016
Pilės	Adhezija, bioplėvelės formavimas	Tomaras ir kt., 2008
Dvikomponentinė sistema OmpR/EnvZ	Infekuotų ląstelių gyvybingumo mažinimas	Tipton ir Rather, 2016
Dvikomponentinė sistema FhaBC	Adhezija, infekuotų ląstelių gyvybingumo mažinimas	Perez ir kt., 2016
RND tipo nešiklis AbeD	Infekuotų ląstelių gyvybingumo mažinimas	Srinivasan ir kt., 2015

Bakterijų virulentiškumo tyrimams naudojamos įvairios modelinės sistemos *in vitro* ir *in vivo*. Tokiose sistemose tiriamas, pvz. bakterijų prisitaikymas prie aplinkos sąlygų arba sąveika su infekuotu organizmu. *In vitro* tyrimai leidžia tirti bakterijų virulentiškumo pasireiškimą naudojant sąlyginai paprastus laboratorijoje įprastus metodus, pvz. atsparumo antimikrobinėms medžiagoms ar stresinėms sąlygoms bei adhezijos ant plastiko paviršiaus ar ant ląstelių kultūrų tyrimus. Vis dėlto, *in vitro* tyrimų duomenys ne visada sutampa su *in vivo* modeliuose gaunamais rezultatais. Tai galima paaiškinti tuo, kad natūraliai organizme vykstant infekcijai bakterijos susiduria ir kovoja su daugiakomponenčiu infekuoto organizmo

atsaku, kurį atkartoti laboratorinėmis sąlygomis gana sunku. Dalis tyrimų rodo ryšį tarp atskirų virulentiškumo įvertinimo metodų, tačiau kai kuriais atvejais rezultatai, gauti naudojant skirtingas vertinimo sistemas, tarpusavyje nesutampa (Lazaro-Diez ir kt., 2016). Nemažai diskusijų kyla ir dėl virulentiškumo tyrimams naudojamų *in vivo* metodų. Dažniausiai gyvūnų modeliuose naudojamos pelės. *A. baumannii* infekcija pelėse gali būti sukeliamą keliais būdais. Dažniausiai naudojami pneumonijos, sepsio ar žaizdos infekcijos modeliai. Priklausomai nuo pasirinkto modelio, infekciją sukelianti bakterijų dozė skiriasi, todėl svarbu įvertinti *A. baumannii* virulentiškumo potencialą tiriant konkretų infekcijos modelį. Pastebėta, kad norint užkrėsti sveikas peles, *A. baumannii* infekcijos dozė turi būti pakankamai didelė. Tai neturėtų stebinti žinant, kad *A. baumannii* yra oportunistinis patogenas. Dėl šios priežasties neretai pelių imunitetas yra papildomai silpninamas, pasitelkiant dirbtinai supresuotas neutropenines (mažą neutrofilų kiekį kraujyje turinčias) peles arba A/J, C3HeB/FeJ pelių linijas (Qiu ir kt., 2009). Vis dėlto, rezultatai, gauti naudojant supresuotų pelių modelius, yra diskutuoti, nes neutropenija nėra būdinga visiems *A. baumannii* infekuotiems pacientams (Freire ir kt., 2016).

A. baumannii tyrimams naudojami ir bestuburių gyvūnų, pvz. nematodo *Caenorhabditis elegans* ir drugio *Galleria mellonella* infekcijos modeliai. Pastebėta, kad šiose modelinėse sistemose *A. baumannii* pasižymi didesniu virulentiškumo potencialu nei kitų rūšių *Acinetobacter* bakterijos, kas vėlgi rodo išskirtinį šios rūšies prisitaikymą infekuoti savo šeimininką (Peleg ir kt., 2009).

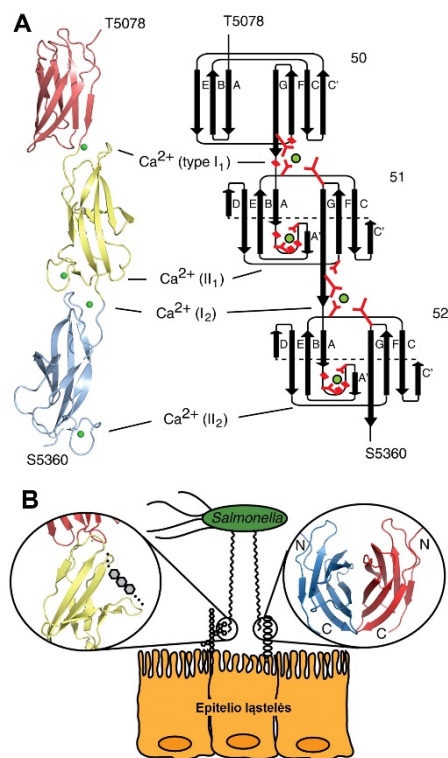
Taigi, vertinant bakterijų patogeniškumą svarbu atkreipti dėmesį, kokie tyrimų modeliai buvo naudojami. Neseniai atliktu tyrimu parodyta, kad du artimų rūšių *A. baumannii* ir *A. pittii* klinikiniai izoliatai nepasižymėjo intensyviu gebėjimu kolonizuoti plaučių ląstelių kultūras *in vitro* modeliuose, nors abu buvo izoliuoti iš sunkios infekcijos būklės ligoninių pacientų (Lazaro-Diez ir kt., 2016). Todėl vertinant bakterijų virulentiškumą, jos turėtų būti ištirtos naudojant kuo daugiau skirtingų tyrimų modelių.

1.2.1. Bioplėvelių formavimas

A. baumannii geba formuoti bioplėveles (angl. *biofilm*) ant abiotinių ar biologinės kilmės (biotinių) paviršių. Ši savybė bakterijoms padeda išlikti ant ligoninėje esančių įrenginių paviršių (Percival ir kt., 2015). Bakterinė bioplėvelė yra struktūra, kurioje iki 80 % tūrio sudaro neląstelinė struktūra, daugiausiai išorinė DNR (angl. *extracellular DNA*, eDNR),

įvairūs polisacharidai, baltymai. Šios molekulės funkcionuoja kaip pastoliai (angl. *scaffold*) bioplėvelės erdvinei struktūrai. *A. baumannii*, gebančios formuoti bioplėvelę, yra atsparesnės išoriniam stresui, taip pat ir antibiotikų poveikiui, nei planktoninės bakterijos (Greene ir kt., 2016).

Bakterijų įsitvirtinimui ant abiotinių ir biotinių paviršių bei bioplėvelės formavimui yra svarbūs paviršiniai baltymai, kurie gali būti ilgės molekulinės struktūros dariniai (fimbrijos ir pilės) arba nepolimeriniai adhezinais. Dauguma *A. baumannii* izoliatų koduoja Csu sistemos (I tipo) pilies. Parodyta, kad šios pilės svarbios formuojant bioplėveles, tačiau jos neturėjo įtakos *A. baumannii* sąveikai su eukariotinėmis ląstelėmis (Tomaras ir kt., 2008; De Breij ir kt. 2009; Pakharukova ir kt., 2018). Vis dėlto, dalis *A. baumannii* savo genomuose neturi Csu sistemos pilių, kas rodo, kad šios pilės nėra vienodai svarbios visiems izoliatams (Wright ir kt., 2016).



1.5 pav. SiiE baltymo iš *S. enterica* Big domenų struktūra. A – 50-52 pasikartojančių domenų organizacija ir kalcio jonų jungimosi vietos. B – spėjama adhezino sąveika su epitelio ląstelių egzopolisacharidais (pilki daugiakampiai) (pagal Griessl ir kt., 2013).

Nepolimeriniai adhezinais taip pat dalyvauja *A. baumannii* bioplėvelės sudaryme. Vienas svarbiausių tokių adhezinių – Bap (angl. *Biofilm-associated protein*) baltymas. *A. baumannii* izoliate AB307-0294 Bap baltymą koduoja 26322 bp dydžio genas (Loehfelm ir kt., 2008). Apie 9000 aminorūgščių baltymas sudarytas iš daugybės pasikartojančių bakterinių, į imunoglobulinus panašių domenų (angl. *Bacterial immunoglobulin-like domains*, Big). Big pasikartojimų turi didelės molekulinės masės adhezinais, kurie padeda bakterijoms adhezuotis prie įvairių paviršių (Lin ir kt., 2010a; Griessl ir kt., 2013; Bodelon ir kt., 2013; Guo ir kt., 2017). *Salmonella enterica* bakterijų 595 kDa adheziną SiiE (1.5 pav.) išlaiko funkcionalią struktūrą dėl Big domenų sąveikos su kalcio jonais ir, manoma, dalyvauja adhezijoje su eukariotinių ląstelių užląsteliniais angliavandeniais. Dėl

didelio geno dydžio ir pasikartojančių sekų, dauguma *A. baumannii* izoliatų turi pertrauktus Bap genus (De Gregorio ir kt., 2015). Bap baltymas C-gale turi pirmos sekrecijos sistemos (T1SS) atpažinimo seką, todėl numanoma jo sekrecija į ląstelės išorę. Šią prielaidą patvirtina ir parodytas Bap baltymo vaidmuo adhezijoje bei bioplėvelės formavime (Loehfelm ir kt., 2008).

1.2.2. Atsakas į aplinkos stresą

A. baumannii pasižymi gebėjimu išgyventi sausoje aplinkoje. Daug veiksnių prisideda prie šios savybės, tačiau iki šiol jie dar nėra gerai apibūdinti *A. baumannii* bakterijose. Atlikus įprastomis sąlygomis augusių *A. baumannii* ir bakterijų, išgyvenusių po ilgalaikio džiūvimo, proteominius tyrimus, nustatyta >700 pakitusios raiškos baltymų (Gayoso ir kt., 2014). Dauguma šių baltymų buvo membranos arba periplazmos komponentai. Padidinta raiška pasižymėjo įvairios pernašos sistemos, antimikrobinį atsparumą suteikiantys baltymai, kvorumo sistemos baltymai, streso indukuojami šaperonai. Tai liudija daugiakomponentinį *A. baumannii* atsaką į stresines aplinkos sąlygas. Neseniai atliktas tyrimas atskleidė, kad 30 parų džiūvimą išgyvenusių *A. baumannii* dalis nesiskyrė nuo gyvybingų bakterijų dalies (Bravo ir kt., 2016). Tai paneigė prieš tai vyravusį požiūrį, kad *A. baumannii* atsparumą džiūvimui nulemia bakterijų perėjimas į ramybės būsenos ląsteles.

Prie atsparumo džiūvimui prisideda ir jau minėtas gebėjimas formuoti bioplėvelę. *A. baumannii*, kurios buvo linkusios sudaryti storesnę bioplėvelės struktūrą, buvo atsparesnės sausoms aplinkos sąlygoms (Chiang ir kt., 2018). Manoma, kad taip yra dėl to, kad didžiąją dalį bioplėvelės sudaro įvairūs neląsteliniai komponentai, kurie gali sulaikyti vandenį struktūros viduje. Jau seniai pastebėta, kad įvairių bakterijų į išorę sekretuojami glikokonjugatai prisideda prie bakterijų atsparumo džiūvimui (Ophir ir Gutnick, 1994). Neseniai parodyta, kad *A. baumannii* mutantas, turintis sutrikusią lipooligosacharido (LOS) acilinimo sistemą, buvo jautresnis džiūvimui ir antimikrobiniams peptidams (Boll ir kt., 2015), kas patvirtino ląstelės sienelės svarbą atsake į aplinkos stresą. Manoma, kad LOS pažeidimas galėjo turėti įtakos ląstelės išorinės membranos pralaidumui, dėl ko džiūvimo metu bakterijos sparčiau neteko vandens. Ląstelei džiūstant, vyksta įvairios DNR pažeidimų, todėl nenuostabu, kad parodytas ir DNR pažeidimas taisančio baltymo RecA vaidmuo atsake į aplinkos stresą (Aranda ir kt., 2011).

Įdomu tai, kad *A. baumannii* ypatingai atsparios ne tik džiūvimui, bet ir oksidaciniam stresui. Kol kas dar nėra aiškūs šio atsparumo molekuliniai

mechanizmai, tačiau atsparumo salos ISAbal lokuse buvo rastas katalazės genas *katG*, kurio raiška padidėjo didinant vandenilio peroksido koncentraciją terpėje (Wright ir kt., 2017).

Taigi, nors kol kas iki galo dar nėra suprastas *A. baumannii* atsako į stresines aplinkos sąlygas vaidmuo patogenezėje, atkreipiant dėmesį į tai, kad bakterijos plinta per lignoninėse esančių įrenginių paviršius, manoma, kad atsparumas džiūvimui ir oksidaciniam stresui turėtų būti svarbus virulentiškumo veiksnys.

1.2.3. Bakterijų judrumas

Nors *Acinetobacter* pavadinimas apibūdina nejudančias bakterijas, tai yra klaidinantis pavadinimas, nes *A. baumannii* ir dalis kitų artimų rūšių geba šliaužti ant abiotinių paviršių. Bakterijos gali pasižymėti ropojimo (angl. *swarming*) arba trūkčiojimo (angl. *twitching*) tipų judėjimais. Laboratorijos sąlygomis ropojimo fenotipas stebimas ant mažos koncentracijos agaro paviršiaus, o trūkčiojimo fenotipas – tarp agaro ir plastiko paviršių. Pastebėta, kad *A. baumannii* mutantas, pasižymintis išreikštu šliaužimo fenotipu, pasižymėjo virulentiškesniu fenotipu gyvūnų modelyje (Eijkelkamp ir kt., 2013), todėl judėjimas taip pat imtas vertinti kaip vienas iš virulentiškumo veiksmų.

Trūkčiojimas yra universali daugelio bakterijų naudojama judėjimo sistema. *A. baumannii* šio tipo judėjimui naudoja ketvirto tipo pilies, kurios, nuolatos susitraukdamos ir atsipalaiduodamos padeda bakterijoms judėti į priekį (Harding ir kt., 2013). Nors tiesioginio ryšio tarp *A. baumannii* trūkčiojimo judėjimo ir virulentiškumo nėra nustatyta, pastebėta, kad pilių struktūrinių baltymų raiška padidėja bakterijoms augant žmogaus serume (Jacobs ir kt., 2012). Tuo tarpu ropojimo fenotipas plačiai ištirtas *P. aeruginosa* bakterijose, kur jis siejamas su žiuželiais (Kearns, 2010). Visgi *A. baumannii* neturi žiuželių, todėl nėra aišku, kokie veiksniai bakterijoms padeda judėti ant kietų paviršių. Keli tyrimai parodė ryšį tarp kvorumo jutimo, lipooligosacharidų raiškos ir ropojimo fenotipo (McQueary ir kt., 2012; Skiebe ir kt., 2012), tačiau detalesni mechanizmai kol kas nėra išaiškinti.

Neseniai atskleistas *A. baumannii* gebėjimas keisti fenotipą formuojant skaidrias (angl. *translucent*) arba neperšviečiamas (angl. *opaque*) kolonijas (Tipton ir Rather, 2016). Neperšviečiamas kolonijas formuojančios bakterijos pasižymėjo labiau išreikštu ropojimo judėjimu, taip pat buvo atsparesnės antimikrobinėms medžiagoms bei pasižymėjo padidėjusiu

virulentiškumu pelės infekcijos modelyje (Chin ir kt., 2018). Fenotipo perjungimo mechanizmas bei jo reikšmė nėra aiškūs. Nustatyta, kad su tokiu fenotipų pasikeitimu yra susiję *A. baumannii* genome koduojami TetR šeimos transkripcijos represoriai ir dvikomponentinė sistema OmpR/EnvZ (Tipton ir Rather, 2016; Chin ir kt., 2018).

1.2.4. Šeimininko kolonizavimas

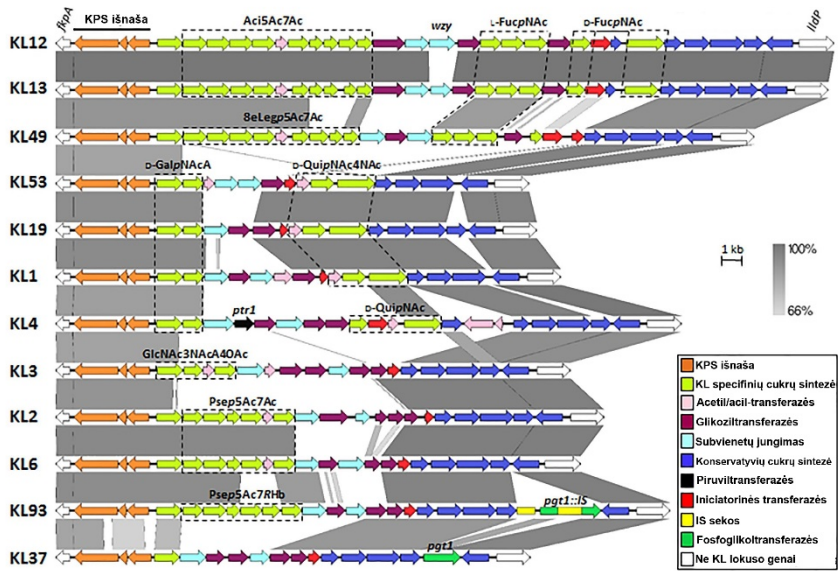
Antibiotikų terapijai tampant neveiksmingai prieš *A. baumannii* infekcijas, ieškoma naujų būdų DAA bakterijų sukeltų infekcijų gydymui. Tam būtina išaiškinti, kokie veiksniai atsakingi už šeimininko kolonizavimą ir infekcijos plitimą užkrėstame individe. Oportunistiniai patogenai negamina toksinų, pasižyminčių letaliu poveikiu šeimininko ląstelėms, todėl veiksniai, lemiančių bakterijų patogeniškumą, identifikavimas yra sudėtingas.

Bakterijų lipopolisacharidai (LPS) yra imuninę atsaką stipriausiai stimuliuojančios bakterijų molekulės. Jas atpažįsta fagocituojančios ląstelės per TLR-4 receptorių, dėl ko išsivysto uždegiminis atsakas. LPS molekulė sudaryta iš išorinėje membranoje esančio lipido A, šerdinio oligosacharido ir O-antigeno (iš pasikartojančių vienetų sudaryto polisacharido). Dar 2000 m. Traub ir Bauer pateikė *A. baumannii* serotipavimo schemą, paremtą polikloninių antikūnų sąveika su bakteriniais sacharidais (Traub ir Bauer, 2000). Visgi nustačius pirmąsias *A. baumannii* genomo sekas paaiškėjo, kad genomuose nėra O-antigeno ligazės homologo geno (Hu ir kt., 2013). *A. baumannii*, kaip ir dalis kitų žmogaus patogenų, pvz. *Neisseria* ar *Campylobacter*, vietoje LPS sintetina tik sutrumpintą jo variantą, kuris yra be O-antigeno dalies – vadinamąjį lipooligosacharidą – LOS. Vis dėlto, LOS taip pat intensyviai stimuliuoja imuninę sistemą (Colombo ir kt., 2018).

Paaiškėjo, kad Traub ir Bauer sukurta serotipavimo sistema yra paremta antikūnų gebėjimu atpažinti egzopolisacharidinės kapsulės komponentus. Bakterijos kapsulė – tai ląstelės apvalkalui priklausanti išorinė struktūra, sudaryta iš ilgų polisacharidinių grandinių. *A. baumannii* pasižymi itin didele kapsulės tipų įvairove, kuri atsiranda dėl skirtingų kapsulės (K) lokuso koduojamų genų (Hu ir kt., 2013; Singh ir kt., 2019) (1.6 pav.). Tai apsunkina ne tik *A. baumannii* detekciją, bet ir specifinių taikinių, tinkamų naujos kartos terapijoms vystyti, identifikavimą. Parodyta, kad egzopolisacharidinė kapsulė svarbi apsisaugant nuo serumo komplemento sukeliama žudymo (Lees-Miller ir kt., 2013). *A. baumannii* kapsulės mutantas nesugebėjo įsitvirtinti infekuotame organizme (žiurkės infekcijos modelyje) (Russo ir kt., 2010). Negana to, parodyta, kad antibiotikų

(chloramfenikolio ir eritromicino) spaudimas skatina *A. baumannii* intensyviau sintetinti egzopolisacharidinę kapsulę, kas lėmė didesnę atsparumą komplemento sistemai (Geisinger ir Isberg, 2015). Nustatyta, kad tokia kapsulės sintezės indukcija reguliuojama dvikomponentinės sistemos BfmRS, kuri reguliuoja ir kitus, su *A. baumannii* virulentiškumu susijusius mechanizmus – bioplėvelių formavimą ar adheziją prie eukariotinių ląstelių (Liou ir kt., 2014).

A

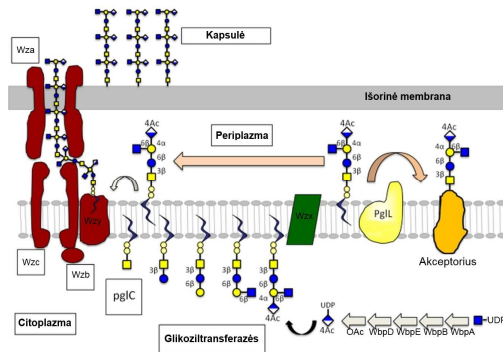


B

K12 [3]-α-o-GalpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-o-FucpNAc-(1→), α-Aci5Ac7Ac-(2→6) ^H	K13 [4]-α-o-Galp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-o-FucpNAc-(1→), α-Aci5Ac7Ac-(2→6) ^H
K49 [3]-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-o-GlcpNAc-(1→8)-α-SeLeg5Ac7Ac(2→),	K53 [3]-α-o-GalpNAcA-(1→3)-β-o-QuipNAc4NAc-(1→),
K19 [3]-α-o-GalpNAc-(1→4)-α-D-GalpNAcA-(1→3)-β-o-QuipNAc4NAc-(1→),	K1 [4]-α-o-GlcpNAc-(1→4)-α-o-GalpNAcA-(1→3)-β-o-QuipNAc4NAc-(1→),
K4 Pyr(2→4), α-o-GlcpNAc-(1→6), [4]-α-o-GalpNAc-(1→4)-α-o-GalpNAcA-(1→3)-α-o-QuipNAc4NAc-(1→),	K3 β-GlcNAc3NAcA4OAc-(1→4), [3]-α-Galp-(1→6)-β-Glcp-(1→3)-β-GalpNAc-(1→), β-GlcpNAc-(1→6) ^H
K2 [3]-β-o-Galp-(1→3)-β-o-GalpNAc-(1→), α-Psep5Ac7Ac-(2→6)-β-o-Glcp-(1→6) ^H	K6 [4]-β-Psep5Ac7Ac-(2→6)-β-o-Galp-(1→6)-β-o-Galp-(1→3)-α-o-GalpNAc(1→),
K37 [4]-β-o-GalpNAc-(1→4)-α-o-Galp-(1→6)-β-o-Glcp-(1→3)-β-o-GalpNAc-(1→), β-o-Glcp(1→6) ^H	K93 [3]-β-o-Galp-(1→3)-β-o-GalpNAc-(1→), β-Psep5Ac7RHb-(2→6)-α-o-Galp-(1→6) ^H

1.6 pav. *A. baumannii* genomoose koduojamų K lokusų sekos. A – skirtingų K lokusų genetinė organizacija. B – nuo K lokusų priklausomų kapsulės egzopolisacharidų įvairovė (pagal Singh ir kt., 2019).

K lokusas koduoja už kapsulės polisacharido sintezę atsakingus fermentus, taip pat polimerazę Wzy, baltymus Wza, Wzb ir Wzc, kurie atsakingi už kapsulės egzopolisacharidų pernašą į ląstelės išorę (1.7 pav.). Nėgana to, parodyta, kad *A. baumannii* geba glikozilinti periplazminius ar išorinės membranos baltymus ir tiek kapsulės polisacharido sintezę, tiek baltymų glikozilinimas yra priklausomi nuo to paties K lokuso (Lees-Miller ir kt., 2013).



1.7 pav. Nuo K lokuso priklausomos kapsulės sintezės/pernašos ir baltymų glikozilinimo sistemos *A. baumannii* bakterijose (pagal Lees-Miller ir kt., 2013).

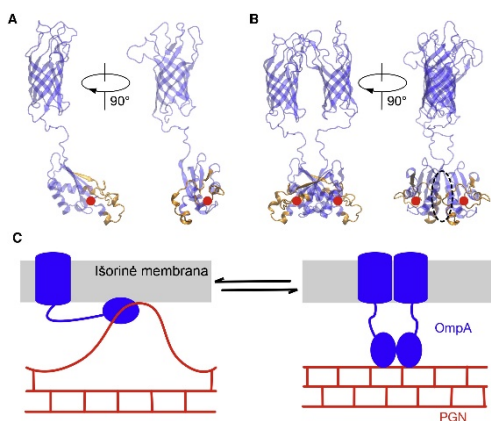
Iki šiol žinomos dvi *A. baumannii* O-glikozilinimo sistemos (Harding ir kt., 2015). Už baltymų glikozilinimą atsakingos sistemos nustatytos *A. baumannii* genomuose ieškant

O-oligosachariltransferazių, pernešančių angliavandenio liekaną nuo lipidinio nešiklio ant baltymo, homologų. Taip identifikuotos TfpO ir PglL

O-oligosachariltransferazės.

Parodyta, kad PglL glikozilina nežinomos funkcijos išorinius baltymus, tuo tarpu TfpO atsakinga už IV tipo pilių pagrindinių komponentų pilinų glikozilinimą. Nors kol kas dar nėra iki galo suprasta baltymų glikozilinimo reikšmė *A. baumannii* patogenezėje, parodyta, kad O-oligosachariltransferazių mutantai prasčiau formuoja bioplėveles (Iwashkiw ir kt., 2012). Baltymų glikozilinimas taip pat turėtų padėti „pasislėpti“ nuo šeimininko imuninės sistemos komponentų infekcijos metu (Piepenbrink ir kt., 2016).

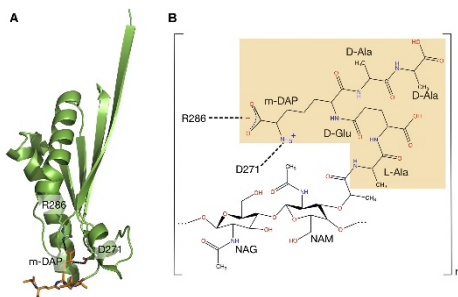
Vienas pirmųjų nustatytų baltymų, svarbių *A. baumannii* sąveikai su infekuota eukariotine ląstele, buvo išorinės membranos baltymas OmpA (Choi ir kt., 2005; Gaddy ir kt., 2009). OmpA priklauso didelei baltymų šeimai, kuri būdinga daugeliui Gram-neigiamų bakterijų ir dalyvauja gausybėje su bakterijų virulentiškumu susijusių procesų (Smith ir kt., 2007b; Maruvada ir Kim, 2011; Confer ir kt., 2013). *A. baumannii* OmpA yra gausiausias išorinės membranos baltymas, sudarytas iš dviejų domenų – membranoje esančios β -statinės ir periplazminio domeno, kuris nekovalentiškai sąveikauja su peptidoglikanu (Park ir kt., 2012; Jahangiri ir kt., 2017) (1.8 pav.). OmpA baltymo β -statinės domenas gali veikti kaip savitasis β -laktamų porinas (Sugawara ir Nikaido, 2012; Iyer ir kt., 2018).



1.8 pav. OmpA_{Ab} baltymas. A – baltymo monomero dvidomeninė struktūra. B – baltymo dimerizacija. Raudonais taškais pažymėtos su peptidoglikanu (PGN) sąveikaujančios grupės. C – monomerinės būsenos ir dimerų sąveika su PGN (pagal Samsudin ir kt., 2016).

OmpA sąveiką su diaminopimelato grupe, kuri yra *A. baumannii* peptidoglikano sudedamoji dalis (Park ir kt., 2012) (1.9 pav.). Atliekant funkcinius tyrimus parodyta, kad OmpA dalyvauja bakterijų ropojimo judėjime, adhezijoje prie eukariotinių ląstelių, gali sukelti ląstelių apoptozę, taip pat gali jungtis prie žmogaus serumo veiksnio H ir taip apsaugoti bakterijas nuo serumo komplemento sistemos (Choi ir kt., 2005; Gaddy ir kt., 2009; Clemmer ir kt., 2011; Smani ir kt., 2012). OmpA baltymas turi įtakos išorinės membranos pūslelių (OMV) biogenezei (Moon ir kt., 2012). OMV yra sferinės, 20–200 nm diametro pūslelės, sekretuojamos įvairių Gram-neigiamų patogeninių bakterijų (Kulp ir Kuehn, 2010). Jos gali būti sudarytos iš išorinės membranos komponentų ir periplazminių baltymų. *A. baumannii* OMV perneša įvairius virulentiškumo veiksnius, tarp kurių ir OmpA, įvairios proteazės, fosfolipazės, atsparumą antibiotikams

Manoma, kad monomerinės būsenos OmpA baltymas gali sąlygoti peptidoglikano sąveiką su išorine membrana jį fiziškai priartindamas. Tuo tarpu baltymo dimeras netenka šios savybės (Marcoux ir kt., 2014; Tan ir kt., 2017). Tokiu būdu, OmpA baltymas gali destabilizuoti peptidoglikano ir ląstelės sienelės sąveiką. *In vitro* tyrimais periplazminiame OmpA domene nustatytos dvi konservatyvios aminorūgštys, D271 ir R286, atsakingos už



1.9 pav. OmpA_{Ab} periplazminio domeno fragmentas. A – R286 ir D271 aminorūgštys sąveikauja su diaminopimelato grupe (m-DAP). B – diaminopimelato grupė PGN sudėtyje. NAM – N-acetilmuramo rūgštis, NAG – N-acetilgliukosaminas (pagal Samsudin ir kt., 2016).

lemiantys baltymai (Kwon ir kt., 2009; Moon ir kt., 2012). Manoma, kad OMV susilieja su eukariotinių ląstelių membrana ir tokiu būdu virulentiniai veiksniai perduodami į ląstelės vidų (Jin ir kt., 2011). Tokia sąveika skatina eukariotines ląsteles sintetinti uždegiminius citokinus.

Kitas išorinės membranos baltymas – Omp33-36 akvaporinas – taip pat siejamas su *A. baumannii* virulentiškumu. Kaip ir OmpA, baltymas svarbus adhezijai prie eukariotinių ląstelių ir išgyvenimui *in vivo* infekcijos modelyje (Smani ir kt., 2012; Rumbo ir kt., 2014). Kiti išorinės membranos baltymai, pvz. CarO ar OprD, taip pat buvo parodyti esantys svarbūs *A. baumannii* infekcijos plitimui (Fernandez-Cuenca ir kt., 2011).

Prie sėkmingos *A. baumannii* infekcijos reikšmingai prisideda ir baltymų sekrecijos sistemos. *A. baumannii* jų žinomos penkios: T1SS, T2SS, T4SS, T5SS ir T6SS. T5SS autotransporteris Ata – svarbus adhezinas sąveikoje su eukariotinėmis ląstelėmis (Bentancor ir kt., 2012a). Įdomu, kad *A. baumannii* savo genome nekoduoja trečio tipo sekrecijos sistemos (T3SS) baltymų, kuri daugelyje kitų patogeninių bakterijų yra pagrindinė efektorinių baltymų, leidžiančių kolonizuoti ir patekti į eukariotinės ląstelės vidų, pernašos sistema. T3SS trūkumas bakterijų genomuose kelia klausimą, ar *A. baumannii* gali būti viduląstelinis patogenas? Vis dėlto, neseniai nustatyta, kad *A. baumannii* artima rūšis *A. nosocomialis* naudoja kitą – T2SS sistemą efektorinių baltymų pvz. lipazės LipA, metaloproteazės CipA ir kt., pernašai (Harding ir kt., 2016). T2SS koduojančio lokuso neturintys mutantai pasižymėjo sumažėjusiu virulentiškumu *in vivo*. Detalesnis efektorinių baltymų vaidmuo patogenezėje nėra aiškus.

Nemažai tyrimų atlikta su *A. baumannii* T6SS sistemos baltymais. Nors šios sistemos pernešami efektoriniai baltymai neturi įtakos bakterijų sąveikai su eukariotinėmis ląstelėmis ar šeimininko imunine sistema, tačiau jie reikalingi tarp rūšių bakterijų konkurencijai (Carruthers ir kt., 2013), kas svarbu vystantis daugiabakterinei infekcijai. Apsaugai nuo savo paties efektorinių toksinų bakterijos sintetina savisaugos (imuniteto) baltymus, todėl žudymo fenotipas pasireiškia tik tarp skirtingų bakterijų rūšių. Įdomu tai, kad *A. baumannii* bakterijose T6SS baltymus koduojantis lokusas dažniausiai yra užslopintas. Neseniai nustatytas apie 150 kb dydžio plazmidėje pernešamas TetR šeimos transkripcijos reguliatorius, kuris slopino T6SS baltymų raišką (Weber ir kt., 2015). Tokiose plazmidėse taip pat pernešami antibiotikams atsparumą lemiantys genai, todėl spontaninis plazmidžių pametimas lemia atsiradusį jautrumą antibiotikams, o kartu ir tarp rūšių konkurencijos fenotipo atstatymą.

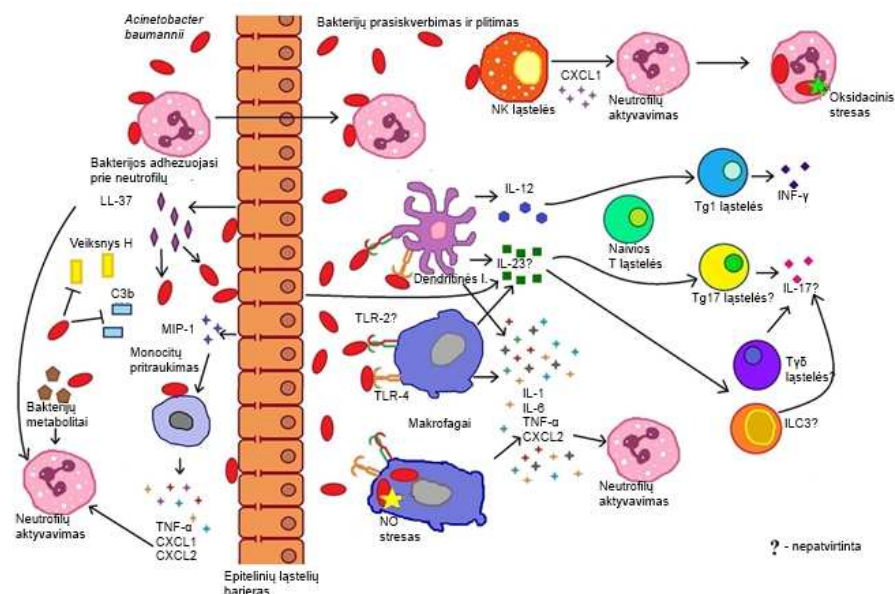
Bakterinės fosfolipazės vaidina svarbų vaidmenį įvairių virulentinių bakterijų patogenezėje. *A. baumannii* koduoja fosfolipazes C ir D, kurios turėtų hidrolizuoti eukariotinių ląstelių fosfolipidus ir taip sukurti membranos pažeidimą. Parodyta, kad šie genai turi įtakos atsparumui serumui ir *A. baumannii* sąveikai su eukariotinėmis ląstelėmis (Camarena ir kt., 2010; Stahl ir kt., 2015; Fiester ir kt., 2016).

Atliekant transpozonų bibliotekų tyrimus paaiškėjo, kad *A. baumannii* išlikimui infekuotame organizme būtini sideroforai, kurie infekcijos židinyje bakterijoms suteikia galimybę įsisavinti geležies, magnio ar cinko jonus, kur tokių jonų koncentracija yra labai maža (Zackular ir kt., 2015; Shapiro ir kt., 2016). Genų lokusų, atsakingų už sideroforų sintezę, mutacijos buvo letalios naudojant *in vivo* infekcijos modelius.

pbpG genas, koduojantis su penicilinu besijungiantį baltymą 7/8 (PBP7/8), kuris dažniausiai siejamas su atsparumu β -laktamų klasės antibiotikams, taip pat yra svarbus veiksnys, lemiantis didesnę *A. baumannii* išgyvenamumą infekcijos metu (Russo ir kt., 2009). Manoma, kad tai susiję su peptidoglikano pertvarka. Nustatyti ir kiti genai – *tuf*, *recA*, *surA1*, *upsA*, kelios dvikomponentinės sistemos, kurių mutantai pasižymėjo sumažėjusiu infekcijos potencialu *in vivo*, nors detalesni mechanizmai kol kas nėra ištirti (1.2 lentelė).

1.2.5. Imuninio atsako stimuliavimas

A. baumannii infekcijoms yra jautrūs pacientai su pažeista imunine sistema, todėl patogenezės mechanizmų tyrimais svarbu nustatyti patogeno sąveiką su imuninės sistemos komponentais (García-Patiño ir kt., 2017). Imuninės sistemos atsakas į *A. baumannii* infekciją nėra detalčiai išaiškintas, tačiau atskiri atsako komponentai žinomi (1.10 pav.). Vos prasidėjus infekcijai organizmas reaguoja, pasitelkdamas įgimto imuniteto komponentus (Diacovich ir Gorvel, 2010). Aktyvinta komplemento sistemos kaskada opsonizuoja bakterijas ir jas lizuoja, formuodama poras ląstelės membranoje. Opsonizuotas bakterijas lizuoja ir fagocituojančios ląstelės. Įgimto imuniteto ląstelės – makrofagai, neutrofilai, monocitai, dendritinės ląstelės ar dalis epitelinių ląstelių į išorinę membraną eksportuoja PRR receptorius (angl. *pattern recognition receptors*), kurie jungiasi prie bakterijų išorėje esančių molekulių, vadinamųjų PAMP-ų (angl. *pathogen-associated molecular patterns*), pvz. LPS, flagelinų, membraninių baltymų, peptidoglikano ar nukleorūgščių. Sąveikos metu aktyvinama citokinų ir chemokinų raiška, į infekcijos židinį pritraukiamos kitos imuninės sistemos



1.10 pav. Imuninės sistemos atsakas į *A. baumannii* infekciją (pagal García-Patiño ir kt., 2017).

ląstelės. Įgimto imuniteto ląstelės taip pat skatina savitąjį atsaką per įgyto imuniteto sistemos aktyvinimą. Antigeną pateikiančios ląstelės aktyvina naivuosius T limfocitus, todėl yra skatinama citotoksinių T limfocitų proliferacija. Taip pat aktyvinamos B ląstelės, kurios reaguodamos į antigeną vykdo kloninę ekspansiją, pakeičia sintetinamų imunoglobulinų klasę iš mažo gimingumo IgM klasės į IgG klasę, specifiskai atpažįstančią konkretų antigeno epitopą.

Organizmui kovojant su *A. baumannii* infekcija vieną svarbiausių vaidmenų atlieka neutrofilai. Jau po 4 valandų infekcijos židinyje pelėse aptinkami aktyvinti neutrofilai, o didžiausia jų koncentracija pasiekama po 24 valandų nuo infekcijos pradžios (Van Faassen ir kt., 2007). Neutrofilai išaktyvina bakterijas jas fagocituodami ir sukeldami oksidacinį stresą. Atliekant bandymus su neutrofilų neturinčiomis pelių linijomis, sukėlus *A. baumannii* infekciją vėlavo citokinų ir chemokinų – interleukino-1 (IL-1), IL-6, TNF- α , CXCL1, MIP-1 ir MIP-2 indukcija, todėl infekcija išplito greičiau (Tsuchiya ir kt., 2012). Palyginti neseniai atrasta neutrofilų savybė – užląstelių spąstų formavimas (angl. *neutrophil extracellular traps*) – kuri neleidžia patogeniui išplisti ir jį neutralizuoja per sekretuojamus antimikrobinius baltymus, neturi įtakos *A. baumannii* infekcijos plitimui (Kamoshida ir kt., 2014). Tai galėtų liudyti apie iki šiol nežinomus *A. baumannii* apsaugos nuo neutrofilų mechanizmus.

A. baumannii infekcijos metu iš imuninės sistemos ląsteles aktyvinančių signalinių molekulių didžiausią raišką pasiekia interleukinas IL-17, kuris skatina kitų signalinių molekulių raišką (Isailovic ir kt., 2015). Vis dėlto, jau anksčiau parodyta, kad pelėse išaktyvinus IL-17 molekules su savitaisiais antikūnais, *A. baumannii* infekcijos eigai tai įtakos neturėjo (Breslow ir kt., 2011), o tai liudija nevienareikšmę konkrečių interleukinų svarbą infekcijos metu. Ankstyvosios *A. baumannii* infekcijos metu taip pat stimuliuojama ir antimikrobinių peptidų – LL-37 ir žmogaus antibakterinio peptido hCAP-18 sintezė (Yang ir kt., 2000). *A. baumannii* sąveikaujant su plaučių epitelio ląstelių fibronektinu per savo išorinės membranos baltymą OmpA, stimuliuojama žmogaus β -defensino sintezė (Feng ir kt., 2014).

Bakterijoms infekavus organizmą yra aktyvinama komplemento kaskada. *A. baumannii* turi išvysčiusi efektyvius mechanizmus, leidžiančius išvengti nuo komplemento priklausomo žudymo. OmpA baltymas gali jungtis su komplemento veiksmu H, tokiu būdu galėtų būti slopinamas alternatyvus komplemento aktyvinimo kelias (Kim ir kt., 2009). Bakterijos kapsulės polisacharidai taip pat alieka svarbų vaidmenį apsaugant *A. baumannii* nuo komplemento opsonizacijos (Russo ir kt., 2010). Nereikėtų užmiršti ir *A. baumannii* sekretuojamų, proteoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų, pvz. CipA, kurio indukcija leidžia išvengti komplemento sistemos (Koenigs ir kt., 2016). Kovojo su *A. baumannii* infekcija be neutrofilų taip pat svarbų vaidmenį atlieka ir kitos įgimto imuniteto ląstelės, pvz. NK ląstelės (angl. *natural killers*, NK) ar alveolių makrofagai, kurie dar prieš neutrofilų aktyvinimą pradeda fagocituoti bakterijas (Qiu ir kt., 2012). Dendritinės ląstelės svarbios ir aktyvuojant specifinį įgytą imuninį atsaką. Nustatyta, kad *A. baumannii* išorinės molekulės – LOS ar OmpA baltymas – aktyvina dendritines ląsteles per MAPK kinazių ir NF κ B signalines kaskadas bei skatina antigeną pristatančių MHC kompleksų ir uždegiminio interleukino IL-12 gamybą, dėl ko aktyvinamos TH1 efektorinės ląstelės (Lee ir kt., 2007).

Tam kad imuninės sistemos ląstelės galėtų būti aktyvintos, jos turi gebėti atpažinti patogeną. Dvi pagrindinės PRR receptorių grupės – Toll (TLR, angl. *Toll-like receptors*) ir NOD receptoriai (angl. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) – dalyvauja šiame procese. Kaip ir kitų patogenų atveju *A. baumannii* atpažinimui svarbūs TLR-2 ir TLR-4 (Kim ir kt., 2014). TLR-4 receptoriai atsakingi už LOS atpažinimą. Šis receptorius yra vienas svarbiausių veiksnių, makrofaguose aktyvinantis IL-6, IL-12 ir TNF- α sekreciją ir skatinantis azoto oksido (NO) sintezę, tokiu būdu neutralizuojant *A. baumannii* (Kim ir kt., 2013). TLR-2 yra atsakingas už

peptidoglikano bei lipoproteinų atpažinimą. *A. baumannii* infekcijos metu TLR-2 gali atpažinti ir OmpA baltymą (Lee ir kt., 2007). Viduląstelių NOD receptorių vaidmuo *A. baumannii* infekcijoje vis dar mažai ištirtas, nes manoma, kad bakterijos dažniausiai veikia kaip užląsteliniai patogenai. Vis dėlto, neseniai pasirodė duomenų apie NOD1 ir NOD2 aktyvinimą epitelinėse ląstelėse esant *A. baumannii* infekcijai (Bist ir kt., 2014).

Ieškant alternatyvių gydymo būdų prieš DAA *A. baumannii* izoliatus, vienas iš jų galėtų būti efektyvų imuninį atsaką sukeliančios vakcinos. Tam turėtų būti rasti *A. baumannii* antigenai, galintys sukelti specifinį įgyto imuniteto atsaką. Iki šiol yra pademonstruota keletas *A. baumannii* antigenų, kurie pelėse sugebėjo stimuliuoti imunoglobulinų IgG ir citokinų IFN- γ , IL-4, IL-17 sintezę (Fajardo Bonin ir kt., 2014). Šie duomenys teikia vilčių, kad *A. baumannii* infekcijos metu organizmas geba aktyvinti ne tik įgimto imuniteto ląsteles, bet ir įgytą imunitetą, kuris galėtų būti pritaikomas kuriant naujas gydymo strategijas.

1.3. *A. baumannii* infekcijų gydymo perspektyvos

Pastarąjį dešimtmetį ligoninėse išplitus DAA *A. baumannii* izoliatams iškilo būtinybė ieškoti naujų gydymo būdų. Šiuo metu stengiamasi naudoti įvairias antimikrobinių medžiagų kombinacijas, tačiau pastebima, kad net ir naudojant kombinuotus gydymo būdus, jie nėra itin veiksmingi (Howard ir kt., 2012). Dėl komplikuoto gydymo *A. baumannii* neseniai paskelbtas ypatingos svarbos patogenų, kurio sukeltoms infekcijoms gydyti turi būti išvystyti nauji terapiniai metodai (Isler ir kt., 2018). Šiuo metu dar tik pradinėse tyrimų stadijose esantys fagų terapijos ar vakcinų vystymo eksperimentai teikia vilčių kaip alternatyvūs gydymo metodai, kurie ateityje galėtų svariai prisidėti prie infekcijų gydymo (Lee ir kt., 2017).

1.3.1. Naujų antimikrobinių medžiagų kombinacijos

Nors šiuo metu klinikoje plinta karbapenemams atsparūs *A. baumannii* izoliatai, karbapenemų klasės antibiotikai imipenemas ir meropenemas vis dar laikomi efektyviausiais vaistais (Doi ir kt., 2015). Gydymui taikomos karbapenemų ir tigeciklino/kolistino/amikacino kombinacijos galėjo išgydyti iki 80 % visų infekcijų (Ozbek ir Senturk, 2010). Vis dėlto, tokios kombinacijos pasižymi neurotoksiškumu ir nefrotoksiškumu. Be to, pastaraisiais metais stebimas augantis *A. baumannii* atsparumas kolistinui ir kitiems „paskutinio pasirinkimo“ antibiotikams (Mendelson ir kt., 2018). Ligoninėse taikomos įvairios ir kitų antibiotikų kombinacijos, pvz.

ceftazidimas/avibaktamas, ceftolozanas/tazobaktamas, meropenemas/vaborbaktamas ar imipenemas/relebaktamas, tačiau dėl dauginio bakterijų atsparumo tokios kombinacijos ne visada veiksmingos (Wright ir kt., 2014). Dėl šios priežasties tiriamos naujos antimikrobinės medžiagos, pvz. antibiotikas cefiderokolis, kuris susintetintas prie cefalosporino chemiškai prijungus katecholinį sideroforą (Ito ir kt., 2016). *In vitro* tyrimų duomenimis antibiotikas slopino OXA-23, -40, -58, NDM ir IMP klasės β -laktamazės (Paterson, 2017). Antibiotikas taip pat didino bakterijų membranos pralaidumą ir pasižymėjo metalų jonus cheluojančiomis savybėmis. Cefiderokolis pasirodė efektyvus tiek *in vivo*, tiek klinikiniuose tyrimuose prieš *E. coli* ir *K. pneumoniae* infekcijas (Portsmouth ir kt., 2017). Terapijai bandoma pritaikyti ir kitus panašiu principu susintetintus antibiotikus naudojant kitos kilmės sideroforus (Ghosh ir kt., 2017). Šiuo metu intensyviai testuojami ir naujos kartos sintetiniai antibiotikai, pvz. eravaciklinas ar fluorociklinų klasės antibiotikų dariniai (Isler ir kt., 2018).

Bene intensyviausiai iš antimikrobinių medžiagų yra tiriami β -laktamazių slopikliai. Diazabiciklooktanonų pagrindu sukurti slopikliai kombinacijoje su karbapenemais slopino PBP2 ir įvairių klasių β -laktamazės (Papp-Wallace ir kt., 2018). Taip pat ieškoma naujų efektyvių sintetinių β -laktamų, polimiksinų, aminoglikozidų klasių antibiotikų, kurie slopintų *A. baumannii* infekcijas (Isler ir kt., 2018). Kaip galimos antimikrobinės medžiagos tiriamos ir specifiniu poveikiu pasižymintys slopikliai, pvz. ACHN-975, kuris slopina nuo cinko priklausomą deacetilazę LpxC, atsakingą už *A. baumannii* LOS sintezę. Nors slopiklis padidino *A. baumannii* jautrumą β -laktamų klasės antibiotikams (Lemaître ir kt., 2017), jis nepasiteisino klinikiniuose tyrimuose, nes sukėlė stiprų uždegiminį atsaką.

Antimikrobiniai peptidai – svarbi įgimto imuniteto sudedamoji dalis daugelyje stuburinių gyvūnų. Atlikta nemažai tyrimų, liudijančių inaktyvuojantį įvairios kilmės peptidų poveikį prieš *A. baumannii* (Garcia-Quintanilla ir kt., 2013). Vis dėlto, trumpi peptidai žmogaus organizme greitai suyra ir nuolatiniai neigiami klinikinių tyrimų rezultatai verčia susimąstyti apie šių antimikrobinių medžiagų realų pritaikymą bakterinių infekcijų gydymui.

1.3.2. Fagų terapija

Nors bakteriofagų terapijos tyrimai prasidėjo dar praėjusio amžiaus viduryje, dėl antibiotikų efektyvumo slopinant bakterines infekcijas, šie

tyrimai buvo pristabdyti (Cisek ir kt., 2016). Pastaruoju metu iškilus būtinybei ieškoti alternatyvių gydymo būdų, fagų terapija vėl sulaukia vis didesnio dėmesio. Pirmasis bakteriofagas, specifiškas DAA fenotipu pasižyminčiam *A. baumannii* izoliatui, buvo charakterizuotas tik 2010 m. (Lin ir kt., 2010b). Nors bakteriofagai gebėjo išgydyti *A. baumannii* infekcija užkrėstas peles (Yin ir kt., 2017), klinikinių tyrimų duomenys kol kas nevienareikšmiai. *A. baumannii* geba maskuoti savo išorines molekules, todėl taikant fagų terapiją dažniausiai yra naudojami įvairiu specifiškumu pasižyminčių bakteriofagų kokteiliai. Kai kuriais atvejais fagų terapiją taikiusiems pacientams infekcijos požymiai susilpnėjo (Schooley ir kt., 2017), nors pasitaikė ir mirčių atvejų (LaVergne ir kt., 2018).

Daug klausimų kelia iki šiol menkai ištirti šios terapijos šalutiniai poveikiai, fagų specifiškumo problema, bakterijų gebėjimas maskuoti paviršines molekules ir pastarųjų mutacijos, taip pat organizmo imuninės sistemos uždegiminis atsakas į didelės koncentracijos bakteriofagų cirkuliavimą kraujyje. Taip pat nėra aiškus optimalus fagų dozavimas. Nėgana to, jau buvo nustatyti fagų terapijai atsparių *A. baumannii* izoliatų išplitimo žmogaus organizme atvejai vos po aštuonių dienų nuo gydymo pradžios (Schooley ir kt., 2017).

Ne tik patys fagai gali pasitarnauti kaip bakterijas inaktyvuojantys veiksniai. Neseniai pradėti atidžiau tyrinėti bakteriofagų koduojami endolizina. Jie hidrolizuoja bakterijos sienelę ir taip gali padidinti patogenų jautrumą antimikrobinėms medžiagoms (Defraigne ir kt., 2016). Pastebėta, kad endolizina yra mažiau aktyvūs prieš Gram-neigiamas bakterijas, nes fermentai negali tiesiogiai hidrolizuoti peptidoglikano dėl išorinės membranos barjero. Dėl šios priežasties endolizinus bandyta konjuguoti su trumpais bakterijų išorinę membraną destabilizuojančiais peptidais, kurių dėka fermentai galėjo hidrolizuoti Gram-neigiamų bakterijų peptidoglikaną (Rodriguez-Rubio ir kt., 2016). Visgi endolizina, patekę į žmogaus organizmą, greitai suyra, todėl jų klinikinis pritaikymas kol kas kelia klausimų.

1.3.3. Vakcinacija ir monokloniniai antikūnai

Šiuo metu JAV vaistų administracija (angl. FDA) yra patvirtinusi tris antibakterinius monokloninius antikūnus prieš oportunistinių bakterijų – *Bacillus anthracis* ir *C. difficile* – sukeltas infekcijas, taip pat dar devyni antikūnų terapiniai vaistai prieš *S. aureus* ir *P. aeruginosa* bakterijas yra klinikinėse tyrimų stadijose (Wang-Lin ir kt., 2018). *A. baumannii* infekcijų

tyrimai parodė, kad bakterijos gali stimuliuoti įgyto imuniteto atsaką, todėl tai suteikė vilčių, kad vakcinavimas galėtų tapti vienu iš efektyviu gydymo būdų prieš šios rūšies bakterijų sukeltas infekcijas.

Parodyta, kad pelės, vakcinuotos išaktyvintų *A. baumannii* bakterijų lizatais, infekciją išgyveno geriau lygant su kontrolinėmis pelėmis (McConnell ir Pachón, 2010). *A. baumannii* sekretuojamos membranos pūslelės taip pat pasirodė stimuliuojančios imuninį atsaką (Jun ir kt., 2013). Vis dėlto, tiek bakterijų lizatuose, tiek išorinės membranos pūslelėse esantys lipooligosacharidai žmogui gali sukelti stiprų uždegiminį atsaką, todėl pavienių baltymų ar kitų bakterinių komponentų vakcinos turi didesnes pritaikymo galimybes. Tinkamas vakcinos kandidatas turėtų būti konservatyvus, paplitęs tarp skirtingų izoliatų, į išorę eksponuotas *A. baumannii* apvalkalo komponentas. *A. baumannii* OmpA išorinės membranos baltymas yra gausiausias bakterijos baltymas, kuris dalyvauja daugelyje su bakterijų virulentiškumu susijusių procesų, todėl OmpA buvo ištirtas kaip potencialus vakcinos kandidatas (Luo ir kt., 2012). Rekombinantinis OmpA aktyvino specifinių imunoglobulinų sintezę pelėse ir apsaugojo nuo *A. baumannii* sukulto sepsio komplikacijų. Keletas kitų, su *A. baumannii* ląstelės paviršiumi asocijuotų komponentų – išorinės membranos baltymų OmpW, Omp22, OmpK, FKIB, Omp1 ir BamA – taip pat gebėjo padidinti išgyvenamumo rodiklius pelių infekcijos modelyje taikant aktyvią vakcinaciją (Chaing ir kt., 2015; Huang ir kt., 2015; Huang ir kt., 2016; Singh ir kt., 2017). Aktyvi vakcinacija praktiškai galėtų būti taikoma į ligoninę patekusiems pacientams, kurių imuninė sistema dar nėra pažeista, tačiau tuo pačiu jie turi didesnę riziką susirgti bakterine infekcija.

Pagrindinė rizikos grupė užsikrėsti *A. baumannii* infekcija yra imunosupresuoti pacientai, kuriems aktyvios vakcinacijos taikymas nebūtų tinkamas. Tokiu atveju turėtų būti pasitelkiama pasyvi vakcinacija, kai pacientui yra suleidžiamas serumas, polikloniniai ar monokloniniai antikūnai, kurie neutralizuotų *A. baumannii* bakterijas ir taip sustabdytų infekcijos plitimą. Iki šiol pasyvios imunizacijos prieš *A. baumannii* tyrimų nėra daug, bet pirmieji eksperimentai atlikti su pelėmis naudojant anti-OmpA, anti-OmpW ar anti-NucAb serumą, padidino išgyvenamumo rodiklius (Lin ir kt., 2013; Huang ir kt., 2015; Garg ir kt., 2016), todėl ši terapija teikia vilčių.

Iki šiol klinikinių tyrimų su vakcinomis prieš *A. baumannii* infekcijas nėra atlikta. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tas, kad imuninę sistemą turi aktyvinti išorinės bakterijos molekulės. Deja, skirtingi *A. baumannii* izoliatai tarpusavyje smarkiai skiriasi į išorę eksponuojamomis molekulėmis.

Be to, didelė dalis *A. baumannii* bakterijų dengia savo paviršines molekules egzopolisacharidinės kapsulės sluoksniu. Nėgana to, šios kapsulės sudėtis tarp skirtingų izoliatų taip pat labai varijuoja (Hu ir kt., 2013). Monokloniniai antikūnai prieš *A. baumannii* K1 tipo kapsulės polisacharidą efektyviai slopino tik 13 % testuotų skirtingų *A. baumannii* izoliatų (Russo ir kt., 2013). Dėl visų šių priežasčių, rasti tinkamą vakcinos kandidatą, kuris veiktų prieš daugelį skirtingų *A. baumannii* izoliatų, yra didelis iššūkis.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Šiame darbe analizuotos reprezentatyvios *A. baumannii* iš klinikinių izoliatų kolekcijos. Izoliatai buvo išskirti iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kauno klinikų, Respublikinės Vilniaus universitetinės ligoninės ir Respublikinės Šiaulių ligoninės pacientų 2010 m., gydomų daugiausiai intensyvios terapijos bei kituose ligoninių skyriuose. (2.1 lentelė). *A. baumannii* atsparumas antibiotikams nustatytas ligoninių klinikinėse laboratorijose kiekybiniu (plokštelių) bei diskų difuzijos metodais. Duomenys analizuoti pagal CLSI (angl. *Clinical ir Laboratory Standarts Institute*) rekomendacijas.

PGR reakcijoms taikyti oligonukleotidiniai pradmenys, darbe naudotos plazmidės ir sukonstruoti kamienai pateikti 2.2 lentelėje.

Ekperimentuose naudotų bakterijų augimo terpių sudėtis:

LB – 1 % triptono (w/v), 0,5 % mielių ekstrakto, 1 % NaCl, 2 % agaro.

TSB – 1,7 % triptono, 0,3 % soitonio, 0,25 % dekstrozės, 0,5 % NaCl, 0,25 % K₂HPO₄, 1,5 % agaro.

NGM – 0,25 % peptono, 0,3 % NaCl, 5 µg/ml cholesterolio, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM K₂HPO₄ (pH 6,0), 1 % etanolio, 2 % agaro.

Eukariotinės ląstelės buvo augintos komercinėje DMEM terpėje (Gibco, 31966021) su 10 % veršiuko serumo (Gibco, 12657029).

2.1 lentelė. Klinikinės kilmės *A. baumannii* charakteristikos

Pulso tipas (izoliatų skaičius pulso tipu)	Ligoninė	Skystis	Šaltinis	Išskyrimo data (2010 m.)	SCF-105	MEM-10	TZP-10	SAM-20	CAZ-30	GM-10	KAN-30	CIP-5	IPM-10	PIP-10
IC I														
I-a	(47)	A	Širdies chirurgijos	nd	10.05	A	J	A	A	A	A	A	J	A
I-aC		C	Traumatologijos	Sąnarys	nd	J	J	nd	nd	A	A	A	J	nd
I-b	(6)	A	Smegenų traumų	Kraujas	07.03	A	J	A	A	A	J	A	J	A
I-c	(16)	A	Nudegimų	Zaizda	10.06	A	A	A	J	A	A	A	A	J
I-d	(20)	A	Traumatologijos	Sąnarys	07.13	J	J	J	J	A	A	A	J	A
I-dB		B	Reanimacijos	Skrepliai	nd	A	J	A	J	A	A	A	J	A
I-e	(36)	A	Reanimacijos	Bronchai	10.11	J	J	A	A	A	A	A	J	A
I-f	(24)	A	Reanimacijos	Bronchai	07.16	J	J	A	A	A	A	A	A	A
I-g	(10)	A	Reanimacijos	Bronchai	07.13	A	J	A	A	A	nd	A	J	A
I-gB		B	Reanimacijos	Zaizda	nd	A	J	A	J	A	A	A	J	A
I-h	(1)	A	Neurochirurgijos	nd	06.22	J	J	J	A	A	A	A	J	A
I-i	(2)	A	Reanimacijos	Bronchai	10.28	nd	J	A	A	A	A	A	J	A
I-j	(1)	A	Urologijos	Šlapimas	10.28	nd	J	J	A	A	A	nd	J	nd
I-k	(1)	A	Nudegimų	Zaizda	10.12	A	J	J	A	A	A	A	J	A
I-m	(1)	A	Reanimacijos	Bronchai	07.02	J	J	J	J	nd	A	A	J	A
I-n	(1)	A	Reanimacijos	nd	06.29	J	J	A	A	A	A	A	J	A
I-o	(1)	A	Reanimacijos	nd	06.29	A	J	A	A	A	A	A	J	A
I-p	(2)	A	Nefrologijos	nd	11.10	A	J	A	A	A	A	A	J	A
I-u1	(26)	B	Reanimacijos	nd	nd	A	J	A	A	A	A	A	J	A
IV	(13)	B	Reanimacijos	nd	nd	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Abc1	(20)	A	Neurochirurgijos	nd	11.09	J	J	A	J	A	J	A	J	A
IC II														
II-a	(40)	A	Gastroenterologijos	Skrepliai	08.02	J	A	A	A	A	J	A	A	A
II-a1		B	Reanimacijos	Skrepliai	nd	A	A	A	J	A	A	A	A	A
II-a1C	(6)	C	nd	nd	nd	J	A	nd	nd	A	A	A	A	nd
II-a2	(12)	B	Neurochirurgijos	nd	nd	A	A	A	J	A	A	A	A	A
II-a3	(22)	C	nd	Intubacijos vamzdis	nd	J	A	nd	nd	A	A	A	A	nd
II-b	(8)	A	Smegenų traumų	nd	06.29	J	A	A	J	A	A	A	A	A
II-c	(14)	A	Reanimacijos	Bronchai	10.07	J	A	A	J	A	J	A	A	A
II-d		A	Neurochirurgijos	Bronchai	nd	J	A	A	J	A	J	A	A	A
II-dB	(48)	B	Reanimacijos	nd	nd	A	A	A	J	A	A	A	A	A
II-e		A	Reanimacijos	Bronchai	10.14	J	A	A	J	A	A	A	A	A
II-eA	(2)	A	Neurochirurgijos	Trachėja	10.13	J	A	A	J	A	A	A	A	A
II-f	(1)	A	Reanimacijos	Bronchai	10.14	J	A	A	J	A	J	A	A	A
II-g	(1)	A	Neurochirurgijos	nd	11.09	A	A	A	J	A	A	A	A	A
II-h	(1)	A	nd	nd	11.09	J	A	A	A	A	A	A	A	A
II-j2	(1)	A	Smegenų traumų	Kraujas	nd	J	A	A	J	A	J	A	A	A
II-j4	(1)	A	Vaikų reanimacijos	Trachėja	11.09	J	A	A	A	J	A	A	A	A
Abc11	(40)	A	Reanimacijos	nd	11.09	J	A	A	J	A	J	A	A	A
III-a	(7)	A	Nefrologijos	nd	nd	J	J	A	J	A	J	A	J	A
NK														
Ab15	-	B	Toksikologijos	nd	nd	J	A	A	J	A	J	A	A	A

A – Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kauno klinikos, B – Respublikinė Vilniaus universitetinė ligoninė, C – Respublikinė Šiaulių ligoninė. Antibiotikų koncentracijos (µg/ml) pateiktos šalia sutrumpinimų; SCF - cefoperazonas-sulbaktamas; MEM - meropenemas; TZP - tazobaktamas; SAM - ampicilinas-sulbaktamas; CAZ - ceftazidimas; GM - gentamicinas; KAN - kanamicinas; CIP - ciprofloksacinai; IMP - imipenemas; PIP – piperacilinas; J – jautrūs, A – atsparūs izoliatai. nd – nėra duomenų.

2.2 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, plazmidės ir kamienai

Pradmuo	Seka (5'-3')	Tikslas	Šaltinis
Eps1	CATTAATAAGCGCAATTGAC	<i>wca</i> priešrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas
Eps2	GTTATATAAAGCGCTTGAGAAACCCCTTTGTGTAATTATCT		
Eps3	TCTCAAGCGCTTTATATAAC	<i>wca</i> posrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas
Eps4	GTCGAGGCATTTCTGTCTAGAACACCTTGTCTGTC		
Fjgms	AGGACAGAAATGCCTCGAC	<i>aac(3)-I</i> kasetės amplifikacija	Šis darbas
Rjgms	ATCTCGGCTTGAACGAATT		
EpgR	TGTAATTACGTTTATATTCAGTATCAC	<i>wca</i> išveiklinimo patvirtinimas	Šis darbas
P-Ab-ITSF	CATTATCACGGTAATTAGTG	<i>A. baumannii</i> rūšies nustatymas	Chiang ir kt., 2011
P-Ab-ITSB	AGAGCACTGTGCACCTTAAG		
gnaaF	CNTAYTAYYTDACNCATAAAGC	K lokuso amplifikacija ir sekoskaita	Šis darbas
galuR	GTCACNACBGTDACCATTTC		
wzy11F	AACGTTGGGACTATAGCAACAAAT	<i>wzy11</i> detekcija/ KL2 nustatymas	Šis darbas
wzy11R	CCTGTTTGATGGGGTGGTCT		
KL27F	GGAGACTGGCTGCAACCTTAT	KL27 nustatymas	Šis darbas
KL27R	AGAGCTGTGCACCAACACAG		
KL6F	CCACTTGGGGAGTGTGATT	KL6 nustatymas	Šis darbas
KL6R	AACCTTCCGCCCAACCTTA		
KL1F	ACGAAACAACAGTTATGGCGA	KL1 nustatymas	Šis darbas
KL1R	ATGGGGGAGGTGTTACAGGT		
KL40F	GGAAGTTAATCTGACTCTGCATTAT	KL40 nustatymas	Šis darbas
KL40R	ACACACCTGTAAGCTTGCCCT		
KL4F	AACGCGGCAAACTTACTGGA	KL4 nustatymas	Šis darbas
KL4R	CGCCGATAAACCCACCTAAG		
KL20F	GAACGCGGCAAACTTACAGG	KL20 nustatymas	Šis darbas
KL20R	CAGGAGAGGACCTGCAATC		
RH1704	CCCTACAAGGTCTTGCCAAT	OCL1 nustatymas	Kenyon ir kt., 2014b
RH1705	CCTCAGCCCGTACTTACAAC		
Citrato F1	AAATTACAGTGGCACATTAGGTCCC	<i>gltA</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
Citrato R12	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG		
gyrB_F	TGAAGCGCGCTTATCTGAGT	<i>gyrB</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
gyrB_R	GCTGGGTCTTTTCTCTGACA		
RA1	CCTGAATCTTCYGGTAAAC	<i>recA</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
RA2	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		
gpi_F	GAAATTTCCGGAGCTCACAA	<i>gpi</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
gpi_R	TCAGGAGCAATACCCCACTC		
GDHB1F	GCTACTTTTATGCAACAGAGCC	<i>gdhB</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
GDHB775R	GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC		
cpn60_F	GGTGCTCAACTTGTTCGTGA	<i>cpn60</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
cpn60_R	CACCGAAACAGGAGCTTTTA		
rpoD-F	ACCCGTGAAGGTGAAATCAG	<i>rpoD</i> amplifikacija ir sekoskaita	https://pubmlst.org
rpoD-R	TTACAGTGGAGCTTTAGCAAT		
BaF	GCACCAATGCAGCAACTCA	<i>blp1_{IC1}</i> geno alelio detekcija	Šis darbas
BaR	TGCTCGTTACAGAAAGCGGT		
BaF	GCACCAATGCAGCAACTCA	<i>blp1_{IC2}</i> geno alelio detekcija	Šis darbas
Blp2R	TACTCGTTACGGAAGGTTCT		
OmpF1	GATTCCTGACCTTTCTTATCACAAC	<i>ompA_{IC1}</i> geno alelio detekcija	Šis darbas
OmpR	GAGCAACTGGAGTTGGTTCA		
OmpF2	GACTTTGATGGCGTAAATCGT	<i>ompA_{IC2}</i> geno alelio detekcija	Šis darbas
OmpR	GAGCAACTGGAGTTGGTTCA		
Fjgms	AGGACAGAAATGCCTCGAC	<i>aac(3)-I</i> kasetės amplifikacija	Šis darbas
Rjgms	ATCTCGGCTTGAACGAATT		
Bav1	CATTACAATGCTTAAGCTA	<i>blp1</i> priešrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas
Bav2	CATATTAAACAATAATTGCTCTCTTCATCGGTAGAAAC		
Bav3	GCAAATTATGTTTAATATG	<i>blp1</i> posrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas
Bav4	GTCGAGGCATTCTGTCTGCTTTAGCAATAGAACGGAT		
Bpat	AAGAGACTTTTAAATAGGCGAT	<i>blp1</i> geno išveiklinimo patvirtinimas su Bav4 pradmeniu	Šis darbas
OmpA1	GGAGCAGTTAGTCTGTATAG	<i>ompA</i> priešrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas
OmpA2	GAACTCAAATTATTGAGCTGCCTCCAGAGATAACAATTG		
OmpA3	CAGCTCAATAATTGAGTTC	<i>ompA</i> posrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas
OmpA4	GTCGAGGCATTCTGTCTGCTTTCGTCAGTTTGAGGC		
OmpAP	GCGATTGCTTCTTTAATTGT	<i>ompA</i> geno išveiklinimo patvirtinimas su OmpA4 pradmeniu	Šis darbas
OAsp268F	CACACAGCTAACACTGGTCCACGTAAG	Asp268 pakeitimas į <i>Ala ompA</i> gene	Šis darbas
OAsp268R	GACCAGTGTTAGCTGTGTGACCTTCG		
OArg283F	CTTTAGCTGCAGCTAACTCTGTTAAATC	Asp283 pakeitimas į <i>Ala ompA</i> gene	Šis darbas
OArg283R	GAGTTAGCTGCAGCTAAAGATAAACG		
BlpK1F	ACTGGAATTCTCTATAAGACACTTAACCTATGAG	<i>blp1</i> geno su priešrovine seka amplifikacija	Šis darbas
BlpK1R	AGTCGGTACCAATTAACCTCATCAGACTTAGTC		
Omk1F	CCTTAATATATGATAAATAGAGC	<i>ompA</i> geno su priešrovine seka amplifikacija	Šis darbas
Omk1R2	AGTCGGTACCAGATTATGAATCAGGAGATTTAC		
Aac3L_seqR	CGAAGTCGAGGCATTTCGT	Transformuotų bakterijų patvirtinimas	Laboratorijos kolekcija
AcORI_seqR	AGGCTGTGATAACTTTTGGAA		
BapRb	GATCAGTATGGTCAATTAT	<i>blp1</i> geno raškos nustatymas	Šis darbas
BapRaiR	CAGCGTGATCAACTACAACCTAC		
Omf	AGCTCTGTGCTTAAACG	<i>ompA</i> geno raškos nustatymas	Šis darbas
Omr	GAGCAACTGGAGTTGGTTCA		
BldBamF	TTCTAGGATCCGAATATTGCTCCAGTAATT	<i>blp1₂₆₅₂₋₃₃₆₃</i> fragmento klonavimas į raškos vektorių	Šis darbas
BlXhR	TTCTACTCGAGTTAAACAATAATTGCTGG		
OmbamF	TTCTAGGATCCGATGAAATTGAGTGTATT	<i>ompA</i> geno klonavimas į raškos vektorių	Šis darbas
OmxhR	TTCTACTCGAGTTATTGAGCTGCTCGAG		
Sel1	CTTGCTACACTCATGTGTA	<i>sel1</i> priešrovinio regiono amplifikacija	Šis darbas

Sel2	CAGCTTGTTATTCTTCTCAGCTTGAAATGGCAATTAGACT G		
Sel3	CTGAGAAGAATAAACAGCTG	<i>sel1</i> posrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Sel4	GTGAGGCAATTCTGTCTTAACTGGTAACACCTGAAC		
Lys1	CTCTTTACGCCGAATTACG	<i>ygaU</i> priešrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Lys2	CATTAAATTGAGGTGGTGACATGAAATTAACCATGCCG TTA		
Lys3	TCAGCCACCTCAATTTAATG	<i>ygaU</i> posrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Lys4	GTGAGGCAATTCTGTCTTGGAGTATTCGTATTAGCTTC		
Peb1	GATAGTTTGGCAGATGAACCT	<i>gltI</i> priešrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Peb2	AGATCCAGTTAGATTCTCGTTCATAAGAACTCCTTGATG ATC		
Peb3	GCAGGAATCTAAGTGGATCT	<i>gltI</i> posrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Peb4	GTGAGGCAATTCTGTCTTGATTAATAGACAGGTGTAG AC		
Brk1	CGTTCAATCACTTGTCTGA	<i>brkB</i> priešrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Brk2	TGTTGAAAGTGAATAGAGAGTTCTAACATGCGTCATCTA TC		
Brk3	CTCTCTATCCACTTTCAACA	<i>brkB</i> posrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
Brk4	GTGAGGCAATTCTGTCTTGGTGTAAATGGAAGAGC		
VP1	CTTCTGATTGGAATCTGG	<i>pqiB</i> priešrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
VP2	ATAGTCTGCCAATTAAGTGAATTCAGACATACTCATTGTTT T		
VP3	TTACAGTTAATGGCAGACTAT	<i>pqiB</i> posrovinio regiono amplikacija	Šis darbas
VP4	GTGAGGCAATTCTGTCTTGAACTCAACCAACAAGT		
pHsF	TTGAAAGTAGGCCAGCGA	Plazmidinio <i>h-ns</i> geno detekcija	Šis darbas
pHsR	CCGCGTCCAGTCCAAGTATC		
HsKIF	CAAAGGCTAAGCAAGCTTTATC	Plazmidinio <i>h-ns</i> geno amplifikavimas	Šis darbas
HsKIR	CACAAAACCTTATTTTGATGAGC	klonavimui	

Plazmidės	Savybės	Šaltinis
pUC19_sacB	pUC19 su <i>sacB</i> genu iš <i>Bacillus</i> sp.	Laboratorijos kolekcija
pUC19_sacB_UDwzaGm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> wza geno priešrovinii ir pasrovinii regionais, sulietais su <i>A. baumannii</i> <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete	Šis darbas
pUC19_gm_AcORI	pUC19 su <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete or <i>Acinetobacter</i> ori sritimi; komplementacijos eksperimentams	Laboratorijos kolekcija
pUC_sacB_UDb1p1Gm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>blp1</i> geno priešrovinii ir posrovinii regionais, sulietais su <i>aac(3)-I</i> kasete; genų dalinių mutantų kūrimui	Šis darbas
pUC_sacB_UDompAGm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>ompA</i> geno priešrovinii ir pasrovinii regionais, sulietais su <i>aac(3)-I</i> kasete; genų dalinių mutantų kūrimui	Šis darbas
<i>pblp1</i> _{AC I}	pUC19_gm_AcORI su <i>Abc₁</i> <i>blp1</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius)	Šis darbas
<i>pblp1</i> _{AC II}	pUC19_gm_AcORI su <i>Abc_{II}</i> <i>blp1</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius)	Šis darbas
<i>pompA</i> _{AC I}	pUC19_gm_AcORI su <i>Abc₁</i> <i>ompA</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius)	Šis darbas
<i>pompA</i> _{AC II}	pUC19_gm_AcORI su <i>Abc_{II}</i> <i>ompA</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius)	Šis darbas
<i>pompA</i> _{D268A}	pUC19_gm_AcORI su <i>Abc₁</i> <i>ompA</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius); įvesta taškinė mutacija: Asp268 pakeista į Ala; komplementacijos eksperimentams	Šis darbas
<i>pompA</i> _{Arg283A}	pUC19_gm_AcORI su <i>Abc₁</i> <i>ompA</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius); įvesta taškinė mutacija: Arg283 pakeista į Ala; komplementacijos eksperimentams	Šis darbas
pET-28b	Baltymų raiškos vektorius	Novagen
pET-His-OmpA	OmpA raiškos plazmidė, histidino uodega sulieta su baltymo N-galu	Šis darbas
pET-His- B1p1 ₂₆₈₂₋₁₃₆₃	B1p1 ₂₆₈₂₋₁₃₆₃ raiškos plazmidė, histidino uodega sulieta su fragmento N-galu	Šis darbas
pUC19_sacB_UDsel1Gm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>sel1</i> geno priešrovinii ir pasrovinii regionais sulietais su <i>A. baumannii</i> <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete	Šis darbas
pUC19_sacB_UDygaUGm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>ygaU</i> geno priešrovinii ir pasrovinii regionais sulietais su <i>A. baumannii</i> <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete	Šis darbas
pUC19_sacB_UDgltIGm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>gltI</i> geno priešrovinii ir pasrovinii regionais sulietais su <i>A. baumannii</i> <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete	Šis darbas
pUC19_sacB_UDbrkBGm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>brkB</i> geno priešrovinii ir pasrovinii regionais sulietais su <i>A. baumannii</i> <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete	Šis darbas
pUC19_sacB_UDpqiBGm	pUC19_sacB su <i>A. baumannii</i> <i>pqiB</i> geno priešrovinii ir pasrovinii regionais sulietais su <i>A. baumannii</i> <i>aac(3)-I</i> gentamicino aminoglikozido aciltransferazės kasete	Šis darbas
<i>ph-ns</i>	pUC19_gm_AcORI su <i>hns</i> genu kartu su priešrovinii regionu (tikėtinas promotorius)	Šis darbas

Kamieniai	Savybės	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> OP50	Laukinis tipas, <i>C. elegans</i> bakterinis maisto šaltinis	Brenner, 1974
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Laukinis tipas	ATCC 33305
<i>Acinetobacter baumannii</i> III-a Δwza	<i>A. baumannii</i> izoliato III-a wza delecinis mutantas; be papildomo atsparumo žymens	Šis darbas
<i>Abc₁</i> Δ <i>blp1</i>	<i>blp1</i> delecinis <i>A. baumannii</i> izoliato <i>Abc₁</i> mutantas; be papildomo atsparumo žymens	Šis darbas
<i>Abc_{II}</i> Δ <i>blp1</i>	<i>blp1</i> delecinis <i>A. baumannii</i> izoliato <i>Abc_{II}</i> mutantas; be papildomo atsparumo žymens	Šis darbas
<i>Abc₁</i> Δ <i>ompA</i>	<i>ompA</i> delecinis <i>A. baumannii</i> izoliato <i>Abc₁</i> mutantas; be papildomo atsparumo žymens	Šis darbas
<i>Abc_{II}</i> Δ <i>ompA</i>	<i>ompA</i> delecinis <i>A. baumannii</i> izoliato <i>Abc_{II}</i> mutantas; be papildomo atsparumo žymens	Šis darbas
<i>Abc₁</i> Δ::p	<i>Abc₁</i> izoliatas su pUC19_gm_AcORI plazmide	Šis darbas
<i>Abc_{II}</i> Δ::p	<i>Abc_{II}</i> izoliatas su pUC19_gm_AcORI plazmide	Šis darbas
<i>Abc₁</i> Δ <i>blp1</i> ::p	<i>Abc₁</i> Δ <i>blp1</i> kamienas su pUC19_gm_AcORI plazmide	Šis darbas
<i>Abc_{II}</i> Δ <i>blp1</i> ::p	<i>Abc_{II}</i> Δ <i>blp1</i> kamienas su pUC19_gm_AcORI plazmide	Šis darbas
<i>Abc₁</i> Δ <i>ompA</i> ::p	<i>Abc₁</i> Δ <i>ompA</i> kamienas su pUC19_gm_AcORI plazmide	Šis darbas
<i>Abc_{II}</i> Δ <i>ompA</i> ::p	<i>Abc_{II}</i> Δ <i>ompA</i> kamienas su pUC19_gm_AcORI plazmide	Šis darbas

<i>Abc::pblp1_{IC1}</i>	<i>Abc::pblp1</i> kamienas komplementuotas <i>pblp1_{IC1}</i>	Šis darbas
<i>Abc::pblp1_{IC2}</i>	<i>Abc::pblp1</i> kamienas komplementuotas <i>pblp1_{IC2}</i>	Šis darbas
<i>Abc::pblp1_{IC3}</i>	<i>Abc::pblp1</i> kamienas komplementuotas <i>pblp1_{IC3}</i>	Šis darbas
<i>Abc::pblp1_{IC4}</i>	<i>Abc::pblp1</i> kamienas komplementuotas <i>pblp1_{IC4}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC1}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC1}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC2}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC2}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC3}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC3}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC4}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC4}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC5}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC5}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC6}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC6}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC7}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC7}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC8}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC8}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC9}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC9}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC10}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC10}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC11}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC11}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC12}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC12}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC13}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC13}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC14}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC14}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC15}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC15}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC16}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC16}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC17}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC17}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC18}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC18}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC19}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC19}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC20}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC20}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC21}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC21}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC22}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC22}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC23}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC23}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC24}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC24}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC25}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC25}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC26}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC26}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC27}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC27}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC28}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC28}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC29}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC29}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC30}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC30}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC31}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC31}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC32}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC32}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC33}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC33}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC34}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC34}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC35}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC35}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC36}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC36}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC37}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC37}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC38}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC38}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC39}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC39}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC40}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC40}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC41}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC41}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC42}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC42}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC43}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC43}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC44}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC44}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC45}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC45}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC46}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC46}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC47}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC47}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC48}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC48}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC49}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC49}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC50}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC50}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC51}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC51}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC52}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC52}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC53}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC53}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC54}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC54}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC55}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC55}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC56}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC56}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC57}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC57}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC58}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC58}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC59}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC59}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC60}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC60}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC61}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC61}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC62}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC62}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC63}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC63}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC64}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC64}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC65}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC65}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC66}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC66}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC67}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC67}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC68}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC68}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC69}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC69}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC70}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC70}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC71}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC71}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC72}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC72}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC73}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC73}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC74}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC74}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC75}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC75}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC76}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC76}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC77}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC77}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC78}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC78}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC79}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC79}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC80}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC80}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC81}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC81}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC82}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC82}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC83}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC83}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC84}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC84}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC85}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC85}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC86}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC86}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC87}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC87}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC88}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC88}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC89}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC89}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC90}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC90}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC91}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC91}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC92}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC92}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC93}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC93}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC94}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC94}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC95}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC95}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC96}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC96}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC97}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC97}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC98}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC98}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC99}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC99}</i>	Šis darbas
<i>Abc::ompA_{IC100}</i>	<i>Abc::ompA</i> kamienas komplementuotas <i>ompA_{IC100}</i>	Šis darbas

2.2. Metodai

2.2.1. *A. baumannii* auginimas

A. baumannii buvo auginamos LB terpėje 37 °C purtant aerobinėmis sąlygomis. Reikalingas antras biosaugos lygis buvo užtikrinamas dirbant su gyvomis bakterijomis biologinės saugos laminarinės traukos spintoje biosaugos lygio reikalavimus atitinkančioje laboratorijoje. Darbo vieta dezinfekuojama ultravioletine spinduliuote arba 70 % etanolio, visos atliekos neutralizuojamos autoklavuojant.

2.2.2. Ląstelių paviršiaus hidrofobiškumo nustatymas

Ląstelių paviršiaus hidrofobiškumas nustatytas išsodinimo testu SAT (angl. *Salt Aggregation Test*) pagal Nwanyanwu ir Abu (2013). *A. baumannii* augintos ant LB agarą 37 °C per naktį. Ląstelių biomasė suspenduota ddH₂O ir sumaišyta su vienodu kiekiu 0,125 – 4 M koncentracijos amonio sulfato tirpalu. Ląstelių agregacija stebėta mikroskopu su ×50 didinimu. Ląstelių hidrofobiškumo indeksu buvo laikoma mažiausia druskos koncentracija, kurioje bakterijos buvo linkusios tarpusavyje agreguoti.

2.2.3. Bakterijų judėjimo fenotipo nustatymas

Trūkčiojimo ir ropojimo judėjimo tipai buvo nustatyti kaip aprašyta anksčiau (Eijkelkamp ir kt., 2011) šiek tiek modifikavus protokolą. Viena bakterijų kolonija užsėta su steriliu antgaliu į 1 ml TSB terpę. Atitinkamai 0,75 % ir 0,25 % agarą koncentracijos naudotos trūkčiojimo ir ropojimo fenotipams stebėti. Lėkštelės inkubuotos drėgnuose

sandariuose kontaineriuose 37 °C 48 val. arba 24 val. Judėjimas buvo išreikštas išmatavus nušliaužtos zonos spindulį milimetrais.

2.2.4. Bakterijų pelikulės įvertinimas

Pelikulės formavimas įvertintas pagal Giles ir kt. (2015) su kai kuriomis modifikacijomis. Į 12-os šulinėlių plokštelę (TPP) su 3 ml TSB terpės inokuliuota $\times 1000$ praskiesta naktinė kultūra ir inkubuota 30 °C 30 val. Pelikulė išsodinta į terpę įpylus 200 μ L izopropanolio, tada ištirpinta 0,5 ml 10 mM NaOH labai greitai jį neutralizuojant su druskos rūgštimi. Išmatuota OD₆₀₀ sugertis.

2.2.5. Džiūvimo testas

A. baumannii bakterijos augintos LB terpėje 37 °C per naktį. Kultūra praskiesta iki OD₆₀₀=0,1. 10 μ l kiekvieno mėginio užlašinta ant polistireno paviršiaus, leista išdžiūti ir galiausiai mėginiai buvo inkubuoti 28 °C 24 val. Bakterijų mėginiai prieš džiūvimą ir po jo buvo praskiesti serijiniais $\times 10$ skiedimais ir išsėti ant LB agaro. Bakterijų išgyvenamumas (D % – atsparumo džiūvimui indeksas) buvo išreikštas lyginant džiūvimą išgyvenusių bakterijų skaičių su pradiniu bakterijų skaičiumi.

2.2.6. Bioplėvelės formavimo nustatymas

Bakterijų bioplėvelė auginta $\times 1000$ naktinės bakterijų kultūros skiedimus inokuliuojant į LB terpę 96 U-formos šulinėlių plokštelėje (Nerbe Plus). Kultūros augintos be purtymo 37 °C 18 val. Pašalinus terpę, šulinėliai 3 kartus praplauti 0,9 % NaCl tirpalu, kad būtų pašalintos neprikibusios bakterijos. Bioplėvelės nudažytos 0,5 % kristalinio violeto tirpalu inkubuojant 5 min., tada tris kartus praplautos 0,9 % NaCl tirpalu. Dažas išplautas 96 % etanoliu inkubuojant 5 min. Sugertis ties OD₅₈₀ normalizuota pagal planktoninių ląstelių sugertį ties OD₆₀₀ ir bioplėvelės formavimas buvo išreikštas apskaičiuojant OD_{580/600} santykį.

2.2.7. Bakterijų adhezijos prie plastiko nustatymas

Penkis kartus skiestos naktinės kultūros inokuliuotos į 200 μ l LB terpę 96 F-formos polistireno šulinėliuose (Nerbe Plus) ir inkubuotos 2 val. 28 °C. Šulinėliai tris kartus praplauti su PBS buferiu ir nudažyti su kristalo violeto dažu (žr. 2.2.15 skyrelį). Bakterijų gebėjimas adhezuotis prie plastiko paviršiaus buvo išreikštas apskaičiuojant santykį OD_{580/600}.

2.2.8. Tyrimai su ląstelių kultūromis

Pelių plaučių epitelio ląstelių linija LL/2 (LLC1), žmogaus plaučių epitelio A549 ir pelių makrofagų/monocitų linija J774 buvo augintos DMEM terpėje (Gibco, 31966021) su 10 % veršiuko serumo (angl. FBS) (Gibco, 12657029) 37 °C esant 5 % CO₂ koncentracijai.

Bakterijų adhezijos prie eukariotinių ląstelių tyrimams ląstelės buvo užsėtos 96 šulinėlių plokštelėje $1,5 \times 10^4$ ląstelės/šulinėlyje tankiu. Adhezinės ląstelės buvo augintos 48 val., kol ląstelių monosluoksniai pasiekė ~80 % paviršiaus padengimo.

A. baumannii bakterijos augintos 12 val. LB terpėje 37 °C su pastoviu 145 rpm purtymu. Bakterijų suspensijos buvo normalizuotos iki OD₆₀₀=0,7 ir praplautos su PBS. Epitelinės ląstelės infekuotos bakterijų suspensijomis santykiu ~1000 bakterijų/ląstelei. Pradinis bakterijų skaičius (angl. CFU), užneštas ant epitelio ląstelių, buvo apskaičiuotas sėjant dešimtkartinius bakterijų suspensijos skiedimus ant LB agaro.

Infekuoti ląstelių monosluoksniai inkubuoti 90 min. 37 °C. Tada šulinėliai atsargiai tris kartus praplauti su DPBS, kad būtų pašalintos neprisitvirtinusios bakterijos. Epitelio ląstelės suspenduotos ddH₂O ir sulizuotos jas intensyviai pipetuojant. Adhezavusios bakterijos buvo apskaičiuotos sėjant dešimtkartinius skiedimus ant LB agaro ir normalizuotos pagal pradinį bakterijų CFU. Bakterijų adhezijos prie eukariotinių ląstelių indeksas (A %) buvo išreikštas pradinio ir adhezavusių bakterijų CFU santykiu.

Antigenų citotoksiškumo tyrimas buvo atliekamas inkubuojant LL/2 ląsteles su rekombinantiniais baltymais DMEM terpėje su 10 % veršiuko serumo 37 °C 24 val su 5 % CO₂. 20 µl MTS tirpalo pridėta į ląstelių augimo terpę ir inkubuota 4 val. 37 °C su 5 % CO₂. Po inkubacijos matuota sugertis kai OD₄₉₀. Ląstelių proliferacija lyginta su kontrolinėmis ląstelėmis, inkubuotomis su PBS buferiu.

Bakterijų fagocitozės tyrimams J774 ląstelės buvo užsėtos 96 šulinėlių plokštelėje $5,6 \times 10^4$ ląstelės/šulinėlyje tankiu ir augintos 14 val. Makrofagai buvo užkrėsti bakterijomis santykiu ~200 bakterijų vienai ląstelei. Infekuoti makrofagai buvo inkubuoti 60 min. 37 °C, vėliau praplauti tris kartus su PBS ir papildomai inkubuoti su DMEM terpe su 400 µg/ml gentamicino 30 min. Po trijų praplovimų su PBS, ląstelės suspenduotos ddH₂O ir sulizuotos jas intensyviai pipetuojant. Fagocituotos (viduląstelinės) bakterijos apskaičiuotos sėjant dešimtkartinius skiedimus ant LB agaro ir normalizuotos pagal pradinį infekcijai naudotų bakterijų CFU. Bakterijų

fagocitozės indeksas (F %) buvo išreikštas pradinio ir fagocituotų bakterijų CFU santykiu.

Opsonofagocitinio žudymo eksperimentas buvo atliekamas J774 makrofagus auginant DMEM terpėje su 10 % veršiuko serumo 37 °C. Makrofagai tris dienas buvo stimuliuoti su 40 ng/ml *E. coli* LPS (Sigma-Aldrich). Makrofagai (1×10^5 ląstelės į šulinėlį) ir *A. baumannii* bakterijos (1×10^4 CFU į šulinėlį) buvo sumaišyti su karščiu inaktyvuotu pelių serumu santykiu 1:200. Po 1 val. inkubacijos $\times 10$ mėginių skiedimai išsėti ant LB agaro. Serumo bakterijų inaktyvavimo įvertis suskaičiuotas lyginant bakterijų skaičių su bakterijų CFU iš mėginio su naiviu serumu.

2.2.9. Bakterijų atsparumo veršiuko serumui nustatymas

Bakterijų atsparumas komplementui vertintas matuojant augimo kreives aktyviame arba karščiu išaktyvintame (56 °C 40 min.) 80 % veršiuko serume LB terpėje ir lyginant su bakterijų augimu 100 % LB terpėje. $\times 1000$ naktinės kultūros skiedimai buvo inokuliuoti į augimo terpes ir inkubuoti 37 °C esant pastoviam purtymui kas 20 min. Augimo kreivės registruotos Tecan Infinite M200 Pro mikroplokštelių skaitytuvu.

2.2.10. Bakterijų DNR išskyrimas

Genominė arba plazmidinė DNR išskirtos iš naktinių bakterijų kultūrų naudojant GeneJET Genomic DNA Purification Kit ir GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinius vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. DNR koncentracija ir grynumas nustatyta NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) spektrofotometru.

2.2.11. PGR ir tikro laiko PGR

DNR fragmentų pagausinimui buvo atliekama PGR. Reakcijos atliktos naudojant 2.2 lentelėje pateiktus pradmenis. DNR fragmentai padauginėti naudojant DreamTaq arba Phusion polimerazes (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Pradmenų prilydymo temperatūra apskaičiuota pagal konkrečias pradmenų sekas.

Genų raiška tirta atliekant tikro laiko PGR (angl. RT-PCR) naudojant DreamTaq polimerazę. RNR iš ląstelių išskirta naudojant „Gene JET RNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Kopijinė DNR susintetinta komerciniu rinkiniu „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific). Tikro laiko PGR reakcijos atliktos naudojant 2.2 lentelėje pateiktus pradmenis naudojant

SYTO9 fluorescensinį dažą. Santykiniai raiškos pokyčiai kiekybinės RT-PCR metu apskaičiuoti pagal $\Delta\Delta C_t$ metodiką, normalizuojant pagal *rpoB* geną.

2.2.12. *A. baumannii* ST tipų nustatymas

PGR reakcijos atliktos naudojant 2.2 lentelėje pateiktus pradmenis. DNR fragmentai padauginėti naudojant Phusion polimerazę (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Pradmenų prilydymo temperatūra apskaičiuota pagal konkrečias pradmenų sekas. Amplikonai toliau buvo analizuojami DNR sekoskaitos būdu.

2.2.13. *A. baumannii* imliųjų (elektrokompetentinių) ląstelių ruošimas

A. baumannii bakterijos užsėtos į 2 ml LB terpės ir augintos per naktį purtyklėje 37 °C. Naktinė kultūra centrifuguojama 12000 × g greičiu 2 min. 4 °C. Nuosėdos suspenduojamos 1 ml 10 % glicerolio tirpale ir vėl centrifuguojamos. Plovimas gliceroliu atliekamas 3 kartus. Ląstelės suspenduojamos 100 µl 10 % glicerolio tirpale.

2.2.14. *A. baumannii* delecinių mutantų kūrimas

Genų delecijos *A. baumannii* genome buvo atliekamos pagal anksčiau aprašytą schemą (Oh ir kt., 2015). Priešsroviniai ir pasroviniai genų regionai amplifikuoti su pradmenų poromis, pateiktomis 2.2 lentelėje. Sulietinio PGR būdu amplikonai buvo sujungti su gentamicino atsparumo kasete *aac3I*, iš klinikinio *A. baumannii* izoliato. Gauta DNR klonuota į pUC19_ *sacB* vektorių. Konstruktas atsirinktas *E. coli* JM107 kamiene. Gauta plazmidė transformuota elektroporacijos būdu į pasirinktą *A. baumannii* izoliatą. Kolonijos, į kurių genomą po pirmos rekombinacijos įsiterpė vektorius, atsirinktos ant LB agaro su 30 µg/ml gentamicino, kadangi vektorius turėjo šiam antibiotikui atsparumą nulemiančią kasetę. Kolonija buvo inokuliuota LB terpėje 4 val. Bakterijos, kuriose antros rekombinacijos metu vektorius kartu su genu-taikiniu buvo pašalinti iš genomo, atsirinktos sėjant serijinius skiedimus ant LB terpės su 10 % sacharozės, kadangi levansukrazė, koduojama *sacB* geno, katalizuoja Gram-neigiamoms bakterijoms toksiškų polisacharidų sintezę iš terpėje esančios sacharozės. Mutantai buvo patvirtinti naudojant PGR ir DNR sekoskaitą.

2.2.15. Genų klonavimas

Komplementacijos eksperimentams genų DNR amplifikuota su priešsrovine seka (tikėtinomis promotorinėmis sekomis) naudojant pradmenų poras, pateiktas 2.2 lentelėje. Apie 1,6 kb DNR fragmentas su *ompA* genu ir apie 10 kb fragmentas su *blp1* genu buvo amplifikuoti naudojant dideliu tikslumu pasižyminčią Phusion polimerazę (Thermo Fisher Scientific). DNR amplikonai klonuoti į pUC19_gm_AcORI vektorių su gentamicinui atsparumą lemiančia kasete ir *Acinetobacter* ori seka naudojant SmaI restrikcijos endonukleazę (Thermo Fisher Scientific). Gautos komplementacijos plazmidės atrinktos *E. coli* JM107 kamienoje, konstruktai patikrinti DNR sekoskaita, tada transformuoti elektroporacijos būdu į atitinkamus *A. baumannii* izoliatus ir kolonijos atrinktos ant LB agarų su 30 µg/ml gentamicino. Taškinės mutacijos *ompA* gene įvestos tikslinės mutagenezės būdu, inversiniu PGR su inversinių pradmenų poromis OAsp268F/OAsp268R ir OArg283F/OArg283R, kuriose buvo įvesti atitinkamai pakeisti kodonai, ir naudojant *pompA*_{IC1} plazmidę (2.2 lentelė) kaip matricą. Po PGR laukinio tipo plazmidė hidrolizuojama su DpnI restrikcijos endonukleaze, o linijinė mutantinė plazmidė fosforilinama su T4 polinukleotidkinaze (Thermo Fisher Scientific) ir transformuojama į $\Delta ompA$ *A. baumannii* kamieną. Gauti konstruktai buvo patvirtinti DNR sekoskaita.

2.2.16. Kapsulės polisacharidų frakcionavimas

Kapsulės polisacharidai analizuoti kaip aprašyta anksčiau (Geisinger ir Isberg, 2015). Bakterijų kultūros augintos ant LB agarų 37 °C per naktį, suspenduotos PBS, normalizuota iki OD₆₀₀=3. Polisacharidai išskirti maišant maksimaliu greičiu 30 sekundžių, centrifuguojant 9000 × g 10 min. ir išsodinant su 75 % šaltu etanoliumi per naktį. Nucentrifugavus nuosėdos ištirpintos NDS mėginio užnešimo buferyje. Mėginiai analizuojami išskirstant 12 % NDS-PAGE gelyje ir dažant su 0,1 % (w/v) sacharidams specifiniu alciano mėlio dažu, kaip aprašyta Mercaldi ir kt. (2008).

2.2.17. Konfokalinė skenuojanti mikroskopija

Bakterijų formuojamų bioplėvelių konfokalinė lazerio skenuojanti mikroskopija (angl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) atlikta „Microscopy and Imaging Platform MIMA2“ (Jouy-en Josas, Prancūzija). x1000 skiestos *A. baumannii* naktinės kultūros užsėtos LB terpėje 96 šulinėlių plokštelėje ir inkubuotos 2 arba 24 val. Bakterijų bioplėvelės vizualizuotos naudojant „Filmtracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability

Kit“ (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Plokštelės nuskaitytos konfokalinio lazerio skenuojančiu mikroskopu. Vaizdai apdoroti IMARIS 7.7.2 programine įranga.

2.2.18. Skenuojanti elektroninė mikroskopija

A. baumannii ląstelių ir sekretuojamų išorinės membranos pūslelių (angl. *outer membrane vesicles*, OMV) skenuojanti elektroninė mikroskopija (angl. *Transmission electron microscopy*, TEM) atitinkamai atlikta „Microscopy and Imaging Platform MIMA2“ (Jouy-en Josas, Prancūzija) ir Eukariotų genų inžinerijos skyriuje (VU, GMC, Biotechnologijos institutas). Bakterijos užaugintos LB terpėje 37 °C per naktį, fiksuotos su 0,1 M natrio kakodilato buferiu (pH 7,2) ir 2 % glutaraldehido 3 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos su Oolong arbatos ekstraktu kakodilato buferyje ir postfiksavimo 1 % osmio tetroksido tirpale su 1,5 % kalio cianferatu, bakterijos dehidratuotos nuosekliai didinant etanolio koncentraciją. Mėginys supjaustytas mikrotomu, perkeltas ant vario plokštelių ir dažytas su kontrastiniu švino citrato dažu. Plokštelės analizuotos HT7700 skenuojančiu elektroniniu mikroskopu naudojant 80 kV.

Išorinės membranos pūslelės mikroskopuotos ant paladžiu padengtų anglies plokštelių ir dažytos 2 % vandeniniu uracilo acetato tirpalu. Pūslelės vaizdintos Morgagni 268 elektroniniu mikroskopu (FEI, Hillsboro, OR, USA).

2.2.19. Išorinės membranos pūslelių išskyrimas

A. baumannii augintos 130 ml LB terpės 37 °C 20 val. su pastoviu purtymu. Ląstelės pašalintos centrifuguojant 10000 × g 4 °C. Supernatantas filtruotas per 0,22 μm filtrą (Sigma-Aldrich). Išorinės membranos pūslelės (OMV) surinktos filtratą ultracentrifuguojant 130000 × g 4 °C 3 val. Pūslelės suspenduotos 100 μl PBS buferio. Baltymų koncentracija nustatyta Bradfordo reagentu (Broth). 20 μl suspensijos išsėta ant LB terpės kaip sterilumo kontrolė. Pūslelės vaizdintos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. Pūslelių baltymai analizuoti 12 % poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

2.2.20. Membraninių baltymų išskyrimas ir analizė

A. baumannii kultūros augintos LB terpėje 37 °C per naktį. Ląstelės praplautos ir suspenduotos 10 mM Tris buferyje (pH 7,5) iki OD₆₀₀=0,5, sulizuotos užšaldant bakterijas -80 °C 2 val. ir vėliau veikiant ultragarsu.

Ląstelių nuolaužos surinktos centrifuguojant $7000 \times g$ 10 min. Membraniniai baltymai iš supernatanto išsodinti ultracentrifuguojant $120000 \times g$ 45 min. 4 °C. Nuosėdos suspenduotos PBS buferyje. Baltymų frakcijos analizuotos 12 % poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

2.2.21. Antigenų klonavimas į raiškos vektorių ir gryninimas giminingumo chromatografijos būdu

Visas *ompA* genas ir *blp1* geno fragmentas, koduojantis baltymo C-galo 2652-3363 aminorūgštis, amplifikuoti su atitinkamais pradmenimis (2.2 lentelė) naudojant Phusion polimerazę. Fragmentai klonuoti į pET28b raiškos vektorių taip, kad 6×His inkaras buvo sulietas su tikslinio baltymo N-galu. Plazmidės patikrintos DNR sekoskaita ir transformuotos elektroporacijos būdu į *E. coli* raiškos kamienus BL21 (DE3) (OmpA) bei ArcticExpress (DE3) (Blp1) (2.2 lentelė). Bakterijos augintos LB terpėje su 40 µg/ml kanamicino iki $OD_{600}=0,5$. Baltymų raiška indukuota 0,5 mM izopropil β-d-tiogalaktopiranozidu (IPTG) ir inkubuojant 28 °C (OmpA) ir 14 °C (Blp1) 16 val. Ląstelės nucentrifuguotos $7000 \times g$ 15 min. ir suspenduotos lizės buferiniame tirpale (20 mM NaH₂PO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazolo). Proteazių slopiklis PMSF (Roth) pripiltas į suspensiją prieš ląstelių ardymą ultragarsu. Netirpūs komponentai nucentrifuguoti $12000 \times g$ 4°C 30 min. Baltymai išgryninti giminingumo chromatografijos būdu naudojant 1 ml HisTrapHPTM nikelio-sefarozės kolonėlę (GE Healthcare). Baltymai išplauti naudojant imidazolo gradientą eliucijos buferiniame tirpale (20 mM NaH₂PO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, 500 mM imidazolo). Eliucijos tirpalas dializuotas naudojant Sephadex G–25 kolonėlę (GE Healthcare) keičiant į PBS buferį. Išgryninti baltymai analizuoti 12 % poliakrilamidiniame gelyje. Rekombinantiniai baltymai laikyti -80 °C.

2.2.22. Imunofermentinė baltymų analizė

Baltymai iš poliakrilamidinio gelio pernešti ant nitroceliuliozinės membranos (Amersham Biosciences) naudojant pusiau sausą (angl. *semi-dry*) baltymų pernašos metodą (Sambrook ir kt., 1989). Nitroceliuliozinė membrana blokuota su 5 % lieso pieno PBST buferyje (PBS su 0,1 % Tween 20) buferyje 1 val. kambario temperatūroje. Tada membrana 1 val. inkubuota su pelių, imunizuotų OmpA baltymu, serumu (1:5000 skiedimas). Membrana praplauta tris kartus su PBST buferiu be pieno ir inkubuota su antriniais ožkos antikūnais (prieš pelių IgG),

konjuguotais su krienų peroksidaze 1:4000 (Bio-Rad) 1 val. Membrana praplauta PBST buferiu tris kartus, užpilta „1-step ultra TMB blotting solution“ (ThermoFisher Scientific) tirpalu. Reakcija stabdyta praplaunant membraną su distiliuotu vandeniu.

ELISA (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) testas buvo atliekamas specifinių antikūnų nustatymui vakcinuotose pelėse. 96 šulinėlių plokštelė (Maxisorp, Nalge Nunc) padengta 0,2 µg baltymo PBS buferyje į šulinėlį ir inkubuota per naktį 4 °C. Po to kai šulinėliai buvo praplauti du kartus su PBST buferiu, ×2 serumo skiedimai PBST buferyje su 5 % lieso pieno buvo inkubuoti 1 val. 37 °C temperatūroje. Plokštelė praplauta tris kartus su PBST buferiu ir inkubuota su 100 µl antrinių ožkos antikūnų (prieš pelių IgG), konjuguotų su krienų peroksidaze 1:4000 (Bio-Rad) 1 val. Šulinėliai 4 kartus praplauti su PBST buferiu ir inkubuoti su 100 µl krienų peroksidazės substratu (ThermoFisher Scientific) 20 min. kambario temperatūroje tamsoje. Reakcija sustabdyta pripylus 100 µl 2N sieros rūgšties, matuota OD₄₅₀ sugertis. Titravimo pabaiga buvo pasirinkta vertė, kurios sugertis buvo bent 0,1 didesnė nei kontrolinių šulinėlių (be serumo).

2.2.23. *Caenorhabditis elegans* vaisingumo tyrimas

C. elegans N2 nematodų (gauta iš dr. M. Rudgalvytės, University of Eastern Finland) kiaušinėliai užauginti iki L1 stadijos kirmėlių, kurios vėliau sinchronizuotos per naktį 20 °C. Nematodai buvo auginami ant NGM terpės su *E. coli* kamieno OP50 gazonu, kaip nematodų maisto šaltiniu, iki kol nematodai pasiekė L2 stadiją. Naktinės *A. baumannii* kultūros išsėtos ant NGM terpės su 1 % etanolio, nes parodyta, kad etanolis indukuoja virulentinės *A. baumannii* savybes (Smith ir kt., 2007a). Lėkštelės su *A. baumannii* kultūromis augintos per naktį 21,5 °C. Vienas L2 stadijos nematodas su sterilia kilpele buvo perneštas ant NGM terpės su *A. baumannii* kultūra ir inkubuotas 21,5 °C. Trečią dieną po perkėlimo nustatytas palikuonių skaičius.

2.2.24. Pelių sepsio modelis

8-12 savaičių BALB/c pelės įsigytos iš VU Gyvybės mokslo centro Biochemijos instituto. Gyvūnai buvo prižiūrimi vadovaujantis rekomendacijomis, parengtomis pagal Europos parlamento 2010 metų rugsėjo 22 dienos direktyvą 2010/63/EU. Tyrimai buvo atliekami pagal Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimą nr. G2-72.

Pelių sepsio modelis buvo pritaikytas kaip aprašyta anksčiau (Huang ir kt., 2014b). *A. baumannii* kultūros augintos LB terpėje 18 val. 37 °C. Bakterijos praplautos ir suspenduotos PBS buferyje iki atitinkamos sugerties, kuri buvo nustatyta anksčiau sėjant skiedimus ant LB agaro ir skaičiuojant CFU. Mėginiai sumaišyti su 5 % kiaulės skrandžio mucinu (w/v; Sigma-Aldrich). 0,5 ml mėginio buvo sušvirkšta pelių patelėms į peritoninę ertmę. Tikslus mėginyje esančių bakterijų skaičius ir bakterijų, išskirtų iš pelės blužnies, titras buvo nustatytas sėjant skiedimus ant LB agaro. *A. baumannii* kolonijos buvo patvirtintos PGR su specifiniais pradmenimis (2.2 lentelė).

2.2.25. Pelių vakcinavimas

Aktyviai imunizacijai BALB/c pelių patinėliai (5 pelės grupėje) imunizuoti 2 µg rekombinantinio baltymo sušvirkšdiant į raumenį. Antigenai sumaišyti vienodu santykiu su pilnu Freundu adjuvantu pirmai vakcinacijai ir su nepilnu Freundu adjuvantu kitoms vakcinacijoms 14 ir 28 dienomis. Kontrolinė grupė vakcinuota vietoje antigeno naudojant PBS buferį su Freundu adjuvantais. 32 dieną po pirmos vakcinacijos surinkti pelių kraujo mėginiai ir tirtas specifinių imunoglobulinų G titras mėginiuose naudojant ELISA testą. Galiausiai, 42 dieną pelėms į peritoninio ertmę suleista 1×10^8 CFU Ab_{IC1} bakterijų. Pelių išgyvenamumas stebėtas 7 dienas.

Pasyviai imunizacijai BALB/c pelių patinėliams (3 pelės grupėje) į peritoninio ertmę sušvirkšta 200 µl Blp1 fragmentui specifinio antiserumo, gauto iš Blp1 fragmentu vakcinuotų pelių. Kontrolinei grupei suleista antiserumo iš pelių, kurios vakcinuotos PBS buferiu. Praėjus 6 val. po vakcinavimo, pelėms į peritoninio ertmę suleista 5×10^7 CFU Ab_{IC1} bakterijų. Pelių išgyvenamumas stebėtas 45 dienas.

2.2.26. Bioinformatinė ir statistinė analizė

Bioinformatinė analizė atlikta naudojant genomų ar baltymų sekas, gautas iš NCBI duomenų bazės. Sekų palyginiai paruošti naudojant TexShade įrankį arba Clustal O programą. Virulentinių veiksmų paieška vykdyta pasitelkiant VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) duomenų bazę, homologijos ieškotos su Blastn, Blastp ar psiBlast paieškos sistemomis. *A. baumannii* sekų tipai (ST) analizuoti PubMLST (<https://pubmlst.org/general.shtml>) platformoje. Statistiniai reikšmingumai skaičiuoti remiantis ANOVA su Tukey HSD arba t testais. Statistinė analizė atlikta naudojantis R platformos versija 3.5.1 (R Development Core Team, 2018) arba Microsoft Excel 2010 programa.

3. REZULTATAI

Pirmoje šio darbo dalyje tirti klinikinių *A. baumannii* izoliatų fenotipai, susiję su ląstelės paviršiaus savybėmis, nes tikėtina, kad jų pasireiškime dalyvauja nemažai potencialių su virulentiškumu siejamų komponentų. Apibūdinus *A. baumannii* izoliatų virulentes savybes, antroje darbo dalyje analizuoti konkretūs, su bakterijų paviršiaus savybėmis susiję komponentai, jų vaidmuo patogenezėje bei ryšys su aprašytais fenotipais. Galiausiai, identifikavus klinikinių *A. baumannii* izoliatų į ląstelės išorinę eksponuojamus virulentiškumo veiksnius, buvo tirtas tokių veiksmų gebėjimas stimuliuoti infekuoto organizmo (pelės) imuninę sistemą, tikintis pritaikyti antigenus aktyviai ir pasyviai vakcinacijoms.

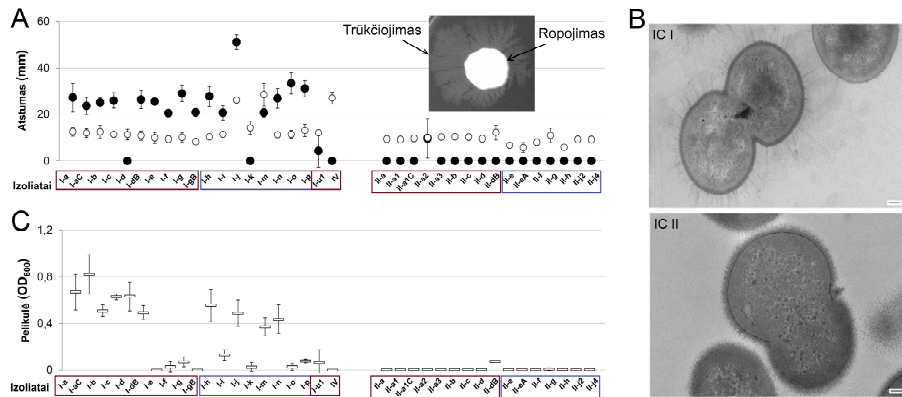
3.1. Ligoninėse paplitusių *A. baumannii* savybės

Darbe tirti 36 klinikinės kilmės *A. baumannii* izoliatai, kurie priklauso IC I (n=20) ir IC II (n=16) pandeminiam klonams, sukeliantiems didžiąją dalį visų *A. baumannii* infekcijų. Šie reprezentatyvūs izoliatai pasirinkti iš anksčiau apibūdintos 365 klinikinių izoliatų kolekcijos pagal jų priskyrimą konkrečiam pulsotipui (2.1 lentelė), kurie buvo nustatyti naudojant PFGE genotipavimo schemą (Povilonis ir kt., 2013). Pasirinktoje reprezentatyvioje grupėje dauguma izoliatų priklausė pulsotipams, kurie turėjo >2 izolatus (klonalūs izoliatai), taip pat į grupę buvo įtraukti ir izoliatai, kurie buvo pavieniai pulsotipe (sporadiniai izoliatai). Konkretūs tirti izoliatai buvo pavadinti pagal jų priskyrimą pandeminiam klonui (I arba II) ir jo pulsotipui (mažoji raidė šalia Romėniško skaičiaus). Analizuojamuose grafikuose izoliatai pateikti iš eilės pagal filogenetinį panašumą. Tirtos *A. baumannii* pasižymėjo dauginiu atsparumu antibiotikams, t.y. buvo atsparios trims arba daugiau antibiotikų klasių (2.1 lentelė).

3.1.1. Judrumas ir gebėjimas sudaryti pelikulę

Pirmiausiai buvo tirtas izoliatų judrumas, nes šis *A. baumannii* fenotipas siejamas su gebėjimu kolonizuoti abiotinius paviršius. Ropojimo (angl. *swarming*) fenotipas (3.1 pav., A, nuotrauka viršuje) buvo būdingas didžiąjai daliai izoliatų (92 %, 33/36), nors kolonijų šliaužimo zonos diametras nebuvo didelis – 6-14 mm (3.1 pav., A), lyginant su literatūroje aprašytais hiperjudriais *A. baumannii* izoliatais (Giles ir kt, 2015). Tik trys IC I izoliatai – I-j, I-m ir IV – pasižymėjo labiau išreikštu ropojimo fenotipu – jų judris

siekė 26 mm. Įdomu tai, kad trūkčiojimo fenotipas (angl. *twitching*) buvo išskirtinai būdingas tik IC I izoliatams (3.1 pav., A). Yra parodyta, kad *A. baumannii* IV tipo pilės atsakingos už trūkčiojimo fenotipą (Harding ir kt., 2013). Todėl nusprendėme palyginti ląstelių paviršių struktūras TEM metodu vaizdinant reprezentatyvaus judraus IC I izoliato ($Ab_{IC\ I}$) ir nejudraus IC II izoliato (II-a) ląsteles (3.1 pav., B). IC I izoliato ląstelių paviršiui buvo būdingos ilgos pilių tipo struktūros, kurių neturėjo nejudraus IC II izoliato ląstelės.



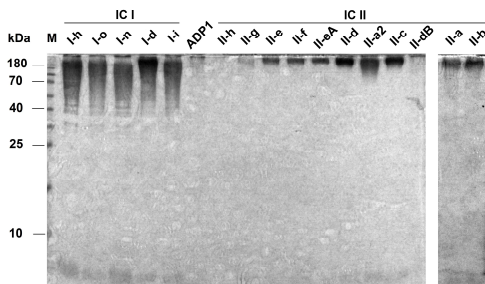
3.1 pav. IC I ir IC II *A. baumannii* izoliatų trūkčiojimo ir ropojimo fenotipai. A – trūkčiojimo (●) ir ropojimo (○) fenotipai įvertinti atstumais nuo inokuliacijos centro, mm; B – reprezentatyvių IC I ir IC II izoliatų TEM nuotraukos, skalė – 70 nm; C – pelikulės biomasė (⇒), įvertinta matuojant 600 nm sugertį suspendavus pelikulę vandeniniame tirpale. Pateikti duomenų vidurkiai ± standartiniai nuokrypiai analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus. Romėniški skaitmenys I ir II, nurodo IC I ir IC II pandeminius klonus. Raudonai apibrėžti paplitusių pulsotipų izoliatai, mėlynai – sporadiniai izoliatai.

Neseniai parodyta sąsaja tarp *A. baumannii* gebėjimo judėti ir formuoti bioplėvelę skysčio ir oro sąlytyje – pelikulę (Hölscher ir kt., 2015; Giles ir kt., 2015). Todėl toliau tyrėme IC I ir IC II klonų izoliatų gebėjimą formuoti tokią struktūrą. IC II izoliatai beveik neformavo pelikulės (3.1 pav., C), tuo tarpu 85 % IC I izoliatų (17/20) sintetino pelikulę, nors jos biomasė gana smarkiai varijavo tarp izoliatų. Nors trūkčiojimo ir pelikulės fenotipai buvo išskirtinai būdingi IC I izoliatams, akivaizdžios koreliacijos tarp šių dviejų fenotipų nenustatėme. Taip pat nebuvo pastebėtas ir šių savybių ryšys su izoliatų paplitimo dažniu.

3.1.2. Sekretuojami kapsulės polisacharidai

Užląsteliniai polisacharidai yra pelikulės ir bioplėvelės sudedamoji dalis (Armitano ir kt., 2014; Nait Chabane ir kt., 2014). Kapsulės polisacharidai yra svarbus *A. baumannii* veiksnys apsisaugant nuo šeimininko imuninės

sistemos (Russo ir kt., 2010). Todėl mus domino, ar IC I ir IC II *A. baumannii* pasižymi sintetinamų polisacharidų skirtumais. Buvo išskirtos kapsulės polisacharidų frakcijos ir analizuotos NDS-PAGE gelyje dažant alciano mėlio dažu, kuris specifiskai jungiasi prie sacharidų. Paaiškėjo, kad IC I ir IC II izoliatai akivaizdžiai skiriasi sekretuojamos polisacharidinės kapsulės profiliais (3.2 pav.). IC I izoliatai sintetino kapsulę, sudarytą iš įvairaus ilgio polisacharidinių grandinių, o IC II izoliatų kapsulės sudarė išskirtinai didelės molekulinės masės polisacharidai. Taigi, šie duomenys rodo, kad sekretuojamos polisacharidų kapsulės sudėtis yra savitas *A. baumannii* pandeminių klonų IC I ir IC II bruožas. Sprendžiant iš nustatytų profilių, absoliuti dauguma tirtų *A. baumannii* turėjo kapsulę, tačiau du IC II izoliatai – II-h ir II-dB – tyrimo sąlygomis (LB, 37 °C) kapsulės nesintetino, kaip ir kontrolinis, kapsulės nesintetinant *Acinetobacter baylyi* kamienas (3.2 pav.). Verta pastebėti, kad visos be išimties *A. baumannii* sintetino lipooligosacharidą (LOS).



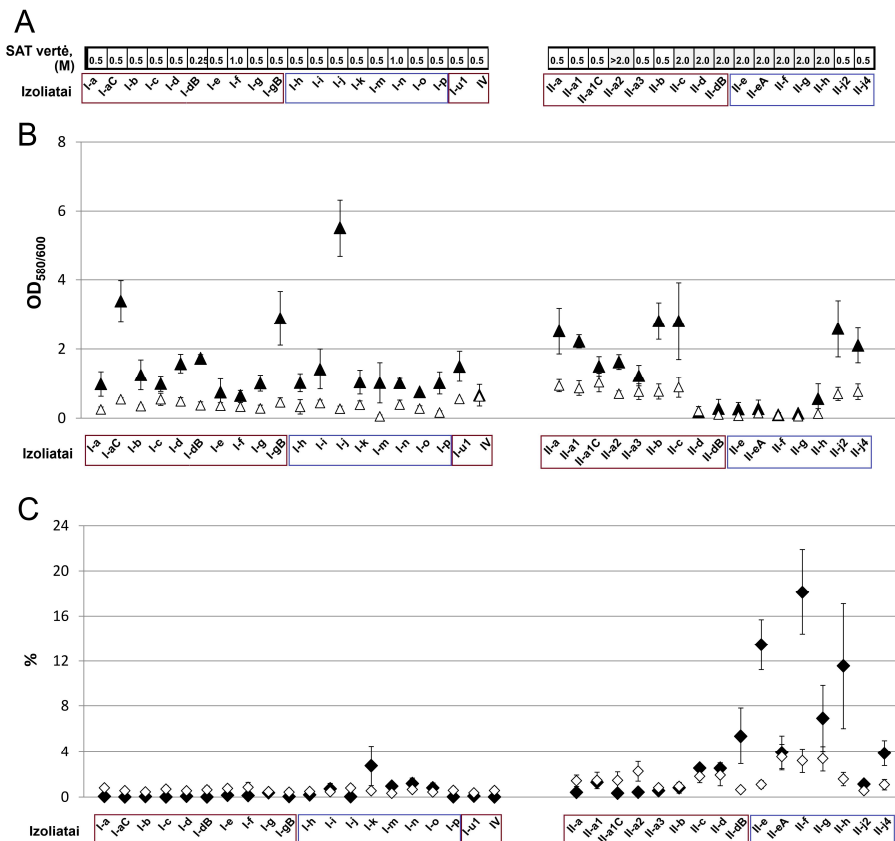
3.2 pav. IC I ir IC II *A. baumannii* kapsulės polisacharidų profiliai. Kapsulės polisacharidai (KPS) ir lipooligosacharidai (LOS) vaizdinti 12 % NDS-PAGE gelyje dažant su sacharidams specifiniu alciano mėlio dažu. Kairėje nurodyti baltymų standartų (M) dydžiai (PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)).

3.1.3. *A. baumannii* ląstelės paviršiaus hidrofobiškumas

Pastebėta, kad bakterijų sąveikai su abiotiniais ir biotiniais paviršiais reikšmingą įtaką daro bakterijos paviršiaus hidrofobinės savybės (Krasowska ir Sigler, 2014). IC I ir IC II klonų *A. baumannii* skyrėsi polisacharidinės kapsulės profiliais, todėl nusprendėme ištirti, ar skiriasi bakterijų paviršiaus hidrofobinės savybės. Hidrofobiškumas vertintas amonio sulfato testu (angl. *salt aggregation test*, SAT), kai esant tam tikrai druskos koncentracijai (SAT vertė), bakterijos tarpusavyje agreguoja. Kuo ląstelės paviršius hidrofiliškesnis, tuo bakterijų agregavimui reikia didesnės druskos koncentracijos. Visi IC I izoliatai pasižymėjo hidrofobinėmis paviršiaus savybėmis, nes jų agregavimui pasiekti reikėjo palyginti nedidelės amonio sulfato koncentracijos (0,25 – 1 M) (3.3 pav., A). Tuo tarpu IC II izoliatai pagal šią charakteristiką išsiskyrė į dvi grupes. Dalis izoliatų (44 %, 7/16), kaip ir IC I izoliatai, pasižymėjo hidrofobinėmis savybėmis. Tuo tarpu IC II

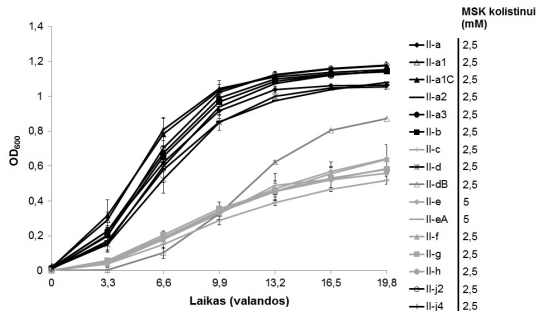
izoliatų II-a2, II-c, II-d, II-dB, II-e, II-eA, II-f, II-g ir II-h paviršius buvo akivaizdžiai hidrofilinis, nes agregavimui pasiekti reikėjo didelės druskos koncentracijos (≥ 2 M). Tarp šių izoliatų II-a2, II-c, II-d ir II-dB buvo klonalūs, o II-e, II-eA, II-f, II-g ir II-h – sporadiniai izoliatai.

Taigi, nustatėme, kad IC I izoliatams yra būdingas hidrofobinis ląstelės paviršius, o *A. baumannii* su hidrofiliniu ląstelės paviršiumi labiau paplitusios IC II pandeminiame klone. Verta pastebėti, kad IC II izoliatai su



3.3 pav. IC I ir IC II *A. baumannii* izoliatų su ląstelės paviršiumi susiję fenotipai. A – ląstelės paviršiaus hidrofobiškumas nustatytas druskos agregacijos testu (angl. *salt aggregation test*, SAT) ir išreikštas SAT verte, kuri atitinka minimalią amonio sulfato koncentraciją (M), kuri sukelia bakterijų agregaciją; B – bioplėvelės formavimas (▲) ir adhezija (Δ) prie plastiko, išreikšta sugerčių OD_{580/600} santykiu. Paklaidos nurodo standartinį nuokrypį analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus; C – atsparumas džiūvimui (◆) ir adhezija prie pelės plaučių epitelio ląstelių LL/2 (◇), išreikšti procentiniais įverčiais lyginant su pradiniu bakterijų skaičiumi. Paklaidos nurodo standartinę klaidą analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus. Romėniški skaitmenys I ir II atitinka IC I ir IC II pandeminius klonus. Raudonai apibrėžti paplitusių pulsotipų izoliatai, mėlynai – sporadiniai izoliatai.

hidrofiliniu ląstelės paviršiumi blogiau augo LB terpėje lyginant su IC II izoliatais, kuriems buvo būdingos hidrofobinės savybės (3.4 pav.). Žinoma, kad kolistinui atsparūs *A. baumannii* izoliatai pasižymi prastesniu augimu, nes LOS modifikacija fosfoetanolaminu sulėtina bakterijų dauginimąsi (Pelletier ir kt., 2013; Da Silva ir Domingues, 2017), todėl buvo tirtas IC II izoliatų atsparumas kolistinui. Vis dėlto, visi izoliatai buvo jautrūs šiam antibiotikui, nes nustatyta MSK vertė svyravo tarp 2,5 – 5 mM.



3.4 pav. IC II *A. baumannii* izoliatų augimas LB terpėje. Pilką spalvą – prastesniu augimu pasižymintys izoliatai. Paklaidos nurodo standartinį nuokrypį analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus. Minimali slopinanti kolistino koncentracija (MSK) išreikšta kolistino koncentracija (mM).

3.1.4. Sąveika su plastiko paviršiumi ir bioplėvelės formavimas

Nustačius *A. baumannii* paviršiaus hidrofobiškumo skirtumus, toliau buvo tiriamas izoliatų gebėjimas kibti prie plastiko paviršiaus ir formuoti bioplėvelės struktūras. Būtent šios savybės leidžia bakterijoms įsitvirtinti ant medicininės įrangos paviršių ligininėse (Krasowska ir Sigler, 2014).

Dauguma IC I ir IC II izoliatų gebėjo formuoti bioplėveles ant plastiko, nors kiekybinė fenotipo išraiška gana smarkiai varijavo (3.3 pav., B). Įdomu tai, kad izoliatų gebėjimas sudaryti bioplėveles nekoreliavo su bakterijų gebėjimu formuoti pelikulę, kas liudija apie skirtingus šiuos fenotipus lemiančius mechanizmus.

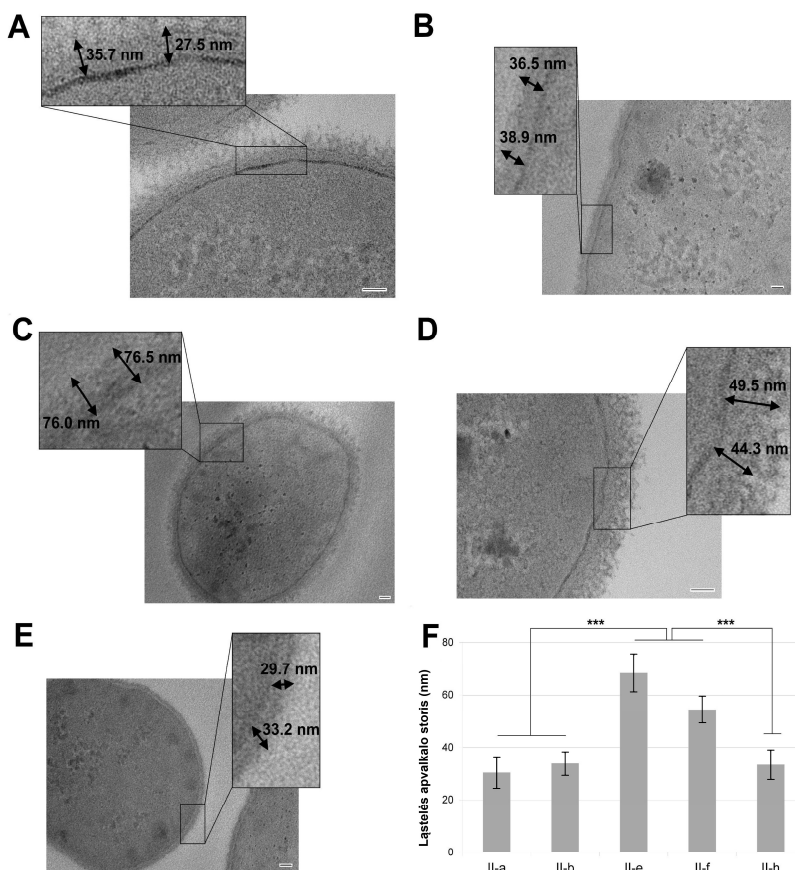
Ypatingą mūsų dėmesį patraukė grupė IC II izoliatų (II-d, II-dB, II-e, II-eA, II-f, II-g ir II-h), kurie pasižymėjo prastu gebėjimu formuoti bioplėvelę ir šis fenotipas koreliavo su jų išreikštomis hidrofilinėmis paviršiaus savybėmis. Manoma, kad ląstelės paviršiaus hidrofobinės savybės yra svarbios bakterijų sąveikai su plastiko paviršiumi dar prieš pradedant formuoti bioplėvelę (Krasowska ir Sigler, 2014), todėl toliau buvo tirtas ryšys tarp izoliatų hidrofobiškumo ir jų gebėjimo adhezuotis prie plastiko. IC I izoliatai pasižymėjo silpna adhezija prie plastiko, tuo tarpu IC II izoliatai su hidrofiliniu ląstelės paviršiumi šios savybės visai neturėjo. Hidrofobiniu paviršiumi pasižyminčių IC II izoliatų adhezija prie plastiko buvo žymiai labiau išreikšta (3.3 pav., B). Taigi, šie duomenys patvirtino

prielaidą, kad bakterijų paviršiaus hidrofobiškumas yra vienas esminių veiksnių, lemiančių *A. baumannii* izoliatų gebėjimą kibti prie abiotinių paviršių ir formuoti bioplėveles. Įdomu tai, kad dauguma hidrofilinėmis paviršiaus savybėmis pasižyminčių ir formuojančių plonesnę bioplėvelę IC II izoliatų buvo sporadiniai, kas rodo, kad gebėjimas adhezuotis prie plastiko paviršiaus ir sudaryti bioplėvelės struktūrą yra vienas iš svarbiausių fenotipų, lemiančių *A. baumannii* išplitimą klinikinėje aplinkoje.

3.1.5. Gebėjimas išgyventi džiūvimo sąlygomis

Bakterijų išplitimui ligininėse svarbus ne tik gebėjimas sąveikauti su abiotiniais paviršiais, bet ir atsparumas sausoms aplinkos sąlygoms (Russotto ir kt., 2015), todėl ištyrėme ir šią savybę. Dauguma izoliatų pasižymėjo prastu išgyvenamumu džiūvimo sąlygomis, kuris svyravo 0,005 % – 1,3 % ribose nuo pradinio bakterijų skaičiaus (3.3 pav., C). Tačiau vėl atkreipėme dėmesį į tai, kad hidrofiliniai IC II izoliatai buvo išskirtinai atsparūs džiūvimui ir jų streso sąlygomis išgyveno iki 14 kartų daugiau, nei hidrofobinių paviršių turinčių bakterijų.

Dėl padidėjusio ląstelės paviršiaus hidrofiliškumo bakterijose galėtų būti pritraukiama ir sulaikoma daugiau vandens molekulių esant sausoms aplinkos sąlygoms. Todėl nusprendėme TEM metodu ištirti reprezentatyvių IC II izoliatų – hidrofilinių II-e bei II-f ir hidrofobinių II-a bei II-b – ląstelių paviršiaus struktūras, didžiausią dėmesį skirdami bakterijos apvalkalo ypatybėms. Įdomu tai, kad atspariausias džiūvimui II-f izoliatas pasižymėjo beveik du kartus storesne ląstelės apvalkalo struktūra, lyginant su jautriais džiūvimui, hidrofobinių paviršių turinčiais II-a ir II-b izoliatais bei kapsulės negaminančiu II-h izoliatu (3.5 pav.). Šie duomenys liudija, kad padidėjusi ląstelės apvalkalo struktūra taip pat galėtų reikšmingai prisidėti prie atsparumo džiūvimui.



3.5 pav. *A. baumannii* II-b (A), II-a (B), II-f (C), II-e (D) ir II-h (E) izoliatų ląstelių apvalkalo struktūra, analizuota TEM metodu. Skalės juosta atitinka 50 nm. Dvigubos rodyklės rodo ląstelės apvalkalo storį. F – analizuotų bakterijų apvalkalų storių vidurkiai. Paklaidos nurodo standartinį nuokrypį analizuojant trijų skirtingų ląstelių tris matavimus, reikšmingumas nustatytas ANOVA (***) $p < 0,001$).

3.1.6. *A. baumannii* adhezija prie plaučių epitelio ląstelių

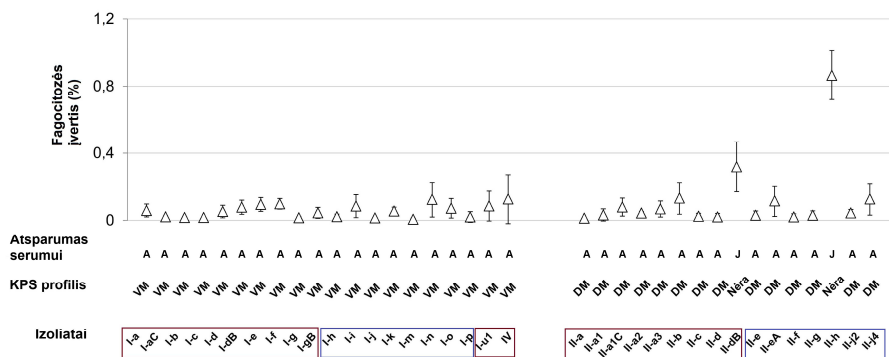
Bakterijų gebėjimas adhezuotis prie eukariotinių ląstelių yra vienas svarbiausių bakterinės infekcijos etapų (Smani ir kt., 2012), todėl mus domino, kaip ši savybė išreiškta tarp IC I ir IC II klonų izoliatų. Buvo analizuota bakterijų adhezija prie pelės plaučių epitelio ląstelių LL/2. Verta pastebėti, kad visi tirti izoliatai nepasižymėjo stipria sąveika su eukariotinėmis ląstelėmis (3.3 pav., C). IC I bakterijų adhezijos lygis buvo 0,3 % – 0,8 % ribose nuo pradinio bakterijų skaičiaus. IC II izoliatų adhezija buvo labiau išreikšta ir siekė 0,5 % – 3,5 %. Pastebėjome, kad geresne adhezija prie ląstelių pasižymėjo hidrofiliniai IC II izoliatai II-a2, II-c, II-d,

II-eA, II-f, II-g ir II-h. Remiantis šiais duomenimis galima teigti, kad IC II klonų *A. baumannii* izoliatų adhezinės savybės varijavo labiau nei IC I klonų izoliatų, o hidrofilinėmis paviršiaus savybėmis pasižymintys IC II izoliatai geriau adhezavosi prie eukariotinių ląstelių.

3.1.7. *A. baumannii* atsparumas imuninės sistemos komponentams

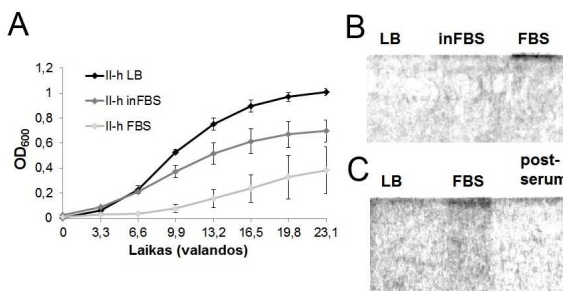
Patogeninės bakterijos išvystė efektyvius apsaugos mechanizmus nuo organizmo imuninės sistemos (Russo ir kt., 2010). Šiame darbe nustatyti IC I ir IC II klonų izoliatų ląstelių paviršiaus savybių skirtumai gali turėti įtakos bakterijų gebėjimui apsisaugoti nuo fagocituojančių ląstelių. Todėl buvo nuspręsta ištirti makrofagų (pelių linijos J774) poveikį IC I ir IC II izoliatų bakterijoms.

A. baumannii buvo atsparios makrofagams – fagocituotos bakterijos sudarė tik mažą dalį 0,01 % – 0,18 % nuo visų bakterijų (3.6 pav.). Išsiskyrė tik IC II klonų II-dB ir II-h izoliatai, kurie buvo jautresni makrofagų fagocitozei – jų fagocitozės rodiklis buvo ~5-10 kartų didesnis lyginant su visais kitais izoliatais. Šie du izoliatai buvo jautrūs ir veršiuko serumo komplementui, apie tai sprenda iš augimo sulėtėjimo terpėje esant aktyvaus serumo komponentų (3.6 pav.). Kitų *A. baumannii* izoliatų augimui aktyvus serumas nedarė įtakos, todėl jos priskirtos serumui atspariems izoliatams. Svarbu pažymėti, kad serumui jautrūs II-dB ir II-h izoliatai nesintetino ir polisacharidinės kapsulės (3.2 pav.).



3.6 pav. IC I ir IC II *A. baumannii* izoliatų jautrumas makrofagų fagocitozei ir serumo poveikiui. Fagocitozė išreikšta procentiniu įverčiu (Δ) lyginant su pradiniu bakterijų skaičiumi. Paklaidos nurodo standartines klaidas analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus. A ir J atitinkamai nurodo serumui atsparius ir jautrius izoliatus. VM ir DM žymi variabilios ir didelės molekulinės masės kapsulės polisacharidus. Romėniški skaitmenys I ir II atitinka IC I ir IC II pandeminius klonus. Raudonai apibrėžti paplitusių pulso tipų izoliatai, mėlynai – sporadiniai izoliatai.

Tyrimų metu pastebėta, kad II-dB ir II-h izoliatai, įprastomis sąlygomis nesintetinantys kapsulės, praėjus ~ 10 val. nuo inkubacijos su aktyviu serumu pradžios gebėjo atstatyti augimą (3.7 pav., A). Siekiant išsiaiškinti, ar šis fenomenas pasireiškė dėl kapsulės indukcijos, buvo išskirtos ir analizuotos polisacharidų frakcijos iš II-h bakterijų, augusių LB terpėje, LB terpėje su 80 % išaktyvinto serumo ir LB terpėje su 80 % aktyvaus serumo. Kaip matyti 3.7 pav. (B), kapsulės sintezė buvo indukuota tik tuo atveju, jeigu augimo terpėje buvo aktyvaus serumo. Toliau buvo tiriama, ar kapsulės polisacharidų sintezės indukcija yra reguliuojamas reiškinys, o ne fenomenas, pasireiškęs dėl, pvz. spontaninių mutacijų. Tuo tikslu II-h bakterijų kultūra, užauginta aktyviame serume, vėliau buvo persėta į LB terpę ir kapsulės polisacharidai tirti NDS-PAGE metodu. II-h bakterijos, perkeltos į LB terpę, nesintetino kapsulės (3.7 pav., C), o tai liudija, kad *A. baumannii* kapsulės sintezė gali būti reguliuojama.

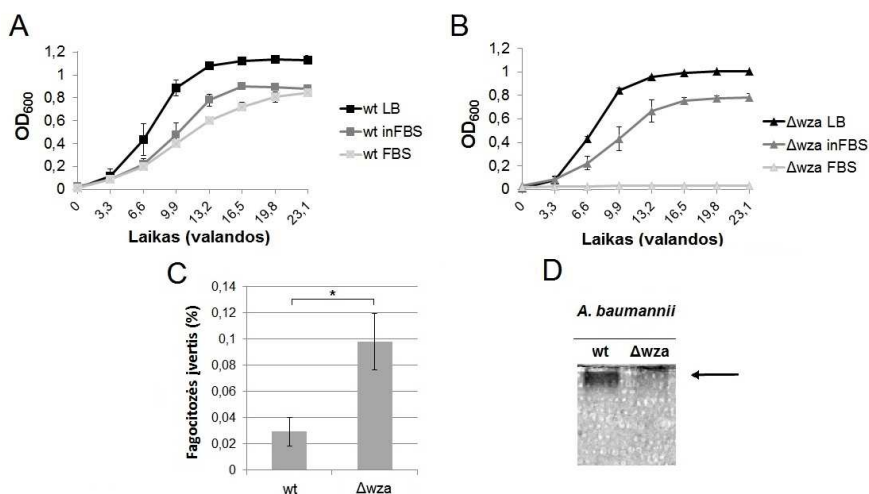


3.7 pav. *A. baumannii* IC II izoliato II-h jautrumas serumui ir kapsulės polisacharidų profiliai. A – augimas LB terpėje, LB terpėje su 80 % išaktyvinto FBS (inFBS) ir LB terpėje su 80 % aktyvaus FBS. Paklaidos nurodo standartinių nuokrypį analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus;

B – bakterijų, augintų skirtingose terpėse, kapsulės polisacharidų profiliai NDS-PAGE gelyje. C – kapsulės polisacharidų sintezės indukcija terpėje su serumu. Rodyklė žymi kapsulės polisacharidų frakciją.

3.1.8. Egzopolisacharidinės kapsulės reikšmė *A. baumannii* patogenezėje

Siekiant išsiaiškinti egzopolisacharidinės kapsulės reikšmę *A. baumannii* atsparumui serumui ir kitiems su virulentiškumu siejamiems fenotipams, buvo sukurtas kapsulės nesintetinantis *A. baumannii* mutantas tikslinės rekombinacijos metodu išveiklinant vieną iš kapsulės lokuso genų *wza*. Tam tikslui iš laboratorijos kolekcijos buvo pasirinktas IC II izoliatas III-a. Lyginant sukurto III-aΔ*wza* mutanto ir laukinio tipo izoliato savybes nustatėme, kad kapsulės mutantas neaugo terpėje esant aktyvaus serumo komponentų (3.8 pav., A-B), taip pat pasižymėjo padidėjusiu jautrumu makrofagų poveikiui (3.8 pav., C). Šie duomenys dar kartą patvirtino esminį kapsulės polisacharidų vaidmenį *A. baumannii* apsaugai nuo imuninės sistemos komponentų, nes III-aΔ*wza* mutantas nesintetino laukinio tipo izoliatui būdingo kapsulės profilio (3.8 pav., D).

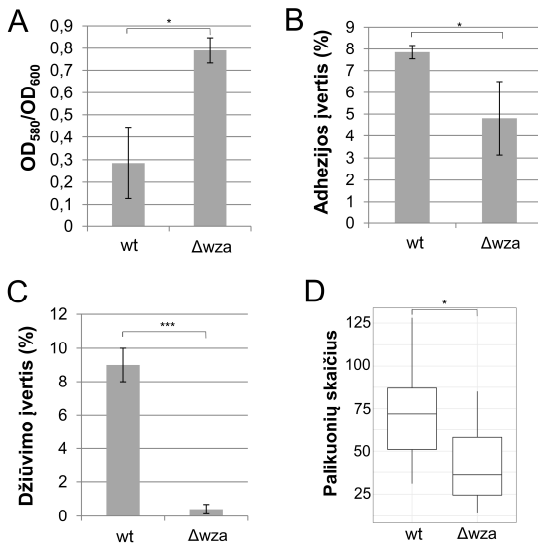


3.8 pav. *A. baumannii* IC II izoliato III-a ir jo Δwza mutanto jautrumas serumui, makrofagų fagocitozei ir bakterijų kapsulės polisacharidų profiliai. III-a (A) ir jo Δwza mutanto (B) augimo kreivės LB terpėje, LB terpėje su 80 % karščiu išaktyvinto serumo (inFBS) ir LB terpėje su 80 % aktyvaus serumo (FBS). Paklaidos nurodo standartinę nuokrypį analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus; C – III-a ir Δwza mutanto fagocitozės įverčiai. Reikšmingumas nustatytas t testu (* $p < 0,05$). D – bakterijų kapsulės polisacharidų profiliai NDS-PAGE gelyje. Rodyklė žymi kapsulės polisacharidų frakciją.

Toliau tyrėme, ar kapsulės praradimas veikia kitas su virulentiškumu siejamas *A. baumannii* savybes. III-a Δwza bakterijų, palyginus su tėviniu kamieniu, paviršiaus hidrofobiškumo indeksas padidėjo nuo 1 M iki 0,5 M, adhezija prie plastiko padidėjo ~2,5 karto, adhezija prie plaučių epitelio ląstelių sumažėjo ~1,5 karto, poveikis nematodams, vertinant palikuonių skaičių *in vivo* infekcijos metu, sumažėjo beveik 2 kartus (3.9 pav.). Taip pat, Δwza bakterijos neišgyveno džiūvimo sąlygomis. Visi šie duomenys liudija egzopolisacharidinės kapsulės svarbą *A. baumannii* patogenezėje.

3.1.9. *A. baumannii* virulentiškumas gyvūnų infekcijos modeliuose

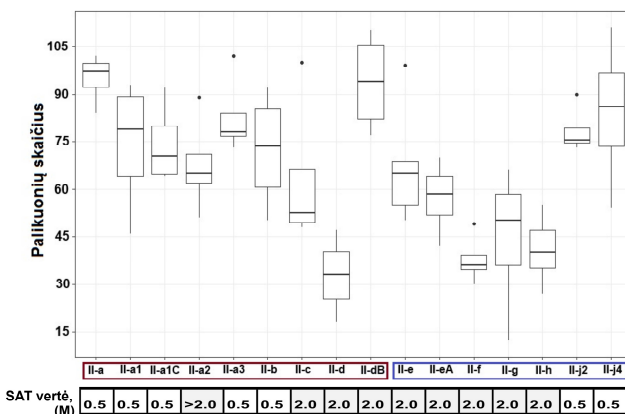
Gavus *ex vivo* tyrimų duomenis apie *A. baumannii* virulentines savybes ir galimas jų sąsajas su bakterijų paviršiaus struktūrinėmis ir funkcinėmis ypatybėmis, toliau tęsėme tyrimus, naudodami *in vivo* gyvūnų infekcijos modelius. Iš analizuotos *A. baumannii* 32 izolatų grupės mus labiausiai domino IC II izoliatai, kurie pasižymėjo didžiausiais ląstelių hidrofobiškumo indekso bei virulentinių savybių skirtumais, todėl jie buvo pasirinkti tolesniems tyrimams.



3.9 pav. *A. baumannii* Δwza mutanto virulentinės savybės. A – bioplėvelės formavimas ant plastiko, išreikštas OD_{580/600} santykiu; B – adhezija prie pelės plaučių epitelio ląstelių LL/2; C – atsparumas džiūvimui. Adhezija ir džiūvimas išreikšti procentiniais įverčiais lyginant su pradiniu bakterijų skaičiumi. Paklaidos nurodo standartinį nuokrypį analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus. Reikšmingumas buvo nustatytas t testu (**p<0,001; *p<0,05); D – stačiakampė diagrama nematodų palikuonių skaičių po trijų dienų inkubacijos su III-a Δwza ir tėviniu kamieniu.

Duomenys pateikti iš trijų nepriklausomų eksperimentų po tris pakartojimus. Reikšmingumas nustatytas ANOVA (*p<0,05).

Pirmiausiai izoliatų virulentiškumas buvo tirtas naudojant *C. elegans* infekcijos modelį. Hidrofilinėmis savybėmis pasižymintys II-a2, II-d, II-e, II-eA, II-f, II-g, ir II-h izoliatai, kurie buvo atsparesni džiūvimui, geriau adhezavosi prie epitelio ląstelių, taip pat pasižymėjo ir didesniu virulentiškumu *C. elegans*, nes nematodai, maitinęsi šiomis bakterijomis, susilaukė mažiau palikuonių, lyginant su hidrofobinių paviršiaus savybių IC II *A. baumannii* (3.10 pav.). Įdomu, kad laboratorijos sąlygomis kapsulės nesintetinantys II-h izoliatas, kuris *in vitro* buvo jautrus makrofagų ir komplemento poveikiui, *C. elegans* infekcijos modelyje buvo virulentiškas.

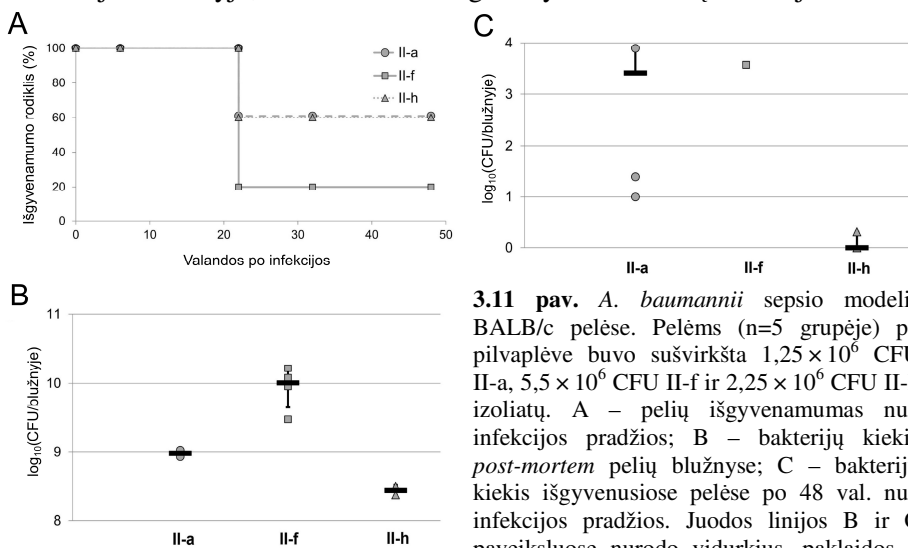


3.10 pav. *A. baumannii* poveikis *C. elegans* vaisingumui. Stačiakampė diagrama nurodo nematodų palikuonių skaičių po trijų dienų inkubacijos su *A. baumannii*. Duomenys pateikti iš trijų nepriklausomų eksperimentų po tris pakartojimus. Romėniški skaitmenys I ir II nurodo IC I ir IC II pandeminius klonus.

Raudonai apibrėžti paplitusių pulsotipų izoliatai, mėlynai – sporadiniai izoliatai. Izoliatų paviršiaus hidrofobiškumą žymi SAT įvertis.

Toliau *A. baumannii* virulentiškumą tyrėme, taikydami pelės sepsio modelį. Tyrimams buvo pasirinkti trys IC II izoliatai: II-a – šio izoliato bakterijos turėjo išreikštas hidrofobines savybes, gebėjo formuoti bioplėvelę ant plastiko paviršiaus, buvo jautrios sausoms aplinkos sąlygoms ir prastai adhezavosi prie plaučių epitelio ląstelių; II-f ir II-h bakterijos turėjo išreikštas hidrofilines savybes, neformavo bioplėvelės, tačiau buvo atsparios džiūvimui ir gebėjo adhezuotis prie eukariotinių ląstelių. Norėdami ištirti *A. baumannii* kapsulės reikšmę infekcijai, pasirinkdami izoliatus atsižvelgėme ir į šią savybę: II-a ir II-f bakterijos sintetino polisacharidinę kapsulę, o II-h izoliatas laboratorinėmis sąlygomis kapsulės nesintetino.

Užkrėtus BALB/c linijos peles *A. baumannii* bakterijomis stebėtas pelių išgyvenamumas ir nustatytas bakterijų skaičius (CFU) gyvūnų blužnyse. Praėjus 24 val. nuo infekcijos pradžios 60 % pelių, užkrėtų II-a ir II-h izoliatais, išgyveno, tuo tarpu pelių, užkrėtų II-f izoliatu, išgyvenamumas siekė tik 20 % (3.11 pav., A). *Post-mortem* pelių, užkrėtų II-f bakterijomis, blužnyse rasta apie 10 kartų daugiau bakterijų, nei II-a bakterijomis užkrėtų pelių blužnyse ir apie 30 kartų daugiau nei pelių, infekuotų II-h bakterijomis (3.11 pav., B). Praėjus 48 val. po infekcijos, infekciją išgyvenusių pelių blužnyse didžiausias bakterijų titras taip pat nustatytas II-f infekcijos atveju (3.11 pav., C). Taigi, *A. baumannii* bakterijų hidrofilinės/hidrofobinės savybės koreliavo su virulentiškumu tiek *ex vivo*, tiek *in vivo*. Taip pat, *in vivo* duomenys liudija, kad kapsulės sintezė yra svarbi stuburinių gyvūnų infekcijos modelyje, bet nėra reikšminga savybė nematodų infekcijos metu.



3.11 pav. *A. baumannii* sepsio modelis BALB/c pelėse. Pelėms ($n=5$ grupėje) po pilvaplėvės buvo sušvirkšta $1,25 \times 10^6$ CFU II-a, $5,5 \times 10^6$ CFU II-f ir $2,25 \times 10^6$ CFU II-h izoliatai. A – pelių išgyvenamumas nuo infekcijos pradžios; B – bakterijų kiekis *post-mortem* pelių blužnyse; C – bakterijų kiekis išgyvenusiose pelėse po 48 val. nuo infekcijos pradžios. Juodos linijos B ir C paveiksluose nurodo vidurkius, paklaidos – standartinius nuokrypius.

3.1.10. Kapsulę ir lipooligosacharidą koduojančių genomo lokusų tyrimai

Tiriant patogeninius *E. coli* izoliatus parodyta, kad į išorę sintetinamų paviršinių molekulių, pvz. lipooligosacharidų, struktūriniai pokyčiai gali lemti bakterijų paviršiaus hidrofobiškumą bei kitas, su virulentiškumu susijusias savybes (Nakao ir kt., 2012). Parodžius *A. baumannii* paviršiaus hidrofobiškumo ir virulentiškumo sąsają ir nustatčius, kad dauguma, tik su keliomis išimtimis, izoliatų sintetina užląstelinę polisacharidinę kapsulę, iškėlėme klausimą, ar *A. baumannii* kapsulę bei lipooligosacharidą koduojančių genomo lokusų variacijos galėtų lemti ląstelės paviršiaus savybių skirtumus bei skirtingas virulentines savybes?

Yra žinoma, kad *A. baumannii* izoliatai sintetina labai įvairius kapsulės polisacharidus (Traub ir Bauer, 2000), todėl nustatėme tirtų izoliatų kapsulės lokuso tipus pagal Hu ir kt. (2013) tipavimo schemą. Didžiausiu virulentiškumu pasižymėjusio II-f izoliato genomine DNR naudota kaip matrica kapsulės lokuso regiono (apie 8 kb) DNR pagausinimui su *gnaaF*/*galuR* pradmenimis (2.2 lentelė). Atlikus amplikono sekoskaitą nustatyta, kad II-f izoliatas turėjo Wzy polimerazę koduojantį *wzyII* geno variantą, kuris randamas PSgc12 tipo kapsulės lokuse (Hu ir kt., 2013), atsakingame už KL2 tipo kapsulės sintezę *A. baumannii* bakterijose (Kenyon ir kt., 2014a). Sukūrus savitus pradmenis *wzyII* geno padauginimui, kapsulės lokuso tipas buvo nustatytas likusiuose 15 IC II izoliatų. KL2 kapsulės lokusą turėjo visi izoliatai, išskyrus II-a2, II-g ir II-h. Tada buvo sukurtos papildomos pradmenų poros lokuso identifikavimui likusiuose izoliatuose (2.2 lentelė). Nustatyta, kad visi IC I izoliatai kodavo KL40 tipo kapsulės lokusą, išskyrus I-e ir I-f, kurie kodavo KL1. Tuo tarpu IC II izoliatas II-a2 kodavo KL27 kapsulės lokuso tipą, o izoliatų IV, II-g ir II-h kapsulės lokuso tipą naudojant sukurtus pradmenis, nepavyko nustatyti.

Toliau buvo tiriamos už lipooligosacharido sintezę atsakingo lokuso (OC lokusas) galimos variacijos tarp izoliatų. OC lokuso tipavimas atliktas remiantis Kenyon ir kt. pasiūlyta schema (2014b). PGR reakcijomis su RH1704/RH1705 pradmenimis nustatyta, kad visi IC II izoliatai kodavo OCL1 lokuso tipą.

Siekiant kiek galima detaliau išsiaiškinti tiriamų izoliatų DNR sekų variabilumą, nustatėme sekų tipus (ST) pagal Oxford-MLST tipavimo sistemą. Reprezentatyvūs IC II izoliatai II-a ir II-f buvo priskirti ST208, II-a2 identifikuotas kaip ST440, o II-g ir II-h izoliatai priskirti ST348 tipui.

Taigi, kapsulės ir lipooligosacharido koduojančių lokusų tyrimai parodė, kad *A. baumanii* izoliatų paviršiaus hidrofobiškumo variabilumas

nepriklauso nuo kapsulės ar lipooligosacharido. Hidrofilinės savybės nėra susijusios ir su *A. baumannii* konkrečiu sekos tipu (ST), nes to paties ST tipo izoliatai gali pasižymėti tiek hidrofobinėmis, tiek hidrofilinėmis ląstelės paviršiaus savybėmis (pvz. II-a ir II-f izoliatai).

3.1.11. *A. baumannii* genomų sekoskaitos analizė

Siekdami nustatyti, kokie geno pokyčiai lemia IC II izoliatų virulentinių savybių skirtumus, atlikome dviejų reprezentatyvių izoliatų – II-a ir II-f – DNR sekoskaitą. Abu izoliatai priklauso ST208 sekos tipui, tačiau bakterijų paviršiaus hidrofobinės savybės ir virulentiškumas akivaizdžiai skiriasi. Sekoskaita atlikta Thermo Fisher Scientific bendrovėje Illumina platforma, duomenys apdoroti naudojant CLC Genomics, Galaxy ir MEGA programas (analizė atlikta kartu su dokt. R. Krasausku, VU, GMC, Biomokslų institutas).

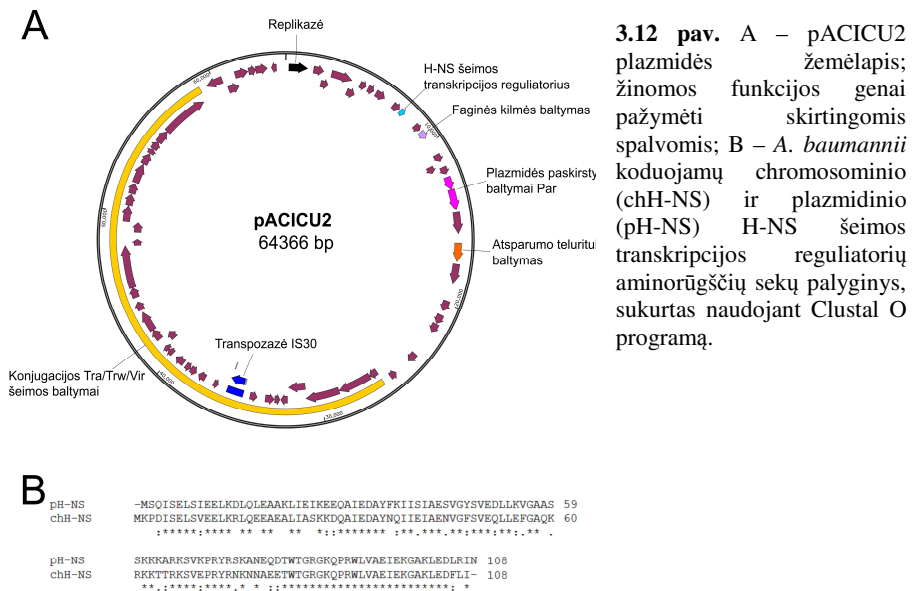
Tarpusavyje lyginant DNR sekas naudojant MEGA programą nustatytas didelis II-a ir II-f sekų panašumas ir identifikuota 12 pavienių nukleotidų polimorfizmo (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) atvejų. Jie palyginti su NCBI duomenų bazėse esančių *A. baumannii* genomų sekomis. *A. baumannii* II-a genome nustatyti 8 SNP atvejai: nuo TonB priklausomo sideroforo receptoriaus (E1A86_13825), nuo FAD priklausomos oksireduktazės (EA720_006125), T6SS sekrecijos sistemos struktūrinio baltymo VgrG (E1A87_00530), hidrolazės (EA720_003145), fruktozės aldolazės (E1A87_16410), hemą prijungiančio baltymo (EA720_002015), hipotetinio baltymo (EA720_005105) genuose ir priešsrovinėje LysR transkripcijos regulatoriaus (E1A87_15425) sekoje.

II-f genome nustatyti 4 SNP atvejai: adenilato ciklazės (EA720_015535), peroksiredoksino (EA720_013625), β -ketoacil-ACP sintazės (E1A86_03825) ir enoil-KoA-enolazės (EA720_003285) genuose. Remiantis pateiktais duomenimis, galima teigti, kad didžioji dalis genų, kuriuose buvo nustatyti SNP, kodavo su bakterijų metabolizmu susijusius genus ir akivaizdaus ryšio su *A. baumannii* virulentiškumu neturėjo.

Sekoskaitos rezultatus išanalizavus SPAdes 3.13.0 ir GitHub įrankiais, nustatėme sekvenotų II-a ir II-f izoliatų turimas plazmides. II-a izoliatas turi tris ~108 kb, 67 kb ir 11 kb dydžio plazmides, kurios NCBI duomenų bazėje atitinka žinomas *A. baumannii* plazmides S1 (ID: CP026944.1), pACICU2 (ID: CP000865.1) ir pAB120 (ID: JX069966.1).

II-f izoliatas turi dvi ~108 kb ir 11 kb ilgio plazmidės, identiškas nustatytoms II-a izolate, tačiau neturi 67 kb pACICU2 tipo plazmidės. Įdomu tai, kad remiantis NCBI duomenų bazėje pateiktomis *A. baumannii* genomų sekomis, ši plazmidė paplitusi ne visuose IC II izoliatuose, o IC I izoliatai ir kitos *Acinetobacter* genties rūšys jos iš viso neturi. IC II klonu viduje plazmidė randama įvairių ST tipų izoliatuose.

Didžiąją dalį plazmidės genų sudaro už konjugaciją atsakingi Tra/Trw/Vir šeimos genai bei nežinomos funkcijos hipotetiniai genai (3.12 pav., A). Taip pat plazmidė koduoja H-NS šeimos transkripcijos reguliatorių. Geno produktas (ID: WP_000078385.1) pasižymi 71 % panašumu į *A. baumannii* chromosomoje koduojamą H-NS šeimos transkripcijos reguliatorių (ID: WP_000801427.1) (3.12 pav., B).



Nusprendėme PGR metodu patikrinti pACICU2 tipo plazmidės paplitimą IC II izoliatuose, taikiniu naudojant plazmidės H-NS geną (pradmenys pateikti 2.2 lentelėje). Įdomu tai, kad nė vienas hidrofilinėmis ląstelės paviršiaus savybėmis pasižymintis izoliatas neturėjo pACICU2 tipo plazmidės, tuo tarpu ji rasta IC II izoliatuose, pasižyminčiuose hidrofobinėmis savybėmis. Taigi, panašu, kad pACICU2 plazmidės praradimas koreliavo su hidrofilinėmis bakterijų paviršiaus savybėmis bei padidėjusiu virulentiškumu.

Mus sudomino, ar plazmidės koduojamas H-NS reguliatorius gali būti susijęs su šiais pokyčiais? H-NS geno DNR buvo pagausinta naudojant II-a

izoliato genomine DNR, klonuota į pUC_gm_AciORI plazmidę, kuri vėliau transformuota į hidrofilinį IC II izoliatą II-f. II-f::ph-ns bakterijų virulentinės savybės lygintos su laukinio tipo izoliatu, turinčiu plazmidę be h-ns geno. Atlikus ląstelės paviršiaus hidrofiliškumo, adhezijos prie pelės plaučių epitelio ląstelių ir kitų su virulentiškumu siejamų savybių tyrimus, skirtumų tarp tirtų bakterijų nenustatyta (duomenys neparodyti). Neatmestina prielaida, kad kiti plazmidės koduojami genai gali būti susiję su aukščiau minėtomis savybėmis.

3.2. Su virulentiškumu siejamų *A. baumannii* veiksmų paieška ir vaidmens patogenezėje tyrimas

Fenotipiniai tyrimai akivaizdžiai parodė *A. baumannii* ląstelės paviršiaus savybių reikšmę išlikimui šeimininke ir už jo ribų. Kitose bakterijose nustatyta, kad patogenezėje svarbus vaidmuo tenka su ląstelės paviršiumi susijusiems baltymams (Nakao ir kt., 2012; Griessl ir kt., 2013; Arrigucci ir kt., 2017), tačiau žinios apie tokius virulentiškumo veiksmus *A. baumannii*, išskyrus kelis baltymus, dar gana negausios. Todėl kitas darbo etapas buvo skirtas *A. baumannii* baltymų, susijusių su ląstelės paviršiaus struktūromis – potencialių virulentiškumo veiksmų – paieškai ir tyrimams.

Remiantis VFDB duomenų baze (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) *A. baumannii* genomuose ieškojome virulentinių veiksmų, kurie buvo nustatyti kitose patogeninėse bakterijose, homologų. Daugumos tokių veiksmų homologų *A. baumannii* aptikti nepavyko. Tai liudija, kad šios bakterijos nesintetina toksiniu poveikiu pasižyminčių efektorinių baltymų arba jie yra labai saviti *A. baumannii* ir jų homologai iki šiol neapibūdinti.

Norėdami įvertinti, kaip *A. baumannii* membraniniai ar periplazminiai baltymai prisideda prie virulentinių savybių, siejamų su ląstelės paviršiumi, pasirinkome grupę baltymų, dalyvaujančių kitų bakterijų patogenezėje, kurių homologus mums pavyko aptikti *A. baumannii* genomuose (3.1 lentelė). Delecinės rekombinacijos būdu baltymus koduojantys genai buvo išveiklinti gentamicinui jautraus *A. baumannii* Ab_{IC1} izoliato chromosomoje (žr. 2.2.12) ir toliau buvo tirtos mutantų savybės, tikintis nustatyti baltymų sąsajas su virulentiškumu (3.1 lentelė). Į tiriamų baltymų grupę įtraukėme ir OmpA poriną, kuris yra bene geriausiai iki šiol apibūdintas *A. baumannii* virulentiškumo veiksnys, dalyvaujantis bioplėvelės formavime, adhezijoje prie eukariotinių ląstelių bei prisidedantis prie atsparumo serumo komponentams (Choi ir kt., 2005; Gaddy ir kt., 2009; Kim ir kt., 2009). Žemiau yra pateiktas trumpas tirtų baltymų apibūdinimas.

3.1 lentelė. Genų, koduojančių numanomus *A. baumannii* virulentiškumo veiksnius, delecijų poveikis bakterijų fenotipinėms savybėms.

<i>A. baumannii</i> homologas	Virulentiškumo veiksnys kitose patogeninėse bakterijose ir jo funkcija	<i>A. baumannii</i> savybės					
		Judrumas	Bio plėvelė	Atsparumas serumui	Adhezija prie epitelio ląstelių	Virulentiškumas <i>C. elegans</i>	Virulent iškumas pelėse
OmpA	<i>E. coli</i> OmpA; Atsparumas serumui ir fagocitozei (Mittal ir kt., 2011)	+	+	+	+	+	+
Blp1	<i>S. typhimurium</i> BapA; Bioplėvelės formavimas (Latasa ir kt., 2005)	-	+	-	+	+	+
YgaU	<i>E. coli</i> YgaU; Atsakas į stresą (Bernal-Cabas ir kt., 2015)	+	-	-	-	-	+
GltI	<i>C. jejuni</i> PebA; Adhezija prie eukariotinių ląstelių (Leon-Kempis ir kt., 2006)	-	-	-	-	-	+
BrkB	<i>B. pertussis</i> BrkB; Atsparumas serumui (Shrivastava ir Miller., 2009)	-	-	-	-	-	-
SelI	<i>L. pneumophila</i> LpnE; Atsparumas fagocitozei (Newton ir kt., 2007)	-	-	-	-	-	-
PqiB	<i>V. cholerae</i> VP1611; Adhezija prie epitelio ląstelių (Krachler ir Orth, 2011)	-	-	-	-	-	-

+ poveikis nustatytas, - poveikis nenustatytas.

Blp1 yra didelės molekulinės masės baltymas (apie 330 kDa), struktūriškai panašus į dar didesnę *A. baumannii* adhezina – Bap (De Gregorio ir kt, 2015). Baltymo homologai kituose patogenuose identifikuoti kaip patogenezėje dalyvaujantys adhezina (Latasa ir kt., 2005; Griessl ir kt. 2013; Guo ir kt., 2017).

ygaU genas koduoja nežinomos funkcijos baltymą, kuris turi prie peptidoglikano besijungiantį LysM domeną ir priklauso neapibūdintai BON baltymų superšeimai. Neseniai buvo parodyta, kad *E. coli* homologas YgaU dalyvauja peptidoglikano persitvarkyme streso sąlygomis (Bernal-Cabas ir kt., 2015).

A. baumannii GltI baltymas yra aspartatų/glutamataų surišančio ABC transporterio baltymo PebA, kuris *Campylobacter jejuni* bakterijų sąveikoje su eukariotinėmis ląstelėmis veikia kaip adhezinas (Pei ir kt., 1998), homologas. *C. jejuni* PebA baltymas svarbus išgyvenant mikroaerobinėmis sąlygomis (Leon-Kempis ir kt., 2006).

Bordetella pertussis BrkB baltymas buvo identifikuotas kaip virulentiškumo veiksnys apsaugant bakterijas nuo serumo slopinant

komplemento baltymus, taip pat buvo svarbus išgyvenimui gyvūnų modelyje *in vivo* (Elder ir kt., 2004; Shrivastava ir Miller, 2009).

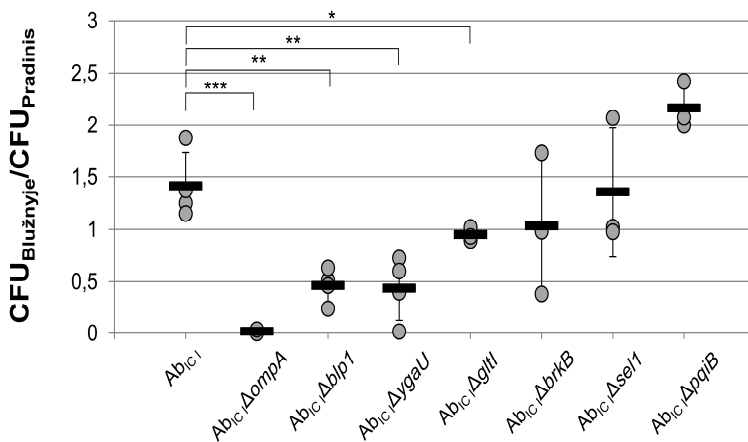
Legionella pneumophila LpnE baltymas, turintis Sell domeninius pasikartojimus, buvo identifikuotas kaip vienas iš svarbiausių adhezijos veiksnių sąveikoje su epitelinėmis ir fagocituojančiomis ląstelėmis, taip pat reikalingas bakterijų išgyvenimui pelių infekcijos modelyje (Newton ir kt., 2007).

Vibrio cholerae bakterijų išorinės membranos adhezinas VP1611 turi eukariotinių ląstelių invazijos domeną (angl. *mammalian cell entry*, mce), jis yra vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių bakterijų sąveiką su eukariotinių ląstelių ligandais, pvz. fibronektinu (Krachler ir Orth, 2011), šio baltymo *A. baumannii* homologue PqiB taip pat nustatyti mce domenai.

Buvo įvertintos aukščiau aprašytų baltymų *A. baumannii* homologų mutantų savybės: judrumas, bioplėvelės sudarymas, adhezija prie epitelio ląstelių, atsparumas fagocitozei ir serumui, virulentiškumas *C. elegans* ir pelės sepsio modeliuose (3.1 lentelė).

BrkB, Sell ir PqiB koduojančių genų delecijos neturėjo įtakos *A. baumannii* virulentinėmis savybėmis *in vitro* ir *in vivo*. $\Delta brkB$ ir $\Delta sell$ mutantai pasižymėjo mažesniu išgyvenamumu pelių infekcijos metu, tačiau lyginant su laukinio tipo izoliatu, šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi (3.13 pav.).

Tuo tarpu kitų tirtų baltymų – OmpA, Blp1, YgaU ir GltI – mutantų išgyvenamumas pelių sepsio metu buvo reikšmingai sumažėjęs (3.13 pav.). Svarbu pastebėti, kad $\Delta ygaU$ mutantas taip pat prarado trūkčiojimo tipo



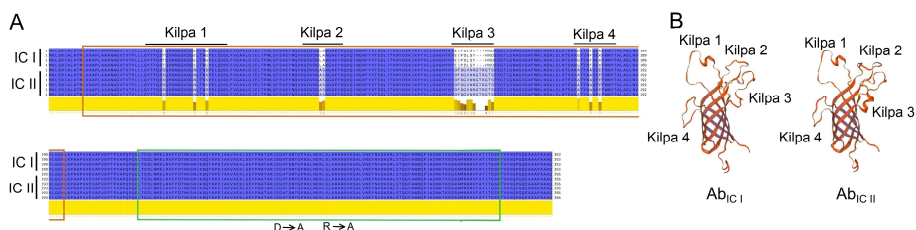
3.13 pav. *A. baumannii* Ab_{IC1} izoliato ir jo genų delecinių mutantų virulentiškumas pelėse. Po 6 val. nuo infekcijos pradžios pelių (n=3-4 grupėje) blužnyse nustatytas bakterijų skaičius (CFU), kuris lygintas su infekcijai naudotu pradiniu bakterijų skaičiumi. Kiekvienas taškas reprezentuoja vieną pelę, juodos linijos nurodo vidurkį, o paklaidos – standartinį nuokrypį. Reikšmingumas nustatytas t testu (**p<0,001; *p<0,01; *p<0,05).

judėjimą (3.1 lentelė), todėl manome, kad tarp virulentiškumo *in vivo* ir šio tipo judėjimo fenotipo pasireiškimo galėtų egzistuoti tiesioginis ryšys.

Kaip matyti iš lentelėje 3.1 ir 3.13 pav. pateiktų duomenų, didžiausią poveikį *A. baumannii* virulentiškumui turėjo OmpA ir Blp1 baltymus koduojančių genų išveiklinimas. Analizuodami *ompA* ir *blp1* genų paplitimą *A. baumannii* genomuose NCBI duomenų bazėje pastebėjome, kad abu genai pasižymi aleliniu polimorfizmu. Tiek *ompA*, tiek *blp1* turėjo du variantus, kurie koreliavo su izoliatų priklausomybe IC I arba IC II klonui. Norėdami įsitikinti genų alelių ir pandeminių klonų sąsaja, sukūrėme pradmenis (2.2 lentelė) abiem individualiems genų variantams aptikti ir ištyrėme laboratorijos kolekcijoje esančius IC I (n=72) ir IC II (n=50) izoliatų PGR metodu. PGR tyrimas patvirtino alelių pasiskirstymą tarp pandeminių klonų, nes visi tirti izoliatai kodavo savo klonui būdingus genų variantus. Toliau siekėme išsiaiškinti *ompA* ir *blp1* genų variantų reikšmę su *A. baumannii* klonalumu siejamomis virulentinėmis savybėmis.

3.2.1. Išorinės membranos baltymo OmpA vaidmuo *A. baumannii* virulentinėms savybėms

OmpA baltymas, sudarytas iš membraninių ir periplazminio domenų, yra vienas gausiausių *A. baumannii* išorinės membranos baltymų. Baltymas periplazminiu domenu sąveikauja su peptidoglikanu (Jahangiri ir kt., 2017; Sato ir kt., 2017). Nustatytas OmpA baltymo sekų variabilumas (3.14 pav., A) buvo išskirtinai būdingas tik baltymo membraninio β -statinės domeno kilpoms, eksponuojamoms į bakterijų išorę (3.14 pav., B). Tuo tarpu periplazminio domeno seka buvo 100 % konservatyvi. OmpA baltymas yra su ląstelės paviršiumi susijęs *A. baumannii* komponentas, todėl alelinės variacijos gali turėti reikšmingos įtakos bakterijų virulentiškumui. Nusprendėme ištirti abiejų *ompA* alelių reikšmę nuodugniau. Tuo tikslu pasirinkome po vieną IC I ir IC II kloną *A. baumannii* izoliatą, atitinkamai



3.14 pav. OmpA alelinė variacija tarp *A. baumannii* IC I ir IC II klonų izoliatų. A – OmpA baltymo sekų palyginys, sudarytas, remiantis sekomis iš NCBI Genbank duomenų bazės. Raudonas kvadratas žymi transmembraninį β -statinės domoną, žalias kvadratas – periplazminį domoną. Geltoni stulpeliai žymi sekų konservatyvumo indeksą. Taškinės aminorūgščių mutacijos pažymėtos apačioje. Palyginys sukurtas ClustalO įrankiu; B – OmpA baltymo transmembraninio domeno tretinės struktūros, sumodeliuotos SwissModel įrankiu.

Ab_{IC I} ir Ab_{IC II}, ir jose delecinės rekombinacijos metodu išveiklinome *ompA* geną. IC I izoliatas pagal Oxford-MLST tipavimo sistemą priskirtas ST231 tipui, o IC II – ST208 tipui. Abu *A. baumannii* ST tipai plačiai paplitę, taigi izoliatai reprezentavo paplitusių genotipų *A. baumannii*.

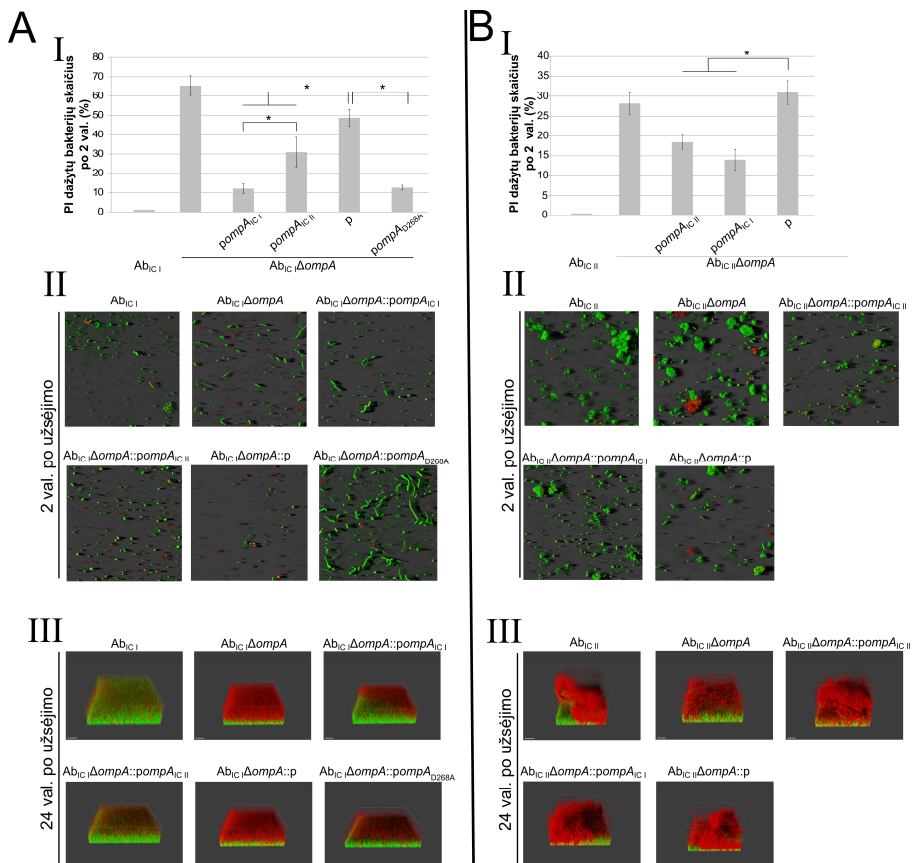
Gauti *ompA* geno deleciniai mutantai toliau bus vadinami Ab_{IC I} Δ *ompA* ir Ab_{IC II} Δ *ompA*. Mutantų komplementacijos eksperimentams *ompA* genai su jų natyviais promotoriais buvo klonuoti į pUC_gm_AcORI plazmidę (2.1 lentelė). Norėdami įvertinti, ar kuris nors geno alelis turi funkcinį pranašumą, Δ *ompA* mutantus komplementavome tiek „nuosavu“, tiek kitam klonui būdingu aleliu. Gavę reikalingus *ompA* mutantus ir komplementacijos plazmides, toliau ištyrėme seriją *A. baumannii* fenotipų ir įvertinome *ompA* geno reikšmę jų pasireiškimui.

3.2.1.1. *ompA* reikšmė *A. baumannii* bioplėvelių formavimui ir kitoms virulentinėms savybėms

Pirmoje dalyje aprašytais tyrimais parodėme, kad gebėjimas sąveikauti su plastiko paviršiumi ir sudaryti bioplėvelės struktūrą yra svarbi *A. baumannii* pandeminių klonų savybė, todėl toliau, tyrėme, kaip OmpA prisideda prie bioplėvelės formavimo. Bioplėvelės struktūros tyrimai buvo atlikti naudojant konfokalinę lazerio skenuojančią mikroskopiją (CLSM) (Jouy en Josas, Prancūzija).

Bakterijų kultūras inokuliuojus į LB terpę po 2 val. stebėta ląstelių adhezija prie plastiko paviršiaus. Bakterijos dažytos SYTO9 ir propidžio jodido (PI) dažais, siekiant nustatyti atitinkamai gyvybingų ląstelių ir bakterijų su pažeista membrana skaičių. Apie 65 % visų Ab_{IC I} Δ *ompA* ir 27 % Ab_{IC II} Δ *ompA* ląstelių nusidažė PI dažu, tuo tarpu tėvinių kamienų ląstelės nekaupė PI dažo (3.15 pav., A(I) ir B(I)). PI dažo kaupimasis Δ *ompA* ląstelėse yra susijęs su sienelės integralumo praradimu arba su užląstelinės DNR (angl. *extracellular DNA*, eDNA) sinteze (Vorkapic ir kt., 2015). Komplementacija *ompA* aleliais sumažino PI dažą kaupiančių bakterijų skaičių abiejuose mutantuose, nors Ab_{IC I} Δ *ompA* mutante „nuosavas“ alelis atstatė fenotipą geriau (3.15 pav., A(I)).

Vaizdindami *A. baumannii* Δ *ompA* ląsteles pastebėjome, kad jos formavo bakterijų „grandinėles“ (3.15 pav., A(II) ir B(II)), kas galėtų liudyti sutrikusį dalijimosi procesą *ompA* mutantuose. Komplementacija *ompA* aleliais atstatė fenotipą, būdingą tėviniams kamienams.

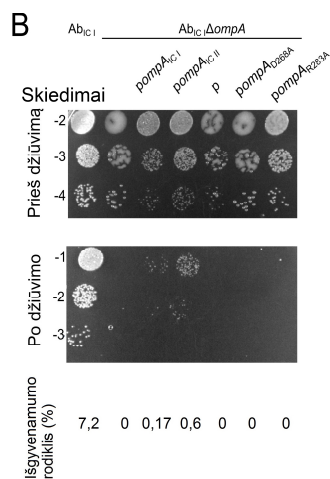
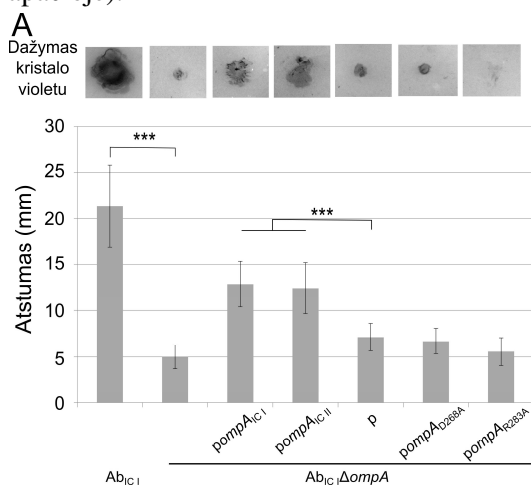


3.15 pav. Ab_{IC I} (A) ir Ab_{IC II} (B) izoliatų bei jų *ompA* genų delecinių mutantų formuojamų bioplėvelių CLSM analizė dažant su propidžio jodidu (PI) (raudona spalva) ir SYTO9 (žalia spalva). Diagramose pateikta PI dažytų bakterijų procentinis įvertis lyginant su visuminiu bakterijų kiekiu 2 val. po užsėjimo. Paklaidos nurodo standartinį nuokrypį analizuojant šešias skirtingas CLSM nuotraukas. Reikšmingumas nustatytas naudojant t testą (*p<0,05).

ΔompA bakterijų bioplėvelėse, suformuotose po 24 val., buvo ženkliai sumažėjęs gyvybingų ląstelių su integralia membrana sluoksnis, apie ką spręsta iš PI dažytų ląstelių kiekio padidėjimo bioplėvelėje (3.15 pav., A(III) ir B(III)). Komplementacija *ompA* aleliais atstatė fenotipus, tačiau nepilnai. Kaip matome iš pateiktų rezultatų, PI dažytų ląstelių kiekio padidėjimas Ab_{IC II} *ΔompA* mutanto bioplėvelėje po 24 val. nebuvo toks akivaizdus lyginant su Ab_{IC I} izoliatu. Ab_{IC II} izoliatas natūraliai yra linkęs sintetinti viršutinį bioplėvelės sluoksnį, kaupiantį PI dažą. Ab_{IC II} kaip ir kiti IC II izoliatai nepasižymi judriu gyvenimo būdu, todėl bioplėvelės morfologiniai skirtumai tarp dviejų izoliatų galėtų būti nulemti išorinių molekulių, pvz. adhezinų ar pilių, sintezės skirtumų (Ronish ir kt., 2019). Duomenys apie

*ompA*_{D268A} ir *ompA*_{R283A} mutantų fenotipus, kurie pateikti 3.15 pav., bus aptariami atskirame skyrelyje.

Pastebėję akivaizdžius formuojamos bioplėvelės morfologinius skirtumus, toliau tyrėme abiejų *ompA* alelių reikšmę *A. baumannii* judėjimui ir atsparumui džiūvimui (3.16 pav.). Abu fenotipai tirti naudojant Ab_{IC} I izoliatą, jo $\Delta ompA$ mutantą bei mutantą, turintį plazmidę su IC I arba IC II *ompA* aleliu. Geresniam nušliaužtų zonų vaizdinimui, panaudojome dažymą kristaliniu violetu, toks dažymas išryškino akivaizdžius judėjimo skirtumus tarp Ab_{IC} I $\Delta ompA$ ir tėvinio kamieno, taip pat parodė abiejų *ompA* alelių variantų gebėjimą iš dalies atstatyti prarastą fenotipą (3.16 pav., A, viršuje). Kiekybinis judėjimo vertinimas patvirtino šiuos rezultatus (3.16 pav., A, apačioje).

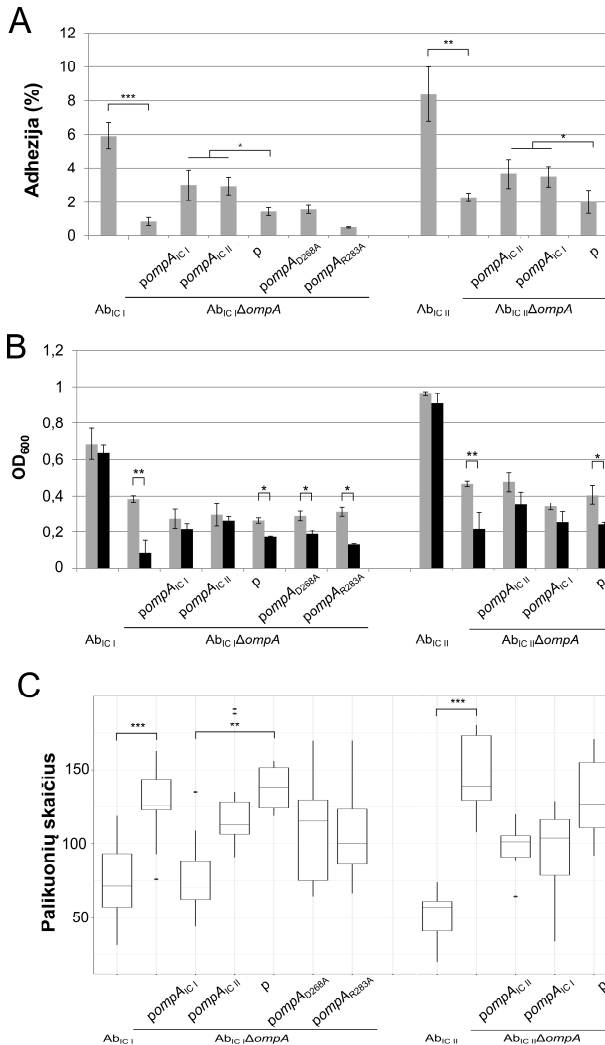


3.16 pav. Ab_{IC} I izoliato ir jo *ompA* geno delecinio mutanto trūkčiojimo judrumas (A) bei atsparumas džiūvimui (B). Paklaidos nurodo standartines paklaidas iš trijų pakartojimų. Reikšmingumas nustatytas t testu (***) $p < 0,001$). Džiūvimo eksperimento metu dešimtkartiniai skiedimai prieš džiūvimą ir po buvo išsėjami ant LB agaro.

Ab_{IC} I $\Delta ompA$ mutantas neišgyveno džiūvimo streso. Komplementacija plazmidėmis su abiejais *ompA* geno variantais iš dalies atstatė fenotipą (3.16 pav., B). Taigi, abu *OmpA* variantai yra funkcionalūs pasireiškiant šliaužimo fenotipui ir apsaugant nuo išdžiūvimo ir gebėjo atstatyti prarastą fenotipą panašiu lygiu.

Toliau ištyrėme, kokią poveikį *OmpA* praradimas daro *A. baumannii* sąveikai su eukariotinėmis ląstelėmis ir jautrumui serumo komponentams. Kaip matyti iš 3.17 pav., $Ab_{IC\ I}\Delta ompA$ ir $Ab_{IC\ II}\Delta ompA$ mutantai pasižymėjo atitinkamai ~ 6 ir 4,5 kartus mažesne adhezija prie pelių plaučių epitelio ląstelių LL/2 nei jų laukinio tipo izoliatai. *ompA* alelių išveiklinimas atitinkamai lėmė ~ 4 ir 2,5 didesnį $Ab_{IC\ I}\Delta ompA$ ir $Ab_{IC\ II}\Delta ompA$ mutantų jautrumą serumui (3.17 pav., B). Visais tirtais atvejais abu genų aleliai gebėjo atstatyti prarastus fenotipus panašiu lygiu.

Abiejų *ompA* geno alelių reikšmė patogenezei *in vivo* buvo įvertinta tiriant $\Delta ompA$ mutantus nematodų infekcijos modelyje. $\Delta ompA$ *A. baumannii* poveikis *C. elegans* vaisingumui buvo ~ 2 kartus mažesnis nei



3.17 pav. $Ab_{IC\ I}$ ir $Ab_{IC\ II}$ izoliatų ir jų mutantų virulentiškumas *in vitro* ir *in vivo*. A – adhezija prie pelės plaučių epitelio ląstelių LL/2 procentais lyginant su pradiniu bakterijų skaičiumi; B – bakterijų jautrumas serumui, nustatytas po 13 val. augimo LB terpėje su išaktyvintu (pilki stulpeliai) ar aktyviu (juodi stulpeliai) serumu. Paklaidos nurodo standartines klaidas iš trijų nepriklausomų eksperimentų. Reikšmingumas nustatytas t testu (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$); C – stačiakampė diagrama nurodo nematodų palikuonių skaičių po trijų dienų inkubacijos su skirtingais izoliatais. Duomenys pateikti iš trijų nepriklausomų eksperimentų po tris pakartojimus. Reikšmingumas nustatytas ANOVA (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

laukinio tipo bakterijų (3.17 pav., C). Įdomu tai, kad $Ab_{IC\ II}\Delta ompA$ mutanto komplementacija tiek vienu, tiek kitu geno aleliu iš dalies sumažino nematodų palikuonių skaičių, tuo tarpu su $Ab_{IC\ I}\Delta ompA$ mutantu toks efektas pasiektas tik komplementavus „nuosavu“ geno aleliu. Tai rodo, kad $Ab_{IC\ I}$ izoliato virulentiškumui *in vivo* yra būtinas „savas“ baltymo variantas.

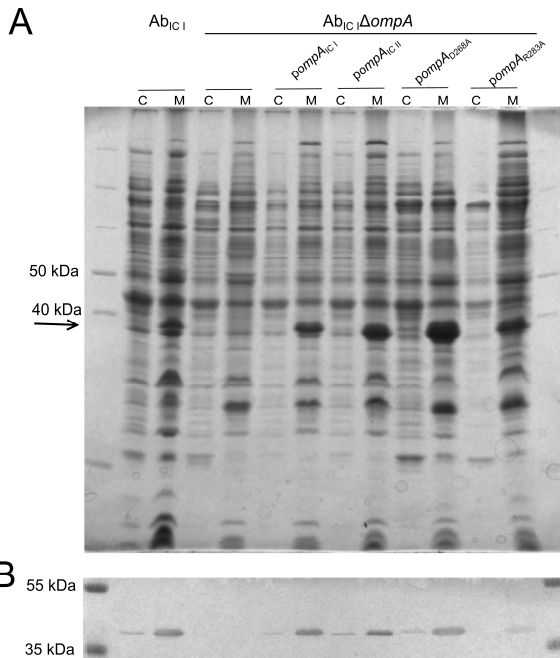
A. baumannii su išveiklintu *ompA* genu prarado virulentiškumą pelių infekcijos modelyje (3.13 pav.). Jau po 6 val. nuo infekcijos pradžios daugumos BALB/c pelių blužnyse $Ab_{IC\ I}\Delta ompA$ bakterijos nebuvo aptinkamos. Tokį drastišką mutanto virulentiškumo praradimą galėjo lemti anksčiau aprašytas daugiafunkcinis OmpA baltymo vaidmuo *A. baumannii* patogenezėje.

3.2.1.2. *OmpA baltymo konservatyvių aminorūgščių Asp268 ir Arg283 tikslinė mutagenėzė*

Park ir kt. (2012), pasitelkę izoterminės kalorimetrijos metodą, *in vitro* parodė, kad *A. baumannii* OmpA baltymo periplazminio domeno konservatyvios aminorūgštys Asp268 ir Arg283 yra būtinos sąveikai su peptidoglikanu (1.9 pav). Ši nekovalentinė sąveika galėtų būti svarbi *A. baumannii* išorinės membranos integralumui bei ląstelės paviršiaus struktūros stabilumui, todėl nusprendėme ištirti OmpA Asp268 ir Arg283 reikšmę bakterijų virulentinėms savybėms. *A. baumannii ompA_{IC I}* alelyje tikslinės mutagenėzės būdu Asp268 ir Arg283 aminorūgštys buvo pakeistos alaninais, gauti mutantai *ompA_{D268A}* ir *ompA_{R283A}*. Sukonstruotos plazmidės su abiem mutantiniais variantais, *pompA_{D268A}* ir *pompA_{R283A}*, transformuotos į $Ab_{IC\ I}\Delta ompA$ ląsteles. Mutantinių OmpA_{D268A} ir OmpA_{R283A} baltymų sintezę ir jų sąveikos su išorine membrana išlaikymą patvirtinome ultracentrifugavimo būdu atskyrę bakterijų lizatų citozolinę ir membranines frakcijas bei atlikę baltymų imunofermentinę (Western-Blot) analizę (3.18 pav.). Gavę reikalingus mutantus ir komplementuotus kamienus, toliau tyrėme su virulentiškumu siejamus *A. baumannii* fenotipus $Ab_{IC\ I}\Delta ompA$ mutante.

CLSM analize parodėme, kad OmpA netekimas sutrikdo bioplėvelės formavimą, todėl nusprendėme ištirti, kaip D268A taškinė mutacija paveikia šią bakterijų savybę. CLSM tyrimas parodė, kad *ompA_{D268A}* bakterijose buvo reikšmingai sumažėjęs PI dažą sukaupusių ląstelių skaičius, palyginus su išveiklintą *ompA* geną turinčiomis bakterijomis, tačiau bakterijų „grandinėlių“ fenotipas, kuriuo pasižymėjo $\Delta ompA$ mutantas, išliko (3.15 pav., A(I-II)). Tai rodo, kad β -statinės OmpA domenas, kuriuo

baltymas įsiterpia į išorinę membraną, reikalingas ląstelės sienelės integralumui, tuo tarpu baltymo sąveika su peptidoglikanu, kurią sutrikdė D268A mutacija, svarbi bakterijų dalijimosi procesui. Sutrikęs *ompA*_{D268A} ląstelių dalijimasis stebėtas ir po 24 val. suformuotos bioplėvelės struktūroje (3.15 pav., A(III)). Šie duomenys liudija apie OmpA vaidmenį *A. baumannii* tiek sienelės integralumo palaikyme, tiek ir dalijimosi procese. Deja, nebuvo techninių galimybių nustatyti kitos – R283A mutacijos poveikį *A. baumannii* formuojamai bioplėvelei, tačiau ištyrėme seriją kitų šio mutanto savybių.



3.18 pav. *A. baumannii* membraniniai (M) ir citozoliniai (C) baltymai. Baltymų frakcijos atskirtos ultracentrifugavimo būdu. A – baltymų frakcijos išskirstytos 12 % NDS-PAGE. Rodyklė žymi OmpA baltymą; B – imunofermentinė OmpA baltymo detekcija naudojant serumą iš BALB/c pelių, imunizuotų su OmpA baltymu.

Analizuojant abiejų OmpA taškinių mutacijų poveikį *A. baumannii* virulentinėms savybėms nustatėme, kad baltymo sąveika su peptidoglikanu būtina bakterijų trūkčiojimo judėjimo palaikymui, atsparumui sausoms aplinkos sąlygoms bei serumo komponentams, adhezijai prie epitelio ląstelių ir *A. baumannii* patogeniškumui *in vivo* nematodų infekcijos modelyje (3.16 pav. ir 3.17 pav.). Tai rodo, kad OmpA sąveikos su peptidoglikanu palaikomo išorinės membranos stabilumo praradimas lemia daugelį su *A. baumannii* virulentiškumu siejamų fenotipinių savybių pokyčių.

3.2.1.3. OmpA reikšmė išorinės membranos pūslelių biogenezei ir atsparumui antibiotikams

Išorinės membranos pūslelėms (OMV) yra priskiriamas virulentiškumo veiksnių nešiklių vaidmuo patogenezėje (Schwechheimer ir Kuehn, 2015).

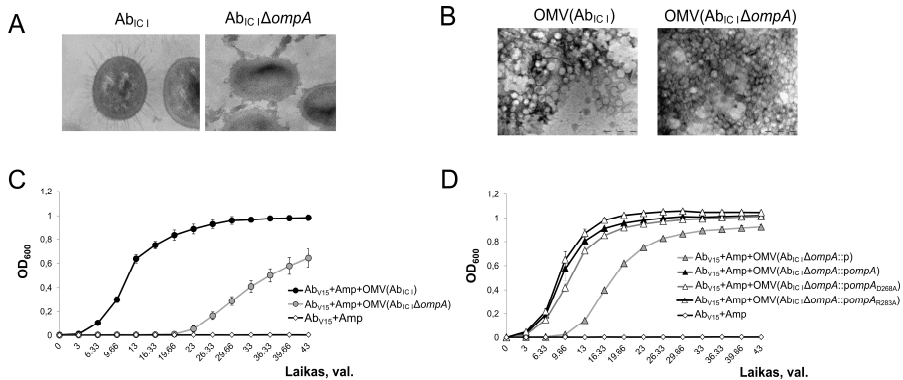
A. baumannii OmpA baltymas yra gausus OMV komponentas (Moon ir kt., 2012), tačiau baltymo įtaka pūslelių funkcijoms yra menkai ištirta. OmpA nesenai buvo identifikuotas kaip atsparumą antibiotikams, tarp jų ir β -laktamams, lemiantis porinas (Kwon ir kt., 2017; Iyer ir kt., 2018). Yra žinoma, kad OMV produkcija įvairiose patogeninėse bakterijose padidėja esant antibiotikų spaudimui (Agarwal ir kt., 2019). Iškelta prielaida, kad viena iš pūslelių funkcijų yra antibiotikų išaktyvinimas pūslelių viduje, taip apsaugant bakterijas nuo antibiotiko patekimo į vidų (Jan, 2017). Todėl mus domino, kokia yra OmpA, kaip vieno pagrindinių pūslelių baltymų, pasižyminčio porino savybėmis, sąsaja su pūslelių gebėjimu išaktyvinti antibiotikus?

Tuo tikslu iš Ab_{IC1} ir $Ab_{IC1}\Delta ompA$ bakterijų kultūrų ultracentrifugavimo būdu buvo išskirtos pūslelių frakcijos. Atkreipėme dėmesį, kad $\Delta ompA$ mutantas gamino ~2 kartus daugiau pūslelių nei tėvinis kamienas, tai greičiausiai buvo susiję su pažeistu ląstelės sienelės integralumu, ką liudija transmisijos elektroninės mikroskopijos metodu gautas vaizdas, kuriame aiškiai matyti, kad $Ab_{IC1}\Delta ompA$ ląstelės paviršiuje, kitaip nei tėvinio kamieno bakterijose, formuojasi ląstelių atplaišos (3.19 pav., A). Išskirtos OMV frakcijos buvo vaizdinamos transmisijos elektroninės mikroskopijos metodu (3.19 pav., B) (VU BTI Eukariotų genų inžinerijos skyriuje).

Naudojant nitrocefina, kaip universalų β -laktamazių substratą, įsitikinome, kad išskirtos OMV turi aktyvių β -laktamazių, nes inkubuojant su OMV buvo stebima šio substrato hidrolizė (duomenys neparodyti). Toliau tyrėme pūslelių gebėjimą išaktyvinti ampiciliną, esantį augimo terpėje. Šiam tikslui naudojome ampicilinui jautrų klinikinį *A. baumannii* izoliatą Ab_{V15} . Rezultatai parodė, kad Ab_{V15} bakterijos esant pūslelėms, kurios buvo išskirtos iš ampicilinui atspariausio izoliato Ab_{IC1} , gebėjo augti LB terpėje su ampicilinu (3.19 pav., C). Įdomu, jog nors ir vėluojant, Ab_{V15} izoliatas sugebėjo augti ir terpėje esant OMV, išskirtomis iš $\Delta ompA$ kamieno, kas rodo, kad OmpA trūkumas apsunkina ampicilino patekimą į pūslelę, tačiau pernaša nėra visiškai blokuojama.

Mums buvo įdomu, ar OmpA baltymo sąveika su peptidoglikanu turi įtakos pūslelių funkcionalumui, t.y. gebėjimui neutralizuoti ampiciliną. Todėl išskyrėme pūslelių frakcijas iš $\Delta ompA$ bakterijų, kurios turėjo plazmidės $pompA_{D268A}$ ir $pompA_{R283A}$. Aukščiau aprašytais eksperimentais įsitikinome, kad mutantiniai OmpA variantai bakterijose sintetinami ir išlaiko sąveiką su membrana. Palyginome Ab_{V15} augimą, kai terpėje buvo pūslelių, išskirtų iš $\Delta ompA$ bakterijų su tuščia plazmide ir pūslelių iš $\Delta ompA$

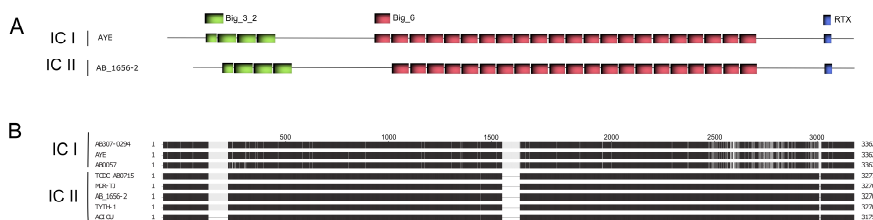
bakterijų su *pompA*_{D268A} ar *pompA*_{R283A} plazmidėmis. Kaip matyti iš 3.19 pav., D, Ab_{V15} bakterijų augimas esant pūslelių, turinčių abu mutantinius OmpA baltymo variantus, atsistatė. Tai liudija, kad OmpA sąveika su peptidoglikanu gebėjimui pernešti ampiciliną į pūsles ir jo neutralizavimui įtakos neturi.



3.19 pav. OmpA įtaka antibiotikų išaktyvinimui *A. baumannii* OMV pūslelėse. A – Ab_{IC1} ir Ab_{IC1}ΔompA ląstelių paviršius; B – *A. baumannii* OMV. Vaizdinta TEM būdu; C – *A. baumannii* Ab_{V15} augimas terpėje su ampicilinu ir pūslelėmis iš Ab_{IC1} ir Ab_{IC1}ΔompA bakterijų; D – *A. baumannii* Ab_{V15} augimas terpėje su ampicilinu ir pūslelėmis iš Ab_{IC1} ir Ab_{IC1}ΔompA, komplementuotų plazmidėmis su *ompA*, *ompA*_{D268A} ir *ompA*_{R283A}. Paklaidos nurodo standartinį nuokrypį iš trijų pakartojimų duomenų.

3.2.2. Blp1 reikšmė *A. baumannii* patogenezėje

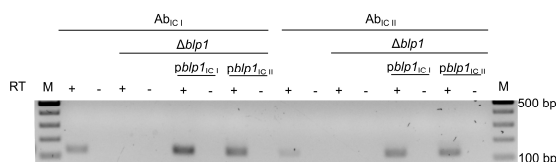
Kitas su *A. baumannii* paviršinėmis struktūromis susijęs baltymas, kurį išsamiau ištyrėme, buvo Blp1. Šis didelis bakterijos baltymas pasirodė akivaizdžiai susijęs su bakterijų adhezinėmis savybėmis ir buvo reikalingas infekcijai *in vivo* (3.1 lentelė). Kaip ir *ompA* geno atveju, *blp1* genui nustatėme du alelinius variantus. Toliau, remdamiesi NCBI duomenų bazėje esančiomis genomų sekomis, atlikome išsamią Blp1 baltymo lyginamąją analizę IC I ir IC II klonui priskiriamose *A. baumannii* (3.20 pav.). Blp1 baltymą koduoja >10 kb dydžio genas. Baltymą sudaro daugybiniai sekų pasikartojimai – vadinamieji bakteriniai į imunoglobulinus panašūs domenai (angl. *Bacterial immunoglobulin-like domains*, Bigs). Pasikartojimų skaičius IC I ir IC II klonų bakterijų Blp1 baltymo variantuose skyrėsi. IC I izoliatų Blp1 koduoja 26 pasikartojimus, o IC II izoliatų – 24-25. Abiejų alelių koduojami baltymai tarpusavyje pasižymėjo 71 % – 74 % sekų panašumu. Baltymo C-gale esančios 160 aminorūgščių su RTX (angl. *repeats in toxin*) domenu ir T1SS pernašos sistemos atpažinimo seka buvo identiškos tarp skirtingų Blp1 variantų. Pastebėjome, kad ~ 540 aminorūgščių regionas baltymo C dalyje tarp RTX domeno ir Big pasikartojimų buvo itin variabilus



3.20 pav. Blp1 alelinė variacija skirtingų klonų *A. baumannii* izoliatuose. A – domeninė Blp1 baltymo organizacija. Raudoni ir žali kvadratai vaizduoja bakterinio į imunoglobulino panašaus domeno tipą 3_2 (Big_3_2) ir tipą 6 (Big_6), mėlyni kvadratai žymi RTX domeną. Domenų organizacija buvo nustatyta naudojant HHMER įrankį; B – Blp1 baltymo sekų palyginys remiantis IC I ir IC II izoliatų genomais iš NCBI Genbank duomenų bazės. Juodos zonos reiškia 100 % identišumą. Baltymų sekos su mažesne homologija pažymėtos pilkai. Palyginys sukurtas TexShade įrankiu.

lyginant abu genų variantus. Paviršiaus baltymų polimorfizmas dažniausiai būdingas į išorę eksponuojamose baltymų dalyse (Smith ir kt., 2007b; Wu ir kt., 2016b), todėl manome, kad būtent Blp1 baltymo C-dalis galėtų būti eksponuojama į ląstelės išorę.

Nustatyta *blp1* geno ir jo koduojamo baltymo polimorfizmo sąsaja su pandeminiiais bakterijų klonais iškėlė klausimą, kokią reikšmę turi baltymai *A. baumannii* virulentinėms savybėms ir patogenezės procesui? Tuo tikslu išveiklinome *blp1* alelius atitinkamuose IC I ir IC II izoliatuose. Gauti $\Delta blp1$ mutantai toliau bus vadinami $Ab_{IC I} \Delta blp1$ ir $Ab_{IC II} \Delta blp1$. Genų išveiklinimas nepaveikė tirtų *A. baumannii* izoliatų augimo. Taip pat sukūrėme plazmides $\Delta blp1$ mutantų komplementacijai $pblp1_{IC I}$ ir $pblp1_{IC II}$. Genų raiška tirtose bakterijose buvo patvirtinta kokybinės RT-PCR būdu (3.21 pav.)



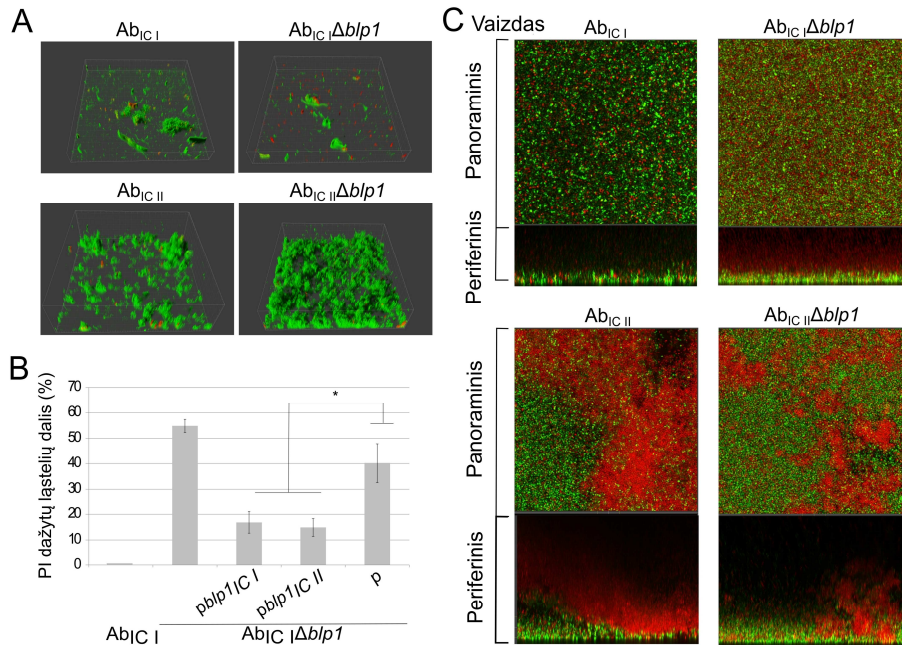
3.21 pav. *blp1* geno raiška *A. baumannii*. Analizė atlikta kokybinės RT-PCR būdu. RT +/- žymi atvirkštinę transkriptazę cDNR sintezės reakcijose. M – DNR ilgio žymuo.

3.2.2.1. Blp1 reikšmė bioplėvelių formavimui

Pirmiausia nustatėme potencialaus adhezino Blp1 įtaką *A. baumannii* formuojamos bioplėvelės struktūrai. Bakterijų kultūras inokuliuojus į LB terpę po 2 val. CLSM metodu stebėta ląstelių adhezija prie plastiko paviršiaus. Bakterijos dažytos PI ir SYTO9 dažais. $Ab_{IC I} \Delta blp1$ bakterijos jau po 2 val. pasižymėjo pirminės adhezijos pokyčiais, ką liudijo ~ 55 %

bakterijų, sukaupusių PI dažą, palyginus su laukinio tipo bakterijomis, kurios dažo nekaupė (3.22 pav., A-B). Įdomu tai, kad $Ab_{IC\ II}\Delta blp1$ bakterijos nesiskyrė nuo laukinio tipo $Ab_{IC\ II}$ izoliato, jų ląstelių pirminė adhezija nebuvo paveikta. Komplementacija plazmidėmis su abiem *blp1* variantais atstatė $Ab_{IC\ I}\Delta blp1$ fenotipinį defektą panašiu lygiu.

Susiformavus subrendusiai bioplėvelei po 24 val., dar labiau išryškėjo $\Delta blp1_{IC\ I}$ alelio įtaka bioplėvelės struktūrai, kurioje sumažėjo gyvybingų ląstelių su integralia membrana sluoksnis (su SYTO9 dažu) ir padidėjo PI sukaupusių ląstelių sluoksnis (3.22 pav., C). Vėlgi, jokių akivaizdžių pokyčių palyginus su laukinio tipo bakterijomis, $\Delta blp1_{IC\ II}$ mutanto suformuotoje bioplėvelėje nustatyta nebuvo.



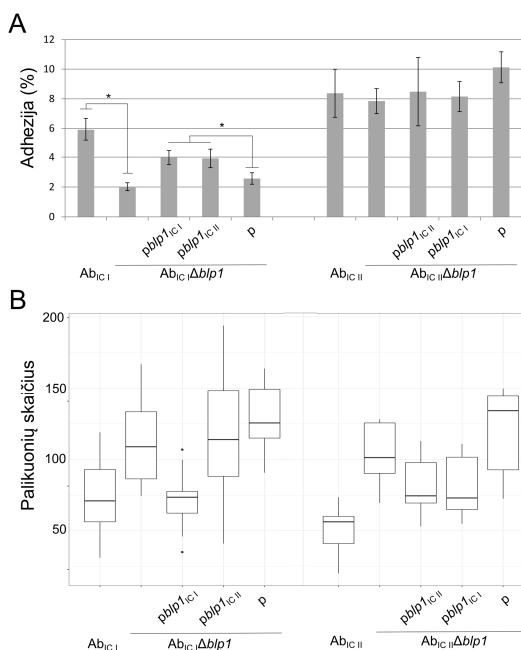
3.22 pav. $Ab_{IC\ I}$ ir $Ab_{IC\ II}$ izoliatų bei jų $\Delta blp1$ mutantų bioplėvelių CLSM analizė. A – pirminė bakterijų adhezija prie plastiko po 2 val. nuo užsėjimo. Dažyta propidžio jodidu (PI) (raudona spalva) ir SYTO9 (žalia spalva). B – PI dažą sukaupusių bakterijų procentinis įvertis lyginant su visu bakterijų skaičiumi praėjus 2 val. nuo užsėjimo. Paklaidos žymi standartinį nuokrypį iš šešių skirtingų CLSM nuotraukų duomenų. Reikšmingumas nustatytas t testu (* $p < 0,05$); C – bakterijų formuojamos subrendusių (po 24 val.) bioplėvelių struktūros.

Verta atkreipti dėmesį, kad $Ab_{IC\ II}$ izoliatas formavo skirtingos struktūros bioplėvelę lyginant su $Ab_{IC\ I}$ izoliatu. Galima teigti, kad *blp1* geno delecija nevienodai paveikė $Ab_{IC\ I}$ ir $Ab_{IC\ II}$ izoliatų gebėjimą formuoti bioplėveles, nors $Ab_{IC\ I}\Delta blp1$ mutante abu geno aleliai gebėjo atstatyti bioplėvelės

struktūrą panašiu lygiu, taigi, abu geno aleliai buvo funkcionalūs bioplėvelės formavime.

3.2.2.2. *Blp1* reikšmė adhezijai prie plaučių epitelio ląstelių

Blp1 baltymas yra sudarytas iš Big pasikartojimų, kurie aptinkami ir kituose bakteriniuose adhezinuose (Lin ir kt., 2010a; Griessl ir kt., 2013; Guo ir kt., 2017), todėl toliau tyrėme *blp1* geno reikšmę adhezijai prie pelės plaučių epitelio ląstelių LL/2. Kaip matyti iš 3.23 pav., A, dėl *blp1* geno delecijos Ab_{IC I} bakterijų adhezija prie epitelio ląstelių sumažėjo ~ 3 kartus, tuo tarpu Ab_{IC II} adhezijai geno išveiklinimas įtakos neturėjo. Abu geno aleliai gebėjo atstatyti prarastą adheziją panašiu lygiu Ab_{IC I}Δ*blp1* mutante, kas patvirtino abiejų alelių funkcionalumą adhezijoje.



3.23 pav. Ab_{IC I} ir Ab_{IC II} izoliatų bei jų Δ*blp1* mutantų virulentiškumas *in vitro* ir *in vivo*. A – adhezija prie pelės plaučių epitelio ląstelių LL/2, išreikšta procentiniais įverčiais lyginant su pradiniu bakterijų skaičiumi. Paklaidos nurodo standartinės klaidas analizuojant tris nepriklausomus eksperimentus. Reikšmingumas nustatytas t testu (*p<0,05); B – stačiakampė diagrama žymi nematodų palikuonių skaičių po trijų dienų inkubacijos su skirtingais izoliatais. Duomenys pateikti iš trijų nepriklausomų eksperimentų po tris pakartojimus.

3.2.2.3. *Blp1* reikšmė *A. baumannii* virulentiškumui *in vivo*

Pastebėję nevienodą „nuosavų“ *blp1* geno alelinių variantų reikšmę Ab_{IC I} ir Ab_{IC II} bakterijų fenotipams, nusprendėme iširti, kokią įtaką jie daro *A. baumannii* patogenizei. Tam pasitelkėme *C. elegans* ir pelių infekcijos modelius. Įdomu tai, kad ir Ab_{IC I}Δ*blp1*, ir Ab_{IC II}Δ*blp1* mutantai pasižymėjo sumažėjusiu virulentiškumu, apie ką sprenda iš ~ 1,5 karto padidėjusio palikuonių skaičiaus lyginant su laukinio tipo izoliatais (3.23 pav., B). Tačiau pastebėjome, kad jeigu abu *blp1* aleliai atstatė Ab_{IC II}Δ*blp1*

virulentiškumą *C. elegans* atžvilgiu, tai Ab_{IC I}Δ*blp1* mutanto virulentinės savybės komplementavo tik “nuosavas” *blp1* alelis. Ta pati tendencija nematodų infekcijos modelyje buvo stabima ir OmpA baltymo tyrimų metu. Tokie duomenys galėtų rodyti “nuosavų” genų svarbą išskirtinai Ab_{IC I} izoliato patogeniškumui.

blp1 svarba buvo nustatyta ir pelių infekcijos modelyje. Lyginant Ab_{IC I} izoliato ir Ab_{IC I}Δ*blp1* mutanto išgyvenamumą infekcijos *in vivo* metu, BALB/c pelių blužnyse buvo nustatyta ~ 3 kartus mažiau Ab_{IC I}Δ*blp1* bakterijų nei laukinio tipo *A. baumannii* (3.13 pav.). Tai rodo, kad Blp1 adhezinas yra svarbus veiksnys *A. baumannii* infekcijos *in vivo* metu.

3.3. Blp1 baltymo kaip potencialaus vakcinos antigeno tyrimai

Kuriant naujas gydymo strategijas prieš DAA fenotipu pasižyminčias *A. baumannii*, didelis iššūkis yra variabilios sudėties egzopolisacharidinė kapsulė, kuri ne tik apsaugo bakterijas nuo infekuojamo organizmo imuninės sistemos komponentų (Russo ir kt., 2010), bet tuo pačiu uždengia *A. baumannii* išorinius antigenus, taip „paslėpdama“ bakterijas nuo atpažinimo. Nustatę, kad Blp1 baltymas yra funkcionalus kapsulę turinčių *A. baumannii* adhezijoje prie plastiko ir pelių plaučių epitelio ląstelių, taip pat yra reikalingas nematodų ir pelių infekcijai *in vivo* (3.2.5 skyrelis), iškėlėme hipotezę, kad Blp1 galėtų funkcionuoti kaip adhezinis komponentas, t.y. nebūti visiškai maskuojamas kapsulės, ypač atsižvelgiant į didelį baltymo dydį ir struktūrinius ypatumus. Prielaidą, kad Blp1 galėtų veikti kaip adhezinas sustiprino ir IC I ir IC II *A. baumannii* Blp1 variantų sekų palyginimas. Variabilumas būdingas Blp1 baltymo C-galui, todėl tikėtina, kad būtent ši baltymo dalis eksponuojama į ląstelės išorę, nes išorinės baltymo dalys yra labiausiai linkusios mutuoti (Smith ir kt., 2007b; Wu ir kt., 2016b).

Atsižvelgiant į Blp1 baltymo savybes, jis galėtų būti tinkamas antigenas vakcinai prieš DAA *A. baumannii* bakterijas. Blp1 kaip antigeno pranašumas yra dar ir tas, kad 160 C-galinių aminorūgščių yra visiškai konservatyvios tarp IC I ir IC II *A. baumannii*. Todėl galima būtų tikėtis, kad imuninis atsakas galėtų veikti prieš abiejų paplitusių klonų bakterijas.

Todėl nusprendėme ištirti Blp1 baltymo galimybes sukelti imuninį atsaką ir apsaugoti nuo *A. baumannii* infekcijos. Antigeno sintezei DNR, apimanti 712 C-galinių Blp1 baltymo aminorūgščių (2652–3363 aminorūgštys) buvo pagausinta PGR būdu, matrica naudojant *A. baumannii* Ab_{IC I} DNR. DNR fragmentas, apimantis didesnę C-galinę Blp1 dalį, buvo pasirinktas siekiant

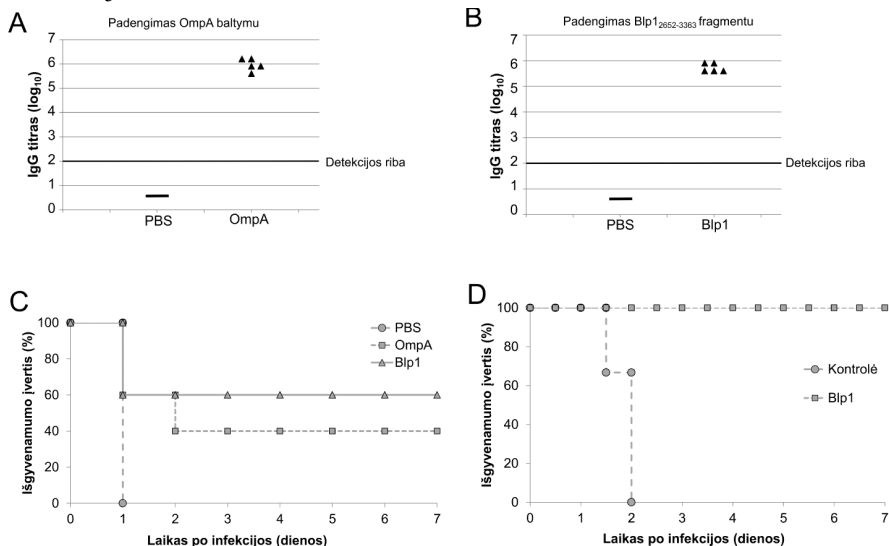
padidinti potencialių antigeninių epitopų skaičių. Gautas amplikonas klonuotas į baltymų raiškos vektorių pET28b, suliejus Blp1 su histidiniu inkaru N-gale. Norėdami palyginti vakcinacijos Blp1 fragmentu efektyvumą, lygiagrečiai klonavome ir OmpA baltymą. *A. baumannii* OmpA baltymo kaip potencialaus vakcinos antigeno efektyvumas buvo neseniai nustatytas (Lin ir kt., 2013). Abu rekombinantiniai baltymai buvo susintetinti *E. coli* ir išgryninti giminingumo chromatografijos būdu.

Pirmiausiai ištyrėme rekombinantinių baltymų poveikį pelės plaučių epitelio LL/2 ląstelių proliferacijai, inkubuodami ląsteles 24 val. su įvairiomis rekombinantinių baltymų koncentracijomis. Inkubuojant su 2,5-10 µg/ml išgrynintų baltymų, ląstelių gyvybingumas atitinkamai siekė 90-83 % Blp1 atveju ir 95-91 % OmpA baltymo atveju (duomenys neparodyti). Taigi, abu išgryninti baltymai pasižymėjo nedideliu citotoksinu poveikiu.

BALB/c pelių (5 pelės grupėje) aktyvios vakcinacijos procesas vyko kaip aprašyta 2.2.23 skyrelyje. ELISA metodu tikrinta, ar vakcinuotų pelių serume susidarė rekombinantiniams baltymams saviti imunoglobulinai IgG. Serumo titravimo duomenys paliudijo, kad visose vakcinuotose pelėse, išskyrus kontrolinę grupę, yra Blp1 fragmentą ar OmpA baltymą specifiskai atpažįstančių IgG (3.24 pav., A-B). Tęsiant eskperimentą, 42 dieną nuo vakcinacijos pradžios, pelės buvo užkrėstos *A. baumannii*, gyvūnams į peritoniumą suleidžiant 10^8 CFU Ab_{IC 1} bakterijų. Pelių išgyvenamumas stebėtas savaitę. *A. baumannii* infekciją išgyveno 60 % pelių, vakcinuotų Blp1 fragmentu ir 40 % pelių, vakcinuotų OmpA fragmentu (3.24 pav., C). Kontrolinėje grupėje išgyvenusių pelių nebuvo. Iš gautų duomenų galima teigti, kad Blp1 fragmentas padidino pelių išgyvenamumo rodiklį, kuris buvo didesnis nei OmpA baltymu vakcinuotų pelių. Tolimesni tyrimai buvo atlikti tik su Blp1 fragmentu.

Pagrindinė rizikos grupė užsikrėsti *A. baumannii* infekcija yra imunosupresuoti asmenys, todėl aktuali yra pasyvios imunizacijos prieš *A. baumannii* galimybė, kai infekuotam individui yra suleidžiamas serumas, polikloniniai ar monokloniniai antikūnai, aktyvūs prieš tam tikrą antigeną. Todėl nusprendėme ištirti Blp1 fragmento efektyvumą kai taikoma pasyvios vakcinacijos pelėse schema. Tam tikslui pelėms (3 pelės grupėje) į peritoniumą buvo suleista 200 µl Blp1-antiserumo, išskirto iš Blp1 fragmentu vakcinuotų pelių. Kontrolinėms pelėms buvo sušvirkšta serumo iš PBS buferiu injekuotų pelių. Po 6 val. pelės buvo užkrėstos Ab_{IC 1} bakterijomis (5×10^7 CFU) ir pelių išgyvenamumas stebėtas 45 dienas. Visos pelės, kurioms buvo suleista Blp1 antiserumo, išgyveno, tuo tarpu

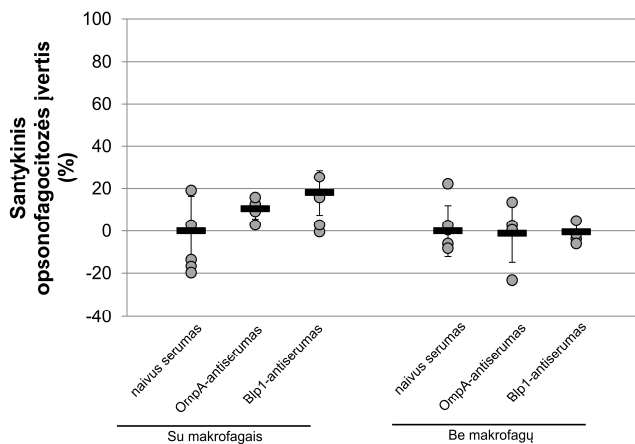
kontrolinių pelių išgyvenamumas buvo 0 % (3.24 pav., D). Tokiu būdu, aukščiau aptarti imunizacijos Blp1 antigenu rezultatai rodo, kad šis komponentas yra efektyvus antigenas taikant tiek aktyvią, tiek pasyvią vakcinacijas.



3.24 pav. Imunizacijos OmpA ir Blp1 antigenais tyrimai. Specifinių IgG titras prieš OmpA (A) ir Blp1 baltymo fragmentą (B) atitinkamais antigenais imunizuotų BALB/c pelių serume; C – pelių (n=5 grupėje), imunizuotų taikant aktyvią vakcinaciją, išgyvenamumas, užkrėtus 10^8 CFU Ab_{IC 1} bakterijų. Išgyvenamumas stebėtas 7 dienas; D – pelių (n=3 grupėje), imunizuotų taikant pasyvią vakcinaciją, išgyvenamumas užkrėtus 5×10^7 CFU Ab_{IC 1} bakterijų. Kontrolinei grupei suleista naivaus serumo iš pelių, kurioms injekuota PBS su Freudo adjuvantu. Išgyvenamumas stebėtas 45 dienas.

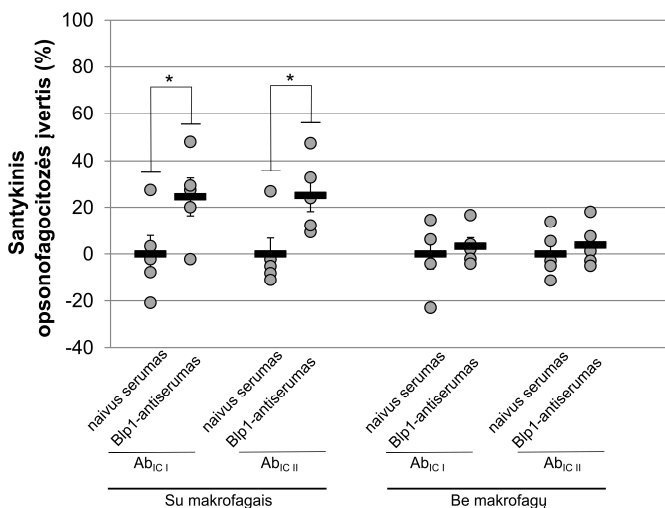
3.3.1. Antiserumo indukuojama klinikinių *A. baumannii* izoliatų opsonofagocitozė

Norėdami išsiaiškinti, kokie vakcinuotų pelių antiserumo komponentai nulėmė poveikį prieš *A. baumannii*, atlikome opsonofagocitozės tyrimą. Tam tikslui, aktyvinti J774 makrofagai buvo sumaišyti su Ab_{IC 1} bakterijomis bei karščiu paveiktu (tam, kad būtų išaktyvinti komplemento baltymai) Blp1-antiserumu bei naiviu serumu. Po 1 val. inkubacijos buvo išsėjamos ir skaičiuojamos *A. baumannii* bakterijos. Rezultatai parodė, kad Blp1-antiserumas žymiai efektyviau skatino makrofagus fagocituoti bakterijas nei OmpA-antiserumas (3.25 pav.). Šis priešbakterinis antiserumo poveikis buvo prarandamas pašalinus makrofagus, kas liudija, kad antiserumo poveikį nulėmė susidarę specifiskai antigeną atpažįstantys antikūnai.



3.25 pav. OmpA-antisero ir Blp1-antisero sukeliama $Ab_{IC I}$ opsonofagocitozė. Kiekvienas taškas reprezentuoja serumo mėginį iš vienos pelės, juoda linija žymi vidurkį, paklaidos – standartinę nuokrypį.

Vakcinacijos tyrimams naudojome Blp1 baltymo C-galinį fragmentą, kurį koduoja $Ab_{IC I}$ klonų izoliatas, todėl norėjome įsitikinti, ar antigenas veiksmingas prieš IC II izolatą, kuris turi kitą *blp1* geno variantą. Kaip matyti iš 3.26 pav. pateiktų rezultatų, Blp1-antiseras veikė vienodai efektyviai (apie 20 % išaktyvintų bakterijų) prieš $Ab_{IC I}$ ir $Ab_{IC II}$ klonų *A. baumannii*. Nesant makrofagų, antibakterinio antisero poveikio nebuvo. Remiantis pateiktais duomenimis, galima teigti, kad Blp1 fragmento indukuoti antikūnai pasižymi efektyviu antibakteriniu poveikiu prieš IC I ir IC II *A. baumannii* izolatus, sukeliančius didžiąją dalį visų *A. baumannii* infekcijų.



3.26 pav. Blp1-antisero sukeliama $Ab_{IC I}$ ir $Ab_{IC II}$ bakterijų opsonofagocitozė. Kiekvienas taškas reprezentuoja serumo mėginį iš vienos pelės, juoda linija žymi vidurkį, paklaidos – standartinę nuokrypį. Reikšmingumas nustatytas t testu (* $p < 0,05$).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tirtos klinikinės kilmės *A. baumannii* izoliatų, išskirtų iš Lietuvos ligoninių, virulentinės savybės. Mūsų žiniomis tai pirmas toks Lietuvos ligoninėse cirkuliuojančių *A. baumannii* izoliatų apibūdinimas. Tiriami izoliatai priklausė labiausiai išplitusiems pandeminiams klonams IC I ir IC II.

A. baumannii izoliatai buvo išskirti iš klinikinės aplinkos, kur bakterijų išplitimui yra svarbios su išgyvenimu *ex vivo* siejamos savybės, tarp jų ir judėjimo fenotipas (Kearns, 2010), todėl pirmiausia ištyrėme izoliatų gebėjimą judėti ropojimo ir trūkčiojimo būdais. Iš atliktų tyrimų paaiškėjo, kad intensyvus ropojimo tipo judėjimas yra retas *A. baumannii* fenotipas, nes tik keli izoliatai pasižymėjo šia savybe. Manoma, kad ropojantys *A. baumannii* izoliatai yra virulentiškesni *in vivo* lyginant su neropojančiais izoliatais (Eijkelkamp ir kt., 2013). Ta pati tendencija buvo pastebėta ir su kitomis patogeninėmis bakterijomis (Lee ir kt., 2015). Visgi mūsų duomenys rodo, kad bent jau išplitimui ligoninėse šio tipo judėjimas nėra kritinė savybė, nes dauguma labiausiai paplitusių pandeminių klonų izoliatų nepasižymėjo tokiu fenotipu. Įdomu tai, kad ropojimo fenotipas patogeninėse bakterijose, pvz. *P. aeruginosa*, siejamas su žiuželio funkcija (Harding ir kt., 2018a). Tačiau atlikus bioinformatinę duomenų bazėse esančių DNR sekų analizę genai, koduojantys žiuželio komponentus, *A. baumannii* genomuose nebuvo rasti (Clemmer ir kt., 2011). Todėl iškelta hipotezė, kad ropojimo judėjimas *A. baumannii* yra nuo žiuželių nepriklausantis, daugiakomponentinis reiškiny (Harding ir kt., 2013).

Kitaip nei ropojimo judėjimas, trūkčiojimo tipo judėjimas buvo dažnas fenotipas, aiškiai išreikštas IC I klonų bakterijose. Šią tendenciją patvirtina duomenys apie Australijoje išskirtų klinikinės kilmės *A. baumannii* savybes, kur nustatyta, kad trūkčiojimo fenotipas taip pat labiau būdingas IC I klonui (Eijkelkamp ir kt., 2011). Tai leidžia manyti, šis fenotipas yra IC I klonų savybė. Nustatyta, kad trūkčiojimo judėjimui *A. baumannii* bakterijoms reikia IV tipo pilių (Harding ir kt., 2013). Tiek IC I, tiek IC II bakterijos savo genomuose koduoja IV tipo pilių genus, todėl akivaizdūs skirtumai tarp trūkčiojimo fenotipo pasireiškimo lyginant skirtingus klonus galėtų būti susiję su pilių komponentų pokyčiais. *A. baumannii* yra nustatytas kai kurių genų, koduojančių pilės komponentus, polimorfizmas, pvz. pagrindinio pilės subvieneto – PilA geno, kurio skirtingi variantai būdingi skirtingiems IC klonams (Piepenbrink ir kt., 2016). Rasta ir kitų skirtumų, galimai susijusių

su pilės funkcijomis. IC II bakterijų genomuose šalia PilA subvienetą ir PglL O-oligosachariltransferazę (O-OTazę) koduojančių genų yra koduojama papildoma TfpO O-OTazė, kuri glikozilina IV tipo piles (Harding ir kt., 2015). Įdomu tai, kad TfpO O-OTazės geno buvimas koreliuoja su serino buvimu PilA subvieneto C-gale, taigi, šios aminorūgšties glikozilinimas galėtų būti susijęs su bakterijų judrumu. Tiriant kitas patogenines bakterijas, pvz. *Neisseria meningitidis* buvo parodyta pilių glikozilinimo įtaka bakterijų išplitimui (Chen ir Seifert, 2011). Vis dėlto, *tfpO* geno išveiklinimas nejudrioje IC II klonų bakterijose neturėjo įtakos ropojimo fenotipo įgijimui (Skerniškytė, duomenys neparodyti), taigi, IC II bakterijų ropojimo praradimas nėra susijęs su pilių glikoziliniu. Tokią išvadą patvirtina ir kiti tyrimai, atlikti artimose *A. baumannii* bakterijose *Acinetobacter nosocomialis*, kurių PilA suvienete, taškinės mutagenzės būdu įvesta S136A mutacija neturėjo įtakos bakterijų judrumui (Piepenbrink ir kt., 2016). Kitame neseniai publikuotame tyrime buvo lygintas *pilA* delecinio mutanto, komplementuoto IC I ir IC II *pilA* aleliais, gebėjimas judėti (Ronish ir kt., 2019). Tik IC I *pilA* geno aleliu komplementuotas $\Delta pilA$ mutantas pasižymėjo trūkčiojimo fenotipu, tuo tarpu IC II aleliu komplementuotas tas pats mutantas buvo labiau sėslus ir formavo didesnės biomasės bioplėvelę. Remiantis elektrostatiniais skaičiavimais pasiūlyta, kad IC II izoliatuose pilės gali būti linkusios sąveikauti viena su kita ir taip nuslopinti nuo IV tipo pilių priklausomą trūkčiojimo judėjimą.

Kaip ir kitose Gram-neigiamose bakterijose, *A. baumannii* išoriniai polisacharidai ir lipooligosacharidai yra svarbūs virulentiniai veiksniai apsaugant nuo infekuojamo organizmo imuninės sistemos (Russo ir kt., 2010; Moffatt ir kt., 2013). Absoliuti dauguma klinikinės kilmės *A. baumannii* sintetino egzopolisacharidinę kapsulę. Pandeminių klonų bakterijos pasižymėjo klonui būdingais kapsulės komponentų profiliais – IC I sintetino įvairaus ilgio sacharidų molekules, o IC II – tik didelės molekulinės masės molekules. Už *A. baumannii* kapsulės sintezę yra atsakinga genų sritis, vadinamasis K lokusas, kuris yra itin variabilus (Hu ir kt., 2013; Kenyon ir Hall, 2013), tačiau mes nenustatėme sąsajos tarp kapsulės komponentų profilio ir kapsulės sintezės lokuso tipo. *A. baumannii* kapsulės biogeneze yra vis dar menkai ištirta, todėl sudėtinga atsakyti, kokios priežastys gali nulemti jos fenotipo skirtumus. Dams-Kozłowska ir Kaplan (2007) tyrinėdami artimos rūšies – *Acinetobacter venetianus* – Rag-1 izoliato egzopolisacharidus pastebėjo, kad sintetinamų molekulių ilgis priklausė nuo taškinų mutacijų, įvedamų į Wzc baltymo prolino-glicino

regioną. Wzc yra tirozino kinazė, kuri dalyvauja kapsulės polisacharidų pernašoje, kitose Gram-neigiamose bakterijose jai priskiriamas kapsulės polisacharido ilgį reguliuojančio baltymo vaidmuo (Kalynych ir kt., 2012). Taškinės mutacijos, įvestos į *A. baumannii* Wzc baltymo Walker'io motyvą taip pat turėjo įtakos egzopolisacharidų profiliui (Geisinger ir Isberg, 2015). *A. baumannii* kapsulės polisacharidų profilio pokyčius sukėlė ir kito baltymo – fosfoglikoziltransferazės PglC pakeitimas geno ortologu iš kitos bakterijos (Harding ir kt., 2018b). Visi šie duomenys liudija, kad kapsulės polisacharidų ilgį lemia daugiakomponentinis mechanizmas.

Disertaciniame darbe buvo atlikta Wzc ir PglC baltymų, koduojamų duomenų bazėje esančiuose IC I ir IC II *A. baumannii* genomuose, filogenetinė analizė. Į analizę buvo įtrauktas ir nekloninis *A. baumannii* izoliatas ATCC 17978, kuris sintetina didelės molekulinės masės kapsulę, panašią į mūsų tiriamų IC II izoliatų kapsulę (Lees-Miller ir kt., 2013; Geisinger ir Isberg, 2015), bei *A. venetianus* Rag-1 izoliatas, kurio egzopolisacharidų profilis taip pat yra žinomas ir yra labiau panašus į IC I izoliatų variabilaus ilgio egzopolisacharidus. Įdomu tai, kad Wzc ir PglC baltymai iš IC II izoliatų klasterizavosi kartu su nekloninio *A. baumannii* ATCC 17978 izoliato baltymų variantais, o baltymai IC I izoliatuose buvo panašiausi į *A. venetianus* Rag-1 izoliato baltymus (S1 pav., Priedai). Taigi, su kapsulės sinteze susijusių baltymų grupavimasis pagal sekų panašumą koreliavo su jų sintetinamų egzopolisacharidų profiliiais.

Šiame darbe visos tirtos *A. baumannii*, išskyrus egzopolisacharidinės kapsulės nesintetinantys izoliatai, pasižymėjo atsparumu serumui ir makrofagų fagocitozei, kas patvirtino esminį kapsulės vaidmenį *A. baumannii* apsaugoje nuo šeimininko imuninės sistemos komponentų (Russo ir kt., 2010). Tyrimais su II-h izoliatu parodyta kapsulės sintezės indukcija, kaip atsakas į aktyvaus serumo komponentus. Šis faktas galėtų liudyti apie fazių variacijos (angl. *phase variation*) fenomeną, neseniai aprašytą *A. baumannii* AB5075 izoliata (Chin ir kt., 2018). Indukuojama kapsulės sintezė parodyta ir inkubuojant *A. baumannii* su antibiotikais (Geisinger ir Isberg, 2015).

II-h izoliatas pasižymėjo panašiu virulentiniu potencialu *C. elegans* modelyje, kaip ir kiti hidrofilinę kapsulę sintetinantys izoliatai, tačiau nekapsuliuotos II-h bakterijos nesugebėjo išlikti pelės organizme. Tai liudija apie *A. baumannii* kapsulės svarbą stuburinių gyvūnų infekcijos pradžioje, kai fagocituojančios ląstelės ir komplemento sistema neutralizuoja bakterijas. Tuo tarpu *C. elegans* imuninės sistemos apsaugos mechanizmai yra paremti daugiausiai antimikrobinių lektinų ir peptidų veikimu

(Ermolaeva ir Schumacher, 2014), duomenų apie funkcionalius komplemento baltymus ar fagocituojančias ląsteles nematoduose nėra. Russo ir kt. (2010) parodė, kad kapsulės nesintetinis *A. baumannii* izoliatas buvo neutralizuotas žiurkės minkštųjų audinių infekcijos modelyje jau per pirmas valandas nuo infekcijos pradžios. Vis dėlto, kapsulės nesintetinis II-h izoliatas nebuvo visiškai avirulentinis pelių infekcijos modelyje, nes buvo stebėti ir žūtys atvejai. Tikėtina, kad indukcija šeimininko aplinkoje galėjo prisidėti prie tokio poveikio.

Šiame darbe parodėme, kad kapsulė yra svarbi ne tik apsaugai nuo infekuoto organizmo imuninės sistemos, bet ir kitų savybių pasireiškimui. Neigiamą krūvį turinčios kapsulės praradimas padidino bakterijų hidrofobiškumą, tai palengvino adheziją prie plastiko ir bioplėvelės formavimą. Nepaisant to, kad kapsulė mažina bakterijų gebėjimą adhezuotis prie plastiko paviršiaus, dauguma šiame darbe tirtų *A. baumannii* sintetino kapsulę ir tuo pačiu gebėjo formuoti bioplėvelę. Hidrofiliniai, negebantys formuoti bioplėvelės IC II izoliatai, remiantis TEM duomenimis, sintetino beveik du kartus storesnę bakterijos apvalkalo struktūrą ir buvo atsparesni džiūvimui lyginant su hidrofobiniais izoliatais. Šie duomenys leidžia manyti, kad *A. baumannii* sintetinama kapsulė nors ir trukdo adhezijai prie plastiko, visiškai jos netekimas nėra palankus, galimai dėl to, kad kapsulė apsaugo bakterijas nuo aplinkos streso, pvz. prisidedant prie atsparumo išdžiūvimui ar dezinfektantams (Tipton ir kt., 2015; Chin ir kt., 2018). Kapsulės netekimas ir paviršiaus hidrofobiškumo padidėjimas *A. baumannii* mutante sumažino adheziją prie eukariotinių ląstelių, kurios dažniausiai turi neigiamą paviršiaus krūvį. Tačiau hidrofobiniai *A. baumannii* izoliatai, kurie sintetino dvigubai plonesnę ląstelės apvalkalą, taip pat pasižymėjo mažesne adhezija prie ląstelių, lyginant su hidrofilinėmis bakterijomis. Įdomu tai, kad nekapsuliuotas mutantas lyginant su laukinio tipo izoliatu pasižymėjo virulentiškesnėmis savybėmis nematodų infekcijos modelyje. Tai galėjo nulemti nedidelės molekulinės masės adhezinių ir kitų efektorinių baltymų, kurie kapsuliuotose bakterijose dažniausiai yra „paslėpti“, poveikis. Kapsulės savybė „uždengti“ trumpus adhezinus ir taip mažinti bakterijų virulentiškumą pastebėta patogeninėse *E. coli* ir *C. jejuni* bakterijose (Schembri ir kt., 2004; Rubinchik ir kt., 2014).

Kita *A. baumannii* savybė, kuri aiškiai išskyrė IC I ir IC II klonų bakterijas, buvo pelikulės fenotipas. Gebėjimas formuoti pelikulę yra svarbus patogeninių bakterijų virulentiškumo veiksnys (Hölscher ir kt., 2015). Ankstesniais tyrimais pademonstruota, kad *A. baumannii* pelikulėse telkiami įvairūs su virulentiškumu siejami veiksniai, pvz. fosfolipazės,

adhezinei, sideroforai, kurie reikalingi geležies įsisavinimui (Marti ir kt., 2011; Kentache ir kt., 2017). Įdomu tai, kad *P. aeruginosa* bakterijose buvo nustatytas ryšys tarp ropojimo tipo judėjimo ir formuojamos pelikulės morfologijos, tačiau šis ryšys nebuvo nustatytas trūkčiojimo tipo judėjimui (Yamamoto ir kt., 2012). Mūsų duomenimis *A. baumannii* pelikulės formavimas nekoreliuoja nei su vienu judėjimo tipu.

Pirmas pelikulės formavimosi etapas apima bakterijų adheziją prie plastiko paviršiaus, vėlesniuose etapuose bakterijoms išplintant po visą tirpalo paviršių (Hölscher ir kt., 2015). Bakterijų sąveiką su paviršiumi nulemia ląstelės paviršiaus hidrofobiškumas (Krasowska ir Sigler, 2014), todėl ši savybė galėtų būti reikšminga pelikulės susidarymui. Chabane ir kt. (2014) bei Giles ir kt. (2015) nustatė ryšį tarp *A. baumannii* ląstelių hidrofobiškumo ir pelikulės formavimo, tačiau kitame panašaus pobūdžio tyrime sąsaja tarp hidrofobiškumo ir pelikulės fenotipo (McQueary ir Actis, 2011) nebuvo parodyta. Mūsų duomenys liudija, kad hidrofobinės *A. baumannii* savybės gali būti palankus veiksnys pelikulei formuotis, tačiau būtini ir kiti veiksniai, prisidedantys prie šio fenotipo pasireiškimo, nes nė vienas hidrofobinėmis savybėmis pasižymintis IC II klonų izoliatas neformavo pelikulės. Kita vertus, *A. baumannii* hidrofobiškumas buvo akivaizdžiai susijęs su gebėjimu formuoti bioplėvelę. Tuo tarpu hidrofilinėmis paviršiaus savybėmis pasižyminčios bakterijos nesugebėjo adhezuotis prie plastiko ir formuoti bioplėvelės struktūros. Tai liudija, kad pelikulės ir bioplėvelės struktūroms susidaryti yra reikalingos skirtingos bakterijos paviršiaus savybės.

Šiame darbe atlikti tyrimai liudija, kad *A. baumannii* paviršiaus hidrofobiškumas mažina atsparumą džiūvimui ir gebėjimą adhezuotis prie eukariotinių ląstelių. IC II klonų *A. baumannii*, kurios pasižymėjo hidrofilinėmis savybėmis, buvo virulentiškesnės tiek nematodų infekcijos, tiek pelių sepsio modeliuose. Pastebėtą sąsają tarp *A. baumannii* hidrofilinių savybių ir virulentiškumo *in vivo* paremia anksčiau atlikto tyrimo rezultatai. Iš to paties paciento buvo išskirti du *A. baumannii* izoliatai, besiskiriantys paviršiaus hidrofobinėmis savybėmis. Hidrofilinis izoliatas neformavo bioplėvelės ant plastiko paviršiaus, tačiau buvo žymiai virulentiškesnis lyginant su hidrofobiniu izoliatu (Kempf ir kt., 2012). Mūsų duomenimis, nors hidrofilinėmis savybėmis pasižyminčių *A. baumannii* virulentiškumas buvo labiau išreikštas nei hidrofobinių izoliatų, visgi hidrofiliškumas buvo labiau paplitęs tarp sporadinių *A. baumannii*, o ne tarp klonalių plačiai paplitusių izoliatų. Ligoninėse aiškiai vyraavo hidrofobinėmis savybėmis bei mažesniu virulentiškumo potencialu (palyginus su hidrofilinių savybių

bakterijomis) pasižyminčios *A. baumannii*, kurių dalis, remiantis turimais epidemiologiniais duomenimis, buvo iš infekcijos protrūkių iškirti izoliatai. Šie duomenys liudija, kad svarbesnis virulentiškumo veiksnys, prisidedantis prie *A. baumannii* paplitimo ligoninėse, yra bakterijų gebėjimas adhezuotis prie abiotinių paviršių ir formuoti bioplėvelės struktūrą ir kad ši savybė galėtų turėti pranašumą prieš kitas virulentes savybes – atsparumą džiūvimui bei serumui, gebėjimą adhezuotis prie epitelinių ląstelių.

Idomu yra tai, kad aiškindamiesi *A. baumannii* hidrofobiškumo variabilumo molekulinės priežastis, nustatėme, kad su šiuo reiškiniu nėra susiję nei už kapsulės polisacharidų, nei už LOS sintezę atsakingi genetiniai lokusai. Anksčiau yra pastebėta, kad *A. baumannii* lipido A modifikacija fosfoetanolaminu sumažina formuojamos bioplėvelės tūrį (Pelletier ir kt., 2013; Da Silva ir Domingues, 2017), o bakterijos pasižymi padidėjusiu atsparumu kolistinui. Vis dėlto, visi mūsų tirti IC II izoliatai buvo jautrūs kolistinui (3.4 pav.), kas liudija, kad hidrofobiškumo variacijas tarp skirtingų izoliatų nulėmė ne ši modifikacija.

Neseniai, tiriant AB5075 izolatą, atskleistas *A. baumannii* TetR šeimos transkripcijos regulatoriaus (ABUW_1645) vaidmuo bakterijoms formuojant dvi virulentinėmis savybėmis besiskiriančias kolonijų subpopuliacijas (Tipton ir kt., 2015; Chin ir kt., 2018). Virulentinės subpopuliacijos bakterijos pasižymėjo storesniu ląstelės apvalkalu, didesniu atsparumu dezinfektantams, sumažėjusiu gebėjimu formuoti bioplėveles ir padidėjusiu virulentiškumo potencialu gyvūnų modelyje (Tipton ir kt., 2015; Chin ir kt., 2018). Autorių aprašyti fenotipai buvo labai panašūs į šiame darbe nustatytas *A. baumannii* savybes – atsparumą džiūvimui, bioplėvelės formavimą, virulentiškumą *in vivo* – todėl patikrinome TetR geno raišką hidrofobiniame II-a ir hidrofiliniame II-f izoliatuose kiekybinės RT-PCR būdu. Regulatoriaus raiškos pokyčiai nebuvo nustatyti, kas liudija apie kitus mechanizmus, atsakingus už virulentinių savybių variacijas tirtuose izoliatuose (Skerniškytė, duomenys neparodyti).

Avirulentinio, hidrofobinių savybių II-a ir virulentinio, hidrofilinių savybių II-f *A. baumannii* izoliatų genomų sekoskaitos duomenų analizė parodė, kad jų genomai labai panašūs, tačiau II-f izolatas neturėjo ~65 kb ilgio pACICU2 tipo plazmidės, kuri nustatyta II-a izoliatai. Nė viena iš tirtų hidrofilinėmis savybėmis pasižyminčių IC II *A. baumannii* neturėjo šios plazmidės, tuo tarpu ji rasta hidrofobinėmis savybėmis pasižyminčiuose IC II izoliatuose. pACICU2 plazmidė koduoja H-NS šeimos transkripcijos reguliatorių, kuris galėtų dalyvauti *A. baumannii* koduojamų genų raiškos reguliavime. Aprašytas atvejis, kai pAB3 plazmidėje pernešamas TetR

šeimos transkripcijos reguliatorius moduliavo *A. baumannii* T6SS sekrecijos sistemos raišką (Weber ir kt., 2015). Tuo tarpu nustatyta, kad ne plazmidėje, o *A. baumannii* chromosomoje koduojamas H-NS baltymas (A1S_0268), slopina T6SS baltymų, I tipo pilių, autotransporterių, kvorumo baltymų, kai kurių bendrųjų metabolizmo fermentų bei kitų transkripcijos reguliatorių genų raišką (Eijkelkamp ir kt., 2013). Taip pat buvo nustatyti pokyčiai citoplazminės membranos fosfolipidų riebalų rūgščių liekanų sudėtyje. Manoma, kad *A. baumannii* chromosomoje koduojamas H-NS reguliatorius dažniau nutildo horizontalios pernašos būdu įgytas patogeniškumo salas, kuriose yra su virulentiškumu siejami genai, ir tokiu būdu gali keisti bakterijų virulentiškumo potencialą reaguojant į aplinkos sąlygas (Eijkelkamp ir kt., 2013). Šią prielaidą paremia ir kitose patogeninėse bakterijose aprašytų H-NS šeimos transkripcijos reguliatorių veikimas, kurie slopino su virulentiškumu susijusius genus (Allsopp ir kt., 2012; Ares ir kt., 2016; Picker ir kt., 2016). *Shigella flexneri* 2457T izoliatai taip pat buvo aptikta konjugacinė plazmidė, kuri kodavo H-NS šeimos transkripcijos reguliatorių, atsakingą už virulentinių genų slopinimą (Navarre ir kt., 2010). Iškelta hipotezė, kad plazmidės įgijimas galėtų būti palankus veiksnys, nes pagerino bakterijų augimą. Mūsų darbe tirtos *A. baumannii*, turinčios pACICU2 tipo plazmidę, taip pat pasižymėjo geresniu augimu LB terpėje. Vis dėlto, pACICU2 *hns* genas, klonuotas į kitą *A. baumannii* plazmidę ir įterptas į hidrofilinį pACICU2 plazmidės neturintį izoliatą, nedarė įtakos jo virulentinėms savybėms, nors geno raiška II-f::pH-NS kamiene buvo patvirtinta RT-PCR metodu (Skerniškytė, duomenys neparodyti). Visiškai atmesti plazmidės koduojamo H-NS reguliatoriaus vaidmens *A. baumannii* patogenezėje negalime, nes reguliatoriaus veikimui gali būti reikalingi kiti pACICU2 koduojami komponentai. pACICU2 tipo plazmidės išlaikymas hidrofobiniuose izoliatuose liudija apie šios plazmidės įtaką *A. baumannii* savybėms.

Visai neseniai buvo nustatyta konjugacinė plazmidė pAB5, kuri reguliavo su virulentiškumu susijusių *A. baumannii* chromosomoje koduojamų genų raišką (Di Venzio ir kt., 2019). Parodyta, kad plazmidė padidino bakterijų gebėjimą plisti kateterių paviršiumi, nors sumažino *A. baumannii* virulentiškumą pelių pneumonijos modelyje. Galima manyti, kad ir pACICU2 tipo plazmidžių palaikymas klinikinės kilmės *A. baumannii* yra palankus bakterijoms plisti ligoninių aplinkoje, nes hidrofobinės ląstelės paviršiaus savybės lemia bakterijų adheziją prie plastiko ir bioplėvelės formavimo fenotipą. Būtent šios savybės leidžia bakterijoms įsitvirtinti ant medicininės įrangos ir tokiu būdu išplisti ligoninėse. Visgi, *A. baumannii*

infekuojant organizmą, ši plazmidė galėtų būti pametama, tokiu atveju bakterijos galėtų persijungti į virulentiškesnę būseną. Atsakyti į klausimą, ar iš tiesų bakterijos linkusios pamesti pACICU2 plazmidę *in vivo* infekcijos sąlygomis, reikalingi papildomi tyrimai. Remiantis NCBI duomenų bazėje esančių *A. baumannii* DNR sekų analize, pACICU2 tipo plazmidė išskirtinai randama tik dalyje IC II klonų *A. baumannii* izoliatų ir jos paplitimas nekoreliuoja su ST tipais. pACICU2 plazmidė koduoja už konjugaciją atsakingus genus. *A. baumannii* izoliatai, turintys šią plazmidę, sintetino plonesnę ląstelės apvalkalo struktūrą, todėl neatmestina prielaida, kad dėl plazmidės genų funkcijų plonėja ląstelės apvalkalo storis ir taip palengvinamos sąlygos bakterinei konjugacijai vykti. Konjugacija yra svarbi bakterijoms dalinantis judriaisiais genomo elementais, kurie koduoja atsparumo antibiotikams ar su virulentiškumu susijusius genus (Leungtongkam ir kt., 2018). Turint omenyje, kad pACICU2 plazmidė paplitusi tik IC II izoliatuose, o šiam klonui priklausantys izoliatai išsiskiria genomo variabilumu lyginant su IC I izoliatais (Eijkelkamp ir kt., 2014), galima manyti, kad pACICU2 plazmidė, palengvindama sąlygas bakterinei konjugacijai vykti, gali prisidėti ir prie *A. baumannii* IC II priklausančių izoliatų genomų variabilumo.

Apibendrinant pirmos dalies tyrimų rezultatus, būtina pabrėžti akivaizdžius virulentinių savybių skirtumus tarp *A. baumannii* IC I ir IC II klonų. IC II izoliatų padidėjęs virulentiškumas koreliavo su hidrofiliškesnėmis bakterijų paviršiaus savybėmis. Pastaruoju metu pasaulio ligoninėse sparčiai plinta IC II *A. baumannii* izoliatai (Kim ir kt., 2017a; Pournaras ir kt., 2017). Manoma, kad tai nulemia šio pandemio klonų išaugęs atsparumas karbapenemams. Visgi negalima atmesti ir IC II izoliatų išskirtinių virulentinių savybių įtakos bakterijų išplitimui, tarp kurių galėtų būti ir pACICU2 tipo plazmidžių pernaša tarp IC II izoliatų.

Šiame darbe atlikta su ląstelės paviršiumi susijusių virulentiškumo veiksmų homologų paieška ir tyrimai suteikė naujos informacijos apie baltymus, kurie gali būti svarbūs *A. baumannii* patogenizei. GltI baltymo, kuris yra *C. jejuni* PebA adhezino homologas, geno delecija sumažino virulentiškumą pelių sepsio modelyje, o tai reiškia baltymo svarbą infekcijos *in vivo* procesui. *C. jejuni* PebA yra aspartatą/glutamata surišantis ABC transporterio baltymas, kuris veikia kaip vienas pagrindinių bakterijų adhezinų sąveikoje su eukariotinėmis ląstelėmis (Pei ir kt., 1998). Leon-Kempis ir kt. (2006) nustatė, kad PebA yra svarbus *C. jejuni* augimui mikroaerobinėmis sąlygomis ir glutamato bei aspartato įsisavinimui. Jie

pasiūlė, kad dvejopa baltymo funkcija (adhezinė ir pernašos) galėtų nulemti PebA mutanto blogesnę išgyvenimą pelės infekcijos modelyje. Mūsų duomenimis *A. baumannii* GltI (PebA homologas) mutantas nepasižymėjo pakitusiomis adhezinėmis savybėmis. Tai gali būti aiškinama tuo, kad nedidelės molekulinės masės adhezinei *ex vivo* sąlygomis yra uždengti *A. baumannii* kapsulės ir nedaro įtakos bakterijų gebėjimui adhezuotis. Tuo tarpu infekuotame organizme tam, kad patogenas galėtų efektyviai adhezuotis prie eukariotinių ląstelių, kapsulės sintezė galėtų būti slopinama, kaip tai buvo parodyta kitose patogeninėse bakterijose (King ir kt., 2015). Tai galėtų paaiškinti, kodėl *A. baumannii* GltI mutantas pasižymėjo sumažėjusiu virulentiškumu tik pelės infekcijos modelyje, tačiau savo adhezinėmis savybėmis nesiskyrė nuo laukinio tipo izoliato *in vitro* sąlygomis.

A. baumannii YgaU yra *E. coli* prie peptidoglikano besijungiančio baltymo homologas. Jį koduojančio geno *A. baumannii* mutanto trūkčiojimo judrumas ir bakterijų titras pelių blužnyse buvo sumažėję, o tai liudija ryšį tarp bakterijų trūkčiojimo judėjimo ir virulentiškumo *in vivo*. Įdomu pastebėti, kad *A. baumannii* genome, spėjame operone kartu su YgaU koduojamas baltymas, kuris yra *B. subtilis* baltymo DprA homologas. DprA, kartu su RecA baltymu, prisijungdamas prie viengrandinės DNR, dalyvauja natūralios transformacijos procese (Duffin ir kt., 2016). Žinant, kad trūkčiojimo fenotipas kartu su IV tipo pilėmis turi įtakos natūralios transformacijos efektyvumui *A. baumannii* (Harding ir kt., 2013), neatmestina prielaida, kad YgaU taip pat galėtų dalyvauti bakterijų natūralios transformacijos procese.

Išorinės membranos baltymas OmpA dalyvauja daugelyje su virulentiškumu siejamų *A. baumannii* fenotipų, pvz. adhezijoje, virulentiškume *in vivo* ir atsparume antibiotikams (Choi ir kt., 2005; Gaddy ir kt., 2009; Kim ir kt., 2009; Smani ir kt., 2014). Mūsų tyrimų duomenys patvirtino šio baltymo esminį vaidmenį *A. baumannii* IC I ir IC II izoliatų patogenezėje. Parodėme, kad OmpA geno išveiklinimas darė reikšmingą poveikį *A. baumannii* sienelės integralumui, augimui bei dalijimuisi abiejų klonų izoliatuose. Taip pat, identifikavome naujas *A. baumannii* Δ ompA mutanto savybes, parodėme, kad OmpA baltymas reikalingas bakterijų trūkčiojimo judrumui ir prisideda prie atsparumo sausoms aplinkos sąlygoms. Darome prielaidą, kad aprašytas daugiafunkcinis poveikis *A. baumannii* fenotipams yra susijęs su OmpA įtaka išorinės membranos stabilumui ir bakterijų dalijimuisi. Panašus poveikis stebėtas tiriant kitus

bakterijų išorinės membranos baltymus, pvz. į OmpA panašius baltymus ar Tol-Pal sistemos komponentus, kurių praradimas taip pat sumažino ląstelės sienelės integralumą ir sutrikdė bakterijų dalijimąsi (Clavel ir kt., 2002; Robertson ir kt., 2014; Egan, 2018). Manoma, kad šie baltymai kartu su Lpp lipoproteinais sąveikaudami su peptidoglikanu yra atsakingi už išorinės membranos stabilumo palaikymą (Wojdyla ir kt., 2015). Buvo pasiūlytas mechanizmas, kuriuo remiantis *A. baumannii* OmpA baltymo sąveika su peptidoglikanu stabilizuoja išorinę membraną (Samsudin ir kt., 2016). Yra ir daugiau duomenių, liudijančių OmpA homologų svarbą bakterijoms. Acidofilinėse bakterijose *Acidithiobacillus ferrooxidans* OmpA baltymo homologas išorinėje bakterijos membranoje nustatytas auginant kultūras tik aukštesnėje nei 40 °C temperatūroje (Manchur ir kt., 2011), o tai rodo baltymo svarbą išlaikant išorinės membranos stabilumą stresinėmis sąlygomis. *Caulobacter crescentus* bakterijose pastebėta OmpA homologo poliarizacija ląstelių dalijimosi metu (Ginez ir kt., 2014), rodanti baltymo funkciją bakterijų dalijimesi, kurio mechanizmas nėra detalai išaiškintas (Boes ir kt., 2018).

Šiame darbe *ompA*_{D268A} ir *ompA*_{R283A} mutantų tyrimais parodėme, kad sąveika tarp periplazminio OmpA domeno ir peptidoglikano yra būtina normaliam *A. baumannii* dalijimuisi, taip pat viso spektro virulentinių savybių pasireiškimui. Todėl kyla klausimas, ar iki šiol pagrindiniu *A. baumannii* virulentiškumo veiksniumi laikytas OmpA baltymas iš tiesų gali būti tiesiogiai siejamas su bakterijų patogeneze, ar jo daugiafunkcinis efektas virulentišumui yra sutrikusios bakterijų biogenezės pasekmė?

Visgi, yra duomenų, liudijančių ir tiesioginį OmpA baltymo ryšį su infekuotų eukariotinių ląstelių apoptoze aktyvinant kaspazių signalinį kelią, taip pat parodytas šio baltymo patekimas į ląstelės branduolį ir mitochondrijas (Choi ir kt., 2008; Lee ir kt., 2010; Rumbo ir kt., 2014). Siūloma, kad OmpA baltymas į eukariotinės ląstelės vidų galėtų būti pernešamas *A. baumannii* išorinės membranos pūslelėmis. Mūsų duomenimis, pūslelės, išskirtos iš *A. baumannii* Δ *ompA* mutanto, blogiau stimuliuo pelių makrofagų J774 uždegiminį atsaką nei laukinio tipo kamienas su funkcionaliū OmpA, apie ką spręsta iš uždegiminių citokinų TNF- α , IL-1b ir IL-6 raiškos lygio sumažėjimo (S2 pav., Priedai). Taigi, galima manyti, kad OmpA baltymas yra uždegiminį atsaką stimuliuojantis veiksnys.

OmpA sąsajų su išorinės membranos pūslelėmis yra ir daugiau. Parodyta, kad išorinės membranos nestabilumas, atsiradęs dėl sutrikusios peptidoglikano ar lipopolisacharidų sintezės, sąlygojo padidėjusią OMV

gamybą *Salmonella enterica* bakterijose (Nevermann ir kt., 2019). Šiame darbe parodėme, kad *A. baumannii* $\Delta ompA$ mutantas taip pat sintetino ~2 kartus daugiau pūslelių. Nustatyta, kad bakterijų išorinės membranos pūslelių gamyba indukuojama, kai augimo terpėje yra antibiotikų (Agarwal ir kt., 2019). Pūslelės, išskirtos iš daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčių *E. coli*, gebėjo inaktyvuoti β -laktamus (Kim ir kt., 2018). Atsparios bakterijos išorinės membranos pūslelėse „supakuoja“ antibiotikus išaktyvinančius fermentus, pvz. β -laktamazės (Jan, 2017). Atrankiems porinams pernešus antibiotiką į pūslelę, ten jį hidrolizuoja atitinkami fermentai. Neseniai parodyta, kad *A. baumannii* OmpA baltymas funkcionuoja kaip β -laktamų porinas (Iyer ir kt., 2018). Šiame darbe nustatytas pūslelių su OmpA geresnis gebėjimas išaktyvinti augimo terpėje esantį ampiciliną. *A. baumannii* pūslelės, neturinčios OmpA, visiškai neprarado gebėjimo neutralizuoti antibiotiką, nors procesas tapo lėtesnis. Tai liudija, kad *A. baumannii* pūslelės turi ir kitų antibiotikus pernešančių porinų. Lyginant pūslelių baltymų profilius NDS-PAGE, mūsų dėmesį atkreipė ~ 27 kDa baltymo indukcija pūslelėse, kurias gamina $\Delta ompA$ bakterijos. Proteomine analize baltymas buvo identifikuotas kaip išorinės membranos nešiklis CarO (Skerniškytė, duomenys neparodyti). Žinoma, kad *A. baumannii* CarO dalyvauja β -laktamų pernašoje (Catel-Ferreira ir kt., 2011; Wu ir kt., 2016a). Todėl manome, kad nesant OmpA, antibiotikų patekimą į pūsleles iš dalies galėtų kompensuoti CarO baltymo inkorporavimas į membraną.

Išveiklinus *A. baumannii* OmpA baltymo periplazminį C domeną buvo nustatytas padidėjęs jautrumas keletui skirtingų antibiotikų (Kwon ir kt., 2017). Taip pat Wu ir kt. (2016a) identifikavo nekovalentinę sąveiką tarp OmpA baltymo ir OXA-23 β -laktamazės. Mushtaq ir kt. (2017) *in vitro* sąlygomis parodė, kad *A. baumannii* OmpA baltymo periplazminis domenas įgauna pilnai funkcionalią būseną tik sąveikoje su ligandu (peptidoglikanu). Visgi, remiantis mūsų tyrimo duomenimis priešingai nei *A. baumannii* virulentinėms savybėms, OmpA baltymo sąveika su peptidoglikanu neturėjo įtakos OMV gebėjimui inaktyvuoti ampiciliną. Tai rodo, kad būtent OmpA baltymo membraninis β -statinės N domenas yra atsakingas už ampicilino patekimą į pūsleles.

OmpA baltymą koduojančiam genui būdingas alelinis polimorfizmas; nustatyta akivaizdi sąsaja tarp geno varianto ir *A. baumannii* priklausymo konkrečiam pandeminiam klonui. Sekų skirtumai, lyginant alelius iš skirtingų IC, nustatyti baltymo β -statinės domeno išoriniuose linkiuose. Polimorfizmas išorinės membranos baltymų linkiuose parodytas ir kai kuriose kitose patogeninėse bakterijose (Wu ir kt., 2016b; Hua ir kt., 2017), pvz. *C. jejuni*, parodyta, kad vieną iš gausiausių išorinės membranos baltymą

PorA koduojantys skirtingi geno aleliai daro skirtingą įtaką virulentinėms savybėms *in vivo*. Tuo tarpu *A. baumannii ompA* alelių įtaka IC I ir IC II klonų bakterijų patogenizei nesiskyrė, todėl darome prielaidą, kad OmpA variabilumas galėtų lemti kitas, su virulentiškumu nesusijusias savybes, pvz. atsparumą bakteriofagams, kas parodyta *E. coli* OmpA baltymo atveju (Smith ir kt., 2007b).

Priešingai nei kapsulės „uždengiami“ maži adhezinais, didelės molekulinės masės baltymas Blp1 turėtų prasiskverbti pro egzopolisacharidų sluoksnį, tokiu būdu sustiprindamas *A. baumannii* adhezinės savybes net ir kapsuliuotose bakterijose. Šią prielaidą patvirtino disertacijos tyrimų metu gauti duomenys: *blp1* delecinis mutantas formavo pakitusios struktūros bioplėvelę, prasčiau adhezavosi prie eukariotinių ląstelių ir pasižymėjo susilpnėjusiu virulentiškumu *in vivo* infekcijos modeliuose.

A. baumannii Blp1 baltymas priklauso RTX domeną turintiems baltymams. RTX toksinų superšeimai priklauso įvairios funkcijos baltymai, pvz., citotoksinai ar adhezinais (Linhartová ir kt., 2010). Nors Blp1 lokalizacija ląstelėje nėra žinoma, TISS sekrecijos sistemos atpažinimo seka baltymo C-gale liudija, kad jis turėtų būti išnešamas į ląstelės išorę. Tokią prielaidą paremia artimos *A. baumannii* rūšies – *A. nosocomialis* Blp1 homologas, (36 % aminorūgščių sekos panašumas į *A. baumannii* Blp1), parodyta užląstelinė išnaša (Harding ir kt., 2017). Struktūrinių homologų paieškos metu, naudojant Swiss-Model įrankį pavyko nustatyti didelės molekulinės masės bakterijų adhezinus, pasižyminčius panašumu į *A. baumannii* Blp1 – SiiE iš *Salmonella enterica* ir MpIBP iš *Marinomonas primoryensis*. Pasiūlyta, kad SiiE adhezinai tvirtinasi ant bakterijos paviršiaus N-galu (Griessl ir kt. 2013). Panašiai elgiasi ir MpIBP, kurio N-galiniam domenui priskirtas inkaro, leidžiančio didelės molekulinės masės baltymui įsitvirtinti išorinėje membranoje, vaidmuo (Guo ir kt., 2017). *In silico* analizės metu nustatėme trumpą (120-137 aminorūgštys) α -spiralės transmembraninį fragmentą Blp1 baltymo N-gale, kuris galėtų įtvirtinti baltymą bakterijos išorinėje membranoje, panašiai kaip aprašyti SiiE ir MpIBP adhezinų atvejais. Tuo tarpu Blp1 C-galiniame domene nenustatyta jokių su adhezija susijusių sekų motyvų, kitaip, nei, pvz. adhezino MpIBP atveju. Vis dėlto mūsų gauti duomenys apie fenotipą, susijusį su adhezija, pokyčius $\Delta blp1$ mutante liudija, kad Blp1 baltymas yra *A. baumannii* funkcionalus adhezinai.

A. baumannii blp1 genui, kaip ir *ompA*, yra būdingas polimorfizmas. Priešingai nei OmpA tyrimų metu, skirtingų geno variantų reikšmė su

virulentiškumu siejamiems fenotipams buvo skirtinga. Blp1 netekimas IC I klonu izoliuotose sutrikdė bioplėvelės struktūrą bei adheziją prie eukariotinių ląstelių, o IC II klonu izoliuotose šioms virulentinėms savybėms geno delecija įtakos neturėjo. IC I mutanto bioplėvelės pokyčiai buvo panašūs į fenotipą, stebėtą IC I izoliuoto AB307-0294 mutante, neturinčiame kito didelės molekulinės masės adhezino – Bap (Loehfelm ir kt., 2008). IC I klonu *Δblp1* mutanto bioplėvelės struktūros pokyčiai, stebimi struktūros formavimosi pradžioje, galėtų liudyti sutrikusį bioplėvelės brendimo procesą, nulemtą sekretuojamų veiksnių, svarbių bioplėvelės struktūrai palaikyti, trūkumo. Kadangi *Δblp1* mutantinio kamieno formuojamoje bioplėvelėje buvo nustatytas padidėjęs PI dažų kaupiančių ląstelių kiekis, galima manyti, kad Blp1 praradimas galėjo paskatinti užląstelinės DNR sekreciją, bioplėvelėje veikiančią kaip struktūrą sutvirtinanti medžiaga (Vorkapic ir kt., 2015), kuri turėtų kompensuoti Blp1 poveikį.

Komplementavus IC I mutantą tiek nuosavu geno aleliu, tiek IC II izoliuotose aptinkamu geno variantu, bioplėvelės struktūra ir adhezija prie eukariotinių ląstelių buvo atstatoma, o tai rodo abiejų alelių funkcionalumą. Tai, kad IC II izoliuotose Blp1 netekimas neturėjo įtakos bioplėvelės fenotipui ir adhezinėms savybėms, liudija, kad pasitelkiami kiti nežinomi veiksniai, kompensuojantys Blp1 funkciją.

Funkcionalus Blp1 baltymas yra reikalingas IC I ir IC II klonų infekcijai *in vivo*, o izoliatų virulentiškumas yra griežtai susijęs su natyviais *blp1* genų aleliais, tai ypač būdinga IC I klonui, kur virulentiškumui *in vivo* reikėjo nuosavo *blp1* (taip pat ir *ompA* geno) alelio. Tokio fenomeno priežastys nėra aiškios. IC II klonu *A. baumannii* genomai, lyginant su IC I, išsiskiria sekų variabilumu, dažnai koduoja naujus genus ar jų variantus (Imperi ir kt., 2011; Snitkin ir kt., 2011; Eijkelkamp ir kt., 2014). Galima manyti, kad IC II klonu izoliatų genomo variabilumas, bet ne konkrečių baltymų su labiau išreikštomis virulentinėmis savybėmis išvystymas, gali būti priežastis, lemianti IC II izoliatų išplitimą (Kim ir kt., 2017a; Pournaras ir kt., 2017).

Tarp naujų gydymo strategijų prieš DAA *A. baumannii* sukeltas infekcijas vakcinų vystymas teikia daugiausia vilčių (Ahmad ir kt., 2016; Dickey ir kt., 2017). Tinkamas kandidatas vakcinai turėtų būti į ląstelės išorę eksponuotas, plačiai paplitęs ir turintis konservatyvią aminorūgščių seką antigenas. Dauguma klinikinių *A. baumannii* sintetina egzopolisacharidinę kapsulę, todėl kapsulės polisacharidai galėtų būti naudojami kaip antigenai imunizacijai. Tokių antigenų efektyvumas yra pademonstruotas (Bentancor

ir kt., 2012b; Russo ir kt., 2013). Problema yra ta, kad *A. baumannii* pasižymi dideliu sintetinamų kapsulės polisacharidų variabilumu (Hu ir kt., 2013) ir sacharidinės kilmės vakcinos yra efektyvios tik prieš nedidelę dalį *A. baumannii* izoliatų, šiandien cirkuliuojančių pasaulio ligoninėse. Be to, kitaip nei baltyminiai antigenai, polisacharidinės grupės negali aktyvinti atminties ląstelių (Colombo ir kt., 2018), todėl sprendžiant šią problemą, kuriamos su bakteriniu toksinu konjuguotos vakcinos, o tai gerokai apsunkina gamybos procesą. Kaip galimi vakcinų prieš *A. baumannii* kandidatai testuojami ir išaktyvinti *A. baumannii* lizatai bei bakterijų gaminamos išorinės membranos pūslelės (McConnell ir Pachón, 2010; Huang ir kt., 2014b; KuoLee ir kt., 2014). Vis dėlto, išgryninti baltymai yra tinkamesni kandidatai vakcinoms dėl saugumo sumetimų, nes žmogaus imuninė sistema yra ypač jautri bakterinės kilmės lipopolisacharidams ar lipooligosacharidams (Colombo ir kt., 2018). Iki šiol yra pasiūlyti keli *A. baumannii* baltymai, kaip galimi kandidatai vakcinoms, daugiausiai išorinės membranos komponentai, pvz. OmpW ir FilF (Huang ir kt., 2016; Singh ir kt., 2016; Zhang ir kt., 2016). Dėl jau aprašytos *A. baumannii* savybės sintetinti egzopolisacharidinę kapsulę, kuri dengia daugumą bakterijų paviršiaus antigenų, šie baltymai kelia pagrįstų abejonių dėl jų efektyvumo klinikoje. Todėl didelės molekulinės masės paviršiaus baltymai, kurie gali prasiskverbti pro kapsulės polisacharidų sluoksnį, turėtų pasižymėti geresniu efektyvumu kaip vakcinų antigenai (Badmasti ir kt., 2015).

A. baumannii Blp1 yra didelės molekulinės masės, adhezinėmis savybėmis pasižymintis baltymas. Blp1 dydis ir stuktūrinės savybės leidžia manyti, kad šis adhezinas galėtų prasiskverbti per *A. baumannii* kapsulę, kuri, mūsų atliktos TEM analizės duomenimis, galėtų būti ~ 30-80 nm storio. Blp1 C-galinis domenas turi konservatyvų 160 aminorūgščių motyvą, kuris būdingas klinikoje labiausiai paplitusių IC I ir IC II klonų *A. baumannii* sintetinamų baltymų variantams. Būtent dėl į išorę eksponuojamos dalies konservatyvumo ir gebėjimo prasiskverbti pro klinikinių *A. baumannii* kapsulės sluoksnį Blp1 baltymas yra pranašesnis vakcinos kandidatas lyginant su iki šiol pasiūlytais (Huang ir kt., 2016; Singh ir kt., 2016; Zhang ir kt., 2016). BALB/c pelių imunizacijos tyrimais parodėme, kad Blp1 baltymo C-galinis domenas gebėjo aktyvinti įgyto imuniteto komponentus taikant aktyvią vakcinaciją, o pelių išgyvenamumo rodikliai buvo geresni nei *A. baumannii* OmpA baltymo, kuris jau yra išbandytas kaip antigenas vakcinai (Lin ir kt., 2013). Taikant pasyvią vakcinaciją Blp1-antiserumu vakcinuotų gyvūnų išgyvenamumas, juos

infekavus *A. baumannii*, buvo 100 %. Nėgama to, serumo indukuotos opsofagocitozės tyrimais parodėme, kad Blp1-antiserumas vienodai efektyviai skatino makrofagų fagocitozę prieš klinikoje paplitusius DAA *A. baumannii* izoliatus, priklausančius IC I ir IC II. Taigi, tyrimų metu identifikavome Blp1 C-galinį fragmentą kaip efektyvų vakcinos kandidatą tiek aktyviai, tiek pasyviai vakcinacijoms naudojant pelių infekcijos modelį.

Apibendrinant galima teigti, kad IC I ir IC II klonų *A. baumannii* yra išvysčiusios skirtingus virulentiškumo mechanizmus, lemiančius šių bakterijų išplitimą pasaulio ligoninėse. Parodėme OmpA, Blp1, YgaU ir GltI virulentinių veiksnių svarbą klinikinės kilmės *A. baumannii* patogenezėje. Blp1 baltymo C-galinis domenas yra potencialus vakcinos kandidatas prieš dauginiu atsparumu pasižyminčias IC I ir IC II klonų *A. baumannii*.

IŠVADOS

1. *A. baumannii* pandeminių klonų izoliatai pasižymi skirtingomis virulentinėmis savybėmis;
2. Ląstelės paviršiaus hidrofiliškumas lemia padidėjusį *A. baumannii* virulentiškumą, tačiau nėra palanki savybė klinikinių izolatų išplitimui;
3. *A. baumannii* OmpA, Blp1, YgaU ir GltI baltymai yra identifikuoti kaip virulentiškumo veiksniai *ex vivo* ir *in vivo*;
4. *A. baumannii* OmpA baltymo periplazminio domeno sąveika su peptidoglikanu lemia daugiafunkcinį baltymo vaidmenį bakterijų patogenezėje;
5. Blp1 baltymo C-galinis fragmentas yra efektyvus antigenas taikant aktyvią imunizaciją, o Blp1-antiserumas apsaugo nuo *A. baumannii* infekcijos taikant pasyvią imunizaciją.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

- **Skerniškytė J**, Karazijaitė E, Deschamps J, Krasauskas R, Briandet R, Sužiedėlienė E. (2019). The Mutation of Conservative Asp268 Residue in the Peptidoglycan-Associated Domain of the OmpA Protein Affects Multiple *Acinetobacter baumannii* Virulence Characteristics. *Molecules*. **24**:1972;
- **Skerniškytė J**, Krasauskas R, Péchoux C, Kulakauskas S, Armalytė J, Sužiedėlienė E. (2019). Surface-Related Features and Virulence Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to International Clones I and II. *Front Microbiol*. **9**:3116.

Konferencijos tezės

Stendiniai pranešimai

- **Skerniškytė J**, Krasauskas R, Sužiedėlienė E. “Characterization of Blp1 adhesin as vaccine candidate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*”, 12th Symposium on the Biology of *Acinetobacter* (*Acinetobacter2019*), 2019 09 4-6, Frankfurtas, Vokietija;
- Karazijaitė E, **Skerniškytė J**, Sužiedėlienė E. “Isolation and Characterization of Outer Membrane Vesicles from Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*”, *The Coins 2019*, 2019 02 26-28, Vilnius, Lietuva;
- **Skerniškytė J**, Karazijaitė E, Deschamps J, Briandet R, Péchoux C, Kulakauskas S, Krasauskas R, Armalytė J, Sužiedėlienė E. “The impact of putative virulence genes on pathogenicity displayed by clinical *Acinetobacter baumannii* strains”, *7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017)*, 2017 07 9-13, Valencija, Ispanija;
- **Skerniškytė J**, Krasauskas K, Armalytė J, Sužiedėlienė E. “Distribution of putative virulence factors in *Acinetobacter baumannii* clinical strains isolated from Lithuanian hospitals and their impact on pathogenesis”, *XIV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society*, 2016 06 28-30, Druskininkai, Lietuva.

Žodiniai pranešimai

- **Skerniškytė J**, Sužiedėlienė E. “Blp1 protein as new vaccine candidate against infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*”.

26th Young Research Fellows Meeting (French Medical Chemistry Society), 2019 02 20-22, Paryžius, Prancūzija;

- **Skerniškytė J**, Karazijaitė E, Krasauskas R, Armalytė J, Sužiedėlienė E. “Potencialių virulentinių genų svarba klinikinių *Acinetobacter baumannii* padermių patogenezei”, 10-oji jaunųjų mokslininkų konferencija “*Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos*”, 2017 12 07, Vilnius, Lietuva.

Finansinė parama

Dalį disertacijoje pristatomų tyrimų finansavo Lietuvos mokslo taryba pagal projektą 09.3.3.-LMT-K-712-10-0095.

Ersamus+ finansavo 3 mėnesių stažuotę Micalis institute, Prancūzijoje.

Europos mikrobiologų draugijų federacija (FEMS) dalinai finansavo dalyvavimą konferencijose „7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017)“ ir „12th Symposium on the Biology of *Acinetobacter* (Acinetobacter2019)“.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei prof. dr. Editai Sužiedėlienei už suteiktą galimybę atlikti tyrimus molekulinės biologijos laboratorijoje bakterijų patogenezės srityje, taip pat už vertingas diskusijas ir pastabas, kantrybę bei nuoširdų rūpestį viso vadovavimo metu ir pagalbą rašant šį darbą.

Esu dėkinga savo kolegoms dr. Julijai Armalytei ir Renatui Krasauskui už praktinius patarimus bei įkvepiančias diskusijas. Didelis ačiū Renatui Krasauskui už pagalbą analizuojant genomų sekoskaitos rezultatus, bakterijų judėjimo ir pelikulės formavimo eksperimentų metu ir įvairiomis kitomis laboratorijos gyvenimo akimirkomis. Taip pat už pagalbą dėkoju studentėms Emilijai Karazijaitei, Gabijai Lauciūtei ir Gabijai Goptaitytei.

Dėkoju visam nuostabiam Biochemijos ir Molekulinės biologijos katedros kolektyvui už įvairiapusę pagalbą ir palaikymą.

Nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Nomedai Kuisienei ir dr. Mildai Plečkaitytei už atidų disertacijos juodraščio perskaitymą, vertingas įžvalgas bei komentarus.

Noriu padėkoti prof. dr. Kęstučiui Sužiedėliui, prof. dr. Aurelijai Žvirblienei ir dr. Aušrai Sasnauskienei už konsultacijas eukariotinių ląstelių kultivavimo klausimais, dr. Martinai Rudgalvytei esu dėkinga už konsultacijas nematodų auginimo klausimais. Labai dėkoju dr. Virginijai Bukelskienei ir Ievai Rinkūnaitei už konsultacijas ir pagalbą dirbant su pelėmis, prof. dr. Rolandui Meškiui esu dėkinga už suteiktą *E. coli* kamieną. Dėkoju dr. Audriui Gegeckui už *Bacillus* spp. kamieną. Taip pat noriu padėkoti Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriui ir dr. Justui Lazutkai už galimybę vaizdinti išorinės membranos pūsleles transmisijos elektroninės mikroskopijos būdu. Dėkoju Proteomikos centrui (VU Biochemijos institutas) už proteominę analizę.

Nuoširdžiai dėkoju įmonei „Thermo Fisher Scientific“ už atliktą *A. baumannii* genomų sekoskaitą.

Taip pat norėčiau padėkoti nuostabiam Micalis instituto kolektyvui, ypatingai dr. Sauliui Kulakauskui už rūpestį ir pagalbą.

Labai dėkoju Mildai Zilnytei ir Indrei Dalgėdienei už turiningas diskusijas.

Galiausiai noriu padėkoti visai savo šeimai už rūpestį ir ypatingai dėkoju Vytautui Petkevičiui, kurio nuolatinis palaikymas suteikė jėgų visos šios kelionės metu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR ir kt. (2009). Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3628–3634.
2. Agarwal B, Karthikeyan R, Gayathri P, RameshBabu B, Ahmed G, Jagannadham MV. (2019). Studies on the mechanism of multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* by proteomic analysis of the outer membrane vesicles of the bacterium. *J Proteins Proteom.* 10(1), 1–15.
3. Ahmad TA, Tawfik DM, Sheweita SA, Haroun M, El-Sayed LH. (2016). Development of immunization trials against *Acinetobacter baumannii*. *Trials in Vaccinology.* 5:53-60.
4. Allsopp LP, Beloin C, Ulett GC, Valle J, Totsika M, Sherlock O ir kt. (2012). Molecular characterization of UpaB and UpaC, two new autotransporter proteins of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infection and immunity.* 80(1), 321–32.
5. Alsan M, Klompas M. (2010). *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. *JCOM.* 17(8), 363-369.
6. Amudhan SM, Sekar U, Arunagiri K, Sekar B. (2011). OXA beta-lactamase-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol.* 29(3):269-74.
7. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis.* 71:292–301.
8. Aranda J, Bardina C, Beceiro A, Rumbo S, Cabral MP, Barbe J ir kt. (2011). *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J. Bacteriol.* 193:3740–3747.
9. Ares MA, Fernández-Vázquez JL, Rosales-Reyes R, Jarillo-Quijada MD, von Bargen K, Torres J ir kt. (2016). H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Front Cell Infect Mi.* 6:13.
10. Armitano J, Méjean V, Jourlin-Castelli C. (2014). Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ Microbiol Rep.* 6(6):534-44.
11. Arrigucci R, Pozzi G. (2017). Identification of the chain-dispersing peptidoglycan hydrolase LytB of *Streptococcus gordonii*. *PloS one.* 12(4), e0176117.
12. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and drug resistance.* 11:1249-1260.
13. Badmasti F, Ajdary S, Bouzari S, Fooladi AA, Shahcheraghi F, Siadat SD. (2015). Immunological evaluation of OMV(PagL)+Bap(1-487aa) and AbOmpA(8-346aa)+Bap(1-487aa) as vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* sepsis infection. *Mol Immunol.* 67(2 Pt B):552-8.
14. Bentancor LV, Routray A, Bozkurt-Guzel C, Camacho-Peiro A, Pier GB, Maira-Litran T. (2012a). Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect. Immun.* 80:3381–3388.

15. Bentancor LV, O'Malley JM, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litrán T. (2012b). Poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine is a target for protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect Immun.* 80(2):651-6.
16. Bernal-Cabas M, Ayala JA, Raivio TL. (2015). The Cpx envelope stress response modifies peptidoglycan cross-linking via the L,D-transpeptidase LdtD and the novel protein YgaU. *J Bacteriol.* 197(3):603-14.
17. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulas X, Cerqueira GM, Schulze KE ir kt. (2016). *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113:9599–9604.
18. Bist P, Dikshit N, Koh TH, Mortellaro A, Tan TT, Sukumaran B. (2014). The Nod1, Nod2, and Rip2 axis contributes to host immune defense against intracellular *Acinetobacter baumannii* infection. *Infect Immun.* 82(3):1112–22.
19. Blackwell GA, Hamidian M, Hall RM. (2016). IncM plasmid R1215 is the source of chromosomally located regions containing multiple antibiotic resistance genes in the globally disseminated *Acinetobacter baumannii* GC1 and GC2 clones. *mSphere* 1:e00117-16.
20. Bodelon G, Palomino C, Fernández LÁ. (2013). Immunoglobulin domains in *Escherichia coli* and other enterobacteria: from pathogenesis to applications in antibody technologies. *FEMS Microbiol Rev.* 37: 204-250.
21. Boes A, Olatunji S, Breukink E, Terrak M. (2019). Regulation of the peptidoglycan polymerase activity of PBP1b by antagonist actions of the core divisome proteins FtsBLQ and FtsN. *mBio.* 10:e01912-18.
22. Boinett CJ, Cain AK, Hawkey J, Do Hoang NT, Khanh NNT, Thanh DP ir kt. (2019). Clinical and laboratory-induced colistin-resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom.*
23. Boll JM, Tucker TA, Klein DR, Beltran AM, Brodbelt JS, Davies Bw ir kt. (2015). Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *mBio.* 6, e00478-15.
24. Bravo Z, Orruño M, Parada C, Kaberdin VR, Barcina I, Arana I. (2016). The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Arch Microbiol.* 198(5):399-407.
25. Bräuning B, Bertosin E, Praetorius F, Ihling C, Schatt A, Adler A, Richter K, Sinz A, Dietz H, Groll M. (2018). Structure and mechanism of the two-component α -helical pore-forming toxin YaxAB. *Nat Commun.* 9(1):1806.
26. Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetic.* 77: 71–94;
27. Breslow JM, Meissler JJ Jr, Hartzell RR, Spence PB, Truant A, Gaughan J ir kt. (2011). Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infect Immun.* 79:3317–27.
28. Brown SP, Cornforth DM, Mideo N. (2012). Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends in microbiology.* 20(7):336-42.
29. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog.* 6:e1000834.

30. Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson RS, Jr. (2013). *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. PLoS ONE. 8:e59388.
31. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A, Jouenne T, Dé E. (2011). Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 66(9):2053-6.
32. Cerqueira GM, Kostoulas X, Khoo C, Aibinu I, Qu Y, Traven A ir kt. (2014). A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. J. Infect. Dis. 210:46–55.
33. Chabane YN, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardoun J, Lesouhaitier O ir kt. (2014). Characterisation of Pellicles Formed by *Acinetobacter baumannii* at the Air-Liquid Interface. PLoS One. 9(10):e111660.
34. Chen A, Seifert HS. (2011). Interactions with Host Cells Causes *Neisseria meningitidis* Pili to Become Unglued. Front Microbiol. 2:66.
35. Chiang SR, Jung F, Tang HJ, Chen CH, Chen CC, Chou HY, Chuang YC. (2018). Desiccation and ethanol resistances of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* embedded in biofilm: The favorable antiseptic efficacy of combination chlorhexidine gluconate and ethanol. J Microbiol Immunol Infect. 51(6):770-777.
36. Chiang, M.C., Kuo, S.C., Chen, Y.C., Lee, Y.T., Chen, T.L., Fung, C.P. (2011). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. J Microbiol Immunol Infect. 44(2):106-10.
37. Chin CY, Tipton KA, Farokhyar M, Burd EM, Weiss DS, Rather PN. (2018). A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii*. Nat Microbiol. 3(5):563-569.
38. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, Chae JP, Yoo SM, Lee JC. (2008). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. Cell Microbiol. 10(2):309-19.
39. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH ir kt. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol. 7(8):1127-38.
40. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. (2016). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. Current microbiology. 74(2):277-283.
41. Clavel T, Germon P, Vianney A, Portalier R, Lazzaroni JC. (2002). TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. Mol Microbiol. 29(1):359-67.
42. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. (2011). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiology. 157:2534–2544.
43. Colombo C, Pitirollo O, Lay L. (2018). Recent Advances in the Synthesis of Glycoconjugates for Vaccine Development. Molecules. 23(7). pii:E1712.
44. Confer AW, Ayalew S. (2013). The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. Vet Microbiol. 163(3-4):207-22.
45. Da Silva GJ, Domingues S. (2017). Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. Antibiotics. 6(4). pii:E28.
46. Dahdouh E, Gómez-Gil R, Pacho S, Mingorance J, Daoud Z, Suárez M. (2017). Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical

- Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. PLoS ONE. 12(4):e0176824.
47. Dams-Kozłowska H, Kaplan DL. (2007). Protein engineering of *wzc* to generate new emulsan analogs. Appl Environ Microbiol. 73(12):4020-4028.
 48. D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, GRAB, Ballardini M, Bartolini S et al. (2009). Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). Clin Microbiol Infect. 15(4):347-57.
 49. De Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, Actis L, Nibbering P, Dijkshoorn L. (2009). CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. Res Microbiol. 160(3):213-8.
 50. De Gregorio E, Del Franco M, Martinucci M, Roschetto E, Zarrilli R, Di Nocera, PP. (2015). Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. BMC genomics. 16:933.
 51. Defraigne V, Schuermans J, Grymonprez B, Govers SK, Aertsen A, Fauvart M et al. (2016). Efficacy of artilysin Art-175 against resistant and persistent *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 60:3480–3488.
 52. Di Venzio G, Flores-Mireles AL, Calix JJ, Haurat MF, Scott NE, Palmer LD et al. (2019). Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. Nat Commun. 10(1):2763.
 53. Diacovich L, Gorvel JP. (2010). Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. Nat Rev Microbiol. 8(2):117-28.
 54. Dickey SW, Cheung GYC, Otto M. (2017). Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. Nat Rev Drug Discov. 16(7):457-471.
 55. Doi Y, Murray GL, Peleg AY. (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. Semin. Respir. Crit. Care Med. 36:85–98.
 56. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. (2014). CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 52:2359–2364.
 57. Duffin PM, Barber DA. (2016). DprA is required for natural transformation and affects pilin variation in *Neisseria gonorrhoeae*. Microbiology. 162(9):1620-1628.
 58. Egan AJF. (2018). Bacterial outer membrane constriction. Mol Microbiol. 107(6):676-687.
 59. Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS Microbiol Lett. 323(1):44-51.
 60. Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Elbourne LD, Paulsen IT, Brown MH. (2013). H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. Infect Immun. 81(7):2574-83.
 61. Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. (2014). Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. BMC Genomics. 15:1020.

62. Elder KD, Harvill ET. (2004). Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun.* 72(10):5919-24.
63. Elhosseiny NM, Amin MA, Yassin AS, Attia AS. (2015). *Acinetobacter baumannii* universal stress protein A plays a pivotal role in stress response and is essential for pneumonia and sepsis pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 305:114–123.
64. Elhosseiny NM, El-Tayeb OM, Yassin AS, Lory S, Attia AS. (2016). The secretome of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 type II secretion system reveals a novel plasmid encoded phospholipase that could be implicated in lung colonization. *Int. J. Med. Microbiol.* 306:633–641.
65. Ermolaeva MA, Schumacher B. (2014). Insights from the worm: The *C. elegans* model for innate immunity. *Seminars in immunology.* 26(4):303-309.
66. Fajardo Bonin R, Chapeaurouge A, Perales J, da Silva JG Jr, do Nascimento HJ, D'Alincourt Carvalho Assef AP ir kt. (2014). Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *Proteomics Clin Appl.* 8(11–12):916–23.
67. Feng Z, Jia X, Adams MD, Ghosh SK, Bonomo RA, Weinberg A. (2014). Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infect Immun.* 82(11):4458–65.
68. Fernandez-Cuenca F, Smani Y, Gomez-Sanchez MC, Docobo-Perez F, Caballero-Moyano FJ, Dominguez-Herrera J ir kt. (2011). Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38:548–549.
69. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV ir kt. (2016). Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE.* 11:e0167068.
70. Fournier PE, Vallenet V, Berbe S, ir kt. (2006). Comparative genomes of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2:e7.
71. Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia CP, Campagnari Bueno MF, Camargo CH, Magri AS, ir kt. (2016). Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 22:352–358.
72. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. (2012). Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect. Immun.* 80:1015–1024.
73. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun.* 77(8):3150-60.
74. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G. (2014). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 13(2):460-76.

75. García-Patiño MG, García-Contreras R, Licona-Limón P. The Immune Response against *Acinetobacter baumannii*, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. *Front Immunol.* 2017 Apr 12;8:441.
76. Garcia-Quintanilla M, Pulido MR, Lopez-Rojas R, Pachon J, McConnell MJ. (2013). Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol.* 21:157–163.
77. Garg N, Singh R, Shukla G, Capalash N, Sharma P. (2016). Immunoprotective potential of in silico predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. *Int J Med Microbiol.* 306:1–9.
78. Gebhardt MJ, Gallagher LA, Jacobson RK, Usacheva EA, Peterson LR, Zurawski DV et al. (2015). Joint transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. *Mbio.* 6, e01660–15.
79. Geisinger E, Isberg RR. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 11(2):e1004691.
80. Ghosh M, Miller PA, Möllmann U, Claypool WD, Schroeder VA, Wolter WR et al. (2017). Targeted Antibiotic Delivery: Selective Siderophore Conjugation with Daptomycin Confers Potent Activity against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Both in Vitro and in Vivo. *J Med Chem.* 60(11):4577–4583.
81. Giammanco A, Calà C, Fasciana T, Dowzicky MJ. (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(1). pii: e00310-16.
82. Giles SK, Stroehrer UH, Eijkelkamp BA, Brown MH. (2015). Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 15:116.
83. Ginez LD, Osorio A, Poggio S. (2014). Localization of the outer membrane protein OmpA2 in *Caulobacter crescentus* depends on the position of the gene in the chromosome. *J Bacteriol.* 196(15):2889–2900.
84. Glew RH, Moellering RC Jr, Kunz LJ. (1977). Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): clinical and laboratory studies. *Medicine (Baltimore)* 56:79–97.
85. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, Tsakris A. (2011). Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09). *J Antimicrob Chemother.* 66(12):2767–72.
86. Greene C, Wu J, Rickard AH, Xi C. (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol.* 63(4):233–9.
87. Griessl MH, Schmid B, Kassler K, Braunsmann C, Ritter R, Barlag B et al. (2013). Structural insight into the giant Ca²⁺-binding adhesion SiiE: implications for the adhesion of *Salmonella enterica* to polarized epithelial cells. *Structure.* 21(5):741–52.
88. Guo S, Stevens CA, Vance T, Olijve L, Graham LA, Campbell RL et al. (2017). Structure of a 1.5-MDa adhesin that binds its Antarctic bacterium to diatoms and ice. *Science advances.* 3(8), e1701440.

89. Harding CM, Kinsella RL, Palmer LD, Skaar EP, Feldman MF. (2016). Medically relevant *Acinetobacter* species require a type II secretion system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLoS Pathog.* 12:e1005391.
90. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. (2018a). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 16(2):91-102.
91. Harding CM, Nasr MA, Kinsella RL, Scott NE, Foster LJ, Weber BS ir kt. (2015). *Acinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins. *Mol Microbiol.* 96(5):1023-41.
92. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS Jr. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio.* 4(4). pii: e00360-13.
93. Harding CM, Haurat MF, Vinogradov E, Feldman MF. (2018b). Distinct amino acid residues confer one of three UDP-sugar substrate specificities in *Acinetobacter baumannii* PglC phosphoglycosyltransferases. *Glycobiology.* 28(7):522-533.
94. Harding CM, Pulido MR, Di Venzio G, Kinsella RL, Webb AI, Scott NE ir kt. (2017). Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. *J Biol Chem.* 292(22):9075-9087.
95. Hölscher T, Bartels B, Lin YC, Gallegos-Monterrosa R, Price-Whelan A, Kolter R ir kt. (2015). Motility, Chemotaxis and Aerotaxis Contribute to Competitiveness during Bacterial Pellicle Biofilm Development. *J Mol Biol.* 427(23):3695-3708.
96. Holt K, Kenyon JJ, Hamidian M, Scultz MB, Pickard DJ, Dougan G ir kt. (2016). Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Open Microbiology.* 2(2):e000052.
97. Hood MI, Mortensen BL, Moore JL, Zhang Y, Kehl-Fie TE, Sugitani N, ir kt. (2012). Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. *PLoS Pathog.* 8:e1003068.
98. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 3(3):243-50.
99. Hu D, Liu B, Dijkshoorn L, Wang L, Reeves PR. (2013). Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme. *PLoS One.* 8(7):e70329.
100. Hua X, Zhou Z, Yang Q, Shi Q, Xu Q, Wang J ir kt. (2017). Evolution of *Acinetobacter baumannii* In Vivo: International Clone II, More Resistance to Ceftazidime, Mutation in ptk. *Front Microbiol.* 8:1256.
101. Huang G, Shen X, Gong Y, Dong Z, Zhao X, Shen W, Wang J, Hu F, Peng Y. (2014a). Antibacterial properties of *Acinetobacter baumannii* phage Abp1 endolysin (PlyAB1). *BMC Infect Dis.* 14:681.
102. Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, Sun W, Liu C, Li Y, Ma Y. (2015). OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine.* 33:4479–4485.

103. Huang W, Yao Y, Long Q, Yang X, Sun W, Liu C ir kt. (2014b). Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. PLoS One 9(6):e100727.
104. Huang W, Yao Y, Wang S, Xia Y, Yang X, Long Q ir kt. (2016). Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Sci Rep. 6:20724.
105. Iyer R, Moussa SH, Durand-Réville TF, Tommasi R, Miller A. (2018). *Acinetobacter baumannii* OmpA Is a Selective Antibiotic Permeant Porin. ACS Infect Dis. 4(3):373-381.
106. Imperi F, Antunes LC, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P ir kt. (2011). The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. IUBMB Life. 63(12):1068-74.
107. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. (2015). Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. J Autoimmun. 60:1-11.
108. Isler B, Doi Y, Bonomo RA, Paterson DL. (2018). New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. Antimicrob Agents Chemother. 63(1). pii: e01110-18.
109. Ito A, Kohira N, Bouchillon SK, West J, Rittenhouse S, Sader HS ir kt. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of S-649266, a catechol-substituted siderophore cephalosporin, when tested against non-fermenting Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother. 71:670-7.
110. Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C ir kt. (2012). Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. PLoS Pathog. 8:e1002758.
111. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J ir kt. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. J Exp Med. 192:1069-74.
112. Yamamoto K, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. (2012). Involvement of flagella-driven motility and pili in *Pseudomonas aeruginosa* colonization at the air-liquid interface. Microbes Environ. 27:320-3.
113. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. (1992). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 1985;33(1):103-19. Erratum in: Gene. 114(1):81-3.
114. Yi L, Wang J, Gao Y, Liu Y, Doi Y, Wu R, Zeng Z, Liang Z, Liu JH (2017). "mcr-1-Harboring *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Sequence Type 34 in Pigs, China". Emerging Infectious Diseases. 23(2):291-295.
115. Yin S, Huang G, Zhang Y, Jiang B, Yang Z, Dong Z ir kt. (2017). Phage Abp1 Rescues Human Cells and Mice from Infection by Pan-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. Cell Physiol Biochem. 44:2337-45.
116. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S ir kt. . (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect. Immun. 78:1952-1962.
117. Jacobs AC, Sayood K, Olmsted SB, Blanchard CE, Hinrichs S, Russell D, Dunman PM. (2012). Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. FEMS Immunol Med Microbiol. 64(3):403-12.

118. Jahangiri A, Rasooli I, Owlia P, Fooladi, AA, Salimian J. (2017). *In silico* design of an immunogen against *Acinetobacter baumannii* based on a novel model for native structure of Outer membrane protein A. Microb Pathog. 105:201-210.
119. Jan AT. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. Frontiers in microbiology. 8, 1053.
120. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, Lee JC. (2011). *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. PLoS One. 6(2):e17027.
121. Johnson TL, Waack U, Smith S, Mobley H, Sandkvist M. (2015). *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and in vivo fitness. J. Bacteriol. 198:711–719.
122. Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snesrud E, Onmus-Leone F et al. (2015). Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. Clin. Infect. Dis. 61:145–154.
123. Joshi SG, Litake GM. (2013). *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogenic threat to public health. World J Clin Infect Dis. 3(3):25-36.
124. Jun SH, Lee JH, Kim BR, Kim SI, Park TI, Lee JC, Lee YC. (2013). *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. PLoS one. 8(8), e71751.
125. Juttukonda LJ, Chazin WJ, Skaar EP. (2016). *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. Mbio. 7:e01475–16.
126. Kalynych S, Valvano MA, Cygler M. (2012). Polysaccharide co-polymerases: the enigmatic conductors of the O-antigen assembly orchestra. Protein Eng Des Sel. 25(11):797-802.
127. Kamoshida G, Kikuchi-Ueda T, Tansho-Nagakawa S, Nakano R, Nakano A, Kikuchi H, Ubagai T, Ono Y. (2015). *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). J Infect Chemother. 21(1):43-9.
128. Karah N. (2011). Identification, molecular epidemiology, and antibiotic resistance characterization of *Acinetobacter* spp. clinical isolates. Doctoral thesis.
129. Kearns DB. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. Nature reviews. Microbiology. 8(9):634-44.
130. Kempf M, Eveillard M, Deshayes C, Ghamrawi S, Lefrancois S, Bastiat G et al. (2012). Cell surface properties of two differently virulent strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient. Can. J. Microbiol. 58:311-317.
131. Kenyon JJ, Hall RM. (2013). Variation in the Complex Carbohydrate Biosynthesis Loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. PLoS One. (4):e62160.
132. Kenyon JJ, Marzaioli AM, Hall RM, De Castro C. (2014a). Structure of the K2 capsule associated with the KL2 gene cluster of *Acinetobacter baumannii*. Glycobiology. 24(6):554-63.
133. Kenyon JJ, Nigro SJ, Hall RM. (2014b). Variation in the OC Locus of *Acinetobacter baumannii* Genomes Predicts Extensive Structural Diversity in the Lipooligosaccharide. PLoS ONE. 9(9):e107833.
134. Kentache T, Ben Abdelkrim A, Jouenne T, Dé E, Hardouin J. (2017). Global Dynamic Proteome Study of a Pellicle-forming *Acinetobacter baumannii* Strain. Mol Cell Proteomics. 16(1):100-112.

135. Khan HA, FK Baig, R Mehboob. (2017). Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance Asian Pac J Trop Biomed. 7:478-482
136. Kim CH, Jeong YJ, Lee J, Jeon SJ, Park SR, Kang MJ ir kt. (2013). Essential role of toll-like receptor 4 in *Acinetobacter baumannii*-induced immune responses in immune cells. Microb Pathog. 54:20–5.
137. Kim CH, Kim DJ, Lee SJ, Jeong YJ, Kang MJ, Lee JY ir kt. (2014). Toll like receptor 2 promotes bacterial clearance during the initial stage of pulmonary infection with *Acinetobacter baumannii*. Mol Med Rep. 9:1410–4.
138. Kim DH, Jung SI, Kwon KT, Ko KS. (2017a). Occurrence of Diverse AbGRII-Type Genomic Islands in *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 Isolates from South Korea. Antimicrob Agents Chemother. 61(2). pii: e01972-16.
139. Kim DH, Ko KS. (2015). AbaR-type genomic islands in non-baumannii *Acinetobacter* species isolates from South Korea. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59(9):5824-6.
140. Kim DH, Jung SI, Kwon KT Ko KS. (2017b). Occurrence of Diverse AbGRII-Type Genomic Islands in *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 Isolates from South Korea. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61(2), e01972–16.
141. Kim SW, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim Jm ir kt. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS Microbiol. Lett. 301:224–231.
142. Kim SW, Park SB, Im SP, Lee JS, Jung JW, Gong TW ir kt. (2018). Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. Sci Rep. 8(1):5402.
143. King JE, Owaif HAA, Jia J, Roberts IS. (2015). Phenotypic Heterogeneity in Expression of the K1 Polysaccharide Capsule of Uropathogenic *Escherichia coli* and Downregulation of the Capsule Genes during Growth in Urine. Infect Immun. 83(7):2605–2613.
144. Koenigs A, Stahl J, Averhoff B, Göttig S, Wichelhaus TA, Wallich R ir kt. (2016). CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. J Infect Dis. 213:1388–99.
145. Koenigs A, Zipfel PF, Krawczyk P. (2015). Translation elongation factor Tuf of *Acinetobacter baumannii* is a plasminogen-binding protein. PLoS ONE. 10:e0134418.
146. Krachler AM, Orth K. (2011). Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands. J Biol Chem. 286(45):38939-47.
147. Krasowska A, Sigler K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 4:112.
148. Kulp A. Kuehn MJ. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu. Rev. Microbiol. 64:163–184.
149. KuoLee R, Harris G, Yan H, Xu HH, Conlan WJ, Patel GB ir kt. (2015). Intranasal immunization protects against *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia in mice. Vaccine. 33(1):260-7.

150. Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. (2009). Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 297:150–156.
151. Kwon HI, Kim S, Oh MH, Na SH, Kim YJ, Jeon YH, Lee JC. (2017). Outer membrane protein A contributes to antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* through the OmpA-like domain. *J Antimicrob Chemother.* 72(11):3012–3015.
152. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzman-Blanco M. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 42:276–292.
153. Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penadés JR, Lasa I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol.* 58(5):1322–39.
154. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. (2018). Phage Therapy for a Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Craniectomy Site Infection. *Open Forum Infect Dis.* 5:ofy064.
155. Lazaro-Diez M, Navascues-Lejarza T, Remuzgo-Martinez S, Navas J, Icardo JM, Acosta F, Martinez-Martinez L, Ramos-Vivas J. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*. *Microbes Infect.* 18:559–564.
156. Lee JS, Lee JC, Lee CM, Jung ID, Jeong YI, Seong EY et al. (2007). Outer membrane protein A of *Acinetobacter baumannii* induces differentiation of CD4+ T cells toward a Th1 polarizing phenotype through the activation of dendritic cells. *Biochem Pharmacol.* 74:86–97.
157. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB et al. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:55.
158. Lee JB, Byeon JH, Jang HA, Kim JK, Yoo JW, Kikuchi Y, Lee BL. (2015). Bacterial cell motility of *Burkholderia* gut symbiont is required to colonize the insect gut. *FEBS Lett.* 589(19):784–90.
159. Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC. (2010). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *J. Microbiol.* 48:387–392.
160. Lees-Miller RG, Iwashkiw JA, Scott NE, Seper A, Vinogradov E, Schild S et al. (2013). A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Mol Microbiol.* 89(5):816–830.
161. Lemaître N, Liang X, Najeeb J, Lee CJ, Titecat M, Leteurtre E, Simonet M, Toone EJ, Zhou P, Sebbane F. (2017). Curative Treatment of Severe Gram-Negative Bacterial Infections by a New Class of Antibiotics Targeting LpxC. *Mbio.* 8:e00674–17.
162. Leon-Kempis Mdel R, Guccione E, Mulholland F, Williamson MP, Kelly DJ. (2006). The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Mol. Microbiol.* 60(5):1262–1275.
163. Leungtongkam U, Thummeepak R, Tasanapak K, Sitthisak S. (2018). Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 13(12):e0208468.

164. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Hujer AM, Taracila MA, Bonomo RA, Spellberg B. (2013). *Acinetobacter baumannii* rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. *Vaccine*. 31:313–318.
165. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ. (2010b). Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Res microbiol*. 161:308–14.
166. Lin YP, McDonough SP, Sharma Y, Chang YF. (2010a). The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. *PLoS One*. 5(6):e11301.
167. Linhartová I, Bumba L, Mašín J, Basler M, Osička R, Kamanová J ir kt. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS microbiology reviews*. 34(6):1076–112.
168. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. (2014). The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47:275–281.
169. Liu D, Liu ZS, Hu P, Cai L, Fu BQ, Li YS ir kt. (2016). Characterization of surface antigen protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. *Vet. Microbiol*. 186:126–138.
170. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol*. 190(3):1036–44.
171. Luo G, Lin L, Ibrahim AS, Baquir B, Pantapalangkoor P, Bonomo RA ir kt. (2012). Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One*. 7:e29446.
172. Manchur MA, Kikumoto M, Kanao T, Takada J, Kamimura K. (2011). Characterization of an OmpA-like outer membrane protein of the acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Extremophiles : life under extreme conditions*. 15(3):403–410.
173. Marcoux J, Politis A, Rinehart D, Marshall DP, Wallace MI, Tamm LK, Robinson CV. (2014). Mass spectrometry defines the C-terminal dimerization domain and enables modeling of the structure of full-length OmpA. *Structure*. 22:781–790.
174. Marti S, Chabane YN, Alexandre S, Coquet L, Vila J, Jouenne T ir kt. (2011). Growth of *Acinetobacter baumannii* in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors. *Plos One*. 6(10):e26030.
175. Maruvada R, Kim KS. (2011). Extracellular loops of the *Eschericia coli* outer membrane protein A contribute to the pathogenesis of meningitis. *J Infect Dis*. 203(1):131–40.
176. McConnell MJ, Pachón J. (2010). Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. *Vaccine*. 29(1):1–5.
177. McQueary CN, Actis LA. (2011). *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol*. 49(2):243–50.
178. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW ir kt. (2012). Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol*. 50(3):434–43.

179. Megeed AA, Hayssam MA, Salem MZ, El-Shikh MS, Talea IA, Alogaibi YA. (2016). Investigation of the virulence factors and molecular characterization of the clonal relations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J. AOAC Int.
180. Mendelson M, Brink A, Gouws J, Mbelle N, Naidoo V, Pople T ir kt. (2018). South African One Health Stewardship Sub-Committee of the Ministerial Advisory Committee on Antimicrobial Resistance. The One Health stewardship of colistin as an antibiotic of last resort for human health in South Africa. Lancet Infect Dis. 18(9):e288-e294.
181. Mercaldi MP, Dams-Kozłowska H, Panilaitis B, Joyce AP, Kaplan DL. (2008). Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. Biomacromolecules. 9:1988–1996.
182. Minandri F, D'Arezzo S, Antunes LC, Pourcel C, Principe L, Petrosillo N, Visca P. (2012). Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. J Clin Microbiol. 50(3):590-7.
183. Mittal R, Krishnan S, Gonzalez-Gomez I, Prasadarao NV. (2011). Deciphering the roles of outer membrane protein A extracellular loops in the pathogenesis of *Escherichia coli* K1 meningitis. J Biol Chem. 286(3):2183-93.
184. Moffatt JH, Harper M, Mansell A, Crane B, Fitzsimons TC, Nation RL ir kt. (2013). Lipopolysaccharide-Deficient *Acinetobacter baumannii* Shows Altered Signaling through Host Toll-Like Receptors and Increased Susceptibility to the Host Antimicrobial Peptide LL-37. Infection and Immunity. 81(3):684–689
185. Moon DC, Choi CH, Lee JH, Choi CW, Kim HY, Park JS, Kim SI, Lee JC. (2012). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. J Microbiol. 50(1):155-60.
186. Morán-Barrio J, Cameranesi MM, Relling V, Limansky AS, Brambilla L, Viale AM. (2017). The *Acinetobacter* outer membrane contains multiple specific channels for carbapenem β -lactams as revealed by kinetic characterization analyses of imipenem permeation into *Acinetobacter baylyi* cells. Antimicrob Agents Chemother. 61(3)
187. Munita JM, Arias CA. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology spectrum. 4(2).
188. Mushtaq AU, Park JS, Bae SH, Kim HY, Yeo KJ, Hwang E ir kt. (2017). Ligand-Mediated Folding of the OmpA Periplasmic Domain from *Acinetobacter baumannii*. Biophys J. 112(10):2089-2098.
189. Nairn BL, Lonergan ZR, Wang J, Braymer JJ, Zhang Y, Calcutt MW ir kt. (2016). The Response of *Acinetobacter baumannii* to Zinc Starvation. Cell Host Microbe. 19:826–836.
190. Nait Chabane Y, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardouin J, Lesouhaitier O ir kt. (2014). Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. PLoS One. 9(10):e111660.
191. Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE. (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. PLoS One. 7(12):e51241.
192. Navarre WW. (2010). H-NS as a Defence System. In: Dame R.T., Dorman C.J., editors. Bacterial Chromatin. Springer; Dordrecht, The Netherlands: 251–322.

193. Nevermann J, Silva A, Otero C, Oyarzún DP, Barrera B, Gil F, Calderón IL, Fuentes JA. (2019). Identification of Genes Involved in Biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Front Microbiol.* 10:104.
194. Newton HJ, Sansom FM, Dao J, McAlister AD, Sloan J, Cianciotto NP, Hartland EL. (2007). Sell repeat protein LpnE is a *Legionella pneumophila* virulence determinant that influences vacuolar trafficking. *Infect Immun.* 75(12):5575-85.
195. Nwanyanwu CE, Abu GO. (2013). Influence of growth media on hydrophobicity of phenol utilizing bacteria found in petroleum refinery effluent. *Int. Res. J. Biological Sci.* 2(10):6-11.
196. Oh MH, Lee JC, Kim J, Choi CH, Han K. (2015). Simple Method for Markerless Gene Deletion in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Appl Environ Microbiol.* 81(10):3357-68.
197. Ophir T, Gutnick DL. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:740-745.
198. Ozbek B, Senturk A. (2010). Postantibiotic effects of tigecycline, colistin sulfate, and levofloxacin alone or tigecycline-colistin sulfate and tigecyclinelevofloxacin combinations against *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy.* 56:466-471.
199. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, Malmi H, Parilova O, Teneberg S ir kt. (2018). Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115(21):5558-5563.
200. Papp-Wallace KM, Nguyen NQ, Jacobs MR, Bethel CR, Barnes MD, Kumar V ir kt. (2018). Strategic approaches to overcome resistance against Gram negative pathogens using β -lactamase inhibitors and β -lactam enhancers: The activity of three novel diazabicyclooctanes, WCK 5153, zidebactam (WCK 5107), and WCK 4234. *J Med Chem.* 61:4067-4086.
201. Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu KS, Kumarasiri M, Hesek D ir kt. (2012). Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the Gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB J.* 26(1):219-28.
202. Paterson DL. (2017). Antibiotics: Cephalosporins and related drugs: cefiderocol, p 658-590663. In Grayson LM (ed), Cosgrove SE, Crowe S, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton.
203. Pei Z, Buruoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ, Kopecko DJ ir kt. (1998). Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun.* 66(3):938-43.
204. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC ir kt. (2009). *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2605-2609.
205. Pelletier MR, Casella LG, Jones JW, Adams MD, Zurawski DV, Hazlett KR ir kt. (2013). Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(10):4831-40.
206. Penwell WF, Arivett BA., Actis LA. (2012). The *Acinetobacter baumannii entA* gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. *PLoS ONE.* 7:e36493.

207. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 64(Pt 4):323-34.
208. Perez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Alvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A ir kt. (2016). The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence.* 8(6):959-974.
209. Picker MA, Wing HJ. (2016). H-NS, Its Family Members and Their Regulation of Virulence Genes in *Shigella* Species. *Genes.* 7(12):112.
210. Piepenbrink KH, Lillehoj E, Harding CM, Labonte JW, Zuo X, Rapp CA ir kt. (2016). Structural Diversity in the Type IV Pili of Multidrug-resistant *Acinetobacter*. *J Biol Chem.* 291(44):22924-22935.
211. Portsmouth S, Van Veenhuyzen D, Echols R, Machida M, Ferreira JC, Ariyasu M, Nagata TD. (2017). Clinical Response of Cefiderocol Compared with Imipenem/Cilastatin in the Treatment of Adults with Complicated Urinary Tract Infections with or without Pyelonephritis or Acute Uncomplicated Pyelonephritis: Results from a Multicenter, Double-blind, Randomized Study (APEKS-cUTI). *Open Forum Infect Dis* 4(Suppl):S537–S538
212. Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E ir kt. (2017). Predominance of international clone 2 OXA-23-producing-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents.* 49:749–753.
213. Povilonis J, Seputiene V, Krasauskas R, Juskaite R, Miskinyte M, Suziedelis K ir kt. (2013). Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 68(5):1000-6.
214. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Chen W. (2009). High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. *Microbes Infect.* 11:946–955.
215. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Van Rooijen N, Patel GB, Chen W. (2012). Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One.* 7:e40019.
216. Raja Danasekaran GM, Annadurai K. (2014). Prevention of healthcare-associated infections: protecting patients, saving lives *Int j community med public health.* 1:67-68.
217. Repizo GD, Gagne S, Foucault-Grunenwald ML, Borges V, Charpentier X, Limansky AS ir kt. (2015). Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii*. *Virulence.* *PLoS ONE.* 10:e0138265.
218. Robertson TG, Elizabeth DRC, Nicole D, Christine I, Murat B, Jean C, Michael VN. (2014). FTT0831c/FTL_0325 Contributes to *Francisella tularensis* Cell Division, Maintenance of Cell Shape, and Structural Integrity. *Infect Immun.* 82(7):2935-2948.
219. Rodriguez-Rubio L, Chang WL, Gutierrez D, Lavigne R, Martinez B, Rodriguez A ir kt. (2016). ‘Artilylation’ of endolysin lambdaSa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against *Streptococci*. *Sci. Rep.* 6:35382.
220. Ronish LA, Lillehoj E, Fields JK, Sundberg EJ, Piepenbrink KH. (2019). The structure of PilA from *Acinetobacter baumannii* AB5075 suggests a mechanism for functional specialization in *Acinetobacter* type IV pili. *J. Biol. Chem.* 294:218-230.

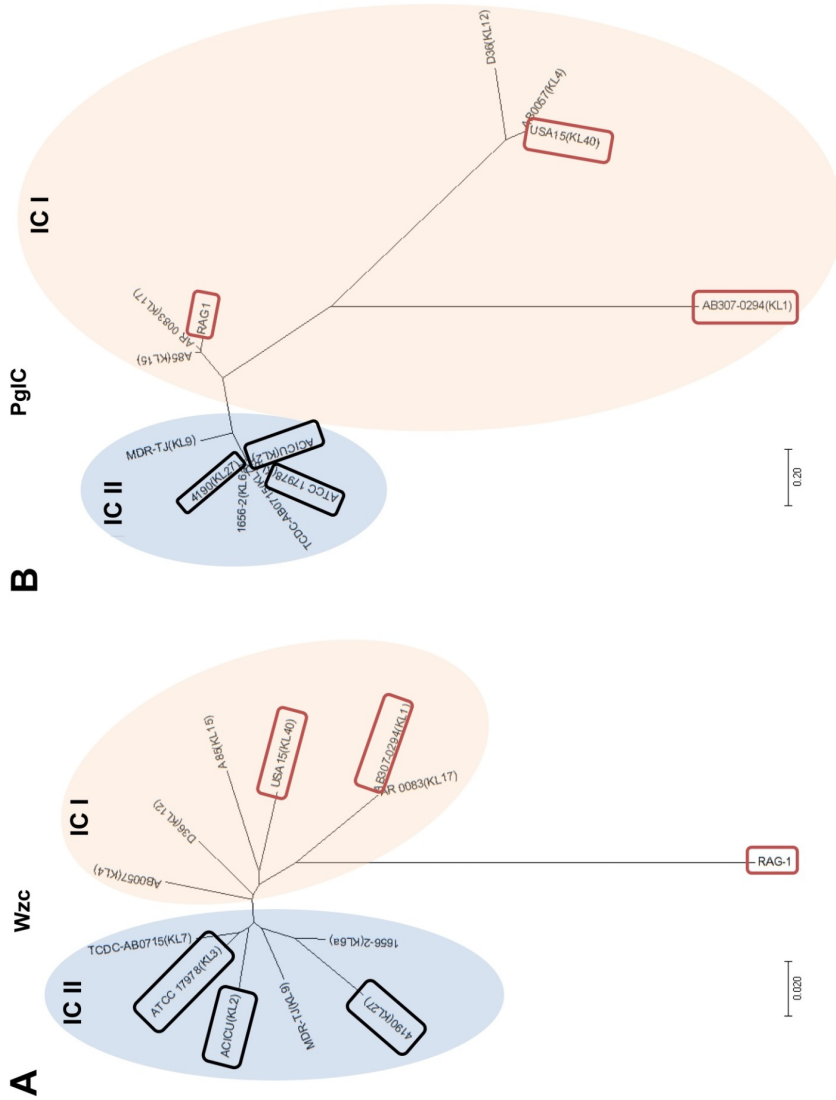
221. Rubinchik S, Seddon AM, Karlyshev AV. (2014). A negative effect of *Campylobacter* capsule on bacterial interaction with an analogue of a host cell receptor. BMC microbiology. 14:141.
222. Ruiz FM, Santillana E, Spinola-Amilibia M, Torreira E, Culebras E, Romero A. (2015). Crystal Structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a Component of the Type VI Secretion System. PLoS ONE. 10:e0129691.
223. Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC ir kt. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 55:3084–3090.
224. Rumbo C, Tomás M, Fernández ME, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, ir kt. (2014). The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. Infect Immun. 82(11):4666-80.
225. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberman SL ir kt. (2009). Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* *in vitro* and *in vivo*. J. Infect. Dis. 199:513–521.
226. Russo TA, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Cox AD, St Michael F ir kt. (2013). The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization. Infect Immun. 81(3):915-22.
227. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberman SL, MacDonald U ir kt. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect Immun. 78(9):3993-4000.
228. Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. (2015). Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. Journal of Intensive Care. 3:54.
229. Sahl JW, Gillece JD, Schupp JM, Waddell VG, Driebe EM, Engelthaler DM, Keim P. (2013). Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*. PLoS One. 8(1):e54287.
230. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; CSH Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA.
231. Samsudin F, Ortiz-Suarez ML, Piggot TJ, Bond PJ, Khalid S. (2016). OmpA: A Flexible Clamp for Bacterial Cell Wall Attachment. Structure. 24(12):2227-2235.
232. Sato Y, Unno Y, Kawakami S, Ubagai T, Ono Y. (2017). Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. J Med Microbiol. 66(2):203-212.
233. Schembri MA, Dalsgaard D, Klemm P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. J Bacteriol. 186(5):1249-57.
234. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L ir kt. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. Antimicrob Agents Chemother. 61:e00954-17.
235. Schwechheimer C, Kuehn MJ. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nat Rev Microbiol. 13(10):605-19.

236. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balıkcı E ir kt. (2004). PER-1 type β -lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med. Sci. Monit. 10:BR180–BR184.
237. Shapiro JA, Wencewicz TA. (2016). Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-Trigged Siderophore Swapping. ACS Infect Dis. 2(2):157-68.
238. Sheel M, Moreland NJ, Fraser JD, Carapetis J. (2016). Development of Group A streptococcal vaccines: an unmet global health need. Expert Rev Vaccines. 15(2):227-38.
239. Shrivastava R, Miller JF. (2009). Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. Current opinion in microbiology. 12(1):88-93.
240. Singh JK, Adams FG, Brown MH. (2019). Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 9:3301.
241. Singh R, Capalash N, Sharma P. (2017). Immunoprotective potential of Bama, the outer membrane protein assembly factor, against MDR *Acinetobacter baumannii*. Sci Rep. 7(1):12411.
242. Singh R, Garg N, Shukla G, Capalash N, Sharma P. (2016). Immunoprotective Efficacy of *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Protein, FilF, Predicted *In silico* as a Potential Vaccine Candidate. Front Microbiol. 7:158.
243. Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D ir kt. (2012). Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. Int J Med Microbiol. 302(3):117-28.
244. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 58(3):1806–1808.
245. Smani Y, McConnell MJ, Pachón J. (2012). Role of Fibronectin in the Adhesion of *Acinetobacter baumannii* to Host Cells. PLoS ONE. 7(4):e33073.
246. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M ir kt. (2007a). New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev. 21(5):601-14.
247. Smith SG, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. (2007b) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. FEMS Microbiol Lett. 273(1):1-11.
248. Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, Stock F, Mijares L; NISC Comparative Sequence Program, Murray PR, Segre JA. (2011). Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(33):13758-63.
249. Srinivasan VB, Venkataramaiah M, Mondal A, Rajamohan G. (2015). Functional characterization of AbeD, an RND-type membrane transporter in antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE. 10:e0141314.
250. Stahl J, Bergmann H, Gottig S, Ebersberger I, Aeverhoff B. (2015). *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. PLoS ONE. 10:e0138360.
251. Studier FW, Moffatt BA. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189:113–130.

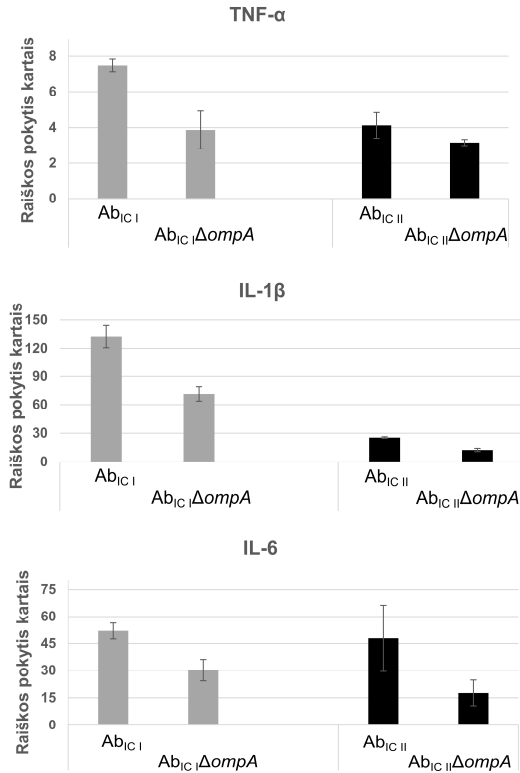
252. Sugawara E, Nikaido H. (2012). OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*. 194(15):4089–4096.
253. Sung JY, Koo SH, Cho HH, Kwon KC. (2012). AbaR7, a genomic resistance island found in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Daejeon, Korea. *Annals of laboratory medicine*. 32(5):324–30.
254. Šeputienė V, Povilonis J, Sužiedėlienė E. (2012). Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(4):1969–73.
255. Tan K, Deatherage KBL, Wu R, Cuff M, Fan Y, Bigelow L ir kt. (2017). Insights into PG-binding, conformational change, and dimerization of the OmpA C-terminal domains from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Borrelia burgdorferi*. *Protein Sci*. 26(9):1738–1748.
256. Thi Khanh Nhu N, Riordan DW, Do Hoang Nhu T, Thanh DP, Thwaites G, Huong Lan NP ir kt. (2016). The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Scientific reports*. 6:28291.
257. Tipton KA, Rather PN. (2016). An *ompR/envZ* two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J. Bacteriol*.
258. Tipton KA, Dimitrova D, Rather PN. (2015). Phase-Variable Control of Multiple Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *J Bacteriol*. 197(15):2593–9.
259. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*. 154:3398–3409.
260. Traub WH, Bauer D. (2000). Surveillance of nosocomial cross-infections due to three *Acinetobacter* genospecies (*Acinetobacter baumannii*, genospecies 3 and genospecies 13) during a 10-Year Observation period: serotyping, macrorestriction analysis of Genomic DNA and antibiotic susceptibilities. *Chemotherapy*. 46(4):282–92.
261. Tsuchiya T, Nakao N, Yamamoto S, Hirai Y, Miyamoto K, Tsujibo H. (2012). NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Microbiol Immunol*. 56(2):107–16.
262. Ugolotti E, Di Marco E, Bandettini R, Tripodi G, Biassoni R. (2016). The whole genome sequencing of *Acinetobacter-calcoaceticus-baumannii* complex strains involved in suspected outbreak in an Intensive Care Unit of a pediatric hospital. *J Hosp Adm*. 5(6):81.
263. Van Faassen H, KuoLee R, Harris G, Zhao X, Conlan JW, Chen W. (2007). Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun*. 75:5597–608.
264. Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol*. 2:203
265. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 59:1210–1215.
266. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD ir kt. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 302:2323–2329.

267. Vorkapic D, Pressler K, Schild S. (2015). Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Current genetics*. 62(1):71-9.
268. Wang N, Ozer EA, Mandel MJ, Hauser AR. (2014). Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. *Mbio*. 5:e01163–14.
269. Wang-Lin SX, Balthasar JP. (2018). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for the Use of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Bacterial Infections. *Antibodies*. 7:5.
270. Weber BS, Ly PM, Irwin JN, Pukatzki S, Feldman MF. (2015). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30):9442-7.
271. Wojdyla JA, Cutts E, Kaminska R, Papadakos G, Hopper JT, Stansfeld PJ ir kt. (2015). Structure and function of the *Escherichia coli* Tol-Pal stator protein TolR. *J Biol Chem*. 290(44):26675-87.
272. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev*. 30(1):409-447.
273. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S ir kt. (2014). New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *Mbio*. 5, e00963–e00913.
274. Wright MS, Mountain S, Beeri K, Adams MD. (2017). Assessment of Insertion Sequence Mobilization as an Adaptive Response to Oxidative Stress in *Acinetobacter baumannii* Using IS-seq. *J Bacteriol*. 199(9). pii: e00833-16.
275. Wright MS, Iovleva A, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. (2016). Genome dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment. *Genome medicine*. 8(1):26.
276. Wu X, Chavez JD, Schweppe DK, Zheng C, Weisbrod CR, Eng JK ir kt. (2016a). *In vivo* protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nat Commun*. 7:13414.
277. Wu Z, Periaswamy B, Sahin O, Yaeger M, Plummer P, Zhai W ir kt. (2016b). Point mutations in the major outer membrane protein drive hypervirulence of a rapidly expanding clone of *Campylobacter jejuni*. *Proc Natl AcadSci U S A*. 113(38):10690-5.
278. Zackular JP, Chazin WJ, Skaar EP. (2015). Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem*. 290(31):18991-8.
279. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 41(1):11-9.
280. Zhang X, Yang T, Cao J, Sun J, Dai W, Zhang L. (2016). Mucosal immunization with purified OmpA elicited protective immunity against infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Pathog*. 96:20-5.
281. Zimble D L, Park TM, Arivett BA, Penwell WF, Greer SM, Woodruff TM ir kt. (2012). Stress response and virulence functions of the *Acinetobacter baumannii* NfuA Fe-S scaffold protein. *J. Bacteriol*. 194:2884–2893.

PRIEDAI



S1 pav. Filogenetinė *Acinetobacter* Wzc (A) ir PglC (B) baltymų analizė. Oranžinė ir mėlyna spalvos atitinkamai nurodo IC I ir IC II izoliatus. Nekloninė *A. baumannii* ATCC 17978 ir *A. venetianus* izoliatas Rag-1 įtrauktas į analizę. Juodi ir raudoni kvadratai atitinkamai nurodo žinomus izoliatus, sintetinančius variabilaus ilgio ir didelės molekulinės masės egzopolisacharidus. Mastelis nurodo aminorūgščių evoliucinį atstumą. Filogenetinė analizė atlikta naudojant Neighbor-Joining metodą su MEGA 7.0 programa.



S2 pav. Citokinų TNF- α (A), IL-1 β (B) ir IL-6 (C) raiškos tyrimas buvo atlikas makrofagus J774 inkubuojant 24 val. su 2 μ g/ml išorinės membranos pūslelėmis. Raiškos pokytis normalizuotas su OMV nepaveiktomis ląstelėmis. Paklaidos nurodo standartines klaidas pagal du nepriklausomus eksperimentus.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.