

**Biochemische Charakterisierung der
Phospholipase PlaF aus *Pseudomonas aeruginosa* und
ihres humanen Homologs ABHD6**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Heinrich Strunk
aus Soest

Düsseldorf, Mai 2020

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

Diese Arbeit wurde gefördert durch den Sonderforschungsbereich 1208 „Identität und Dynamik von Membransystemen – von Molekülen bis zu zellulären Funktionen“ sowie die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2020

*„But I am very poorly today and very stupid
and hate everybody and everything“*

Charles Darwin, 1861

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	IV
VERÖFFENTLICHUNGEN	VII
DANKSAGUNG	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ein nosokomiales Pathogen	1
1.2 <i>Quorum-sensing</i> - ein Zelldichte-abhängiges Zell-Zell-Kommunikationssystem in <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3 Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i>	3
1.4 Phospholipasen als bakterielle Virulenzfaktoren.....	5
1.4.1 Klassifizierung von Phospholipasen und deren Eigenschaften	6
1.4.2 Bakterielle Phospholipasen und deren Rolle in der Virulenz.....	8
1.5 Steuerung der Proteinfunktion durch strukturelle Änderungen	10
1.5.1 Protein-Protein-Interaktionen	10
1.5.2 Protein-Liganden-Interaktionen.....	11
1.6 PlaF – eine neu entdeckte Phospholipase A aus <i>P. aeruginosa</i>	13
1.6.1 Biochemische Charakterisierung der PlaF-Funktion	13
1.6.2 Auflösung der 3D-Struktur von PlaF.....	14
1.6.3 Interaktionen als Modulatoren der PlaF Struktur-Funktionsbeziehung	16
1.6.4 Physiologische Funktion von PlaF in <i>P. aeruginosa</i>	17
1.7 Das humane PlaF-Homolog ABHD6 als Regulator des Endocannabinoid-Systems	20
1.8 Zielsetzung	22
2 MATERIAL	23
2.1 Instrumente und Zubehör.....	23
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.3 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide	26
2.3.1 Bakterienstämme.....	26
2.3.2 Plasmide	26
2.3.3 Oligonukleotide.....	28
2.3.4 Verwendete Software und Datenbanken	31
3 METHODEN	32
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	32
3.1.1 Bakterielle Zellkultivierung	32
3.1.2 Lagerung von Bakterien	33

3.1.3	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Stämme	33
3.1.4	Herstellung elektrokompetenter <i>P. aeruginosa</i> -Zellen	33
3.1.5	Transformation durch Elektroporation	34
3.1.6	Expression von <i>plaF_{H6}</i> in <i>P. aeruginosa</i>	34
3.1.7	Expression von <i>abhd6_{H6}</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	34
3.1.8	Bestimmung der Biofilmproduktion	34
3.1.9	Untersuchung der bakteriellen Schwimmbeweglichkeit	35
3.2	Molekularbiologische Methoden	36
3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese durch PCR	36
3.2.2.1	<i>Sequence and ligation independent cloning</i> -PCR.....	36
3.2.2.2	QuikChange-PCR	37
3.2.3	DNA-Isolierung und Reinigung	37
3.2.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	38
3.2.5	<i>Sequence and ligation independent cloning</i>	38
3.2.6	Kolonie-PCR.....	38
3.2.7	DNA-Sequenzvalidierung	38
3.3	Biochemische Methoden für die Analyse von Proteinen	39
3.3.1	Zellaufschluss	39
3.3.2	Isolierung von Zellmembranen	39
3.3.3	Proteinreinigung von Pla _{H6} und ABHD6 _{H6}	39
3.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
3.3.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.3.6	Immunologischer Proteinnachweis mittels Western Blotting.....	43
3.3.7	Enzymaktivitätsbestimmung mit <i>para</i> -Nitrophenylacylsubstraten	44
3.3.8	Enzymaktivitätsbestimmung mit natürlichen (Phospho-) Lipidsubstraten	44
3.3.9	Enzymaktivitätsbestimmung mit CoA-Thioestern	46
3.3.10	Bestimmung der Thermostabilität durch <i>nano differential scanning fluorimetry</i>	47
3.3.11	<i>In vitro</i> -Crosslinking und Fettsäure-Inhibierung.....	47
3.3.12	Rekonstitution von Pla _{H6} und ABHD6 _{H6}	48
3.3.12.1	Herstellung von <i>small unilamellar vesicles</i>	48
3.3.12.2	Detergensentfernung von solubilisiertem Pla _{H6} und ABHD6 _{H6}	48
3.3.12.3	Bestimmung der Effizienz der Detergensentfernung.....	49
3.3.13	TCA-NaDoc-Fällung	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	3D-Strukturanalyse zur Identifizierung potenziell wichtiger Aminosäurereste für die PlaF-Funktion	50
4.1.1	Mutationen innerhalb der putativen Ligandenbindestelle beeinflussen die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF.....	50
4.1.2	Mutationen innerhalb der Juxtamembran-Region weisen eine veränderte Fettsäure-induzierte Dimerisierung auf	54
4.1.3	Mutationen zur Blockierung der vier putativen Substratzugangstunnel zu PlaF	56
4.2	Temperaturstabilitätsanalyse von Fettsäure-inhibiertem PlaF	58

4.3	Lipolytisches Profil von PlaF mit natürlichen Lipiden	59
4.3.1	PlaF hydrolysiert Mono- und Diacylglyceride	59
4.3.2	BMP, Hemi-BMP, Cardiolipin und DOPE werden durch PlaF hydrolysiert.....	61
4.3.3	CoA-Thioester werden durch PlaF hydrolysiert	62
4.4	Untersuchung von PlaF-Lipid-Interaktionen mit <i>small unilamellar vesicles</i> als Mimetika für natürliche Membranumgebungen	63
4.4.1	Detergensentfernung zur Rekonstitution von PlaF in <i>small unilamellar vesicles</i>	63
4.4.2	PlaF zeigt erhöhte Aktivität in Phospholipid-SUV mit positiv-geladenem, organischen Rest im Vergleich zu neutralem, organischen Resten	64
4.5	<i>In vitro</i> -Crosslinking-Analyse von Detergens-solubilisiertem und SUV-rekonstituiertem PlaF.....	66
4.6	Die Phospholipase ABHD6 als humanes Homolog zu PlaF.....	67
4.6.1	<i>abhd6_{H6}</i> kann in <i>E. coli</i> BL21(DE3) heterolog exprimiert werden	67
4.6.2	Heterolog gebildetes ABHD6 liegt membranlokalisiert vor und lässt sich durch chromatographische Methoden isolieren	69
4.6.3	PlaF und ABHD6 folgen Michaelis-Menten-Kinetik und zeigen Produktinhibierung.....	71
4.6.4	Vergleich des Substratprofils zwischen PlaF und ABHD6.....	72
4.6.5	Plasmid-basierte Komplementierung einer <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> -Mutante mit <i>abhd6</i> in Bezug auf Schwimmbeweglichkeit und Biofilmproduktion	73
4.6.6	ABHD6 zeigt im Vergleich zu PlaF ein verändertes Dimerisierungsverhalten	76
4.6.7	Bioinformatischer Strukturvergleich von PlaF und ABHD6.....	77
4.6.8	Höhere Aktivität von ABHD6 in einer Phospholipidumgebung	81
5	DISKUSSION	82
5.1	Lipolytisches Substratprofil von PlaF unterstützt dessen Beteiligung in der Membranphospholipid-Homöostase	82
5.2	Protein-Lipid-Interaktionen als Regulator der Funktion von PlaF.....	85
5.3	Einblicke in die Funktion der putativen Ligandenbindestelle in Bezug auf die intrinsische PlaF-Dimerisierung	89
5.4	Juxtamembran-Region ist wichtig für die Fettsäure-induzierte Dimersierung.....	92
5.5	Identifikation des Substratzugangstunnels und eines Acyltransferase-Motivs.....	93
5.6	Biochemischer und physiologischer Vergleich von PlaF mit seinem humanen Homolog ABHD6	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	101
7	SUMMARY	103
8	LITERATURVERZEICHNIS	105
	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	127

VERÖFFENTLICHUNGEN

Konferenzbeiträge auf (inter-) nationalen Konferenzen

Strunk C. H., Caliskan M., Bleffert F., Granzin J., Siebers M., Dörmann P., Rahme L., Batra-Safferling R., Jaeger K-E & Kovacic F. The role of phospholipase PlbF of *Pseudomonas aeruginosa* for virulence (2017). Jahrestagung 2017 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Würzburg.

Weiler A. J., Strunk C. H., Berger J., Jaeger K-E & Kovacic F. Novel phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* (2017). Jahrestagung 2017 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Würzburg.

Weiler A., Strunk C., Caliskan M. Structure and function of phospholipase PlbF from *Pseudomonas aeruginosa* (2017). 2^{te} SFB1208 Retreat, Schleiden.

Kovacic F., Bleffert F., Schwabroch T., Strunk C., Caliskan M., Granzin J., Siebers M., Dörmann P., Rahme L., Batra-Safferling R., Jaeger K-E. *Pseudomonas aeruginosa* phospholipases and lectins are potential therapeutic targets (2017). FEMS 2017 7th Congress of European Microbiologist, Valencia.

Caliskan M., Strunk C. H., Molitor R., Bleffert F., Granzin J., Siebers M., Schott-Verdugo S., Dörmann P., Rahme L., Gohlke H., Batra-Safferling R., Jaeger K-E & Kovacic F. Phospholipase A PlbF of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible role for membrane remodeling (2017). 16th International Conference on Pseudomonas – Focused Meeting 2017, Liverpool

Strunk C. H., Caliskan M., Bleffert F., Granzin J., Batra-Safferling R., Rahme L., Gohlke H., Waldera-Lupa D., Stühler K., Kovacic F. & Jaeger K-E. A membrane-bound phospholipase A PlbF of *Pseudomonas aeruginosa* (2017). International CRC 1208 conference Dynamics of Membrane Systems, Düsseldorf

Weiler A. J., Strunk C. H., Berger J., Waldera-Lupa D., Stühler K., Jaeger K-E & Kovacic F. Novel phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* (2017). International CRC 1208 conference Dynamics of Membrane Systems, Düsseldorf

Weiler A. J., Berger J., Strunk C. H., Bender J., Flieger A., Jaeger K-E & Kovacic F. PlaB, a novel phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* (2018). Jahrestagung 2018 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg.

Strunk C. H., Bleffert F., Granzin J., Batra-Safferling R., Gohlke H., Kovacic F. & Jaeger K-E. Fatty acids and phospholipids as regulators of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase PlaF function (2018). Jahrestagung 2018 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg.

Strunk C. H., Bleffert F., Paffen D., Gohlke H., Kovacic F. & Jaeger K-E. Comparison of the bacterial phospholipase PlaF and its human homolog ABHD6 (2019). 2nd International CRC 1208 conference Dynamics of Membrane Systems, Düsseldorf

Weiler A. J., Strunk C. H., Berger J., Jaeger K-E & Kovacic F. PlaB is novel intracellular phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* with activity towards endogenous phospholipids (2019). 2nd International CRC 1208 conference Dynamics of Membrane Systems, Düsseldorf

Strunk C. H., Bleffert F., Paffen D., Gohlke H., Kovacic F. & Jaeger K-E. Comparison of the bacterial phospholipase PlaF and its human homolog ABHD6 (2019). Jahrestagung 2019 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Mainz.

Publikation

Perez Garcia P., Kobus S., Hoepfner A., Holzcheck N., Strunk C., Huber H., Jaeger K.-E., Kovacic F., Smits S., Streit W. R., Chow J. Origin of metallo-beta-lactamases: The highly promiscuous hydrolase Igni18 from the crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis* represents an ancestral enzyme. (submitted)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn **Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger** für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Des Weiteren danke ich ihm für die Ermöglichung der Anfertigung meiner Doktorarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie.

Bei Herrn **Prof. Dr. Holger Gohlke** bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Zusätzlich danke ich Herrn **Dr. Filip Kovacic** für die gute Betreuung und die Übergabe des PlAF-Projekts.

Ein weiterer Dank gilt meiner Fahrgemeinschaft, die zum Ende auch die ganze AG Kovacic darstellte. Die Hin- und Rückfahrten nach und von Jülich waren immer wieder interessante Reisen mit witzigen Gesprächsthemen. Dankeschön **Andrea Weiler, Muttalip Caliskan** und **Nikolina Babic!**

Zudem möchte ich mich für die gute Kooperation mit **Sabahuddin Ahmad** vom Institut „*Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics*“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bedanken.

Außerdem möchte ich noch die drei Masterstudenten **Julia Berger, Rebecka Molitor** und **David Paffen** sowie meine Bachelorstudenten **Jasmin Fuhrmeister** und **Jannik Heemann** erwähnen, die meine Arbeit mit vorantrieben und durch deren Anwesenheit die Laboratmosphäre unterhaltsamer wurde.

Ebenso möchte ich mich bei meinen SFB-Kommilitoninnen **Lena Müller** und **Claudia Hoppen** und **Inga Mohr** für die abwechslungsreichen Retreats, Konferenzen und Seminartage bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie, insbesondere **Patrick Lenz**, möchte ich für die anregenden Mittagspausen-Gesprächsthemen danken.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und besonders meinem Freund Sebastian. Sie alle standen mir immer unterstützend zur Seite und ohne diese Unterstützung wäre mein Studium nicht durchführbar gewesen.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in einer Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme.	1
Abbildung 2: Autoinducer und deren bekannte Derivate aus verschiedenen <i>quorum sensing</i> -Signalwegen.	3
Abbildung 3: Darstellung eines Phospholipids am Beispiel des Phosphatidylethanolamins und der enzymatischen Spaltungsstellen verschiedener Phospholipasen.	6
Abbildung 4: Einflüsse auf die Wirtszelle durch Abbauprodukte bakterieller Phospholipasen....	9
Abbildung 5: 3D-Kristallstruktur von PlaF in einer schematischen Lipid-Doppelschicht.	15
Abbildung 6: Interaktionsnetzwerk der T-förmigen Ligandenbindetasche von PlaF _A	16
Abbildung 7: Analyse der Virulenz einer <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> -Mutante anhand eines <i>Drosophila melanogaster</i> Virulenzassays.....	18
Abbildung 8: Verwendete Molekulargewichts-Standards in den Gelelektrophoresen.	25
Abbildung 9: PlaF-Struktur mit dem putativen Liganden OG an der Dimerschnittstelle.....	51
Abbildung 10: <i>In vivo</i> -Charakterisierung der PlaF-Varianten der putativen OG-Ligandenbindestelle.....	52
Abbildung 11: <i>In vitro</i> -Charakterisierung der PlaF _{OG} -Mutanten aus der putativen Ligandenbindestelle.....	53
Abbildung 12: Untersuchung der PlaF _{DDM} -Mutanten aus der Juxtamembran-Region der Transmembranhelix.	55
Abbildung 13: Darstellung der vier putativen Substratzugangstunnel in PlaF _A anhand von Substrattrajektorien.....	56
Abbildung 14: Untersuchung der PlaF _{DDM} -Varianten zur Blockierung der vier putativen Substratzugangstunnel.	57
Abbildung 15: nanoDSF Thermostabilitätsmessung von PlaF _{DDM} in Gegenwart von Decansäure.58	
Abbildung 16: Lipaseaktivität von PlaF _{DDM} gegenüber Mono- und Diacylglyceriden mit variierender Acylkettenlänge.....	60
Abbildung 17: Lipaseaktivität von PlaF _{DDM} gegenüber BMP, Hemi-BMP, Cardiolipin und DOPE.61	
Abbildung 18: Thioesteraseaktivität von PlaF _{DDM} mit Acyl-Coenzym A mit variierender Kettenlänge.....	62
Abbildung 19: Analyse der PlaF-Rekonstitution in SUVs unter Verwendung von BioBeads SM-2.64	
Abbildung 20: Esteraseaktivität von PlaF in SUVs mit unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung.	65
Abbildung 21: Analyse von Detergens-solubilisiertem und SUV-rekonstituiertem PlaF mit <i>in vitro</i> -Crosslinking.	66
Abbildung 22: Nachweis der heterologen Expression von <i>abhd6</i> _{H6} in <i>E. coli</i> BL21(DE3) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.....	68
Abbildung 23: Lokalisierung und Reinigung von heterolog exprimiertem <i>abhd6</i> _{H6} in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	70
Abbildung 24: Messung der Michaelis-Menten-Kinetik für PlaF _{DDM} und ABHD6 _{DDM}	71
Abbildung 25: Substratprofilvergleich zwischen PlaF _{DDM} und ABHD6 _{DDM}	72
Abbildung 26: Untersuchung der Schwimmbeweglichkeit einer Plasmid-basierten Komplementierung der <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> -Mutante mit <i>abhd6</i>	74
Abbildung 27: Analyse der Biofilmproduktion einer Plasmid-basierten Komplementierung der <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> -Mutante mit <i>abhd6</i> _{H6}	75
Abbildung 28: Untersuchung des Dimerisierungsverhalten von ABHD6 _{DDM} im Vergleich zu PlaF _{DDM}	76

Abbildung 29: Strukturanalyse von PlaF mit der TopModel-modellierten ABHD6-Struktur.	78
Abbildung 30: Nahaufnahme wichtiger Bereiche von PlaF in der überlagerten Struktur von PlaF und ABHD6.....	80
Abbildung 31: Esteraseaktivität von Detergens-solubilisiertem PlaF _{DDM} und ABHD6 _{DDM} und deren SUV-rekonstituierten Gegenstücken PlaF _{SUV} und ABHD6 _{SUV}	81
Abbildung 32: Darstellung der geladenen Aminosäure-Seitenketten in der putativen Membraninteraktionsdomäne.....	87
Abbildung 33: Anordnung der Aminosäure Val33 in der 3D-Struktur von PlaF in Verbindung mit den exogenen Liganden OG.....	91
Abbildung 34: Darstellung der katalytischen Triade und dem putativen Acyltransferase-Motiv in PlaF und ABHD6.	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Instrumente und Zubehör.....	23
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	25
Tabelle 3: Liste aller verwendeten Stämme und deren dazugehöriger Genotypen.	26
Tabelle 4: Liste aller verwendeter Plasmide und deren dazugehörige Genotypen.	26
Tabelle 5: Liste aller verwendeten Oligonukleotide.....	28
Tabelle 6: Verwendete Softwareprogramme.....	31
Tabelle 7: Eingesetzte Online-Werkzeuge und Datenbanken.....	31
Tabelle 8: Zusammensetzung des LB-Nährmediums für <i>E. coli</i> und <i>P. aeruginosa</i>	32
Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Agar-Nährmediums für <i>E. coli</i> und <i>P. aeruginosa</i>	32
Tabelle 10: Eingesetzte Antibiotika und deren Endkonzentrationen im Kulturmedium für <i>P. aeruginosa</i> und <i>E. coli</i>	33
Tabelle 11: Zusammensetzung des Agar-Mediums für den Schwimmbeweglichkeitstest.	35
Tabelle 12: Verwendete Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.....	36
Tabelle 13: Temperaturprofil zur SLIC-PCR.	36
Tabelle 14: Temperaturprofil zur QC-PCR.	37
Tabelle 15: Zusammensetzung des Solubilisationspuffers.....	39
Tabelle 16: Verwendete Puffer und deren jeweilige Volumina bei der IMAC.	40
Tabelle 17: Verwendete Puffer und deren jeweilige Volumina bei der Anionenaustauschchromatographie.....	41
Tabelle 18: Liste der Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der Proteine und ihrer generierten Varianten.....	42
Tabelle 19: Rezeptur für zwei diskontinuierliche Gele mit 5 % Sammelgel und 12 % Trenngel. 43	
Tabelle 20: Zusammensetzung des DC- und TBST-Puffers.....	44
Tabelle 21: Verwendete natürliche (Phospho-) Lipidsubstrate für die Enzymaktivitätsbestimmung.....	45
Tabelle 22: Zusammensetzung des Assay-Puffers für die Aktivitätsbestimmung mit natürlichen Phospholipid- und Lipidsubstraten.	46
Tabelle 23: Verwendete Acyl-Coenzym A-Substrate für die Aktivitätsbestimmung.....	46
Tabelle 24: Zusammensetzung der verschiedenen <i>Crosslinking</i> -Lösungen.	47
Tabelle 25: Zusammensetzung der Stopp-Lösung für das <i>in vitro</i> - <i>Crosslinking</i>	48

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1

1-LG 1-Lauroyl-*rac*-glycerol
 1-OG 1-Oleoyl-*rac*-glycerol
 1-SG 1-Stearoyl-*rac*-glycerol

2

2-AG 2-Arachidonoylglycerol

3

3OC12HSLN-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserinlaktone

A

A_{410nm} Absorption bei 410 nm
 A_{550nm} Absorption bei 550 nm
 ABHD6 α , β -hydrolase domain containing 6
 ADPRT Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase
 AEX Anionen-Austauschchromatographie
 AHL *N*-Acyl-Homoserinlaktone
 AI Autoinducer
 AIDS *acquired immune deficiency syndrome*
 APS Ammoniumperoxodisulfat

B

BMP Bis-(monoacylglycero)-phosphat
 BMP-C14 Bis-(monomyristoylglycero)phosphat
 BS²G *Bis*-(sulfosuccinimidyl) glutarat
 BS³ *Bis*-(sulfosuccinimidyl) suberat

C

C10 Decansäure
 C11 Undecansäure
 C14 Myristinsäure
 C4HSL *N*-butyryl-L-Homoserinlaktone
 Cfa Cyclopropan-Fettsäuresynthase
 CL Cardiolipin
 CL-14 Cardiolipin mit Myristinsäureresten
 CoA Coenzym A
 CoA-C12 Lauroyl-Coenzym A
 CoA-C14 Myristoyl-Coenzym A
 CoA-C16 Palmitoyl-Coenzym A
 Cti *cis-trans*-Isomerase

D

DAG Diacylglycerid, 1,2-Diacylglyceride
 DC Dunn-Carbonat
 ddH₂O Doppelt-destilliertes H₂O
 DDM *n*-Dodecyl- β -D-Maltosid
 DMP Dimethylpimelimidat
 DMSO Dimethylsulfoxid
 dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat
 d-PlaF dimeres PlaF
 d-PlaF^{*}:FS ... Komplex aus PlaF Dimer und Fettsäure
 DSF *differential scanning fluorimetry*
 DTNB 5,5'-Dithio-*bis*-2-nitrobenzoesäure
 DTT Dithiotreitol

E

E. coli TLE *E. coli total lipid extract*
 ECL Signalverstärkte Chemolumineszenz
 EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
 Exo Exotoxin

F

FFS Freie Fettsäure
 FMM Funktionelle Membranmikrodomäne

G

GAP Guanosinriphosphatase aktivierendes Protein
 GCAT Glycerophospholipid:Cholesterol-
 Acyltransferase
 GDSL Gly-Asp-Ser-(Leu/Ile)
 GPCR G-Protein-gekoppelter Rezeptor
 GPL Glycerophospholipid
 GTPase Guanosinriphosphatase

H

HBMP Hemi-Bis-(monoacylglycero)-phosphat
 HBMP-C14 Hemi-BMP mit Myristinsäureresten
 HIV-1 Humaner Immundefizienz-Virus 1
 HPSF *High Purity Salt Free*

I

IMAC Immobilisierte-Metallionen-
 Affinitätschromatographie

IPA Isopropylalkohol
IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

J

JM Juxtamembran

K

kmk kritische Mizellkonzentration

L

LB *Lysogeny Broth*

LF Lösliche Fraktion

LPA Lysophosphatidsäure

LPC Lysophosphatidylcholin

LPE14 1-Myristoyl-lysophosphatidylethanolamin

LPE18 1-Stearoyl-lysophosphatidylethanolamin

LPG14 1-Myristoyl-lysophosphatidylglycerol

LPG18 1-Stearoyl-lysophosphatidylglycerol

LPS Lipopolysaccharide

LV Leervektor

LysoPL Lysophospholipid

LysoPLA Lysophospholipase A

M

MAG Monoacylglycerid

MF Membranfraktion

MGL Monoacylglycerol-Lipase

mpH₂O H₂O mit Millipore-Reinheit

m-PlaF monomeres PlaF

MTP Mikrotiterplatte

MWCO *Molecular Weight Cut-off*

N

NaDoc Natriumdeoxychololat

NEFA *non-esterified fatty acids*

Ni-NTA Nickel-Nitrilotriessigsäure

O

OD_{580nm} Optische Dichte bei 580 nm

OG *n*-Octyl- β -D-Glucopyranosid

OLR Offenes Leseraster

OMPLA *outer membrane phospholipase A*

P

PA Phosphatidsäure

PC Phosphatidylcholin

PCR Polymerase-Kettenreaktion

pDNA Plasmid-DNA

PE Phosphatidylethanolamin

PE14 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin

PE18 1,2-Distearoyl-phosphatidylethanolamin

PG Phosphatidylglycerol

PG12 1,2-Dilauroyl-phosphatidylglycerol

PG14 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylglycerol

PG18 1,2-Distearoyl-phosphatidylglycerol

PI Phosphatidylinositol

PL Phospholipid

PLA₁ Phospholipase A1

PLA₂ Phospholipase A2

PLB Phospholipase B

PLC Phospholipase C

PLD Phospholipase D

PLI Protein-Liganden-Interaktion

PLP Patatin-ähnliches Protein

pNPAS *para*-Nitrophenylacetylsubstrat

pNPB *para*-Nitrophenylbutyrat

pNPH *para*-Nitrophenylhexanoat

PPI Protein-Protein-Interaktion

PQS 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1H)-quinolon

PS Phosphatidylserin

PVDF Polyvinylidenfluorid

Q

QC QuikChange

QS *quorum sensing*

R

RMSD_{all} *root-mean square deviation of all atoms*

RT Raumtemperatur

S

SDS Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sif *Salmonella*-induziertes Filament

SLIC *Sequence and ligation independent cloning*

SUV *small unilamellar vesicle*

T

T3SS Typ III-Sekretionssystem

TBE TRIS-Borat-EDTA

TBST TRIS-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20

TCA Trichloressigsäure

TEMED..... *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin
TM Transmembran
TRIS..... Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T_{SM} Schmelztemperatur

U

Upm Umdrehungen pro Minute

W

WHO..... Weltgesundheitsorganisation

1 EINLEITUNG

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* – ein nosokomiales Pathogen

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, welches zur Gruppe der γ -Proteobakterien gehört (Abbildung 1).^{1, 2} Innerhalb des Genus *Pseudomonas* hebt sich *P. aeruginosa* besonders durch eine opportunistische Lebensweise in Säugern, Pflanzen, Hefen und Insekten ab.³ In der Medizin ist *P. aeruginosa* mit 10 % aller nosokomialen Infektionen besonders als weitverbreiteter Gram-negativer Keim bekannt.^{4, 5} Dabei befällt das Bakterium gehäuft verschiedene Untergruppen von immunsupprimierten Patienten mit z. B. (Brand-) Wunden, cystischer Fibrose, *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) und Krebserkrankungen.^{6–9} Die Behandlung von *P. aeruginosa* mit Antibiotika gestaltet sich durch intrinsische Antibiotikaresistenzen, multiresistente Keime und die Ausbildung von Biofilm als besonders schwierig.^{8, 10–14}

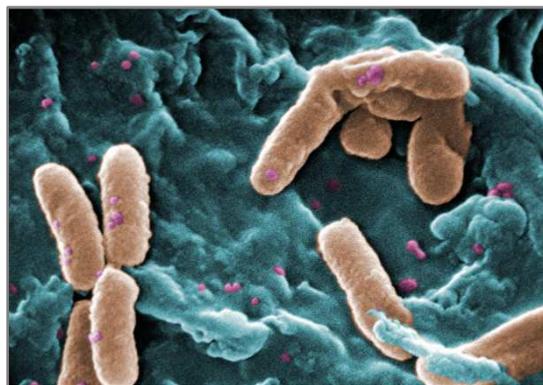


Abbildung 1: *Pseudomonas aeruginosa* in einer Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme.¹⁵

Mit der Genomsequenzierung des Stammes zeigte sich durch eine vergleichbare Anzahl offener Leseraster (OLR) eine ähnliche Komplexität zu simplen Eukaryoten wie bei *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) mit 6200 OLRs.¹⁶ Hierbei kodieren besonders viele dieser OLRs für Transporter und regulatorische Proteine, die *P. aeruginosa* eine Adaptation an Umwelteinflüsse erleichtern.¹⁶ Anhand der Ausbildung von zellassozierten (Lipopolysaccharide, Flagellen, Typ IV-Pili, Alginate) und sekretierten (Proteasen, Exotoxine, Rhamnolipide, Pyocyanin, Phospholipasen) Virulenzfaktoren lässt sich die Pathogenität dieses Stammes beschreiben.⁵ Reguliert wird das komplexe Zusammenspiel der Virulenz durch *quorum-sensing* (QS) als ein Zell-Zell Signalsystem.^{5, 17, 18}

In einer aktuellen Studie stuft die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *P. aeruginosa* in die Risikogruppe 1, mit dringendem Handlungsbedarf in der Erforschung und Entwicklung von Antibiotika, ein.¹⁹ Neben den medizinischen und umweltrelevanten Aspekten konnte *P. aeruginosa* auch eine biotechnologische Rolle zugeordnet werden, indem es z. B. zur Sekretion von Lipasen genutzt wird.²⁰ Die chemoorganotrophe Lebensweise ermöglicht *P. aeruginosa* das ubiquitäre Wachstum

durch die Verwendung verschiedenster Kohlenstoffquellen und erlaubt so die Produktion von Polymeren und niedermolekularen Verbindungen.^{21, 22}

1.2 *Quorum-sensing* - ein Zelldichte-abhängiges Zell-Zell-Kommunikationssystem in *P. aeruginosa*

Die Einführung des Begriffs QS erfolgte 1994 durch drei renommierte Wissenschaftler als regulatorischer Prozess in Abhängigkeit von der bakteriellen Zellpopulation in verschiedenen Organismen.²³ Seit der Entdeckung konnten viele weitere QS-Systeme (*rhl*, *pqs*, *iqs*), die durch extrazelluläre Signalmoleküle gesteuert sind, identifiziert werden.^{24–26} In Gram-positiven Bakterien sind es häufig autoinduzierende Peptide, die prozessiert und sekretiert werden.^{27, 28} So kommt es bei hohen extrazellulären Konzentrationen zur Signalweiterleitung durch Interaktion mit Histidin-Kinaserezeptoren.²⁹ Im Vergleich dazu spielen in Gram-negativen Bakterien niedermolekulare Verbindungen als Autoinducer (AI) eine Rolle^{25, 30} und interagieren mit ihren dazugehörigen Rezeptoren.^{31, 32} Anhand von QS-Systemen werden Prozesse wie die Biolumineszenz, die Sporulierung, die Transformationskompetenz, die Antibiotikaproduktion, die Biofilmproduktion und die Sekretion von Virulenzfaktoren gesteuert.^{30, 33–37}

P. aeruginosa ist dabei als Modellorganismus für QS bekannt. In den letzten Jahren konnte sich ein hierarchisches QS-System aus *las*, *iqs*, *pqs*, *rhl* etablieren, welches hochadaptierbar auf externen Stress die Steuerung von Virulenzfaktoren modulieren kann.²⁶ Das *las*-QS-System besteht dabei aus LasI zur Biosynthese des AI *N*-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserinlaktone (3OC12HSL) und dem Transkriptionsaktivator LasR.³⁸ Dies zeigt sich analog im *rhl* QS-System mit dem Transkriptionsregulator RhIR und der Synthase RhIII mit dem AI *N*-butyryl-L-Homoserinlaktone (C4HSL).^{31, 39, 40} Beide Systeme sind dabei durch Interaktion des *rhlR* mit dem 3OC12HSL-LasR-Komplex reguliert und steuern die Produktion extrazellulärer Virulenzfaktoren.^{38, 41, 42} Das dritte QS-System besteht aus dem Gencluster *pqsABCD* und dem dazugehörigen AI 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1H)-quinolon (PQS) und steuert die *N*-Acyl-Homoserinlaktone (AHL)-assoziierte Bildung von Virulenzfaktoren.^{25, 43, 44} Die QS-Systeme sind dabei in einer hierarchischen Ordnung zueinander verbunden.^{45, 46} Dabei spielt das *las*-System eine übergeordnete Rolle und kontrolliert die nachgeschalteten *pqs*- und *rhl*-Gene.^{25, 47} Ein weiterer Zell-Zell-Kommunikationsweg ist der *diffusible signal factor*, welcher die Regulation der Virulenzfaktorproduktion und Biofilmverteilung steuert.^{48, 49} Nachfolgend sind die AIs und deren bekannten Derivate aus QS-Signalwegen dargestellt (Abbildung 2).

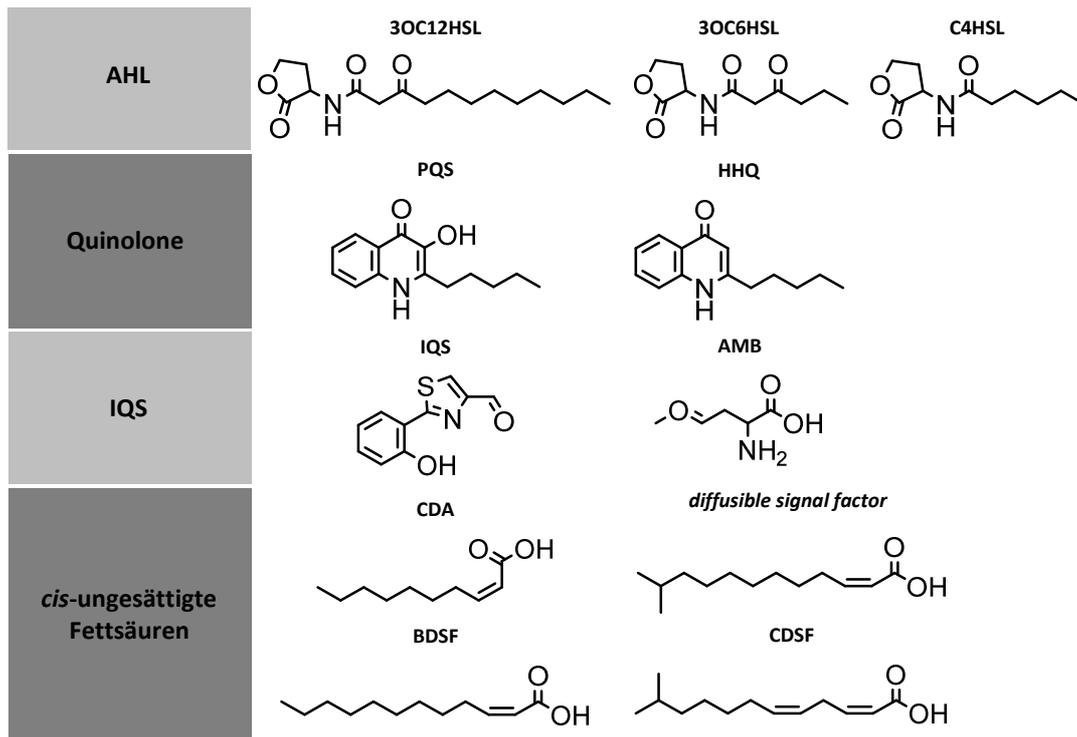


Abbildung 2: Autoinducer und deren bekannte Derivate aus verschiedenen *quorum sensing*-Signalwegen. AHL = *N*-Acyl-Homoserinlaktone, 3OC12HSL = *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-Homoserinlaktone, 3OC6HSL = *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-Homoserinlaktone, C4HSL = *N*-butyryl-*L*-Homoserinlaktone, PQS = 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1H)-Quinolone, HHQ = 2-heptyl-4-(1H)-Quinolone, IQS = 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazol-4-Carbaldehyd, AMB = *L*-2-amino-4-methoxy-*trans*-3-Butensäure, CDA = *cis*-2-Decansäure, *diffusable signal factor* = *cis*-11-methyl-Dodecansäure, BDSF = *cis*-2-Dodecansäure, CDSF = *cis*-11-methyl-dodeca-2,5-Diensäure. (modifiziert nach ⁵⁰)

1.3 Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

Virulenzfaktoren werden von Mikroorganismen für deren pathogene Wirkung produziert. Diese erlauben dem Organismus, strategisch auf Umwelteinflüsse oder die wirtseigene Immunabwehr zu reagieren und diese zu überleben.^{51, 52} So konnten bereits beim Vergleich von *P. aeruginosa*-Isolaten aus akuten und chronischen Infektionen erhebliche Unterschiede im Phänotyp des Organismus aufgedeckt werden.⁵³ Die Virulenz von *P. aeruginosa* wird durch den Wechsel vom beweglichen zum sesshaften Lebensstil herabgesetzt, um die veränderten Umwelteinflüsse im Wirt zu überleben.⁵⁴ Außerdem kommt es beim Übergang von akuten zu chronischen Infekten zu einer QS-abhängigen Genexpression, in deren Verlauf es zur Ausbildung von Biofilm und zur Produktion von Virulenzfaktoren kommt.⁵⁵ Letztere werden generell in zellassoziierte und sekretierte Virulenzfaktoren eingeteilt.

Neben den für die bakterielle Chemotaxis verwendeten Flagellen und Typ IV-Pili sind mit den Lipopolysacchariden (LPS) auch einzelne Membranfragmente als zellassoziierte Virulenzfaktoren beschrieben.^{54, 56} Die proteinogenen Fortsätze fungieren dabei als Adhäsine und ermöglichen durch verschiedene Bewegungseigenschaften eine koordinierte Anhaftung an Oberflächen und rufen durch Bindung des asialyerten Glykolipids asioloGM1 eine starke Immunantwort hervor.^{57, 58}

Durch die Anhaftung kommt es zur Konzentrierung und Aggregation der Zellen, wodurch sich Mikrokolonien bilden, die Schutz vor der wirtseigenen Immunantwort und Antibiotika liefern.⁵⁹ Die äußere Membran von *P. aeruginosa* setzt sich teilweise aus LPS zusammen, fungiert dort als Aktivator für die Immunabwehr des Wirts und kann durch eine dysregulierte Immunantwort zur Morbidität und Mortalität führen.⁵⁶

Sekretierte Virulenzfaktoren bestehen neben den niedermolekularen Verbindungen wie Rhamnolipiden, Alginaten, Siderophoren und Pyocyanin auch aus Proteinen und Toxinen.⁴⁶ Rhamnolipide sind Biotenside, die durch ihre nekrotische Eigenschaft Leukozyten inaktivieren können.^{60, 61} Alginate, als eine der Hauptkomponenten des Biofilms, sind besonders in mukoiden *P. aeruginosa* Phänotypen vorzufinden und dienen als Schutz gegen die Immunantwort und etwaige Antibiotikabehandlungen.^{62, 63} Die Siderophore Pyoverdin und Pyochelin fungieren als Eisenchelatoren und werden als Stressantwort von *P. aeruginosa* auf Eisenmangel gebildet.⁶⁴ Dabei spielen sie in der akuten Infektion und der Biofilmbildung eine entscheidende Rolle in der Überlebensstrategie und der Pathogenität.^{65, 66} Das blau-grüne Pigment Pyocyanin führt im Wirt zu oxidativem Stress und ist in der Lage, Fe^{3+} aus Wirtsproteinen zu Fe^{2+} zu reduzieren.^{67, 68} Außerdem ist *P. aeruginosa* durch Pyocyanin in der Lage, reaktiven Sauerstoffspezies aus phagozytischen Zellen zu widerstehen.^{69, 70}

Die sekretierten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* werden QS-abhängig über Sekretionssysteme aus der Zelle geschleust.⁷¹ Dabei wird die Vielzahl der Toxine über die Typ I – Typ III Sekretionssysteme über die Membran in die Zellperipherie transportiert.⁷¹ Diese Toxine sind dabei häufig hydrolytische Proteine wie z. B. Proteasen, Lipasen und Phospholipasen.⁷¹

Über das Typ I-Sekretionssystem wird eine alkalische Protease sekretiert, die als Metalloprotease am Abbau von Wirtsproteinen und Fibronectin beteiligt ist.^{72, 73} Außerdem konnte ein Eingreifen dieser alkalischen Protease in den Flagellin-Signalweg gezeigt werden, wodurch es zum Abbau von Flagellin-Monomeren kommt und somit eine Immunreaktion des Wirts vermieden wird.⁷⁴

Charakteristische Virulenzfaktoren, die über das Typ II-Sekretionssystem transportiert werden, sind die beiden Elastasen LasA und LasB, das Exotoxin (Exo) A und die Phospholipase C (PLC) PlcB.^{75–77} LasA besitzt im Vergleich zu LasB nur einen weitaus geringeren Anteil an elastolytischer Aktivität, jedoch wird LasA eine verstärkende Eigenschaft für LasB zugeschrieben.^{75, 78} LasA, auch als Staphylolysin bekannt, ist in der Lage, eine Pentaglycin-Brücke zu hydrolysieren, die zur Stabilisierung des Peptidoglykans von Staphylokokken dient.⁷⁹ LasB spielt mit einer elastolytischen Aktivität eine große Rolle in der Infektion von Lungen in der zystischen Fibrose und dem Abbau von Kollagen.^{80, 81} Ferner ist es in der Lage, Immunglobuline, die durch eine Immunantwort freigesetzt werden, abzubauen.^{82, 83} Mit dem ExoA sekretiert *P. aeruginosa* eine Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase (ADPRT), die zum Stopp der Proteinsynthese durch Inhibierung des Elongationsfaktors 2 führt.⁸⁴ Im Mausmodell konnte beim Vergleich von ExoA-produzierenden *Pseudomonas*-Stämmen mit ExoA-defizienten *Pseudomonas*-Stämmen eine 20-fach höhere Virulenz ermittelt

werden.⁸⁵ Des Weiteren wird durch ExoA der Zelltod durch Apoptose induziert, weshalb es als Immuntoxin gegen Krebszellen in den Fokus der Untersuchungen gerückt ist.^{86, 87}

Das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) kann durch eine nadelförmige Struktur Toxine direkt ins Zytoplasma des Wirts injizieren.⁸⁸ Die Expression des T3SS ist direkt mit einer akuten, invasiven Infektion assoziiert und konnte mit einer erhöhten Mortalität verknüpft werden.^{88, 89} Für das T3SS wurden die vier Virulenzfaktoren ExoS, ExoU, ExoY und ExoT beschrieben.⁸⁸ Dabei zeigen diese in verschiedenen Stämmen unterschiedlich starke Produktionsstärken und erzeugen meist nur eins der Haupttoxine ExoU oder ExoS.⁹⁰ Das ExoS ist bifunktional und besitzt am N-Terminus Aktivität als Guanosintriphosphatase aktivierendes Protein (GAP) und C-terminale Aktivität als ADPRT.⁹¹ Dadurch spielt ExoS eine Rolle in der zytoskelettalen Organisation von Aktin.^{91, 92} Auf ExoU wird in den folgenden Kapiteln weiter eingegangen. ExoY ist eine lösliche Adenylyl- und Guanylylcyclase und stört durch die gebildeten zyklischen Nukleotide die Signalvermittlung in der Zelle. Zudem kommt es zu einer Desorganisation des Zytoskeletts der Zelle und einer Inhibierung der Immunantwort im Wirt.^{93–95} ExoT ist ebenso wie ExoS ein bifunktionales Toxin mit N-terminaler GAP-Domäne und C-terminaler ADPRT-Domäne.^{96, 97} Innerhalb der Pathogenität von *P. aeruginosa* nimmt ExoT dabei eine wichtige Rolle ein, da es als einziges Exotoxin des T3SS in allen virulenten *P. aeruginosa*-Isolaten belegt werden konnte.⁹⁸ Neben dem Einfluss auf die Wundheilung und das Aktin-Zytoskelett führt die Produktion von ExoT zur Induktion der Apoptose.^{99–101}

1.4 Phospholipasen als bakterielle Virulenzfaktoren

Als Unterklasse der Lipasen / Esterasen sind Phospholipasen ubiquitär sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen zu finden und übernehmen dort eine Fülle an zellulären Aufgaben, wie z. B. in Entzündungsreaktionen, in der Bildung von sekundären Botenstoffen sowie in der Zusammensetzung und Synthese von Membranen.^{102–105} Begünstigend wirkt sich dabei die Beteiligung von Phospholipasen als Virulenzfaktor auf die Invasion und anschließende Besiedlung eines Wirts durch pathogene Bakterien aus. Evolutionär sind Phospholipasen / Lipasen innerhalb ihrer katalytisch aktiven Zentren und charakteristischen Sequenzmotive zudem unterschiedlich stark konserviert.^{106–110} Phospholipide, als typische Substrate von Phospholipasen, sind auf subzellulärer Ebene als Einzel- oder Doppelschicht vorzufinden. Der Aufbau eines Phospholipids (PL) setzt sich dabei aus einem Glycerol-Rückgrat, an dem zwei Fettsäuren verestert vorliegen, sowie einer Phosphatgruppe zusammen. Hierbei bildet die Phosphatgruppe als Phosphorsäurediester eine Bindung zu einer charakteristischen Kopfgruppe aus. Neben Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC) sind Sphingomyelin, Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) als kennzeichnende PLs in Säugerzellen zu nennen.^{111–113} Die Zusammensetzung der Membran in *P. aeruginosa* besteht hingegen hauptsächlich aus PE, Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL). In geringerem Maße konnten auch Phosphatidsäure (PA) und Ornithinlipide detektiert werden. Für letztere konnte in *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) bereits gezeigt werden, dass diese unter phosphatlimitierenden Bedingungen als einziges polares Lipid gebildet werden.^{114–116}

1.4.1 Klassifizierung von Phospholipasen und deren Eigenschaften

Eine Einteilung von Phospholipasen kann anhand ihrer enzymatischen Hydrolysestellen innerhalb von PLs in Acylhydrolasen und Phosphodiesterasen vorgenommen werden. Dabei werden Phospholipasen spezifisch ihrer hydrolysierten Esterbindung mit den Buchstaben A - D benannt (Abbildung 3). Insofern werden die veresterten sn-1- und sn-2-Positionen des Glycerol-Rückgrats durch die Acylhydrolasen Phospholipase A₁ (PLA₁) bzw. Phospholipase A₂ (PLA₂) zur freien Fettsäure (FFS) und dem entsprechenden Lysophospholipid (LysoPL) abgebaut. Mit einer Lysophospholipase A (LysoPLA) kann das entstandene LysoPL weiter hydrolysiert werden. Phospholipasen B (PLB) sind in der Lage beide veresterten Fettsäuren abzuspalten. Die zur Gruppe der Phosphodiesterasen gehörenden PLCs und Phospholipasen D (PLD) hydrolysieren PLs an der Glycerol-orientierten bzw. der Alkohol-orientierten Seite zu 1,2-Diacylglyceriden (DAG) und Phosphorylalkohol bzw. PA und einem Alkohol (Abbildung 3).¹¹⁷ In erster Linie richtet sich die Substratspezifität von Phospholipasen nach den gebundenen Fettsäuren und der polaren Kopfgruppe des PL.¹¹¹ Im Laufe dieser Arbeit wurde eine PLA₁ aus *P. aeruginosa* charakterisiert, weshalb sich im weiteren Verlauf dieses Abschnitts auf die Klassifizierung und die generellen Eigenschaften von PLAs fokussiert wird.

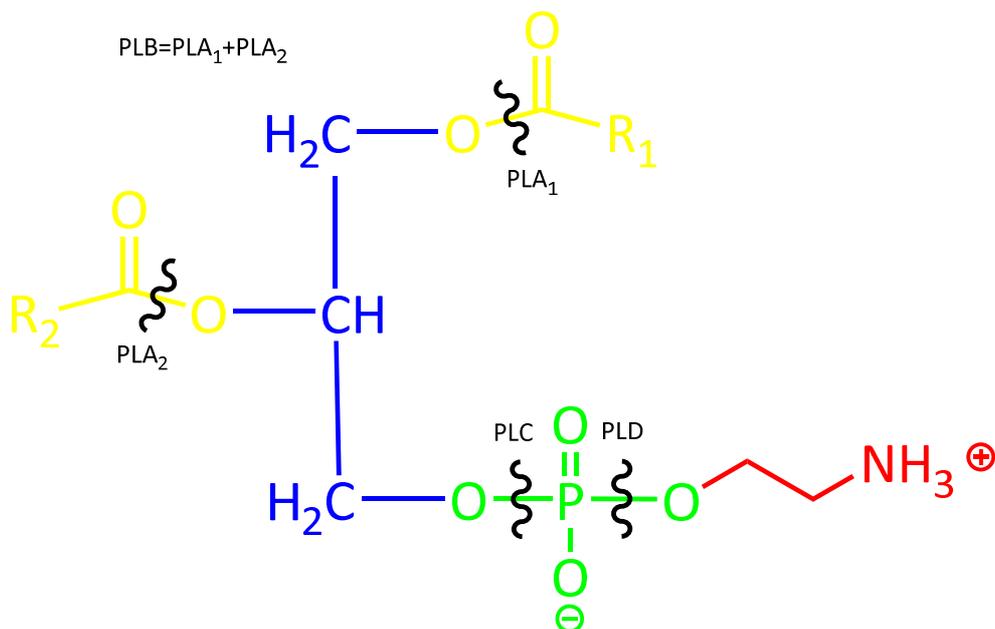


Abbildung 3: Darstellung eines Phospholipids am Beispiel des Phosphatidylethanolamins und der enzymatischen Spaltungsstellen verschiedener Phospholipasen. Als Phosphoglycerolipid besitzt Phosphatidylethanolamin ein Rückgrat aus Glycerol (blau). Als Substituenten liegen an der sn-1- und sn-2-Position (gelb) des Glycerols zwei Fettsäuren (R₁ und R₂) und an der sn-3-Position eine Phosphatgruppe (grün) verestert vor. Am Phosphatrest ist zudem eine polare Kopfgruppe, wie in diesem Fall z. B. Ethanolamin (rot), verestert.

Die Einteilung bakterieller Acylhydrolasen / Lipasen erfolgte auf Grund von Aminosäuresequenzen und grundlegenden biologischen Eigenschaften in acht verschiedene Familien, wobei die größte Familie in sechs weitere Unterfamilien unterteilt ist. Neben der typischen α,β -Hydrolasefaltung ist allen Mitgliedern dieser Familien die Benutzung einer katalytischen Triaden aus Ser-Asp-His gemein. Dabei konnte PLA-Aktivität in den ersten beiden Familien identifiziert werden.¹⁰⁷

Die als echte Lipasen bezeichnete Familie I ist in sechs Unterfamilien gegliedert und hydrolysiert charakteristischerweise neutrale Lipide. Innerhalb Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien ist die Familie I am stärksten vertreten.^{107, 109} Charakteristisch für diese Familie sind zum einen das konservierte Gly-X-Ser-X-Gly-Motiv innerhalb der katalytischen Triade und zum anderen auch zwei Aspartate, die zur Ca^{2+} -Bindung fungieren. Neben der Hydrolyse von neutralen Lipiden konnten einige echte Lipasen aus *Staphylococcus hyicus* und *Staphylococcus warneri* mit Phospholipase-Aktivität identifiziert werden.^{118, 119}

Das Charakteristikum der Familie II ist das Umgebungsmotiv des katalytischen Ser mit Gly-Asp-Ser-(Leu/Ile), weshalb diese auch als GDSL-Esterasen bezeichnet werden. Zusätzlich dazu besitzt diese Familie spezielle, konservierte Bereiche, die in fünf Blöcke eingeteilt sind. In Block I ist das zuvor erwähnte GDSL-Motiv enthalten. Die beiden restlichen Aminosäuren der katalytischen Triade Asp und His befinden sich als Asp-X-X-His-Motiv innerhalb des Block V.^{106, 107, 110} Neben einer Vielzahl an Bakterien exprimieren auch höhere Pflanzen Vertreter dieser Familie.^{106, 110, 120}

GDSL-Esterasen besitzen im Vergleich zu anderen Acylhydrolase / Lipase-Familien Abweichungen von der typischen α,β -Hydrolasefaltung. Zusätzlich unterscheiden sie sich innerhalb der Distanz von N-Terminus zum katalytisch aktiven Ser-Aminosäurerest und der Position der restlichen katalytischen Triade zueinander.^{106, 110, 121} Mit PLA- und LysoPLA-Aktivität sowie hämolytischer und Acyltransferase-Aktivität zeigen die Vertreter der Familie II eine erweiterte Substrat- und Regio-spezifität.^{107, 110, 122–124} Ein Beispiel dafür ist die Glycerophospholipid:Cholesterol-Acyltransferase (GCAT) SatA aus *Aeromonas salmonicida*, indem es Fettsäuren auf das für Bakterien untypische Cholesterol überträgt.^{125, 126}

Durch Sequenz-Homologieanalysen mit Patatin, einem in der Kartoffelknolle weitverbreiteten Protein mit Lipidacylhydrolase-Aktivität, konnte die Lipasefamilie der Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) gefunden werden.^{108, 127–130} Das katalytisch aktive Ser ist als Gly-X-Ser-X-Gly-Motiv in den Homologie-Block II und das zur katalytischen Diade gehörende Asp als Asp-Gly-Motiv in den Homologie-Block IV eingebettet. Bakteriellen Lipasen ist dabei charakteristisch gemein, dass sie neben der Diade einen Abschnitt mit Gly-Resten am N-Terminus besitzen.^{108, 131–133} Eukaryotische PLPs unterscheiden sich durch ein im Block III enthaltenes, konserviertes Prolin-Motiv. Das eukaryotische Ala-Ala-Pro-Motiv ist im Gegensatz zu bakteriellen PLPs durch das Ala-Ser-X-X-X-Pro-Motiv beschrieben.^{108, 131} Im Allgemeinen sind bakterielle PLPs, wie VipD/PatA, VpdA/PatC, PatD,

VpdC/PatF und VpdB/PatG aus *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) sowie PlpD aus *P. aeruginosa* nur in geringem Maße charakterisiert.^{134–140}

Mit der Entdeckung von PlaB aus *L. pneumophila* wurde eine neue Gruppe bakterieller Lipasen identifiziert und nach dem einzigen Mitglied PlaB benannt.¹⁴¹ Diesem Enzym wird neben hämolytischer Aktivität auch PLA- und LysoPLA-Aktivität zugeschrieben. In Homologie-Analysen konnten mit hypothetischen Proteinen wasserassoziierter Bakterien bis dato keine signifikanten Homologe charakterisiert werden.¹⁴² Dies lässt sich auf unbekannte Motive der typischen, katalytischen Triade zurückführen. In dem ungewöhnlichen Thr-X-Ser-X-Gly-Motiv liegt das katalytische Ser eingebettet vor. Ebenso zeigen sich die atypischen Motive Gly-Ser-Asp-Gly-Val-Val bzw. Ser-His-Ser für die beiden restlichen Aminosäuren Asp und His der katalytischen Triade.^{141, 142}

1.4.2 Bakterielle Phospholipasen und deren Rolle in der Virulenz

Sowohl intrazellulär lebende als auch extrazellulär lebende Bakterien produzieren Virulenzfaktoren mit phospholipolytischer Aktivität. Als Gram-positive Bakterien sind neben verschiedenen *Clostridium*- und *Bacillus*-Spezies auch *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Corynebacterium pseudotuberculosis* bekannt. Mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *L. pneumophila*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* und *P. aeruginosa* sind ebenfalls Gram-negative Bakterien vorzufinden. Eine wesentliche Beeinflussung der bakteriellen Pathogenität dieser Stämme findet durch die produzierten Phospholipasen statt.^{111, 143–150} Die Einflüsse auf die die Wirtszelle durch Abbauprodukte bakterieller Phospholipasen lassen sich dabei in zytolytisch / destruktive Eigenschaften und die Manipulation von Signaltransduktionswegen einteilen (Abbildung 4).

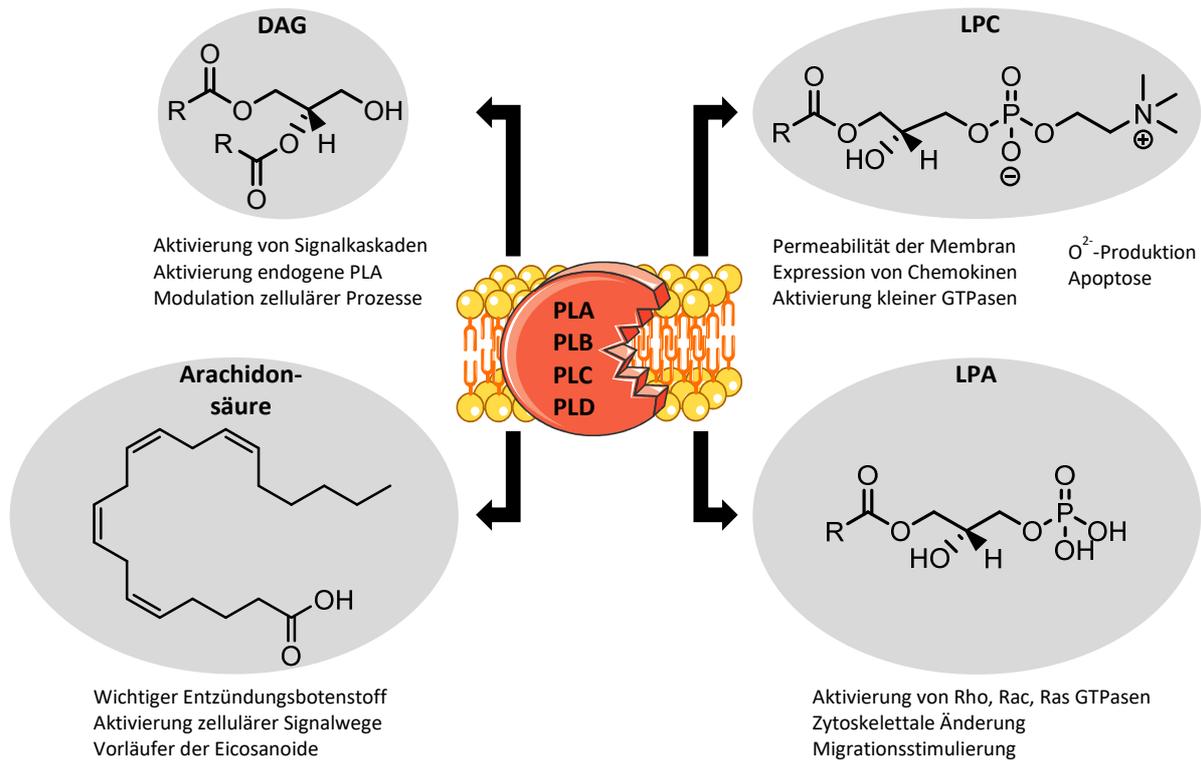


Abbildung 4: Einflüsse auf die Wirtszelle durch Abbauprodukte bakterieller Phospholipasen. Neben dem unmittelbaren Membranabbau kann auch ein Effekt phospholipolytischer Enzyme durch produzierte, sekundäre Botenstoffe auftreten. Hierbei sind besonders Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidsäure (LPA), 1,2-Diacylglycerid (DAG) und Arachidonsäure zu nennen, welche die Signalkaskaden der Wirtszelle, als auch inflammatorische oder apoptotische Abläufe beeinflussen. Eine Konsequenz kann die Aktivierung von Guanosintriphosphatasen (GTPase) sein.

Die Hydrolyse von PLs auf Grund der zytolytischen Eigenschaften bakterieller Phospholipasen bestimmt im großen Maßstab deren Toxizität. Diese wird dabei durch Zelltoxizität, indem es zum Abbau struktureller Lipide und der Zerstörung der Zellintegrität kommt, aber auch durch die Produktion lytischer oder membranverändernder Reaktionsprodukte bestimmt.^{111, 151} Solche Reaktionsprodukte aus der Hydrolyse von PLs können als sekundäre Botenstoffe entzündliche Prozesse modulieren oder manipulativ auf die Signalkaskaden in Wirtszellen wirken. Hierbei ist besonders mit LPC (LPC), Lysophosphatidsäure (LPA) und DAG, das ehemalige Glycerol-Rückgrat vorzufinden. Allerdings sind mit Arachidonsäure auch einzelne FFS als Modulatoren bzw. Manipulatoren bekannt (Abbildung 4).^{102, 152, 153} LPCs werden in eukaryotischen Zellen unterschiedliche Funktion zugeschrieben. Einerseits wird das Nicotinamidadenindinukleotid / Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase-System durch LPC aktiviert und führt zur Freisetzung von Superoxid-Anionen. Andererseits führt die LPC-Erzeugung zur Produktion des Chemokins Interleukin-8 und es kommt zur Aktivierung der kleinen Guanosintriphosphatase (GTPase) RhoA. Hierdurch kommt es zur Vermittlung von Entzündungsprozessen und Apoptose, aber auch einer erhöhten Endothel-permeabilität.^{154–157} ExoU aus *P. aeruginosa* beispielsweise besitzt PLA- und LysoPLA-Aktivität und kann durch ein breites Substratspektrum den nekrotischen Zelltod durch induzierte zytotoxische Effekte bewirken.^{158–162} Dies ermöglicht dem extrazellulär lebenden Lungenerreger *P. aeruginosa*

die Dissemination im Blutstrom durch zerstörte Epithel- und Endothelzellen.⁸⁸ Zu den zuvor beschriebenen Eigenschaften von ExoU kommt es *in vivo* zur Auslösung einer Arachidonsäure-abhängigen Entzündungskaskade, da ExoU ein Homolog zu einer eukaryotischen, zytosolischen PLA₂ ist. Mit der Induktion zur Bildung spezifischer Transkriptionsfaktoren und proinflammatorischer Eicosanoide kommt es zur Regulation der Produktion von Zytokinen, die ihrerseits Neutrophile rekrutieren.^{163–166}

Die Regulation verschiedener Signaltransduktionswege und Proteinkinase C-Aktivierung werden DAG zugeschrieben.^{167, 168} Das durch verschiedene Phospholipasen zugängliche LPA führt zu Veränderungen in der Zellproliferation, der Migration des Zytoskeletts und der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen durch Aktivierung von GTPasen wie Ras, Rac und Rho.^{169–172} Des Weiteren wurde mit dem GDSL-Enzym SseJ aus *Salmonella typhimurium* eine Phospholipase identifiziert, die zur Bakterien-induzierten Membranverlängerung führt. Dabei werden die *Salmonella*-induzierten Filamente (Sif), als tubuläre Verlängerungen von der *Salmonella*-beinhaltenden Vakuole, durch die PLA- und GCAT-Aktivität von SseJ reguliert.

1.5 Steuerung der Proteinfunktion durch strukturelle Änderungen

Die Regulation der biologischen Funktion von Proteinen laufen häufig nicht intrinsisch, sondern extrinsisch durch die Bindung an weitere Proteine oder Liganden, ab.^{173, 174} Dabei erfolgt die Proteininteraktion an speziellen Schnittstellen auf der Proteinoberfläche, sogenannten Bindetaschen.¹⁷³ Diese Bindetaschen werden häufig durch spezifische Aminosäuren im Kern oder am Rand der Schnittstelle charakterisiert.^{175–178} Oftmals werden die Bindungsaffinität und -spezifität durch kleine Teilbereiche der Aminosäurerest der Grenzfläche, sogenannte *hot spots*, ausgelöst.¹⁷⁹

Der Zusammenhang zwischen der veränderten Struktur und der daraus resultierenden Proteinfunktion wird in der Literatur als Struktur-Funktionsbeziehung beschrieben. Die Interaktionen können dabei neben stabilisierenden Effekten auch zelluläre Funktionen übernehmen.^{180, 181} Dabei sind besonders die Steuerung der enzymatischen Aktivität und die Fähigkeit, weitere Bindungen einzugehen, zu nennen.¹⁸² Des Weiteren kann auch subzelluläre Lokalisierung, der oligomere Zustand oder der Wechsel zwischen verschiedenen enzymatischen Aktivitäten geregelt werden.¹⁸²

1.5.1 Protein-Protein-Interaktionen

Nahezu alle biologischen Prozesse werden nicht durch einzelne isolierte Proteinentitäten gesteuert, sondern liegen auf Grund von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) in einem dynamischen Netzwerk vor und fungieren häufig als Multiproteinkomplex.^{183, 184} Aus diesem Grund besitzen PPIs neben der eigentlichen Proteinaktivität eine außerordentlich wichtige Funktion im Verständnis für die biologische Rolle eines Proteins. Eine Unterscheidung von PPIs kann anhand ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Interaktionspartnern (Heterooligomere) oder gleichen Interaktionspartnern (Homooligomere) vorgenommen werden.

Allein im menschlichen Körper wird die Ausbildung von Proteinkomplexen durch PPIs auf 130.000¹⁸³ – 650.000¹⁸⁴ geschätzt. Ein prominenter Vertreter humaner PPIs ist das hochkonservative Adapterprotein 14-3-3, welches human in sieben Isoformen vorliegt und mit mehr als 200 Interaktionspartnern wechselwirkt. Innerhalb der Familie der 14-3-3-Proteine sind diese in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterodimere auszubilden und steuern darüber die Stabilität und die Funktion *in vivo*.¹⁸⁵ Die Funktion von 14-3-3 liegt dabei in der Regulation von zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion, der Zellzykluskontrolle, dem Metabolismus, der Apoptose, der Transkription, der Stressantwort und malignen Transformation.^{186, 187} Im Zentrum dieser vielfältigen, zellulären Prozesse befinden sich Interaktionspartner wie z. B. Raf-Kinasen^{188, 189}, die Zellzyklus-Phosphatase Cdc^{190, 191}, der Transkriptionsmodulator YAP^{192, 193} und der Tumorsuppressor p53, die mit Krankheitsprozessen in Verbindung stehen.

Innerhalb prokaryotischer Zellen koordinieren PPIs mit der Regulation der Genexpression¹⁹⁴, der DNA-Replikation^{195, 196}, der Signaltransduktion^{197, 198} und Virulenz^{180, 181, 199} ebenso wichtige Prozesse wie in Eukaryoten. Besonders in der bakteriellen Virulenz kommt es zu PPIs zwischen Virulenzfaktoren und eukaryotischen Aktivierungsfaktoren. *P. aeruginosa* sekretiert beispielsweise über das T3SS ExoS und ExoT, die durch PPIs mit den ubiquitär, eukaryotischen 14-3-3-Proteine aktiviert und gegenüber thermischer Aggregation stabilisiert werden.¹⁸¹ Darüber hinaus werden die ebenfalls über das T3SS sekretierten ExoU und ExoY durch die eukaryotischen Faktoren Ubiquitin¹⁹⁹ bzw. Aktin¹⁸⁰ aktiviert.

Neben der Aktivierung von Virulenzfaktoren können PPIs auch das Bakterium vor der schädigenden Wirkung eigens produzierter Virulenzfaktoren schützen. *P. aeruginosa* beispielsweise deaktiviert die Nuklease Tse7 durch spezifische Bindung mit dem Immunitätsprotein Tsi7.²⁰⁰ Weiterhin konnte mit der Interaktion zwischen dem Cholera toxin aus *Vibrio cholerae* und dem Chaperon HSP90 eine Translokation der katalytischen Untereinheit des Toxins vom endoplasmatischen Retikulum zum Zytosol identifiziert werden.²⁰¹

1.5.2 Protein-Liganden-Interaktionen

Die Protein-Liganden-Interaktionen (PLI) als molekulare Erkennung, spielen neben den PPIs eine wichtige Funktion in natürlichen Lebensprozessen.²⁰² Neben dem in 1.5.1 beschriebenen PPIs beeinflussen die PLIs mit Membranen, (Phospho-) Lipiden und niedermolekularen Stoffen die biologische Funktion ihrer jeweiligen Proteinparker.^{203–208} Aus diesem Grund ist das Verständnis von PLIs auf molekularer Ebene essenziell, um gezielt solche Interaktionen steuern zu können, wie z. B. bei der Entwicklung neuer Arzneimittel.

Einerseits lassen sich Membranproteine durch stark hydrophobe Bereiche aus Aminosäureresten wie Leucin, Isoleucin und Phenylalanin charakterisieren, die typischerweise zur Membranassoziiierung führen.^{209, 210} Andererseits wird die Membranverankerung durch oberflächenexponierte Ami-

nosäuren von Membranproteinen mit der Lipiddoppelschicht ausgeführt bzw. unterstützt.²¹¹ Zwischen dem hydrophoben Membraninneren und den Lipidkopfgruppen lagern sich bevorzugt die polaren Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan an.^{209, 210} In Prokaryoten konnten spezifische Membrandomänen gefunden werden, die modulierend auf Proteine einwirken können.²⁰³ Die CL-reichen Domänen formen polare Domänen in der bakteriellen Membran von *E. coli* mit der sie die Lokalisierung und Aktivität von Transportern modulieren.^{212–215} Als Funktion solcher CL-Domänen, vermutlich durch deren negative Krümmung, werden Prozesse in der Zellteilung und der Auswahl der Teilungsstelle beschrieben.^{216, 217} Domänen die mit PG angereichert sind, zeigen eine helikale Struktur innerhalb von *B. subtilis*-Zellen.²¹⁸ Die PG-reichen Domänen bewirken eine lokal erhöhte Membranfluidität und beeinflusst die Lokalisierung und Diffusion von Membranproteinen.²¹⁹ Ähnlich den *lipid rafts* in Eukaryoten konnten in Prokaryoten *lipid raft*-ähnliche Membrandomänen detektiert werden, die statt Cholesterol Polyisoprenoid-Lipide anreichern und als funktionelle Membranmikrodomänen (FMM) deklariert wurden.^{220, 221} Die in FMMs eingelagerten Proteine sind mit verschiedenen zellulären Funktionen, wie der Signaltransduktion^{220, 222, 223}, Membrantransport^{224–226} und der Metabolismusregulation^{224, 227, 228} assoziiert. Ebenso zeigen sich angereicherte Homologe zum eukaryotischen Flotillin innerhalb der FMMs.^{220, 226, 228, 229} Dort ermöglichen diese eine effiziente Assemblierung von Proteinkomplexen.^{230–232} Eine *coiled-coil*-Domäne im C-terminalen Ende der Flotilline ist am Aufbau von PPIs beteiligt.^{222, 223} Anhand eines monomeren Transmembran (TM)-Proteins konnte gezeigt werden, dass das Protein nur bis zur Oligomerisierung in den FMMs verweilt.²³³

Neben der Interaktion mit einer Membrangesamtheit können Proteine auch mit einzelnen Bestandteilen der Membran als Ligand spezifisch interagieren. Im Fall von (Phospho-) Lipiden kann dies durch hydrophobe Wechselwirkungen der Fettsäuren mit hydrophoben Aminosäuren oder anhand ionischer Wechselwirkungen zwischen der hydrophilen Kopfgruppe und hydrophilen Aminosäuren geschehen.²³⁴ ExoU aus *P. aeruginosa* erfährt durch die Bindung des PL Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat eine Konformationsänderung und lokalisiert so zur Plasmamembran in eukaryotischen Zellen.^{204, 205} Außerdem kommt es durch die Interaktion mit (Phospho-) Lipiden zur Grenzflächenaktivierung der Proteine, wobei es neben deren Oligomerstabilisierung auch zur Öffnung einer deckelartigen Domäne, der sogenannten *lid*-Domäne, kommen kann. Dies geht meist mit der Aktivierung der jeweiligen Proteine einher.^{235–237} Das in Prokaryoten häufig auftretende Diphosphatidylglycerol CL konnte durch die Interaktion mit Membranproteinen für deren Stabilisierung als auch deren Funktion verantwortlich gemacht werden.^{238–245}

Für die Stabilisierung, transkriptionelle Regulation und Virulenz spielen Interaktionen zu Ionen als Kofaktoren für Proteine eine ausschlaggebende Rolle in Zellen.^{206, 207, 246–252} Die *outer membrane phospholipase A* (OMPLA) aus *E. coli* beispielsweise stabilisiert durch die Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen die Bildung von Dimeren.^{206, 207} In bakteriellen Pathogenen konnte ein komplexes transkriptionelles Regulationsnetzwerk identifiziert werden, welches durch Metallionen gesteuert wird.^{250–253} Zusätzlich wurden Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa* entdeckt, die Zink als Kofaktor für deren

Aktivität benötigen und teilweise auch bei der Reifung von Virulenzfaktoren zum Einsatz kommen.^{246–249}

Die Interaktion von Membranproteinen mit Detergenzien liegt häufig schon den Reinigungsmethoden zu Grunde.²⁵⁴ Neben der Beibehaltung einer artifiziellen Membranumgebung zum Schutz der TM-Bereiche können Proteine auch Detergenzien als Liganden in putativen Bindestellen binden und als Substitut für natürliche Liganden fungieren.^{208, 255, 256} Für *n*-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) konnte gezeigt werden, dass es kompetitiv zu den zwei Anästhetika Propofol und Isofluran in Albumin und Apoferritin bindet.²⁵⁵ Für *n*-Octyl- β -D-Glucopyranosid (OG) konnte strukturell gezeigt werden, dass es in die Bindetasche eines Na⁺-Symporters bindet und dadurch eine geblockte Konformation einnimmt.²⁰⁸ Des Weiteren konnte für OG eine vom Partnerprotein-unabhängige Dimerbildung mit dem Nef-Protein aus dem Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) festgestellt werden.²⁵⁶ Die Dimerbildung ist dabei typischerweise an der Aktivierung der Protein-Tyrosinkinasen Hck und der Rekrutierung von AP-2 sowie der Regulierung von CD4-Korezeptoren beteiligt.²⁵⁷

1.6 PlaF – eine neu entdeckte Phospholipase A aus *P. aeruginosa*

Die Anwendung lipolytischer Enzyme als industrielle Biokatalysatoren ist heutzutage wichtiger denn je, da diese häufig auch unter harschen Temperatur-, Salz- oder Lösungsmittelbedingungen ihre Stabilität und Aktivität beibehalten.^{258, 259} In der organischen Synthese von Biopharmazeutika wie Paclitaxel²⁶⁰, Naproxen²⁶¹ und Captopril²⁶² werden sie auf Grund ihrer Enantio-, Stereo- und Regioselektivität geschätzt. Zur Identifikation neuer putativer lipolytischer Enzyme wurde die *Pseudomonas* Genom-Datenbank analysiert, wobei an die hundert OLR gefunden werden konnten.²⁶³ Mit *pa2949* wurde ein Gen identifiziert, welches für ein 34,8 kDa großes Protein kodiert. Dieses Protein weist Homologien zu bereits bekannten Esterasen und Lipasen aus *P. aeruginosa* und den psychrophilen Bakterien *Moraxella species* und *Psychrobacter immobilis* auf.²⁶³ Beim Vergleich der Sequenzen konnte das typischerweise konservierte Lipasemotiv Gly-X-Ser-X-Gly aufgefunden gemacht und die katalytische Triade mit Ser137, Asp258 und His286 bestimmt werden.²⁶³ Mit der Entwicklung einer heterologen und homologen *pa2949*-Expression und der Identifizierung einer N-terminalen TM-Helixverankerung in der Zytoplasmamembran konnte gleichzeitig auch eine Reinigung von produziertem PA2949 erfolgen.^{263–265} Diese Detergens-basierte Reinigung erlaubte eine weiterführende biochemische und physiologische Charakterisierung des als PlaF betitelten produzierten PA2949.^{263–265}

1.6.1 Biochemische Charakterisierung der PlaF-Funktion

Anhand biochemischer Analysen konnte die Esteraseaktivität von heterolog in *E. coli* produziertem PlaF mit einem artifiziellen *para*-Nitrophenylacylsubstrat (*p*NPAS) *in vitro* bestätigt werden.²⁶³ Ebenso konnte ein pH-Stabilitätsbereich von 7,5 – 8,5 identifiziert und das Temperaturoptimum auf 30 °C gesetzt werden.²⁶³ Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums zeigte PlaF auch bei

10 °C eine Restaktivität von 47 %, welches für mesophile Enzyme untypisch ist, da diese bei geringen Temperaturen inaktiv sind.^{263, 266} Dies indiziert ein eher psychrophiles Verhalten von PlaF, welches durch die zuvor beschriebenen Lipasehomologe aus psychrophilen Bakterien unterstützt werden kann.²⁶³

Die Zugänglichkeit für PlaF als industrieller Biokatalysator wurde durch dessen Aktivität bei Zugabe von verschiedenen Lösungsmitteln analysiert. Hierbei zeigte sich bei Zugabemengen von bis zu 30 Volumenprozent für nahezu alle getesteten Lösungsmittel Restaktivität. Auf Grund des Aufbaus von Membranproteinen aus einer membranverankerten Domäne und einer löslichen Domäne besitzen diese unterschiedliche Resistenzen zu hydrophoben (hoher $\log P$) oder hydrophilen (niedriger $\log P$) Lösungsmitteln.²⁶⁶ Besonders Diethylether und Methanol scheinen die Aktivität sogar zu verstärken.²⁶³ Durch die Testung verschiedener Lipaseinhibitoren konnte PlaF als Serinhydrolase identifiziert werden. Anhand von Mutagenitätsanalysen konnte das zuvor in bioinformatischen Sequenzvergleichen gefundene Ser137 als Teil der katalytischen Triade bestätigt werden.²⁶³

Die Etablierung der homologen Expression ermöglichte auch die Reinigung von PlaF aus *P. aeruginosa*.²⁶⁴ Beim Vergleich der Esteraseaktivitäten präsentierte sich das homolog produzierte Protein mit 2,3-facher Aktivität zu seiner heterolog produzierten Variante.²⁶⁴ Die Substratspezifität konnte mit artifiziellen *p*NPAS unterschiedlicher Kettenlänge getestet werden und wies die höchste Aktivität für *para*-Nitrophenyloctanoat auf. Zusätzlich dazu konnte das Substratspektrum um natürliche Triacylglyceride erweitert werden, wobei diese jedoch eine deutlich schwächere Aktivität als die *p*NPAS besaßen.²⁶⁴ Das Aktivitätsprofil von PlaF zeigte dementsprechend eine präferierte Freisetzung von mittelkettigen Fettsäuren.²⁶⁴ In weiterführenden Experimenten konnte PlaF auch eine PLA₁-Aktivität zugeschrieben werden, die die Umsetzung von natürlichen PCs, PEs und PGs mit unterschiedlichen Fettsäure-Kettenlängen ermöglichte.²⁶⁵

1.6.2 Auflösung der 3D-Struktur von PlaF

Die Etablierung einer Reinigung, welche konzentriertes, reines PlaF lieferte, ermöglichte auch erste Versuche zur Lösung der 3D-Kristallstruktur. Diese brachten erste Proteinkristalle, die eine Strukturauflösung von 2,54 Å erlaubten, hervor.²⁶⁴ In weiteren Schritten konnte die Auflösung auf 2,0 Å verfeinert und die Struktur gelöst werden (Abbildung 5).²⁶⁵

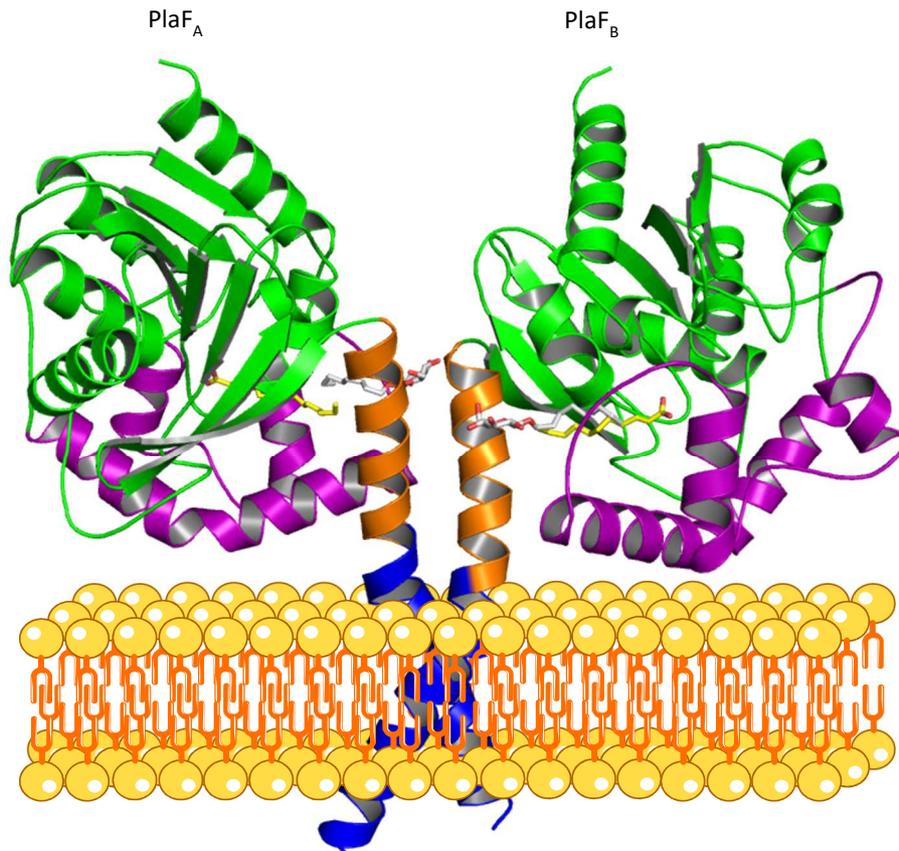


Abbildung 5: 3D-Kristallstruktur von PlaF in einer schematischen Lipid-Doppelschicht. Das Dimer setzt sich aus zwei PlaF-Monomeren (PlaF_A und PlaF_B) zusammen. Dabei sind die hydrophoben Bereiche der Transmembranhelices (blau) in die zur Visualisierung eingefügte Lipid-Doppelschicht eingelagert. Daran anschließend ist die hydrophilere Juxtamembranregion (orange) dargestellt. Mit den in Lila dargestellten Domänen zeigen sich putative Membraninteraktionsdomänen, die sich durch ihre hohe Anzahl an geladenen Aminosäure-Seitenketten charakterisieren. Ferner sind die katalytisch aktiven Domänen mit den katalytischen Triaden in Grün abgebildet. Die endogenen Fettsäuren (gelb) und die exogenen Liganden OG (weiß) sind in Stäbchenform in der Struktur zu erkennen. (PDB-ID: 6I8W)

Die ermittelte Struktur ist aus zwei PlaF-Monomeren (PlaF_A und PlaF_B) mit den Aminosäuren 1 - 310 dargestellt.²⁶⁵ Zusätzlich dazu konnten Myristinsäure (C14), OG, Isopropylalkohol (IPA) und Undecansäure (C11) als Liganden identifiziert werden.²⁶⁵ Mit den ersten 38 Aminosäuren des N-Terminus wurde die TM-Helix deklariert, die wiederum mit ihren hydrophoben Aminosäuren 5 – 27 in der Membran verankert vorliegt.²⁶⁵ Die Aminosäuren 28 – 38 beinhaltende Juxtamembran (JM)-Domäne zeigt hydrophilere Eigenschaften und verbindet die Membrandomäne mit der katalytischen Domäne von PlaF.²⁶⁵ Im Gegensatz zur katalytischen Domäne konnten bei Analysen mit dem Dali-Server keine Homologien für die TM-Helix festgestellt werden und zeigten demzufolge die Einzigartigkeit dieser Region.²⁶⁵

Das OG-Molekül ist an einer der drei Öffnungen der T-geformten aktiven Bindetasche (Abbildung 6) gelegen.²⁶⁵ Innerhalb der Struktur zeigt sich die Aminosäure Val33 aus PlaF_A beteiligt an der PlaF-Dimerisierung durch Interaktion mit den Seitenketten Val33 und Ser32 aus PlaF_B.²⁶⁵ Überdies interagiert Val33 aus PlaF_A auch mit dem Pyranosering des OG-Moleküls und kann auf diese Weise

Einfluss auf die Dimerisierung von PlaF nehmen.²⁶⁵ Außerdem stellen sich mit den stabilisierenden, hydrophoben Wechselwirkungen der OG-Alkylketten und dem endogenen C14-Liganden in Verbindung mit der Wasserstoffbrückenbindung des katalytischen Ser137 zur Carbonyl-Funktion von C14, der Aufbau eines Liganden-vermittelten Interaktionsnetzwerk dar.²⁶⁵ Dadurch ist neben der strukturverändernden Dimerisierung auch eine mögliche Regulation der PlaF-Aktivität gekoppelt.²⁶⁵ Die Beeinflussung der Aktivität und sogar der Stabilität durch unterschiedliche Detergenzien konnte ebenfalls gezeigt werden.

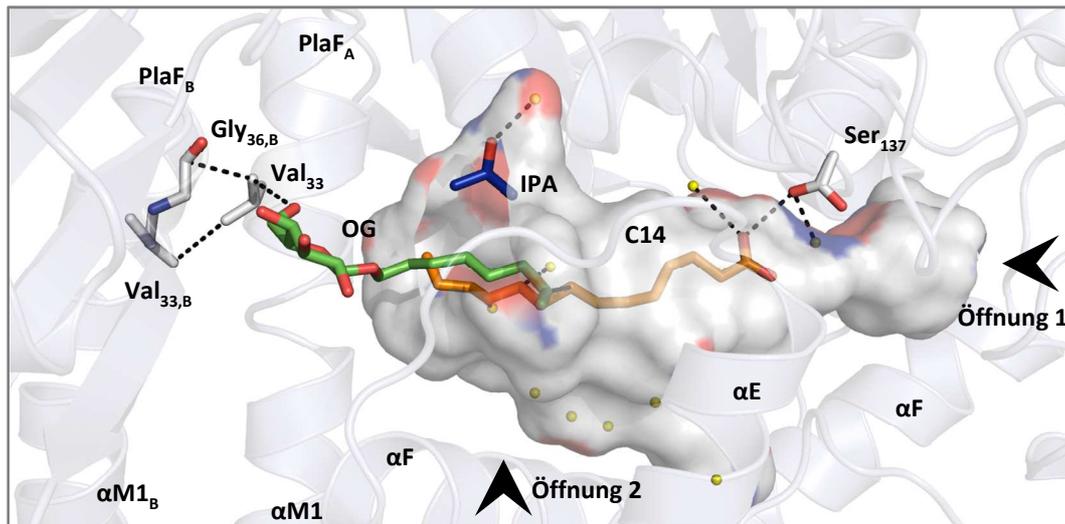


Abbildung 6: Interaktionsnetzwerk der T-förmigen Ligandenbindetasche von PlaFA. Das katalytisch aktive Ser137 ist innerhalb des Interaktionsnetzwerks in beiden PlaF Monomeren in zwei Seitenketten-Konformationen vorzufinden. Allerdings ist nur eins der beiden Konformere in räumlicher Nähe, um Wasserstoffbrückenbindungen zu Myristinsäure (C14, orange) und Isopropylalkohol (IPA, blau) auszubilden. C14 interagiert wiederum durch hydrophobe Interaktionen mit OG. Dabei bilden die Wasserstoffbrücken zwischen der OG-Zuckergruppe und Val33_A aus PlaFA, welche seinerseits wiederum mit Val33_B und Gly36_B aus PlaFB interagiert, das Ende des Interaktionsnetzwerks innerhalb der Ligandenbindetasche. Die vorgefundenen Öffnungen sind mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Dabei ist Öffnung 2 durch verschiedene Wassermoleküle (gelbe Kugel) besetzt. (modifiziert nach ²⁶⁵)

Anhand der 3D-Struktur konnte auch eindeutig die aus acht β -Faltblättern und acht α -Helices bestehende charakteristische α,β -Hydrolasefaltung für PlaF identifiziert werden.²⁶⁵ Darüber hinaus wurde eine aus drei α -Helices bestehende deckelartige Domäne vorgefunden, die über dem aktiven Zentrum liegt.²⁶⁵ Eine Bestätigung der α,β -Hydrolasefaltung, der katalytischen Triade sowie dem Oxyanionen-Loch konnte durch die Überlagerung der PlaF-Struktur mit den bekannten Strukturen der *P. aeruginosa* Lipase²⁶⁷ und der *Burkholderia cepacia* Lipase²⁶⁸ vorgenommen werden.²⁶⁵ Des Weiteren konnten anhand dieser Überlagerung die Bindung von Triacylglycerid-Analoga als Substrat untersucht und hierdurch deren Umsetzung bestätigt werden.²⁶⁵

1.6.3 Interaktionen als Modulatoren der PlaF Struktur-Funktionsbeziehung

Wie bereits in 1.5 dargestellt, spielen sowohl Liganden (Ionen, Fettsäuren, [Phospho-] Lipide, Detergenzien, niedermolekulare Verbindungen), als auch die Homo- oder Heteromerbildung bei der

Modulierung der Struktur-Funktionsbeziehung eine Rolle. Mit dem Erhalt der PlaF 3D-Kristallstruktur wurden erste Daten für die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF zugänglich gemacht.²⁶⁵ Eine vorgeschlagene Homodimerisierung über hydrophobe Interaktionen innerhalb der TM-Helix konnte mit *Crosslinking*-, *Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization*- und *MicroScale Thermophoresis*-Studien belegt und verifiziert werden.²⁶⁵ Innerhalb der Struktur kann eine *coiled-coil* Interaktion der TM-Helices zueinander identifiziert werden, womit eine X-geformte Dimerschnittstelle gebildet wird.²⁶⁵ Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte die gefundene Dimerisierung von PlaF in *P. aeruginosa* nachgewiesen werden und mit der Funktion von PlaF verlinkt werden.²⁶⁵

Zudem zeigte, die in der Struktur vorliegende deckelartige *lid*-Domäne, eine geringere Strukturierung mit einer Vielzahl an geladenen Aminosäuren an.²⁶⁵ Durch die fehlende Membraninteraktion dieser zuvor erwähnten geladenen Aminosäuren mit den hydrophilen Phospholipidkopfgruppen wird eine ausbleibende Stabilisierung dieser Domäne vermutet.²⁶⁵ Die Abwesenheit der in natürlichen Membranen vorkommenden PLs und deren Ersatz durch Detergenzien könnte auch ein Grund für die gering strukturierte TM-Helix durch fehlende Interaktionen vom Membrankern sein.²⁶⁵

Innerhalb der PlaF-Struktur wurden mit C14 und C11 endogene Fettsäuren und mit OG ein exogener Ligand detektiert.²⁶⁵ In Inhibierungsstudien von PlaF mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge zeigte sich ein starker Inhibierungseffekt, der durch weiterführende *Crosslinking*-Analysen auch mit einer gesteigerten PlaF-Dimerisierung korreliert werden konnte.²⁶⁵ Dieser Fettsäure-induzierte Dimerisierungseffekt könnte eine potenzielle regulatorische Funktion für die Aktivität von PlaF bedeuten.²⁶⁵ Das in der Struktur vorgefundene artifizielle OG könnte als Ligandenersatz einer putativen Ligandenbindetasche innerhalb der PlaF-Struktur fungieren.²⁶⁵

1.6.4 Physiologische Funktion von PlaF in *P. aeruginosa*

Mit der Generierung einer *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante konnte die Rolle von PlaF als möglicher Regulator des Membrangehalts an Glycerophospholipiden (GPL) anhand von Lipidomstudien analysiert werden.²⁶⁵ Hierbei konnten 334 GPLs detektiert werden, die signifikante Unterschiede vom *P. aeruginosa*-Wildtyp zur *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante zeigten.²⁶⁵ Innerhalb der Studie konnten 16 signifikant akkumulierte PLs identifiziert werden, die möglicherweise native PlaF-Substrate darstellen.²⁶⁵ Durch die 19 vorgefundenen reduzierten GPLs bleibt der Gesamtgehalt beim Vergleich *P. aeruginosa*-Wildtyp zu *P. aeruginosa* Δ *plaF* nahezu gleich.²⁶⁵ Die akkumulierten GPLs konnten mit > 12 % vom gesamten GPL-Gehalt identifiziert werden und indizieren die physiologische Funktion von PlaF in der Membranphospholipid-Homöostase.²⁶⁵

Neben zuvor beschriebenen Virulenzfaktoren als Regulatoren der bakteriellen Virulenz (1.3) zeigen die Bakterienmembran und GPLs Effekte auf die Virulenz.^{147, 269} Für PlaF konnte beim Vergleich von *P. aeruginosa*-Wildtyp mit dem *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm eine reduzierte Überlebensrate

von *Drosophila melanogaster* in einem dazugehörigen Virulenzassay festgestellt werden (Abbildung 7).²⁷⁰ Damit kann PlaF die Eigenschaften eines Virulenzfaktors zugeschrieben werden, der sich durch eine Lokalisierung in der Zytoplasmamembran von der in der Literatur charakteristisch beschriebenen Virulenzvermittlung mit Wirtskontakt unterscheidet.²⁶⁵ Außerdem konnte in Experimenten eine Beteiligung von PlaF am primären Metabolismus von *P. aeruginosa* ausgeschlossen werden.²⁶⁵

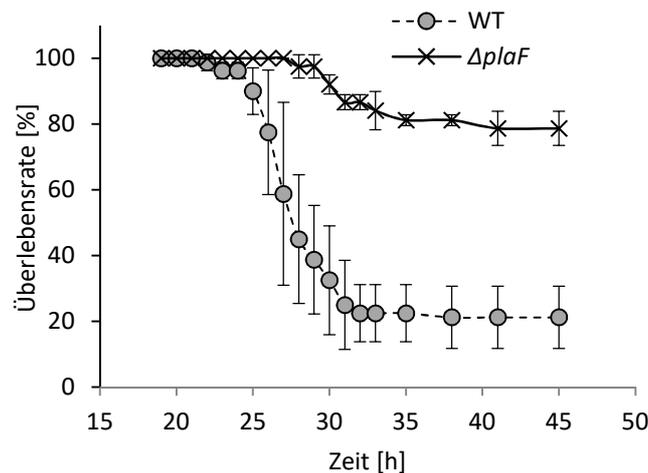


Abbildung 7: Analyse der Virulenz einer *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Mutante anhand eines *Drosophila melanogaster* Virulenzassays. Im Vergleich zum *P. aeruginosa*-Wildtyp (WT) zeigt die *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Mutante ($\Delta plaF$) eine geringere Virulenz in *Drosophila melanogaster*. (modifiziert nach ²⁷⁰)

Die phänotypische Analyse des *P. aeruginosa*-Wildtyps und der *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Mutante lieferte eine signifikant beeinträchtigte Schwimmbeweglichkeit des Stammes ohne *plaF*-Gen, jedoch nicht der *swarming*- oder *twitching*-Beweglichkeit.²⁷¹ Außerdem kommt es im *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Stamm zu einer um 40 -60 % reduzierten bakteriellen Adhärenz als Biofilm im Vergleich zum *P. aeruginosa*-Wildtyp und indiziert so die physiologische Rolle von PlaF in der frühen Entwicklung von Biofilm.

Zusätzlich wurde mit Hilfe von Proteomstudien des *P. aeruginosa*-Wildtyps und der *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Mutante die Auswirkungen der durch PlaF verursachten Membranveränderung näher untersucht. Der Vergleich lieferte eine veränderte Proteinexpression für 422 Proteine, deren Funktion hauptsächlich mit Transport, Signaltransduktion, Zellwand und Membranbiogenese assoziiert sind. Innerhalb der 422 Proteine konnten 36 Proteine identifiziert werden, die mit der Ausbildung von Biofilm verknüpft sind und so eine mögliche Erklärung für die reduzierte Biofilmproduktion liefern könnten. Weitere 18 Proteine sind mit der Zellbeweglichkeit assoziiert und könnten Hinweise auf die beeinträchtigte Schwimmbeweglichkeit liefern. An der Zytoplasmamembran konnten ca. 100 Proteine detektiert werden, die in 75 % der Fälle eine erhöhte Produktionsrate aufzeigten. Möglicherweise reagiert der *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Stamm auf eine verminderte zytoplasmatische Funktion mit der vermehrten Produktion zytoplasmatischer Proteine.

Zusammenfassend kann PlaF daher eine Beteiligung an der Homöostase der Membranphospholipide zugeschrieben werden.²⁶⁵ Im Rahmen dessen wurde ein Netzwerk für die Phospholipidhomöostase generiert und anhand der gesammelten Proteomstudien analysiert. Von den beteiligten Enzymen liegen in den Proteomstudien die Cyclopropan-Fettsäuresynthase (Cfa), die cis-trans-Isomerase (Cti) und die Phosphotransacylase um das 1,8-, 1,6- und 1,5-fache gesteigert vor. Dabei führen diese Enzyme spezifische Modifikationen ein und können hierdurch die biophysikalischen Eigenschaften des Membran-Gesamtgerüsts und der Zellphysiologie beeinflussen.²⁷²⁻²⁷⁴ Dies erlaubt eine schnelle Adaptation des Bakteriums an äußere Umwelteinflüsse.²⁷⁵ Beim Wegfall des Umweltsignals könnten die durch Cfa und Cti generierten PLs durch PlaF abgebaut werden, um den ursprünglichen Membranzustand wiederherzustellen. Diese Hypothese kann durch *in vitro* durchgeführte Hydrolyse von Substraten mit Cyclopropan- und ungesättigten Fettsäuren, als auch membrandestabilisierenden LysoPL bekräftigt werden. Zusammengefasst kann PlaF damit eine einzigartige Rolle in der Membranphospholipid-Homöostase durch Lipidabbau zugeschrieben werden und im Zuge dessen als Balance zwischen unmodifizierten und modifizierten PLs agieren.

Die Aufnahme von Eisen über Siderophore ist für *P. aeruginosa* besonders wichtig beim Wachstum und der Kolonisierung des Wirts. Hierfür werden die zuvor erwähnten (1.3) Eisenchelatoren Pyoverdin und Pyochelin durch *P. aeruginosa* hergestellt. Innerhalb eines aus der Literatur generierten Proteinnetzwerk der Eisenhomöostase wurden mit der Proteomstudie 26 Proteine mit einer veränderten Abundanz identifiziert. Pyoverdin als Hauptchelator für die Eisenaufnahme für *P. aeruginosa* ist dabei unter den am stärksten regulierten Proteinen vorzufinden. Des Weiteren sind die an der Synthese des Pyoverdin-Vorläufers Ferribactin beteiligten Proteine signifikant reduziert, ebenso wie die mit der periplasmatischen Reifung von Ferribactin zu Pyoverdin assoziierten Proteine. Untersuchungen des extrazellulären Gehalts an Pyoverdin, im Vergleich der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante zum *P. aeruginosa*-Wildtyp, lieferten einen 40 % geringeren Anteil. Die beschriebenen Ergebnisse lassen dementsprechend eine regulatorische Beteiligung von PlaF bei der Eisenaufnahme durch Pyoverdin vermuten. Unter den hochregulierten Proteinen findet sich mit Pyochelin der zweitwichtigste Eisenchelator von *P. aeruginosa*. Somit kommt es durch Ausschaltung des *plaF*-Gens zu einer verminderten Produktion von Pyoverdin, aber gleichzeitig zu einer verstärkten Pyochelin-Bildung.²⁷⁶ Innerhalb von Wachstumsexperimenten unter eisenlimitierenden Konditionen konnte ein vermindertes Wachstum des *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stammes detektiert werden, welche durch Zugabe von Eisen in gewissem Maße zurückreguliert werden konnte. Mit Hilfe dieser Informationen lässt sich für PlaF eine adaptive Rolle im Wechsel von Pyoverdin zu Pyochelin indizieren.

Innerhalb von Sequenzanalysen konnte ein humanes Homolog zu PlaF mit 49 % Sequenzähnlichkeit gefunden werden.²⁶⁴ Das zur Familie der α , β -Hydrolasedomäne gehörende *α , β -hydrolase domain containing 6* (ABHD6) ist als Regulator des Signalmoleküls 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) im Endocannabinoid-System bekannt.^{264, 277} Zusätzlich zur Sequenzähnlichkeit besitzt ABHD6, ebenso

wie PlaF, eine α,β -Hydrolasefaltung mit katalytischer Ser-Triade.²⁶⁴ In Experimenten konnte bereits für beide Proteine eine Substratspezifität auf mittelkettige Fettsäuren identifiziert werden.²⁶⁴ Darüber hinaus kann PlaF hydrolytisch das Hauptsubstrat 2-AG umsetzen.²⁶⁴

1.7 Das humane PlaF-Homolog ABHD6 als Regulator des Endocannabinoid-Systems

Mit der Charakterisierung von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol ging auch die Entdeckung des dazugehörigen Rezeptorsystems, dem Endocannabinoid-System, einher.²⁷⁸ Dieses ubiquitär verbreitete System ist für die Aufrechterhaltung der Funktionen im menschlichen Körper essenziell und wird verstärkt im Gehirn und dem Immunsystem vorgefunden.²⁷⁹ Für Entzündungen und Stoffwechselerkrankungen konnte das Endocannabinoid-System als therapeutisches Target zur Behandlung herangezogen werden.^{280, 281} Der Aufbau des Endocannabinoid-Systems kann in integrale Rezeptorproteine, lösliche Liganden und Synthese-, Transport- und Metabolismusproteine unterteilt werden.²⁸² In der Membran verankert liegen die Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 als G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) vor. Als lösliche, endogene Liganden fungieren 2-AG und Anandamid.²⁸² Aktuell werden mit dem GPCR GPR55 und ABHD12 weitere Enzyme als putative Mitglieder des Endocannabinoid-Systems diskutiert.^{279, 283, 284} Auf Grund der regulatorischen Funktion für andere Neurotransmitter-Systeme wurden bereits verschiedene Krankheiten mit der Dysregulation des Endocannabinoid-Systems assoziiert. Dazu gehören neben Alzheimer, der Huntington-Krankheit und multipler Sklerose weitere psychische und psychosoziale Störungen.²⁸⁵ Weitere Einflüsse des Endocannabinoid-Systems konnten durch neue Studien in der Regulation der Dopamin-Neurotransmission und dem Oxytocin-Signalweg identifiziert werden.^{286–288} Somit zeigt sich ein hohes therapeutisches Potential, indem das Endocannabinoid-System spezifisch moduliert wird. Mit der Anvisierung der Rezeptoren als Target sind häufig negative Nebenwirkungen, wie Rezeptor-bezogene psychoaktive Effekte verbunden.^{289, 290} Hingegen treten diese Nebenwirkungen nicht bei den Enzymen auf, die für den Metabolismus der Endocannabinoiden zuständig sind, wodurch sie als attraktive Arzneistofftargets fungieren.^{291, 292}

Ein derartiges therapeutisches Potential konnte für das vor kurzem entdeckte ABHD6 nachgewiesen werden, welches als metabolisches Enzym für den Abbau von 2-AG als potenter Agonist für beide Cannabinoid-Rezeptoren mit 4 - 40 % zuständig ist.^{293–295} Der Großteil von 2-AG wird durch das metabolische Enzym Monoacylglycerol-Lipase (MGL) abgebaut. Die Inhibierung der MGL bewirkt einen gestiegenen 2-AG-Level, womit negative Nebeneffekte durch Rezeptor-bezogene Kompensationsmechanismen erzeugt werden können.²⁹⁶

Als Serinhydrolasen mit gleichem Substrat zeigen ABHD6 und MGL, abgesehen von einigen grundlegenden Strukturgemeinsamkeiten, nur eine geringe Homologie. Eine grundlegende Gemeinsamkeit innerhalb der Serinhydrolase-Familie ist das Vorhandensein einer α,β Hydrolase-Faltung.

Diese besteht aus acht β -Faltblättern, welche über Helices und Schleifenbereiche miteinander verbunden sind und dadurch eine hoch konservative katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat ausbilden. Für ABHD6 konnte die katalytische Triade mit Ser148, His306 und Asp278 identifiziert werden.²⁹⁵

Die Identifizierung von ABHD6 erfolgte bei der Untersuchung aller Serinhydrolasen, welche 2-AG im Proteom des Mäusegehirns metabolisch abbauen.²⁹⁷ Neben der Produktion im Gehirn konnte ABHD6 auch in signifikanten Mengen im Dünndarm und im braunen Fettgewebe gefunden werden. Dadurch übernimmt es eine kritische Regulatorfunktion für das 2-AG-Level.^{293, 294} Strukturelle Analysen zeigen ABHD6 mit einer einzelnen TM-Domäne, welche zur integralen, postsynaptischen Verankerung des Proteins auf der Seite der 2-AG-Synthese führt. Diese subzelluläre Lokalisierung ermöglicht die Kontrolle über einen separaten 2-AG Pool und bewirkt unterschiedliche Effekte bei der Inhibierung.²⁹⁴

Durch den *knockdown* von *abhd6* konnte eine therapeutische Signifikanz gezeigt werden. Im Mausmodell zeigte sich eine schnellere Wiederherstellungszeit bei traumatischen Gehirnverletzungen durch die Zugabe von kovalenten ABHD6-Inhibitoren.²⁹⁸ Außerdem konnte ABHD6 im Mausmodell ein präventiver Effekt bei Fettleibigkeit und Diabetes zugeschrieben werden, indem durch *silencing* RNA die Expression von *abhd6* herabgesetzt wurde. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte ABHD6 ebenso eine Rolle als Schlüsselregulator im Metabolismus durch Modulation der Glukosetoleranz bei der Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas zugeordnet werden.^{280, 299–301} Die normale phänotypische Entwicklung von *abhd6-knockout*-Mäusen lässt auf ein vermindertes Risiko ernsthafter schädlicher Entwicklungseffekte schließen. Dadurch konnte ABHD6 in Experimenten eine unterstützende Funktion in der spezifischen Zellantwort durch ABHD6-Rezeptor-Interaktionen zugeschrieben werden. Einerseits interagiert ABHD6 mit den Glutamat-Rezeptoren Untereinheiten A1 - A3 der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazolpropionsäure-Typ Glutamatrezeptoren und unterdrückt den Membrantransport und die Funktion der Rezeptoren sowie deren Oberflächenexpression.^{302, 303} Andererseits konnte durch ABHD6 Inhibierung eine CB2-Rezeptor-Aktivierung festgestellt werden, wodurch therapeutische Effekte in Mäusen mit multipler Sklerose identifiziert werden konnten.³⁰⁴

Obwohl ABHD6 als attraktives Target für Arzneimittel entdeckt wurde, sind mit Triazolureaten³⁰⁵, Glycinsulfonamiden³⁰⁶ und Thiadiazolcarbamat³⁰⁷ nur wenige spezifische Inhibitoren beschrieben. Für die weitere Entwicklung potenter und selektiver Inhibitoren stellt die bis dato fehlende ABHD6-Proteinstruktur eine Schlüsselfunktion zur biochemischen Analyse dar.

1.8 Zielsetzung

Das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* ist ein opportunistisch humanpathogenes Bakterium mit einem Arsenal an Virulenzfaktoren, die zur Invasion in oder mit der Wirtszelle fungieren.⁵ In vorausgegangenen Arbeiten konnte mit PlaF aus *P. aeruginosa* eine PLA₁ identifiziert werden, welche Einfluss auf die bakterielle Pathogenität nimmt.²⁷⁰ Durch einen Lipidomvergleich des *P. aeruginosa*-Wildtyps mit einer *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante konnten signifikant unterschiedliche Phospholipidprofile detektiert werden. Anhand derer wurde die biologische Funktion durch Einfluss auf die Phospholipidhomöostase in der Adaptation von Membranen eruiert. Die physiologischen Analysen der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante zeigten sowohl eine reduzierte Biofilmproduktion als auch eine reduzierte Schwimmbeweglichkeit.²⁷¹ Des Weiteren konnte anhand von biochemischen Experimenten eine Regulation der PlaF-Funktion durch dynamische Homodimerisierung identifiziert werden.²⁷⁰

Ziel dieser Arbeit ist das Zusammenspiel zwischen der PlaF-Struktur und dessen Aktivität in einer Struktur-Funktionsbeziehung mittels biochemischer Analysen weiter zu charakterisieren. Anhand von Mutagenitätsstudien innerhalb der TM-Region und der JM-Region sollte die Struktur-Funktionsbeziehung untersucht werden. Darüber hinaus sollen *in silico* identifizierte Aminosäuren zur Blockierung der verschiedenen PlaF-Tunnel bestätigt und damit der Substratzugangstunnel bestimmt werden. Ferner sollte eine Umsetzung von Monoacylglyceriden (MAG) und Diacylglyceriden (DAG) seitens PlaF untersucht werden. Zur Unterstützung der Hypothese, dass PlaF an der Adaptation von Membranen beteiligt ist, werden ausgewählte, strukturegebende Lipide auf die Umsetzung durch PlaF untersucht. Außerdem gilt es, eine bereits gezeigte *in vivo* Thioesteraseaktivität durch *in vitro* Experimente zu bestätigen.

Bis dato erfolgte die *in vitro* biochemische Charakterisierung ausschließlich mit Detergens-solubiliertem PlaF. Innerhalb dieser Arbeit sollen erste Daten in einer natürlichen Phospholipidumgebung gewonnen werden, um den Einfluss von Protein-Lipid-Interaktionen zu ermitteln. Aus diesem Grund soll eine Rekonstitution von PlaF, als auch seines Humanhomologs ABHD6, in *small unilamellar vesicles* (SUV) etabliert und der Vergleich zu Detergens-solubilierten Gegenständen anhand einer Struktur-Funktionsbeziehung untersucht werden. Außerdem soll ein biochemischer, physiologischer und struktureller Vergleich von PlaF mit seinem Humanhomolog ABHD6 durchgeführt, um ein globales Verständnis über die PlaF-Proteinfamilie zu gewinnen.

2 MATERIAL

2.1 Instrumente und Zubehör

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 dargestellten Instrumente und Zubehör folgender Firmen verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Instrumente und Zubehör.

Instrument / Zubehör	Firma
Agarose-Gelelektrophorese	
PowerPac Basic mit Wide Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschüttler	
Multitron Standard	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Timix Control mit TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
3033	GFL mbH, Burgwedel
Nano Differential Scanning Fluorimetry	
Prometheus NT-Plex nano	NanoTemper Technologies GmbH, München
Thermozykler	
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler ep-gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	
Multi-Calimatik Typ 766 mit pH/Pt 1000 Sensor Se101N	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer	
SpectraMax 250	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gelelektrophorese und Western Blotting	
Power Supply EPS-601	Amersham PLC, Little Chalfont UK
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Advanced Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Zellaufschlussgeräte	
Sonoplus Generator HD2070 mit Ultraschallwand- ler UW2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Sonotrode KE76	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Sonotrode MS72	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
French Press Cell Disrupter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

UV-Licht-Detektionsplattform	
Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Waagen	
CP224S	Sartorius AG, Göttingen
MS205DU	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zentrifugen	
Sorvall RC-6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sorvall RC-5b	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
CT 15E	Hitachi, Tokio, Japan
CT 15RE	Hitachi, Tokio, Japan
Ultrazentrifuge Optima L-80 Xp	Beckman Coulter, Palo Alto, USA
Rotor 55.2 Ti	Beckman Coulter, Palo Alto, USA
Vakuumbzentrifuge speed-vac	Eppendorf AG, Hamburg
Elektroporator	
MicroPulser™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wasseraufbereitungssystem	
Reinstwassersystem Milli-Q® Advantage A10	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt

2.2 Verbrauchsmaterialien

Von folgenden Firmen wurden Antibiotika, Enzyme, Chemikalien, Substrate, Lipide und Medienzutaten für diese Arbeit bezogen. Hierbei besaßen alle Chemikalien die Qualität „p.a.“ oder „reinst“. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Molekulargewicht-Standards der Gelelektrophoresen sind in Tabelle 2 und Abbildung 8 dargestellt.

Antibiotika:	Serva (Heidelberg), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt)
Chemikalien:	Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), CovaChem (Loves Park, USA)
Enzyme:	New England Biolabs (Schwalbach), Roche Applied Science (Mannheim), Sigma (Taufkirchen), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Substrate:	<i>p</i> -Nitrophenylacylester (Sigma, Taufkirchen)
Lipide:	Phospholipide (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA), Lipidextrakt (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA)
Antikörper:	Anti-His(C-term)-HRP-Antikörper (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Medienzutaten:	Fluka (Sternheim), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt)

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Firma
Filtereinheit	
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	VWR, Darmstadt
Säulenmaterial für die Chromatographie	
Ni-NTA Superflow	Qiagen N.V., Hilden
PD10 Entsalzungssäulen	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
UNOsphere Q Anion Exchange Resin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultrafiltrationseinheiten	
VivaSpin 2, 30.000 MWCO	VWR, Darmstadt
VivaSpin 20, 30.000 MWCO	VWR, Darmstadt
DNA-Kits	
InnuPREP Plasmid mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
InnuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena AG, Jena
Enzymassay-Kits	
NEFA-HR R1 + R2 Kit	Wako Chemicals GmbH, Neuss
NEFA Standard	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Beads	
Bio-Beads SM-2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

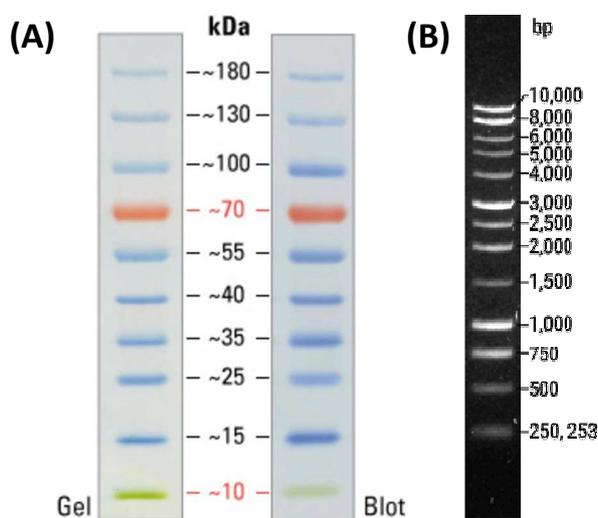


Abbildung 8: Verwendete Molekulargewichts-Standards in den Gelelektrophoresen. (A) PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).³⁰⁸ (B) GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).³⁰⁹

2.3 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide

2.3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit kultivierten Bakterienstämme und deren dazugehörige Genotypen sind der folgenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Liste aller verwendeten Stämme und deren dazugehöriger Genotypen.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	310
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻mB⁻) gal dem</i> (λ ts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lavUV5-T7gene1</i>)	311
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Ec294:: [RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] Tp ^r , Sm ^r , tra ⁺ <i>recA, pro, res</i>	312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01*	Wildtyp, zur Verfügung gestellt von D. Haas (Lausanne, Schweiz)	313
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 Δ <i>plaF</i> *	Wildtyp, Gendeletion von <i>pa2949 (plaF)</i>	314

*Im weiteren Verlauf werden die verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme ohne den Namenszusatz PA01 genannt.

2.3.2 Plasmide

Alle verwendeten und in dieser Arbeit generierten Plasmide mit ihren dazugehörigen Genotypen sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Liste aller verwendeter Plasmide und deren dazugehörige Genotypen.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pBBR1mcs-3	Cm ^r mob <i>lacZα P_{lac} P_{T7} Tc^r</i>	315
pBBR- <i>plaF</i> _{H6}	<i>plaF</i> Gen inseriert in <i>XbaI / SacI</i> Schnittstelle von pBBR1mcs-3, C-terminaler His ₆ -Affinitätstag	270
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -S29A	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Ser29 gegen Ala	Arbeits- gruppe
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -T32A	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Thr32 gegen Ala	Arbeits- gruppe
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -V33A	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Val33 gegen Ala	Arbeits- gruppe
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -V33I	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Val33 gegen Ile	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -E34A	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Glu34 gegen Ala	Diese Arbeit

pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -D74W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Asp74 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -N77W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Asn77 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -R80W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Arg74 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -M166W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Met166 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -L177W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Leu177 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -V185W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Val185 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -F200W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Phe200 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -L206W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Leu206 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -L214W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Leu214 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -R217W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Arg217 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -A218W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Ala218 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -A221W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Ala221 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -S222W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Ser222 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -N225W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Asn225 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -A226W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Ala226 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -F229W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Phe229 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -R233W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Arg233 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -Y236W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Tyr236 gegen Trp	Diese Arbeit
pBBR- <i>plaF</i> _{H6} -V290W	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} , Aminosäureaustausch im nativen Protein von Val290 gegen Trp	Diese Arbeit

pET 22b (+)	ColE1 Amp ^r lac ^q P _{T7}	Novagen (Merck)
pET- <i>abhd6</i> _{H6}	<i>abhd6</i> Gen inseriert in <i>Nde</i> I / <i>Sac</i> I Schnittstelle von pBBR1mcs-3, C-terminaler His ₆ -Affinitätstag	316
pET- <i>abhd6</i>	<i>abhd6</i> Gen inseriert in <i>Nde</i> I / <i>Sac</i> I Schnittstelle von pBBR1mcs-3	316
pBBR- <i>abhd6</i>	Insertion des <i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I Fragment aus pET- <i>abhd6</i> in pBBR1mcs-3	316

2.3.3 Oligonukleotide

Die Erstellung der Oligonukleotide erfolgte in dieser Arbeit unter Verwendung des CloneManager 9 (Tabelle 5). Die Schmelztemperatur (T_{SM}) der Oligonukleotide wurde mit dem Online-Werkzeug „Tm calculator“³¹⁷ bestimmt und anschließend mit dem „Oligoanalyzer 3.1“^{318, 319} validiert, um starke Sekundärstrukturen oder Dimerbildung auszuschließen. Die Herstellung der erstellten Oligonukleotide wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) mit dem Reinigungsgrad *high purity salt free* (HPSF) durchgeführt. Die lyophilisierte DNA wurde mit H₂O mit Millipore-Reinheit (mpH₂O) auf eine Stammkonzentration von 100 pmol/μL gelöst und für den weiteren Einsatz auf 10 pmol/μL verdünnt.

Tabelle 5: Liste aller verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz [5'-3'] ^{a,b}	Verwendung
PlaF _{H6} -(V33A) up	CGTACGCACCG <u>CC</u> GAGCGCGGTC	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - V33A
PlaF _{H6} -(V33A) down	GACCGCGCTCG <u>G</u> CGGTGCGTACG	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - V33A
PlaF _{H6} -(V33I) up	AGCGTACGCACCA <u>T</u> CGAGCGCGGTC	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - V33I
PlaF _{H6} -(V33I) down	GACCGCGCTCG <u>A</u> TGGTGCCTACGCT	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - V33I
PlaF _{H6} -(E34A) up	ACGCACCGT <u>CG</u> CGCGGTCTCG	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - E34A
PlaF _{H6} -(E34A) down	CGAGACCGCG <u>CG</u> GACGGTGCCT	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - E34A
PlaF _{H6} -(D74W) up	CTTCGGCGCCT <u>TGG</u> AAGGACAAGTGGCTGCGCTTCGC	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - D74W
PlaF _{H6} -(D74W) down	GTTGTCCTT <u>CCA</u> GCGCCGAAGCCGTGGATCAGCAAC	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - D74W
PlaF _{H6} -(N77W) up	GACAAGGACT <u>TGG</u> TGGCTGCGCTTCGCCGCGCGCTG	pBBR- <i>plaF</i> _{H6} - N77W

PlaF _{H6} -(N77W) down	GCGCAGCCA <u>CCA</u> GTCTTGTTCGGCGCCGAAGCCGTG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ N77W
PlaF _{H6} -(R80W) up	AACTGGCTG <u>TGG</u> TTCGCCCGGCCGCTGACCGAGCG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ R80W
PlaF _{H6} -(R80W) down	CCGGGCGAA <u>CCA</u> CAGCCAGTTGTCTTGTTCGGCGC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ R80W
PlaF _{H6} -(M166W) up	GCCGGGGT <u>TGG</u> CCGGCGCGCAAGAGCGAACTGTTC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ M166W
PlaF _{H6} -(M166W) down	GCGCGCCGG <u>CCA</u> CACCCCGCGTTGTTCGATCAGCG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ M166W
PlaF _{H6} -(L177W) up	GTTCGAGGACT <u>TGG</u> GAGCGCGGCGAGAATCCCCTGGTG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ L177W
PlaF _{H6} -(L177W) down	GCCGCGCT <u>CCA</u> GTCTCGAACAGTTCGCTCTTGC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ L177W
PlaF _{H6} -(V185W) up	GAATCCCCTG <u>TGG</u> GTGCGCCAGCCGGAAGACTTCCAG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ V185W
PlaF _{H6} -(V185W) down	CTGGCGCAC <u>CCA</u> CAGGGGATTCTCGCCGCGCTCCAG	pBBR-PlaF _{H6} (V185W)
PlaF _{H6} -(F200W) up	GCTCGACTTCGTG <u>TGG</u> GTCCAGCAACCGCC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ F200W
PlaF _{H6} -(F200W) down	GGCGGTTGCTGGAC <u>CCA</u> CACGAAGTCGAGC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ F200W
PlaF _{H6} -(L206W) up	CAGCAACCGCCG <u>TGG</u> CCGGCGCCGCT	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ L206W
PlaF _{H6} -(L206W) down	AGCGGCGCCG <u>CCA</u> CGGCGGTTGCTG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ L206W
PlaF _{H6} -(L214W) up	CAAGCGCTACT <u>TGG</u> GGCGAGCGCGGTTAGCCGCGTC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ L214W
PlaF _{H6} -(L214W) down	GCGCTCGCC <u>CCA</u> GTAGCGTTGAGCGGCCGCGCAG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ L214W
PlaF _{H6} -(R217W) up	CTCGGCGAGT <u>TGG</u> GCGGTAGCCGCGTCGGCGTTCAAC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ R217W
PlaF _{H6} -(R217W) down	GGCTACCGC <u>CCA</u> CTCGCCGAGGTAGCGCTTGAGCG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ R217W
PlaF _{H6} -(A218W) up	GGCGAGCGCT <u>TGG</u> GTTAGCCGCGTCGGCGTTCAACGC	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ A218W
PlaF _{H6} -(A218W) down	CGCGGCTAC <u>CCA</u> GCGCTCGCCGAGGTAGCGCTTGAG	pBBR- <i>plaF_{H6}</i> ⁻ A218W

PlaF _{H6} ⁻ (A221W) up	GCGGTAGCC <u>TGG</u> TCGGCGTTCAACGCGCAGATATTC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> A221W
PlaF _{H6} ⁻ (A221W) down	GAACGCCG <u>CCA</u> GGCTACCGCGCGCTCGCCGAGGTAG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> A221W
PlaF _{H6} ⁻ (S222W) up	GTAGCCGCGT <u>TGG</u> GCGTTCAACGCGCAGATATTCGAAC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> S222W
PlaF _{H6} ⁻ (S222W) down	GTTGAACGCC <u>CA</u> CGCGGCTACCGCGCGCTCGCCGAG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> S222W
PlaF _{H6} ⁻ (N225W) up	GTCGGCGTT <u>TGG</u> GCGCAGATATTCGAACAACCTGCG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> N225W
PlaF _{H6} ⁻ (N225W) down	GAATATCTGCGC <u>CCA</u> GAAACGCCGACGCGGCTACGCGC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> N225W
PlaF _{H6} ⁻ (A226W) up	GCGTTCAACT <u>TGG</u> CAGATATTCGAACAACCTGCGCCAG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> A226W
PlaF _{H6} ⁻ (A226W) down	GAATATCTG <u>CCA</u> GTTGAACGCCGACGCGGCTACCG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> A226W
PlaF _{H6} ⁻ (F229W) up	GCGCAGATAT <u>TGG</u> GAAACAACCTGCGCCAGCGCTACATC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> F229W
PlaF _{H6} ⁻ (F229W) down	CAGTTGTT <u>CCA</u> TATCTGCGCGTTGAACGCCGACG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> F229W
PlaF _{H6} ⁻ (R233W) up	GAACAACCTG <u>TGG</u> CAGCGCTACATCCCGCTGGAGCC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> R233W
PlaF _{H6} ⁻ (R233W) down	GTAGCGCTG <u>CCA</u> CAGTTGTTTGAATATCTGCGCGTTG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> R233W
PlaF _{H6} ⁻ (Y236W) up	CGCCAGCGCT <u>TGG</u> ATCCCGCTGGAGCCGGAACCTGCC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> Y236W
PlaF _{H6} ⁻ (Y236W) down	CAGCGGGAT <u>CCA</u> GCGCTGGCGCAGTTGTTTGAATATC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> Y236W
PlaF _{H6} ⁻ (V290W) up	GTGCCGATG <u>TGG</u> GAAACGCCCGGAGGAAACCGCGCAG	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> V290W
PlaF _{H6} ⁻ (V290W) down	CGGGCGTT <u>CCA</u> CATCGGCACGTGTCCGCGAGTTTTTC	pBBR- <i>plaF_{H6}⁻</i> V290W
M13 uni (-21)	TGTA AACGACGGCCAGT	Sequenzierung pBBR1mcs-3
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung pBBR1mcs-3
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung pET 22b (+)

T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	Sequenzierung pET 22b (+)
---------	---------------------	------------------------------

^a Das betroffene Basentriplett ist jeweils **fett** hervorgehoben.

^b Die eingeführten Veränderungen sind in der Sequenz unterstrichen dargestellt.

2.3.4 Verwendete Software und Datenbanken

In verschiedenen Bereichen wurden Softwareprogramme verwendet, um die Bildbearbeitung, Datenauswertungen, Sequenzierungs- und Klonierungsarbeiten, Proteinstrukturvisualisierung und -analyse sowie die Darstellung von Molekülstrukturen zu ermöglichen (Tabelle 6). Des Weiteren wurden folgende Online-Werkzeuge sowie Online-Datenbanken verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 6: Verwendete Softwareprogramme.

Software	Firma
Bildbearbeitung	
Microsoft PowerPoint 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Datenauswertung	
SOFTmax Pro Version 3.1.2	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Sequenzierungs- und Klonierungsarbeiten	
Clone Manager 9 Version 9.51	Scientific & Educational Software, Denver, USA
Proteinstrukturvisualisierung und -analyse	
PyMOL Molecular Graphics System Version 2.0.4	Schrödinger LLC, New York City, USA
Swiss PDB Viewer Version 4.1.0	320
Darstellung von Molekülstrukturen	
ChemDraw Professional Version 16.0.1.4	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

Tabelle 7: Eingesetzte Online-Werkzeuge und Datenbanken.

Online-Werkzeug / Datenbank	Referenz
Proteineigenschaften	
ExPASy Bioinformatics Resource Portal	321
PDBsum	322
Analyse von Oligonukleotiden	
OligoAnalyzer Tool 3.1	318
Tm calculator	317
Pseudomonas Datenbank	
Pseudomonas Genome Database	323
Proteindatenbank	
RSCB Protein Data Bank	324

3 METHODEN

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Medien, Lösungen und Puffer wurden in doppelt-destilliertem H₂O (ddH₂O) angesetzt. Bei der Einstellung des pH-Wertes wurde, soweit nicht anders angegeben, Salzsäure bzw. Natronlauge eingesetzt. Angesetzte Medien wurden bei 121 °C unter 200 kPa für 21 min autoklaviert. Verwendete Medienzusätze (z. B. Antibiotika) wurden sterilfiltriert und erst vor Nutzung der Medien hinzugegeben.

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Bakterielle Zellkultivierung

Die Flüssigkultivierung von *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte bei 37 °C und 150 Umdrehungen pro Minute (Upm) in *Lysogeny broth* (LB)-Medium³²⁵, wohingegen die Kultivierung auf festen Nährmedien mit LB-Agar-Platten bei 37 °C durchgeführt wurde (Tabelle 8 / Tabelle 9).

Tabelle 8: Zusammensetzung des LB-Nährmediums für *E. coli* und *P. aeruginosa*.

LB-Medium*	
Konzentration	Reagenz
10 g/l	NaCl
10 g/L	Trypton
5 g/L	Hefeextrakt
pH 7,0	

*Das LB-Medium wurde mit Fertigpulver (Carl Roth) angesetzt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Agar-Nährmediums für *E. coli* und *P. aeruginosa*.

LB-Agar-Medium*	
Konzentration	Reagenz
10 g/L	NaCl
10 g/L	Trypton
5 g/L	Hefeextrakt
15 g/L	Agar
pH 7,0	

*Das LB-Medium wurde mit Fertigpulver (Carl Roth) angesetzt.

Bei der Flüssigkultivierung betrug das Kulturvolumen nicht mehr als 1/5 des Gefäßvolumens des Erlenmeyerkolbens, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Für die Kultivierung auf festem Nährmedium wurde ~ 50 µL verdünnte Kultur auf dem LB-Agar-Medium mit Glaskugeln ausgestrichen und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um eine Plasmidabstoßung der Stämme zu verhindern, wurden den Kulturmedien die jeweiligen Antibiotika in den nachfolgend angegebenen Konzentrationen hinzugefügt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Eingesetzte Antibiotika und deren Endkonzentrationen im Kulturmedium für *P. aeruginosa* und *E. coli*.

Antibiotikum	Konzentration	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin	100 µg/mL	-
Tetracyclin	10 µg/mL	100 µg/mL

Für die Erstellung von Übernachtskulturen erfolgte die Inokulation mit Einzelkolonien von einer LB-Agar-Platte oder durch Cryo-Kulturen (3.1.2) und anschließender Kultivierung für mindestens 16 h. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte bei 580 nm (OD_{580nm}) gemessen und als Referenz das Kulturmedium verwendet.

3.1.2 Lagerung von Bakterien

Kultivierte Agarplatten wurden für die kurzfristige Lagerung von Organismen bei 4 °C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte in Cryo-Kulturen durch Zugabe von 30 % (v/v) sterilem Glycerol (*E. coli*) oder 7 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) (*P. aeruginosa*) zu einer frischen Übernachtskultur und anschließender Lagerung bei -80 °C.

3.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Stämme

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Stämme wurde folgendes Protokoll verwendet und mit den im weiteren Verlauf beschriebenen Schritten modifiziert.³²⁵ Hierzu wurden 250 mL LB-Medium mit einer *E. coli*-Übernachtskultur auf eine OD_{580nm} von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD_{580nm} von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden danach für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 3220 x g für 15 min bei 4 °C geerntet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Zellpellet wurde durch leichtes Schwenken in sterilem mpH₂O resuspendiert und daraufhin erneut zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Im dritten und letzten Schritt wurde das Zellpellet mit 10 % (v/v) sterilem Glycerol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 3220 x g für 15 min bei 4 °C wurde das Zellpellet in 2 mL 10 % (v/v) sterilem Glycerol resuspendiert und in 50 µL Fraktionen aliquotiert. Die Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgekühlt und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Herstellung elektrokompetenter *P. aeruginosa*-Zellen

Elektrokompetente *P. aeruginosa*-Zellen wurden mit einem modifizierten Protokoll erstellt.³²⁶ Hierfür wurden 1,5 mL *P. aeruginosa*-Übernachtskultur bei 16.000 x g und Raumtemperatur (RT) für 2 min pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 1 mL 300 mM Saccharose resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der vorausgegangene Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt und anschließend wurde das Zellpellet in 100 µL 300 mM Saccharose resuspendiert und bis zur Verwendung am selbigen Tag auf Eis gelagert.

3.1.5 Transformation durch Elektroporation

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten elektrokompentenen Zellen (3.1.3 und 3.1.4) wurden auf Eis aufgetaut und danach mit 25 - 50 ng Plasmid-DNA (pDNA) aus 1 – 5 μL versetzt und leicht durchmischt. Anschließend wurde die Zellsuspension in trockene und vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite (BioBudget) überführt. Das Anlegen des Stromimpulses bei 2500 V/cm für 4 – 5,5 ms erfolgte an einem „MicroPulser™“. Nach dem elektrischen Impuls wurden 800 μL LB-Medium ohne Antibiotikum zur Zellsuspension hinzugegeben und in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen. Dieses wurde unter leichtem Schütteln bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ je nach Antibiotikum (Ampicillin: 1 h, Tetracyclin: 3 h) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf Agarplatten oder als Flüssigkultur mit dem jeweiligen Antibiotikum kultiviert.

3.1.6 Expression von *plaF_{H6}* in *P. aeruginosa*

Die Expression von *plaF_{H6}* erfolgte konstitutiv nach folgendem Protokoll.^{264, 327} Hierzu wurde eine *P. aeruginosa* Übernachtskultur (3.1.1) mit dem jeweiligen Expressionsplasmid pBBR-*plaF_{H6}* bzw. den mutierten PlaF-Plasmiden (Tabelle 4) zur Inokulation einer Hauptkultur auf eine $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,05 verwendet. Nachdem eine Zelldichte von 1,0 bis 1,2 erreicht war, wurden die Zellen bei $6750 \times g$ für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ geerntet. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in etwa 1 / 25 des Kulturvolumens mit ddH_2O resuspendiert und nach erneuter Pelletierung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.7 Expression von *abhd6_{H6}* in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression von *abhd6_{H6}* erfolgte in einem T7-Expressionssystem und wurde anhand des angezeigten Protokolls durchgeführt.³¹⁶ Hierzu wurde eine *E. coli* BL21(DE3) Übernachtskultur (3.1.1) mit pET22-*abhd6_{H6}* (Tabelle 4) zur Inokulation einer Hauptkultur auf eine $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,05 verwendet. Nachdem die Hauptkultur eine $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,4 bis 0.6 erreicht hatte, wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Genexpression induziert. Nach weiterer Kultivierung für 4 h wurden die Zellen bei $6750 \times g$ für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen und das erhaltene Zellpellet in etwa 1 / 25 des Kulturvolumens mit ddH_2O resuspendiert und nach erneuter Pelletierung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.8 Bestimmung der Biofilmproduktion

Zur Bestimmung der Biofilmproduktion wurde eine frische Übernachtskultur des jeweiligen *P. aeruginosa*-Stammes ohne Antibiotikum auf eine $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,1 verdünnt und nach einem modifizierten Protokoll gearbeitet.³²⁸ Anschließend wurden 100 μL dieser verdünnten Zellsuspension auf eine 96-well Mikrotiterplatte (MTP) übertragen und für 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellkultur durch Umdrehen der MTP abgenommen und zweimalig in ein Wasserbad getaucht und das Wasser abgeschüttet. Danach wurde die MTP im

Heizschrank bei 37 °C komplett getrocknet. Für das Anfärben des Biofilms wurde 150 µL 0,1 % (w/v) Kristallviolett hinzugegeben und bei RT für 10 min inkubiert. Mit einer Pipette wurde das Kristallviolett abgenommen und verworfen. Zum Waschen wurden 200 µL ddH₂O hinzugegeben und anschließend wieder entnommen und verworfen. Die MTP wurde zum Waschen erneut in das Wasserbad getaucht und danach im Heizschrank bei 37 °C komplett getrocknet. Nach der Trocknung konnte das Kristallviolett mit 150 µL 30 % (v/v) Essigsäure gelöst werden und wurde bei RT für 10 min inkubiert. Zum gleichmäßigen Lösen des Kristallvioletts wurde die MTP mit dem Plattenphotometer „SpectraMax 250“ für 10 s geschüttelt. Zum Schluss wurden 100 µL des gelösten Kristallviolett in eine frische MTP überführt und die Absorption bei 550 nm vermessen.

3.1.9 Untersuchung der bakteriellen Schwimmbeweglichkeit

Der Test zur Untersuchung der bakteriellen Schwimmbeweglichkeit für *P. aeruginosa* wurde nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt.³²⁹ Hierbei wurde die Plasmid-basierte Komplementation der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante analysiert. Für den Assay wurden Agarplatten nach folgender Zusammensetzung hergestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammensetzung des Agar-Mediums für den Schwimmbeweglichkeitstest.

Menge	Reagenz
10 g/L	Trypton
5 g/L	NaCl
3 g/L	Agar

Bei der Herstellung der Agarplatten wurde darauf geachtet, dass das Agar-Medium nach dem Gießen maximal 5 min geöffnet unter der Sicherheitswerkbank verblieb, um eine zu starke Trocknung der Agarplatten zu verhindern. Anschließend wurde ein Zahnstocher in eine Übernachtskultur (3.1.1) der jeweiligen *P. aeruginosa*-Stämme eingetaucht und damit die Agarplatte mittig inokuliert. Ab diesem Zeitpunkt wurde darauf geachtet, dass die Agarplatten keinen großen Schwankungen ausgesetzt wurden, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. Zusammen mit einer 250 mL Gewindeflasche, gefüllt mit ddH₂O, wurden die Agarplatten in eine Transportbox geschlossen, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit zu garantieren und ein Austrocknen der Platten zu vermeiden. Dabei erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 20 h. Die Auswertung der Schwimmbeweglichkeit wurde durch den Schwimmradius vom Inokulationspunkt bis zum Rand des Schwimmbereichs vorgenommen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde horizontal angelegte Agarose-Gelelektrophorese³²⁵ verwendet. Dazu wurden 1 % (w/v) Agarose in 0,5x TRIS-Borat-EDTA Puffer (TBE, Tabelle 12) gelöst und in die vorbereiteten Boxen gegossen. In die noch flüssige Agarose wurden 0,5 % (v/v) Ethidiumbromid hinzugegeben. Der 5x DNA-Probenpuffer (Tabelle 12) wurde mit der entsprechenden Menge an DNA-Probe auf eine 1x Konzentration gebracht und mit dem Molekulargewichts-Standard "GeneRuler 1 kb DNA ladder" (Abbildung 8) auf das ausgehärtete Agarosegel geladen. Anschließend erfolgte die Auftrennung nach Größe in den Agarosegelen unter einer angelegten Spannung von 130 V für 35 min. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA konnte im Anschluss an einem „Gel iX Imager“ (Tabelle 1) dokumentiert werden.

Tabelle 12: Verwendete Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

0,5x TBE Puffer		5x DNA-Probenpuffer	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
44,5 mM	TRIS	100 mM	EDTA
44,5 mM	Borsäure	45 % (v/v)	Glycerol
1 mM	EDTA	0,5 % (w/v)	Bromphenolblau
pH 8,0			

3.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese durch PCR

3.2.2.1 *Sequence and ligation independent cloning*-PCR

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente für die *sequence and ligation independent cloning* (SLIC) erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in modifizierter Form.³³⁰ Ein 50 µL PCR-Ansatz mit 1x konzentriertem GC-Puffer, ca. 50 ng pDNA als Template-DNA, 200 µM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), 500 nM von *up*- und *down*-Primer, 1,5 % (v/v) DMSO und 2 U Phusion DNA-Polymerase wurde angesetzt und mit mpH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde die PCR im Thermozykler mit folgendem Temperaturprofil (Tabelle 13) durchgeführt.

Tabelle 13: Temperaturprofil zur SLIC-PCR.

Wiederholung	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1x	1. Initiale Denaturierung	98	2,5
28x	2. Denaturierung	98	0,5
	3. Hybridisierung	60 - 70 (Primerspezifisch)	0,5
	4. Elongation	72	3,5
1x	5. Finale Elongation	72	10

Falls das gewünschte PCR-Produkt nicht erhalten werden konnte, wurde die Hybridisierungstemperatur oder die DMSO-Konzentration modifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1). Durch die Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym *DpnI* und anschließender Inkubation bei 37 °C für 3 h konnte noch im Ansatz vorhandene Template-DNA abgebaut werden. Die Hitzeinaktivierung von *DpnI* erfolgte bei 80 °C für 20 min. Das erhaltene PCR-Produkt konnte im Anschluss entsalzt und konzentriert werden (3.2.3).

3.2.2.2 QuikChange-PCR

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die QuikChange (QC)-PCR verwendet. Dabei wurde die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes nach Herstellerempfehlung der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* vorgenommen.³³¹ Das Temperaturprofil erfolgte hingegen nach Herstellervorgaben des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ mit den im Folgenden beschriebenen Modifikationen.³³² Zu Beginn wurden zwei Ansätze verwendet, die jeweils nur den *up-* bzw. den *down-*Primer (Tabelle 5) enthalten, um eine Eigenhybridisierung zu unterbinden. Ein 25 µL PCR-Ansatz mit 1x konzentriertem GC-Puffer, 25 ng pDNA als Template-DNA, 100 µM dNTPs, 200 nmol eines Primers (*up-* bzw. *down-*Primer) und 1 U Phusion DNA-Polymerase, wurde angesetzt und mit mpH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Ansätze mit jeweils einem Primer wurden in den Thermozykler gegeben und mit dem Temperaturprofil (Tabelle 14, Durchgang 1) durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze aus *up-* und *down-*Primer vereint und erneut im Thermozykler nach folgendem Temperaturprofil (Tabelle 14, Durchgang 2) amplifiziert.

Tabelle 14: Temperaturprofil zur QC-PCR.

Wiederholung	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
[Durchgang 1 / Durchgang 2]			
1x / 1x	1. Initiale Denaturierung	98	0,5
5x / 18x	2. Denaturierung	98	0,5
	3. Hybridisierung	60 - 70 (Primerspezifisch)	0,75
	4. Elongation	72	3,5
1x / 1x	5. Finale Elongation	72	7

Der weitere Ablauf erfolgte wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben (3.2.2.1). Für die anschließende Elektrotransformation (3.1.5) wurden 2 – 3 µL entsalztes und konzentriertes PCR-Produkt eingesetzt.

3.2.3 DNA-Isolierung und Reinigung

Mit der Methode der alkalischen Lyse³³³ und anschließender DNA Adsorption an einer Silikamembran erfolgte die Isolierung von pDNA. Unter Verwendung des „innuPREP Plasmid Mini Kits“ nach Herstellervorgaben konnte aus *E. coli* DH5α-Übernachtskultur pDNA in mpH₂O eluiert werden. Das „innuPREP DOUBLEpure Kit“ wurde nach Herstellervorgaben zur Extraktion von DNA-Fragmenten

und zur schnellen Reinigung von PCR-Produkten eingesetzt. Hierbei erfolgte die Elution der pDNA ebenfalls mit mpH₂O.

3.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm am Spectrophotometer „NanoDrop 2000c“. Das Gerät wurde nach Herstellervorgaben verwendet und als Referenz mpH₂O verwendet.

3.2.5 *Sequence and ligation independent cloning*

Mit dem „innuPREP DOUBLEpure Kit“ wurde das erhaltene PCR-Produkt (3.2.2.1) gereinigt (3.2.3). Die SLIC-Reaktion wurde nach einem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt.³³⁴ Dabei bestand der Ansatz aus 10 - 14 ng des amplifizierten PCR-Produktes mit 1 µg bovinem Serumalbumin sowie 1 µL NEB-Puffer 2 und wurde mit mpH₂O auf ein Endvolumen von 10 µL aufgefüllt. Nachdem 1,5 U T4-DNA-Polymerase hinzugegeben wurde, wurde der Ansatz zuerst für 2,5 min bei RT und anschließend für weitere 10 min auf Eis inkubiert. *E. coli* wurde danach mit 1 – 5 µL des Reaktionsansatzes transformiert (3.1.5).

3.2.6 Kolonie-PCR

Zur Bestimmung, ob auf LB-Agarplatten gewachsene Kolonien die gewünschte pDNA enthalten, wurde Kolonie-PCR verwendet. Dafür wurde der jeweilige PCR-Ansatz (3.2.2) ohne Template-DNA vorbereitet. Anschließend wurde eine Kolonie von einer Agarplatte gepickt und mit einem Zahnstocher zum vorher angesetzten PCR-Ansatz gegeben und leicht vermischt. Für weitere Experimente wurden die restlichen Zellen der gleichen Kolonie für die Inokulation neuer Kulturen verwendet. Die verwendeten Temperaturprofile (3.2.2.1 / 3.2.2.2) für die Kolonie-PCR sind dabei identisch zu denen der SLIC- und QC-PCRs. Als einzige Abweichung wurde die initiale Denaturierungsdauer auf 5 min gesetzt, um eine Lyse der Zellen zu ermöglichen.

3.2.7 DNA-Sequenzvalidierung

Die Sequenzvalidierung der klonierten Konstrukte wurde durch Sequenzierung bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden Sequenzierreaktionen mit den Oligonukleotiden „T7“ und „T7 term“ für das Plasmid pET 22b (+) sowie „M13 uni (-21)“ und „M13 rev (-29)“ für das Plasmid pBBR1mcs-3 (Tabelle 5) in Auftrag gegeben und mit der Zielsequenz überlagert.

3.3 Biochemische Methoden für die Analyse von Proteinen

3.3.1 Zellaufschluss

Zu Beginn wurde das Zellpellet von *E. coli* oder *P. aeruginosa* (3.1.6 / 3.1.7) in 100 mM TRIS pH 8,0 gelöst bis eine homogene Zellsuspension entstanden war. Der Aufschluss erfolgte auf Eis durch den Hochdruckhomogenisator „French Press Cell Disrupter“. Hierbei wurde die Zellsuspension mit vier bis fünf Durchflusszyklen bei einem Zellinnendruck von ~ 700 bar aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde im Anschluss mit einer Spatelspitze Lysozym (20000 U/mg) und 100 μ L 0,5 mg/mL Desoxyribonuklease I (gelöst in 10 mM HEPES pH 7,9, 30 mM $MgCl_2$, 30 mM Ca_2Cl und 50 % (v/v) Glycerol) versetzt und auf Eis für 30 min inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation bei $3220 \times g$ für 15 min bei 4 °C wurden nicht aufgeschlossene Zellen und unlösliche Bestandteile abgetrennt.

3.3.2 Isolierung von Zellmembranen

Das Zelllysate (3.3.1) wurde bei $201.000 \times g$ für 2 h bei 4 °C in der Ultrazentrifuge „Optima L-80 Xp“ zentrifugiert, um eine Isolierung der Zellmembranen zu erhalten. Mit einer Pipette oder vorsichtigem Dekantieren wurde der Überstand abgenommen und ein Waschschrift durch Zugabe von 1 bis 2 mL 100 mM TRIS pH 8,0 unter leichtem Schwenken angeschlossen. Falls es dabei zur Ablösung der Membranfraktion vom Boden des Zentrifugenröhrchens kam, wurde erneut bei $20.000 \times g$ für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Solubilisierung der Membranfraktion in 17,5 mL Solubilisationspuffer (Tabelle 15) über Nacht bei 4 °C und leichtem Schwenken. In einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt bei $20.000 \times g$ für 30 min bei 4 °C wurden noch restliche, unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde weiter verwendet und das Pellet verworfen.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Solubilisationspuffers.

Menge	Reagenz
5 mM	TRIS
300 mM	NaCl
50 mM	KH_2PO_4
20 mM	Imidazol
1 % (v/v)	Triton X-100
pH 8,0	

3.3.3 Proteinreinigung von Pla_{F_{H6}} und ABHD_{6_{H6}}

Die erhaltenen, solubilisierten Membranen (3.3.2) wurden im weiteren Reinigungsverlauf nach einem modifizierten Protokoll^{263, 264} in einem zweistufigen Prozess in Tropfsäulen bei RT bearbeitet. Der erste Schritt beinhaltet eine Reinigung mittels His₆-Affinitäts tag über eine Immobilisierte-

Metallionen-Affinitätschromatographie^{335, 336} (IMAC) mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA). Zwischen dem ersten und dem zweiten Schritt wurde der Puffer mit PD10-Entsalzungssäulen ausgetauscht. Im zweiten Schritt der Reinigung wurde eine Anionen-Austauschchromatographie (AEX) mit UNOsphere Q-Säulenmaterial³³⁷ durchgeführt.

Für die IMAC wurde die Tropfsäule mit 3 – 3,5 mL Säulenmaterial „Ni-NTA Superflow“ beladen, welches mit 25 mL Solubilisationspuffer (Tabelle 15) äquilibriert wurde. Anschließend wurden die solubilisierten Membranen (3.3.2) auf die Säule aufgetragen und durch Gravitationsfluss über das Säulenmaterial geleitet. Die im weiteren Verlauf verwendeten Puffer und deren eingesetzten Volumina sind Tabelle 16 zu entnehmen. Hierbei wurde ab Waschpuffer 2 das gewünschte Detergens OG oder DDM verwendet. Für die Elution wurden zuerst 5 mL Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Säulenmaterial durch einen Plastikspatel aufgewirbelt. Nachdem sich das Säulenmaterial erneut abgesetzt hatte, wurde die Tropfsäule am oberen Ende verschlossen, um so mit einer kontrollierten und geringeren Flussrate das Eluat aufzufangen. Zum Schluss wurden weitere 5 mL Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen und erneut langsam eluiert und mit den vorherigen 5 mL Eluat vereint.

Tabelle 16: Verwendete Puffer und deren jeweilige Volumina bei der IMAC.

Waschpuffer 1 (25 mL)		Waschpuffer 2 (25 mL)	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
5 mM	TRIS	5 mM	TRIS
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
50 mM	KH ₂ PO ₄	50 mM	KH ₂ PO ₄
20 mM	Imidazol	20 mM	Imidazol
1 % (v/v)	Triton X-100	30 mM bzw. 0,22 mM*	OG bzw. DDM
pH 8,0		pH 8,0	

Waschpuffer 3 (10 mL)		Elutionspuffer (10 mL)	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
5 mM	TRIS	5 mM	TRIS
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
50 mM	KH ₂ PO ₄	50 mM	KH ₂ PO ₄
30 mM	Imidazol	300 mM	Imidazol
30 mM bzw. 0,22 mM*	OG bzw. DDM	30 mM bzw. 0,22 mM*	OG bzw. DDM
pH 8,0		pH 8,0	

*Die Auswahl des Detergens zwischen OG oder DDM erfolgte anhand des gewählten Proteins und der Mutanten. Allgemein wurden alle Proteine mit DDM solubilisiert. Allerdings wurden die PlaF-Mutanten der putativen Ligandenbindestelle ausschließlich mit OG solubilisiert.

Das IMAC-Proteineluat wurde mit PD10-Entsalzungssäulen nach Herstellervorgaben in 100 mM TRIS mit 30 mM OG bzw. 0,22 mM DDM umgepuffert.³³⁸ Für die folgende AEX wurden 6 mL Anionenaustauschmaterial auf die Tropfsäule gepackt und mit 25 mL des Waschpuffers 4 (Tabelle 17) äquilibriert. Anschließend wurde die umgepufferte Proteinlösung hinzugegeben und durch Gravitationsfluss über das Säulenmaterial geleitet. Die im weiteren Verlauf verwendeten Puffer und deren eingesetzten Volumina können Tabelle 17 entnommen werden. Das Zielprotein befand sich dabei im Durchfluss des Säulenauftrags und den Waschschritten, wohingegen nahezu alle Proteinverunreinigungen durch das Säulenmaterial zurückgehalten wurden. Nach einer Untersuchung der jeweiligen Fraktionen über SDS-PAGE (3.3.5) wurden, je nach Reinheitsgrad, der Durchfluss des Säulenauftrags und der Durchfluss von Waschpuffer 4 vereint. In Einzelfällen wurde auch der Durchfluss des Waschpuffers 5 zusätzlich verwendet.

Tabelle 17: Verwendete Puffer und deren jeweilige Volumina bei der Anionenaustauschchromatographie.

Waschpuffer 4 (25 mL)	
Menge	Reagenz
100 mM	TRIS
30 mM bzw. 0,22 mM	OG bzw. DDM
pH 8,0	

Waschpuffer 5 (10 mL)	
Menge	Reagenz
100 mM	TRIS
20 mM	NaCl
30 mM bzw. 0,22 mM	OG bzw. DDM
pH 8,0	

Elutionspuffer (10 mL)	
Menge	Reagenz
100 mM	TRIS
500 mM	NaCl
30 mM bzw. 0,22 mM	OG bzw. DDM
pH 8,0	

Die vereinte Proteinlösung wurden in Ultrafiltrationseinheiten (VivaSpin 2 / 20, 30.000 MWCO) bis zum Erreichen der gewünschten Proteinkonzentration bei 3220 x g bei 4 °C eingengt. Im weiteren Verlauf wurde diese Probe als Pla_{FOG} bzw. Pla_{FDDM} und ABHD_{6DDM} bezeichnet. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 260 nm am Spectrophotometer „NanoDrop 2000c“. Dazu wurden die Molekulargewichte und die Extinktionskoeffizienten der Proteine Pla_{FH6} und ABHD_{6H6} mit dem Online-Werkzeug „ProtParam“ von „ExPASy Bioinformatics Resource Portal“ (Tabelle 7) ermittelt. Alle erhaltenen Werte sind der nachfolgenden Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Liste der Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der Proteine und ihrer generierten Varianten.

Proteinvariante	Molekulargewicht [g/mol]	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]
PlaF _{H6}	35660	22920
PlaF _{H6} V33A	35630	22920
PlaF _{H6} V33I	35670	22920
PlaF _{H6} E34A	35600	22920
PlaF _{H6} D74W	35730	28420
PlaF _{H6} N77W	35730	28420
PlaF _{H6} R80W	35690	28420
PlaF _{H6} M166W	35710	28420
PlaF _{H6} L177W	35730	28420
PlaF _{H6} V185W	35740	28420
PlaF _{H6} F200W	35700	28420
PlaF _{H6} L206W	35730	28420
PlaF _{H6} L214W	35730	28420
PlaF _{H6} R217W	35690	28420
PlaF _{H6} A218W	35775	28420
PlaF _{H6} A221W	35770	28420
PlaF _{H6} S222W	35760	28420
PlaF _{H6} N225W	35730	28420
PlaF _{H6} A226W	35770	28420
PlaF _{H6} F229W	35700	28420
PlaF _{H6} R233W	35690	28420
PlaF _{H6} Y236W	35680	26930
PlaF _{H6} V290W	35740	28420
ABHD6 _{H6}	39150	46870

3.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteinproben unter denaturierenden Bedingungen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.^{325, 339} Die verwendeten 0,75 mm diskontinuierlichen Gele wurden, wie in Tabelle 19 aufgelistet, vorbereitet. Dabei wurden die Reagenzien *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) erst kurz vor Beginn der Polymerisation hinzugegeben.

Tabelle 19: Rezeptur für zwei diskontinuierliche Gele mit 5 % Sammelgel und 12 % Trenngel.

5 % Sammelgel		12 % Trenngel	
Menge [mL]	Reagenz	Menge [mL]	Reagenz
2,8	ddH ₂ O	3,4	ddH ₂ O
0,83	30 % (v/v) Acrylamid*	4,0	30 % (v/v) Acrylamid*
1,3	0,5 mM TRIS (pH 6,8)	2,5	1,5 mM TRIS (pH 8,8)
0,05	10 % (w/v) SDS	0,1	10 % (w/v) SDS
0,05	TEMED	0,1	TEMED
0,01	10 % (w/v) APS	0,01	10 % (w/v) APS

* Mischung aus 29 % (v/v) Acrylamid und 1 % (w/v) *N,N'*-Methylenbisacrylamid

Die Proben wurden zu Beginn mit 1x SDS Probenpuffer (60 mM TRIS pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 50 mM Dithiothreitol (DTT), 10 % (v/v) Glycerol, 0,005 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Abbildung 8) verwendet. Vor Beginn der Elektrophorese wurde 1x SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) in die Laufkammer der „Mini-Protean Tetravertical Electrophoresis Cell“ (Tabelle 1) gefüllt. Nach dem Probenauftrag wurden die Proben durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 15 min im Sammelgel konzentriert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte anschließend im Trenngel bei 200 V für 40 – 45 min. Mit Coomassie-Brilliantblau G-250 Lösung (10 % Ammoniumsulfat, 1,2 % (v/v) Phosphorsäure, 20 % (v/v) Methanol, 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G-250) wurden die Proteinbanden über Nacht unter leichtem Schwenken angefärbt.³⁴⁰ Zur Entfärbung der Gele wurde ddH₂O verwendet.

3.3.6 Immunologischer Proteinnachweis mittels Western Blotting

Zur spezifischen Detektion von Proteinen auf der SDS-PAGE (3.3.5) wurden die Proteinbanden auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen übertragen.³⁴¹ Die Visualisierung erfolgte durch die signalverstärkte Chemolumineszenz (ECL)-Reaktion der Antikörper-konjugierten Meerrettichperoxidase.³⁴² Die Immobilisierung der Proteine auf der PVDF-Membran wurde in Dunn-Carbonat (DC)-Puffer (Tabelle 20) durchgeführt.³⁴³ Als Erstes wurden die PVDF-Membranen für 5 min in Methanol aktiviert und daraufhin für 2 min in ddH₂O gewaschen und bis zur Nutzung in DC-Puffer äquilibriert. Danach wurden die Proteine für 15 min bei 150 mA und anschließend für 1 h bei 300 mA in DC-Puffer auf die PVDF-Membran transferiert. Für die Sättigung der Membran wurde diese für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween-20 (TBST, Tabelle 20) und 5 % (w/v) Milchpulver leicht geschwenkt. Zur Antikörperbindung wurde die PVDF-Membran mit 1:5000 (v/v) Anti-His(C-term)-HRP-Antikörper in TBST mit 5 % Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Nach diesem Bindungsschritt wurde die Membran dreimal für 15 min in TBST unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde frisch angesetzte ECL-Lösung (1 mL 1,4 µM Luminol in 100 mM TRIS pH 8,6, 100 µL 6,7 µM *p*-Hydroxycoumarin in DMSO, 0,3 µL (v/v)

H₂O₂) auf die Membran gegeben und für 1 - 2 min inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte anhand des „Advanced Fluorescence Imagers“ (Tabelle 1).

Tabelle 20: Zusammensetzung des DC- und TBST-Puffers.

DC-Puffer		TBST-Puffer	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
10 mM	NaHCO ₃	25 mM	TRIS
3 mM	Na ₂ CO ₃	150 mM	NaCl
20 % (v/v)	Methanol	3 mM	KCl
		0,2 % (v/v)	Tween-20
		pH 8,0	

3.3.7 Enzymaktivitätsbestimmung mit *para*-Nitrophenylacylsubstraten

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität wurde die Quantifizierung von freigesetztem *p*-Nitrophenolat aus der enzymatischen Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacylester herangezogen.³⁴⁴ Die Durchführung erfolgte in 96-*well* MTP und *p*-Nitrophenolat konnte photometrisch bei einer Absorption bei 410 nm (A_{410nm}) am Plattenphotometer „SpectraMax 250“ (Tabelle 1) ermittelt werden. Dabei wurde zur Bestimmung der Esteraseaktivität nach einem modifizierten Protokoll gearbeitet.³⁴⁵ Die Substrate *p*-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB) und *p*-Nitrophenylhexanoat (*p*NPH) wurden jeweils als 20 mM Stammlösung in 2-Propanol gelöst. Die verwendete Substratlösung wurde frisch durch eine 1:20 Verdünnung der jeweiligen Stammlösung mit 100 mM K₂HPO₄ pH 7,4 angesetzt. Für einen Ansatz wurden 5 – 95 µL entsprechend verdünnter Probe 100 – 150 µL Substratlösung hinzugefügt und anschließend eine Kinetikmessung für 5 – 15 min bei 30 °C vorgenommen. Dabei ließ sich über folgende Formel die volumetrische Enzymaktivität bestimmen (Formel 1).

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta OD_{410\text{ nm}} \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot VF}{d \cdot \varepsilon \cdot t \cdot V_{\text{Probe}}}$$

Formel 1: Berechnung der volumetrischen Aktivität. V_{gesamt}= Gesamtvolumen [mL], VF= Verdünnungsfaktor, d= Schichtdicke [cm], ε= Extinktionskoeffizient [mL/µmol*cm], hier 10,4 mL/µmol*cm, t= Zeit, V_{Probe}= Volumen der Probe [mL].

3.3.8 Enzymaktivitätsbestimmung mit natürlichen (Phospho-) Lipidsubstraten

Für die Aktivitätsbestimmung wurde folgendes Protokoll verwendet und die beschriebenen Modifikationen angewandt.³⁴⁶ Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieser Assay als *non-esterified fatty acids* (NEFA)-Aktivitätsassay betitelt. Zu Beginn wurden die verwendeten Substrate (Tabelle 21) als Stammlösung mit Assay-Puffer (Tabelle 22) versetzt, gut durchmischt und für 30 min bei RT inkubiert.

Tabelle 21: Verwendete natürliche (Phospho-) Lipidsubstrate für die Enzymaktivitätsbestimmung.

Substratname	Firma	Abkürzung
Monoacylglyceride		
1-Lauroyl- <i>rac</i> -glycerol	Sigma, Taufkirchen	1-LG
1-Oleoyl- <i>rac</i> -glycerol	Sigma, Taufkirchen	1-OG
1-Stearoyl- <i>rac</i> -glycerol	Sigma, Taufkirchen	1-SG
2-Lauroylglycerol	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH, Bremen	-
2-Myristoylglycerol	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH, Bremen	-
2-Palmitoylglycerol	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH, Bremen	-
2-Stearoylglycerol	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH, Bremen	-
2-Arachidonylglycerol	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	2-AG
Diacylglyceride		
1,2-Dilauroylglycerol	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	-
1,2-Dimyristoylglycerol	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	-
1,2-Dipalmitoylglycerol	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	-
1,2-Distearoylglycerol	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	-
Lysophospholipide		
1-Myristoyl-lysophosphatidylglycerol	Sigma, Taufkirchen	LPG14
1-Myristoyl-lysophosphatidylethanolamin	Sigma, Taufkirchen	LPE14
1-Stearoyl-lysophosphatidylglycerol	Sigma, Taufkirchen	LPG18
1-Stearoyl-lysophosphatidylethanolamin	Sigma, Taufkirchen	LPE18
Phospholipide		
1,2-Dilauroyl-phosphatidylglycerol	Sigma- Taufkirchen	PG12
1,2-Dimyristoyl-phosphatidylglycerol	Sigma, Taufkirchen	PG14
1,2-Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin	Sigma, Taufkirchen	PE14
1,2-Distearoyl-phosphatidylglycerol	Sigma, Taufkirchen	PG18
1,2-Distearoyl-phosphatidylethanolamin	Sigma, Taufkirchen	PE18
Weitere Lipidsubstrate		
Bis-(monomyristoylglycero)phosphat	Sigma, Taufkirchen	BMP-C14
<i>sn</i> -(3-myristoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho- <i>sn</i> -3'-(1',2'-dimyristoyl)-glycerol	Sigma, Taufkirchen	HBMP-C14
1',3'-bis(1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho)-glycerol	Sigma, Taufkirchen	CL-14

Für (Lyso-) Phosphatidylethanolamine wurde eine Konzentration von 6,7 mM und für alle weiteren 13,4 mM verwendet. Bei noch vorhandenem nicht gelöstem Substrat wurde die Lösung für 5 min bei 60 °C inkubiert und zusätzlich für 1 min beschallt. Die Substratstammlösung wurde unmittelbar vor der Reaktion mit Assay-Puffer auf 2,68 mM verdünnt und im Vortexmischer gut durchmischt. Im Fall einer nicht geklärten Lösung wurde die Ultraschallprozedur wiederholt. Die Reaktion wurde durch Mischen von 25 µL 24 µM gereinigter Protein-Lösung mit 25 µL Lipidsubstratlösung gestartet und bei 30° C unter leichtem Schwenken inkubiert. Als Blankproben wurden Waschpuffer 4 (Tabelle 17) mit Assay-Puffer, Waschpuffer 4 mit Lipidsubstratlösung sowie Protein-Lösung mit Assay-Puffer verwendet. Letztere Blankprobe wurde verwendet, um endogene Fettsäuren nachzuweisen, die mit dem jeweiligen Protein kogereinigt wurden. Die Inkubationsdauer der Reaktion variierte je nach Substrat: 3 - 5 h für Mono- und Diacylglyceride, 12 h bei LysoPL und 24 h bei PLs. Die durch Hydrolyse der (Phospho-) Lipide und Acylglyceride entstandenen FFS wurden durch das NEFA-Kit nach Herstellervorgaben bei einer Absorption von 550 nm quantifiziert.³⁴⁷

Tabelle 22: Zusammensetzung des Assay-Puffers für die Aktivitätsbestimmung mit natürlichen Phospholipid- und Lipidsubstraten.

Menge	Reagenz
50 mM	TRIS
100 mM	NaCl
1 mM	CaCl ₂
1 % (v/v)	Triton X-100
pH 8,9	

3.3.9 Enzymaktivitätsbestimmung mit CoA-Thioestern

Zur Aktivitätsbestimmung der Thioesteraseaktivität wurden Coenzym A (CoA)-Acylester in einem kolorimetrischen Assay mit dem Ellmanns Reagenz 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) getestet. Die Acyl-CoA-Substrate (Tabelle 23) wurden hierfür als 5 µM Stammlösung im Assay-Puffer (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 8,9) gelöst und das DTNB mit mpH₂O als 10 mM Stammlösung vorbereitet.

Tabelle 23: Verwendete Acyl-Coenzym A-Substrate für die Aktivitätsbestimmung.

Substratname	Firma	Abkürzung
Lauroyl-Coenzym A	Sigma, Taufkirchen	CoA-C12
Myristoyl-Coenzym A	Sigma, Taufkirchen	CoA-C14
Palmitoyl-Coenzym A	Sigma, Taufkirchen	CoA-C16

Die Ansätze wurden aus 50 µL 6,54 µM Proteinlösung mit 50 µL 5 µM CoA-Substratstammlösung und 50 µL Assay-Puffer angesetzt. Als Referenzproben wurden einmal 50 µL des jeweiligen Proteinpuffers mit 100 µL Assay-Puffer, 50 µL 6,54 µM Proteinlösung mit 100 µL Assay-Puffer sowie

50 μL des jeweiligen Proteinpuffers mit 50 μL 5 mM CoA-Substratstammlösung und 50 μL Assay-Puffer angesetzt. Anschließend wurde für jede zu vermessende Probe 7,5 μL DTNB-Lösung in eine 96-well MTP vorgelegt. Nach der Zugabe von 100 μL der zuvor hergestellten Ansätze und Referenzproben in die MTP erfolgte eine Messung der Kinetik am Plattenphotometer „SpectraMax 250“ (Tabelle 1) über 30 min bei 412 nm. Der zur Berechnung der Aktivitäten verwendete Extinktionskoeffizient für DTNB beträgt $13300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3.10 Bestimmung der Thermostabilität durch *nano differential scanning fluorimetry*

Die Analyse der Temperaturstabilität von Proteinen wurde durch *differential scanning fluorimetry* (DSF) durchgeführt. Hierbei wird die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz, welche überwiegend durch Tryptophan vermittelt wird, ermittelt.³⁴⁸ Bei einer Änderung der Tryptophanumgebung durch thermische Entfaltung kommt es zu einer Verschiebung der Tryptophanemission von 350 auf 330 nm. Über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 350 nm und 330 nm als Funktion der Temperatur kann die T_{SM} ermittelt werden, bei der 50 % der vorliegenden Proteine entfaltet vorliegen. Die Messung erfolgte mit 10 μL Proteinlösung (1 mg/mL) in „Prometheus NT.Plex nano-DSF Grade Standard Capillary Chips“ am „Prometheus NT.Plex“ (Tabelle 1). Der Temperaturgradient wurde dabei von 15 bis 95 °C mit einer Heizrate von 0,5 bis 1 °C gewählt.

3.3.11 *In vitro*-Crosslinking und Fettsäure-Inhibierung

Das *in vitro*-Crosslinking erfolgte mit Detergens-solubilisiertem (3.3.3) oder SUV-rekonstituiertem Protein (3.3.12). Hierzu wurden 10 μL 15,5 - 31 μM Proteinlösung mit 6 μL Crosslinking-Lösung (Tabelle 24) versetzt und 1,5 h bei RT inkubiert. Hierbei wurde neben Dimethylpimelimidat (DMP) auch *Bis*-(sulfosuccinimidyl) glutarat (BS^2G) und *Bis*-(sulfosuccinimidyl) suberat (BS^3) als *Crosslinker* verwendet (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zusammensetzung der verschiedenen *Crosslinking*-Lösungen.

DMP-Lösung		BS ² G-Lösung		BS ³ -Lösung	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
100 mM	TRIS	100 mM	TRIS	100 mM	TRIS
150 mM	DMP	5 mM	BS ² G	5 mM	BS ³
0,22 / 30 mM*	DDM / OG	0,22 / 30 mM*	DDM / OG	0,22 / 30 mM*	DDM / OG
pH 8,6		pH 8,0		pH 8,0	

*Die Reagenzien wurden nur im Falle von Detergens-solubilisierten Proteinen hinzugegeben und bei SUV-rekonstituierten Proteinen gänzlich herausgenommen.

In Versuchen zur Fettsäure-Inhibierung wurde der Proteinprobe vor dem *Crosslinking* 0,6 μL Decansäure (C10) bzw. DMSO als Blankprobe zugesetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach 1,5 h Inkubationszeit wurde die *Crosslinking*-Reaktion durch die Zugabe von 2 μL Stopp-Lösung (Tabelle 25)

gestoppt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Probe auf Aktivität (3.3.7) oder mit SDS-PAGE (3.3.5) untersucht werden.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Stopp-Lösung für das *in vitro*-Crosslinking.

Menge	Reagenz
1 M	Glycin
50 mM	TRIS
150 mM	NaCl
pH 8,3	

3.3.12 Rekonstitution von Pla_{F_{H6}} und ABHD6_{H6}

3.3.12.1 Herstellung von *small unilamellar vesicles*

In dieser Arbeit wurden SUVs hergestellt und zur Rekonstitution verwendet. Hierfür wurde nach einem modifizierten Protokoll gearbeitet.³⁴⁹ Die verwendeten PLs 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) und das *E. coli total lipid extract* (*E. coli* TLE) wurden als Chloroform-gelöste Variante von Avanti Polar Lipids, Alabaster bestellt. Zur Herstellung der SUVs wurden 2,6 µmol PL in ein Glasreaktionsgefäß gegeben, um keine Fremdstoffe durch das organische Lösemittel zu übertragen. Das verwendete *E. coli* TLE setzt sich zu 57,5 wt/wt % PE, 15,1 wt/wt % PG, 9,8 wt/wt % CL und 17,6 wt/wt % unbekannter Komponenten zusammen³⁵⁰ und wurde mit 2 mg eingesetzt. Zuerst wurde das Chloroform unter dem Abzug langsam mit einem leichten Argonstrom verdampft. Anschließend erfolgte eine Entfernung des restlichen Chloroforms an der Vakuumzentrifuge „Speed-Vac“ (Tabelle 1) für 1 - 2 h. Den getrockneten PLs wurden 2,6 mL 100 mM TRIS pH 8,0 hinzugegeben und das Glasreaktionsgefäß verschlossen. Nach einer zusätzlichen Versiegelung mit Parafilm wurde das Gefäß für 15 – 30 min bei RT stehengelassen. Für eine vollständige Resuspension wurde das Gefäß auf einen Vortexer gegeben und gründlich durchmischt. Die Lösung sollte daraufhin eine milchige Suspension sein. Zur Ausbildung der mizellaren Strukturen wurde die Suspension für 2 min an die Ultraschallnadel bei 40 % Leistung gegeben, bis die Suspension nahezu klar war. Falls dies nicht zutraf, wurde erneut Ultraschall angelegt. Die frisch angesetzte Lösung wurde bis zur Verwendung am selben Tag bei 4 °C gelagert.

3.3.12.2 Detergensentfernung von solubilisiertem Pla_{F_{H6}} und ABHD6_{H6}

Um eine erfolgreiche Rekonstitution der Proteine in die zuvor hergestellten Phospholipid-SUVs (3.3.12.1) zu ermöglichen, erfolgte eine Sättigung der SUVs mit dem Detergens des jeweils gereinigten Proteins im Detergens-Lipid-Molverhältnis (mol : mol) 1:1,3 für OG bzw. 1:1 für DDM. Die Lösung wurde anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Nach einer Ultraschallbeschallung für 10 min wurde das Protein im Protein-Lipid-Gewichtsverhältnis (g : g) 1:40 hinzugegeben und 3 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Zur Entfernung des Detergens wurden die hydrophilen BioBeads

SM-2 (Tabelle 2) verwendet. Diese wurden mit Wasser gewaschen und anschließend im SUV-Puffer (100 mM TRIS pH 8,0) äquilibriert. Nachdem die äquilibrierten BioBeads in einem Detergens-*Beads*-Verhältnis von 1:10 zu den destabilisierten Phospholipid-SUVs gegeben wurden, erfolgte eine Inkubation bei RT für 2 h unter leichtem Schwenken. Anschließend wurden die BioBeads entfernt und über Nacht erneut mit äquilibrierten BioBeads versetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der BioBeads und die Proben wurden auf Eis oder bei 4 °C gelagert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird rekonstituiertes PlaF_{H6} als PlaF_{SUV} bzw. ABHD6_{H6} als ABHD6_{SUV} bezeichnet.

3.3.12.3 Bestimmung der Effizienz der Detergensenfernung

Die Effizienz der Detergensenfernung konnte mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode anhand eines kolorimetrischen Assay bestimmt werden und wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt und mit den nachfolgend beschriebenen Modifikationen abgeändert.³⁵¹ 25 µL der Probe vor und nach Entfernung des Detergens durch die BioBeads (3.3.12.2) wurden jeweils mit 125 µL 5 % (v/v) Phenol unter dem Abzug versetzt. Anschließend wurden 300 µL konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und die Reaktionsgefäße verschlossen. Durch die exotherme Reaktion erhitzt sich das Gemisch, weshalb gewartet wurde bis dieses wieder auf RT gekühlt war. Der relative Detergensgehalt konnte durch die Bestimmung der Absorption bei 490 nm ermittelt werden.

3.3.13 TCA-NaDoc-Fällung

Zur Konzentrierung von Proteinproben im Niedrigmaßstab für spätere SDS-PAGE-Analysen (3.3.5) wurde eine modifizierte Trichloressigsäure (TCA)-Natriumdeoxycholat (NaDoc)-Fällung verwendet.³⁵² In dieser Arbeit wurde die Methode auf gereinigtes, Detergens-solubilisiertes Protein (3.3.3) sowie SUV-rekonstituiertes Protein (3.3.12.2) angewendet, die zuvor über *in vitro*-Crosslinking (3.3.11) verknüpft wurden. Dazu wurde 1 mL der jeweiligen Lösung mit 100 µL 1 % (w/v) eiskaltem NaDoc versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 100 µL eiskalte 40 % (w/v) TCA zur Probe hinzugegeben und erneut für 20 min auf Eis inkubiert. Im darauffolgenden Zentrifugationsschritt bei 21.000 x g für 30 min bei 4 °C wurde das Präzipitat pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 500 µL eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Nach der Abnahme des Überstands wurde das Pellet für mindestens 5 min getrocknet. Die Resuspension erfolgte anschließend im gewünschten Volumen von 100 mM TRIS pH 8,0.

4 ERGEBNISSE

Innerhalb dieser Arbeit wurden biochemische und biophysikalische Analysen und Experimente angewendet, um PlaF und ABHD6 näher zu charakterisieren. Dabei setzen sich die durchgeführten Experimente in vier Themenblöcke zusammen. Zunächst wurden strukturbasierte Mutationen vorgenommen und deren Einfluss innerhalb der Dimerisierung und Fettsäure-basierten Dimerisierung analysiert. Des Weiteren wurde das lipolytische Profil von PlaF um verschiedene strukturgebende Lipide, Signalmoleküle und CoA-Thioester erweitert. Außerdem konnte die Etablierung eines Rekonstitutionsprozesses vorgenommen werden, die erste Untersuchungen der PlaF-Lipid-Interaktionen ermöglichte. Zum Schluss wurde ein biochemischer Vergleich zwischen PlaF und dessen humanen Homolog ABHD6 durchgeführt.

4.1 3D-Strukturanalyse zur Identifizierung potenziell wichtiger Aminosäurereste für die PlaF-Funktion

Die Regulation der Proteinfunktion ist häufig ein komplexer Vorgang aus verschiedenen Interaktionen mit dem Protein. Die transiente, nicht-kovalente Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen in z. B. Homo- oder Heterooligomeren sind charakteristische, regulative Mechanismen zur Steuerung der Proteinfunktion.^{173, 174} Weiterhin bewirken Protein-Liganden-Interaktionen als Effektoren in der Allosterie eine Regulation der Proteinfunktion.¹⁷⁴ Ein Unterpunkt der erwähnten Interaktionen stellen die Protein-Lipid-Interaktionen dar, die erst in den 1990ern in den Blickwinkel der Forschung rückten.³⁵³ Allen zuvor genannten Interaktionen ist häufig eine strukturelle Änderung des Proteins gemein, weshalb das Zusammenspiel aller Interaktionen zur Regulation der Proteinfunktion als Struktur-Funktionsbeziehung beschrieben wird.

Für PlaF wurde bereits 2010 eine dynamische Homodimerisierung vorgeschlagen²⁷⁰, welche mit zusätzlichen *in vivo*- und *in vitro*-Crosslinking-Experimenten in Kombination mit Aktivitätsmessungen belegt werden konnte.²⁶⁵ Diese zeigten eine Regulation der PlaF-Aktivität durch ein Äquilibrium zwischen monomeren PlaF (m-PlaF) und dimeren PlaF (d-PlaF).²⁶⁵ Anhand der 3D-Kristallstruktur konnte neben der PlaF-PlaF-Interaktion auch die PlaF-Liganden-Interaktion belegt werden und ermöglichte somit eine 3D-Strukturanalyse. Ziel der vorliegenden Arbeit war der vertiefende Einblick in den komplexen Vorgang der PlaF-Homodimerisierung und dessen katalytischen Mechanismus durch strukturbasierte Mutationsstudien.

4.1.1 Mutationen innerhalb der putativen Ligandenbindestelle beeinflussen die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF

Das bei der PlaF-Reinigung verwendete Solubilisierungsmittel OG konnte innerhalb der 3D-Proteinstruktur zwischen der Dimerisierungsstelle identifiziert werden und über die Position in der T-förmigen, aktiven Bindetasche als putative Ligandenbindestelle postuliert werden.²⁶⁵ *In vivo* wäre

hypothetisch eine Ersetzung von OG in der Bindestelle durch einen natürlichen Liganden denkbar, der so Einfluss auf die Dimerisierung und die Aktivität besitzen könnte. Ein derartig stabilisierender Effekt auf Proteindimere konnte bereits mit einem gebundenen Ca^{2+} -Ion an der Schnittstelle der OMPLA aus *E. coli* gezeigt werden.³⁵⁴ Mit der Untersuchung der enzymatischen Aktivität und Dimerisierung von PlaF-Mutanten der putativen Ligandenbindestelle sollten diese möglichen Einflüsse untersucht werden. Die Tatsache, dass PlaF mit OG, aber nicht mit DDM unter den gleichen Bedingungen kristallisiert, zeigte ferner, dass die Konformation von PlaF in Gegenwart dieser beiden Detergenzien unterschiedlich ist. Zur Belegung möglicher Effekte auf die Dimerisierung und Aktivität sollten Aminosäure-Seitenketten in der PlaF-Kristallstruktur gefunden werden, die als Interaktionspartner von OG fungieren können. Anhand einer *in silico*-Analyse mit der Software „Swiss PDB Viewer“ (Tabelle 6) konnten benachbarte Aminosäuren in einem Radius von 4 Å um OG identifiziert werden (Abbildung 9).

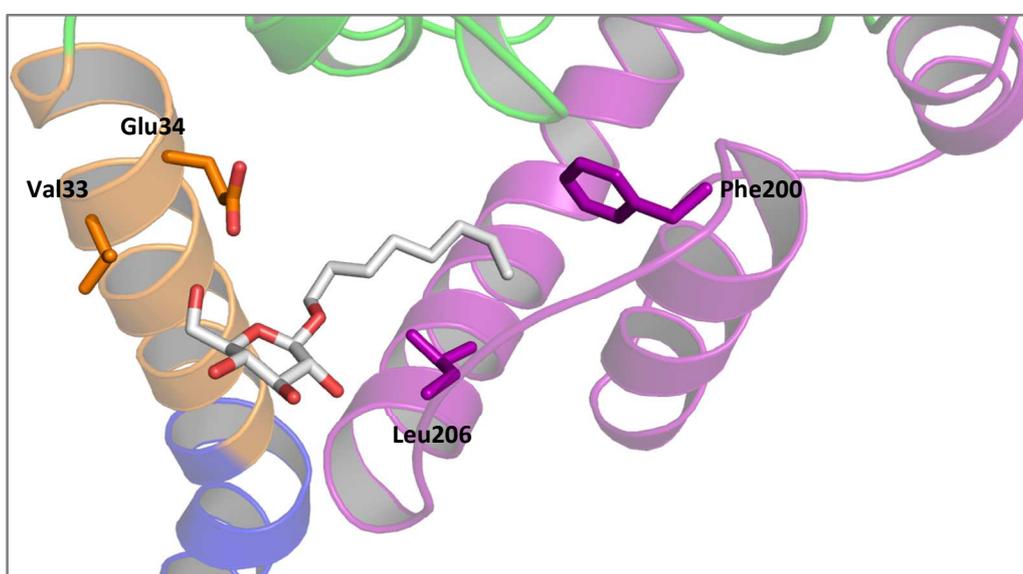


Abbildung 9: PlaF-Struktur mit dem putativen Liganden OG an der Dimerschnittstelle. Die Interaktionen sind in beiden PlaF-Monomeren vorzufinden und werden hier am Beispiel von PlaF_A dargestellt. Die in Stäbchenform dargestellten Aminosäure-Seitenketten (orange und lila) wurden *in silico* in einem Abstand von 4 Å um OG (weiß) als putative Interaktionspartner identifiziert. (PDB-ID: 6I8W)

Dabei konnte zwischen Zucker-Protein- und Fettsäurekette-Protein-Interaktionen unterschieden werden. Interessanterweise konnten auch Interaktionen von OG zu der im aktiven Zentrum gebundene Fettsäure identifiziert werden. Die Interaktionen könnten als mögliche Erklärung für die Verbindung zwischen Ligand und Enzymfunktion herangezogen werden.²⁶⁵ Anschließend wurden mit der Software „Swiss PDB Viewer“ *in silico*-Mutagenesen durchgeführt. Mit der Mutation zu Alanin sollte eine größere Bindetasche einhergehen, wohingegen das Einführen von Isoleucin und besonders Tryptophan sterisch die Bindetasche verkleinern sollte. In beiden Fällen sollte es zur Auflösung der putativen Interaktionen zwischen OG und PlaF kommen. Die verschiedenen Mutationen wurden durch Oligonukleotide (Tabelle 5) mittels QC-Mutagenese (3.2.2.2) jeweils in den pBBR-*plaF*_{H6}-Vektor eingebracht (pBBR-*plaF*_{H6}-V33A, pBBR-*plaF*_{H6}-V33I,

pBBR-*plaF_{H6}*-E34A, pBBR-*plaF_{H6}*-F200W, pBBR-*plaF_{H6}*-L206W). Die erfolgreiche Einbringung wurde mittels Sequenzierung untersucht und verifiziert (3.2.7). Anschließend wurden Expressionen der jeweiligen Mutanten im Kleinmaßstab (3.1.6) durchgeführt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (3.3.1) und anhand eines *pNPB*-Aktivitätsassays (3.3.7) bzw. Western Blot (3.3.6) wurden die Auswirkungen der Mutationen auf die Aktivität und Bildung von PlaF untersucht (Abbildung 10).

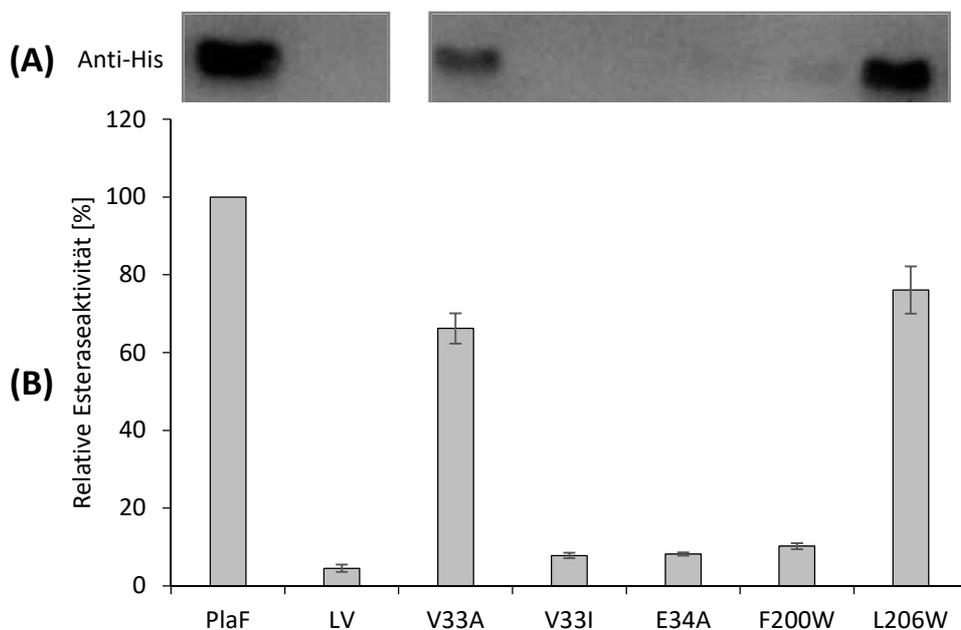


Abbildung 10: In vivo-Charakterisierung der PlaF-Varianten der putativen OG-Ligandenbindestelle. (A): Western Blot Analyse zur Detektion der exprimierten *plaF*-Varianten. Zur Detektion wurde ein Anti-His-Affinitätstag-Antikörper (2.2) verwendet. **(B):** Relative Esteraseaktivität der homolog produzierten PlaF_{H6}-Mutanten. Die *P. aeruginosa*-Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und 2,5 µL des Zelllysats (OD_{580nm} = 0,1) mit *pNPB*-Substrat versetzt. Als Referenz wurde zusätzlich der *P. aeruginosa*-Stamm mit Leervektor (LV) pBBR1mcs-3 mitgeführt. Die relative Aktivität wurde auf wildtypisches PlaF in *P. aeruginosa* mit 100 % normalisiert. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten.

In Abbildung 10B zeigten die PlaF_{H6}-Mutanten V33A und L206W eine verringerte Esteraseaktivität von 65 bis 75 % gegenüber PlaF_{H6}. Bei den restlichen Mutanten wiesen V33I, E34A und F200W nur eine gering höhere Aktivität als der Stamm mit Leervektor (LV) pBBR1mcs-3 auf. Die Western Blot-Analyse der Produktion der PlaF_{H6}-Mutanten zeigte intensive Banden der Mutanten V33A und L206W, jedoch nur schwache Banden der Mutanten E34A und F200W (Abbildung 10A). Hingegen zeigte der Western Blot keine Bildung der PlaF_{H6} V33I-Variante. Beim Vergleich der Ergebnisse zeigte sich eine Korrelation zwischen Aktivität und Produktion der jeweiligen Mutante. Somit konnten nur V33A und L206W in *P. aeruginosa* im Großmaßstab (3.1.6) gebildet und mittels IMAC und AEX gereinigt (3.3.3) werden. Die Reinigung erfolgte dabei mit OG als Detergens, um eine Faltung von PlaF, wie in der ermittelten 3D-Struktur, beizubehalten.

Die gereinigten PlaF_{OG}-Varianten wurden auf ihr Dimerisierungsverhalten und das Verhalten bei Fettsäure-induzierter Inhibierung (3.3.11) sowie auf Stabilität (3.3.10) und Aktivität (3.3.7) hin untersucht (Abbildung 11).

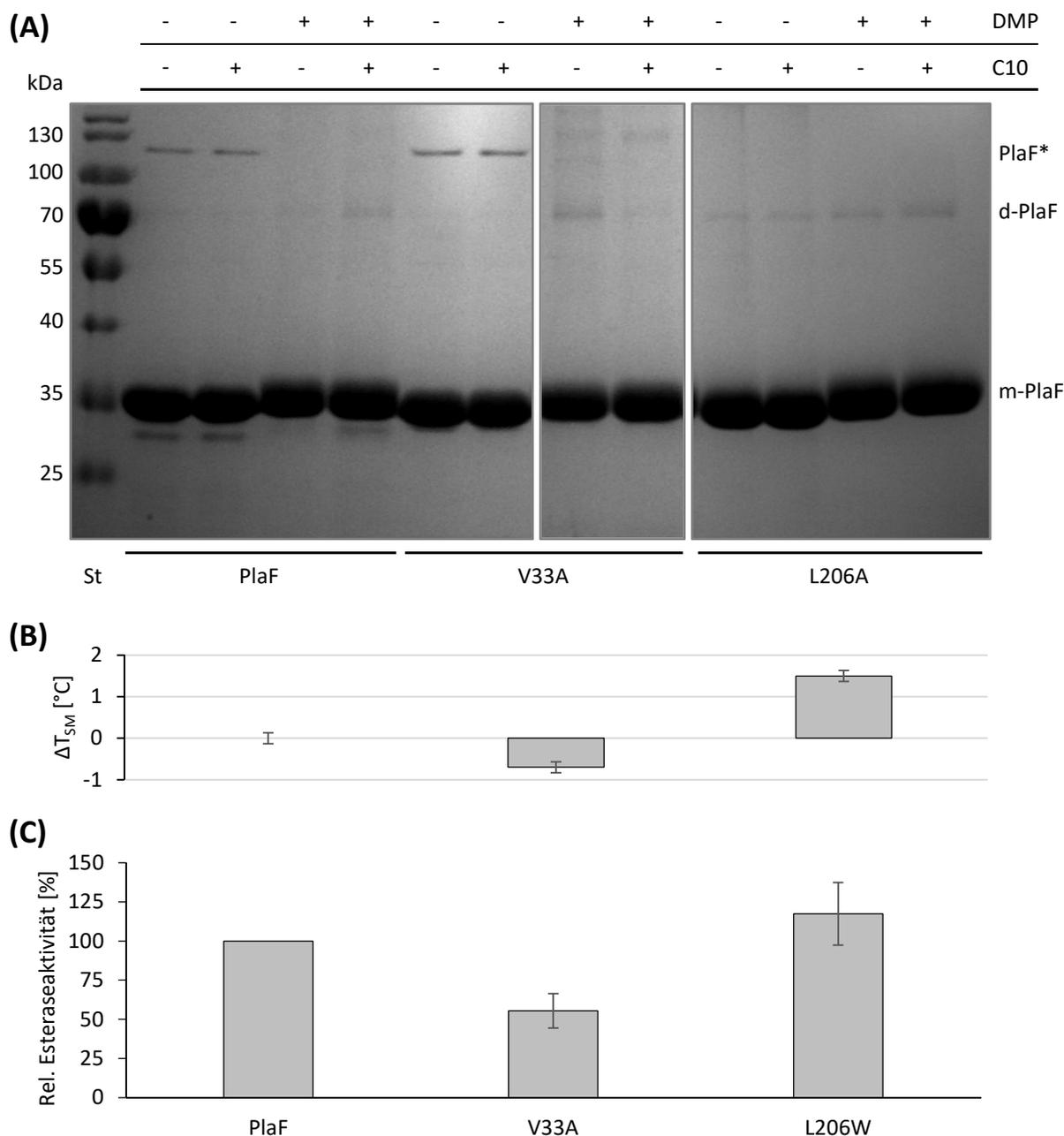


Abbildung 11: *In vitro*-Charakterisierung der PlaF_{OG}-Mutanten aus der putativen Ligandenbindestelle. (A): 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. Zu sehen sind die Proben mit jeweils vorheriger Inkubation mit Decansäure (C10) und anschließender *Crosslinking*-Reaktion mit DMP. + bedeutet dabei eine Zugabe des jeweiligen Reagenzes wohingegen bei – nur die Zugabe von Puffer bzw. DMSO erfolgte. m-PlaF bezeichnet in der Abbildung das Monomer, d-PlaF ein Homodimer und PlaF* ein Trimer oder Tetramer (Unterscheidung nicht möglich). **(B):** Gemessene Thermostabilität durch nanoDSF. Die Darstellung zeigt die Differenz aus der T_{SM} der Mutante mit der T_{SM} des Wildtyp-Proteins. **(C):** Gemessene Esteraseaktivität mit pNPB als Substrat. Die Darstellung zeigt die relative Esteraseaktivität normalisiert auf das Wildtyp-Protein mit 100 %.

PlaF_{OG} zeigte unter Einsatz von DMP als *Crosslinker* die charakteristischen Dimerbanden bei 70 kDa, wie sie bereits in früheren Arbeiten ermittelt werden konnten (Abbildung 11A).²⁶⁵ Ebenfalls war der zuvor beschriebene Effekt der Fettsäure-induzierten Dimerisierung mit einer zunehmenden Dimerbande deutlich zu erkennen (Abbildung 11A).²⁶⁵ Die in der JM befindliche V33A-Variante zeigte im Vergleich zu PlaF_{OG} eine verringerte Esteraseaktivität, wohingegen L206W aus der Membraninteraktionsdomäne eine leicht gesteigerte Aktivität zum Wildtyp-Protein aufwies (Abbildung 11C). Bei der Stabilitätsanalyse mit nanoDSF zeigte sich, dass beide Varianten nahezu identisch stabil zu PlaF_{OG} sind und deswegen die verringerte Aktivität von V33A nicht durch verringerte Stabilität erklärbar war (Abbildung 11B). Die Analyse des Dimerisierungsverhaltens wies für die Variante V33A eine gesteigerte intrinsische Dimerisierung auf, die eine Erklärung für die zuvor beschriebene Esteraseaktivität lieferte (Abbildung 11A). Diese Mutante sprach jedoch nur in reduzierter Weise auf die Fettsäure-induzierte Dimerisierung an. Die PlaF Variante L206W zeigte keine Besonderheiten bei der *Crosslinking*-Analyse, allerdings im Vergleich zu V33A die charakteristische Fettsäure-induzierte Dimerisierung (Abbildung 11A). Die Lage von Val33 innerhalb der T-förmigen Ligandenbindetasche (Abbildung 6) stellt dessen Besonderheit für die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF dar und liefert mit der Verknüpfung zum katalytisch aktiven Ser137 eine mögliche Erklärung für den direkten Einfluss auf die Aktivität.²⁶⁵

4.1.2 Mutationen innerhalb der Juxtamembran-Region weisen eine veränderte Fettsäure-induzierte Dimerisierung auf

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde mit Ser₂₉-Val-Arg-Thr₃₂ ein hydrophiler Bereich in der JM identifiziert²⁶⁵, der ein typisches Dimerisierungsmotiv beschreibt.³⁵⁵ Zur Untersuchung der beschriebenen Aminosäuren Ser29 und Thr32 wurde gegen Alanine ausgetauscht, um die Einflüsse beider Seitenketten auf die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF zu identifizieren. Die verwendeten Plasmide pBBR-*plaF_{H6}*-S29A und pBBR-*plaF_{H6}*-T32A (Tabelle 4) wurden bereits in einer früheren Arbeit erstellt und zeigten Expression und katalytische Aktivität in *P. aeruginosa*. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Expression der Mutanten im Großmaßstab durchgeführt (3.1.6) und die Reinigung mit DDM als Detergens vorgenommen (3.3.3). Die biochemischen Analysen der Varianten in dieser Arbeit sind in Abbildung 12 zusammenfassend dargestellt. Dabei zeigte sich bei beiden Varianten eine deutlich stärkere Fettsäure-induzierte Dimerisierung bei der *Crosslinking*-Analyse (3.3.11, Abbildung 12A). Sowohl S29A und T32A wiesen bei der Analyse der Temperaturstabilität (3.3.10) leicht reduzierte Werte, um bis zu 2 °C auf, die allerdings nicht in einem deutlich anderen Bereich zu wildtypischem PlaF lagen (Abbildung 12B). Die Aktivitätsuntersuchungen (3.3.7) der beiden Varianten nach Fettsäure-Inkubation (3.3.11) signalisierten keine Inhibierung von PlaF_{DDM} (Abbildung 12C). Hierbei blieben die Aktivitäten auf dem Niveau von nicht inhibiertem PlaF_{DDM}, obwohl beide Varianten zuvor eine erhöhte Dimerbildung im Vergleich zu PlaF_{DDM}-Wildtyp aufzeigten.

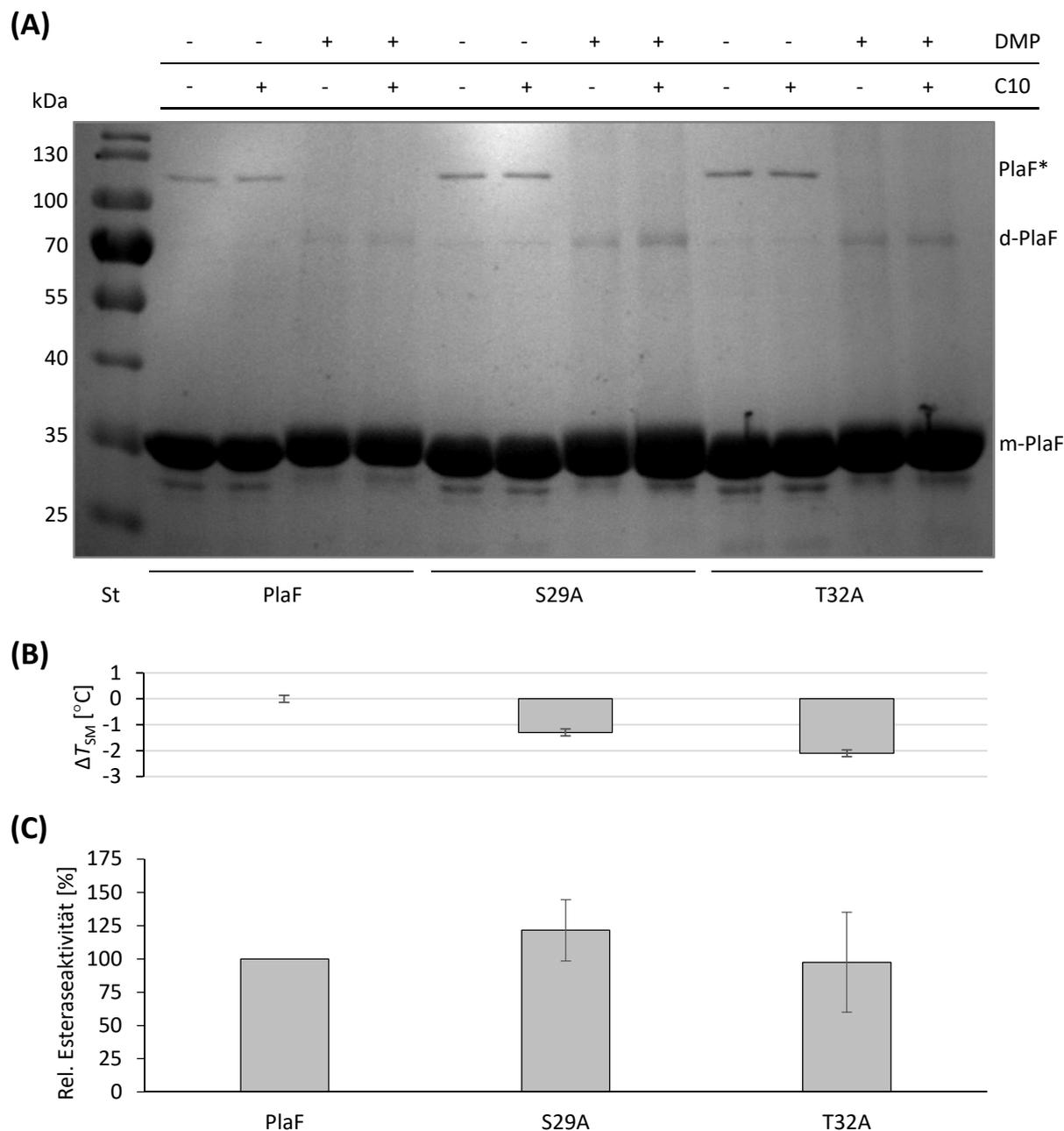


Abbildung 12: Untersuchung der PlaF_{DDM}-Mutanten aus der Juxtamembran-Region der Transmembranhelix.

(A): 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. Zu sehen sind die Proben mit jeweils vorheriger Inkubation mit Decansäure (C10) und anschließender *Crosslinking*-Reaktion mit DMP. + bedeutet dabei eine Zugabe des jeweiligen Reagenzes wohingegen bei – eine Zugabe durch DMSO erfolgte. **(B):** Gemessene Thermostabilität durch nanoDSF. Die Darstellung zeigt die Differenz aus der T_{SM} der Mutante mit der T_{SM} des Wildtyp-Proteins. **(C):** Gemessene Esteraseaktivität nach Fettsäure-Inhibierung mit Decansäure. Als Substrat wurde *p*NPB verwendet und die relative Esteraseaktivität wurde normalisiert auf das wildtypische PlaF mit 100 % dargestellt.

4.1.3 Mutationen zur Blockierung der vier putativen Substratzugangstunnel zu PlaF

Für PlaF konnte innerhalb der 3D-Struktur bereits eine T-förmige, aktive Bindestelle (Abbildung 6) beschrieben werden.²⁶⁵ In Kooperation mit dem Institut „Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden vier Zugänge zu eben dieser Bindestelle anhand von Substrattrajektorien gefunden (Abbildung 13). Anhand dieser Trajektorien können Tunnel interpretiert werden, die als putative Substratzugänge fungieren können. Um eine Identifikation des PlaF-Substratzugangstunnels durchzuführen, sollten Aminosäuren identifiziert werden, die eine spezifische Blockierung einzelner Tunnel im Monomer zuließ. Mit der zuvor genannten Kooperation konnten anhand von MD-Simulation für jeden Tunnel bis zu fünf Aminosäuren vorgeschlagen werden. Hierbei wurden nur Aminosäuren betrachtet, deren Reste in den jeweiligen Tunnel gerichtet sind. Des Weiteren wurden bei der Auswahl die Aminosäuren ausgeschlossen, deren Reste sich in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum oder der TM-Helix befinden. Ebenso wurden Glycine und Proline nicht als mögliche Blockierungsstellen für die einzelnen Tunnel ausgewählt.

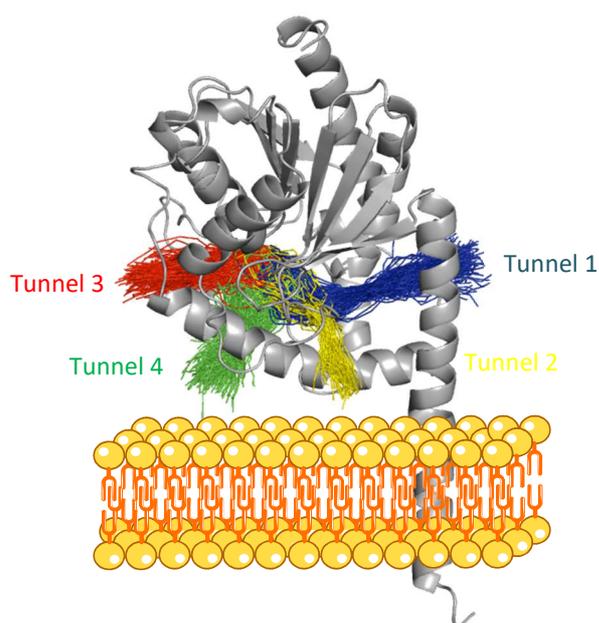


Abbildung 13: Darstellung der vier putativen Substratzugangstunnel in PlaF_A anhand von Substrattrajektorien. PlaF_A wurde aus der 3D-Struktur von dimeren PlaF, durch Entfernung des zweiten Monomers PlaF_B, entnommen und in eine schematische Lipid-Doppelschicht eingebettet. Die Identifikation der Tunnel und die Bereitstellung der gezeigten Abbildung erfolgte durch das kooperierende Institut „Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anhand von Substrattrajektorien. Die von der Membran abgewandten Tunnel 1 und Tunnel 3 sind jeweils in Blau bzw. Rot dargestellt; wohingegen die zur Membranoberfläche gerichteten Tunnel 2 und Tunnel 4 in Gelb bzw. Grün koloriert sind. (PDB-ID: 6I8W)

Die verschiedenen Mutationen wurden durch Oligonukleotide (Tabelle 5) mittels SLIC (3.2.2.2) jeweils in den pBBR-*plaF_{H6}*-Vektor eingebracht (pBBR-*plaF_{H6}*-D74W, pBBR-*plaF_{H6}*-N77W, pBBR-*plaF_{H6}*-R80W, pBBR-*plaF_{H6}*-M166W, pBBR-*plaF_{H6}*-L177W, pBBR-*plaF_{H6}*-V185W, pBBR-*plaF_{H6}*-L214W, pBBR-*plaF_{H6}*-R217W, pBBR-*plaF_{H6}*-A218W, pBBR-*plaF_{H6}*-A221W, pBBR-*plaF_{H6}*-S222W, pBBR-*plaF_{H6}*-N225W, pBBR-*plaF_{H6}*-A226W, pBBR-*plaF_{H6}*-F229W, pBBR-*plaF_{H6}*-R233W, pBBR-*plaF_{H6}*-Y236W, pBBR-*plaF_{H6}*-V290W). Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Sequenzierung untersucht und verifiziert (3.2.7). Anschließend wurden die Varianten homolog in *P. aeruginosa* exprimiert (3.1.6) und die Reinigung mit DDM als Detergens durchgeführt (3.3.3). Zur Belegung der Funktionalität wurden die Aktivitäten der jeweiligen Mutanten mit einem

artifiziiellen (*p*NPB, 3.3.7) und einem natürliehen PlaF-Substrat getestet (PG-C12, 3.3.8). Die durchgeführten Analysen und Untersuchungen dieser Arbeit sind zusammenfassend in Abbildung 14 dargestellt.

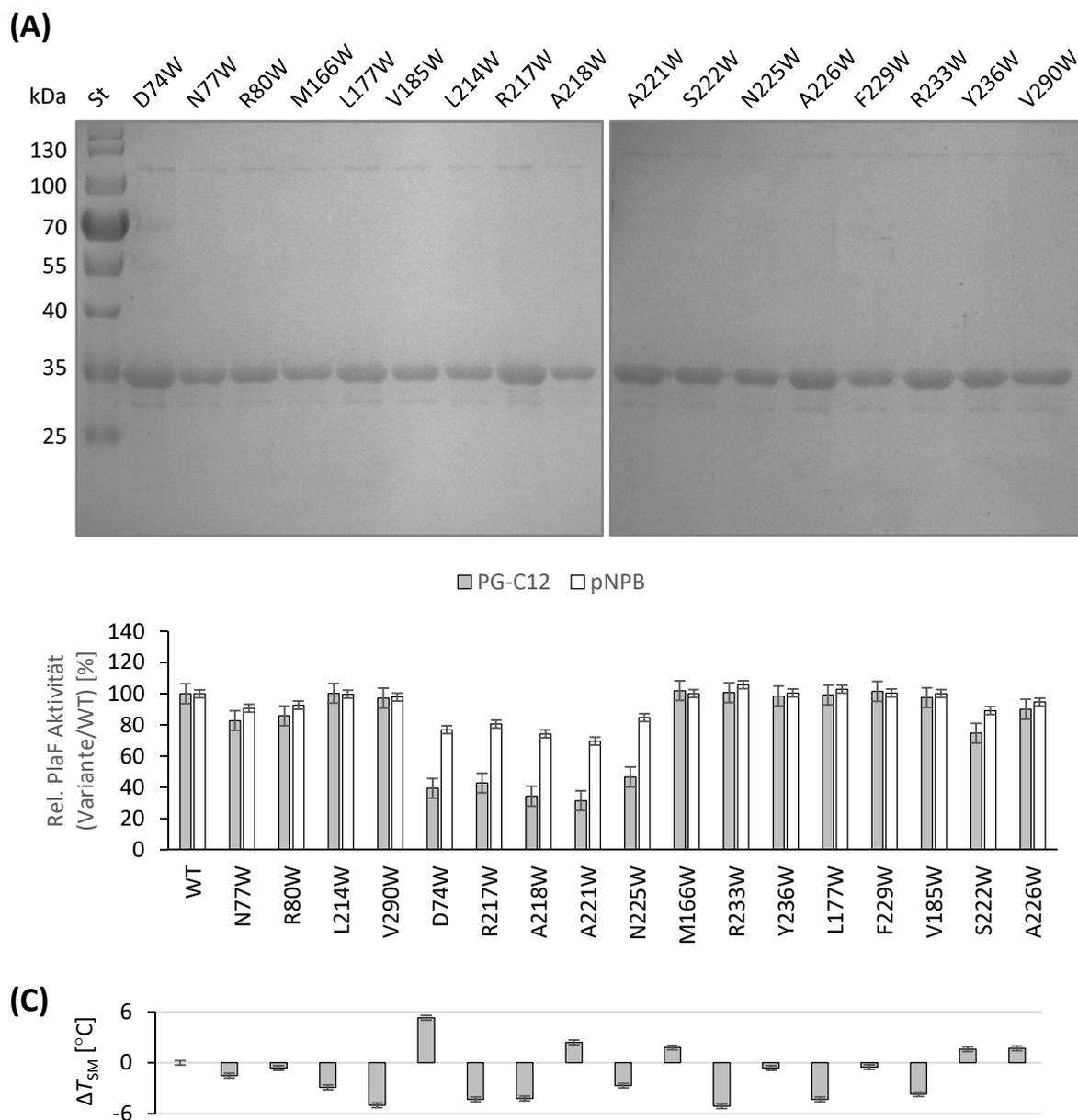


Abbildung 14: Untersuchung der PlaF_{DDM}-Varianten zur Blockierung der vier putativen Substratzugangstunnel. **(A):** 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. **(B):** Lipolytische Aktivität der PlaF-Varianten mit Dilauroylphosphatidylglycerol (PG12) und *p*NPB dargestellt als relative Esteraseaktivität normalisiert auf PlaF-Wildtyp mit 100 %. **(C):** Gemessene Thermostabilität durch nanoDSF. Die Darstellung zeigt die Abweichung als Differenz aus der T_{SM} der Mutante mit der T_{SM} des Wildtyp-Proteins.

Alle generierten Varianten konnten in *P. aeruginosa* exprimiert (3.1.6) werden und mittels IMAC und AEX gereinigt werden (3.3.3, Abbildung 14A). Sie wurden auf ihre Temperaturstabilität (3.3.10) untersucht und die T_{SM} lagen dabei in einem Stabilitätsbereich von ± 6 °C um den PlaF-Wildtyp (Abbildung 14C). Bei der Aktivitätsbestimmung mit *p*NPB (3.3.7) konnte für alle Varianten hydrolytische Aktivität identifiziert werden (Abbildung 14B). Auffällig hierbei waren besonders die

Varianten, welche den Tunnel 2 blockieren, da diese bis zu 30 % verringerte Esteraseaktivität aufwiesen. Die Umsetzung des gewählten Phospholipidsubstrats PG12 (3.3.8) von PlaF konnte für sämtliche Varianten identifiziert werden (Abbildung 14B). Hierbei offenbarten erneut die Varianten aus Tunnel 2 die stärksten Aktivitätsverringierungen um bis zu 70 %, welche mit einer verringerten Freisetzung freier Fettsäuren im NEFA-Aktivitätsassay (3.3.8) einhergingen. Durch die eingeführten Mutationen konnte der Zugang zu PlaF blockiert bzw. erschwert werden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Tunnel 2 als Substratzugangstunnel für PlaF dient.

4.2 Temperaturstabilitätsanalyse von Fettsäure-inhibiertem PlaF

In vorausgegangenen Arbeiten konnte ein Einfluss von Fettsäuren auf die Dimerisierung bzw. daraus folgenden Inhibierung von PlaF entdeckt werden.²⁶⁵ In dieser Arbeit konnten bereits PlaF-Varianten gezeigt werden, die durch die eingeführte Punktmutation eine Änderung der Fettsäure-induzierten Dimerisierung / Inhibierung zeigten. Bis dato ist nichts über den Mechanismus dieses Effektes bekannt. Aus diesem Grund sollte eine Analyse der Thermostabilität (3.3.10) vor und nach Zugabe von C10 (3.3.11) erfolgen. Nachfolgend sind die ermittelten Daten graphisch dargestellt (Abbildung 15).

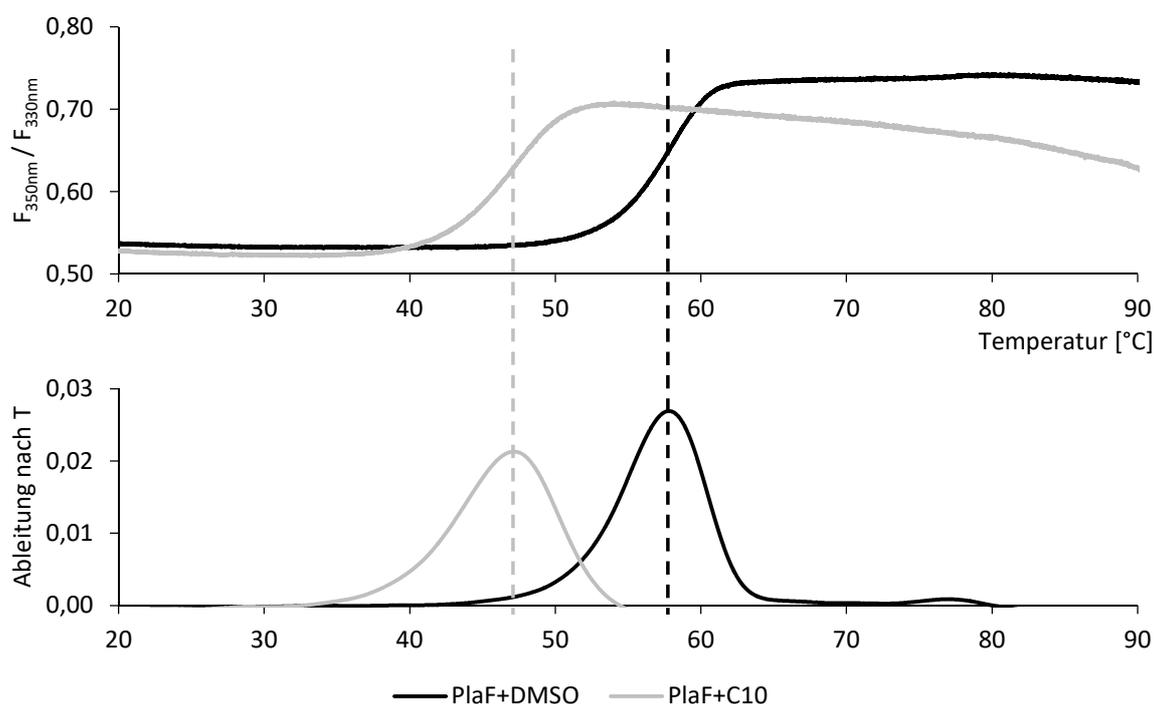


Abbildung 15: nanoDSF Thermostabilitätsmessung von PlaF_{DDM} in Gegenwart von Decansäure. Das Fluoreszenzverhältnis ($F_{350\text{nm}} / F_{330\text{nm}}$) sowie das Fluoreszenzverhältnis als Funktion der Temperatur ($\Delta F_{350\text{nm}} / F_{330\text{nm}} / \Delta T$) wurden per nanoDSF am „Prometheus NT-Plex nano“ gemessen und sind im oberen bzw. unteren Teil abgebildet. Die T_{SM} des Proteins wurde als gestrichelte Linie dargestellt. Die Messung erfolgte mit einer gereinigten PlaF_{DDM} Probe, welche zuvor für 30 min mit 180 nmol Decansäure (C10) inkubiert wurde. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Messung als Mittelwert derer gezeigt.

Beide Kurvenverläufe zeigten einen charakteristischen, sigmoidalen Kurvenverlauf, die eine eindeutige Bestimmung des Wendepunktes erlaubten, der als T_{SM} definiert werden kann. Für die PlaF_{D_{DM}}-Probe ohne vorherige C10-Inkubation konnte eine T_{SM} von 57,6 °C ermittelt werden, wohingegen für die PlaF_{D_{DM}}-Probe mit Fettsäure-induzierter Dimerisierung / Inhibierung eine Absenkung der T_{SM} um 10,6 °C auf 47,0 °C detektiert werden konnte. Somit konnte eine reduzierte Temperaturstabilität und damit ein möglicher destabilisierender Effekt durch Inkubation mit C10 in PlaF_{D_{DM}} identifiziert werden.

4.3 Lipolytisches Profil von PlaF mit natürlichen Lipiden

Für PlaF konnte in vergangenen Arbeiten bereits eine (Lyso-) PLA₁-Aktivität mit natürlichen (Lyso-) Phospholipiden unterschiedlicher Kopfgruppen ermittelt werden. Zusätzlich wurde eine hydrolytische Aktivität von PlaF mit Triacylglyceriden identifiziert, welche besonders stark bei Substraten mit mittelkettigen Fettsäuren auftrat.²⁶⁵ In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob eine Hydrolyse von MAGs und DAGs mit PlaF erfolgt, sowie weitere putative Phospholipidsubstrate umgesetzt werden können. Neben bereits bestehender PlaF-Thioesteraktivität in *E. coli* Zelllysats²⁷⁰ sollte das lipolytische Profil um Thioesteraseaktivität mit gereinigtem PlaF erweitert werden. Die durchgeführten Messreihen wurden ausschließlich mit PlaF_{D_{DM}} vermessen, da OG-solubilisiertes Protein eine geringere Stabilität aufzeigte.

4.3.1 PlaF hydrolysiert Mono- und Diacylglyceride

Die hydrolytische Aktivität gegenüber MAGs und DAGs konnte bereits mehrfach für das humane Homolog ABHD6 gezeigt werden²⁹⁵ Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob PlaF ebenfalls DAG und MAG hydrolytisch spalten kann. Die hydrolytische Spaltung von Triacylglyceriden durch PlaF konnte bereits in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden. Zur weiteren Belegung und Untermauerung dieser Fragestellung galt es die mögliche Umsetzung von DAG und MAG durch PlaF zu untersuchen. Zur Erforschung dieser Hypothese wurden DAG und MAG verschiedener Fettsäurekettenlängen (C12 - C18) mit PlaF_{D_{DM}} inkubiert und anschließend mit einem NEFA-Kit auf deren Gehalt an freien Fettsäuren untersucht (3.3.8). Die erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 16).

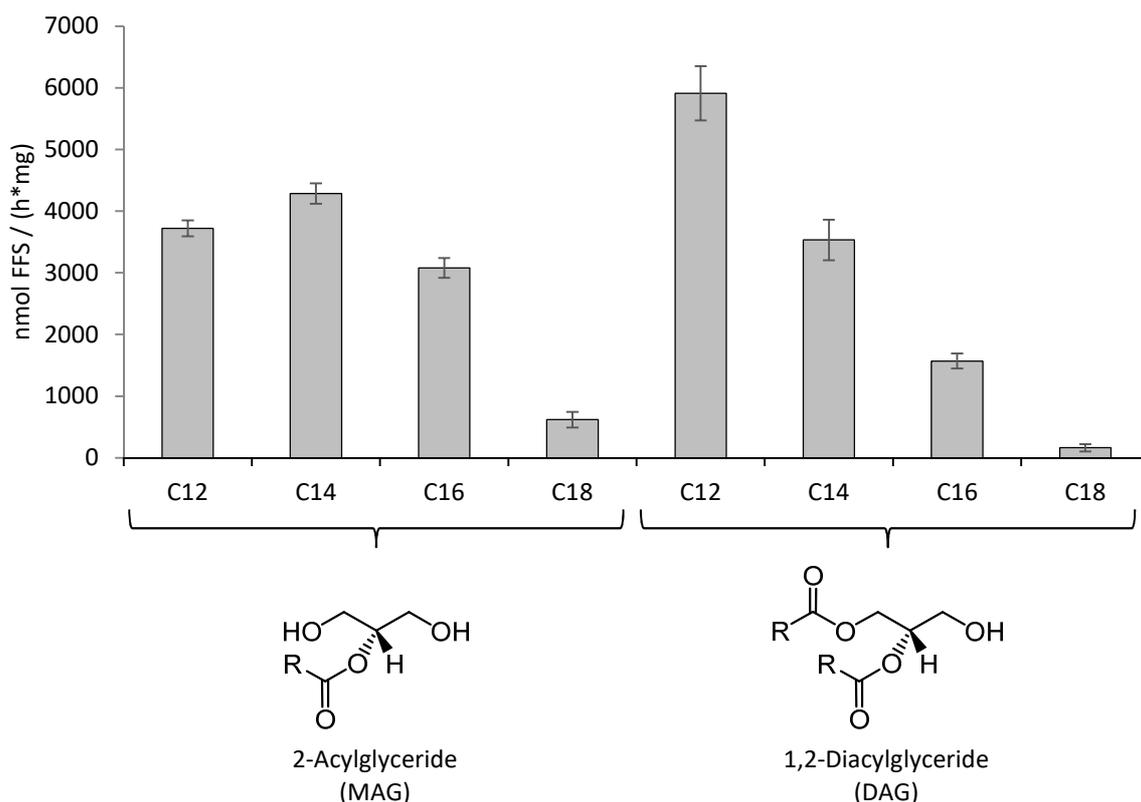


Abbildung 16: Lipaseaktivität von PlaF_{DDM} gegenüber Mono- und Diacylglyceriden mit variierender Acylkettenlänge. Die Lipaseaktivität von gereinigtem PlaF_{DDM} wurde über die Quantifizierung der vom Lipidsubstrat freigesetzten Fettsäuren (FFS) bestimmt. Als Lipasesubstrat dienten 2-Acylglyceride und 1,2-Diacylglyceride mit variierender Kettenlänge R (C12 - C18). Die Quantifizierung der FFS erfolgte nach einer Inkubationszeit von 3 h. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Messung als Mittelwert derer gezeigt.

Bei der Betrachtung der erhaltenen Aktivitäten von PlaF_{DDM} gegenüber MAG-Substraten zeigte das Substrat mit den C14-Acylketten mit 4285 nmol FFS / (h*mg) die höchste Aktivität. Anschließend folgten die MAG-Substrate mit C12- bzw. C16-Acylkette mit 3721 nmol FFS / (h*mg) bzw. 3078 nmol FFS / (h*mg) auf einem ähnlichen Aktivitätsniveau. Die geringste Aktivität wurde mit 618 nmol FFS / (h*mg) für das MAG-Substrat mit C18-Acylkette ermittelt und ist somit um das 6,9 fache reduziert im Vergleich zum MAG-Substrat mit C14-Acylkette. Für die Umsetzung der DAG-Substrate durch PlaF_{DDM} wurde eine abnehmende Aktivität mit zunehmender Acylkettenlänge von C12 bis C18 bestimmt. Hierbei besaß das DAG-Substrat mit C12-Acylkettenlänge mit 5911 nmol FFS / (h*mg) die höchste Aktivität aller getesteten DAGs, wohingegen für das Substrat mit C18-Acylkette die geringste Aktivität von 161 nmol FFS / (h*mg) ermittelt wurde. In Verbindung mit vorherigen Arbeiten konnte ein Aktivitätsprofil mit folgender Abstufung DAG > MAG > TAG ermittelt werden. Hierbei zeigten jedoch alle getesteten Substrate eine vielfach höhere Aktivität im Vergleich zur Phospholipase-Aktivität von PlaF_{DDM} an.

4.3.2 BMP, Hemi-BMP, Cardiolipin und DOPE werden durch PlaF hydrolysiert

Die physiologische Rolle von PlaF wird in der Membranhomöostase vermutet und konnte mit Lipidomanalysen bereits untermauert werden.²⁶⁵ Aus diesem Grund sollte analysiert werden, ob PlaF in der Lage ist, strukturgebende Lipide wie CL, Bis-(monoacylglycero)-phosphat (BMP), Hemi-Bis-(monoacylglycero)-phosphat (HBMP) und DOPE hydrolytisch zu spalten, die für die Fluidität, die Cargosortierung und die Zellmembranfunktion während der Zellteilung verantwortlich sind.^{356–359} In Abbildung 17 sind nachfolgend die erhaltenen Ergebnisse graphisch aufgetragen.

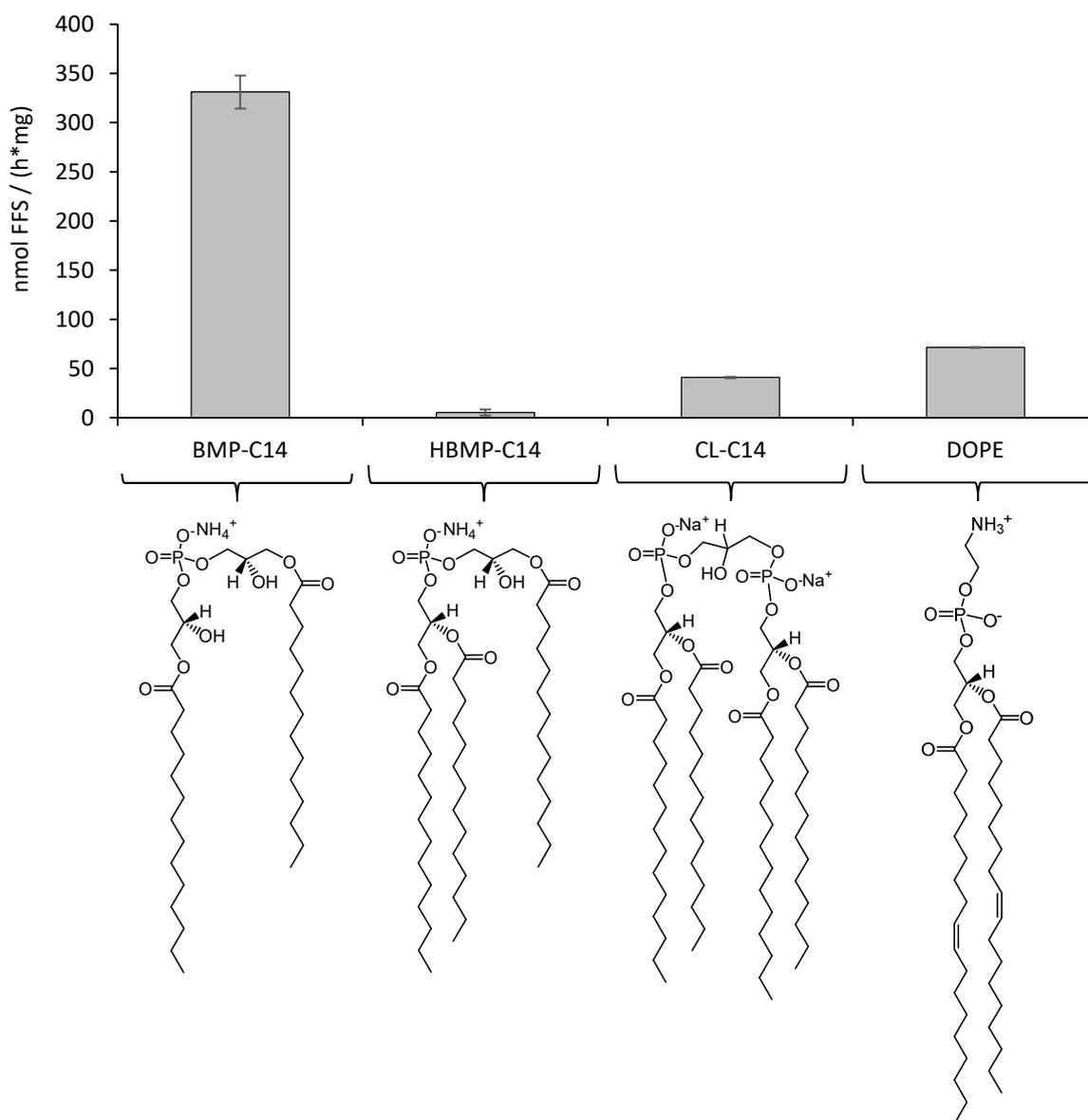


Abbildung 17: Lipaseaktivität von PlaF_{DDM} gegenüber BMP, Hemi-BMP, Cardiolipin und DOPE. Die Lipaseaktivität von gereinigtem PlaF_{DDM} wurde über die Quantifizierung der vom Lipidsubstrat freigesetzten Fettsäuren (FFS) bestimmt. Als Lipasesubstrat dienten BMP, Hemi-BMP und CL mit Myristinsäure (C14) als Acylkette sowie DOPE. Die Quantifizierung der FFSs erfolgte nach einer Inkubationszeit von 3 h für BMP-C14 und DOPE sowie 6 h für HBMP-C14 und CL-C14. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Messung als Mittelwert derer gezeigt.

Alle getesteten Substrate besitzen C14-Acylketten und wurden als CL-C14, BMP-C14 und HBMP-C14 abgekürzt. Zur Untersuchung der hydrolytischen Umsetzung wurden die zuvor genannten Substrate mit PlaF für 3 h (BMP-C14, DOPE) bzw. 6 h (HBMP-C14, CL-C14) inkubiert und die Freisetzung von FFSs anhand eines NEFA-Kits analysiert (3.3.8). Unter den vier untersuchten Substraten war BMP-C14 das Substrat, welches am stärksten mit 331,1 nmol FFS/(h*mg) umgesetzt wurde. Das Substrat HBMP zeigte im Vergleich mit nur 5,3 nmol FFS/(h*mg) eine sechsfach geringe Aktivität als Cardiolipin mit 40,9 nmol FFS/(h*mg). Das ungesättigte PL DOPE konnte mit 71,4 nmol FFS/(h*mg) von PlaF umgesetzt werden. Die Aktivität aller Substrate zeigte hierbei erneut ein deutliches Indiz für die physiologische Rolle von PlaF in der Regulation biophysikalischer Eigenschaften von Membranen.

4.3.3 CoA-Thioester werden durch PlaF hydrolysiert

Eine Acyl-CoA-Thioesteraseaktivität mit Zelllysaten aus PlaF-produzierenden *E. coli* konnte bereits in einer vorherigen Arbeit gezeigt werden.²⁷⁰ Als Fortführung dieser Experimente wurde gereinigtes PlaF_{DDM} (3.3.3) verwendet, um ebenfalls *in vitro*-Thioesteraseaktivität nachzuweisen. Die Experimente zur Messung der Thioesteraseaktivität wurden mit CoA-Acylestern unterschiedlicher Kettenlänge durchgeführt (3.3.9). Hierfür wurde PlaF mit dem jeweiligen Substrat versetzt und nach der anschließenden Zugabe des Ellmanns Reagenz DTNB eine Kinetik aufgenommen. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten von PlaF_{DDM} wurden graphisch in Abbildung 18 dargestellt.

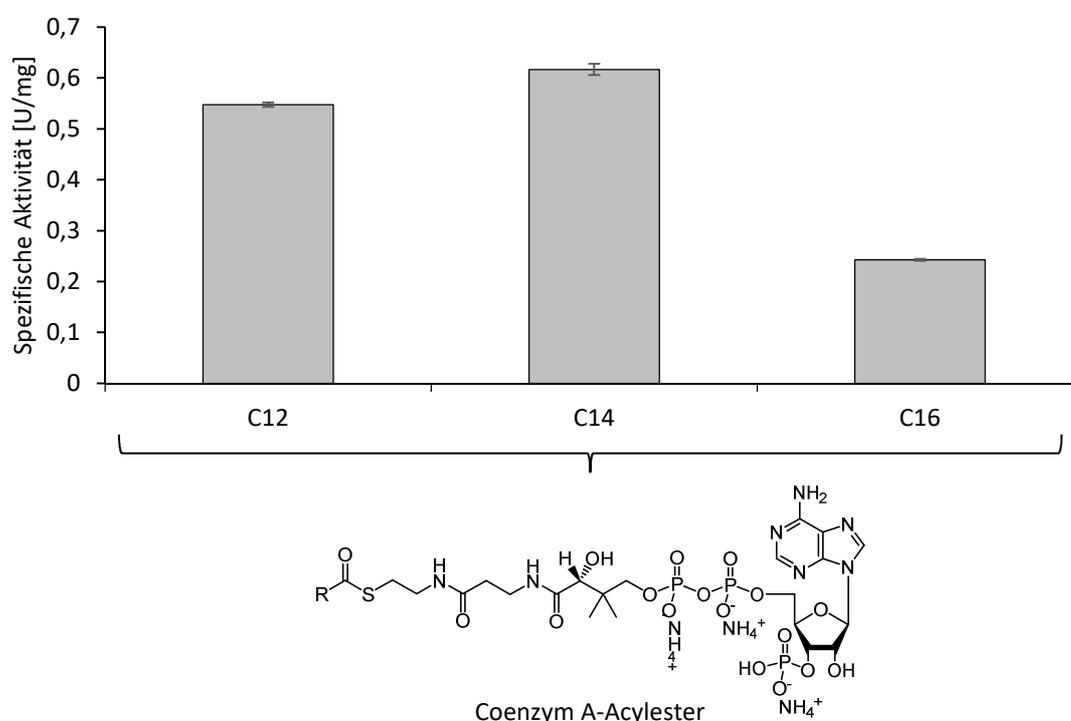


Abbildung 18: Thioesteraseaktivität von PlaF_{DDM} mit Acyl-Coenzym A mit variierender Kettenlänge. Die Thioesteraseaktivität von gereinigtem PlaF_{DDM} wurde über die Quantifizierung mit DTNB anhand einer Messung der Kinetik durchgeführt. Als Thioesterase-Substrat dienen Acyl-Coenzym A mit variierender Kettenlänge R (C12 – C16). Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und als Mittelwert derer gezeigt.

Alle getesteten Thioesterase-Substrate wurden durch PlaF_{DDM} hydrolytisch gespalten. CoA-C12 und CoA-C14 zeigten dabei mit 0,547 U/mg und 0,616 U/mg eine ähnlich starke Umsetzung, wohingegen bei CoA-C16 ein Abfall um ~ 40 % auf 0,242 U/mg beobachtet wurde. Dadurch zeigte sich eine Präferenz zu mittelkettigen Acylresten mit CoA, wie es auch für die Phospholipidsubstrate beschrieben wurde.²⁶⁵

4.4 Untersuchung von PlaF-Lipid-Interaktionen mit *small unilamellar vesicles* als Mimetika für natürliche Membranumgebungen

Bisherige Arbeiten als auch die vorliegende Arbeit legen das Augenmerk auf die Untersuchung und die biochemische Charakterisierung von PlaF in Detergentsmizellen anstelle der natürlichen Phospholipidumgebung im Organismus. Um einen Blick auf mögliche Interaktionen der umgebenden Lipide auf PlaF zu untersuchen, wurde eine Rekonstitution von PlaF in SUVs etabliert, die eine Untersuchung unter Detergens-freien Bedingungen ermöglichen sollte (3.3.12.2).

4.4.1 Detergensentfernung zur Rekonstitution von PlaF in *small unilamellar vesicles*

Zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen muss das Protein in dem gewünschten Lipidmilieu rekonstituiert werden. Allerdings werden zur Vereinfachung Membranproteine häufig zuvor unter Verwendung von Detergenzien gereinigt, da diese eine effiziente Solubilisierung und Stabilisierung in der Reinigung zeigen. Die Detergenzien können allerdings Einfluss auf die Aktivität und den oligomeren Zustand haben.^{208, 256} Aus diesem Grund ist eine Untersuchung der zuvor beschriebenen Eigenschaften in einer nahezu nativen Membranumgebung von großer Bedeutung. Innerhalb dieses Versuchsabschnitts wurden zuerst SUVs aus *E. coli* TLE (3.3.12.1) mit DDM destabilisiert (3.3.12.2) und anschließend Detergens-solubilisiertes PlaF_{DDM} (3.3.3) hinzugegeben. Für den folgenden Rekonstitutionsprozess musste das Detergens im weiteren Verlauf wieder entfernt werden. Hierbei kamen nichtpolare, makroporöse Polymer-*Beads* (Tabelle 2) zum Einsatz, welche hydrophobe Substanzen durch hydrophobe Interaktionen aus wässrigen Lösungen abtrennen (3.3.12.2). Infolgedessen wurde der Detergensgehalt (3.3.12.3), der Proteingehalt (3.3.4) und die Thermostabilität (3.3.10) vor und nach der Rekonstitution ermittelt. Nachfolgend sind die gemessenen und ermittelten Werte graphisch wiedergegeben (Abbildung 19).

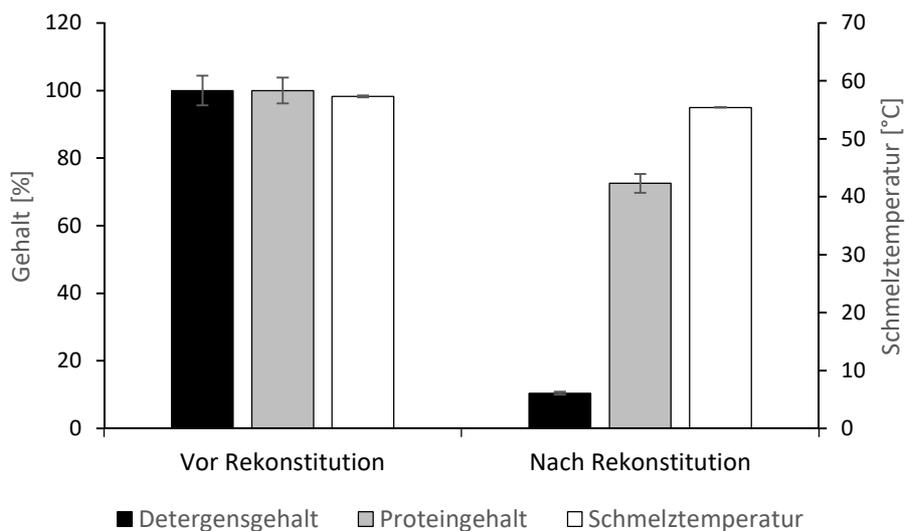


Abbildung 19: Analyse der PlaF-Rekonstitution in SUVs unter Verwendung von BioBeads SM-2. Die Rekonstitution erfolgte in SUVs aus *E. coli* TLE. Zur Ermittlung des Detergensgehalt vor und nach Zugabe der BioBeads SM-2 wurde ein kolorimetrischer Assay, anhand der Phenol-Schwefelsäure-Methode, durchgeführt. Dabei wurde die Darstellung als relativer Detergensgehalt normalisiert auf den Detergensgehalt vor der Rekonstitution von 100 %. Ferner wurde der Proteingehalt photometrisch bestimmt und als relativer Proteingehalt normalisiert auf den Proteingehalt vor der Rekonstitution von 100 % dargestellt. Die Messung der Thermostabilität wurde über nanoDSF bestimmt und ist als Schmelztemperatur (T_{SM}) wiedergegeben.

Durch die Inkubation von Detergens-solubilisiertem PlaF_{DDM} mit den BioBeads SM-2 konnte eine Absenkung von DDM in PlaF_{SUV} von ~ 90 % ermittelt werden. Bei der Bestimmung des Proteingehalts hingegen konnte ein Proteinverlust von ~ 28 % nach der Rekonstitution identifiziert werden. Der Vergleich der Stabilitäten von PlaF_{DDM} und PlaF_{SUV} belegte mit 57,3 °C und 55,4 °C nur einen marginalen Stabilitätsunterschied.

4.4.2 PlaF zeigt erhöhte Aktivität in Phospholipid-SUV mit positiv-geladenem, organischen Rest im Vergleich zu neutralem, organischen Resten

Nachdem im vorausgegangenen Abschnitt erfolgreich der Rekonstitutionsprozess charakterisiert wurde, konnten unterschiedliche PLs verwendet werden, um den Einfluss verschiedener Membraniumgebungen auf die PlaF-Aktivität zu untersuchen. In diesem Experiment wurden DOPG, DOPC, DOPE und *E. coli* TLE verwendet. Neben reinen SUVs aus einem Phospholipid wurden auch einzelne PLs im 1:1-Verhältnis generiert (3.3.12.1) und zur PlaF Rekonstitution (3.3.12.2) benutzt. Ausgenommen ist hierbei die Bildung von reinen DOPE-SUVs, da diese in wässriger Lösung hexagonale Strukturen und keine Lipiddoppelschichten ausbilden.³⁶⁰ Die Esteraseaktivitäten mit pNPB der verschiedenen PlaF_{SUV} und PlaF_{DDM} wurden ermittelt (3.3.7, Abbildung 20) und der Aktivitätsgradient zwischen den verschiedenen Phospholipiden für die SUVs graphisch (Abbildung 20B) dargestellt.

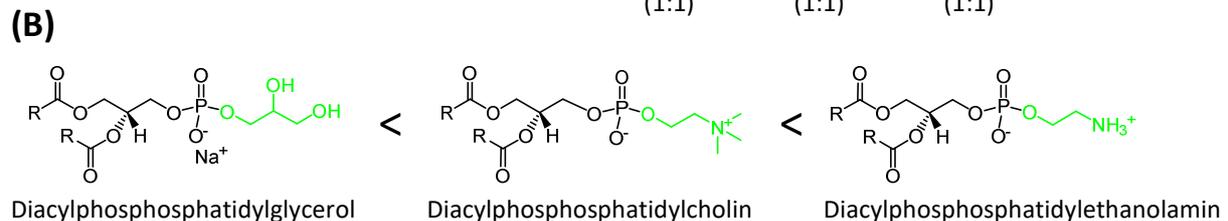
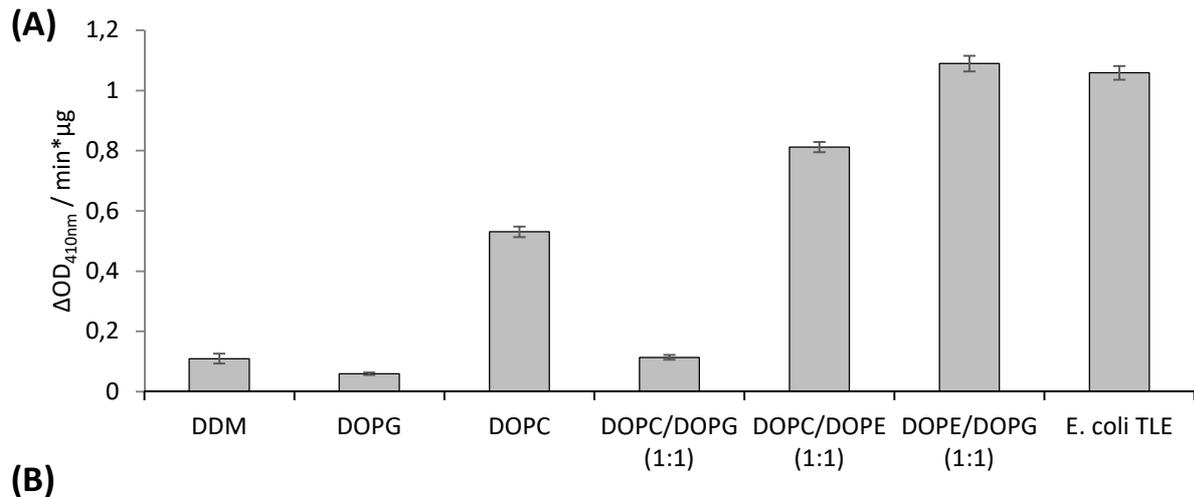


Abbildung 20: Esteraseaktivität von PlaF in SUVs mit unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung. (A)

PlaF wurde in SUVs mit unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung rekonstituiert. Hierzu wurden neben Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) und Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) noch *E. coli* TLE verwendet. Die Esteraseaktivität wurde anschließend mit *p*NPB gemessen und mit Detergens-solubilisiertem PlaF_{DDM} verglichen. **(B)** Aktivitätenreihenfolge der organischen Reste innerhalb der Phospholipidkopfgruppen in aufsteigender Reihenfolge von PlaF in SUVs. Zur vereinfachten schematischen Darstellung wurde das Phospholipid mit Acylketten-Resten (R) dargestellt. Die unterschiedlichen organischen Reste der Kopfgruppen sind in Grün hervorgehoben.

Bei der Verwendung von PlaF_{SUV} mit DOPG-SUVs zeigte sich eine marginale Aktivitätsverringering im Vergleich zu Detergens-solubilisiertem PlaF_{DDM} (Abbildung 20A). Bei der Wahl von DOPC mit einem positiv-geladenem, organischen Rest kam es für PlaF_{SUV} zu einer Aktivierung mit einem 4,8-fachen Aktivitätsanstieg zu PlaF_{DDM}. Für PlaF_{SUV} konnte die Kombination der PLs DOPC und DOPG mit positiv- geladenem bzw. neutralem, organischen Rest wiederum eine Aktivität ähnlich dem Detergens-solubilisiertem PlaF_{DDM} zeigen. Mit der Verwendung von DOPC und DOPE, welche beide einen positiv-geladenen, organischen Rest besitzen, zeigte sich eine weitere Aktivitätssteigerung für PlaF_{SUV} zu vorher beschriebenen SUVs aus DOPC / DOPG und eine 7,4-fache Aktivitätssteigerung zu Detergens-solubilisiertem PlaF_{DDM}. Mit der Kombination aus DOPE und DOPG wurde mit DOPG ein PL gewählt, welches eigenständig keine Aktivierung, sondern eher minimale Inhibierung zeigte. Allerdings zeigte die Aktivitätsmessung dieser Probe eine noch höhere Aktivität im Vergleich zur Probe DOPC / DOPG. Somit konnte belegt werden, dass speziell Phosphatidylethanolamin eine besonders starke Aktivierung zeigte, welche noch nicht einmal durch die Kombination DOPE / DOPG ausgelöscht wurde. Als letzter Schritt wurde PlaF in SUVs aus *E. coli* TLE rekonstituiert. Diese Probe zeigte neben DOPE / DOPG die höchste Aktivität im gesamten Experiment mit

einem 9,7-fachen Aktivitätsanstieg zu PlaF_{DDM}. Die Zusammensetzung der *E. coli* TLE SUVs entspricht mit der Phospholipidzusammensetzung einer typischen Gram-negativen Membranumgebung, wie sie charakteristischerweise auch in *P. aeruginosa* vorliegt.

4.5 *In vitro*-Crosslinking-Analyse von Detergens-solubiliertem und SUV-rekonstituiertem PlaF

Im vorherigen Abschnitt konnte bereits ein aktivierender Effekt von einer natürlichen Phospholipidumgebung im Vergleich zum Detergensmilieu von PlaF identifiziert werden. Um eine Struktur-Funktionsbeziehung aufzuklären, fehlte somit noch die strukturelle Charakterisierung von PlaF_{SUV}. Eine wichtige Eigenschaft von PlaF ist dessen Inhibierung durch Dimerisierung.²⁶⁵ Für einige Detergenzien ist bereits bekannt, dass sie die Stabilität oder Ausbildung von Dimeren ihrer rekonstituierten Proteine beeinflussen.^{361–363} Aus den zuvor genannten Gründen wurde PlaF_{SUV} mit unterschiedlichen *Crosslinker* auf Dimerbildung untersucht und mit PlaF_{DDM} verglichen. Zur Nachbildung einer natürlichen Gram-negativen Phospholipidumgebung wurde für die SUVs das TLE aus *E. coli* verwendet. Die eingesetzten *Crosslinker* BS²G (7,7 Å), DMP (9,2 Å) und BS³G (11,4 Å) sind mit jeweils unterschiedlichen Spacerlängen versehen, besitzen jedoch alle die gleiche chemische Reaktivität gegenüber primären Aminen. Nachdem das *in vitro*-Crosslinking auf die jeweiligen Proben angewendet wurde (3.3.11), erfolgte eine Konzentrierung der Proben durch TCA-NaDoc-Fällung (3.3.13). Die nachfolgende SDS-PAGE (3.3.5) der Proben ist in Abbildung 21 dargestellt.

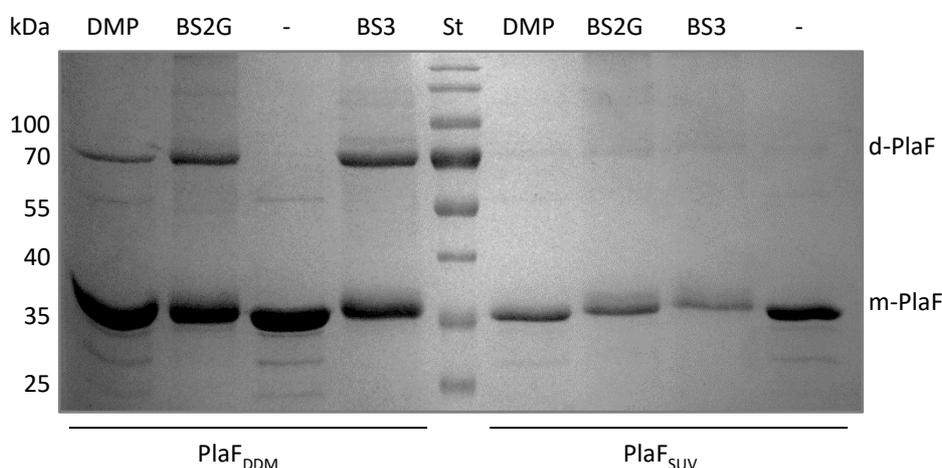


Abbildung 21: Analyse von Detergens-solubiliertem und SUV-rekonstituiertem PlaF mit *in vitro*-Crosslinking.

12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. Die Rekonstitution von PlaF erfolgte hierbei in SUVs aus *E. coli* TLE. Zuerst wurde durch Zugabe der entsprechenden *Crosslinker* (150 mM DMP in 100 mM TRIS pH 8,6 bzw. 5 mM BS²G oder 5 mM BS³ in jeweils 100 mM TRIS pH 8,0) das *in vitro*-Crosslinking mit den Proben durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine durch TCA-NaDoc-Fällung angereichert und die Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Das PlaF-Monomer (m-PlaF) sowie das gebildete PlaF-Dimer (d-PlaF) sind auf den jeweiligen Höhen des Größenstandards dargestellt.

Alle PlaF_{DDM} Fraktionen mit den jeweiligen *Crosslinkern* zeigten die Ausbildung von d-PlaF bei ~ 70 kDa an. Die Menge an d-PlaF untereinander unterschieden sich dabei nach der Wahl des CL in folgender aufsteigender Folge von DMP < BS²G < BS³. Als Referenz zu den PlaF_{DDM} Fraktionen mit *Crosslinkern* wurde eine Probe mit nur 100 mM TRIS pH 8,0 versetzt. Diese Fraktion zeigte, wie zu erwarten, keine Dimerausbildung. Bei den PlaF_{SUV} Fraktionen zeigte sich ein gänzlich anderes Bild, da bei den mit *Crosslinker* versetzten Proben kaum bis keine Dimerbildung zu detektieren war. Anhand der zuvor beschriebenen Ergebnisse konnte somit gesagt werden, dass PlaF_{SUV} im Vergleich zu PlaF_{DDM} kaum bis keine Dimere ausbildet. Dies lässt sich mit den zuvor dargestellten Ergebnissen der erhöhten Aktivität in SUVs mit unterschiedlichen PLs variierender organischer Reste (4.4.2) in Einklang bringen. Durch die natürliche Phospholipidumgebung kommt es durch PlaF-Lipid-Interaktionen und einer möglichen Konformationsänderung nicht zur Dimerbildung und daher zu einer veränderten PlaF-Struktur.

4.6 Die Phospholipase ABHD6 als humanes Homolog zu PlaF

Mit der Entdeckung und ersten biochemischen Charakterisierung von PlaF konnte durch Sequenzanalysen mit 49 % Sequenzähnlichkeit das humane Homolog ABHD6 gefunden werden.²⁷⁰ Neben ihrer Primärstruktur weisen PlaF und ABHD6 noch weitere Gemeinsamkeiten in ihrer Sekundärstruktur und ihren lipolytischen Profilen von 2-AG und mittelkettigen Fettsäuren auf.²⁶⁴ Obwohl ABHD6 als interessantes Zielenzym in der Wirkstoffforschung angesehen wird, konnte bis dato keine 3D-Proteinstruktur von ABHD6 gelöst werden. Um einen Vergleich von bakteriellen und humanen Phospholipasen, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind, herzustellen, sollte eine heterologe Expression von *abhd6*_{H6} mit anschließender Reinigung etabliert werden.

4.6.1 *abhd6*_{H6} kann in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert werden

In Arbeiten von Shields³⁶⁴ wurden Expressionsstudien in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Allerdings zeigte sich dort eine verstärkte Bildung von Einschlusskörpern und unzureichend lösliches, aktives Protein. Im Rahmen einer Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Expression von *abhd6*_{H6} auch in *E. coli* BL21(DE3) in aktiver Form möglich ist.³¹⁶ Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten die Ergebnisse von Expression und Aktivitätsmessungen aus der Masterarbeit³¹⁶ reproduziert werden, was in Abbildung 22 dargestellt ist. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Untersuchung (3.3.5/3.3.6) der Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der IPTG-Induktion und die dazugehörigen Aktivitäten (3.3.7) sind in der nachfolgenden Abbildung 22 dargestellt.

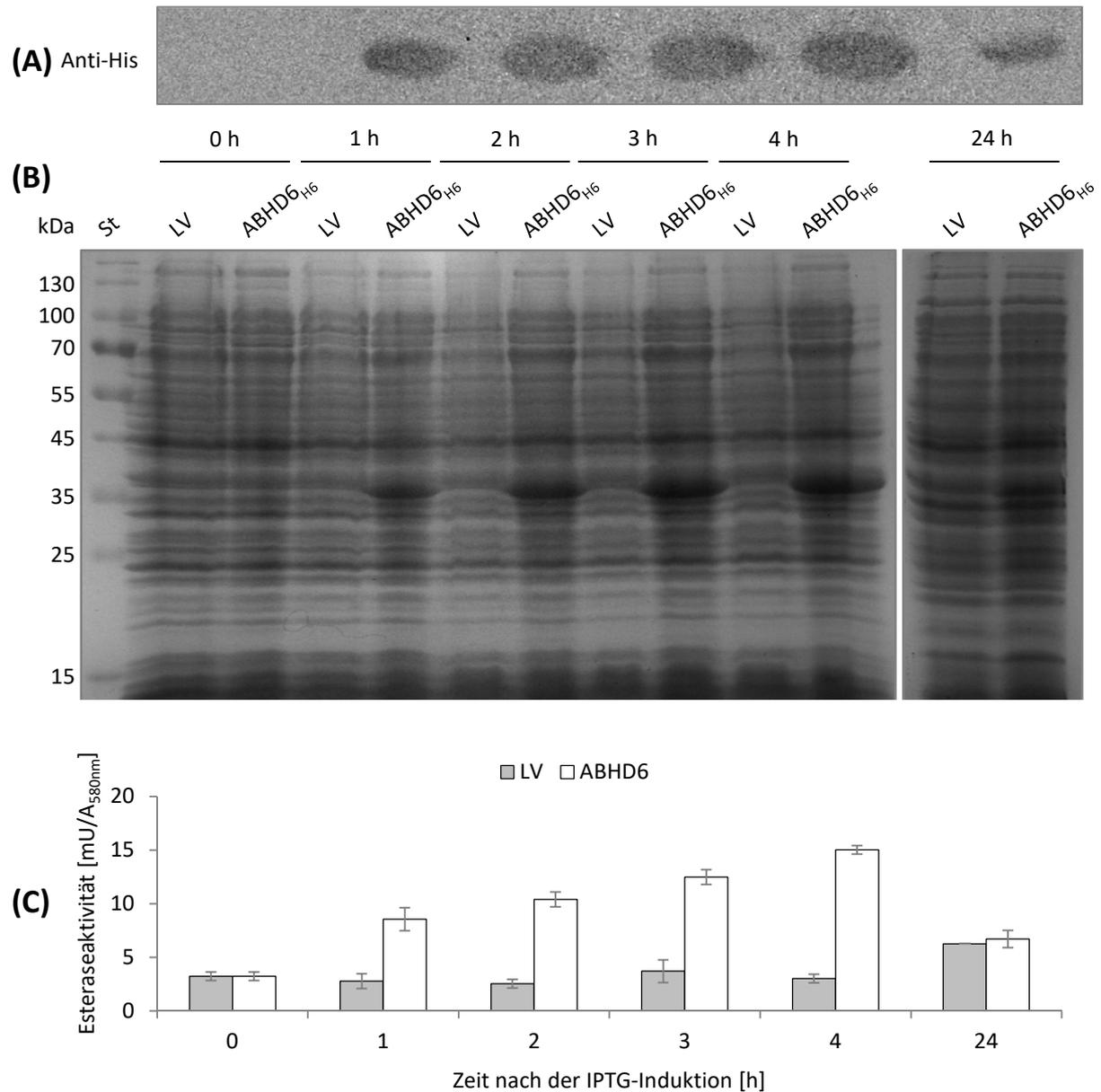


Abbildung 22: Nachweis der heterologen Expression von *abhd6*_{H6} in *E. coli* BL21(DE3) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Hierzu wurden *E. coli* BL21(DE3)-Stämme mit jeweils pET 22b (+)-Leervektor (LV) und pET-*abhd6*_{H6} über einen Zeitraum von 24 h wachsen gelassen und Proben vor IPTG-Induktion sowie 1, 2, 3, 4 und 24 h danach, gezogen. **(A):** Western Blot-Analyse der Proben mit Anti-His-Affinitätstag-Antikörper. **(B):** 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. Die Produktion von ABHD6 ist bei einem Molekulargewicht von 39,1 kDa detektierbar. **(C):** Messung der Esteraseaktivität mit *p*NPB. Die Messung wurde auf die optische Dichte bei 580 nm normiert.

Hierzu wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) einmal mit dem jeweiligen pET 22b (+)-LV und einmal mit pET-*abhd6*_{H6} kultiviert und nach Erreichen einer OD_{580nm} von 0,5 mit IPTG induziert (3.1.7). Das Zellysate mit pET 22b (+)-LV als Referenz zeigte im Zeitraum von 0 bis 4 h eine nahezu gleichbleibende lipolytische Aktivität von ~ 7 mU/mL und keine detektierbaren Expressionsbanden im SDS-PAGE-Gel bzw. Western Blot an. Nach nur 24 h war hier ein Aktivitätsanstieg auf

~ 12 mU/mL gemessen worden. Die Proben mit pET-*abhd6*_{H6} zeigten direkt 1 h nach Induktion einen ~ 2,7-fachen Anstieg der lipolytischen Aktivität auf 18,4 mU/mL an und es war eine deutlich detektierbare Expressionsbande im SDS-PAGE-Gel bzw. Western Blot zu erkennen. Dieser Aktivitätsanstieg wuchs mit stetiger Inkubationsdauer bis 4 h nach Induktionszugabe auf 32,4 mU/mL und spiegelte sich ebenfalls in der Expressionsbande im SDS-PAGE-Gel bzw. Western Blot wieder. Nach 24 h Inkubation zeigte sich allerdings in der Aktivität mehr als eine Halbierung auf 14,4 mU/mL. Dieser Abfall ist anhand der Expressionsbande ebenfalls auszumachen.

4.6.2 Heterolog gebildetes ABHD6 liegt membranlokalisiert vor und lässt sich durch chromatographische Methoden isolieren

Die Etablierung der Detergens-basierten Reinigungsmethode von ABHD6_{H6} wurde im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.³¹⁶ Um ausreichende Mengen an ABHD6 generieren zu können, wurden die Ergebnisse reproduziert und um Lokalisierungsstudien erweitert. Da eine heterologe Expression stattfindet, sollte analysiert werden, ob ABHD6_{H6} wie im homologen Organismus als Membranprotein vorliegt und ob die Reinigung von ABHD6_{H6} aus der Membran möglich ist. Dazu wurden Proben direkt nach Beendigung der Expression (3.1.7) nach 4 h abgenommen, anschließend aufgeschlossen (3.3.1) und das Zellysate in die lösliche Fraktion (LF) und Membranfraktion (MF) aufgetrennt (3.3.2). Für die weitere *in vitro*-Charakterisierung von ABHD6_{H6} wurde über IMAC und AEX (3.3.3) ein zweistufiger Reinigungsprozess etabliert.³¹⁶ Die erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend gezeigt (Abbildung 23).

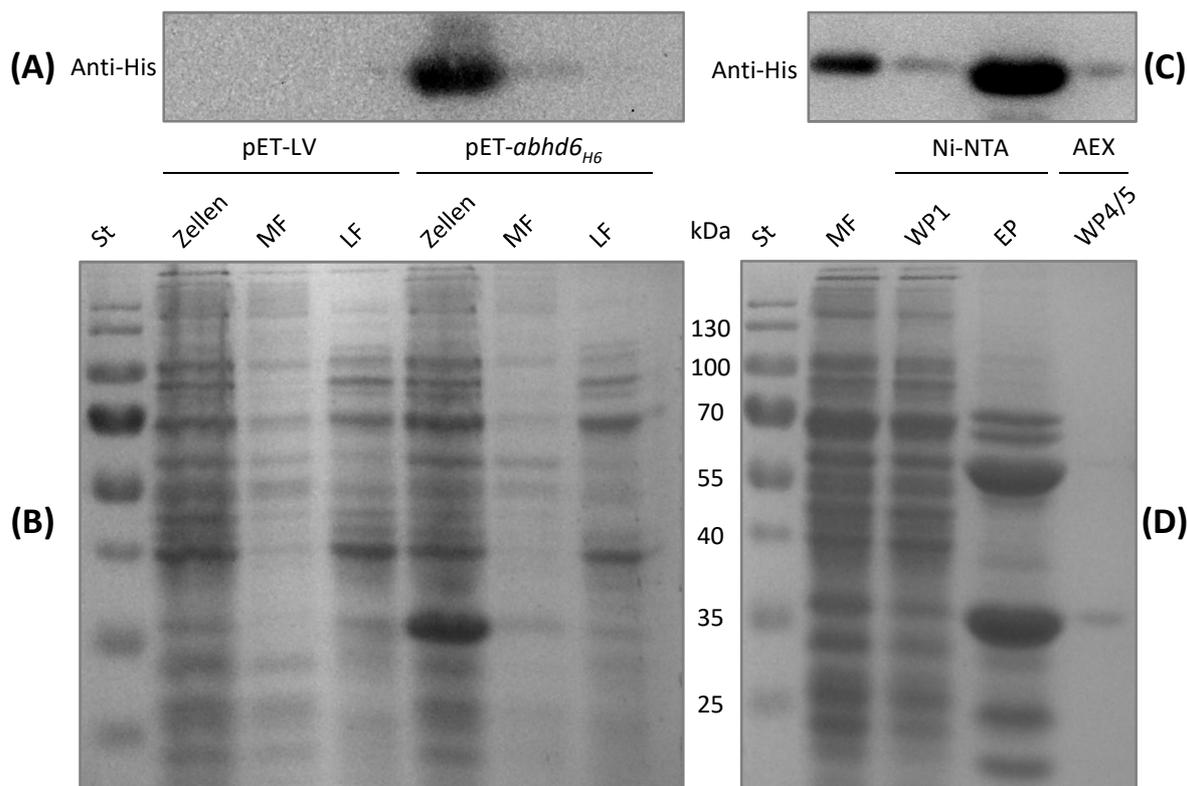


Abbildung 23: Lokalisierung und Reinigung von heterolog exprimiertem *abhd6_{H6}* in *E. coli* BL21(DE3). (A): Western Blot-Analyse der Lokalisierungsproben mit Anti-His-Affinitätstag-Antikörper. (B): 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. *E. coli* BL21(DE3) pET-*abhd6_{H6}* und *E. coli* BL21(DE3) pET-LV wurden für 4 h nach Induktion kultiviert und eine Probe abgenommen (Zellen). Anschließend wurde die Zellsuspension aufgeschlossen und die Membranfraktion (MF) durch Ultrazentrifugation von der löslichen Fraktion abgetrennt (LF). (C): Western Blot-Analyse der Reinigungsproben mit Anti-His-Affinitätstag-Antikörper. (D): 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. Die kultivierten *E. coli* BL21(DE3) pET-*abhd6_{H6}*-Zellen wurden aufgeschlossen und die MF isoliert. Anschließend wurde die erhaltene Membranfraktion über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und Anionenaustauschchromatographie (AEX) gereinigt. Dabei wurden Proben des Durchflusses von Waschpuffer 1 (WP1), dem Elutionspuffer (EP) und der vereinten Waschfraktionen 4/5 (WP4/5) abgenommen und analysiert.

Die Referenzproben mit pET 22b (+)-LV zeigten, wie zu erwarten, keine Expressionsbanden von *abhd6_{H6}* in der SDS-PAGE (3.3.5, Abbildung 23B) oder dem Western Blot (3.3.6, Abbildung 23A). Hingegen konnten die getesteten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pET-*abhd6_{H6}* deutlich die gewünschte Expression bei ~ 39 kDa auf dem SDS-PAGE-Gel (Abbildung 23B) und dem Western Blot (Abbildung 23A) indizieren. Beim Vergleich der LF mit der MF ließ sich nur innerhalb der MF *ABHD6_{H6}* identifizieren (Abbildung 23A). Hingegen enthielt die LF kein detektierbares *ABHD6_{H6}* und zeigte somit eindeutig eine Membranlokalisierung von heterolog exprimiertem *abhd6_{H6}* in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen.

Damit das membranlokalisierte *ABHD6_{H6}* für *in vitro*-Charakterisierung zugänglich gemacht werden konnte, wurde in einem zweistufigen Prozess gereinigt (3.3.3).³¹⁶ Innerhalb des ersten Wasch-

schrittenes mit WP1 wies der Durchfluss eine deutliche ABHD6_{H6}-Bande auf, was darauf zurückschließen lässt, dass hier ein Teil des exprimierten *abhd6*_{H6} verloren ging (Abbildung 23C / Abbildung 23D). Nachdem das mit einem His₆-Affinitätstag versehene ABHD6_{H6} durch Elution mit Imidazol von der Säule gewaschen wurde, zeigte sich im EP eine große Menge an vorgereinigtem ABHD6_{H6}. Im letzten Schritt wurde mit der AEX die letzte Reinigungsstufe fortgeführt und die WP4 und WP5 kombiniert. Diese Fraktion signalisierte hochreines ABHD6_{H6}, welches in DDM solubilisiert vorliegt und im Weiteren mit ABHD6_{DDM} betitelt wurde.

4.6.3 PlaF und ABHD6 folgen Michaelis-Menten-Kinetik und zeigen Produktinhibierung

Mit gereinigtem ABHD6_{DDM} konnten erste *in vitro*-Charakterisierungen vorgenommen und diese mit PlaF_{DDM} verglichen werden. Zuerst sollten mit Kinetikmessungen beider Proteine typische, biochemische Parameter bestimmt werden. Hierzu wurde die spezifische Aktivität gegenüber unterschiedlichen *p*NPH-Konzentrationen bestimmt (3.3.7, Abbildung 24).

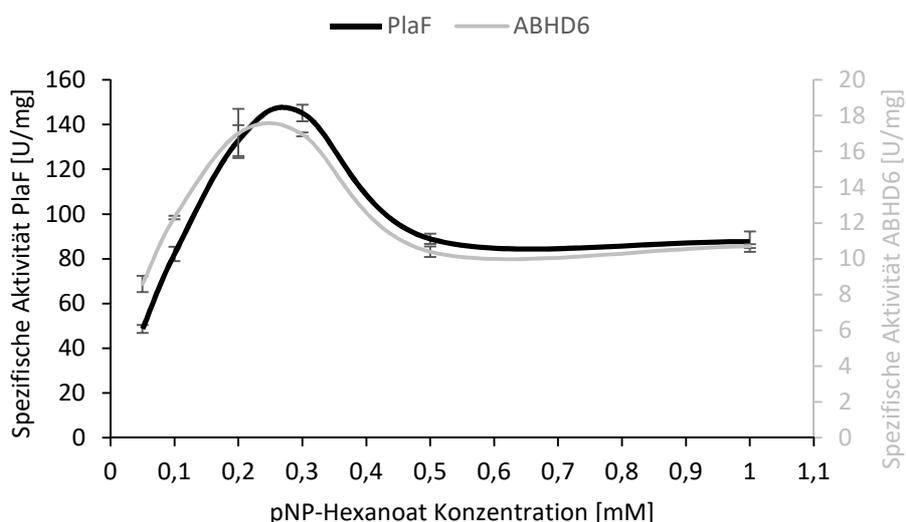


Abbildung 24: Messung der Michaelis-Menten-Kinetik für PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM}. Zur Bestimmung der Kinetik der beiden Proteine wurden 150 μ L *para*-Nitrophenylhexanoat unterschiedlicher Konzentrationen (0 mM; 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM) als Substrat-Stammlösung verwendet und mit 5 μ L Probe des jeweiligen Proteins (PlaF: 0,01 mg/mL; ABHD6: 0,05 mg/mL) versetzt. Aus der Auftragung der berechneten spezifischen Aktivität des Proteins mit der *p*NP-Hexanoat Konzentration konnte die Kinetik erstellt werden.

Sowohl ABHD6_{DDM} und PlaF_{DDM} zeigten einen Verlauf nach Michaelis-Menten-Kinetik, jedoch wies ABHD6_{DDM} mit einem Maximum von \sim 17 U/mg eine 8,8-fach geringere Aktivität gegenüber PlaF_{DDM} von 150 U/mg auf. Auffällig war für beide Proteine das Absinken auf \sim 11 U/mg und \sim 90 U/mg für ABHD6_{DDM} bzw. PlaF_{DDM} nachdem das Maximum eine Substratkonzentration von 0,27 mM für PlaF und 0,25 mM für ABHD6 erreicht hatte. Dies spricht für eine erfolgreiche Produktinhibierung beider Proteine. Dabei ist ein Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Fettsäure-induzierten Dimerisierung und Inhibierung von PlaF_{DDM} zu erkennen.²⁶⁵ Dieses Verhalten wurde für ABHD6_{DDM} bis dato nicht analysiert.

4.6.4 Vergleich des Substratprofils zwischen PlaF und ABHD6

Für ABHD6 konnte im Rahmen einer Masterarbeit die hydrolytische Spaltung von ausgewählten Substraten *in vitro* belegt werden.³¹⁶ Innerhalb dieser Arbeit sollte eine mögliche Konservierung der Substratspezifität und eine mögliche Involvierung von PlaF in Signalwegen, wie es z. B. für ABHD6 mit der Hydrolyse von 2-AG beschrieben ist, untersucht werden. Hierzu wurden als Erweiterung der vorhandenen ABHD6-Messungen parallele Aktivitätsmessungen von PlaF und ABHD6 im gleichen Ansatz durchgeführt, um einen Vergleich der ausgewählten Substratprofile zu erreichen. Die ermittelten Ergebnisse konnten als graphische Auftragung der spezifischen Aktivität dargestellt werden (Abbildung 25).

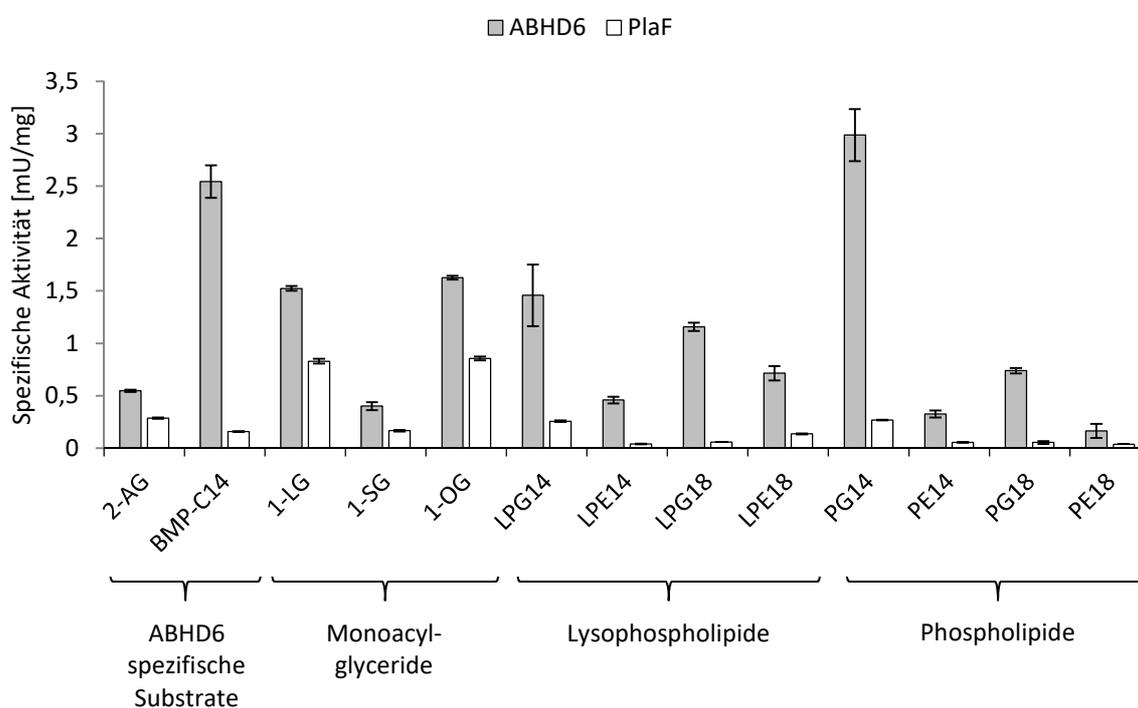


Abbildung 25: Substratprofilvergleich zwischen PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM}. Das Experiment wurde unter Verwendung des NEFA-Kits durchgeführt. Hierzu wurden Lipidsubstratlösungen mit 13,4 mM bzw. für (Lyso-) Phosphatidylethanolamine mit 6,7 mM angesetzt. Nach der Zugabe von 25 μ L 24 μ M Proteinlösung zu 25 μ L Lipidsubstratlösung erfolgte die Inkubation bei 30 °C. Die Inkubationsdauer variierte, je nach verwendetem Lipid, von 3 h (Mono- und Diacylglyceride) über 12 h (LysoPLs) bis zu 24 h (PLs). Es wurden vier verschiedene Gruppen von Substraten verwendet. Zuerst die typisch beschriebenen ABHD6-Substrate 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und Bis-(monomyristoylglycerol)phosphat (BMP-C14). Als Zweites die Monoacylglyceride 1-Lauroylglycerol (1-LG), 1-Stearoylglycerol (1-SG) und 1-Oleoylglycerol (1-OG). Die dritte Gruppe umfasste die LysoPL 1-Myristoyl-lysophosphatidylglycerol (LPG14), 1-Myristoyl-lysophosphatidylethanolamin (LPE14), 1-Stearoyl-lysophosphatidylglycerol (LPG18), 1-Stearoyl-lysophosphatidylethanolamin (LPE18). Zuletzt wurden die Phospholipide 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylglycerol (PG14), 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin (PE14), 1,2-Distearoyl-phosphatidylglycerol (PG18), 1,2-Distearoyl-phosphatidylethanolamin (PE18) getestet.

Das natürliche ABHD6-Substrat 2-AG³⁶⁵ ist ein Endocannabinoid und besitzt als 2-Acyglycerid ein MAG-Gerüst, dessen Umsetzung in dieser Arbeit bereits für PlaF gezeigt werden konnte (4.3.1).

Neben dem Endocannabinoid 2-AG wurden BMP-C14 und weitere bereits beschriebene ABHD6-Substrate²⁹⁵ auf *in vitro*-Aktivität von PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} mit dem NEFA-Assay (3.3.8) getestet. Die Substrate wurden in vier Gruppen geordnet. Zuerst die natürlichen ABHD6-Substrate 2-AG und BMP-C14. Zweitens die MAGs 1-LG, 1-SG und 1-OG. Die dritte Gruppe umfasste die LysoPLs LPG14, LPE14, LPG18, LPE18. Zuletzt wurden die PLs PG14, PE14, PG18, PE18 getestet. Für die LysoPL- und PL-Substrate konnte bereits eine erfolgreiche Umsetzung durch PlaF gefunden werden.

Die Charakterisierung des lipolytischen Vergleichsprofils (Abbildung 25) von PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} zeigte für beide Proteine und alle getesteten Substrate *in vitro*-Aktivität an. Allgemein lag die Aktivität von PlaF jedoch niedriger als die gemessenen Aktivitäten von ABHD6_{DDM}. Die höchsten ABHD6_{DDM}-Aktivitäten zeichneten sich mit den Substraten PG14 mit 2,9 mU/mg und BMP-C14 mit 2,5 mU/mg ab. Gefolgt von 1-OG, 1-LG, LPG14 mit 1,6 mU/mg, 1,5 mU/mg und 1,4 mU/mg. Für PlaF_{DDM} hingegen zeigten sich die höchsten Aktivitäten bei 1-LG und 1-OG mit ~ 0,8 mU/mg für beide Substrate. Alle weiteren Substrate zeigten mit PlaF_{DDM} Aktivitäten von unter 0,5 mU/mg. Dadurch konnte ein konvergentes Substratprofil für ABHD6_{DDM} und PlaF_{DDM} gezeigt werden, wobei PlaF_{DDM} die Substrate nicht im gleichen Ausmaß umsetzen konnte, wie ABHD6_{DDM}.

4.6.5 Plasmid-basierte Komplementierung einer *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit *abhd6* in Bezug auf Schwimmbeweglichkeit und Biofilmproduktion

Beim *in vivo*-Vergleich der generierten *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit *P. aeruginosa*-Wildtyp konnte neben der verminderten Virulenz²⁷⁰ auch eine reduzierte Biofilmproduktion und Schwimmbeweglichkeit²⁷¹ identifiziert werden. In den vorherigen Abschnitten konnte bereits eine erste biochemische Charakterisierung von ABHD6_{DDM} im Vergleich mit PlaF_{DDM} durchgeführt werden. Neben der schon erwähnten ähnlichen Primär- und Sekundärstruktur²⁶⁴ wurde ein vergleichbarer Kinetikverlauf (4.6.3) und ein ähnliches Substratprofil (4.6.4) beider Proteine gezeigt. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob *abhd6* in der Lage wäre, die Funktion von *plaF* in der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante zu komplementieren. Zu diesem Zweck wurde die *abhd6*-Gensequenz in pBBR1mcs-3 kloniert (pBBR-*abhd6*, Tabelle 4) und damit *P. aeruginosa* Δ *plaF* transformiert (3.1.5). Mit Hilfe dieses generierten Stammes sollte eine Plasmid-basierte Komplementierung anhand der Biofilmproduktion (3.1.8) und der Schwimmbeweglichkeit (3.1.9) getestet werden.

Die bakterielle Fortbewegung der Zellen wird durch zelluläre Anhänge wie Typ-IV Pili und Flagellen ermöglicht. Chemoattraktoren und Repellentien sind dabei häufig für die gezielte Steuerung des Bakteriums zu vorteilhaften Umgebungen zuständig.³⁶⁶ Die Chemotaxis-assoziierten Anhänge spielen, neben weiteren Faktoren, häufig in der bakteriellen Virulenz eine Rolle.^{71, 367, 368} *P. aeruginosa* besitzt dabei nur ein polares Flagellum. Für PlaF konnte bereits ein Zusammenhang zwischen reduzierter, Flagellar-vermittelter Schwimmbeweglichkeit und verminderter Virulenz in

der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante gezogen werden.²⁷¹ Die ermittelten Ergebnisse der Plasmid-basierten Komplementierung des *P. aeruginosa* Δ *plaF* in Bezug zur Schwimmbeweglichkeit sind in Abbildung 26 dargestellt.

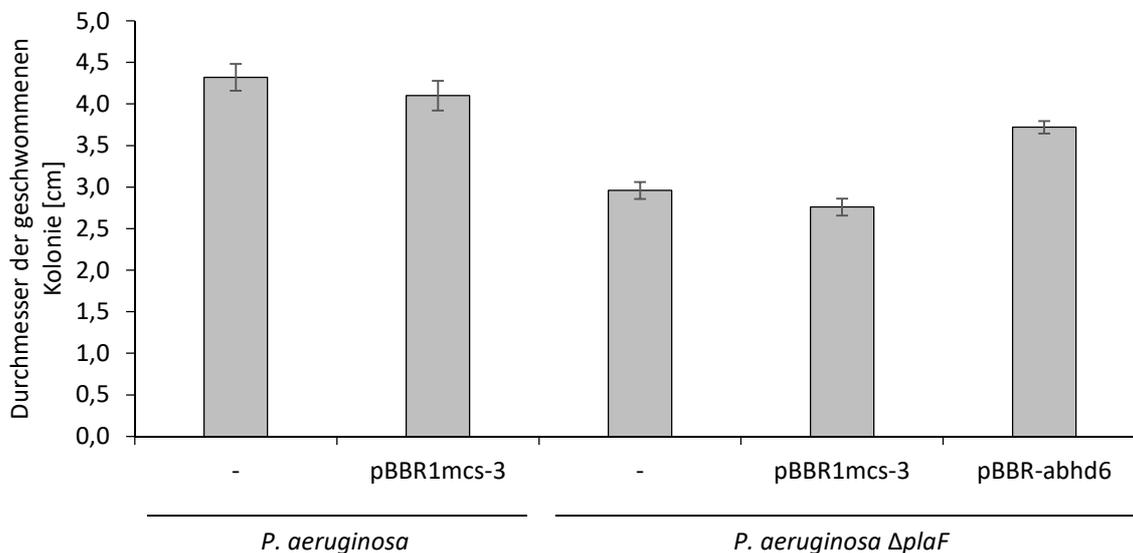


Abbildung 26: Untersuchung der Schwimmbeweglichkeit einer Plasmid-basierten Komplementierung der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit *abhd6*. Hierzu wurden auf 0,3 % LB-Agarplatten Einzelkolonien des jeweiligen Stammes mit einem Zahnstocher transferiert und für 20 h inkubiert. Der Durchmesser der geschwommenen Kultur wurde als Maßstab für die Schwimmbeweglichkeit herangezogen. Die Ergebnisse wurden in zwei separaten Experimenten mit jeweils drei Triplikaten untersucht.

Bei der Untersuchung der Schwimmbeweglichkeit (3.1.9) im Vergleich *P. aeruginosa*-Wildtyp und *P. aeruginosa* mit pBBR1mcs-3 zeigte sich kein deutlicher Unterschied im Durchmesser der geschwommenen Kolonie. Der zuvor beschriebene Effekt der reduzierten Schwimmbeweglichkeit in der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp²⁷¹ ließ sich auch in diesem Experiment mit 32 % identifizieren. Die *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit pBBR1mcs-3 transformiert, sank nur minimal im Vergleich zur nicht transformierten *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante. Die Plasmid-basierte Komplementierungsprobe *P. aeruginosa* Δ *plaF* pBBR-*abhd6* zeigte im Vergleich zu *P. aeruginosa* Δ *plaF* einen erkennbaren Anstieg und konnte 86 % der ursprünglichen Schwimmbeweglichkeit wiederbringen. Somit konnte mit ABHD6 eine partielle Wiederherstellung der ursprünglichen Schwimmbeweglichkeit durch Plasmid-basierte Komplementierung erfolgen.

Für viele pathogene Bakterien, wie z. B. *P. aeruginosa*, ist ein Wechsel von einem planktonischen zu einem Biofilm-Lebensstil bekannt. Letzterer zeichnet sich dabei durch einen sesshaften Zustand der Zellen aus, welche sich in extrazelluläre Polymersubstanzen einlagern, um zu überleben und exogene Umweltveränderungen auszuhalten.⁷¹ Der exakte, molekulare Mechanismus zur Kontrolle der Biofilmproduktion in *P. aeruginosa* ist bis dato nicht gänzlich geklärt. Es ist bekannt, dass der Wechsel zum Biofilm-Lebensstil von einem komplexen regulatorischen Netzwerk aus Zweikomponentensystem, QS, zyklisches Diguanylat und Sigmafaktor-Signalwegen kontrolliert wird.³⁶⁹

Für die PlaF-vermittelte Virulenz konnte eine Rolle von PlaF in der frühen Phase der Biofilmentwicklung mit einer irreversiblen Anhaftung der Zellen an Oberflächen detektiert werden. Zur Analyse einer möglichen Komplementierung des *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stammes mit *abhd6* wurde eine Plasmid-basierte Komplementierungsmethode gewählt. Hierzu wurden der *P. aeruginosa*-Wildtyp sowie die *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit dem pBBR1mcs3-Vektor als Referenzstämme generiert. Für die zu untersuchende Probe wurde der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm mit dem pBBR-*abhd6*-Vektor transformiert (3.1.5). Alle erstellten Stämme wurden ohne Schütteln für 24 h inkubiert und anschließend die Biofilmproduktion mit einem Kristallviolett-basierten kolorimetrischen Assay bestimmt (3.1.8). Die Bestimmung der Biofilmproduktion wurde durch die Auftragung der ermittelten Absorption bei 550 nm ($A_{550\text{nm}}$) vorgenommen (Abbildung 27).

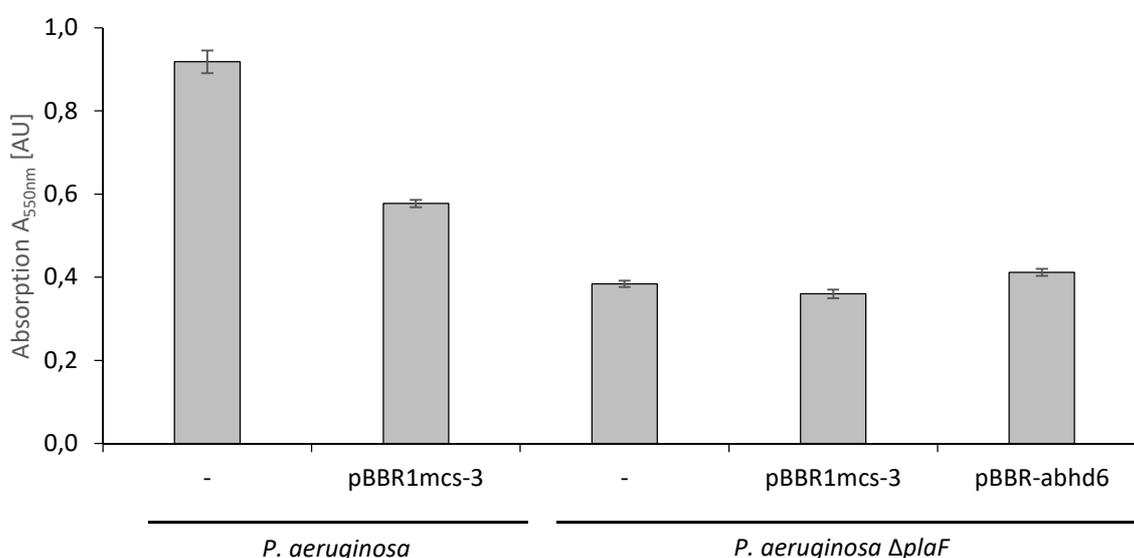


Abbildung 27: Analyse der Biofilmproduktion einer Plasmid-basierten Komplementierung der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit *abhd6*_{H6}. Hierzu wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Stammes auf eine $OD_{580\text{nm}}$ von 0,1 verdünnt, für 24 h ohne Schütteln in Mikrotiterplatten kultiviert und anschließend durch Einsatz von Kristallviolett photometrisch vermessen. Die Auswertung wurde durch die Ermittlung der Absorption bei 550 nm ($A_{550\text{nm}}$) vorgenommen. Die Daten konnten anhand drei unabhängiger Experimente in Triplikaten bestimmt werden.

Bei der Untersuchung der Biofilmproduktion zeigte sich der höchste Wert für *P. aeruginosa* mit 0,91 AU. Für den Stamm *P. aeruginosa* mit pBBR1mcs-3 konnte eine Reduktion des Biofilms um 33 % identifiziert werden. Der zuvor beschriebene Effekt der reduzierten Biofilmproduktion in der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante, im Vergleich zum *P. aeruginosa*-Wildtyp, ließ sich auch in diesem Experiment mit 58 % beobachten. Die *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante mit pBBR1mcs-3 transformiert, sank nur minimal im Vergleich zur *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante. Der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm mit pBBR-*abhd6* zeigte keinen beträchtlichen Unterschied zur nicht transformierten *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante. Infolgedessen konnte mit ABHD6 keine Komplementierung der ursprünglichen Biofilmproduktion gezeigt werden.

4.6.6 ABHD6 zeigt im Vergleich zu PlaF ein verändertes Dimerisierungsverhalten

Eine Verankerung von Membranproteinen innerhalb der Plasmamembran erfolgt neben der β -Fass-Struktur häufig über hydrophobe α -Helices.³⁷⁰ Letztere zeigen dabei oftmals eine Beteiligung an biologischen Prozessen durch die Ausbildung von Dimeren^{5, 19}, z. B. bei der An- und Abschaltung von Rezeptor-Tyrosinkinasen³⁷¹ oder Transkriptionsregulatoren³⁷². Für PlaF konnte eine Struktur-Funktionsbeziehung über das inaktive Dimer und das aktive Monomer beschrieben werden.²⁶⁵ Für ABHD6 wurde bis dato kein regulativer Mechanismus beschrieben, weshalb über *Crosslinking*-Analyse (3.3.11) eine putative Dimerisierung von ABHD6 untersucht werden sollte. Die angefertigten SDS-PAGE-Gele (3.3.5) nach der *Crosslinking*-Reaktion sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 28).

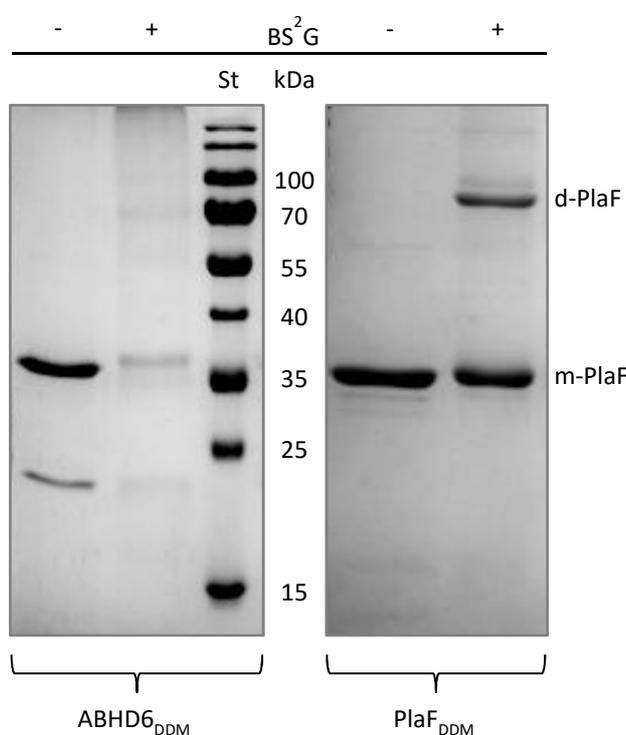


Abbildung 28: Untersuchung des Dimerisierungsverhalten von ABHD6_{DDM} im Vergleich zu PlaF_{DDM}. 12 % (w/v) SDS-PAGE-Gel in Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt. Für den Nachweis des Dimerisierungsverhaltens wurde *in vitro*-Crosslinking mit dem BS²G-Crosslinker durchgeführt. Hierzu wurde 10 μ L 15,5 μ M Proteinlösung mit 6 μ L 5 mM BS²G (gelöst in 100 mM TRIS pH 8,0) versetzt und die Reaktion nach 1,5 h Inkubation mit 2 μ L Stopp-Lösung terminiert.

Bei der Betrachtung von PlaF_{DDM} zeigte sich bei \sim 70 kDa deutlich das zu erwartende Dimer, wohingegen bei der Probe ohne *Crosslinker* keine Bande identifizierbar war. Beim humanen Homolog ABHD6_{DDM} war ein gänzlich anderes Bild erkennbar. In der mit *Crosslinker* inkubierten Probe ließ sich nur ein sehr schwaches bis gar kein Signal bei der zu erwartenden Dimergröße von \sim 78 kDa detektieren. Folglich zeigte ABHD6_{DDM} im Gegensatz keine bis sehr schwache Dimerisierung unter

den hier getesteten Bedingungen auf. Zusammen mit den unterschiedlichen Aktivitäten im Substratvergleich konnte mit dem veränderten Dimerisierungsverhalten ein weiterer Unterschied zu PlaF_{DDM} identifiziert werden.

4.6.7 Bioinformatischer Strukturvergleich von PlaF und ABHD6

In den letzten Jahren konnten eine Vielzahl verschiedener physiologischer und pathologischer Funktionen von ABHD6 detektiert werden. Dazu gehören neben Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen³⁷³⁻³⁷⁵, der Insulinsekretion³⁰⁰ auch ein neuroprotektiver Schutz²⁹⁸. Aus diesem Grund wuchs das Interesse an ABHD6 und seiner 3D-Struktur als therapeutisches Target. Für ABHD6 konnte bereits mit 49 % eine hohe Primärsequenzähnlichkeit und eine konservierte Sekundärstruktur ermittelt werden.²⁶⁴ Bis dato gibt es allerdings keine gelöste Struktur einer ABHD6 enthaltenden Domäne. Für einen strukturellen Vergleich mit PlaF und einer möglichen Erklärung für eine veränderte ABHD6-Dimerisierung und –Aktivität wurde eine Struktur benötigt. In Zusammenarbeit mit dem Institut „*Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics*“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf konnten zwei mögliche ABHD6-Modellstrukturen erhalten werden. Die erste wurde über die ABHD6-Primärsequenz anhand der PlaF-Struktur erstellt und im Rahmen einer Masterarbeit beschrieben.³¹⁶ Die zweite ABHD6-Modellstruktur wurde über das Programm „TopModel“³⁷⁶ hergestellt. Sowohl von der PlaF-Kristallstruktur als auch der TopModel-modellierten ABHD6-Struktur wurde die Sekundärstruktur graphisch unter Verwendung der Software „PDBsum“ dargestellt (Abbildung 29A / Abbildung 29B). Mit der Proteinstrukturvisualisierungs- und –analysesoftware „PyMOL“ (Tabelle 6) wurden die TopModel-modellierte ABHD6-Struktur anhand der „Super“-Funktion mit der PlaF-Kristallstruktur überlagert und als Cartoon-Form dargestellt (Abbildung 29C). Die Überlagerung der beiden Strukturen zeigte eine deutliche strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der globulären, katalytisch aktiven Domänen (PlaF: Aminosäure 38 - 310; ABHD6: Aminosäure 47 - 337) mit einem *root-mean square deviation of all atoms* (RMSD_{all}) von 0,8 Å. Allein im N-terminalen Ende innerhalb der Strukturen war ein prägnanter Unterschied von Aminosäure 1 – 37 (PlaF) bzw. 1 - 46 (ABHD6) identifizierbar. In der gelösten 3D-Struktur von PlaF präsentiert sich dieser Bereich als durchgängige α -Helix, die in eine TM-Region und eine JM-Region unterteilt wird.²⁶⁵ Innerhalb der modellierten ABHD6-Struktur zeigte sich dieser Bereich komplett unstrukturiert und belegt somit keine Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinstrukturen.

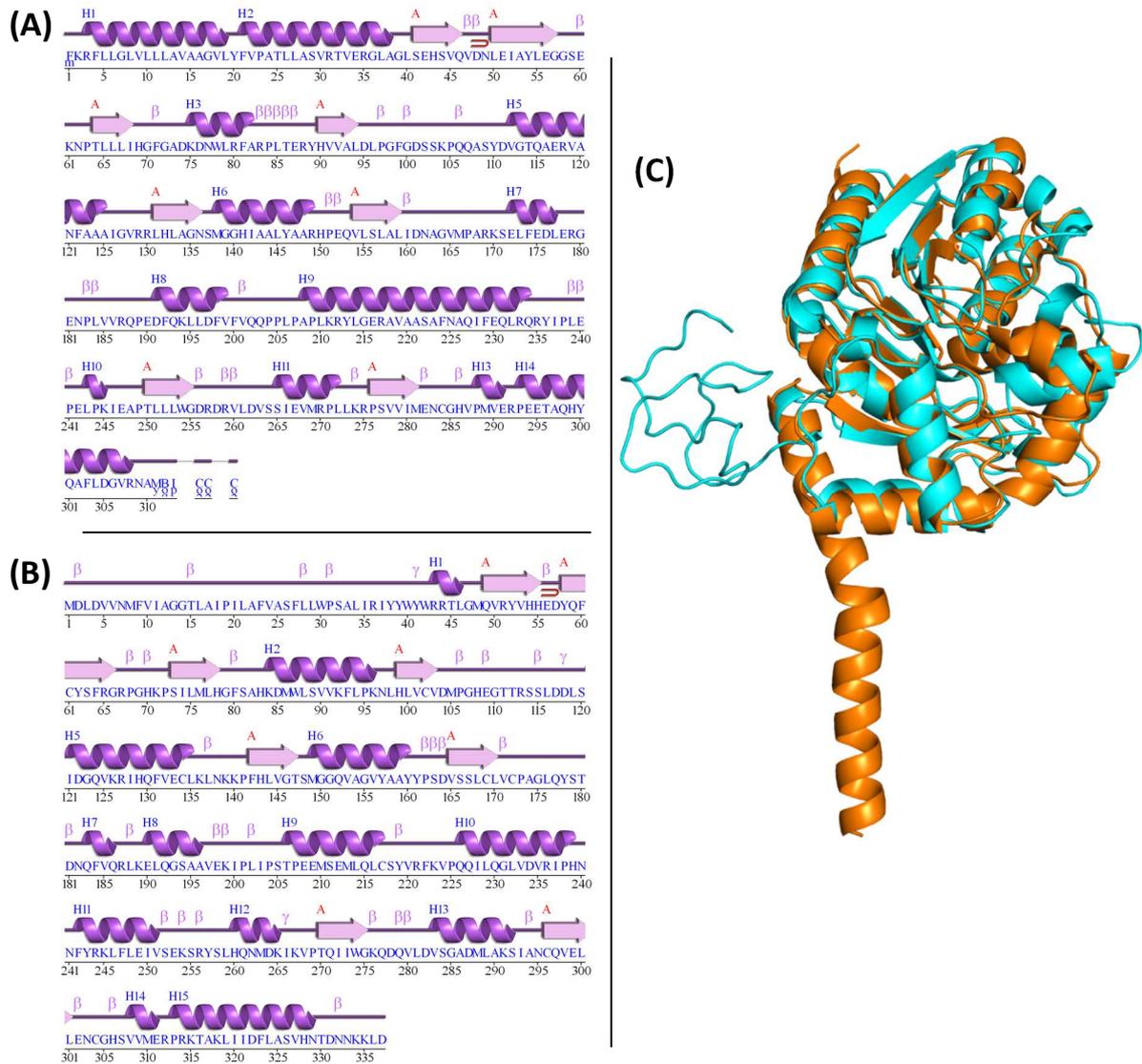


Abbildung 29: Strukturanalyse von PlaF mit der TopModel-modellierten ABHD6-Struktur. (A): Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente von Pla_FA aus der 3D-Kristallstruktur mit dem Online-Tool „PDBsum“. **(B):** Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente der TopModel-modellierten ABHD6-Struktur mit dem Online-Tool „PDBsum“. Innerhalb der beiden gezeigten Sekundärstrukturanalysen sind α-Helices mit einem H beschriftet, wohingegen β-Faltblätter mit einem Großbuchstaben dargestellt sind. β, γ markieren auftretende β- bzw. γ-Kehren. Ein roter Bogen bezeichnet eine β-Haarnadel. **(C):** Strukturalignment von PlaF (orange, PDB-ID: 6I8W) mit ABHD6 (cyan). Mit dem Programm PyMOL wurden die beiden Strukturen unter Verwendung der „Super“-Funktion überlagert und in der Cartoon-Darstellung gezeigt.

Für ABHD6 konnte bereits belegt werden, dass es die Funktion auch in verkürzter Form (Deletion der Aminosäuren 1 - 29) ABHD6 Δ29 beibehält und somit keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität besitzt.²⁷⁷ Dieser beschriebene Unterschied könnte auch ein möglicher Anhaltspunkt für eine ausbleibende Dimerisierung von ABHD6 im Gegensatz zu PlaF sein. Für PlaF ist eben diese TM-Region für die Lokalisierung in der inneren Membran und als putative Dimerisierungsdomäne beschrieben.²⁶⁵ Neben der wichtigen TM-Helix sind in PlaF neben dem aktiven Zentrum auch weitere wichtige Bereiche, wie die Fettsäure-Bindetaste und die putative Ligandenbindestelle mit OG beschrieben. Mit den überlagerten Proteinen sollte eine Auswertung dieser Bereiche auch für die

modellierte ABHD6-Struktur ermöglicht werden. Die Nahaufnahmen dieser Bereiche in der Stäbchendarstellung sind nachfolgend gezeigt (Abbildung 30A-D).

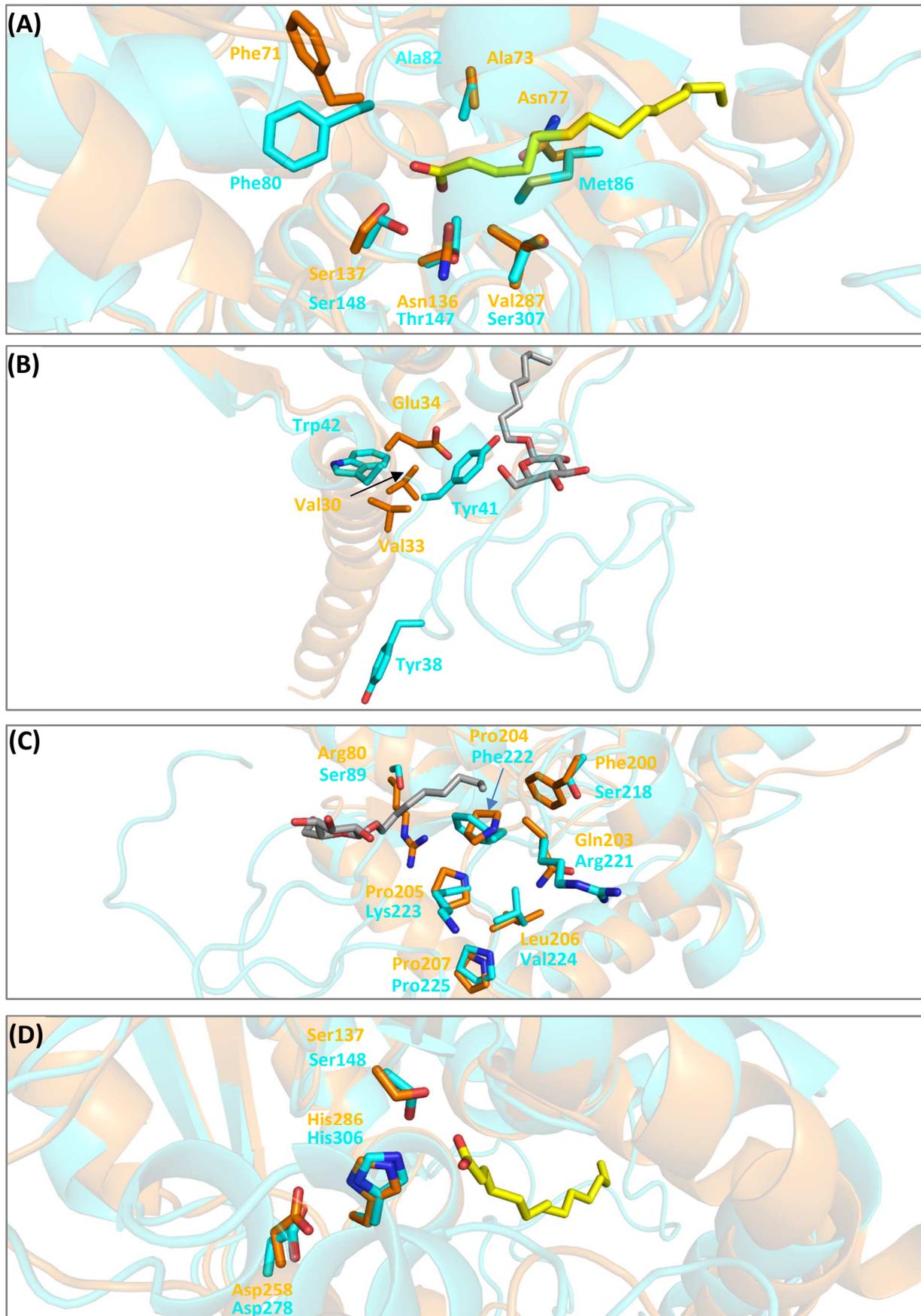


Abbildung 30: Nahaufnahme wichtiger Bereiche von PlaF in der überlagerten Struktur von PlaF und ABHD6.

Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrer Proteinfarben in orange (PlaF, PDB-ID: 6I8W) und cyan (ABHD6) in Stäbchenform dargestellt und beschriftet. **(A)**: Fettsäure-Bindetasche mit C14 (gelb) als endogener Ligand und dessen interagierenden Aminosäuren. **(B)**: Putative Ligandenbindestelle mit OG (grau) als exogener Ligand und den interagierenden Aminosäuren innerhalb der Transmembranregion. **(C)**: Putative Ligandenbindestelle mit OG (grau) als exogener Ligand und den interagierenden Aminosäuren innerhalb der globulären Regionen. **(D)**: Aktives Zentrum mit der katalytischen Triade.

In Abbildung 30A ist die Fettsäure-Bindetasche dargestellt und zeigte einen RMSD_{all} im strukturellen Vergleich von $0,87 \text{ \AA}$ unter Einbeziehung essenzieller Aminosäurereste (PlaF: Phe71, Ala73, Asn77, Asn136, Ser137, Val287; ABHD6: Phe80, Ala82, Met86, Thr147, Ser148, Ser307) in der Tasche. Dabei zeigten sich für Phe71, Ala73 und Ser137 (PlaF) identische homologe Aminosäuren mit Phe80, Ala82, Ser148 (ABHD6), wobei im Falle des Phe80 (ABHD6) eine geänderte strukturelle Ausrichtung zu Phe71 (PlaF) zu identifizieren war. Die restlichen essenziellen Aminosäurereste Asn77, Asn136 und Val287 (PlaF) innerhalb der Fettsäurebindetasche zeigten mit Met86, Thr147 und Ser307 (ABHD6) ähnlich sterische Ansprüche, allerdings leicht veränderte Polaritäten der Aminosäurereste.

In Bezug auf die putative Ligandenbindestelle, die in Abbildung 30B und Abbildung 30C dargestellt ist, war der Unterschied mit $0,75 \text{ \AA}$ als RMSD_{all} unter Einbeziehung der essenziellen Aminosäuren (PlaF: Val30, Val33, Glu34, Arg80, Phe200, Gln203, Pro204, Pro205, Leu206, Pro207; ABHD6: Tyr38, Tyr41, Trp42, Ser89, Ser218, Arg221, Phe222, Lys223, Val224, Pro225) geringer. Ein struktureller Vergleich essenzieller Aminosäuren der putativen Ligandenbindestelle innerhalb der N-terminalen Aminosäureregion 1 - 37 (PlaF) bzw. 1 - 48 (ABHD6) ist nicht eindeutig beschreibbar, da für die über TopModel erstellte ABHD6-Struktur, durch fehlende Strukturähnlichkeiten, eine unstrukturierte Region vorliegt (Abbildung 30B). Allerdings zeigten sich für Val30, Val33 und Glu34 (PlaF) mit Tyr38, Tyr41 und Trp42 (ABHD6) deutlich sterisch anspruchsvollere Aminosäurereste. Die innerhalb der globulären Struktur vorliegenden essenziellen Aminosäuren der putativen Ligandenbindestelle sind in Abbildung 30C dargestellt. Im Vergleich zur Fettsäurebindetasche (Abbildung 30A) zeigten sich mit Pro207 (PlaF) und Pro225 (ABHD6) deutlich weniger identische, essenzielle Aminosäurereste. Mit Leu206 (PlaF) und Val224 (ABHD6) konnten ähnlich große und hydrophobe Aminosäuren gefunden werden. Die unterschiedlichen Aminosäurereste Ser89 und Ser218 (ABHD6) im Vergleich zu Arg80 und Phe200 (PlaF) zeigten deutlich kleinere und ungeladene Aminosäuren innerhalb von ABHD6 an. Im Falle von Gln203 (PlaF) und dessen homologen Aminosäurerest Arg221 (ABHD6) lag eine größere Aminosäure mit positiver Ladung innerhalb der putativen Ligandenbindestelle vor. Die restlichen essenziellen Aminosäuren Pro204 und Pro205 (PlaF) sind als homologe Aminosäuren Phe200 und Lys223 (ABHD6) dargestellt. Dadurch kommt es im letzten Fall zu einer Erhöhung der positiven Ladung innerhalb der ABHD6-Tasche im Vergleich zu PlaF. Mit der Überlagerung des aktiven Zentrums von PlaF (Ser137, Asp258; His286) und ABHD6 (Ser148, Asp278, His306) zeigte sich mit $0,43 \text{ \AA}$ der geringste RMSD_{all} aller getesteten Bereiche

(Abbildung 30D). Die Ausrichtung der Seitenketten Asp258 und His286 (PlaF) wiesen im Vergleich zu Asp278 und His306 (ABHD6) nur marginale strukturelle Verschiebungen auf. Hingegen zeigte im Vergleich das katalytische aktive Ser148 (ABHD6) zu Ser137 (PlaF) eine 90° Verschiebung an.

4.6.8 Höhere Aktivität von ABHD6 in einer Phospholipidumgebung

In 4.4.2 konnte bereits gezeigt werden, dass PlaF_{SUV} allgemein einen aktivierenden Effekt im Vergleich zu PlaF_{DDM} zeigte. Da für ABHD6 noch kein regulativer Mechanismus bekannt ist und keine bis kaum Dimerisierung stattfindet, sollte analysiert werden, ob ABHD6-Lipid-Interaktionen möglicherweise einen Einfluss nehmen können. Dazu wurden die Detergens-solubilisierten Proteine PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} (3.3.3) sowie deren rekonstituierten Gegenstücke PlaF_{SUV} und ABHD6_{SUV} (3.3.12.2) in SUVs aus *E. coli* TLE eingesetzt und die Aktivität mit pNPH (3.3.7) vermessen. Die ermittelten Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 31).

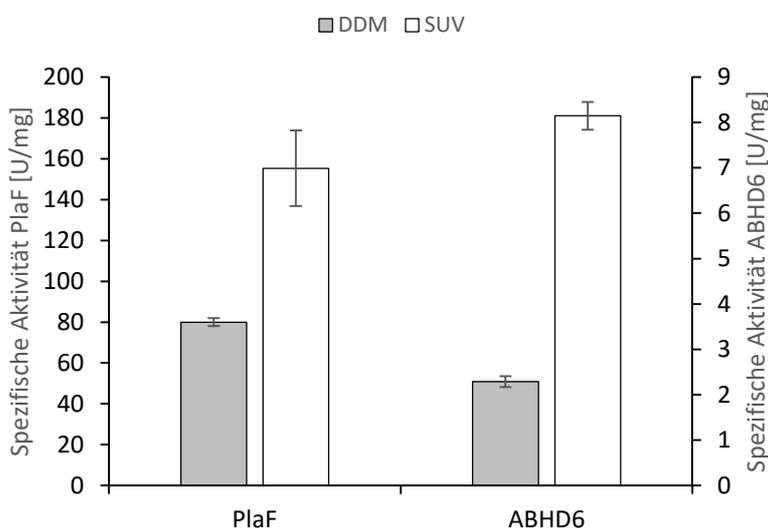


Abbildung 31: Esteraseaktivität von Detergens-solubiliertem PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} und deren SUV-rekonstituierten Gegenständen PlaF_{SUV} und ABHD6_{SUV}. Hierzu wurden die Esteraseaktivitäten von Detergens-solubilierten PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} sowie deren SUV-rekonstituierten Gegenständen PlaF_{SUV} und ABHD6_{SUV} mit pNPH gemessen. Die Rekonstitution erfolgte dabei in SUVs aus *E. coli* TLE. Die Messung erfolgte in zwei separaten Experimenten mit Triplikaten.

Für PlaF_{DDM} konnte eine spezifische Aktivität von ~ 80 U/mg ermittelt werden. Im Vergleich dazu wurde für SUV-rekonstituiertes PlaF_{SUV} eine 1,9-fache Aktivitätssteigerung berechnet. Mit dem artifiziellen Substrat pNPH ergab sich für ABHD6_{DDM} in Relation zu PlaF_{DDM} eine 35-fach niedrigere spezifische Aktivität von 2,2 U/mg. Bei der Betrachtung von ABHD6_{DDM} mit ABHD6_{SUV} war ein Anstieg der Aktivität um das 3,5-fache für SUV-rekonstituiertes ABHD6_{SUV} zu verzeichnen. Dabei lag die spezifische Aktivität für ABHD6_{SUV} allerdings um das 19-fache niedriger als für PlaF_{SUV}.

5 DISKUSSION

P. aeruginosa ist seit der Entdeckung Ende des 19. Jahrhunderts ein in der Forschung stark vertretender Mikroorganismus.^{377, 378} Die Schwerpunkte der *Pseudomonas*-Forschung liegen dabei in biotechnologischen^{379–383}, umwelttechnischen^{384–386} sowie pathogenen und virulenten Fragestellungen.^{387, 388} Besonders die Virulenz und Pathogenität dieses Bakteriums ist ein zunehmender Faktor der Erforschung, da die WHO *P. aeruginosa* in einer aktuellen Studie in die Risikogruppe 1, mit sogenannten dringendem Handlungsbedarf in der Erforschung und Entwicklung von Antibiotika, einstuft.¹⁹ Aus diesem Grund fokussiert sich die Grundlagenforschung besonders auf die Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* als interessante Angriffspunkte zur Bekämpfung dieses Pathogens.^{389–391} Hierzu zählen neben Proteasen, Exotoxinen, Rhamnolipiden und Pyocyanin auch Phospholipasen.^{46, 71}

Zu Beginn dieser Arbeit war die PLA₁ PlaF aus *P. aeruginosa* als Virulenzfaktor deklariert und eine grundsätzliche Charakterisierung in Detergensmizellen durchgeführt sowie eine in diesen gelöste Kristallstruktur entdeckt.^{263–265} Des Weiteren konnte durch Sequenzvergleiche ein humanes Homolog mit ABHD6 gefunden werden, von dem jedoch bis dato keine 3D-Kristallstruktur gelöst werden konnte.²⁶⁴ Der Erhalt der PlaF-Struktur sollte demzufolge zu einem verbesserten Verständnis von integralen Membranproteinen mit therapeutischer Bedeutung, wie exemplarisch ABHD6, führen.²⁶⁴

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es daher die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF zu untersuchen. Darüber hinaus wurde eine Erweiterung des lipolytischen Profils vorgenommen sowie Protein-Lipid-Interaktionen als Effektoren der Struktur-Funktionsbeziehung entdeckt. Außerdem konnte eine heterologe Produktion, Lokalisierung und Reinigung des Humanhomologs in *E. coli* BL21(DE3) etabliert und untersucht werden. Dies ermöglichte eine biochemische Untersuchung des Proteins und einen Vergleich zu PlaF.

5.1 Lipolytisches Substratprofil von PlaF unterstützt dessen Beteiligung in der Membranphospholipid-Homöostase

Die Modulation der bakteriellen Zellmembran durch Lipid-modifizierende Enzyme ist eine essenzielle Eigenschaft in der Stressantwort, um sich an geänderte Umweltbedingungen anzupassen.^{392–394} Zu solchen zählt neben extremen Lebensbedingungen auch ein fluktuierender Wechsel zwischen verschiedenen Lebenszyklen z. B. während der Infektion, um das Überleben des Bakteriums zu garantieren.^{53, 54} Eine Vielzahl von Proteinen wie Flippasen, Desaturasen, Methylasen und Phospholipasen steuern die Permeabilität, die Membranfluidität, die Membranladung oder auch die Rekrutierung an oder in die Membran.^{395–399} In *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) erfolgt durch die Lipid A-modifizierenden N-Acyltransferasen LpxD1 und LpxD2 eine temperaturabhängige Membranamstrukturierung. Hierbei wird durch LpxD1 eine 3-OH C18-Fettsäure bei 37 °C im Wirt

bzw. eine 3-OH C16-Fettsäure durch LpxD2 in der Umweltumgebung bei 18 °C in Lipid A eingefügt. Dadurch kann eine gezielte Steuerung der Membranfluidität gegeben werden und lässt somit Effekte auf die Faltung, Verteilung und Interaktionen mit Membranproteinen vermuten, die eine spezifische Anpassungsfähigkeit an den jeweiligen Wirt ermöglicht. In Deletionsstudien konnte bereits in *F. tularensis* Δ *lpxD1* gezeigt werden, dass solche vermeintlich kleinen Änderungen der Fettsäure-Kettenlänge neben einer erhöhten Antibiotikaanfälligkeit auch eine abgeschwächte Virulenz des Stammes bewirken können.⁴⁰⁰ Das Bakterium *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) hingegen ist in der Lage, wirtseigenes Cholesterin aufzunehmen und damit eigene Cholesterin-Glykolipide aufzubauen. Diese ermöglichen *B. burgdorferi* durch Lipid-Lipid-Interaktionen mit Bestandteilen eukaryotischer *lipid rafts* eine Adhäsion an die Wirtszelle.⁴⁰¹

Bakterielle Phospholipasen fungieren häufig als Virulenzfaktor, indem sie einerseits zur Desintegration der Wirtszellmembran beitragen und andererseits lytische oder membranverändernde Reaktionsprodukte freisetzen.^{111, 151} Innerhalb des Humanpathogens *P. aeruginosa* gesellt sich PlaF²⁶⁴ zu den bereits bekannten Phospholipasen A PlpD¹³⁷, EstA³⁴⁵, TesA⁴⁰² und ExoU¹⁵⁸, den Phospholipasen C PlcH⁴⁰³ und PlcN⁴⁰⁴ sowie den Phospholipasen D PldA⁴⁰⁵ und PldB⁴⁰⁶, die häufig alle eine Beteiligung an der Virulenz des Bakteriums zeigen. Oftmals geschieht dies durch die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden und der damit einhergehenden Freisetzung von Fettsäuren, die direkt oder als Prekursor für Signalmoleküle fungieren können.^{111, 151} In *P. aeruginosa* beeinflusst bspw. die Freisetzung von *cis*-2-Decansäure, polyungesättigten Fettsäuren und Oxylipinen verschiedene zelluläre Prozesse.^{407–409} Für *cis*-2-Decansäure konnte ein Einfluss auf die Verteilung des gebildeten Biofilms identifiziert werden.⁴⁰⁷ Die ungesättigten Fettsäuren bewirken neben einer gesteigerten Biofilmproduktion auch einen Einfluss auf die Schwimmbeweglichkeit von *P. aeruginosa* und sind über beide Eigenschaften mit der Virulenz des Organismus verknüpft.⁴⁰⁸ Für Ölsäure-abgeleitete Oxylipine konnte in *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass sie in der Zell-Zellkommunikation agieren, um unterstützend auf die Ausbildung von bakteriellen Mikrokolonien und Biofilm zu wirken.^{409, 410}

Mit einem breit aufgestellten Substratspektrum^{265, 316} wäre PlaF daher prinzipiell in der Lage durch die (Phospho-) Lipidhydrolyse in verschiedenen Signalwegen involviert zu sein. Anhand von Sequenzanalysen konnte bereits mit ABHD6 ein humanes, lipolytisches Homolog zu PlaF identifiziert werden (27 % Sequenzidentität, 49 % Sequenzähnlichkeit).^{264, 270} ABHD6 wurde durch funktionelle Proteomstudien in Gehirngewebe nachgewiesen und als Hydrolase des Lipidmediators 2-AG identifiziert.²⁹⁷ In neuen Studien konnte die Funktion von humanem ABHD6 als Regulator des 2-AG-Niveaus in Neuronen bestimmt werden und dementsprechend eine Eingliederung in den Endocannabinoid-Signalweg erfolgen.²⁹⁴ Anhand der hydrolytischen Spaltung des Membranphospholipids PI-4,5-bisphosphat durch eine PLC wird das entstandene DAG in einem weiteren Prozessierungsschritt durch eine Diacylglycerollipase α zu 2-AG umgesetzt.²⁹³ Dabei ist ABHD6 als integrales Membranprotein strategisch so positioniert, dass das 2-AG-Level am Entstehungsort zu Glycerol

und Arachidonsäure hydrolysiert werden kann.²⁹³ Neben der Kontrolle von physiologischen Prozessen wie der Schmerzempfindung, der Aufrechterhaltung der Nahrungsaufnahme und Lern- und Gedächtnisprozessen zeigt ABHD6 ebenfalls einen Zusammenhang zu neurodegenerativen Krankheiten.⁴¹¹ Anhand von Sequenzvergleichen wurden in einer Masterarbeit bakterielle Homologe zur ABHD-Proteinfamilie identifiziert, und daran eine mögliche Konservierung in der Evolution zu Eukaryoten diskutiert.³¹⁶ Für PlaF sollte aus diesem Grund analysiert werden, ob es in der Lage sei, DAGs und MAGs zu spalten und ähnlich wie ABHD6 im Endocannabinoid-System in Signalwege einzugreifen. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden DAGs und MAGs verschiedener Fettsäure-Kettenlängen (C12 - C18) mit PlaF_{DDM} inkubiert und analysiert (Abbildung 16). Die dargestellten Aktivitäten zeigen zusammen mit den bereits bekannten TAG-Aktivitäten eine Abstufung von DAG > MAG > TAG. DAGs sind in Eukaryoten bereits als Signalmoleküle bekannt¹⁶⁸ und bewirken durch ihre Inkorporierung in die Lipiddoppelschicht eine negative Membrankrümmung.⁴¹² Die dadurch stattfindende Membranveränderung kann wiederum Einfluss auf die Einlagerung von Proteinen haben.^{413, 414} MAGs sind ebenfalls als typische Signalmoleküle bekannt und zeigen antimikrobielle Wirkung, speziell gegenüber Gram-negativen Bakterien.^{415, 416}

Die physiologische Rolle von PlaF wird in der Adaptation von Membranen vermutet und konnte mit Lipidomanalysen bereits gestärkt werden.²⁶⁵ Aus diesem Grund sollte analysiert werden, ob PlaF in der Lage ist, die strukturbeeinflussenden Lipide BMP, HBMP, CL und DOPE (Abbildung 17) sowie CoA-Thioester (Abbildung 18) hydrolytisch zu spalten. Die Ergebnisse zeigten deutlich für alle getesteten Substrate eine Hydrolyse durch PlaF an. Die vergleichsmäßig starke Umsetzung des Lipids BMP war zu erwarten, da das humane PlaF-Homolog ABHD6 dieses Lipid spezifisch in der Leber spaltet.⁴¹⁷ Innerhalb von Eukaryoten konnte BMP mit der Cargosortierung assoziiert werden^{356, 357} und besitzt im Vergleich zu seinem Prekursor *sn*-3:*sn*-1'-PG mit einer *sn*-1:*sn*-1'-Stereochemie eine erhöhte Resistenz vor dem hydrolytischen Abbau durch Phospholipasen.^{357, 418} Für Prokaryoten konnte dieses Lipid zwar bereits gefunden werden, allerdings mit geänderter Stereochemie und keiner bekannten Funktion.⁴¹⁹ Außerdem wurden zwischen BMP-Molekülen starke intermolekulare Interaktionen gefunden, die eine Ausbildung von Mikrodomänen und möglicherweise sogar *small lamellar vesicles* ermöglichen.^{420, 421} Membraneingelagertes CL führt zur Erhöhung der Membranfluidität³⁵⁸ und einer negativen Krümmung der Membran.⁴¹² Weiterhin findet sich CL gehäuft in bestimmten Mikrodomänen vor und weist dort strukturelle und funktionelle Effekte auf.²¹²⁻²¹⁵ Mit HBMP wurde ein Lipid untersucht, welches für die Zellmembranfunktion während der Zellteilung von *E. coli* wichtig ist.³⁵⁹ Zuletzt wurde mit DOPE ein PL mit ungesättigten Fettsäureresten als Substrat verwendet. Durch den Einbau von ungesättigten Fettsäuren kommt es zur Erhöhung der Membranfluidität, die ihrerseits wiederum Effekte auf die Proteinaktivität besitzen kann.⁴²² Außerdem zeigen PE-Lipide ebenfalls wie DAG und CL einen negativen Krümmungseffekt auf die Membran, der allerdings durch die Kettenlänge und -sättigung stärker oder schwächer ausfällt.⁴¹² Darüber hinaus konnte bereits für *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass die Membranfluidität einen Effekt auf die Pathogenität des Bakteriums besitzen kann.⁴²³ Die Rolle

von PlaF kann anhand der identifizierten Aktivitäten gegenüber MAGs, DAGs und membranstrukturbeeinflussenden Lipiden, sowohl in der Generierung von Signalmolekülen und der gezielten Modulation der eigenen Membran zu Adaptationszwecken, diskutiert werden. Diese Prozesse sind wiederum eng mit der Virulenz von *P. aeruginosa* verknüpft.

Die Hydrolyse von Thioestern als energetische Verbindungen spielt in Zellsignalwegen und der Zellbeweglichkeit eine Rolle.^{424, 425} In vorausgegangenen Arbeiten wurde bereits CoA-Thioesteraseaktivität von PlaF getestet.²⁷⁰ Als Fortführung dieser Experimente wurde gereinigtes PlaF_{DDM} verwendet, um ebenfalls Thioesteraseaktivität mit gereinigtem PlaF nachzuweisen (Abbildung 18). Die Experimente zur Messung der Thioesteraseaktivität wurden mit CoA-Acylestern unterschiedlicher Kettenlänge durchgeführt. Obwohl die katalytische Domäne des in der inneren Membran verankerten PlaF ins Periplasma gerichtet ist, wodurch ein Zugang zu Acyl-CoA-Substraten weitestgehend ausgeschlossen sein sollte, zeigte sich für alle drei getesteten Substrate eine hydrolytische Spaltung. Bereits in *E. coli* konnte mit den Genen *tesA*, *apeA* und *pldC* periplasmatische Enzyme gefunden werden, die Acyl-CoA-Hydrolaseaktivität aufweisen. Jedoch konnte diesen noch keine klare physiologische Rolle zugeschrieben werden.⁴²⁶ In *P. aeruginosa* zeigt das periplasmatisch lokalisierte *TesA* neben der hauptsächlichen LysoPLA-Aktivität ebenfalls eine Umsetzung von Acyl-CoA-Substraten an.⁴⁰² Im Allgemeinen wurden Thioesterasen bereits mit verschiedenen Rollen im bakteriellen Organismus gefunden. In *Shewanella oneidensis* (*S. oneidensis*) konnte zudem eine Beeinflussung der Beweglichkeit durch die Thioesterase YbgC, durch Modulation des zyklischen Diguanyls, ermittelt werden.⁴²⁵ Für *P. aeruginosa* konnte mit *PqsE* eine spezifische Thioesterase identifiziert werden, die Signalmoleküle im Alkylquinolon-Biosyntheseweg durch Abbau im Gleichgewicht hält.⁴²⁴ Zusammenfassend können somit weitere Indizien für die Beteiligung von PlaF in Signalwegen durch den Abbau von Signalmolekülen gegeben werden. Außerdem könnte die verminderte Schwimmbeweglichkeit des *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stammes möglicherweise auf die Thioesteraseaktivität von PlaF zurückführbar sein.

5.2 Protein-Lipid-Interaktionen als Regulator der Funktion von PlaF

Innerhalb der Zellmembran können spezifische Lipidklassen oder molekulare Spezies, sogenannte *annular lipids*, die hydrophoben TM-Bereiche von Membranproteinen ummanteln.⁴²⁷ Für Membranproteine in Lipiddoppelschichten konnte bereits, im Vergleich zu Detergens-solubilisierten Membranproteinen, ein Unterschied in der Aktivität und der Oligomerisierung der Proteine detektiert werden.^{361–363} In vorausgegangenen Arbeiten über die PLA₁ PlaF aus *P. aeruginosa* wurde die biochemischen Charakterisierungen des Proteins in verschiedenen Detergensmizellen durchgeführt.^{263–265}

In dieser Arbeit sollte PlaF in eine natürliche Membranumgebung rekonstituiert und anschließend biochemisch charakterisiert werden. Hiermit sollten putative Effekte, wie Aktivitätsänderungen^{428–430}, Dynamikänderungen^{430, 431} oder eine veränderte Rigidität⁴³² im Vergleich zu Detergens-

solubilisierten Mizellen analysiert werden. Die Etablierung der Rekonstitution für PlaF in SUVs konnte erfolgreich abgeschlossen werden und lieferte durch die Behandlung mit BioBeads einen Restgehalt an Detergens von $\sim 10\%$ (Abbildung 19). Die Rekonstitution für PlaF zeigte dabei einen Proteinverlust von $\sim 28\%$ an (Abbildung 19), der möglicherweise durch ungewünschte Interaktion der hydrophoben TM-Bereiche von PlaF mit den hydrophoben BioBeads zustande kam.

Die biochemische Charakterisierung von rekonstituiertem PlaF in SUVs mit unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung zeigte eine unterschiedlich ausgeprägte Aktivität und Dynamik an (Abbildung 20 / Abbildung 21). Hierbei fiel besonders der zunehmende Anstieg der Aktivität von PlaF in SUVs mit positiv-geladenem, organischem Rest, wie PE und PC, auf. Der neutrale, organische Rest des PG hingegen zeigte einen leicht inhibierenden Effekt auf die PlaF-Aktivität. Die höchste Aktivität von PlaF in den SUVs im 1:1 Verhältnis konnte für DOPE / DOPG gefunden werden, die einer natürlichen Gram-negativen Membranumgebung mit Massenanteilen von 70 % PE, 20 % PG und 10 % CL am nächsten kommt. Hierbei zeigte sich, dass der Einsatz von DOPE auch den normalerweise gezeigten inhibierenden Effekt von PG auf die PlaF-Aktivität kompensieren kann. Mit dem verwendeten *E. coli* TLE (57,5 % PE, 15,1 % PG, 9,8 % CL und 17,6 % unbekannter Komponenten als Massenteile) sollte sich die SUV-Zusammensetzung weiter an eine typische *P. aeruginosa* Membranumgebung mit Massenanteilen von 71,4 % PE, 11,8 % PG, 0,8 % CL, 2,4 % PA, 1,6 % Lyso-phosphatidylethanolamin, 7,9 % PC und 3,9 % LPC anpassen.⁴³³ In Verbindung mit der steigenden Aktivität von PlaF in spezifischen SUVs konnte auch eine stark reduzierte Dimerbildung entdeckt werden (Abbildung 21). In *Crosslinking*-Analysen mit unterschiedlichen *Crosslinkern* konnte gezeigt werden, dass es in SUVs im Vergleich zu Detergens-solubilisiertem PlaF zu keiner bis kaum Dimerbildung kommt. Einerseits könnte dies auf spezifische Interaktionen von PlaF mit den verwendeten Phospholipiden zurückzuführen sein. Andererseits könnte auch eine ausbleibende Ligan-deninteraktion in der putativen Bindetasche für die ausbleibende Dimerisierung verantwortlich gemacht werden.

Für PlaF konnte auf der Basis der 3D-Struktur bereits eine putative Membraninteraktionsdomäne (Aminosäure Asn162 - Leu239) gezeigt werden, die eine hohe Anzahl an positiv-geladenen Aminosäuren (Arg169, Lys179, Arg179, Arg187, Lys194, Lys211, Arg212, Arg217, Arg233, Arg235) und negativ-geladenen Aminosäuren (Glu172, Glu175, Asp176, Glu178, Glu181, Glu190, Asp191, Asp197, Glu216, Glu230) zeigt (Abbildung 32).

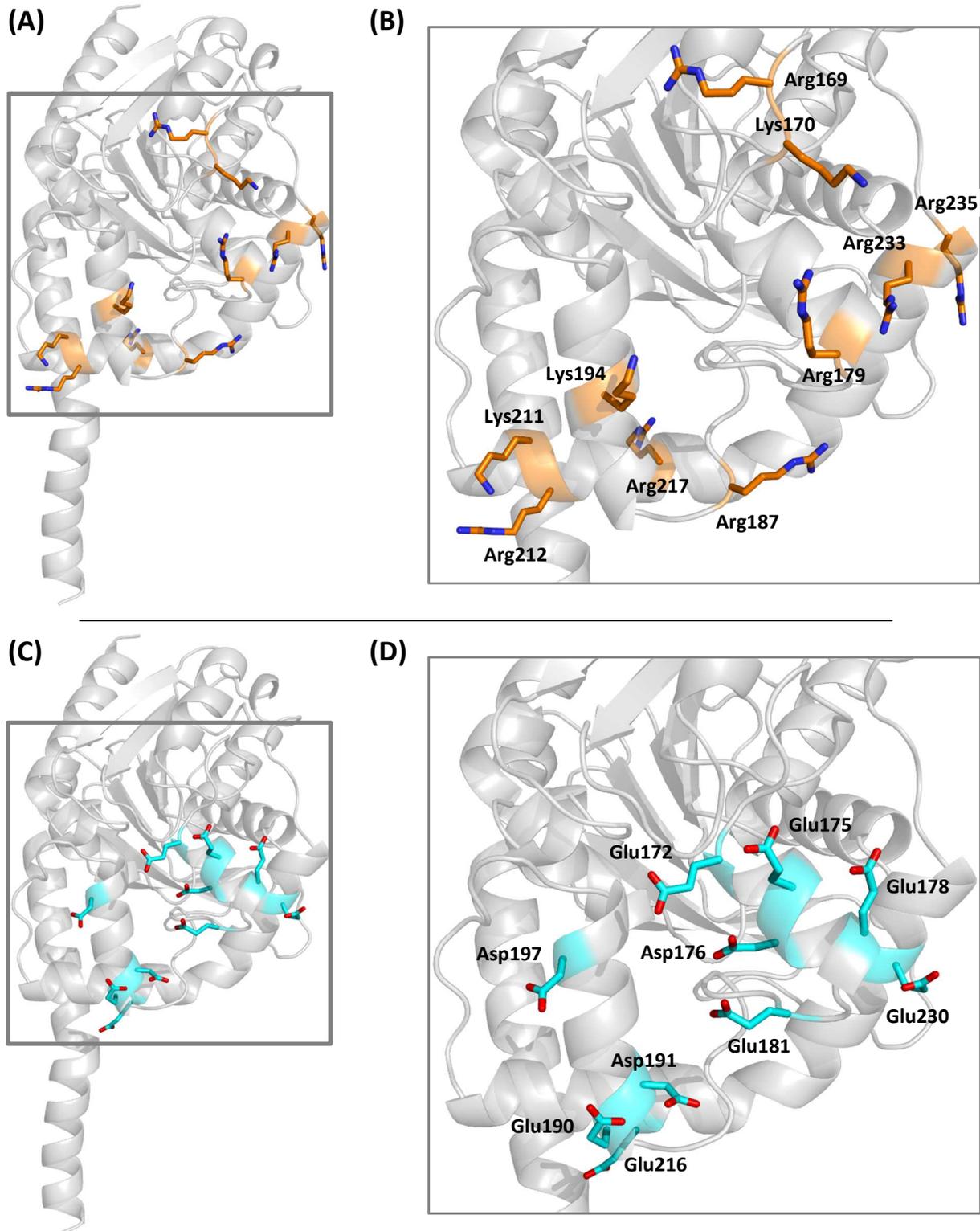


Abbildung 32: Darstellung der geladenen Aminosäure-Seitenketten in der putativen Membraninteraktionsdomäne. Die Struktur (grau, PDB-ID: 6I8W) ist in der Cartoon-Darstellung und die geladenen Aminosäure-Seitenketten als Membraninteraktionspartner, in der Stäbchenform dargestellt. **(A):** Darstellung der Plaf-Gesamtstruktur und der positiv-geladenen Aminosäure-Seitenketten (orange). **(B):** Vergrößerte Darstellung der Membraninteraktionsdomäne des grauen Rahmens aus A. **(C):** Darstellung der Plaf-Gesamtstruktur und der negativ-geladenen Aminosäure-Seitenketten (cyan). **(D):** Vergrößerte Darstellung der Membraninteraktionsdomäne des grauen Rahmens aus C.

Die gesteigerte Aktivität (Abbildung 20) in einer Phospholipidumgebung und die damit verbundene reduzierte Dimerisierung (Abbildung 21) von PlaF belegen hingegen die Hypothese der Regulation der PlaF-Aktivität durch ein dynamisches Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Hierdurch bestätigt sich zudem der mögliche Einfluss von Membranlipiden auf die Regulation der Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF. Der Phospholipid-aktivierende Effekt tritt nur bei den Phospholipiden PE und PC mit positiv-geladenem, organischen Rest auf. Hingegen zeigt sich bei Phospholipiden mit neutralem, organischem Rest keine Aktivierung. Damit wäre eine ionische Interaktion der negativ-geladenen PlaF-Aminosäure-Seitenketten mit den positiv-geladenen, organischen Resten der Phospholipide an der Membranoberfläche denkbar.⁴³⁴ Eine Ausrichtung der Kopfgruppen, wie es z. B. in Eukaryoten mit Cholesterol gefunden wurde, wäre auch für die bakterielle Membran vorstellbar.⁴³⁵ In stark räumlicher Nähe zur Membran befinden sich Arg187, Lys211, Arg212, Arg217 sowie Glu190, Asp191 und Glu216 weshalb diese als putative Interaktionspartner mit der Membran erwartet werden können. Besonders Glu216 scheint eine starke Ausrichtung zur Membran aufzuzeigen und lässt so eine mögliche Interaktion dieser Aminosäure-Seitenkette mit den positiv-geladenen, organischen Resten der Phospholipidkopfgruppen aus PE und PC vermuten. Dies wäre insofern eine Besonderheit, da die typischerweise am häufigsten beschriebenen ionischen Interaktionen aus einem sauren organischen Rest innerhalb der Phospholipid-Kopfgruppe und einer basischen Aminosäure-Seitenketten gebildet werden. Des Weiteren wäre aber auch ein Zusammenspiel aller Ladungen für die Interaktion mit der Membran für die Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF möglich. Anhand von PlaF wurde zuvor ein möglicher *tilting*-Mechanismus zur Anlagerung auf die Membran und anschließender Extraktion und Hydrolyse der Membranlipide beschrieben.²⁶⁵ Die weiter von der Membran abgewandten, geladenen Aminosäure-Seitenketten in der Membraninteraktionsdomäne könnten möglicherweise beim *tilting* des PlaF-Monomers auf die Membran eine Funktion ausüben.²⁶⁵

Innerhalb der Membran können sich charakteristische FMMs in Bakterien bilden, die einen ähnlichen Aufbau zu eukaryotischen *lipid rafts* haben und Einfluss auf den Oligomerisierungszustand sowie die Proteinaktivität haben könnten.^{220, 222} Hierfür würde auch die Interaktion von PlaF mit PA3729, einem Homolog zu humanem Flotillin 2, sprechen³¹⁴, welche bei der Ausbildung von FMMs notwendig sind.²²⁰ Die Ausbildung solcher FMMs konnte bereits mit virulenzassoziierten Prozessen verknüpft werden.^{222, 436, 437} In *B. subtilis* zeigen sich Defekte in der Biofilmbildung und Sporulation durch die Deletion der Flotillin-ähnlichen Proteine FloT und YqfA.^{220, 228} Für *Staphylococcus aureus* konnte durch die Deletion von FloA zusätzlich zum Defekt in der Biofilmproduktion ein Einfluss auf das Typ VII-Sekretionssystem nachgewiesen werden.^{436, 438} Die Deletion von *cj0268c* in *Campylobacter jejuni*, welches für ein Flotillin-ähnliches Protein kodiert, zeigte neben einer verringerten Adhäsion an humane Zellen einen Einfluss auf die über das T3SS vermittelte Virulenz.^{437, 439} In *H. pylori* kommt es, durch die Deletion eines Flotillinhomologs, zur reduzierten

Virulenz, die sich vermutlich auf Effekte im Typ IV-Sekretionssystem zurückführen lässt.⁴⁴⁰ Innerhalb von FMMs lässt sich eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung als in der restlichen Membran vorfinden.

Im Allgemeinen zeigen die FMMs eine geänderte Zusammensetzung im Vergleich zur umgebenen Membran.⁴⁴¹ Für Lipiddoppelschichten ist die Lipidzusammensetzung ein Faktor, der sich auf die Membrandicke auswirkt. Für Membranproteine ist die Membrandicke häufig mit der Länge der TM-Domäne verknüpft. Bei Membranen mit einem schmalen Bereich als die Transmembrandomäne kann es durch *tilting*^{442–444} oder *bending*^{445, 446} zu Konformationsänderungen kommen. Mit spezifischen Phospholipid-Zusammensetzungen innerhalb der FMMs könnte es folglich zu einer Membranverdünnung kommen, die wiederum als Erklärung für den identifizierten *tilting*-Mechanismus des PlaF-Monomers herangezogen werden könnte.²⁶⁵

5.3 Einblicke in die Funktion der putativen Ligandenbindestelle in Bezug auf die intrinsische PlaF-Dimerisierung

Die PLIs als molekulare Erkennung zueinander spielen neben den PPIs eine wichtige Funktion in natürlichen Lebensprozessen.²⁰² Einerseits sind hier die *annular lipids* als bevorzugte Interaktionspartner zu hydrophoben Proteinoberflächen innerhalb eines Membranverbundes zu nennen. Andererseits gibt es, neben niedermolekularen Stoffen, auch *non-annular lipids*, welche als (Phospho-) Lipide spezifisch in Membranproteinkomplexen binden und dort Einfluss auf die biologische Funktion ihres jeweiligen Partnerproteins besitzen können. Hierbei können diese eine Regulation des oligomeren Zustands, der Aktivität oder weitere Proteinrekrutierungen bewirken. Aus diesem Grund ist das Verständnis von PLIs auf molekularer Ebene wichtig, um gezielt solche Interaktionen steuern zu können z. B. bei der Entwicklung neuer Arzneimittel.

Innerhalb der 3D-Struktur von PlaF konnte neben endogenen Fettsäuren ebenfalls das exogene Solubilisierungsmittel OG innerhalb einer T-förmigen, aktiven Bindetasche identifiziert werden.²⁶⁵ Die Fettsäuren könnten als Produkte der hydrolytischen PlaF-Aktivität entstanden sein und als Liganden auf die Struktur-Funktionsbeziehung einwirken und Einfluss auf Aktivität und Dynamik nehmen. Neben der Beibehaltung einer artifiziellen Membranumgebung zum Schutz der TM-Bereiche können Proteine auch mit Detergenzien als Liganden in putativen Bindestellen wechselwirken und als Substitut für natürliche Liganden fungieren.^{208, 255, 256} Für OG konnte strukturell gezeigt werden, dass es in eine Bindetasche eines Na⁺-Symporters bindet, der dadurch eine geblockte Konformation einnimmt.²⁰⁸ Des Weiteren konnte für OG eine vom Partnerprotein-unabhängige Dimerbildung mit dem Nef-Protein aus dem HIV-1 festgestellt werden.²⁵⁶ Die Dimerbildung ist dabei typischerweise an der Aktivierung der Protein-Tyrosinkinasen Hck und der Rekrutierung von AP-2 sowie der Herunterregulierung von CD4-Korezeptoren beteiligt.²⁵⁷ *In vivo* wäre somit eine Ersetzung von OG in der PlaF-Bindestelle durch einen natürlichen Liganden denkbar, der Einfluss auf die Dimerisierung und die Aktivität besitzen könnte. Ein solch stabilisierender Effekt auf Proteindimere

konnte bereits mit einem gebundenen Ca^{2+} -Ion an der Schnittstelle der OMPLA aus *E. coli* gezeigt werden.³⁵⁴ Darüber hinaus konnte bereits dargestellt werden, dass PlaF nur mit OG, aber nicht mit DDM unter den gleichen Bedingungen kristallisiert und somit eine deutlich unterschiedliche Konformation von PlaF in Gegenwart beider Detergenzien indiziert.

Zur Untersuchung der putativen OG-Ligandenbindetasche wurden Mutanten in einem Bereich von 4 Å um den OG-Liganden identifiziert und mutiert (Abbildung 9). Anschließend wurden die generierten *plaF*-Mutanten *in vivo* auf ihre Expressierbarkeit untersucht und lieferten hier bereits unterschiedliche Ergebnisse (Abbildung 10). Nur die Varianten V33A und L206W zeigten eine ausreichende Menge an produziertem Protein, wohingegen die restlichen Varianten keine Detektion anhand der Western Blot-Methode ermöglichen. Offenbar könnte dies aber auch für deren Wichtigkeit innerhalb der Struktur und Faltung von PlaF hindeuten, da ohne die korrekte Aminosäure-Seitenkette keine native Faltung oder Membranlokalisierung vorliegen kann und somit ein Abbau des missgefalteten Proteins erfolgt. Bei der *in vitro*-Charakterisierung der Varianten V33A und L206W konnte für die V33A-Variante eine reduzierte Aktivität ermittelt werden, die mit einem ansteigenden Anteil an PlaF-Dimeren einhergeht (Abbildung 11). Hingegen lieferte die Variante L206W eine leicht gesteigerte Aktivität im Vergleich zum PlaF-Wildtyp. Allerdings bleibt es hier bei einem nahezu gleichbleibenden Dimerlevel (Abbildung 11). Als Effekt für die V33A-Variante lässt sich dahingehend ein verstärkender Effekt auf die spontane Dimerisierung feststellen, wohingegen L206W ein Ausbleiben der dimerisierungsbedingten Aktivitätsminderung zeigt.

Wie bereits zuvor erwähnt, liegt Val33 innerhalb der putativen Ligandenbindetasche des PlaF-Monomers (Abbildung 33) vor. Durch ein ermitteltes Interaktionsnetzwerk zwischen der Val33-Seitenkette über das OG-Molekül und die identifizierten Fettsäuren direkt zum aktiven Zentrum von PlaF wird eine Verknüpfung zur Struktur-Funktionsbeziehung gezogen. Somit scheint die Val33-Seitenkette einen wichtigen Effekt auf die Monomerisierung und damit Aktivität von PlaF zu haben.

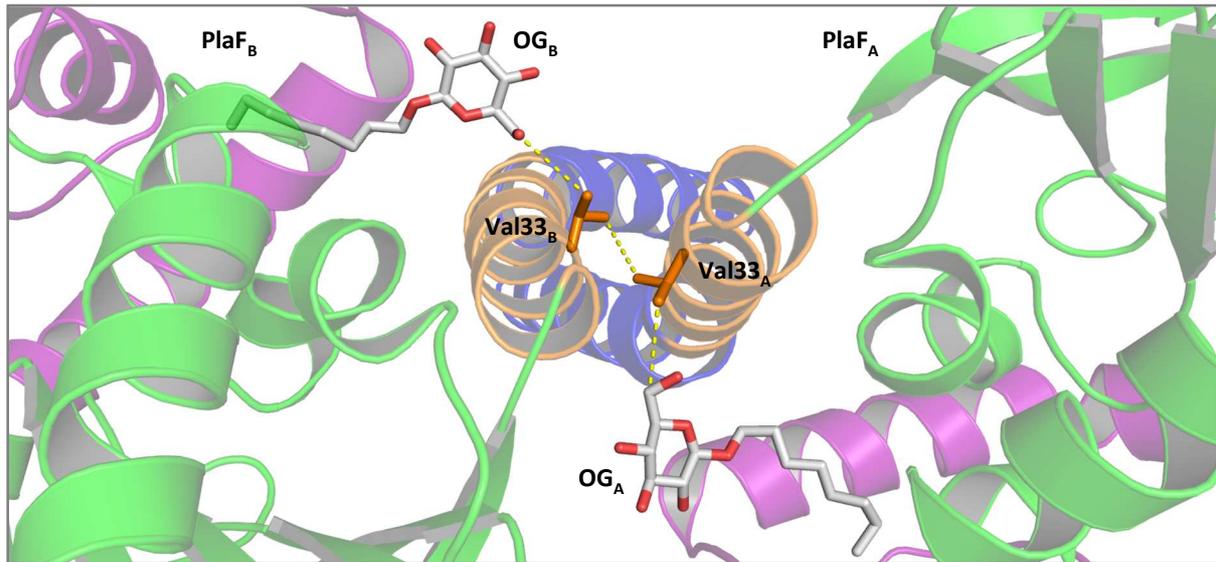


Abbildung 33: Anordnung der Aminosäure Val33 in der 3D-Struktur von PlaF in Verbindung mit den exogenen Liganden OG. Die in der Beschriftung gezeigten Indices A und B beziehen sich auf die Zugehörigkeit zum jeweiligen PlaF-Monomer (PlaF_A und PlaF_B). (PDB-ID: 6I8W)

Für PlaF konnte bereits eine Fettsäure-induzierte Dimerisierung beschrieben werden, die Einfluss auf dessen Aktivität nimmt.²⁶⁵ Innerhalb dieser Arbeit sollte auch näher auf den Einfluss von Fettsäuren und deren Verhalten auf PlaF eingegangen werden. In Thermostabilitätsassays von Fettsäure-inkubiertem PlaF_{D_{DDM}} und Wildtyp-PlaF_{D_{DDM}} konnte bereits ein deutlicher Unterschied von ~ 10 °C ermittelt werden (Abbildung 15). Durch die Zugabe der Fettsäure C10 sinkt die T_{SM} von PlaF auf 47,0 °C im Vergleich zu PlaF ohne vorherige Fettsäure-Zugabe. Dies deutet wiederum auch eine konformationelle Änderung von PlaF_{D_{DDM}} hin. Die Einordnung der PlaF-Inhibierung in den gemischten Inhibierungstyp bestätigt diese Annahme.²⁶⁵ Es konnte bereits dargelegt werden, dass weniger die Kontaktdichte, als mehr die jeweiligen Aminosäurereste Einfluss auf die T_{SM} besitzen. Besonders die Abnahme von hydrophoben Interaktionen und die Zunahme von abstoßenden Ladungskontakten führen zu sinkenden T_{SM} .⁴⁴⁷ Jedoch ist diese T_{SM} noch deutlich über der bei den Aktivitätsmessungen mit *p*NPAS und natürlichen Substraten durchgeführten Temperatur von 30 °C und garantiert somit keinen negativen Einfluss auf die Messungen. Anhand der Absenkung der T_{SM} kann daher angenommen werden, dass es durch die Inkubation mit Fettsäure zu einem destabilisierenden Effekt in PlaF kommt.

Die generierten Varianten V33A und L206W aus der putativen Ligandenbindestelle wurden ebenfalls auf den Effekt der Fettsäure-induzierten Dimerisierung getestet (Abbildung 11). Hier wurden *Crosslinking*-Analysen mit Proben, die mit Fettsäure versetzt wurden, durchgeführt. Die L206W-Variante zeigte hierbei den zu erwartenden Anstieg der Dimerisierung bei vorausgegangener Inkubation mit Fettsäuren. Demgegenüber zeigte die V33A-Variante als Abweichung erneut eine deutliche Reduktion der Dimere bei der zu erwartenden Fettsäure-induzierten Dimerisierung. Dies deutet auf die Wichtigkeit von Val33 bei der Monomerisierung und Dimerisierung für PlaF hin.

Punktuelle Mutationen von Aminosäuren sind vermutlich nicht ausreichend, weshalb ein komplexeres Zusammenspiel mehrerer Faktoren einen Beitrag zur Dimerisierung von PlaF leisten könnte.

5.4 Juxtamembran-Region ist wichtig für die Fettsäure-induzierte Dimerisierung

Die spezifische Homo- und Heterodimerisierung ist ein typischer Kontrollmechanismus für die Proteinfunktion.⁴⁴⁸ Der Mechanismus für einfache TM-Helix durchspannende Proteine ist allerdings häufig auf atomarer Ebene noch wenig erforscht.⁴⁴⁹ Im N-Terminus der PlaF-Struktur wurden die TM-Region und eine JM-Region innerhalb einer geknickten α -Helix entdeckt. In vorausgegangenen Arbeiten konnte bereits ein Zusammenhang dieser α -Helix aus TM-Region und JM-Region mit der Lokalisierung und Aktivität von PlaF durch verschiedene Deletionsvarianten gefunden werden. Neben einer vermuteten Stabilisierung des PlaF-Dimers durch die *coiled-coil* Interaktion der TM-JM-Helix zweier PlaF-Monomere anhand von hydrophoben Interaktionen wurde ebenfalls ein typisches hydrophiles Dimerisierungsmotiv gefunden. Dieses Ser₂₉-X-X-Thr₃₂-Motiv befindet sich in der JM-Region von PlaF und könnte durch Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimerisierung von PlaF beteiligt sein. Diese beiden Aminosäuren galt es anhand von Mutationsanalysen zu untersuchen. Die generierten Varianten S29A und T32A zeigten in Kombination mit vorausgegangener Fettsäure-induzierter Dimerisierung einen zu erwartenden Anstieg der Dimerisierung von PlaF (Abbildung 12). Allerdings belegten die Ergebnisse einen Erhalt der PlaF-Aktivität auf Wildtypniveau für T32A und für S29A sogar eine minimale Aktivitätssteigerung. Die Mutanten S29A und T32A zeigen damit einen inhibierenden Effekt auf die Fettsäure-vermittelte Dimerisierung, welcher sich schematisch durch die Interaktion zwischen mPlaF und Fettsäure in einer Überführung in einen inaktiven Komplex aus PlaF Dimer und Fettsäure darstellen lässt (d-PlaF^{*}:FS).

Für die untersuchten Varianten S29A und T32A kommt es vermutlich ebenso zu einer Komplexbildung aus d-PlaF und Fettsäure, da sie, wie für den Fettsäure-induzierten Effekt, eine Steigerung der Dimerisierung mitbringen. Allerdings scheint hier die dimere Variante eine geänderte Struktur zum einfachen Komplex d-PlaF^{*}:FS auszubilden, da die Aktivität der Varianten auf dem Niveau des wildtypischen PlaF verbleibt. Der Aktivitätserhalt lässt sich möglicherweise mit einer veränderten PlaF-Konformation während der Fettsäure-induzierten Dimerisierung erklären. Neben den bereits ermittelten gemischten Inhibierungskinetiken²⁶⁵ indizieren auch die Thermostabilitätsmessungen einen Unterschied zwischen Fettsäure-induzierter Dimerisierung und intrinsischer Dimerisierung, anhand einer geänderten Konformation in PlaF. Folglich zeigt sich für Ser₂₉ und Thr₃₂ eine Beteiligung an der Fettsäure-induzierten Dimerisierung von PlaF. Diese scheint sich allerdings von der im Gleichgewicht stattfindenden Dimerisierung zu unterscheiden. Beide Aminosäuren fungieren nach den Experimenten somit als putative Interaktionspartner für die Fettsäure und bewirken dessen Dimerisierung im Komplex aus d-PlaF und Fettsäure ohne dessen Inaktivierung.

5.5 Identifikation des Substratzugangstunnels und eines Acyltransferase-Motivs

Für Enzyme ist allgemein bekannt, dass ihre Substrate innerhalb einer aktiven Bindetasche umgesetzt werden. Hierbei unterscheiden sich Enzyme allerdings, wie weit diese aktive Bindetasche an der Oberfläche bzw. im Enzym selbst vergraben liegt.⁴⁵⁰ Letztere sind dabei häufig über Tunnel mit der Enzymperipherie verbunden.⁴⁵¹ Diese beschriebenen Tunnel können als Filter Einfluss auf Substratspezifität und den katalytischen Mechanismus nehmen. Dieser Einfluss wird häufig in der Forschung für das Protein Engineering⁴⁵¹ und das Design von Arzneimitteln benutzt.⁴⁵² Allseits bekannt ist, dass die eigentliche Katalyse eines Proteins oftmals auf eine geringe Anzahl an Aminosäuren reduziert werden kann.⁴⁵³ Allerdings werden häufig nicht katalytisch aktive Aminosäuren ausgelassen, die innerhalb dieser Zugangstunnel zum aktiven Zentrum an der Substratspezifität, der richtigen Orientierung und katalytischen Effizienz involviert sind.⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶ Dies lässt sich gut mit dem vorgeschlagenen Modell „*keyhole-lock-key*“⁴⁵¹ als Ergänzung des „*lock and key*“ Modells von Fischer⁴⁵⁷ beschreiben. Dabei nehmen die als *keyhole* beschriebenen Tunnel Einfluss auf die Enzymaktivität, -spezifität und -stereoselektivität.⁴⁵¹

In Kooperation mit dem Institut für „*Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics*“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf konnten für PlaF vier putative Substratzugangstunnel durch die PlaF-Struktur identifiziert werden (Abbildung 13). Durch *in silico* generierte Vorschläge von Aminosäuren sollten Mutationen innerhalb von PlaF vorgenommen werden, um spezifisch die einzelnen Tunnel zu blockieren und anschließend auf Aktivität zu testen. Hierzu wurde einerseits mit *p*NPB ein kleines artifizielles Substrat von PlaF getestet, um die native Faltung und auf diese Weise dessen allgemeine Aktivität mit bestehender Mutation zu überprüfen (Abbildung 14). Durch die geringe Größe sollte dieses Substrat, trotz möglicher Blockierung des Tunnels, bis in das aktive Zentrum vordringen und bei vorliegender nativer Faltung durch PlaF umgesetzt werden. Hierbei zeigte sich, besonders bei den im Tunnel 2 durchgeführten Mutationen, eine Absenkung der Aktivität von bis zu 30 %. Mit der Einführung von Tryptophan ist die Absenkung möglicherweise durch eine damit einhergehende Strukturanpassung zu erklären. Alle Mutanten der weiteren identifizierten Tunnel wiesen im Vergleich dazu nur Aktivitätsreduzierungen von bis zu 11 % auf. Weiterhin wurde das natürliche PL PG-C12 als natürliches PlaF-Substrat zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt (Abbildung 14). Dieses natürliche Substrat weist, im Vergleich zum vorher getesteten artifiziellem *p*NPB-Substrat, eine deutliche Erhöhung der Größe auf, die wiederum das Passieren der geblockten Tunnel nahezu ausschließen sollte. Mit PG-C12 wurde explizit ein Substrat gewählt, welches im Mittelfeld der Fettsäurelängen liegt, die durch PlaF hydrolysiert werden. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Umsetzung durch eine drastische Veränderung der PlaF-Struktur erfolgte, da charakteristischerweise nur Substrate, die die Mutation erreichen, einen Einfluss auf die Aktivität besitzen.⁴⁵⁸ Die ermittelten Ergebnisse zeigten eine er-

hebliche Reduktion der Aktivität innerhalb aller Mutanten aus Tunnel 2 von bis zu ~ 70 % im Vergleich zum Wildtyp an. Wohingegen alle weiteren Mutanten aus allen anderen Tunneln eine maximale Reduktion von ~ 25 % im Vergleich zum Wildtyp anführten. Für die Bestimmung der Aktivität gegenüber natürlichen Phospholipidsubstraten wurde der NEFA-Assay verwendet, der die Freisetzung von Fettsäuren aus den Substraten detektiert. Einerseits könnte die Aktivitätsreduktion hierbei mit einer möglichen Blockierung des Ausgangstunnels die Freisetzung der Produkte verhindern. Gegen diese Theorie spricht allerdings die deutliche Detektion der freigesetzten Fettsäuren mit dem kleinen artifiziellen Substrat *p*NPB und somit dessen Hydrolyse. Des Weiteren könnte eine ungehinderte Freisetzung von Fettsäuren durch die Hydrolyse möglicherweise durch einen anderen Tunnel gesichert sein. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Tunnel 2 als Substratzugangstunnel für PlaF dient, da durch Blockierung des Tunnels eine Reduktion der freigesetzten Fettsäuren durch Hydrolyse mit einer deutlichen Aktivitätsreduktion einhergeht.

Einen weiteren starken Einfluss auf die beschriebenen Tunnel hat die direkte Proteinumgebung. Proteine innerhalb einer Membrenumgebung zeigen eine veränderte Stabilisierung der zuvor beschriebenen Zugangstunnel zum aktiven Zentrum und somit auch der Substratbindungsspezifität.^{459–461} Die in dieser Arbeit beschriebene Aktivierung von PlaF innerhalb von Phospholipidmembranen (Abbildung 20) könnte deshalb im Zusammenhang mit einer veränderten Tunnelstruktur oder –stabilisierung einhergehen. Eine Inaktivierung von PlaF durch die Dynamik zwischen Monomer und Dimer könnte durch eine veränderte Tunnelstruktur hervorgerufen werden. Erste Indizien geben im *in silico*-Vergleich von m-PlaF und d-PlaF eine Veränderung der vier Tunnel wieder.⁴⁶²

Innerhalb der PlaF-Sequenz konnte zusätzlich mit His₉₀-X-X-X-X-Asp₉₅ ein Acyltransferase-Motiv entdeckt werden, welches in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum der bis dato beschriebenen Phospholipase besteht (Abbildung 34).²⁶⁴ Die räumliche Nähe und das Auffinden eines gleichen Motivs in ABHD6⁴⁶³ könnten einen Hinweis auf eine mögliche Modulation der Membran durch Phospholipidaufbau, neben dem bereits beschriebenen strukturgebenden PL- und Lipidabbau, geben (Abbildung 16 / Abbildung 17). Eine solche bifunktionelle Aktivität aus Lipase- und Acyltransferase-Aktivität konnte bereits in der Pflanze *Arachis hypogaea* gefunden werden und wird auch innerhalb von bakteriellen Organismen durch Sequenzhomologien vermutet.⁴⁶⁴

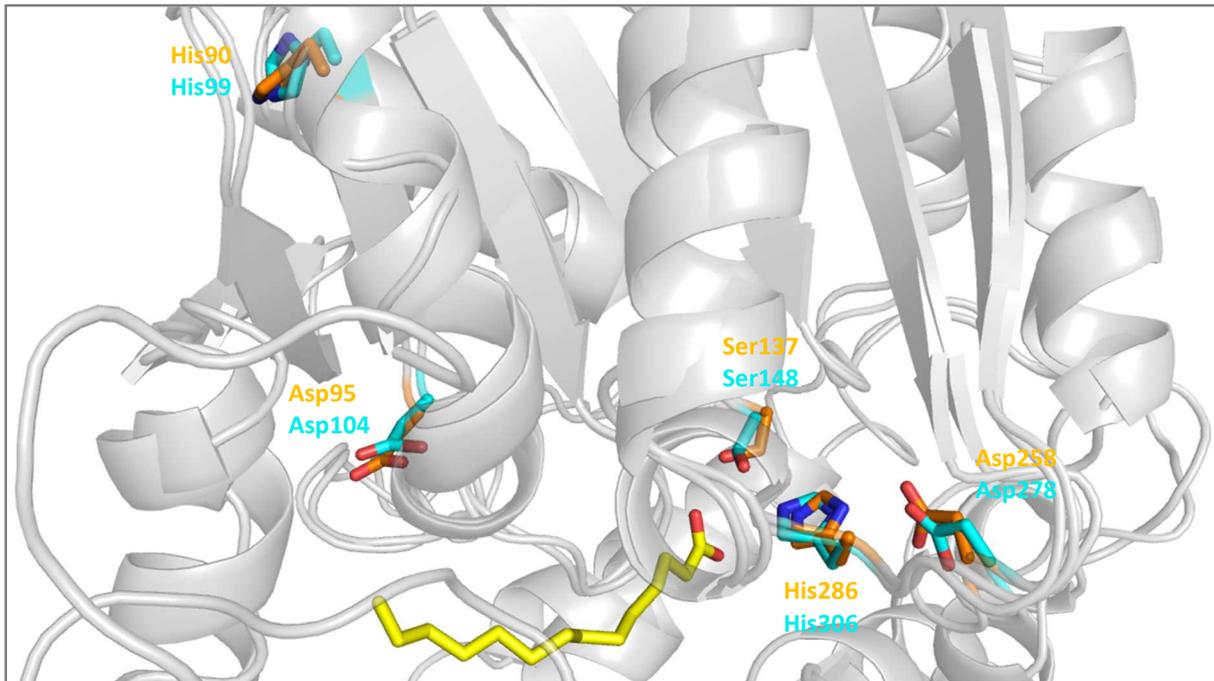


Abbildung 34: Darstellung der katalytischen Triade und dem putativen Acyltransferase-Motiv in PlaF und ABHD6. Mit dem Programm PyMOL wurden PlaF (PDB-ID: 6I8W) und ABHD6 unter Verwendung der „Super“-Funktion überlagert und in der Cartoon-Darstellung gezeigt. Die katalytische Triade Ser137, Asp258, His286 und das putative Acyltransferase-Motiv His90 und D95 aus PlaF (orange) sowie der endogene Ligand Myristinsäure (gelb) sind in Stäbchenform dargestellt. Für ABHD6 erfolgte die Darstellung der katalytischen Triade Ser148, Asp278, His306 und des putativen Acyltransferase-Motivs His99 und Asp104 (cyan) ebenso in Stäbchenform.

Die Substratzugangstunnel können durch *substrate channeling* Einfluss auf die katalytische Rate haben und so auch zwei aktive Zentren im Protein verbinden.⁴⁶⁵ Möglicherweise könnte dies im Falle des Hydrolasemotivs Gly-X-Ser₁₃₇-X-Gly und dem Acyltransferasemotivs His₉₀-X-X-X-Asp₉₅ für PlaF der Fall sein. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass dynamische Helixinteraktionen einen Effekt auf Signalwege zeigen.⁴⁶⁶ Für *Vibrio harveyi* konnte der im QS-System involvierte integrale Membranrezeptor LuxPQ identifiziert werden, der durch Helixdynamik einen Wechsel zwischen Kinase- und Phosphatase-Aktivität vornehmen kann.⁴⁶⁷ Der Aufbau spezifischer PLs durch das verbaute Acyltransferasemotiv in PlaF müsste experimentell noch bestätigt werden, um die Rolle von PlaF in der Membranmodulierung zu unterstreichen. Neben dem Abbau von PLs wäre durch eine vorhandene Acyltransferase-Aktivität von PlaF auch der Aufbau spezifischer PLs denkbar, wodurch ein Einfluss auf Signalwege und die Membranphospholipid-Homöostase unterstrichen werden könnte.

5.6 Biochemischer und physiologischer Vergleich von PlaF mit seinem humanen Homolog ABHD6

Anhand von Sequenzhomologieanalysen konnte mit ABHD6 ein humanes Homolog zu PlaF mit 49 % Sequenzähnlichkeit identifiziert werden.^{264, 270} Zusätzlich zur Primärstruktur konnten Gemeinsamkeiten innerhalb der Sekundär²⁶⁴- und Tertiärstruktur (Abbildung 29) von PlaF zu ABHD6 detektiert werden. Für ABHD6 konnte 2-AG²⁹⁴ und BMP⁴¹⁷ als charakteristische Substrate identifiziert werden, die einen chemisch ähnlichen Aufbau zu den Triacylglyceriden und PLs besitzen, die durch PlaF hydrolysiert werden.²⁶⁵

Damit eine weiterführende biochemische Analyse des Humanhomologs ABHD6 mit der aus *P. aeruginosa* gefundenen PLA₁ PlaF vorgenommen werden konnte, musste eine Expression mit anschließender Reinigung des Proteins für *in vitro*-Analysen etabliert werden. Vorherige Arbeiten hatten bei der Expression von heterologem *abhd6* in *E. coli* BL21(DE3) Probleme durch die Ausbildung von Einschlusskörperchen und der damit einhergehenden geringen Proteinausbeute.²⁷⁷ Des Weiteren konnte dort durch die heterologe Expression nur unzureichend lösliches, aktives Protein erhalten werden.²⁷⁷ Im Rahmen einer Masterarbeit³¹⁶ konnte jedoch eine rekombinante Expression in *E. coli* BL21(DE3) (Abbildung 22) und anschließende Reinigung von ABHD6 erfolgen (Abbildung 23). Hierbei konnte das Protein in ausreichender Menge und in reiner Form erhalten werden. Darüber hinaus konnte die im menschlichen Organismus vorgefundene Membranlokalisierung für heterolog produziertes ABHD6 bestätigt werden (Abbildung 23). Diese ist wichtig, damit das Protein seine nahezu native Faltung durch Interaktion mit PLs beibehält.

Mit ABHD6_{DDM} konnten erste *in vitro*-Charakterisierungen vorgenommen und diese mit PlaF_{DDM} verglichen werden. Zuerst wurde mit PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} Kinetikmessungen durchgeführt (Abbildung 24). Hierbei zeigten sich für beide Enzyme ein Kinetikverlauf nach Michaelis-Menten und zusätzlich eine Produktinhibierung. Die in dieser Arbeit weiter untersuchte Fettsäure-induzierte Dimerisierung geht mit einer Inaktivierung von PlaF einher und ist im Konsens mit der gefundenen Produktinhibierung. Eine alternative Erklärung zur postulierten Produktinhibierung ist eine mögliche *interfacial activation* von PlaF durch die Überschreitung der kritischen Mizellkonzentration (k_{mk}) für pNPH. Hierfür konnte bereits das Absinken der Proteinaktivität bei Substrateinsatz über der k_{mk} gezeigt werden.⁴⁶⁸ Die k_{mk} müsste jedoch für die Bedingungen des in dieser Arbeit durchgeführten Experimentes ermittelt werden.

Im weiteren Verlauf wurde ein Vergleich der Substratprofile beider Proteine durch biochemische Charakterisierungen angestrebt (Abbildung 25). Das Spektrum der Substrate erstreckte sich dabei über typische ABHD6-Substrate (2-AG, BMP) sowie MAGs (1-LG, 1-SG, 1-OG). Bis auf BMP wurden diese Substrate bereits auf hydrolytische Spaltung in *abhd6*-exprimierender humaner Zellkultur untersucht.²⁹⁵ Zusätzlich dazu wurden mit LysoPLs (LPG14, LPE14, LPG18, LPE18) und PLs (PG14, PE14, PG18, PE18) typische PlaF-Substrate untersucht. Hierbei konnten alle Substrate *in vitro* durch beide Proteine gespalten werden. Dabei zeigte ABHD6_{DDM} bei allen Substraten eine höhere

Aktivität als sein Vergleichsprotein PlaF_{DDM}. Anhand dieser Daten konnte die bereits für einige Substrate beschriebene *in vivo*-Aktivität²⁹⁵ auch *in vitro* bestätigt werden. Für PlaF zeigt sich hier ein großes hydrolytisches Spektrum, welches gut in Einklang mit dessen Rolle in der Membranadaptation zu bringen ist. Mit der durchgeführten Analyse des Substratspektrums lässt sich dahingehend ein ähnliches Substratprofil für ABHD6 und PlaF vermuten.

Mit den Gemeinsamkeiten innerhalb der Struktur, Lokalisierung und einem ähnlichen *in vitro*-Substratprofil zwischen ABHD6_{DDM} und PlaF_{DDM} stellt sich somit die Frage, ob ABHD6 *in vivo* die Funktion von PlaF in einem *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm komplementieren kann. Bis dato konnte für die PlaF-vermittelte Virulenz eine Beteiligung an der frühen Phase der Biofilmentwicklung mit einer irreversiblen Anheftung der Zellen an Oberflächen detektiert werden.^{265, 469} Des Weiteren konnte bereits ein Zusammenhang zwischen reduzierter, Flagellar-vermittelter Schwimmbeweglichkeit und verminderter Virulenz in der *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Mutante gezogen werden.²⁶⁵ Aus diesem Grund wurde die Schwimmbeweglichkeit (Abbildung 26) und Biofilmproduktion (Abbildung 27) einer *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm mit *abhd6*-Expressionsplasmid in Relation zum Wildtypstamm untersucht. Die bakterielle Fortbewegung der Zellen wird typischerweise durch zelluläre Anhänge wie den Typ-IV Pili und Flagellen ermöglicht. Chemoattraktoren und Repellentien sind dabei häufig für die gezielte Steuerung des Bakteriums zu vorteilhaften Umgebungen vorzufinden.³⁶⁶ Für *P. aeruginosa* konnte im Vergleich zu anderen Bakterien nur ein polares Flagellum gezeigt werden. Neben weiteren Faktoren sind solche Chemotaxis-assoziierten Anhänge häufig mit der bakteriellen Virulenz verbunden.^{71, 367, 368} Die Ergebnisse zur Schwimmbeweglichkeit konnten innerhalb einer Masterarbeit zum ersten Mal identifiziert und anhand von eigenen Daten erneut gestützt werden.³⁶⁹ Die Komplementierung von PlaF durch ABHD6 im *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm im Hinblick auf die Schwimmbeweglichkeit lieferte signifikante Unterschiede innerhalb der Schwimmdurchmesser des komplementierten Deletionsstammes zum nicht-komplementierten Deletionsstamm (Abbildung 26). Hierbei wird ersichtlich, dass die PlaF-Funktion durch Plasmid-basierte Komplementierung durch ABHD6 im *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm hinsichtlich der Schwimmbeweglichkeit bis zu einem gewissen Grad übernommen werden kann. Viele pathogene Bakterien, wie z. B. *P. aeruginosa*, können von einem planktonischen zu einem Biofilm-Lebensstil wechseln. Letzterer zeichnet sich dabei durch einen sesshaften Zustand der Zellen aus, welche sich in extrazelluläre Polymersubstanzen einlagern, um zu überleben und exogene Umweltveränderungen auszuhalten.⁷¹ Der exakte, molekulare Mechanismus zur Kontrolle der Biofilmproduktion in *P. aeruginosa* ist bis dato nicht gänzlich geklärt. Es ist bekannt, dass der Wechsel zum Biofilm-Lebensstil von einem regulatorischen Netzwerk aus Zweikomponentensystem, QS, zyklischem Diguanylat und Sigmafaktor-Signalwegen kontrolliert wird.³⁶⁹ Die Komplementierung von PlaF durch ABHD6 im *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stamm im Hinblick auf die Biofilmproduktion lieferte keine signifikanten Unterschiede zum nicht-komplementierten Deletionsstamm (Abbildung 27). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ABHD6 nicht die Funktion von PlaF innerhalb der Produktion von Biofilm

ausführen kann. Möglicherweise lässt sich die ausbleibende Komplementierung des Biofilms durch ein komplexeres Faktorenzusammenspiel als bei der Schwimmbeweglichkeit erklären.

Viele bis dato bekannte bakterielle und die Plasmamembran-durchspannende Proteine besitzen eine α -helikale Struktur³⁷⁰ und sind an biologischen Prozessen in Bakterien und Eukaryoten durch Dimerisierung beteiligt.^{5, 19} Dimerisierung zeigt sich typischerweise als regulativer Mechanismus, um bspw. Rezeptor-Tyrosinkinasen³⁷¹ oder Transkriptionsregulatoren³⁷² an- oder abzuschalten. Für PlaF konnte eine Struktur-Funktionsbeziehung über das inaktive Dimer und das aktive Monomer beschrieben werden.²⁶⁵ Die Lokalisierung von ABHD6 wurde als integrales Membranprotein über eine einzelne TM-Domäne innerhalb der postsynaptischen Zelle beschrieben.²⁹⁴ Für ABHD6 ist allerdings keine Struktur-Funktionsbeziehung, wie sie bspw. in PlaF vorzufinden ist, beschrieben. Deshalb sollte ein mögliches Oligomerisierungsverhalten von ABHD6 durch *Crosslinking*-Analyse untersucht werden (Abbildung 28). Die Ergebnisse zeigten keine bis kaum Dimerisierung oder Oligomerisierung für ABHD6 an und somit ein geändertes Dimerisierungsverhalten im Vergleich zu PlaF. Des Weiteren konnte in humanen Zellexperimenten eine Hypothese aufgestellt werden, dass ABHD6 nicht als TM-Protein in der Membran verankert vorliegt, sondern durch die Interaktion von ABHD6 mit dem C-Terminus des Glutamatrezeptors GluA1 nur an die Membran rekrutiert wird.³⁰² Eine alleinige Rekrutierung von ABHD6 zur Membran über zuvor genannte Interaktionen ist unwahrscheinlich, da sowohl in vorausgegangenen Arbeiten³⁶⁴ als auch in dieser Arbeit Detergentsolubilisierung eingesetzt wurde, um *in vitro* aktives ABHD6 zu erhalten. Dies indiziert ABHD6 somit als integrales oder mindestens peripheres Membranprotein.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob dieser gefundene Regulationsunterschied zwischen ABHD6 und PlaF durch ein verändertes Dimerisierungsverhalten möglicherweise auf struktureller Ebene belegbar sei. Obwohl ABHD6 als attraktives Target für Arzneimittel identifiziert wurde, konnte bisher keine 3D-Proteinstruktur erhalten werden, die als Schlüsselfunktion für weitere biochemische und *in silico*-Analysen verwendet werden könnte. In Zusammenarbeit mit dem Institut „*Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics*“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf konnten zwei mögliche ABHD6-Modellstrukturen erhalten werden. Die erste wurde über die ABHD6-Primärsequenz anhand der PlaF-Struktur erstellt und fand im Rahmen einer Masterarbeit in der Analyse Anwendung.³¹⁶ Die zweite ABHD6-Modellstruktur wurde über das Programm TopModel³⁷⁶ hergestellt und mit der vorhandenen 3D-Struktur von PlaF überlagert (Abbildung 29). Innerhalb der modellierten ABHD6-Struktur lag der N-terminale Bereich komplett unstrukturiert vor und belegt somit keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinstrukturen. Hingegen befindet sich dort in der PlaF-Struktur, die aus TM- und JM-Bereich bestehende α -Helix, die als putative Dimerisierungsdomäne fungiert.²⁶⁵ Für ABHD6 konnte bereits dokumentiert werden, dass es seine Funktion auch in verkürzter Form mit einer Deletion der Aminosäuren 1 - 37 beibehält und somit keinen Effekt auf die katalytische Aktivität besitzt.²⁷⁷ Diese beschriebenen Unterschiede könnten ein möglicher Anhaltspunkt für eine ausbleibende bis veränderte Dimerisierung von ABHD6 im Gegensatz zu PlaF sein (Abbildung 28). Darüber hinaus wurden mit der

Fettsäurebindetasche, der putativen Ligandenbindetasche und dem aktiven Zentrum drei spezifische Regionen innerhalb der Enzyme strukturell verglichen (Abbildung 30). Für die Fettsäurebindetasche konnte teilweise neben ausgetauschten Aminosäuren auch eine geänderte Ausrichtung der Aminosäuren im Vergleich zu PlaF identifiziert werden. Allerdings ließ sich allgemein ein niedriger RMSD_{all} ermitteln, der die Hydrolyse von ähnlichen Substraten vermuten lassen würde. Diese Ergebnisse standen zudem auch im Zusammenhang mit den analysierten Substratprofilen (Abbildung 25), die für beide Enzyme eine hydrolytische Umsetzung der Substrate mit teilweise veränderter Aktivitätsstärke abbildeten. Innerhalb der putativen Ligandenbindestelle stellten sich stärkere Änderungen der Aminosäuren in deren Auswahl und sterischer Ausrichtung dar. Besonders die in PlaF vorgefundenen Proline Pro204 und Pro205, die innerhalb von Strukturen als Helixbrecher fungieren und somit grundlegende strukturelle Gegebenheiten vermuten lassen, liegen in ABHD6 als Phe222 und Lys223 vor. Dies lässt sich möglicherweise erneut mit der ausbleibenden bis veränderten Dimerisierung von ABHD6 verknüpfen, da für die putative Ligandenbindetasche von PlaF eine Struktur-Funktionsbeziehung vermutet wird. Möglicherweise spielt die Dimerisierung für die Biofilmentwicklung eine entscheidende Rolle, weshalb ABHD6 nicht in der Lage ist, den *P. aeruginosa* ΔplaF -Stamm zu komplementieren (Abbildung 27). Beim Vergleich innerhalb der katalytischen Domäne ergaben sich nur geringe Strukturunterschiede zwischen PlaF und ABHD6 (Abbildung 29). Für das katalytische Ser148 (ABHD6) konnte eine um 90° gedrehte Seitenkettenorientierung im Vergleich zu Ser137 (PlaF) detektiert werden. Innerhalb der ermittelten 3D-Struktur konnten für Ser137 zwei verschiedene Konformationen der Seitenketten mit $\sim 180^\circ$ zueinander gelöst werden. Hierbei zeigte allerdings nur eine Ausrichtung die passenden Interaktionen zu Substrat und dem Rest der katalytischen Triade.²⁶⁵ Möglicherweise könnte diese geänderte Konformation mit einer leicht unterschiedlichen Struktur der Bindetasche und somit verschiedenen Substraten einhergehen. Andererseits könnte durch eine ausbleibende PPI oder PLI das ABHD6 in einer inaktiven Form verweilen. Alles in allem untermauern die Ergebnisse das ähnliche Substratprofil beider Proteine (Abbildung 25) und die Komplementierung der Schwimmbeweglichkeit (Abbildung 26) der *P. aeruginosa* ΔplaF -Mutante durch ABHD6.

Für die Regulation der ABHD6-Aktivität ist bislang kein Mechanismus beschrieben worden. Innerhalb dieser Arbeit konnte eine Regulation durch Oligomerisierung oder Dimerisierung, wie im Falle von PlaF, ausgeschlossen werden (Abbildung 28). Allerdings konnte für PlaF_{SUV} innerhalb dieser Arbeit ein Phospholipid-aktivierender Effekt detektiert werden, dessen Stärke sich nach der Ladung des organischen Rests innerhalb der Phospholipid-Kopfgruppe richtet (Abbildung 20). Dieser aktivitätsregulierende Effekt durch Protein-Lipid-Interaktionen sollte für ABHD6_{SUV} ebenfalls analysiert werden. Für PlaF_{SUV} konnte durch den Phospholipid-aktivierenden Effekt des *E. coli* TLE eine Aktivitätssteigerung um das $\sim 1,9$ -fache detektiert werden (Abbildung 31). Des Weiteren konnte für ABHD6_{SUV} durch Protein-Lipid-Interaktionen ein Phospholipid-aktivierender Effekt mit *E. coli* TLE ermittelt werden, der sich in einer Steigerung der Aktivität von $\sim 3,5$ zu ABHD6_{DDM} darstellt (Abbildung 31). Möglicherweise könnte dieser Phospholipid-aktivierende Effekt für ABHD6_{SUV}

noch stärker in einer eukaryotischen statt einer prokaryotischen Membranumgebung ausfallen. Somit wäre eine mögliche Struktur-Funktionsbeziehung durch FMMS für PlaF_{SUV} im Fall von ABHD6_{SUV} durch eukaryotische *lipid rafts* denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* ist ein opportunistisches Humanpathogen und ist an einer Vielzahl von krankenhausassoziierten Infektionen von immunsupprimierten Patienten beteiligt. Die WHO stufte *P. aeruginosa* in einer aktuellen Studie in die Risikogruppe 1, mit dringendem Handlungsbedarf in der Erforschung und Entwicklung von Antibiotika, ein. Eine entscheidende Eigenschaft für die Virulenz und Pathogenität des Bakteriums ist sein Arsenal an Virulenzfaktoren, welches die Invasion in die Wirtszelle oder eine erfolgreiche Interaktion mit der Wirtszelle ermöglicht. Auf Grund dessen erlangen diese Virulenzfaktoren immer größere Bedeutung in der Erforschung als alternative Angriffspunkte für Antibiotika.

Das im Genom von *P. aeruginosa* vorgefundene Gen *pa2949* kodiert für eine PLA₁, die mit PlaF betitelt wurde und einen signifikanten Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums aufweist. Mutagenitätsanalysen innerhalb der TM-Helix, JM-Region und der innerhalb von PlaF befindlichen Tunnel lieferten Daten zur Struktur-Funktionsbeziehung von PlaF. Somit zeigte sich besonders für die Variante V33A der TM-Helix ein Einfluss auf die Aktivität und gleichzeitig auf den oligomeren Zustand von PlaF. Für die Varianten der JM-Region konnte eine Beteiligung der Aminosäuren Ser29 und Thr32 an der Fettsäure-induzierten Dimerisierung gezeigt werden. Mit Hilfe von Mutanten innerhalb der Tunnel der PlaF-Struktur konnte der Substratzugangstunnel in das aktive Zentrum von PlaF identifiziert werden.

Weiterhin konnte das lipolytische Profil von PlaF um natürliche Substrate erweitert werden. Hierzu gehört die Hydrolyse neutraler Lipide, den MAGs und DAGs, mit unterschiedlichen Fettsäure-Kettenlängen. Außerdem konnte Hydrolyseaktivität von struktur- und signalgebenden Lipiden wie BMP, HBMP, CL und DOPE für PlaF identifiziert werden. Diese Daten stützen die vermutete Beteiligung von PlaF in der Membranphospholipid-Homöostase oder als Modulator von FMMS.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Rekonstitution von PlaF in SUVs etabliert und erste Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Aktivierung von PlaF in einer Phospholipidumgebung im Vergleich zu Detergens-solubilisiertem PlaF. Des Weiteren wurden spezifisch die positivgeladenen, organischen Reste innerhalb der Kopfgruppen von PC und PE gefunden, die unterschiedlich starke Phospholipid-aktivierende Effekte auf PlaF in SUVs lieferten. Für PG, mit einem neutralen, organischen Rest innerhalb der Phospholipidkopfgruppe, konnte hingegen kein aktivierender Effekt durch die Phospholipidumgebung detektiert werden. Zudem wurde PlaF in SUVs aus einem *E. coli* TLE rekonstituiert, um das Verhalten von PlaF in einer typischen Gram-negativen Membran nachzuempfinden. Auch das komplexe Zusammenspiel verschiedenster Lipide innerhalb dieser SUVs lieferte eine Aktivierung von PlaF_{SUV}. Zusätzlich zum entdeckten Phospholipid-aktivierenden Effekt auf PlaF konnte eine verringerte Dimerisierung von PlaF_{SUV} im Vergleich zu PlaF_{DDM} ermittelt werden.

Durch Sequenzhomologien konnte in vorausgegangenen Arbeiten mit ABHD6 ein humanes Homolog zu PlaF aus *P. aeruginosa* mit einer Sequenzähnlichkeit von 49 % ermittelt werden. Dieses gehört, ebenso wie PlaF, zur Proteinfamilie der α,β -Hydrolasen und ist im intrazellulären Vesikeltransport, dem Energie- und Lipidmetabolismus sowie als Regulator im Endocannabinoid-Signalweg beteiligt. Während dieser Arbeit wurde anhand von biochemischen *in vitro*-Charakterisierungen und *in vivo*-Untersuchungen ein Vergleich von PlaF mit seinem Humanhomolog durchgeführt. Hierzu wurde zu Beginn eine heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) und anschließende Reinigung von ABHD6 etabliert sowie die Membranlokalisierung bestätigt. Beim Vergleich der Enzymkinetik konnte für beide Proteine ein Michaelis-Menten-Verlauf mit einer Produktinhibierung detektiert werden. Auf Grund der beschriebenen Gemeinsamkeiten wurde innerhalb dieser Arbeit eine Plasmid-basierte Komplementierung des *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stammes vorgenommen und im Hinblick auf seine Biofilmproduktion und Schwimmbeweglichkeit des Bakteriums mit dem Wildtyp *P. aeruginosa* hin untersucht. Die im Deletionsstamm typische reduzierte Biofilmproduktion konnte durch ABHD6 nicht komplementiert werden. Die reduzierte Schwimmbeweglichkeit des Deletionsstammes konnte durch die Komplementierung mit ABHD6 wiederum in gewissem Ausmaß wiederhergestellt werden. Außerdem konnte in weiteren Versuchen ein überlappendes Substratprofil zwischen PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM} identifiziert werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proteinen wurde durch eine nahezu ausbleibende Dimerisierung von ABHD6_{DDM} im Gegensatz zu PlaF_{DDM} detektiert. Um diesen Unterschied auch auf struktureller Ebene weiter zu erforschen, wurde in Kooperation mit dem Institut „Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eine modellierte ABHD6-Struktur mit dem Programm TopModel erstellt. Die Überlagerung beider Strukturen zeigte innerhalb der katalytischen Domäne einen RMSD_{all} von 0,8 Å, wohingegen sich der N-terminale Bereich von ABHD6 drastisch von der TM-Region von PlaF unterschied. Beim Vergleich der Aktivitäten beider Proteine in SUVs konnte für ABHD6_{SUV} ebenfalls ein Phospholipid-aktivierender Effekt identifiziert werden. Die Aktivitätssteigerungen lagen dabei bei $\sim 1,9$ (PlaF_{SUV}) und $\sim 3,5$ (ABHD6_{SUV}) im Vergleich zu ihren Detergens-solubilisierten Gegenstücken PlaF_{DDM} und ABHD6_{DDM}.

7 SUMMARY

The Gram-negative bacterium *P. aeruginosa* is a human pathogen, which is involved in a variety of hospital-associated infections of immunosuppressed patients. Recently, the WHO classified *P. aeruginosa* into the risk group 1, with an urgent need for action in the research and development of antibiotics. A decisive property for the virulence and pathogenicity of the bacterium is its arsenal of virulence factors, which enables the invasion into the host cell or a successful interaction with the host cell. Because of this, virulence factors are becoming increasingly important as alternative targets for antibiotics.

The gene *pa2949* of *P. aeruginosa* encodes a phospholipase A1, which has been named PlaF and was shown to have a significant influence on the virulence of the bacterium. Mutational analysis within the TM helix, JM region and the tunnels within PlaF_{DDM}, provided data on the structure-function relationship of PlaF. Especially for the mutant V33A of the TM-helix, an influence on the activity and at the same time on the oligomeric state of PlaF_{DDM} was shown. Furthermore, the involvement of the amino acids Ser29 and Thr32 from the JM-region in the fatty acid-induced dimerization was suggested.

Mutational analysis aimed to block the substrate binding tunnels of PlaF_{DDM}, revealed tunnel 2 as the access tunnel for the substrate delivery. Furthermore, the lipolytic profile of PlaF_{DDM} could be expanded to different natural substrates. This includes the hydrolysis of neutral lipids of MAGs and DAGs with different fatty acid chain lengths. Additionally, hydrolase activity on structural and signaling lipids such as BMP, HBMP, CL and DOPE for PlaF were identified, too. These data support the postulated role of PlaF in membrane phospholipid homeostasis or as modulator of FMMs.

Within this thesis, the reconstitution of PlaF in SUVs was established and first biochemical investigations were carried out. These results revealed an activation of PlaF in phospholipid vesicles in comparison to detergent-solubilized PlaF. Furthermore, the positively charged organic residues within the head groups of PC and PE containing SUVs could be identified specifically as activators of PlaF activity. For PG, with a neutral organic residue, no activating effect from the phospholipid environment could be detected. Furthermore, PlaF was reconstituted in SUVs comprised of an *E. coli* total lipid extract in order to investigate the behaviour of PlaF in a typical Gram-negative membrane. The complex interaction of different lipids within these SUVs also provides an activation of PlaF. In addition to the discovered phospholipid-activating effect on PlaF, a reduced dimerization of PlaF_{SUV} compared to PlaF_{DDM} could be determined.

By sequence homology analysis, ABHD6 was identified as the human homolog of PlaF from *P. aeruginosa* with sequence similarity of 49 %. Like PlaF, it is a member of the α,β -hydrolase protein family and is involved in intracellular vesicle transport, energy- and lipid-metabolism and as a regulator in the endocannabinoid signaling pathway. In this thesis, a comparison of PlaF with ABHD6 was carried out on the basis of biochemical *in vitro* characterizations and *in vivo* investigations.

For this, a procedure for heterologous expression in *E. coli* BL21(DE3) with subsequent purification of ABHD6 was established and its membrane localization was confirmed. While comparing the enzyme kinetics, a Michaelis-Menten kinetic with product inhibition could be detected for both proteins. Due to the similarities described, plasmid-based complementation of the *P. aeruginosa* Δ *plaF* mutant strain was carried out within this thesis and examined with regard to its biofilm production and swimming mobility of the bacterium with the wild type *P. aeruginosa*. The reduced biofilm production, which is typical of the *P. aeruginosa* Δ *plaF* strain, could not be complemented by *abhd6* expression. The reduced swimming motility of the *P. aeruginosa* Δ *plaF* strain could partially be restored by complementing it with *abhd6* expression.

In addition, an overlapping substrate profile between PlaF and ABHD6 was identified in further experiments. A significant difference between the two proteins could be detected by an almost absent dimerization of ABHD6 in comparison to PlaF. To further investigate this difference on a structural level, a modeled ABHD6 structure was created with the program TopModel in cooperation with the institute "Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics" (HHU Düsseldorf). The superposition of both structures showed an RMSD_{all} of 0.8 Å within the catalytic domain, whereas the N-terminal region of ABHD6 differs drastically from the TM-region of PlaF. When comparing the activities of both proteins in SUVs, a phospholipid-activating effect could be identified for ABHD6_{SUV} as well. The increase in activity was ~ 1.9 and ~ 3.5 for PlaF_{SUV} and ABHD6_{SUV} compared respectively to their detergent-solubilized counterparts PlaF_{DDM} and ABHD6_{DDM}.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. N. J. Palleroni, *Pseudomonas* classification: A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 231–251 (1994).
2. G. J. Olsen, C. R. Woese, R. Overbeek, The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**, 1–6 (1994).
3. S. Mahajan-Miklos, L. G. Rahme, F. M. Ausubel, Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* **37**, 981–988 (2000).
4. NNIS System, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* **32**, 470–485 (2004).
5. C. V. Delden, B. H. Iglewski, Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 10 (1998).
6. G. P. Bodey, R. Bolivar, V. Fainstein, L. Jadeja, Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* **5**, 279–313 (1983).
7. A. Cross, *et al.*, Nosocomial Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*: Review of Recent Trends. *Clin. Infect. Dis.* **5**, S837–S845 (1983).
8. P. Richard, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in a Burn Unit: Role of Antimicrobials in the Emergence of Multiply Resistant Strains. *J. Infect. Dis.* **170**, 377–383 (1994).
9. B. A. Pruitt, A. T. McManus, S. H. Kim, C. W. Goodwin, Burn Wound Infections: Current Status. *World J. Surg.* **22**, 135–145 (1998).
10. P. Gacesa, Bacterial alginate biosynthesis - recent progress and future prospects. *Microbiology* **144**, 1133–1143 (1998).
11. R. E. W. Hancock, D. P. Speert, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Updat.* **3**, 247–255 (2000).
12. S. P. Conway, K. G. Brownlee, M. Denton, D. G. Peckham, Antibiotic Treatment of Multidrug-Resistant Organisms in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Med.* **2**, 321–332 (2003).
13. G. Rukholm, C. Mugabe, A. Azghani, A. Omri, Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time–kill study. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**, 247–252 (2006).
14. M. Bassetti, E. Righi, C. Viscoli, *Pseudomonas aeruginosa* Serious Infections: Mono or Combination Antimicrobial Therapy? *Curr. Med. Chem.* **15**, 517–522 (2008).
15. J. H. Carr, Centers for Disease Control and Prevention’s Public Health Image Library (PHIL). *Details - Public Health Image Libr.* (<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10043>) (January 6, 2020).
16. C. K. Stover, *et al.*, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
17. D. L. Erickson, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Systems May Control Virulence Factor Expression in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis. *Infect. Immun.* **70**, 1783–1790 (2002).
18. G. Girard, G. V. Bloemberg, Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* **3**, 97–106 (2008).
19. E. Tacconelli, *et al.*, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 318–327 (2018).
20. K.-E. Jaeger, *et al.*, Bacterial lipases for biotechnological applications. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **3**, 3–12 (1997).
21. N. Jamil, N. Ahmed, Production of biopolymers by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine source. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **51**, 457–464 (2008).
22. M. E. Valentine, *et al.*, Generation of a highly attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* for commercial production of alginate. *Microb. Biotechnol.*, 162–175 (2019).

23. W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg, Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 7 (1994).
24. J. P. Pearson, L. Passador, B. H. Iglewski, E. P. Greenberg, A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1490–1494 (1995).
25. E. C. Pesci, *et al.*, Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11229–11234 (1999).
26. J. Lee, *et al.*, A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 339–343 (2013).
27. L. S. Havarstein, G. Coomaraswamy, D. A. Morrison, An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11140–11144 (1995).
28. G. Ji, R. C. Beavis, R. P. Novick, Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 12055–12059 (1995).
29. J. A. Hoch, T. J. Silhavy, Eds., *Two-component signal transduction* (ASM Press, 1995).
30. P. Williams, *et al.*, Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes: Bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 161–167 (1992).
31. U. A. Ochsner, J. Reiser, Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 6424–6428 (1995).
32. H. Cao, *et al.*, A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14613–14618 (2001).
33. J. Engebrecht, M. Silverman, Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4154–4158 (1984).
34. R. Magnuson, J. Solomon, A. D. Grossman, Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* **77**, 207–216 (1994).
35. E. V. Pestova, L. S. Havarstein, D. A. Morrison, Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* **21**, 853–862 (1996).
36. D. G. Davies, *et al.*, The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**, 295–298 (1998).
37. L. Passador, J. Cook, M. Gambello, L. Rust, B. Iglewski, Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**, 1127–1130 (1993).
38. E. C. Pesci, J. P. Pearson, P. C. Seed, B. H. Iglewski, Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**, 3127–3132 (1997).
39. J. M. Brint, D. E. Ohman, Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177**, 7155–7163 (1995).
40. K. Winzer, P. Williams, Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 131–143 (2001).
41. A. Latifi, M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, A. Lazdunski, A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* **21**, 1137–1146 (1996).
42. J. P. Pearson, E. C. Pesci, B. H. Iglewski, Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756–5767 (1997).
43. F. Bredenbruch, *et al.*, Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines. *J. Bacteriol.* **187**, 3630–3635 (2005).

44. S. P. Diggle, *et al.*, The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR: PQS regulation of *rhl*-dependent phenotypes. *Mol. Microbiol.* **50**, 29–43 (2003).
45. P. Nadal Jimenez, *et al.*, The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 46–65 (2012).
46. J. Lee, L. Zhang, The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **6**, 26–41 (2015).
47. T. de Kievit, Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlII* regulation. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**, 101–106 (2002).
48. Y. Deng, J. Wu, F. Tao, L.-H. Zhang, Listening to a New Language: DSF-Based Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Chem. Rev.* **111**, 160–173 (2011).
49. Y.-W. He, L.-H. Zhang, Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 842–857 (2008).
50. S. D. Ahtor, L. Zhang, Small Is Mighty—Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, 559–578 (2019).
51. L. K. Nelson, G. H. D’Amours, K. M. Sproule-Willoughby, D. W. Morck, H. Ceri, *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems are important for infection and inflammation in a rat prostatitis model. *Microbiology* **155**, 2612–2619 (2009).
52. L. Feng, *et al.*, Effects of Quorum Sensing Systems on Regulatory T Cells in Catheter-Related *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection Rat Models. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1–7 (2016).
53. E. E. Smith, *et al.*, Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8487–8492 (2006).
54. C. Winstanley, S. O’Brien, M. A. Brockhurst, *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol.* **24**, 327–337 (2016).
55. C. Fuqua, M. R. Parsek, E. P. Greenberg, Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 439–468 (2001).
56. J. D. King, D. Kocíncová, E. L. Westman, J. S. Lam, Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun.* **15**, 261–312 (2009).
57. E. A. Miao, E. Andersen-Nissen, S. E. Warren, A. Aderem, TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* **29**, 275–288 (2007).
58. S. K. Gupta, R. S. Berk, S. Masinick, L. D. Hazlett, Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect. Immun.* **62**, 4572–4579 (1994).
59. D. D. Sriramulu, Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* **54**, 667–676 (2005).
60. P. O. Jensen, *et al.*, Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**, 1329–1338 (2007).
61. M. Van Gennip, *et al.*, Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* **117**, 537–546 (2009).
62. S. L. Gellatly, R. E. W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* **67**, 159–173 (2013).
63. A. Ghafoor, I. D. Hay, B. H. A. Rehm, Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5238–5246 (2011).
64. J.-M. Meyer, Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* **174**, 135–142 (2000).

65. E. Banin, M. L. Vasil, E. P. Greenberg, Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 11076–11081 (2005).
66. G. M. Patriquin, *et al.*, Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**, 662–671 (2008).
67. Y. Wang, *et al.*, Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *J. Bacteriol.* **193**, 3606–3617 (2011).
68. G. W. Lau, D. J. Hassett, H. Ran, F. Kong, The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* **10**, 599–606 (2004).
69. T. Vinckx, Q. Wei, S. Matthijs, P. Cornelis, The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology* **156**, 678–686 (2010).
70. G. W. Lau, B. E. Britigan, D. J. Hassett, *Pseudomonas aeruginosa* OxyR Is Required for Full Virulence in Rodent and Insect Models of Infection and for Resistance to Human Neutrophils. *Infect. Immun.* **73**, 2550–2553 (2005).
71. M. F. Moradali, S. Ghods, B. H. A. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7** (2017).
72. J. Guzzo, J. M. Pages, F. Duong, A. Lazdunski, M. Murgier, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* **173**, 5290–5297 (1991).
73. A. J. Laarman, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J. Immunol.* **188**, 386–393 (2012).
74. B. W. Bardoel, *et al.*, *Pseudomonas* Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. *PLoS Pathog.* **7**, e1002206 (2011).
75. D. S. Toder, S. J. Ferrell, J. L. Nezezon, L. Rust, B. H. Iglewski, *lasA* and *lasB* Genes of *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of Transcription and Gene Product Activity. *Infect. Immun.* **62**, 1320–1327 (1994).
76. A. P. Barker, *et al.*, A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis: Phospholipases C and chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **53**, 1089–1098 (2004).
77. O. R. Pavlovskis, B. H. Iglewski, M. Pollack, Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A in Experimental Mouse Infections: Adenosine Diphosphate Ribosylation of Elongation Factor 2. *Infect Immun* **19**, 5 (1978).
78. J. E. Peters, D. R. Galloway, Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.* **172**, 2236–2240 (1990).
79. E. Kessler, M. Safrin, J. C. Olson, D. E. Ohman, Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Staphylytic Protease. *J. Biol. Chem.* **268**, 7503–7508 (1993).
80. L. W. Heck, K. Morihara, W. McRae, E. J. Miller, Specific Cleavage of Human Type III and IV Collagens by *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *Infect. Immun.* **51**, 115–118 (1986).
81. J. Voynow, B. Fischer, S. Zheng, Proteases and cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1238–1245 (2008).
82. T. Bainbridge, R. B. Jr. Fick, Functional importance of cystic fibrosis immunoglobulin G fragments generated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Lab. Clin. Med.* **114**, 728–733 (1989).
83. L. W. Heck, *et al.*, Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol.* **144**, 2253–2257 (1990).
84. B. H. Iglewski, D. Kabat, NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 2284–2288 (1975).
85. Shu. Miyazaki, T. Matsumoto, K. Tateda, A. Ohno, K. Yamaguchi, Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J. Med. Microbiol.* **43**, 169–175 (1995).

86. N. Komatsu, T. Oda, T. Muramatsu, Involvement of Both Caspase-Like Proteases and Serine Proteases in Apoptotic Cell Death Induced by Ricin, Modeccin, Diphtheria Toxin, and *Pseudomonas* Toxin. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 1038–1044 (1998).
87. P. Wolf, U. Elsässer-Beile, *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 161–176 (2009).
88. A. R. Hauser, The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 654–665 (2009).
89. R. T. Sadikot, T. S. Blackwell, J. W. Christman, A. S. Prince, Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 1209–1223 (2005).
90. C. M. Shaver, A. R. Hauser, Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect. Immun.* **72**, 6969–6977 (2004).
91. J. T. Barbieri, J. Sun, “*Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT” in *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, (Springer Berlin Heidelberg, 2004), pp. 79–92.
92. Q. Deng, J. T. Barbieri, Modulation of host cell endocytosis by the type-III cytotoxin, *Pseudomonas* ExoS. *Traffic Cph. Den.* **9**, 1948–1957 (2008).
93. S. L. Sayner, *et al.*, Paradoxical cAMP-Induced Lung Endothelial Hyperpermeability Revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.* **95**, 196–203 (2004).
94. C. He, *et al.*, Bacterial Nucleotidyl Cyclase Inhibits the Host Innate Immune Response by Suppressing TAK1 Activation. *Infect. Immun.* **85**, e00239-17 (2017).
95. J. Jeon, Y.-J. Kim, H. Shin, U.-H. Ha, T3SS effector ExoY reduces inflammasome-related responses by suppressing bacterial motility and delaying activation of NF-κB and caspase-1. *FEBS J.* **284**, 3392–3403 (2017).
96. R. Krall, G. Schmidt, K. Aktories, J. T. Barbieri, *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Is a Rho GTPase-Activating Protein. *Infect. Immun.* **68**, 6066–6068 (2000).
97. J. Sun, J. T. Barbieri, *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 Regulator of Kinase (Crk) Proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 32794–32800 (2003).
98. H. Feltman, *et al.*, Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147**, 2659–2669 (2001).
99. T. K. Geiser, B. I. Kazmierczak, L. K. Garrity-Ryan, M. A. Matthay, J. N. Engel, *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell. Microbiol.* **3**, 223–236 (2001).
100. L. Garrity-Ryan, *et al.*, The Arginine Finger Domain of ExoT Contributes to Actin Cytoskeleton Disruption and Inhibition of Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by Epithelial Cells and Macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 7100–7113 (2000).
101. S. H. Shafikhani, C. Morales, J. Engel, The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **10**, 994–1007 (2008).
102. E. A. Dennis, S. G. Rhee, M. M. Billah, Y. A. Hannun, Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* **5**, 2068–2077 (1991).
103. M. Ibguren, *et al.*, End-products diacylglycerol and ceramide modulate membrane fusion induced by a phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 59–64 (2010).
104. A. Linkous, E. Yazlovitskaya, Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis: cPLA2 and disease pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **12**, 1369–1377 (2010).
105. A. Sreenivas, J. L. Patton-Vogt, V. Bruno, P. Griac, S. A. Henry, A Role for Phospholipase D (Pld1p) in Growth, Secretion, and Regulation of Membrane Lipid Synthesis in Yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 16635–16638 (1998).
106. C. C. Akoh, G.-C. Lee, Y.-C. Liaw, T.-H. Huang, J.-F. Shaw, GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* **43**, 534–552 (2004).

107. J. L. Arpigny, K.-E. Jaeger, Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties. *Biochem. J.* **343**, 177–183 (1999).
108. S. Banerji, A. Flieger, Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* **150**, 522–525 (2004).
109. A. Messaoudi, H. Belguith, I. Ghram, J. Ben Hamida, Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *Afr. J. Biotechnol.* **9**, 8243–8247 (2010).
110. C. Upton, J. T. Buckley, A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 178–179 (1995).
111. D. H. Schmiel, V. L. Miller, Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **1**, 1103–1112 (1999).
112. J. A. Virtanen, K. H. Cheng, P. Somerharju, Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4964–4969 (1998).
113. R. J. Mason, M. C. Williams, Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **617**, 36–50 (1980).
114. H. Benamara, *et al.*, Characterization of Membrane Lipidome Changes in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Growth on Glass Wool. *PLoS ONE* **9**, e108478 (2014).
115. H. C. Pinkart, D. C. White, “Lipids of *Pseudomonas*” in *Pseudomonas*, T. C. Montie, Ed. (Springer US, 1998), pp. 111–138.
116. D. E. Minnikin, H. Abdolrahimzadeh, The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett.* **43**, 257–260 (1974).
117. A. Aloulou, Y. B. Ali, S. Bezzine, Y. Gargouri, M. H. Gelb, “Phospholipases: An Overview” in *Lipases and Phospholipases*, G. Sandoval, Ed. (Humana Press, 2012), pp. 63–85.
118. M. D. van Kampen, R. Rosenstein, F. Götz, M. R. Egmond, Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1544**, 229–241 (2001).
119. M. G. Van Oort, *et al.*, Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **28**, 9278–9285 (1989).
120. D. J. Brick, *et al.*, A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize. *FEBS Lett.* **377**, 475–480 (1995).
121. A. Mølgaard, S. Kauppinen, S. Larsen, Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **8**, 373–383 (2000).
122. S. Banerji, P. Aurass, A. Flieger, The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* – Identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 169–181 (2008).
123. C. Lang, *et al.*, Zinc Metalloproteinase ProA Directly Activates *Legionella pneumophila* PlcC Glycerophospholipid:cholesterol Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **287**, 23464–23478 (2012).
124. S. Shinoda, *et al.*, Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2705–2711 (1991).
125. J. T. Buckley, L. N. Halasa, S. MacIntyre, Purification and partial characterization of a bacterial phospholipid: cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **257**, 3320–3325 (1982).
126. Y. P. M. van der Meer-Janssen, J. van Galen, J. J. Batenburg, J. B. Helms, Lipids in host–pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog. Lipid Res.* **49**, 1–26 (2010).
127. C. Anderson, P. Pinsirodom, K. L. Parkin, Hydrolytic selectivity of patatin (lipid ACYL hydrolase) from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers towards various lipids. *J. Food Biochem.* **26**, 63–74 (2007).
128. D. L. Andrews, B. Beames, M. D. Summers, W. D. Park, Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem. J.* **252**, 199–206 (1988).

129. P. C. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass, R. Zechner, Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J. Lipid Res.* **50**, S63–S68 (2009).
130. P. R. Shewry, Tuber Storage Proteins. *Ann. Bot.* **91**, 755–769 (2003).
131. H. J. H. B. Hirschberg, J.-Willem. F. A. Simons, N. Dekker, M. R. Egmond, Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A: Active site characterization of patatin. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5037–5044 (2001).
132. T. J. Rydel, *et al.*, The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal that Patatin Is a Lipid Acyl Hydrolase with a Ser-Asp Catalytic Dyad. *Biochemistry* **42**, 6696–6708 (2003).
133. J. D. Schrag, M. Cygler, “Lipases and hydrolase fold” in *Meth. Enzymol.*, (Elsevier, 1997), pp. 85–107.
134. P. Aurass, *et al.*, bdhA-patD Operon as a Virulence Determinant, Revealed by a Novel Large-Scale Approach for Identification of *Legionella pneumophila* Mutants Defective for Amoeba Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4506–4515 (2009).
135. S. Kato, T. Yoshimura, H. Hemmi, R. Moriyama, Biochemical Analysis of a Novel Lipolytic Enzyme YvdO from *Bacillus subtilis* 168. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 701–706 (2010).
136. B. Ku, *et al.*, VipD of *Legionella pneumophila* Targets Activated Rab5 and Rab22 to Interfere with Endosomal Trafficking in Macrophages. *PLoS Pathog.* **8**, e1003082 (2012).
137. R. Salacha, *et al.*, The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.*, 1498–1512 (2010).
138. N. Shohdy, J. A. Efe, S. D. Emr, H. A. Shuman, Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 4866–4871 (2005).
139. S. M. VanRheenen, Z.-Q. Luo, T. O’Connor, R. R. Isberg, Members of a *Legionella pneumophila* Family of Proteins with ExoU (Phospholipase A) Active Sites Are Translocated to Target Cells. *Infect. Immun.* **74**, 3597–3606 (2006).
140. A. H. Gaspar, M. P. Machner, VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 4560–4565 (2014).
141. J. Bender, *et al.*, Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *J. Biol. Chem.* **284**, 27185–27194 (2009).
142. A. Flieger, K. Rydzewski, S. Banerji, M. Broich, K. Heuner, Cloning and Characterization of the Gene Encoding the Major Cell-Associated Phospholipase A of *Legionella pneumophila*, plaB, Exhibiting Hemolytic Activity. *Infect. Immun.* **72**, 2648–2658 (2004).
143. J. A. Higgins, B. W. Hitchin, M. G. Low, Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* as a probe for the distribution of phosphatidylinositol in hepatocyte membranes. *Biochem. J.* **259**, 913–916 (1989).
144. T. S. Istivan, P. J. Coloe, Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**, 1263–1274 (2006).
145. M. R. Popoff, P. Bouvet, Clostridial toxins. *Future Microbiol.* **4**, 1021–1064 (2009).
146. G. Singh, G. Singh, D. Jadeja, J. Kaur, Lipid hydrolyzing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**, 259–269 (2010).
147. I. Sitkiewicz, K. E. Stockbauer, J. M. Musser, Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* **15**, 63–69 (2007).
148. J. G. Songer, Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* **5**, 156–161 (1997).
149. R. W. Titball, Bacterial phospholipases. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 1275–1375 (1998).
150. R. W. Titball, Bacterial Phospholipases C. *Microbiol. Rev.* **57**, 20 (1993).

151. H. U. Weltzien, Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 259–287 (1979).
152. C. Lang, A. Flieger, Characterisation of *Legionella pneumophila* phospholipases and their impact on host cells. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 903–912 (2011).
153. K. Kuhle, A. Flieger, *Legionella phospholipases* implicated in virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **376**, 175–209 (2013).
154. F. Huang, *et al.*, Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKC α and RhoA cross talk. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **289**, L176–185 (2005).
155. A. Masamune, *et al.*, Lysophosphatidylcholine Induces Apoptosis in AR42J Cells. *Pancreas* **22**, 75–83 (2001).
156. G. Murugesan, *et al.*, Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 1375–1384 (2003).
157. S. Takeshita, *et al.*, Lysophosphatidylcholine Enhances Superoxide Anions Production via Endothelial NADH/NADPH Oxidase. *J. Atheroscler. Thromb.* **7**, 238–246 (2000).
158. V. Finck-Barbançon, *et al.*, ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* **25**, 547–557 (1997).
159. A. M. Saliba, *et al.*, Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Microbes Infect.* **8**, 450–459 (2006).
160. H. Sato, D. W. Frank, ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* **53**, 1279–1290 (2004).
161. H. Sato, *et al.*, The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* **22**, 2959–2969 (2003).
162. M. Tamura, *et al.*, Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 323–331 (2004).
163. A. Cuzick, F. R. Stirling, S. L. Lindsay, T. J. Evans, The Type III Pseudomonas Exotoxin U Activates the c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathway and Increases Human Epithelial Interleukin-8 Production. *Infect. Immun.* **74**, 4104–4113 (2006).
164. B. McMorran, *et al.*, Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect. Immun.* **71**, 6035–6044 (2003).
165. A. M. Saliba, *et al.*, Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell. Microbiol.* **7**, 1811–1822 (2005).
166. F. S. Sutterwala, *et al.*, Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* **204**, 3235–3245 (2007).
167. H. J. Newton, D. K. Y. Ang, I. R. van Driel, E. L. Hartland, Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 274–298 (2010).
168. J. L. Oliva, E. M. Griner, M. G. Kazanietz, PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors* **23**, 245–252 (2005).
169. M.-E. Lin, D. R. Herr, J. Chun, Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **91**, 130–138 (2010).
170. W. H. Moolenaar, L. A. van Meeteren, B. N. G. Giepmans, The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* **26**, 870–881 (2004).
171. F. N. Van Leeuwen, *et al.*, Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J. Biol. Chem.* **278**, 400–406 (2003).
172. Y. Zhao, V. Natarajan, Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors: role in airway inflammation and remodeling. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 86–92 (2013).

173. B. Ma, T. Elkayam, H. Wolfson, R. Nussinov, Protein–protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5772–5777 (2003).
174. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie* (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
175. A. A. Bogan, K. S. Thorn, Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **280**, 1–9 (1998).
176. P. Chakrabarti, J. Janin, Dissecting protein–protein recognition sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **47**, 334–343 (2002).
177. S. Jones, J. M. Thornton, Analysis of protein–protein interaction sites using surface patches. *J. Mol. Biol.* **272**, 121–132 (1997).
178. M. Guharoy, P. Chakrabarti, Conservation and relative importance of residues across protein–protein interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15447–15452 (2005).
179. W. L. DeLano, Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 14–20 (2002).
180. A. Belyy, *et al.*, Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. *Nat. Commun.* **7**, 13582 (2016).
181. T. Karlberg, *et al.*, 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface. *Nat. Commun.* **9** (2018).
182. V. Obsilová, J. Silhan, E. Boura, J. Teisinger, T. Obsil, 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol. Res.* **57 Suppl 3**, S11-21 (2008).
183. K. Venkatesan, *et al.*, An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**, 83–90 (2009).
184. M. P. H. Stumpf, *et al.*, Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6959–6964 (2008).
185. G. Messaritou, S. Grammenoudi, E. M. C. Skoulakis, Dimerization Is Essential for 14-3-3 Stability and Function in Vivo. *J. Biol. Chem.* **285**, 1692–1700 (2010).
186. D. L. Darling, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **68**, 281–315 (2005).
187. G. P. H. van Heusden, 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life* **57**, 623–629 (2005).
188. E. Freed, M. Symons, S. G. Macdonald, F. McCormick, R. Ruggieri, Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* **265**, 1713–1716 (1994).
189. M. Molzan, *et al.*, Impaired binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4698–4711 (2010).
190. R. K. Andrews, X. Du, M. C. Berndt, The 14-3-3zeta-GPIb-IX-V complex as an antiplatelet target. *Drug News Perspect.* **20**, 285–292 (2007).
191. D. S. Conklin, K. Galaktionov, D. Beach, 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7892–7896 (1995).
192. A. Vassilev, K. J. Kaneko, H. Shu, Y. Zhao, M. L. DePamphilis, TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* **15**, 1229–1241 (2001).
193. B. Schumacher, M. Skwarczynska, R. Rose, C. Ottmann, Structure of a 14-3-3 σ -YAP phosphopeptide complex at 1.15 Å resolution. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 978–984 (2010).
194. G. Baniulyte, *et al.*, Identification of regulatory targets for the bacterial Nus factor complex. *Nat. Commun.* **8**, 2027 (2017).

195. B. P. Dalrymple, K. Kongsuwan, G. Wijffels, N. E. Dixon, P. A. Jennings, A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11627–11632 (2001).
196. G. Wijffels, *et al.*, Inhibition of protein interactions with the beta 2 sliding clamp of *Escherichia coli* DNA polymerase III by peptides from beta 2-binding proteins. *Biochemistry* **43**, 5661–5671 (2004).
197. A. Howell, S. Dubrac, D. Noone, K. I. Varughese, K. Devine, Interactions between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: the PhoR kinase phosphorylates the non-cognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Mol. Microbiol.* **59**, 1199–1215 (2006).
198. E. Rietkötter, D. Hoyer, T. Mascher, Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**, 768–785 (2008).
199. D. M. Anderson, *et al.*, Ubiquitin and Ubiquitin-Modified Proteins Activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS Cytotoxin, ExoU. *Mol. Microbiol.* **82**, 1454–1467 (2011).
200. P. Pissaridou, *et al.*, The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 12519–12524 (2018).
201. A. Kellner, M. Taylor, T. Banerjee, C. B. T. Britt, K. Teter, A binding motif for Hsp90 in the A chains of ADP-ribosylating toxins that move from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell. Microbiol.* **21**, e13074 (2019).
202. A. P. Demchenko, Recognition between flexible protein molecules: induced and assisted folding. *J. Mol. Recognit.* **14**, 42–61 (2001).
203. H. Strahl, J. Errington, Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 519–538 (2017).
204. T. I. Springer, T.-E. Reid, S. L. Gies, J. B. Feix, Interactions of the effector ExoU from *Pseudomonas aeruginosa* with short-chain phosphatidylinositides provide insights into ExoU targeting to host membranes. *J. Biol. Chem.*, 19012–19021 (2019).
205. G. H. Tyson, *et al.*, A Novel Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Binding Domain Mediates Plasma Membrane Localization of ExoU and Other Patatin-like Phospholipases. *J. Biol. Chem.* **290**, 2919–2937 (2015).
206. I. Ubarretxena-Belandia, J. W. Boots, H. M. Verheij, N. Dekker, Role of the cofactor calcium in the activation of outer membrane phospholipase A. *Biochemistry* **37**, 16011–16018 (1998).
207. H. J. Snijder, B. W. Dijkstra, Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 91–101 (2000).
208. M. Quick, *et al.*, Binding of an octylglucoside detergent molecule in the second substrate (S2) site of LeuT establishes an inhibitor-bound conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 5563–5568 (2009).
209. Y. Pilpel, N. Ben-Tal, D. Lancet, kPROT: a knowledge-based scale for the propensity of residue orientation in transmembrane segments. Application to membrane protein structure prediction. *J. Mol. Biol.* **294**, 921–935 (1999).
210. J. L. MacCallum, W. F. D. Bennett, D. P. Tieleman, Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations. *Biophys. J.* **94**, 3393–3404 (2008).
211. A. M. Whited, A. Johs, The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* **192**, 51–59 (2015).
212. E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. *J. Bacteriol.* **182**, 1172–1175 (2000).
213. T. Romantsov, L. Stalker, D. E. Culham, J. M. Wood, Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**, 12314–12323 (2008).
214. T. Romantsov, A. R. Battle, J. L. Hendel, B. Martinac, J. M. Wood, Protein localization in *Escherichia coli* cells: comparison of the cytoplasmic membrane proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL. *J. Bacteriol.* **192**, 912–924 (2010).

215. S. Subramani, H. Perdreau-Dahl, J. P. Morth, The magnesium transporter A is activated by cardiolipin and is highly sensitive to free magnesium in vitro. *eLife* **5** (2016).
216. E. Mileyskoykaya, W. Dowhan, Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 135–142 (2005).
217. A. Nishibori, J. Kusaka, H. Hara, M. Umeda, K. Matsumoto, Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J. Bacteriol.* **187**, 2163–2174 (2005).
218. I. Barák, K. Muchová, A. J. Wilkinson, P. J. O’Toole, N. Pavlendová, Lipid spirals in *Bacillus subtilis* and their role in cell division. *Mol. Microbiol.* **68**, 1315–1327 (2008).
219. F. Oswald, A. Varadarajan, H. Lill, E. J. G. Peterman, Y. J. M. Bollen, MreB-Dependent Organization of the *E. coli* Cytoplasmic Membrane Controls Membrane Protein Diffusion. *Biophys. J.* **110**, 1139–1149 (2016).
220. D. López, R. Kolter, Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.* **24**, 1893–1902 (2010).
221. X. Feng, *et al.*, Structural and functional analysis of *Bacillus subtilis* YisP reveals a role of its product in biofilm production. *Chem. Biol.* **21**, 1557–1563 (2014).
222. J. Schneider, *et al.*, Spatio-temporal remodeling of functional membrane microdomains organizes the signaling networks of a bacterium. *PLoS Genet.* **11**, e1005140 (2015).
223. J. Schneider, B. Mielich-Süss, R. Böhme, D. Lopez, In vivo characterization of the scaffold activity of flotillin on the membrane kinase KinC of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **161**, 1871–1887 (2015).
224. J. N. Bach, M. Bramkamp, Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Mol. Microbiol.* **88**, 1205–1217 (2013).
225. F. Dempwolff, H. M. Möller, P. L. Graumann, Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins. *J. Bacteriol.* **194**, 4652–4661 (2012).
226. C. Donovan, M. Bramkamp, Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiol. Read. Engl.* **155**, 1786–1799 (2009).
227. B. Mielich-Süss, J. Schneider, D. Lopez, Overproduction of flotillin influences cell differentiation and shape in *Bacillus subtilis*. *mBio* **4**, e00719-00713 (2013).
228. A. Yepes, *et al.*, The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Mol. Microbiol.* **86**, 457–471 (2012).
229. J. B. Parsons, C. O. Rock, Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* **52**, 249–276 (2013).
230. D. M. Lang, *et al.*, Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J. Neurobiol.* **37**, 502–523 (1998).
231. P. E. Bickel, *et al.*, Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 13793–13802 (1997).
232. J. F. Dermine, *et al.*, Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18507–18512 (2001).
233. T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons, Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* **141**, 929–942 (1998).
234. H. Palsdottir, C. Hunte, Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 2–18 (2004).
235. I. Liko, *et al.*, Lipid binding attenuates channel closure of the outer membrane protein OmpF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 6691–6696 (2018).
236. K. Gupta, *et al.*, The role of interfacial lipids in stabilizing membrane protein oligomers. *Nature* **541**, 421–424 (2017).

237. K. Thiruvengadam, S. K. Baskaran, G. Pennathur, Understanding domain movements and interactions of *Pseudomonas aeruginosa* lipase with lipid molecule tristearoyl glycerol: A molecular dynamics approach. *J. Mol. Graph. Model.* **85**, 190–197 (2018).
238. M. Svensson-Ek, *et al.*, The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Mol. Biol.* **321**, 329–339 (2002).
239. E. Sedláč, N. C. Robinson, Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* **38**, 14966–14972 (1999).
240. O. Kruse, *et al.*, Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J. Biol. Chem.* **275**, 6509–6514 (2000).
241. D. Reinsberg, P. J. Booth, C. Jegerschöld, B. J. Khoo, H. Paulsen, Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHClI, in the presence of native lipids. *Biochemistry* **39**, 14305–14313 (2000).
242. W. Dowhan, M. Bogdanov, Lipid-protein interactions as determinants of membrane protein structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 767–774 (2011).
243. M. Bogdanov, W. Dowhan, H. Vitrac, Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1475–1488 (2014).
244. K. S. Alnajjar, T. Cvetkov, L. Prochaska, Role of phospholipids of subunit III in the regulation of structural rearrangements in cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **54**, 1053–1063 (2015).
245. A. Musatov, R. Varhač, J. P. Hosler, E. Sedláč, Delipidation of cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* destabilizes its quaternary structure. *Biochimie* **125**, 23–31 (2016).
246. Z. Kuang, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One* **6**, e27091 (2011).
247. J. C. Olson, D. E. Ohman, Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J. Bacteriol.* **174**, 4140–4147 (1992).
248. E. Kessler, M. Safrin, J. K. Gustin, D. E. Ohman, Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J. Biol. Chem.* **273**, 30225–30231 (1998).
249. M. J. Preston, *et al.*, Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect. Immun.* **65**, 3086–3090 (1997).
250. J. J. Braymer, D. P. Giedroc, Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 59–66 (2014).
251. K. A. Higgins, D. Giedroc, Insights into Protein Allostery in the CsoR/RcnR Family of Transcriptional Repressors. *Chem. Lett.* **43**, 20–25 (2014).
252. J. P. Lisher, D. P. Giedroc, Manganese acquisition and homeostasis at the host-pathogen interface. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 91 (2013).
253. B. Troxell, H. M. Hassan, Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 59 (2013).
254. A. Anandan, A. Vrieling, Detergents in Membrane Protein Purification and Crystallisation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **922**, 13–28 (2016).
255. L. Xu, *et al.*, n-Dodecyl β -D-maltoside specifically competes with general anesthetics for anesthetic binding sites. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **32**, 1833–1840 (2014).
256. M. Wu, J. J. Alvarado, C. E. Augelli-Szafran, R. G. Ptak, T. E. Smithgall, A single β -octyl glucoside molecule induces HIV-1 Nef dimer formation in the absence of partner protein binding. *PLOS ONE* **13**, e0192512 (2018).
257. S. T. Shu, L. A. Emert-Sedlak, T. E. Smithgall, Cell-based Fluorescence Complementation Reveals a Role for HIV-1 Nef Protein Dimerization in AP-2 Adaptor Recruitment and CD4 Co-receptor Down-regulation. *J. Biol. Chem.* **292**, 2670–2678 (2017).

258. K. de G. Daiha, R. Angeli, S. D. de Oliveira, R. V. Almeida, Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. *PLOS ONE* **10**, e0131624 (2015).
259. K.-E. Jaeger, T. Eggert, Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 390–397 (2002).
260. A. Schmid, *et al.*, Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258–268 (2001).
261. C. H. Kwon, J. H. Lee, S. W. Kim, J. W. Kang, Lipase-catalyzed esterification of (S)-naproxen ethyl ester in supercritical carbon dioxide. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1596–1602 (2009).
262. M. A. Ondetti, B. Rubin, D. W. Cushman, Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **196**, 441–444 (1977).
263. F. Kovacic, *et al.*, A membrane-bound esterase PA2949 from *Pseudomonas aeruginosa* is expressed and purified from *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio* **6**, 484–493 (2016).
264. F. Bleffert, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* esterase PA2949, a bacterial homolog of the human membrane esterase ABHD6: expression, purification and crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **75**, 270–277 (2019).
265. F. Bleffert, *et al.*, Structural and mechanistic insights into phospholipase A-mediated membrane phospholipid degradation related to *Pseudomonas aeruginosa* virulence (submitted).
266. F. Kovacic, A. Mandrysch, C. Poojari, B. Strodel, K.-E. Jaeger, Structural features determining thermal adaptation of esterases. *Protein Eng. Des. Sel.* **29**, 65–76 (2016).
267. M. Nardini, D. A. Lang, K. Liebeton, K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, Crystal structure of *pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**, 31219–31225 (2000).
268. D. A. Lang, M. L. Manesse, G. H. de Haas, H. M. Verheij, B. W. Dijkstra, Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur. J. Biochem.* **254**, 333–340 (1998).
269. M. Flores-Díaz, L. Monturiol-Gross, C. Naylor, A. Alape-Girón, A. Flieger, Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 597–628 (2016).
270. F. Kovacic, “Novel phospholipases A of *Pseudomonas aeruginosa* - biochemical characterisation and cellular localisation,” Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. (2010).
271. R. Molitor, “The phospholipase PlaF affects virulence phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*,” Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. (2018).
272. C. Eberlein, T. Baumgarten, S. Starke, H. J. Heipieper, Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2583–2593 (2018).
273. H. Keweloh, H. J. Heipieper, Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, 129–137 (1996).
274. M. C. Mansilla, L. E. Cybulski, D. Albanesi, D. de Mendoza, Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**, 6681–6688 (2004).
275. Y.-M. Zhang, C. O. Rock, Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 222–233 (2008).
276. M. Caliskan, *et al.*, Proteomics reveal modulation of virulence adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by cytoplasmic membrane phospholipase A, PlaF (unpublished).
277. C. M. Shields, N. Zvonok, A. Zvonok, A. Makriyannis, Biochemical and Proteomic Characterization of Recombinant Human α/β Hydrolase Domain 6. *Sci. Rep.* **9**, 890 (2019).
278. W. A. Devane, F. A. Dysarz, M. R. Johnson, L. S. Melvin, A. C. Howlett, Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **34**, 605–613 (1988).
279. K. Ahn, M. K. McKinney, B. F. Cravatt, Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* **108**, 1687–1707 (2008).
280. G. Thomas, *et al.*, The Serine Hydrolase ABHD6 is a Critical Regulator of the Metabolic Syndrome. *Cell Rep.* **5** (2013).

281. M. Alhouayek, J. Masquelier, P. D. Cani, D. M. Lambert, G. G. Muccioli, Implication of the anti-inflammatory bioactive lipid prostaglandin D2-glycerol ester in the control of macrophage activation and inflammation by ABHD6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17558–17563 (2013).
282. H.-C. Lu, K. Mackie, An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry* **79**, 516–525 (2016).
283. M. Kano, Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **90**, 235–250 (2014).
284. P. E. Castillo, T. J. Younts, A. E. Chávez, Y. Hashimoto-dani, Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* **76**, 70–81 (2012).
285. D. A. Kendall, G. A. Yudowski, Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 294 (2016).
286. D. P. Covey, Y. Mateo, D. Sulzer, J. F. Cheer, D. M. Lovinger, Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. *Neuropharmacology* **124**, 52–61 (2017).
287. D. Wei, S. Allsop, K. Tye, D. Piomelli, Endocannabinoid Signaling in the Control of Social Behavior. *Trends Neurosci.* **40**, 385–396 (2017).
288. D. Wei, *et al.*, Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 14084–14089 (2015).
289. P. Zhong, *et al.*, Genetic deletion of monoacylglycerol lipase alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic depression in the cerebellum. *J. Physiol.* **589**, 4847–4855 (2011).
290. A. Straiker, *et al.*, Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1220–1227 (2009).
291. V. Naidoo, *et al.*, Equipotent inhibition of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase - dual targets of the endocannabinoid system to protect against seizure pathology. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **9**, 801–813 (2012).
292. J. Hwang, *et al.*, Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: a neuroprotective therapeutic modality. *Life Sci.* **86**, 615–623 (2010).
293. J. R. Savinainen, S. M. Saario, J. T. Laitinen, The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors: The three guardians of 2-AG signalling. *Acta Physiol.* **204**, 267–276 (2012).
294. W. R. Marrs, *et al.*, The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat. Neurosci.* **13**, 951–957 (2010).
295. D. Navia-Paldanius, J. R. Savinainen, J. T. Laitinen, Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J. Lipid Res.* **53**, 2413–2424 (2012).
296. A. H. Lichtman, J. L. Blankman, B. F. Cravatt, Endocannabinoid Overload. *Mol. Pharmacol.* **78**, 993–995 (2010).
297. J. L. Blankman, G. M. Simon, B. F. Cravatt, A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **14**, 1347–1356 (2007).
298. F. Tchantchou, Y. Zhang, Selective Inhibition of Alpha/Beta-Hydrolase Domain 6 Attenuates Neurodegeneration, Alleviates Blood Brain Barrier Breakdown, and Improves Functional Recovery in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* **30**, 565–579 (2013).
299. S. Zhao, *et al.*, α/β -Hydrolase Domain 6 Deletion Induces Adipose Browning and Prevents Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Rep.* **14**, 2872–2888 (2016).
300. S. Zhao, *et al.*, α/β -Hydrolase Domain-6-Accessible Monoacylglycerol Controls Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Cell Metab.* **19**, 993–1007 (2014).

301. S. Zhao, *et al.*, α/β -Hydrolase domain-6 and saturated long chain monoacylglycerol regulate insulin secretion promoted by both fuel and non-fuel stimuli. *Mol. Metab.* **4**, 940–950 (2015).
302. M. Wei, *et al.*, α/β -Hydrolase domain-containing 6 (ABHD6) negatively regulates the surface delivery and synaptic function of AMPA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E2695-2704 (2016).
303. M. Wei, *et al.*, The Inhibitory Effect of α/β -Hydrolase Domain-Containing 6 (ABHD6) on the Surface Targeting of GluA2- and GluA3-Containing AMPA Receptors. *Front. Mol. Neurosci.* **10** (2017).
304. J. Wen, R. Ribeiro, M. Tanaka, Y. Zhang, Activation of CB2 receptor is required for the therapeutic effect of ABHD6 inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropharmacology* **99**, 196–209 (2015).
305. K.-L. Hsu, *et al.*, Development and Optimization of Piperidyl-1,2,3-Triazole Ureas as Selective Chemical Probes of Endocannabinoid Biosynthesis. *J. Med. Chem.* **56**, 8257–8269 (2013).
306. F. J. Janssen, *et al.*, Discovery of glycine sulfonamides as dual inhibitors of sn-1-diacylglycerol lipase α and α/β -hydrolase domain 6. *J. Med. Chem.* **57**, 6610–6622 (2014).
307. J. Z. Patel, *et al.*, Optimization of 1,2,5-Thiadiazole Carbamates as Potent and Selective ABHD6 Inhibitors. *ChemMedChem* **10**, 253–265 (2015).
308. , Thermo Fisher Scientific. *PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 180 KDa* (January 14, 2020).
309. , Promega Corporation. *1kb DNA Ladder* (January 14, 2020).
310. D. M. Woodcock, *et al.*, Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3469–3478 (1989).
311. F. W. Studier, B. A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
312. R. Simon, U. Priefer, A. Puhler, A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotechnol*, **8** (1983).
313. B. W. Holloway, V. Krishnapillai, A. F. Morgan, Chromosomal Genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**, 30 (1979).
314. M. Caliskan, “Protein-protein interaction studies of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase A PlbF,” Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. (2016).
315. M. E. Kovach, R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop, K. M. Peterson, pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**, 800–802 (1994).
316. D. Paffen, “Expression in *Escherichia coli* and biochemical properties of the human lipase ABHD6,” Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. (2018).
317. New England Biolabs, Tm calculator (August 30, 2019).
318. R. Owczarzy, *et al.*, IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* **36**, W163–W169 (2008).
319. Integrated DNA Technologies, OligoAnalyzer Tool Version 3.1 (August 30, 2019).
320. N. Guex, M. C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723 (1997).
321. P. Artimo, *et al.*, ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**, W597–W603 (2012).
322. R. A. Laskowski, J. Jabłońska, L. Pravda, R. S. Vařeková, J. M. Thornton, PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **27**, 129–134 (2018).
323. G. L. Winsor, *et al.*, Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D646–D653 (2016).
324. H. M. Berman, The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
325. J. Sambrook, D. W. Russel, *Molecular cloning - A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

326. K.-H. Choi, A. Kumar, H. P. Schweizer, A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* **64**, 391–397 (2006).
327. F. Bleffert, “Biochemische Analyse und Kristallisation einer membrangebundenen Phospholipase B aus *Pseudomonas aeruginosa*,” Masterarbeit, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen. (2013).
328. G. A. O’Toole, Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp. JoVE* (2011) <https://doi.org/10.3791/2437>.
329. M. H. Rashid, A. Kornberg, Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4885–4890 (2000).
330. R. K. Saiki, *et al.*, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
331. , Thermo Fisher Scientific. *Phusion High-Fidel. DNA Polym. 2 UμL* (December 17, 2019).
332. , Agilent. *Site-Dir. Mutagen. Kits QuikChange* (December 17, 2019).
333. H. C. Bimboim, J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
334. J.-Y. Jeong, *et al.*, One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5440–5443 (2012).
335. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598–599 (1975).
336. E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr. A* **411**, 177–184 (1987).
337. A. K. Hunter, G. Carta, Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers. *J. Chromatogr. A* **897**, 65–80 (2000).
338. , GE Healthcare Life Sciences. *Sephadex G-25 PD-10 Desalt. Columns* (December 17, 2019).
339. U. K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
340. V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262 (1988).
341. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–4354 (1979).
342. G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, “Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase” in *Methods in Enzymology*, (Elsevier, 1986), pp. 331–353.
343. S. D. Dunn, Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **157**, 144–153 (1986).
344. K.-E. Jaeger, F. Kovacic, Determination of lipolytic enzyme activities. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1149**, 111–134 (2014).
345. S. Wilhelm, J. Tommassen, K. E. Jaeger, A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 6977–6986 (1999).
346. A. Flieger, B. Neumeister, N. P. Cianciotto, Characterization of the Gene Encoding the Major Secreted Lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and Its Role in Detoxification of Lysophosphatidylcholine. *Infect. Immun.* **70**, 6094–6106 (2002).
347. , FUJIFILM Wako Chemicals Europe. *NEFA-HR2 Assay* (December 17, 2019).

348. A. Ghisaidoobe, S. Chung, Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22518–22538 (2014).
349. J. H. Morrissey, Morrissey Lab Protocol for Preparing Phospholipid Vesicles (SUV) by Sonication (<https://tf7.org/suv.pdf>) (September 12, 2019).
350. Avanti Polar Lipids, *E. coli* Extract Total (<https://avantilipids.com/product/100500>) (September 12, 2019).
351. A. Urbani, T. Warne, A colorimetric determination for glycosidic and bile salt-based detergents: applications in membrane protein research. *Anal. Biochem.* **336**, 117–124 (2005).
352. G. L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356 (1977).
353. D. C. Mitchell, M. Straume, J. L. Miller, B. J. Litman, Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. *Biochemistry* **29**, 9143–9149 (1990).
354. H. J. Snijder, *et al.*, Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**, 5 (1999).
355. C. del Val, S. H. White, A.-N. Bondar, Ser/Thr Motifs in Transmembrane Proteins: Conservation Patterns and Effects on Local Protein Structure and Dynamics. *J. Membr. Biol.* **245**, 717–730 (2012).
356. F. Hullin-Matsuda, C. Luquain-Costaz, J. Bouvier, I. Delton-Vandenbroucke, Bis(monoacylglycerol)phosphate, a peculiar phospholipid to control the fate of cholesterol: Implications in pathology. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **81**, 313–324 (2009).
357. H. D. Gallala, K. Sandhoff, Biological function of the cellular lipid BMP-BMP as a key activator for cholesterol sorting and membrane digestion. *Neurochem. Res.* **36**, 1594–1600 (2011).
358. J. D. Unsay, K. Cosentino, Y. Subburaj, A. J. García-Sáez, Cardiolipin Effects on Membrane Structure and Dynamics. *Langmuir* **29**, 15878–15887 (2013).
359. M. Pourmaleki, T. A. Garrett, Alterations in Acyl Phosphatidylglycerol Levels in $\Delta pagP$, $\Delta pldB$, and ΔcIs *Escherichia coli* leads to Phenotypic Variance. *FASEB J.* **30**, 1133.2-1133.2 (2016).
360. P. R. Cullis, B. D. Kruijff, Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **559**, 399–420 (1979).
361. Y.-T. Hsu, R. J. Youle, Nonionic Detergents Induce Dimerization among Members of the Bcl-2 Family. *J. Biol. Chem.* **272**, 13829–13834 (1997).
362. L. E. Fisher, D. M. Engelman, J. N. Sturgis, Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycoporphin A transmembrane domain. *J. Mol. Biol.* **293**, 639–651 (1999).
363. M. Stangl, A. Veerappan, A. Kroeger, P. Vogel, D. Schneider, Detergent Properties Influence the Stability of the Glycophorin A Transmembrane Helix Dimer in Lysophosphatidylcholine Micelles. *Biophys. J.* **103**, 2455–2464 (2012).
364. Miyabe Shields, “Biochemical characterization of human alpha/beta hydrolase domain 6 as a therapeutic target,” Dissertation, Northeastern University. (2018).
365. N. Stella, P. Schweitzer, D. Piomelli, A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778 (1997).
366. Q. Cai, Z. Li, Q. Ouyang, C. Luo, V. D. Gordon, Singly Flagellated *Pseudomonas aeruginosa* Chemotaxes Efficiently by Unbiased Motor Regulation. *mBio* **7**, e00013-16 (2016).
367. B. I. Kazmierczak, M. Schniederberend, R. Jain, Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **28**, 78–82 (2015).
368. M. A. Matilla, T. Krell, The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* **42** (2018).
369. C. Bordi, S. de Bentzmann, Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Ann. Intensive Care* **1**, 19 (2011).

370. R. Koebnik, K. P. Locher, P. Van Gelder, Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**, 239–253 (2000).
371. E. Li, K. Hristova, Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhes. Migr.* **4**, 249–254 (2010).
372. E. Li, K. Hristova, Role of Receptor Tyrosine Kinase Transmembrane Domains in Cell Signaling and Human Pathologies. *Biochemistry* **45**, 6241–6251 (2006).
373. M. J. Hubler, A. J. Kennedy, Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J. Nutr. Biochem.* **34**, 1–7 (2016).
374. E. Ricciotti, G. A. FitzGerald, Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 986–1000 (2011).
375. K. Coopman, L. D. Smith, K. L. Wright, S. G. Ward, Temporal variation in CB2R levels following T lymphocyte activation: Evidence that cannabinoids modulate CXCL12-induced chemotaxis. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 360–371 (2007).
376. D. Mulnaes, H. Gohlke, TopScore: Using Deep Neural Networks and Large Diverse Data Sets for Accurate Protein Model Quality Assessment. *J. Chem. Theory Comput.* **14**, 6117–6126 (2018).
377. G. Novik, V. Savich, E. Kiseleva, An Insight Into Beneficial *Pseudomonas* bacteria. *Microbiol. Agric. Hum. Health*, 73–105 (2015).
378. O. F. Anayo, *et al.*, “The Beneficial Roles of *Pseudomonas* in Medicine, Industries, and Environment: A Review” in *Pseudomonas Aeruginosa - An Armory Within*, (2019).
379. M. Nitschke, S. G. V. A. O. Costa, Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 252–259 (2007).
380. M. Ashengroph, I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani, F. Momenbeik, Use of Growing Cells of *Pseudomonas aeruginosa* for Synthesis of the Natural Vanillin via Conversion of Isoeugenol. *Iran J Pharm Res* **10**, 749–757 (2011).
381. S. Vadlamani, S. R. Parcha, Studies on industrially important alkaline protease production from locally isolated superior microbial strain from soil microorganisms. *Int. J. Biotechnol. Appl.* **3**, 101–105 (2011).
382. R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**, 627–662 (2001).
383. M. Z. El-Fouly, A. M. Sharaf, A. A. M. Shahin, H. A. El-Bialy, A. M. A. Omara, Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **8**, 36–48 (2015).
384. M. Kumar, L. Philip, Bioremediation of endosulfan contaminated soil and water -- optimization of operating conditions in laboratory scale reactors. *J. Hazard. Mater.* **136**, 354–364 (2006).
385. X. Zhang, D. Xu, C. Zhu, T. Lundaa, K. E. Scherr, Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chem. Eng. J.* **209**, 138–146 (2012).
386. E. Haba, M. J. Espuny, M. Busquets, A. Manresa, Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 379–387 (2000).
387. J. L. Veessenmeyer, A. R. Hauser, T. Lisboa, J. Rello, *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Crit. Care Med.* **37**, 1777–1786 (2009).
388. M. W. Azam, A. U. Khan, Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov. Today* **24**, 350–359 (2019).
389. D. A. Rasko, V. Sperandio, Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 117–128 (2010).
390. J. W. Pepper, Defeating pathogen drug resistance: guidance from evolutionary theory. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **62**, 3185–3191 (2008).
391. A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548 (2007).

392. N. Ruiz, T. J. Silhavy, Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 122–126 (2005).
393. T. L. Raivio, MicroReview: Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **56**, 1119–1128 (2005).
394. G. Rowley, M. Spector, J. Kormanec, M. Roberts, Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 383–394 (2006).
395. S. G. Altabe, M. C. Mansilla, D. de Mendoza, “Remodeling of Membrane Phospholipids by Bacterial Desaturases” in *Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism*, J. M. Ntambi, Ph.D., Ed. (Springer New York, 2013), pp. 209–231.
396. L. Danne, *et al.*, Membrane Remodeling by a Bacterial Phospholipid-Methylating Enzyme. *mBio* **8** (2017).
397. J. T. Best, P. Xu, T. R. Graham, Phospholipid flippases in membrane remodeling and transport carrier biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **59**, 8–15 (2019).
398. M. Zavaleta-Pastor, *et al.*, *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 302–307 (2010).
399. E. A. Lucas, S. J. Billington, P. Carlson, D. J. McGee, B. H. Jost, Phospholipase D promotes *Arcanobacterium haemolyticum* adhesion via lipid raft remodeling and host cell death following bacterial invasion. *BMC Microbiol.* **10**, 270 (2010).
400. Y. Li, *et al.*, LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8716–8721 (2012).
401. J. T. Crowley, *et al.*, Lipid Exchange between *Borrelia burgdorferi* and Host Cells. *PLOS Pathog.* **9**, e1003109 (2013).
402. F. Kovačić, *et al.*, Structural and Functional Characterisation of TesA - A Novel Lysophospholipase A from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* **8**, e69125 (2013).
403. R. M. Ostroff, B. Wretling, M. L. Vasil, Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.* **57**, 1369–1373 (1989).
404. L. S. Terada, K. A. Johansen, S. Nowbar, A. I. Vasil, M. L. Vasil, *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* **67**, 2371–2376 (1999).
405. A. B. Russell, *et al.*, Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* **496**, 508–512 (2013).
406. F. Jiang, N. R. Waterfield, J. Yang, G. Yang, Q. Jin, A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe* **15**, 600–610 (2014).
407. D. G. Davies, C. N. H. Marques, A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J. Bacteriol.* **191**, 1393–1403 (2009).
408. L. Y. Baker, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. *BMC Microbiol.* **18** (2018).
409. E. Martínez, J. Campos-Gómez, Oxylipins produced by *Pseudomonas aeruginosa* promote biofilm formation and virulence. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2016).
410. E. Martínez, *et al.*, Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun. Biol.* **2**, 66 (2019).
411. J. Fernández-Ruiz, J. Romero, J. A. Ramos, “Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson’s Disease, Huntington’s Chorea, Alzheimer’s Disease, and Others” in *Endocannabinoids*, Handbook of Experimental Pharmacology., R. G. Pertwee, Ed. (Springer International Publishing, 2015), pp. 233–259.
412. H. T. McMahon, E. Boucrot, Membrane curvature at a glance. *J. Cell Sci.* **128**, 1065–1070 (2015).

413. K. S. Ramamurthi, R. Losick, Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13541–13545 (2009).
414. N. S. Hatzakis, *et al.*, How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 835–841 (2009).
415. J. J. Kabara, D. M. Swieczkowski, A. J. Conley, J. P. Truant, Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 23–28 (1972).
416. J. J. Kabara, R. Vrable, Antimicrobial lipids: natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids* **12**, 753–759 (1977).
417. M. A. Pribasniig, *et al.*, α/β Hydrolase Domain-containing 6 (ABHD6) Degrades the Late Endosomal/Lysosomal Lipid Bis(monoacylglycero)phosphate. *J. Biol. Chem.* **290**, 29869–29881 (2015).
418. Y. Matsuzawa, K. Y. Hostetler, Degradation of bis(monoacylglycero)phosphate by an acid phosphodiesterase in rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **254**, 5997–6001 (1979).
419. M. Nishihara, H. Morii, Y. Koga, Bis(monoacylglycero)phosphate in Alkalophilic Bacteria. *J. Biochem. (Tokyo)* **92**, 1469–1479 (1982).
420. T. Hayakawa, *et al.*, Differential membrane packing of stereoisomers of bis(monoacylglycero)phosphate. *Biochemistry* **45**, 9198–9209 (2006).
421. T. Hayakawa, *et al.*, Membrane Properties of Dipalmitoyl Bis (monoacylglycero) phosphate. *Membrane* **32**, 221–228 (2007).
422. D. A. Los, N. Murata, Regulation of Enzymatic Activity and Gene Expression by Membrane Fluidity. *Sci. Signal.* **2000**, pe1–pe1 (2000).
423. S. A.-M. Abdel-Samie, Y.-M. Zhang, Optimal membrane fluidity is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *FASEB J.* **25**, 742.1-742.1 (2011).
424. S. L. Drees, S. Fetzner, PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chem. Biol.* **22**, 611–618 (2015).
425. T. Gao, Q. Meng, H. Gao, Thioesterase YbgC affects motility by modulating c-di-GMP levels in *Shewanella oneidensis*. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
426. H. Cho, J. E. Cronan, Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 4216–4219 (1995).
427. F.-X. Contreras, A. M. Ernst, F. Wieland, B. Brügger, Specificity of Intramembrane Protein–Lipid Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (2011).
428. J. Zimmer, D. A. Doyle, Phospholipid requirement and pH optimum for the in vitro enzymatic activity of the *E. coli* P-type ATPase ZntA. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1758**, 645–652 (2006).
429. C. R. Sanders, G. C. Landis, Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid-Rich Bilayered Mixed Micelles for NMR Studies. *Biochemistry* **34**, 4030–4040 (1995).
430. Y. Ding, L. M. Fujimoto, Y. Yao, G. V. Plano, F. M. Marassi, Influence of the lipid membrane environment on structure and activity of the outer membrane protein Ail from *Yersinia pestis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 712–720 (2015).
431. Y. Kofuku, *et al.*, Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 13376–13379 (2014).
432. L. Ge, *et al.*, Molecular plasticity of the voltage-dependent anion channel embedded into a membrane. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **24**, 585–594 (2016).
433. S. T. Albelo, C. E. Domenech, Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 271–274 (1997).
434. L. Li, X. Shi, X. Guo, H. Li, C. Xu, Ionic protein–lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem. Sci.* **39**, 130–140 (2014).

435. A. J. Robinson, W. G. Richards, P. J. Thomas, M. M. Hann, Behavior of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* **68**, 164–170 (1995).
436. G. Koch, *et al.*, Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence by Targeting Flotillin Protein Scaffold Activity. *Cell Chem. Biol.* **24**, 845-857.e6 (2017).
437. A. M. Tareen, *et al.*, The *Campylobacter jejuni* Cj0268c protein is required for adhesion and invasion in vitro. *PLoS One* **8**, e81069 (2013).
438. B. Mielich-Süss, *et al.*, Flotillin scaffold activity contributes to type VII secretion system assembly in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **13**, e1006728 (2017).
439. M. M. Heimesaat, *et al.*, Impact of *Campylobacter jejuni* cj0268c knockout mutation on intestinal colonization, translocation, and induction of immunopathology in gnotobiotic IL-10 deficient mice. *PLoS One* **9**, e90148 (2014).
440. M. L. Hutton, *et al.*, A *Helicobacter pylori* Homolog of Eukaryotic Flotillin Is Involved in Cholesterol Accumulation, Epithelial Cell Responses and Host Colonization. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 219 (2017).
441. D. Lopez, G. Koch, Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**, 76–84 (2017).
442. S. H. Park, S. J. Opella, Tilt Angle of a Trans-membrane Helix is Determined by Hydrophobic Mismatch. *J. Mol. Biol.* **350**, 310–318 (2005).
443. S. K. Kandasamy, R. G. Larson, Molecular Dynamics Simulations of Model Trans-Membrane Peptides in Lipid Bilayers: A Systematic Investigation of Hydrophobic Mismatch. *Biophys. J.* **90**, 2326–2343 (2006).
444. E. Strandberg, S. Esteban-Martín, A. S. Ulrich, J. Salgado, Hydrophobic mismatch of mobile transmembrane helices: Merging theory and experiments. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 1242–1249 (2012).
445. P. L. Yeagle, M. Bennett, V. Lemaître, A. Watts, Transmembrane helices of membrane proteins may flex to satisfy hydrophobic mismatch. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1768**, 530–537 (2007).
446. A. E. Daily, D. V. Greathouse, P. C. A. van der Wel, R. E. Koeppe, Helical Distortion in Tryptophan- and Lysine-Anchored Membrane-Spanning α -Helices as a Function of Hydrophobic Mismatch: A Solid-State Deuterium NMR Investigation Using the Geometric Analysis of Labeled Alanines Method. *Biophys. J.* **94**, 480–491 (2008).
447. E. A. Franzosa, K. J. Lynagh, Y. Xia, Structural correlates of protein melting temperature. *Proc. 4th Int. Beilstein Symp. Exp. Stand. Cond. Enzyme Charact.*, 99–106 (2009).
448. N. J. Marianayagam, M. Sunde, J. M. Matthews, The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 618–625 (2004).
449. E. V. Bocharov, *et al.*, Helix-helix interactions in membrane domains of bitopic proteins: Specificity and role of lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1859**, 561–576 (2017).
450. J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid, Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 67–80 (1998).
451. Z. Prokop, *et al.*, “Engineering of protein tunnels: Keyhole-lock-key model for catalysis by the enzymes with active sites” in *Protein Engineering Handbook*, (Wiley-VCH, 2012), pp. 421–464.
452. A. Stsiapanava, *et al.*, Binding of Pro-Gly-Pro at the active site of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase and development of an epoxide hydrolase selective inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4227–4232 (2014).
453. G. J. Bartlett, C. T. Porter, N. Borkakoti, J. M. Thornton, Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *J. Mol. Biol.* **324**, 105–121 (2002).
454. P. R. Wilderman, *et al.*, Investigation by site-directed mutagenesis of the role of cytochrome P450 2B4 non-active-site residues in protein-ligand interactions based on crystal structures of the ligand-bound enzyme. *FEBS J.* **279**, 1607–1620 (2012).

455. A. Shimotohno, S. Oue, T. Yano, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, Demonstration of the importance and usefulness of manipulating non-active-site residues in protein design. *J. Biochem. (Tokyo)* **129**, 943–948 (2001).
456. K. Valmsen, *et al.*, A critical role of non-active site residues on cyclooxygenase helices 5 and 6 in the control of prostaglandin stereochemistry at carbon 15. *J. Biol. Chem.* **282**, 28157–28163 (2007).
457. A. Eschenmoser, One Hundred Years Lock-and-Key Principle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**, 2363–2363 (1995).
458. J. Schmitt, S. Brocca, R. D. Schmid, J. Pleiss, Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Eng.* **15**, 595–601 (2002).
459. J. Sgrignani, A. Magistrato, Influence of the Membrane Lipophilic Environment on the Structure and on the Substrate Access/Egress Routes of the Human Aromatase Enzyme. A Computational Study. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1595–1606 (2012).
460. W. Jiang, D. Ghosh, Motion and flexibility in human cytochrome p450 aromatase. *PLoS One* **7**, e32565 (2012).
461. V. Cojocar, K. Balali-Mood, M. S. P. Sansom, R. C. Wade, Structure and Dynamics of the Membrane-Bound Cytochrome P450 2C9. *PLOS Comput. Biol.* **7**, e1002152 (2011).
462. S. Ahmad, “PhD thesis,” Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. (unpublished).
463. C. C. Lord, G. Thomas, J. M. Brown, Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 792–802 (2013).
464. P. Vijayaraj, *et al.*, A Bifunctional Enzyme That Has Both Monoacylglycerol Acyltransferase and Acyl Hydrolase Activities1[W][OA]. *Plant Physiol.* **160**, 667–683 (2012).
465. H. O. Spivey, J. Ovádi, Substrate channeling. *Methods San Diego Calif* **19**, 306–321 (1999).
466. E. E. Matthews, M. Zoonens, D. M. Engelman, Dynamic Helix Interactions in Transmembrane Signaling. *Cell* **127**, 447–450 (2006).
467. M. B. Neiditch, *et al.*, Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* **126**, 1095–1108 (2006).
468. H. Østdal, H. J. Andersen, Non-enzymic protein induced hydrolysis of P-nitrophenyl acyl esters in relation to lipase/esterase assays. *Food Chem.* **55**, 55–61 (1996).
469. B. M. Coffey, G. G. Anderson, “Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate” in *Pseudomonas Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology., A. Filloux, J.-L. Ramos, Eds. (Springer New York, 2014), pp. 631–641.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die vorgelegte Dissertation wurde in dieser oder in ähnlicher Weise noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Christoph H. Strunk