

Physiologische und biochemische Charakterisierung einer
neuen Phospholipase B aus *Pseudomonas aeruginosa*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Jeanette Weiler

aus Gelsenkirchen

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

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1208 „Identität und Dynamik von Membransystemen – von Molekülen bis zu zellulären Funktionen“.

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 2021

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation mit dem Thema „Physiologische und biochemische Charakterisierung einer neuen Phospholipase B aus *Pseudomonas aeruginosa*“ von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät eingereicht und ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen. Es handelt sich bei allen von mir eingereichten Dissertationsschriften um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitungen vorgenommen wurden.

Düsseldorf, den

Andrea Weiler

Zwei Dinge sind zu unserer **Arbeit** nötig:
unermüdliche **Ausdauer** und die **Bereitschaft**,
etwas, in das man viel **Zeit** und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen.

(Albert Einstein)

Meiner Oma Töne

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der gesamten Phase der Promotion unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Bereitstellung des interessanten wissenschaftlichen Themas sowie der Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie anzufertigen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Dr. Filip Kovačić, danke für deine Betreuung während meiner Promotion und die nützlichen Hilfestellungen.

Vielen Dank an alle wissenschaftlichen Kooperationspartner für die freundliche und effektive Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich Dr. Sebastian Felgner, Olivia Spitz, Mirja Gudzhun, Dr. Stephan Schott-Verdugo, Michael Kamel, Dr. Björn Thiele, Dr. Gereon Poschmann und Dipl.-Ing. Esther Knieps-Grünhagen.

Ich danke allen Mitarbeitern des IMETs für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Liebe AG „Bacterial Enzymology“ und gleichzeitig Mitglieder der Fahrgemeinschaft, vielen Dank für die lustigen Autofahrten, euren wissenschaftlichen Austausch und die vielen gemeinsamen Stunden. Vielen Dank Christoph für deine Unterstützung bei biochemischen Fragen und dem Zeichnen von Lipidstrukturen. Besonders danken möchte ich Dr. Stephan Thies für deine unermüdliche Unterstützung und Hilfe in allen erdenklichen Situationen. Vielen Dank Dr. Andreas Knapp für dein offenes Ohr, deine Unterstützung nicht nur in beruflichen Situationen und die Fähigkeit, stets das Positive zu sehen bzw. hervorzuheben!

Besonders danken möchte ich auch meinen Studenten Julia Berger, Tobias Link und Katja Pöstges. Dank eurer Hilfe hat PlaB an Fahrt aufgenommen und das Thema zügig vorgebracht. Celina Schulz, du hast mir zum Ende der Promotion sehr geholfen und diese Phase tatkräftig unterstützt! Vielen Dank an euch für die gute Zusammenarbeit!

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches 1208 für die gute Zusammenarbeit, die anregenden Gespräche, Seminare, Retreats und Konferenzbeiträge.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde. Ich habe euch während der Promotion weniger Aufmerksamkeit geschenkt, als ihr verdient habt! Danke für eure Geduld und eure Unterstützung. Sowohl beruflich als auch privat danke ich dir Talip für deine Unterstützung. In den letzten Jahren haben wir gemeinsam sehr viele lustige, amüsante, traurige sowie schwierige Situationen erlebt und gemeistert. Danke für die aufregende Zeit und das gemeinsame Jammern :D.

Ich danke allen Beteiligten für die Durchsicht des Manuskripts.

Zu guter Letzt aber nicht weniger wichtig möchte ich meiner Familie danken. Dank eurer Zuversicht, den Glauben an mich und eure dauerhafte Unterstützung sowie Ermutigung bin ich so weit gekommen. Ohne euch wäre ich nicht zu dem Menschen geworden, der ich nun bin. Vielen Dank für Alles!

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Andrea J. Weiler, Olivia Spitz, Mirja Gudzuhn, Stephan N. Schott-Verdugo, Michael Kamel, Björn Thiele, Wolfgang R. Streit, Alexej Kedrov, Lutz Schmitt, Holger Gohlke and Filip Kovačić. **Novel intracellular phospholipase B PlaB from *Pseudomonas aeruginosa* with activity towards endogenous phospholipids affects biofilm assembly.** *Submitted.*

Posterpräsentationen im Rahmen der Promotion

Andrea Jeanette Weiler, Christoph Heinrich Strunk, Julia Berger, Karl-Erich Jaeger and Filip Kovačić. (2017). **Identification of novel phospholipases A in *Pseudomonas aeruginosa*.** Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 05.- 08.03.2017, Würzburg/DE. Posternummer 774/MPP; 3 Minuten Vortrag.

Andrea Jeanette Weiler, Christoph Heinrich Strunk, Julia Berger, Karl-Erich Jaeger and Filip Kovačić. (2017). **Identification of novel phospholipases A in *Pseudomonas aeruginosa*.** Dynamics of membrane systems, 1th CRC 1208 International Conference in Düsseldorf. 13.- 15.09.2017; Posternummer 4.

Andrea Jeanette Weiler, Julia Berger, Christoph Heinrich Strunk, Jennifer Bender, Antje Flieger, Karl-Erich Jaeger and Filip Kovačić. (2018). **PlaB, a novel phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa*.** Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 15.- 18.04.2018, Wolfsburg/DE. Posternummer MTP337; 3 Minuten Vortrag.

Andrea Jeanette Weiler, Christoph Heinrich Strunk, Julia Berger, Karl-Erich Jaeger and Filip Kovačić. (2019). **PlaB is a novel intracellular phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* with activity towards endogenous phospholipids.** „Dynamics of membrane systems, 2nd CRC 1208 International Conference“ in Düsseldorf. 12.- 14.03.2019, Düsseldorf/DE. Posternummer 6.

Andrea Jeanette Weiler, Christoph Heinrich Strunk, Julia Berger, Karl-Erich Jaeger and Filip Kovačić. (2019). **PlaB is novel intracellular phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* with activity towards endogenous phospholipids.** Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 17.- 20.03.2019, Mainz/DE. Posternummer MTP276.

Weiler, Andrea Jeanette, Berger, Julia, Jaeger, Karl-Erich and Kovačić, Filip (2019). **PlaB, a novel intracellular enzyme of *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipase A and acyl-CoA thioesterase activities.** 17th International conference on *Pseudomonas*. 22.- 26.07.2019; Kuala Lumpur/Malaysia. Posternummer PA-2019-159; 90 Sekunden Posterpitch.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Sekretionswege in <i>P. aeruginosa</i>	4
1.3 Virulenzfaktoren	6
1.3.1 Zellassoziierte Virulenzfaktoren	6
1.3.2 Nicht-zellassoziierte Virulenzfaktoren	8
1.3.3 Biofilm, ein effektiver Schutz vor externen Einflüssen	9
1.4 Zell-Zell-Kommunikationssysteme in <i>P. aeruginosa</i>	11
1.5 Bakterielle Phospholipasen als Virulenzfaktoren	14
1.5.1 <i>L. pneumophila</i> , ein Modellorganismus für die Untersuchung von Phospholipasen	16
1.5.2 PlaB aus <i>L. pneumophila</i> , eine virulenzassoziierte Phospholipase A	17
1.5.3 Phospholipasen aus <i>P. aeruginosa</i>	21
1.6 Ziel der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	25
2.2 Bakterienstämme und Plasmide.....	25
2.3 Oligonukleotide	26
2.4 Arbeiten mit Bakterien	27
2.4.1 Nähr- und Testmedien	27
2.4.2 Kultivierung von Bakterien	28
2.4.3 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen	28
2.4.4 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	29

2.4.5	Herstellung und Transformation von elektrokompetenter Pseudomonaden.....	30
2.4.6	Transfer von Plasmid-DNA mittels Konjugation.....	30
2.4.7	Kultivierung von Biofilmen von <i>P. aeruginosa</i>	31
2.4.7.1	Färbung von Biofilmen mit Kristallviolett	31
2.4.8	Kultivierung von <i>Pseudomonas</i> in Fließkammern.....	32
2.4.8.1	Fluoreszenzbasierte Untersuchung von Biofilmen in Fließkammern.....	32
2.4.9	Nachweis der Expression von <i>paplaB_{H6}</i> in <i>E. coli</i> C43(DE3).....	33
2.4.10	Zelluläre Lokalisation von PaPla _{H6} und Isolierung von bakteriellen Membranen..	34
2.4.11	Separation von integral und peripher gebundenen Proteinen.....	35
2.4.12	Trennung der inneren und äußeren Membran mittels Saccharosegradienten.....	35
2.4.13	Herstellung eines <i>paplaB</i> -defizienten <i>P. aeruginosa</i> Stammes	36
2.4.14	Messung von Pyoverdin in <i>P. aeruginosa</i> Kulturüberständen.....	37
2.4.15	Lagerung von Bakterien	37
2.5	Arbeiten mit Nukleinsäuren	38
2.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	38
2.5.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. aeruginosa</i>	38
2.5.3	Photometrische Messung von DNA und Protein-Konzentrationen.....	38
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.5.4.1	<i>Phusion</i> [®] -PCR	38
2.5.4.2	<i>QuikChange</i> [®] -PCR	39
2.5.5	Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.5.7	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
2.5.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
2.5.9	DNA-Sequenzierung	41
2.6	Arbeiten mit Proteinen.....	42
2.6.1	Proteintrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42

2.6.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen	42
2.6.3	Reinigung von Proteinen mit IMAC.....	43
2.6.4	Bestimmung der Esteraseaktivität	45
2.6.5	Nachweis der Phospholipaseaktivität mit natürlichen Lipiden.....	45
2.6.6	Bestimmung der Phospholipase A ₁ - und A ₂ - Aktivität mit synthetischen Lipiden..	46
2.6.7	Nachweis der Hydrolyse von Acyl-CoA Thioestern	46
2.6.8	Enzyminhibierung durch Lipase-Inhibitoren	47
2.6.9	Thermostabilität von PaPlaB.....	47
2.6.10	Fettsäure-Extraktion und GC-MS Analyse.....	48
2.6.11	Größenausschlusschromatographie	49
2.7	Untersuchung des Proteoms mittels LC-ESI-MS.....	50
2.8	Das <i>Galleria mellonella</i> -Virulenzmodell	51
2.9	<i>In silico</i> Methoden	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Identifizierung von PaPlaB aus <i>P. aeruginosa</i>	53
3.1.1	Bioinformatische Analyse und Identifizierung neuer lipolytischer Enzyme	53
3.1.2	Sequenzbasierte Analyse von PaPlaB aus <i>P. aeruginosa</i> PA01.....	55
3.2	Die heterologe Expression von <i>paplaB</i> ermöglicht Lokalisationsstudien und die Reinigung aus Membranen.....	59
3.2.1	Das Gen <i>paplaB_{hg}</i> kann heterolog in <i>E. coli</i> C43(DE3) überexprimiert werden	59
3.2.2	Aktives PaPlaB ist in <i>E. coli</i> in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert	61
3.2.3	PaPlaB kann aus <i>E. coli</i> Membranen isoliert und gereinigt werden	65
3.3	Biochemische Charakterisierung der Phospholipase PaPlaB	67
3.3.1	PaPlaB hydrolysiert bevorzugt mittel- und langkettige Phospholipide als auch endogene Lipide.....	67
3.3.2	PaPlaB gehört zu der Klasse der Phospholipasen B	69
3.3.3	PaPlaB ist in der Lage, Acyl-CoA Thioester zu hydrolysieren	70

3.3.4	Die Aktivität von PaPlaB ist abhängig von der Proteinkonzentration und dem Oligomerisierungszustand.....	71
3.3.5	Bis zu einer Temperatur von 42 °C ist PaPlaB stabil und aktiv.....	74
3.3.6	PaPlaB kann durch Paraoxon inhibiert werden	75
3.3.7	Die Aminosäuren S79, D196 und H244 bilden die katalytische Triade.....	76
3.4	Physiologische Rolle von PaPlaB in <i>P. aeruginosa</i>	78
3.4.1	<i>paplaB</i> ist unter Standardlaborbedingungen nicht essenziell und kann deletiert werden	79
3.4.2	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> zeigt eine verminderte intrazelluläre PLA-Aktivität.....	80
3.4.3	Während der exponentiellen Wachstumsphase zeigt <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> ein verzögertes Wachstum	80
3.4.4	Innerhalb von 72 h produziert <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> unter statischen Bedingungen signifikant weniger Biofilm.....	82
3.4.5	Im <i>Galleria mellonella</i> -Virulenzversuch ist <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> weniger virulent..	85
3.5	Globale Proteomstudien.....	87
3.5.1	Die Deletion von <i>paplaB</i> führt zu Veränderungen im Proteom von <i>P. aeruginosa</i> .	88
3.5.1.1	Ein Großteil der identifizierten Proteine können dem Transport zugeordnet werden	90
3.5.1.2	Die Pyoverdininproduktion von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> ist reduziert	97
3.5.1.3	Die Deletion von <i>paplaB</i> hat Einfluss auf den zentralen Metabolismus	100
4	Diskussion	105
4.1	Bioinformatische Analysen	105
4.2	Produktion, Reinigung und Lokalisation der Phospholipase PaPlaB	107
4.3	Biochemische Charakterisierung von PaPlaB	110
4.4	PaPlaB ist ein Virulenzfaktor von <i>P. aeruginosa</i>	113
5	Zusammenfassung	120
6	Summary	122
7	Referenzen	124
8	Anhang.....	150

8.1	Ergänzung für Kapitel 3.2.2.....	150
8.2	Ergänzung für Kapitel 3.4.4.....	150
8.3	Ergänzung für Kapitel 3.4.5.....	152
8.4	Ergänzung für Kapitel 3.5.1.....	152
8.5	Ergänzung für Kapitel 3.5.1.....	153
8.6	Ergänzung für Kapitel 3.5.1.1.....	160
8.7	Ergänzung für Kapitel 3.5.1.3.....	163
8.8	Ergänzung für Kapitel 4.3.....	165

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Liste der Antibiotikaresistenten Pathogene für die Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika.	3
Abb. 1.2:	Biofilm Lebenszyklus von <i>P. aeruginosa</i>	10
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der vier Zell-Zell-Kommunikationssysteme in <i>P. aeruginosa</i>	12
Abb. 1.4:	Klassifizierung der Phospholipasen anhand ihrer hydrolytischen Spaltungsstellen am Beispiel von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC).	15
Abb. 1.5:	Bekannte Phospholipasen aus <i>L. pneumophila</i> und ihre Lokalisation.	17
Abb. 1.6:	Struktur von LpPlaB.	19
Abb. 1.7:	Bekannte Phospholipasen aus <i>P. aeruginosa</i> und ihre Lokalisation.	22
Abb. 3.1:	Sequenzvergleich und vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von PaPlaB aus <i>P. aeruginosa</i>	56
Abb. 3.2:	PaPlaB 3D-Homologiemodell.....	58
Abb. 3.3:	Validierung des 3D-Modells von PaPlaB.....	58
Abb. 3.4:	Nachweis der Produktion und Esteraseaktivität von PaPlaB in <i>E. coli</i> C43(DE3).	60
Abb. 3.5:	Immunologischer Nachweis von PaPlaB in isolierten Membranen aus <i>E. coli</i> C43(DE3).	62
Abb. 3.6:	Enzymatischer und immunologischer Nachweis der Membranassoziiierung von PaPlaB in <i>E. coli</i> C43(DE3).	62
Abb. 3.7:	Membranlokalisierung von PaPlaB in <i>E. coli</i> C43(DE3).....	64
Abb. 3.8:	Reinigung von PaPlaB aus <i>E. coli</i> C43(DE3) Membranen.....	66
Abb. 3.9:	(Lyso-) PLA-Aktivität von PaPlaB gegenüber natürlichen Phospholipiden mit variierenden Kopfgruppen und Kettenlängen.	67
Abb. 3.10:	PaPlaB hydrolysiert endogene Phospholipide isoliert aus <i>P. aeruginosa</i> PA01.	68
Abb. 3.11:	Bestimmung der PLA-Aktivität von PaPlaB nach der Hydrolyse von PC 18:1-16:0. ...	69
Abb. 3.12:	PaPlaB hydrolysiert Acyl-CoA Thioester mit variierenden Kettenlängen.	71
Abb. 3.13:	Zunahme der PLA-Aktivität mit abnehmender Proteinkonzentration.	72
Abb. 3.14:	Konzentrationsabhängige Oligomerisierung von PaPlaB.	73
Abb. 3.15:	Thermostabilität von PaPlaB.	74
Abb. 3.16:	Inhibierung von PaPlaB.....	75
Abb. 3.17:	Nachweis der Produktion und Esteraseaktivität von PaPlaB-Varianten in <i>E. coli</i> C43(DE3).	77
Abb. 3.18:	PCR Nachweis der erfolgreichen Deletion von <i>paplaB</i> in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i>	79
Abb. 3.19:	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> zeigt eine verringerte intrazelluläre PLA-Aktivität.	80
Abb. 3.20:	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> zeigt ein verlangsamtes logarithmisches Wachstum.	81

Abb. 3.21: Quantitativer Nachweis der Biofilmproduktion von <i>P. aeruginosa</i> PA01 und <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i>	83
Abb. 3.22: CLSM-Aufnahmen von Biofilmen gewachsen unter dynamischen Bedingungen.	84
Abb. 3.23: Im <i>Galleria mellonella</i> -Virulenzversuch ist <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> weniger virulent. ...	86
Abb. 3.24: Von 1870 detektierten Proteinen wurden 315 signifikant unterschiedlich abundante Proteine in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> identifiziert.....	89
Abb. 3.25: 57 % der durch LC-ESI-MS Analysen quantifizierten Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert.....	90
Abb. 3.26: Funktionelle Gruppierung der in der logarithmischen Wachstumsphase abundanten Proteine.....	91
Abb. 3.27: In der stationären Wachstumsphase konnten 89 Proteine dem Transport zugeordnet werden.	93
Abb. 3.28: Schematische Darstellung der Pyoverdinsynthese in <i>P. aeruginosa</i>	98
Abb. 3.29: Die Pyoverdinmenge im Kulturüberstand von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> war reduziert.	100
Abb. 8.1: Lokalisation von PaPlaB Einschlusskörperchen.	150
Abb. 8.2: Analyse der Biofilmarchitektur von <i>P. aeruginosa</i> PA01 und <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i>	151
Abb. 8.3: Einfluss von PaPlaB auf die Virulenz von <i>P. aeruginosa</i> im <i>Galleria mellonella</i> -Virulenzmodell.....	152
Abb. 8.4: Hauptkomponenten-Analyse der globalen Proteomstudie.	152
Abb. 8.5: Die Thioesteraseaktivität von <i>P. aeruginosa</i> PA01 und Δ <i>plaB</i> unterscheidet sich nicht.	165

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Übersicht über alle verwendeten Bakterienstämme.	25
Tab. 2.2:	Übersicht über alle verwendeten Plasmide.	26
Tab. 2.3:	Verwendete Oligonukleotide.....	27
Tab. 2.4:	Verwendete Antibiotika.....	28
Tab. 2.5:	Einstellungen für das Mikroskop.	33
Tab. 2.6:	Einstellungen für die Fraktionierung der Proben an der <i>Gradient Station</i>	36
Tab. 2.7:	Zusammensetzung des <i>Phusion</i> [®] -PCR Reaktionsansatzes.	39
Tab. 2.8:	Reaktionsbedingungen für die <i>Phusion</i> [®] -PCR.	39
Tab. 2.9:	Reaktionsbedingungen für die <i>QuikChange</i> [®] -PCR.	40
Tab. 2.10:	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.....	42
Tab. 2.11:	Alle in dieser Arbeit verwendeten (Lyso-) Phospholipide.	46
Tab. 2.12:	Alle in dieser Arbeit verwendeten Acyl-Coenzym A Substrate.	47
Tab. 2.13:	Standardproteine für die Größenausschlusschromatographie.....	49
Tab. 3.1:	Liste der verwendeten Phospholipasen für die BLAST- und UniProt-Suche.	54
Tab. 3.2:	GC-MS Quantifizierung von Ölsäure (C18:1) und Palmitinsäure (C16) nach der Hydrolyse von PC 18:1-16:0 durch PaPlaB.....	70
Tab. 3.3:	Quantifizierung der CLSM-Aufnahmen mit dem Programm BiofilmQ.	84
Tab. 3.4:	Unterschiedlich abundante Proteine in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> , die verschiedenen COG-Transportprozessen zugeordnet werden konnten (4 h Kultivierung).....	92
Tab. 3.5:	Unterschiedlich abundante Proteine in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> , die der COG-Kategorie „Transport“ zugeordnet werden konnten (24 h Kultivierung).....	94
Tab. 3.6:	Signifikant abundanten Proteine, die der Pyoverdinsynthese zugeordnet werden konnten.....	98
Tab. 3.7:	Signifikant abundanten Proteine, die dem „Lipidtransport & Metabolismus“ und der „Energiehomöostase“ zugeordnet wurden.	101
Tab. 8.1:	Zahlenwerte für die Erstellung des Box-Plot Diagramms für die Biofilmanalyse mit Kristallviolett.....	150
Tab. 8.2:	Alle durch Proteomstudien als signifikant abundanten in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> identifizierten Proteine.....	153
Tab. 8.3:	Identifizierte Proteine, die verschiedenen COG-Transportprozessen zugeordnet werden können (24-stündige Kultivierung).....	160
Tab. 8.4:	Signifikant abundanten Proteine, die dem „Lipidtransport & Metabolismus“ und der „Energiehomöostase“ zugeordnet wurden.	163
Tab. 8.5:	Hoch abundante Protein in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i> , die RpoS reguliert sind (24 h).....	164

Abkürzungen

<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillatum</i> (destilliertes Wasser, vollentsalzt)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A.U.	<i>arbitrary units</i>
Bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
COG	<i>clusters of orthologous groups</i> , Gruppierung orthologer Gruppen
C-terminal	Carboxy-terminal
(k)Da	(Kilo-) Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DUF	<i>domain of unknown function</i> , Domäne
eDNA	Extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FFA	<i>free fatty acid</i> , freie Fettsäure
g (ml, µg)	Gramm (Milli-, Mikro-)
h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kPA	Kilopascal
KÜ	Kulturüberstand
LV	Leervektor
l (ml, µl)	Liter (Milli-, Mikro-)
M	molar (mol/l)
m (µm, nm)	Meter (Mikro-, Nano-)
min	Minute(n)
Mol (nmol)	Mol (Nano-)
N-terminal	Amino-terminal
O.D. _{580nm}	optische Dichte bei 580nm
OMPLA	<i>outer membrnae Phospholipase A</i>
ORFs	<i>open reading frame(s)</i> , offene(r) Leserahmen
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NPB	<i>para</i> -Nitrophenyl-Butyrat
PQS	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QS	<i>quorum sensing</i> , Zell-Zell-Kommunikationssystem
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T _M	Schmelztemperatur
U	<i>unit(s)</i> (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtskultur
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
WHO	<i>world health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
λ _{EM}	Emissions Wellenlänge
λ _{EX}	Anregungswellenlänge

1 Einleitung

Im 19. Jahrhundert war es Robert Koch, der damals verstand, dass Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Cholera oder Diphtherie auf kleine Organismen, die Bakterien, zurückzuführen sind (Blevins & Bronze, 2010). Mit der Entdeckung und Erforschung von Antibiotika war eine ersehnte Lösung gefunden, bakterielle Infektionskrankheiten zu bekämpfen. Jedoch führte deren breite, häufig übermäßige Verwendung leider oft auch zu einer rasanten Entwicklung von multiresistenten Keimen (Shallcross & Davies, 2014), die sich häufig vor allem in Krankenhäusern verbreiten. Allein in Deutschland infizieren sich jedes Jahr 400.000-600.000 Patienten mit nosokomialen (also in Krankenhäusern zugezogenen) Infektionen, davon schätzungsweise 30.000-35.000 Patienten mit multiresistenten Keimen. Schätzungen gehen davon aus, dass jährlich 1.000-4.000 Patienten durch das Fehlen wirksamer Antibiotika versterben (Gastmeier *et al.*, 2016). Solche Keime erschweren heutzutage die Behandlung von Infektionskrankheiten, da zu diesem Zeitpunkt keine Alternativen zu konventionellen Antibiotika zur Verfügung stehen. Deshalb erscheint es wichtig, neben Antibiotika mit neuen Angriffspunkten auch ergänzende und alternative Strategien zur Behandlung von bakteriellen Infektionen zu entwickeln, weshalb man auch von der beginnenden *post* Antibiotika-Ära spricht (Maeda *et al.*, 2012). Zurzeit werden z.B. Therapien mit Bakteriophagen als Antibiotikaalternativen getestet (de Bentzmann & Plésiat, 2011). Neben Antibiotika und Bakteriophagen, die das Abtöten der Erreger zum Ziel haben und somit immanent einen starken Selektionsdruck auf die Bakterien bewirken, wird auch vermehrt ein Fokus auf Strategien gesetzt, welche nicht die Viabilität, sondern die Virulenz der Bakterien schwächen sollen. Hierzu zählen die Unterdrückung der Biofilmbildung, der Zell-Zell-Kommunikation oder die Inaktivierung von Virulenzfaktoren. Dies erfordert ein tiefes Verständnis der zugrundeliegenden physiologischen Prozesse und Mechanismen der virulenzassoziierten Proteine (Fothergill *et al.*, 2012).

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1894 wurde die Gattung *Pseudomonas* von dem deutschen Botaniker Walter Migula (Migula, 1897) erstmals als Gram-negative stäbchenförmige Bakterien beschrieben und später in der Familie der *Pseudomonadaceae* angesiedelt (Winslow *et al.*, 1917; Olsen *et al.*, 1994). *Pseudomonadaceae* gehen aus der Ordnung der *Pseudomonadales* hervor, welche wiederum zur Klasse der γ -Proteobakterien gehören. Einer der bekanntesten Vertreter der *Pseudomonadaceae* ist das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (Bodey *et al.*, 1983; Gellatly & Hancock, 2013), ein

polar begeißeltes Bakterium, welches nicht in der Lage ist Sporen zu bilden (Sadikot *et al.*, 2005; Stanier *et al.*, 1966). Ein besonders auffallendes und charakteristisches Merkmal dieser Art ist die grüne Farbe, welcher das Bakterium seinen Namen (*aerugo*, lat. = Grünspan) verdankt. Diese wird hervorgerufen durch die Produktion zweier Pigmente, des Pyocyanins und des Pyoverdins (Frank & DeMoss, 1959; Meyer & Abdallah, 1978; Cezard *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* ist ubiquitär verbreitet und im Boden, Wasser sowie Sümpfen lebensfähig (Green *et al.*, 1974; Hardalo & Edberg, 1997; Stover *et al.*, 2000). Dies ist möglich, da das Bakterium unter anderem in der Lage ist, heterozyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle zu nutzen und sich an äußere Umwelteinflüsse anzupassen (Mathee *et al.*, 2008; Palleroni, 1986). Pflanzen- und Tiergewebe, sowie Insekten können ebenfalls von dieser Art, die zu den humanpathogenen Erregern gehört, besiedelt werden (Hardalo & Edberg, 1997; Mahajan-Miklos *et al.*, 2000). 100 Jahre nach der Entdeckung von *P. aeruginosa* konnte das komplette Genom sequenziert werden, welches mit 6,3 Millionen Basenpaaren und 5570 offenen Leserahmen (ORFs) zum damaligen Zeitpunkt das größte sequenzierte bakterielle Genom darstellte (Stover *et al.*, 2000). *Saccharomyces cerevisiae* als Vertreter der Eukaryoten besitzt 6200 offene Leserahmen und ist damit nicht viel komplexer als *P. aeruginosa* (Ball *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* ist der am häufigsten in nosokomiale Infektionen vorkommende Keim (Cross *et al.*, 1983; Van Delden & Iglewski, 1998; Gellatly & Hancock, 2013). Die Infektionen betreffen sowohl Augen und Brandwunden (Tredget *et al.*, 2004) als auch die Atemwege (Winstanley & Fothergill, 2009). In gesunden Menschen schafft es die körpereigene Abwehr, durch Schleim und Wassersekretion die ASL-Schicht (*airway surface liquid*) zu bilden, um das Eindringen der Keime in die Blutbahn und subzelluläre Bereiche zu verhindern und ihn mit jedem Atemzug nach außen zu befördern (Williams *et al.*, 2010). Besonders für immunsupprimierte Patienten, die unter Zystischer Fibrose (ZF) leiden, sowie künstlich beatmete Patienten stellt dieser Organismus eine Gefahr dar (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Jaeger, 1994; Cross *et al.*, 1983; Bodey *et al.*, 1983) und ist daher auch auf der im Jahre 2017 von der Welt Gesundheitsorganisation (WHO, *world health organisation*) veröffentlichten Liste von multiresistenten Pathogenen, für die dringend neue Antibiotika entwickelt bzw. erforscht werden müssen, zu finden (Tacconelli *et al.*, 2018; Abb. 1.1).

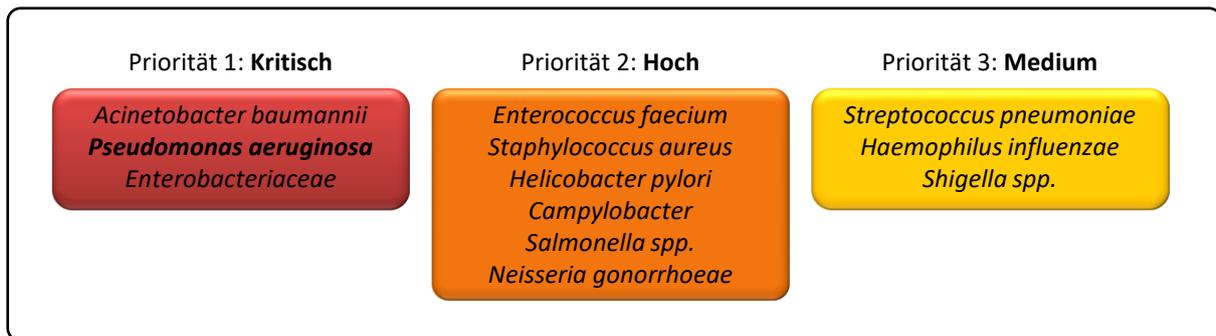


Abb. 1.1: Liste der Antibiotikaresistenten Pathogene für die Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika. Die Abbildung wurde nach dem Bericht der WHO (WHO, 2017) modifiziert.

Wie aus Abb. 1.1 ersichtlich ist, gibt es eine Vielzahl von Pathogenen, die bereits gegen verschiedene Antibiotika resistent sind. Aus einem epidemiologischen Report für das Jahr 2016 geht hervor, dass 27 % der aus Patienten mit nosokomialen Lungenentzündungen isolierten *P. aeruginosa* Stämme resistent gegenüber Carbapenem und Ceftazidim waren (ECDC, 2018; Strateva & Yordanov, 2009). Eine besondere Herausforderung ist nicht nur, dass *P. aeruginosa* sehr leicht multiple Resistenzen ausbildet (Livermore, 2002; Lister *et al.*, 2009), sondern auch in Seifen und Desinfektionsmitteln überleben kann (Vasil, 1986; Stover *et al.*, 2000; Lister *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* entwickelt sehr schnell Resistenzen gegenüber Antibiotika sogar während des Verlaufs einer Behandlung (Lister *et al.*, 2009). Resistenzen können sowohl über mobile Elemente wie den Plasmiden aber auch durch Prozesse, welche die Genexpression beeinflussen, entstehen (Obritsch *et al.*, 2004; Lister *et al.*, 2009). Eine besonders problematische Eigenschaft des Bakteriums ist die Vielzahl von Effluxpumpen mit der Fähigkeit, antibakterielle Stoffe zu sekretieren und damit von ihrem Wirkort fernzuhalten (Grishin *et al.*, 2015; Schweizer, 2003). Ein Beispiel ist das Efflux-System, bestehend aus den vier genetisch unterschiedlichen dreiteiligen Komponentensystem MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN und MexX-MexY-OprM (Livermore, 2001; Livermore, 2002). MexB, MexD und MexF stellen die Pumpen dar, welche in der zytoplasmatischen Membran liegen. Sie sind über ein Lipoprotein (MexA, MexC, MexE) mit OprM, OprJ oder OprN verbunden. Das MexA-MexB-OprM System sekretiert β -Lactamasen und verschiedenen Antibiotika wie Chloramphenicol und Tetracyclin, Fluoroquinolone und Sulfonamide (Poole, 2001). Die Expression anderer Efflux-Systemen wie MexC-MexD-OprJ und MexE-MexF-OprN führt zu Resistenzen gegenüber Fluoroquinolonen und β -Lactamasen. Aminoglykoside werden bei Hochregulierung des MexX-MexY-OprM Systems beeinflusst.

1.2 Sekretionswege in *P. aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt alle bekannten Sekretionssysteme (T1SS-T6SS, Typ (1-6)-Sekretionssystem) von Gram-negativen Bakterien mit Ausnahme des Typ IV-Sekretionsweges, dessen Funktion wahrscheinlich vom Typ III-Sekretionsapparat übernommen wird (Filloux, 2011). Grundsätzlich können die Sekretionssysteme in zwei Kategorien unterteilt werden. Bei der Einschritt-Sekretion werden Proteine direkt vom Zytoplasma zur Zelloberfläche transportiert. Die Zweischritt-Sekretion zeichnet sich dadurch aus, dass Proteine erst über die innere Membran ins Periplasma und von da aus zur äußeren Membran transportiert werden (Rosenau & Jaeger, 2000; Filloux, 2011). Der Transport ins Periplasma kann entweder ungefaltet über den Sec oder gefaltet über den Tat-Weg (*twin arginine translocation*), stattfinden (Green & Meccas, 2016). Der Transport in oder über die äußere Membran wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Es kann insgesamt zwischen sieben unterschiedlichen Sekretionssystemen unterschieden werden. Die Phospholipase C (PLC) ist ein Beispiel für eine über den Tat-Weg sekretierte Phospholipase. Insgesamt wurden 18 Tat-sekretierte und virulenzassoziierte Proteine in *P. aeruginosa* identifiziert (Ochsner *et al.*, 2002).

Typ I-Sekretionssystem (ABC-Transporter):

Das Typ I-Sekretionssystem stellt ein Einschritt-System dar, welches aus einer ATP-bindende Kasette (*ATP-binding cassette*, ABC), welche die innere Membran durchquert, einem Membranfusionsprotein (*membrane fusion protein*, MFP) und einem äußeren Membranfaktor (*outer membrane factor*, OMF) besteht. Der ABC-Transporter verwendet die durch ATP-Hydrolyse gewonnene Energie für den Transfer des Substrats (Green & Meccas, 2016). Die alkalische Proteasen AprA und AprX sind zwei bekannte Substrate, welche über diesen Sekretionsweg transportiert werden (Duong *et al.*, 2001; Filloux, 2011).

Typ II-Sekretionssystem:

Um gefaltete Proteine aus dem Periplasma in den extrazellulären Raum zu transportieren, wird der Typ II-Sekretionsweg verwendet. Für den Transport über die innere Membran müssen die Proteine jedoch zunächst über den Sec- oder Tat-Sekretionsweg transportiert werden. Hierzu müssen die Proteine am N-Terminus ein Sec- oder Tat-abhängiges Signalpeptid aufweisen (Korotkov *et al.*, 2012).

Erfolgt der Sec-abhängige Transport über die innere Membran, muss das Protein anschließend im Periplasma noch gefaltet werden. Tat-sekretierte Proteine werden gefaltet sekretiert. Ein Beispiel für ein Typ II-sekretiertes Protein ist das Exotoxin A aus *P. aeruginosa* (Lu & Lory, 1996).

Typ III-Sekretionssystem:

Als Injektisom oder Nadel-ähnlicher Apparat wird das Typ III-Sekretionssystem bezeichnet, welches ein Einschritt-System darstellt und für die Zytotoxizität von *P. aeruginosa* verantwortlich ist. Mit diesem System ist es möglich, ein Substrat direkt in die Zellemembran des Wirtes zu injizieren (Green & Mecsas, 2016). Der Sekretionsapparat besteht aus drei Komponenten: Dem Basal-Körper, der Nadel-ähnliche Apparat und das Translokon. Der Basal-Körper durchspannt die innere und äußere Membran und bildet eine sockelartige Struktur. Dieser wird in den meisten Systemen aus 15 Proteine gebildet. Der Transport in den extrazellulären Raum wird durch diese Nadel ermöglicht. Das Translokon ermöglicht den Transport der Effektorproteine durch die Wirtsmembran (Abrusci *et al.*, 2014; Green & Mecsas, 2016). Typische Substrate stellen Effektorproteine dar, die teilweise ein spezifisches Chaperon haben, welches sie zum Sekretionsapparat führt, wo sie dann in einem ungefalteten Zustand, ATP-abhängig transportiert werden (Green & Mecsas, 2016). Bekannte Beispiele für Typ III-sekretierte Effektorproteine aus *P. aeruginosa* sind ExoU,S,T,Y (Berthelot *et al.*, 2003). Wie das Typ III-Sekretionssystem als Virulenzfaktor agiert, wird in Kapitel 1.3.2 beschrieben.

Typ V-Sekretionssystem (Autotransporter):

Das Typ V-Sekretionssystem besteht aus insgesamt fünf Untergruppen, bezeichnet mit Typ Va bis Ve (Leo *et al.*, 2012). Autotransporter-Substrate haben die Besonderheit, dass sie sich selbst transportieren (Green & Mecsas, 2016). Sie tragen eine β -Faltblatt-Domäne, welche sich in die äußere Membran integriert, dort einen Kanal bildet und den Rest des Proteins, aber auch andere Proteine durch die Membran passieren lässt (Leyton *et al.*, 2012). Für den Transport durch die innere Membran besitzen die Proteine ein Sec-Signalpeptid (van Ulsen *et al.*, 2014). Das Typ V-Sekretionssystem gehört somit ebenfalls zu den Zweischritt-Systemen. Für *P. aeruginosa* sind vier Autotransporter beschrieben unter anderem die Phospholipase PlpD, EstA und EprS, welche eine Rolle für die Virulenz des Bakteriums spielen (Wilhelm *et al.*, 2007; Salacha *et al.*, 2010; Kida *et al.*, 2013).

Typ VI-Sekretionssystem (T6SS):

Der Einschnitt-Transport von Effektorproteinen zwischen Bakterien erfolgt über das Typ VI-Sekretionssystem und stellt eine Waffe dar, um andere Bakterien zu töten oder zu inhibieren (Green & Meccas, 2016; Mougous *et al.*, 2006; Coulthurst, 2019). Ungefähr 25 % der Proteobakterien besitzen wenigstens ein Typ VI-Sekretionssystem (T6SS A-D) in ihrem Genom (Bingle *et al.*, 2008). ClpV stellt eine ATPase dar, welche in den Typ VI-Sekretionsapparat involviert ist und als Energielieferant dienen kann (Filloux, 2009). Der Sekretionsapparat besteht aus mehreren Proteinen, welche zu der Familie der mit Hämolyisin koregulierten Proteine (Hcp) gehören (Filloux, 2009; Hood *et al.*, 2010). Das H1T6SS (Hcp *Secretion Island-I-encoded* Typ VI-Sekretionssystem) aus *P. aeruginosa* ist wichtig für die Fitness der Bakterien in chronischen Infektionen wie der Zystischen Fibrose (Mougous *et al.*, 2006). Bekannte Substrate sind die Proteine Tse1-3 (Filloux, 2009). Der TagQRST Komplex in *P. aeruginosa* erkennt Moleküle, die durch das T6SS von Nachbarzellen injiziert werden. Dies führt zur Aktivierung von PpkA und gleichzeitig zum Rücktransport der Moleküle über das H1-T6SS (Coulthurst, 2019).

1.3 Virulenzfaktoren

Eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, welche dem Bakterium seine pathogene Wirkung geben, werden von *P. aeruginosa* produziert. Diese sind besonders wichtig für die Kolonisation von Wirtsgeweben, das Überleben im Wirt (Van Delden & Iglewski, 1998; Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011; Sadikot *et al.*, 2005) und für die Fähigkeit, Zellen des Wirtes zu zerstören (Zulianello *et al.*, 2006). Des Weiteren können einige Virulenzfaktoren die Zellphysiologie, die Zellform, die Membrandurchlässigkeit und die Proteinsynthese beeinflussen (Ballok & O'Toole, 2013).

1.3.1 Zellossoziierte Virulenzfaktoren

Zu den zellossoziierten Virulenzfaktoren gehören Lipopolysaccharide (Cryz *et al.*, 1984), Flagellen und Pili (Van Delden & Iglewski, 1998).

Lipopolysaccharide, kurz LPS, sind an der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien lokalisierte Endotoxine und stellen eine Barriere für schädliche Moleküle wie Antibiotika dar (Maldonado *et al.*, 2016). LPS bestehen aus drei Domänen: dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen. Lipid A (Endotoxin) stellt den hydrophoben, Glucosamin-basierten Anker der LPS dar (Raetz & Whitfield, 2002). Bereits sehr geringe Konzentrationen des Lipid A reichen aus, um eine

Immunantwort auszulösen und Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen anzuregen (Ramachandran, 2014). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Lipid A-Modifikationen (Zystische Fibrose-spezifische *P. aeruginosa*) zu einer erhöhten Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden und Erkennung durch den humanen *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) führten (Ernst *et al.*, 2003). Die Kernregion der LPS besteht hauptsächlich aus 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO), Phosphaten und Oligosacchariden (Wilkinson, 1996; Holst & Molinaro, 2010). 1996 konnte gezeigt werden, dass die äußere Kernregion den Eintritt der Pseudomonaden in die Lunge und kornealen Epithelzellen ermöglicht (Pier *et al.*, 1996; Zaidi *et al.*, 1996). Den dritten Bereich der Lipopolysaccharide stellt das O-Antigen dar, welches ein Polysaccharid aus Zuckern wie Glukose, Mannose, Rhamnose oder Galaktose darstellt (Bystrova *et al.*, 2006; Pier, 2007). Das O-Antigen ist Bakterien-spezifisch und in zahlreichen Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass das O-Antigen das Hauptangriffsziel für eine schützende Immunantwort zum Beispiel bei einer Impfung darstellt (Pier, 2007).

Flagellen ermöglichen Bakterien durch Bewegung, z.B. Chemotaxis, Umgebungen neu zu erschließen, die eine vorteilhaftere Nährstoffversorgung gewährleisten (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013; Duan *et al.*, 2013). Weiterhin sind Flagellen an der frühen Biofilmbildung, Adhäsion und Invasion beteiligt (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013). Flagellen bestehen hauptsächlich aus Flagellin, das über einen eigenen Sekretionsapparat an der Basis des Flagellums sekretiert wird. Flagellin gehört zu den pathogenassoziierten Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), die dem Immunsystem ermöglichen, das Eindringen von Bakterien zu erkennen und eine Entzündungsreaktion auszulösen (Sato *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2013). Zudem wurde im Jahre 1999 der Flagellumapparat als Transportweg für nicht-flagellare, aber virulenzassoziierte Effektorproteine beschrieben (Young *et al.*, 1999). Flagellen sind somit ein wichtiger Ansatzpunkt für die Immunantwort des Wirtes. Es konnte gezeigt werden, dass in den Atemwegen von Patienten mit Zystischer Fibrose *P. aeruginosa* in der Lage war, dem Immunsystem zu entgehen, in dem systematisch verschiedene transkriptionelle Regulationswege aktiviert bzw. die Flagellinsynthese runterreguliert wurde (Wolfgang *et al.*, 2004).

Typ IV-Pili sind in der bakteriellen Adhäsion, DNA-Aufnahme, der Biofilmbildung und der Bewegungsform *twitching* (Zuckbewegung) beteiligt (Zolfaghar *et al.*, 2003; Haiko & Westerlund-Wikström, 2013; Leighton *et al.*, 2015). Als *twitching* wird die Flagella-unabhängige Bewegungsform auf feuchtem Grund bezeichnet und beruht auf der Extension und Kontraktion von Pili (Mattick, 2002). Mutanten, die keine Typ IV-Pili besitzen, zeigen eine beeinträchtigte Kolonisierung des Wirtes und sind weniger infektiös (Farinha *et al.*, 1994; Leighton *et al.*, 2015).

1.3.2 Nicht-zellassozierte Virulenzfaktoren

Exotoxin A, Proteasen, Rhamnolipide, Lektine und Phospholipasen sind Beispiele für nicht-zellassozierte, extrazelluläre Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* (Strateva & Mitov, 2011).

Das Exotoxin A ist ein zytotoxisches Protein, welches die ADP-Ribosylierung von Proteinen katalysiert und den Elongations-Faktor 2 inaktiviert. Dies führt wiederum zur Inhibierung der Proteinbiosynthese und zum Zelltod (Wick *et al.*, 1990; Van Delden & Iglewski, 1998; Armstrong *et al.*, 2002). Zugleich ist das Exotoxin A für Gewebsschädigungen und das bakterielle Eindringen verantwortlich (Woods & Iglewski, 1983). Manafi und Mitarbeiter zeigten, dass die aktive Immunisierung von Mäusen mit semi-gereinigtem Exotoxin A zu einer reduzierten Sterblichkeit führt und sogar vor einer Infektion mit *P. aeruginosa* schützt (Manafi *et al.*, 2009).

Die Zink-Metalloprotease LasB, die Serinprotease LasA und die alkalische Protease AprA sind Beispiele für Enzyme, die während der akuten Infektion mit *P. aeruginosa* eine wichtige Rolle spielen (Van Delden & Iglewski, 1998). LasAB besitzen die Fähigkeit, Elastin zu zerstören. Elastin ist wichtig für die Entwicklung der Lunge, deren Kontraktion und ist Bestandteil von Blutgefäßen (Galloway, 1991; Strateva & Mitov, 2011). LasB und AprA agieren zudem synergistisch bei der Inaktivierung von humanen Zytokinen wie dem Gamma-Interferon und den Tumornekrosefaktoren (Parmely *et al.*, 1990; Kuang *et al.*, 2011), weshalb LasB nicht nur Gewebe zerstören kann, sondern auch die Wirtsabwehrmechanismen stört (Strateva & Mitov, 2011).

Rhamnolipide sind Glykolipid-Biotenside (*biosurfactants*), welche die Aufnahme und den Abbau von schwer löslichen Substraten fördern. Sie besitzen antimikrobielle Wirkung, sind Immunmodulatoren und an der Biofilmbildung beteiligt (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Für das Eindringen von *P. aeruginosa* in das Atemwegsepithel ist die Sekretion von Rhamnolipiden essenziell (Zulianello *et al.*, 2006). Sie dienen der Aufnahme von hydrophoben Substraten wie *n*-Alkanen und erhöhen den Abbau von schwach löslichen Molekülen; eine geringe Zugabe von Rhamnolipiden führt zur Freisetzung der LPS wodurch die Oberfläche hydrophober wird (Al-Tahhan *et al.*, 2000; Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rhamnolipide für das *swarming* (schwärmen) der Zellen notwendig sind. Hierbei handelt es sich um eine Flagellum-abhängigen Bewegungsform über halb feste Oberflächen (Köhler *et al.*, 2000; Caiazza *et al.*, 2005).

Typ III-Sekretionssysteme (T3SS) von *P. aeruginosa* transportieren Effektorproteine direkt in das Zytoplasma des infizierten Wirtes (Hauser, 2009). ExoS, ExoT, ExoU und ExoY stellen vier Effektorproteine dar, die über das T3SS sekretiert werden (Aiello *et al.*, 2010). ExoST besitzen

beide GTPase- und ADP-Ribosyltransferase Aktivität und weisen innerhalb der Primärstruktur eine hohe Aminosäureidentität auf (75 %). Die Aktivität der beiden Proteine führt zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts und einem Apoptose-ähnlichen Zelltod (Yahr *et al.*, 1996). ExoU ist eine PLA₁ (Kapitel 1.5.3; Phillips *et al.*, 2003) und ExoY stellt eine Adenylylcyclase dar, welche in der Wirtszelle durch Aktin (F-Aktin) aktiviert wird und für die Synthese von zyklischen Nukleotidmonophosphaten verantwortlich ist (Belyy *et al.*, 2016). Die Inhibierung des T3SS stellt eine vielversprechende Antibiotika-unabhängige Therapie zur Behandlung von akuten Infektionen dar (Anantharajah *et al.*, 2016).

Lektine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine, welche diverse Zucker an der Zellmembran erkennen und an der Zell-Zell-Kommunikation und Wirt-Pathogen-Interaktion beteiligt sind (Vijayan & Chandra, 1999; Ofek *et al.*, 2013). Des Weiteren können Lektine Erythrozyten agglutinieren, was als Hämagglutination bezeichnet wird (Gilboa-Garber, 1982). In *P. aeruginosa* sind zwei lösliche Lektine bekannt, LecA (PA-IL) und LecB (PA-IIL), welche spezifisch für Galaktose und Fruktose sind (Gilboa-Garber, 1982; Sonawane *et al.*, 2006). Für LecB wurde eine Beteiligung an der Pili-Biogenese und der Biofilmbildung nachgewiesen (Tielker *et al.*, 2005; Chemani *et al.*, 2009). Für LecA konnte gezeigt werden, dass es zytotoxische Effekte auf Atemwegs Epithelzellen hat (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994) und in der Biofilmbildung als Adhäsion wirkt (Diggle *et al.*, 2006).

Aus der Literatur ist bekannt, dass sekretierte bakterielle Phospholipasen z.B. die Plasmamembran des Wirtes zerstören können, Signalwege und Entzündungsreaktionen beeinflussen und zytotoxisch gegenüber menschlichen Monozyten sind (Flores-Diaz *et al.*, 2016). Detailliert werden Phospholipasen und deren Funktion in Kapitel 1.5 beschrieben.

1.3.3 Biofilm, ein effektiver Schutz vor externen Einflüssen

Der Begriff „Biofilm“ wurde das erste Mal im Jahre 1981 von McCoy *et al.*, angewendet, nachdem drei Jahre zuvor eine Bakteriengemeinschaft beschrieben wurden, die an einer Oberfläche haftet und in einer Matrix eingebettet war (Costerton *et al.*, 1978; Bjarnsholt, 2013). Diese Matrix wird von den Bakterien selbst produziert und besteht aus Wasser, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), extrazellulärer DNA (eDNA), Nukleinsäuren, Polysacchariden und Proteinen (Costerton *et al.*, 1999; Sutherland, 2001; Flemming & Wingender, 2010; Wei & Ma, 2013). Durch diese Matrix werden die Bakterien zusammengehalten und bleiben an der Oberfläche gebunden (Rasamiravaka *et al.*, 2015; Abb. 1.2).

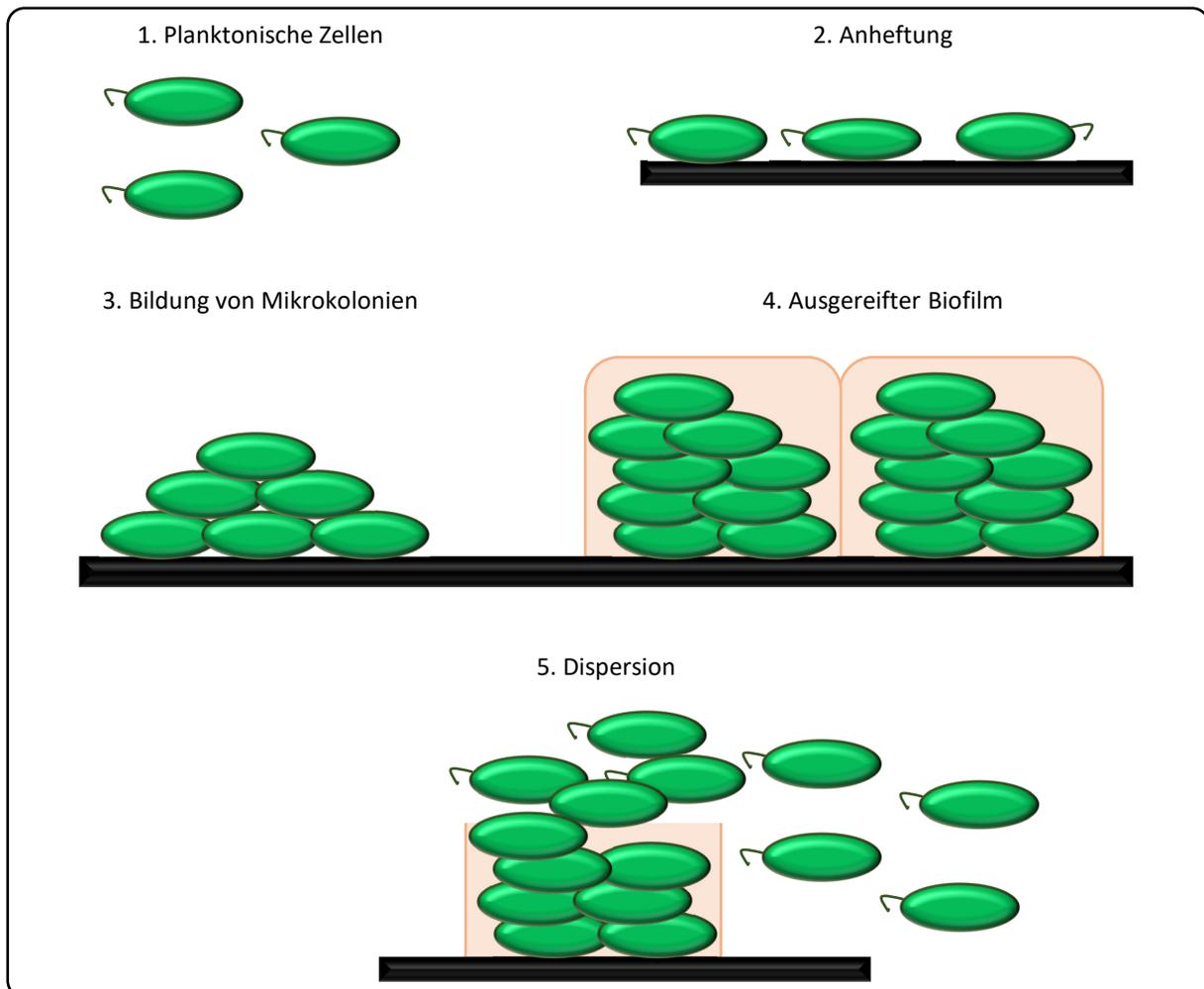


Abb. 1.2: Biofilm Lebenszyklus von *P. aeruginosa*.

Planktonische Zellen (1) heften sich reversibel an eine Oberfläche (2). Nachdem die Zellen irreversibel an der Oberfläche haften, bilden sich Mikrokolonien (3) in der exopolymeren Matrix (EPS). Die Zellen gehen von einem beweglichen in einen unbeweglichen Zustand über. Die Mikrokolonien breiten sich aus, alle noch freien Stellen auf der Oberfläche werden bedeckt und der Biofilm nimmt eine dreidimensionale Struktur an (4). Nachdem der Biofilm vollständig gereift ist, lösen sich die Zellen aus dem Biofilm (Dispersion), um neue Oberflächen zu besiedeln (5). Die Abbildung wurde mit Genehmigung des Rechteinhabers aus Welch *et al.*, 2005 (The Royal Society of Chemistry) entnommen und modifiziert.

Fünf Stadien werden von der Entwicklung bis zur Reifung des Biofilms durchlaufen: (1) Planktonische Zellen heften sich reversibel an eine Oberfläche (2), (3) Bildung von Mikrokolonien durch Vermehrung in der EPS, aktive Bewegung durch *twitching* und irreversible Haftung der Zellen an die Oberfläche (O'Toole & Kolter, 1998; O'Toole *et al.*, 2000). Sobald die Biofilmbildung initiiert wurde, verringert sich die flagellare Genexpression wodurch die Zellen unbeweglich werden (Guttenplan & Kearns, 2013). Für den Wechsel von einem beweglichen zu einem sessilen Lebensstil ist der sekundäre Botenstoff (3',5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) verantwortlich (Hengge, 2009). Das c-di-GMP Level steigt um ein drei bis fünffaches, wenn die Zellen auf einer Agarplatte wachsen, im Vergleich zu Zellen in Flüssigkultur (Kuchma *et al.*, 2012). Die vollständige Reifung des Biofilms erfolgt (4), der eine dreidimensionale Struktur annimmt.

Danach lösen sich einzelne Zellen aus der Biofilmstruktur (5) und besiedeln neue Oberflächen (O'Toole *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2005; Rasamiravaka *et al.*, 2015).

Die Biofilmbildung ist ein sehr effektiver Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen und schädlichen Substanzen wie Antibiotika, Desinfektionsmitteln, anderen chemischen Molekülen und dem Immunsystem (Costerton *et al.*, 1999; Welch *et al.*, 2005; Shrouf *et al.*, 2011; Bridier *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass Biofilme in Zusammenhang mit chronischen Krankheiten stehen und durch die Besiedlung von medizinischen Instrumenten ein enormes Problem darstellen (Costerton *et al.*, 1999; Donlan & Costerton, 2002; Roberts, 2013; Srivastava A., 2019). Innerhalb der Biofilme kommunizieren die Bakterien miteinander, weshalb lange Zeit angenommen wurde, dass die Biofilmbildung von dem Zell-Zell-Kommunikationssystem (Kapitel 1.4) reguliert wird (Majumdar & Pal, 2017). Mittlerweile wurde jedoch gezeigt, dass die Biofilmbildung deutlich komplexer und abhängig von mehreren Faktoren ist. Untersuchungen bestätigten, dass Umwelteinflüsse (Kirisits & Parsek, 2006), die Kohlenstoffquelle (Sauer *et al.*, 2004; Shrouf *et al.*, 2011), Rhamnolipide (Davey *et al.*, 2003; Nickzad & Déziel, 2014), die Beweglichkeit der Zellen (Klausen *et al.*, 2003), Eisenverfügbarkeit (Banin *et al.*, 2005), die beiden zuckerbindenden Lektine LecAB (Diggle *et al.*, 2006; Tielker *et al.*, 2005) und Zweikomponenten-Systeme einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben (Mikkelsen *et al.*, 2011). Die Versorgung der Biofilme mit Nährstoffen erfolgt über wasserführende Kanäle (de Beer *et al.*, 1994, 1996). Biofilme bilden einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Antivirulenz-Strategien. Angriffspunkte stellen hierbei die Adhäsion der Bakterien, die Produktion der EPS, das Auflösung bereits existierender Biofilme und die Unterdrückung des Zell-Zell-Kommunikationssystems dar (Parrino *et al.*, 2018; Fleitas Martínez *et al.*, 2019).

1.4 Zell-Zell-Kommunikationssysteme in *P. aeruginosa*

Extrazelluläre, sekretierte Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* stehen unter der Kontrolle des Zell-Zell-Kommunikationssystems, auch *quorum sensing* genannt (QS; Van Delden & Iglewski, 1998; Fothergill *et al.*, 2012). Das Kommunikationssystem basiert im Allgemeinen auf der interzellulären Informationsweitergabe zwischen Bakterien mit Hilfe diffusionsfähiger Moleküle (*diffusible signalling factors*) in Abhängigkeit der Zelldichte, um auf Reize aus der Umwelt zu reagieren (Fuqua *et al.*, 2001; Schuster & Greenber, 2006; Whitehead *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* besitzt mindestens vier interagierende Kommunikationssysteme Las, Rhl, PQS und IQS. (Lee & Zhang, 2015; Abb. 1.3).

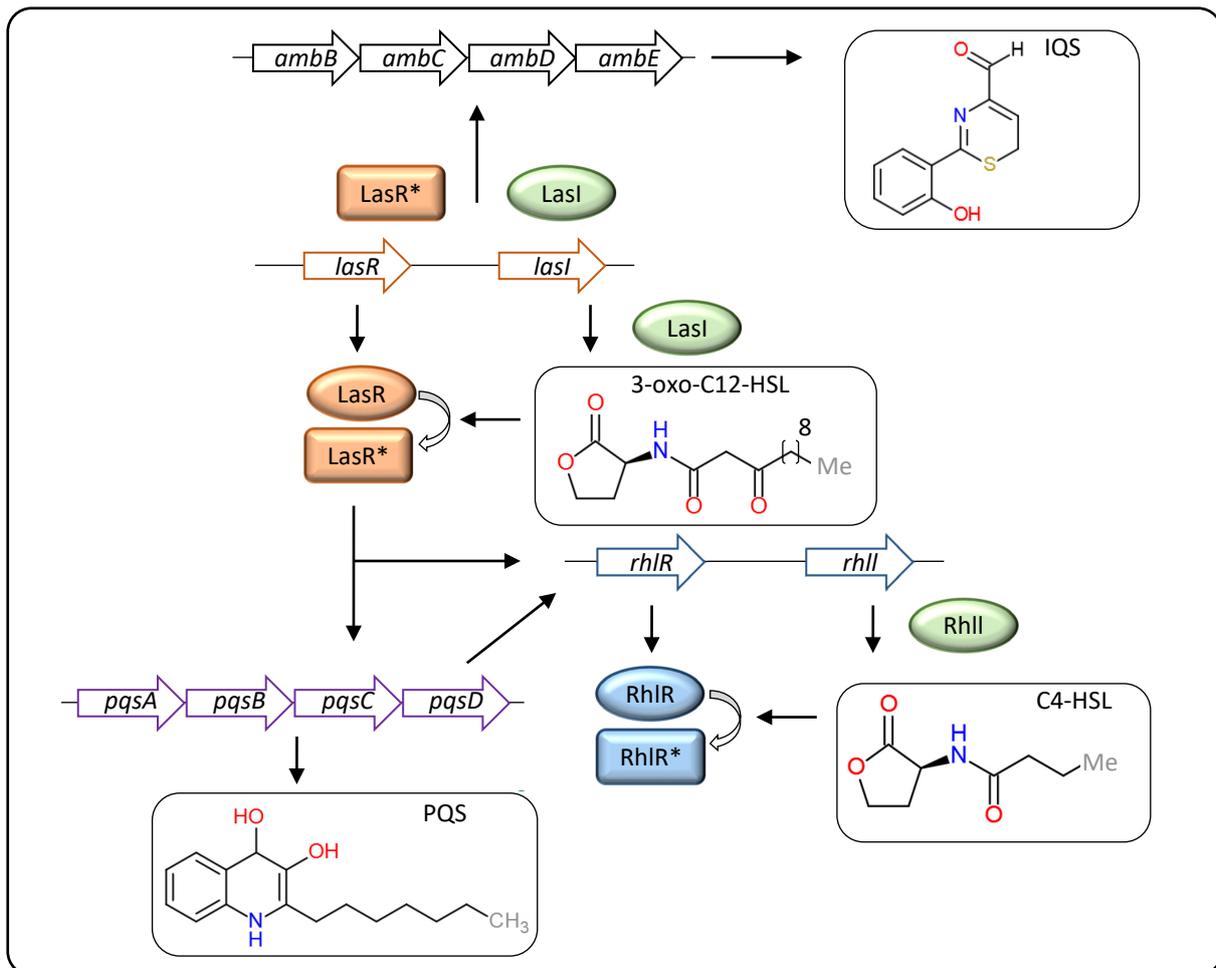


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der vier Zell-Zell-Kommunikationssysteme in *P. aeruginosa*.

LasI synthetisiert *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserin-Lacton (3-oxo-C12-HSL), welches dann wiederum an LasR bindet und dieses aktiviert. Das aktivierte LasR induziert die Transkription zahlreicher Virulenzfaktoren und *rhIR*. *N*-Butanoyl-L-Homoserin-Lacton (C4-HSL) wird durch RhlI synthetisiert, welches von RhIR gebunden wird. Dies führt ebenfalls zu der Induktion der Transkription von Virulenzfaktoren. LasR kontrolliert die Aktivierung des PQS-Systems und die Produktion des Signalmoleküls 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS). LasRI kontrolliert das IQS-System und die Synthese des Signalmoleküls 2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazol-4-Carbaldehyd (IQS). LasR*/RhIR*= aktivierte Form der beiden Proteine. Me= Methyl. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Welch *et al.*, 2005 und Lee & Zhang, 2015 gestaltet.

Das Las-System besteht aus der *Autoinducer*-Synthase LasI, welche in die Synthese des Autoinduktors *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserin-Lacton (PAI-1, 3-oxo-C12-HSL) involviert ist (Passador *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1994) und dem Transkriptionsregulator LasR, welcher im Komplex mit 3-oxo-C12-HSL essenziell für die Transkription des Elastase Gens *lasB* ist (Gambello & Iglewski, 1991). Des Weiteren ist *lasR* verantwortlich für die Transkription von *lasA* (Protease; Toder *et al.*, 1991), *aprA* (alkalische Protease) und *toxA* (Exotoxin A; Gambello *et al.*, 1993). Als Autoinduktor werden frei diffundierende Botenstoffe bezeichnet, welche von den Bakterien selbst produziert werden und nach Erreichen eines Schwellenwertes die Expression von Autoinduktor-induzierter Gene induzieren (Ng & Bassler, 2009).

Ebenfalls auf Homoserinlacton-Signalmolekülen basiert das Rhl-System. Dies besteht aus der *Autoinducer*-Synthase RhlI für *N*-Butanoyl-L-Homoserin-Lacton (PAI-2, C4-HSL, Pearson *et al.*, 1995) und dem Transkriptionsaktivator Protein RhlR (Ochsner *et al.*, 1994). Das RhlR-Regulon umfasst unter anderem die Gene *rhlAB*, welche für die Rhamnolipidproduktion notwendig sind (Ochsner *et al.*, 1994). Ebenso wie das Las-System ist das Rhl-System in die Produktion der Elastase LasB, der Protease LasA und der alkalinen Protease involviert (Brint & Ohman, 1995). Biofilmstudien zeigten, dass *lasI*-Mutanten von *P. aeruginosa* nur einen sehr dünnen Biofilm, *rhlI*-Mutanten hingegen einen dem Wildtyp ähnlichen Biofilm produzierten (Davies *et al.*, 1998). Beide Systeme können die Funktion des jeweils anderen zwar nicht übernehmen, jedoch interagieren sie hierarchisch miteinander (Pesci *et al.*, 1997; Pearson *et al.*, 1997; Van Delden & Iglewski, 1998). LasR induziert die Expression von *rhlR* und somit ist die Aktivität des Rhl-Systems von dem Las-System abhängig (Latifi *et al.*, 1996).

Das 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone ist das Signalmolekül des dritten Kommunikationssystems in *P. aeruginosa*, dem *Pseudomonas quinolone signal*, kurz PQS-System (Pesci *et al.*, 1999). Die Produktion von PQS wird durch LasR reguliert, welches dann extrazellulär vorliegend, die Expression von *lasB*, *rhlI* und *rhlR* induziert (McKnight *et al.*, 2000). PQS wird zu Beginn der stationären Wachstumsphase produziert (Diggle *et al.*, 2003). *pqsABCD*, *phnAB* und *pqsH* bilden das Synthesecuster (Gallagher *et al.*, 2002). PQS kontrolliert die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren wie bspw. LecA (Diggle *et al.*, 2003) und Pyocyanin (Gallagher *et al.*, 2002; Diggle *et al.*, 2003).

Im Jahre 2013 wurde von Lee und Mitarbeitern ein weiteres Zell-Zell-Kommunikationssystem identifiziert, das sogenannte *integrated quorum sensing system* (IQS; Lee *et al.*, 2013). In diesem System wurde eine neue Klasse von Signalmolekülen beschrieben, die 2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazole-4-Carbaldehyde, welche durch die Proteine des Genclusters *ambBCDE* synthetisiert werden. Das IQS-System ist durch LasRI kontrolliert, sobald eines der Gene nicht funktionsfähig ist, findet keine Expression des Genclusters *ambBCDE* statt und folglich auch keine Produktion des Signalmoleküls 2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazol-4-Carbaldehyd (Lee *et al.*, 2013; Lee & Zhang, 2015). Der *diffusible signal factor* stellt einen weiteren Zell-Zell-Kommunikationsweg dar, welcher in der Biofilmdispersion beteiligt ist und *cis*-2-Decansäure als Signalmolekül nutzt (Davies & Marques, 2009; Deng *et al.*, 2011).

1.5 Bakterielle Phospholipasen als Virulenzfaktoren

Phospholipasen sind lipolytische Enzyme, welche die Hydrolyse von Phospholipiden katalysieren (Dennis, 1983). Es gibt membranassoziierte, sekretierte und zytoplasmatische Phospholipasen (Schmiel & Miller, 1999; Richmond & Smith, 2011). Phospholipide bestehen aus zwei hydrophoben Fettsäuren, einem Glycerolrückgrat und einem Phosphatrest mit polarer Kopfgruppe bestehend aus z.B. Cholin, Ethanolamin oder Glycerol (Cooper, 2000). Die amphiphile Eigenschaft der Phospholipide ermöglicht die Mizellenbildung in wässrigen Lösungen und die Bildung von Lipiddoppelschichten. Somit ist der Aufbau von Zellmembranen die wichtigste Funktion dieser Phospholipide (Aloulou *et al.*, 2012). Die genaue Lipidzusammensetzung der Membranen unterscheidet sich je nach Organismus und Zelltyp. In Säugetierzellen machen Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserine (PS) und Sphingomyelin 50-60 % des gesamten Lipidanteils in Membranen aus (Cooper, 2000). In *P. aeruginosa* setzt sich die Membran aus PE, PG, PC, LPC und Cardiolipin (CL) zusammen (Albelo & Domenech, 1997; Sohlenkamp & Geiger, 2015; Auer & Weibel, 2017). Die Lipidzusammensetzung in Bakterien schwankt abhängig von den Umwelteinflüssen (Wilderman *et al.*, 2002). Eine verringerte Sauerstoffkonzentration während des Wachstums von *Bradyrhizobium japonicum* führt zu einer erhöhten Synthese von PE, PG und verminderten Synthese von PC (Tang & Hollingsworth, 1998). *P. aeruginosa* produziert unter phosphatlimitierenden Konditionen vermehrt phosphatfreie Ornithinlipide, welche jedoch keinen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums haben (Lewenza *et al.*, 2011). In der inneren und äußeren Membran wurden 6 % Alanyl-Phosphatidylglycerol (APG) unter sauren Konditionen nachgewiesen, welches die Resistenz gegenüber Cefsulodin, Cr³⁺ und Natriumlactat erhöht. Unter basischen Konditionen konnte APG nicht detektiert werden (Klein *et al.*, 2009).

Vier Hauptgruppen der Phospholipasen (A bis D) sind bekannt. Die Gruppen der Phospholipasen A und B spalten die Esterbindungen zwischen Glycerol und den Fettsäuren und sind somit Acylhydrolasen. Phospholipasen A (PLA) werden in die Untergruppen A₁ und A₂ unterteilt. Phospholipasen A₁ (EC 3.1.1.32) hydrolysieren die sn-1 Position des Phospholipids, PLA₂ (EC 3.1.1.4) die sn-2 Position (Schmiel & Miller, 1999). Phospholipasen, die sowohl die sn-1 als auch sn-2 Position hydrolysieren können, werden als Phospholipasen B (PLB) bezeichnet (Banno *et al.*, 1985). Die Phospholipasen C (EC 3.1.4.10) und D (EC 3.1.4.4) hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen an der Glycerol- bzw. alkoholorientierten Seite und gehören zu den Phosphodiesterasen (Titball, 1998; Jenkins & Frohman, 2005). Durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung basierend auf einer Phospholipase C (PLC) entstehen 1,2-Diacylglycerole und abhängig von der jeweiligen Kopfgruppe z.B. Cholinphosphat (Ghannoum, 2000). Als

Reaktionsprodukt der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung durch eine Phospholipase D (PLD) entsteht Phosphatidsäure und bspw. ein Cholin (Exton, 1997; Jenkins & Frohman, 2005). Die vier Hauptklassen der Phospholipasen, deren hydrolytische Spaltungsstellen und der vereinfachte Abbau eines Phospholipids sind in Abb. 1.4 dargestellt.

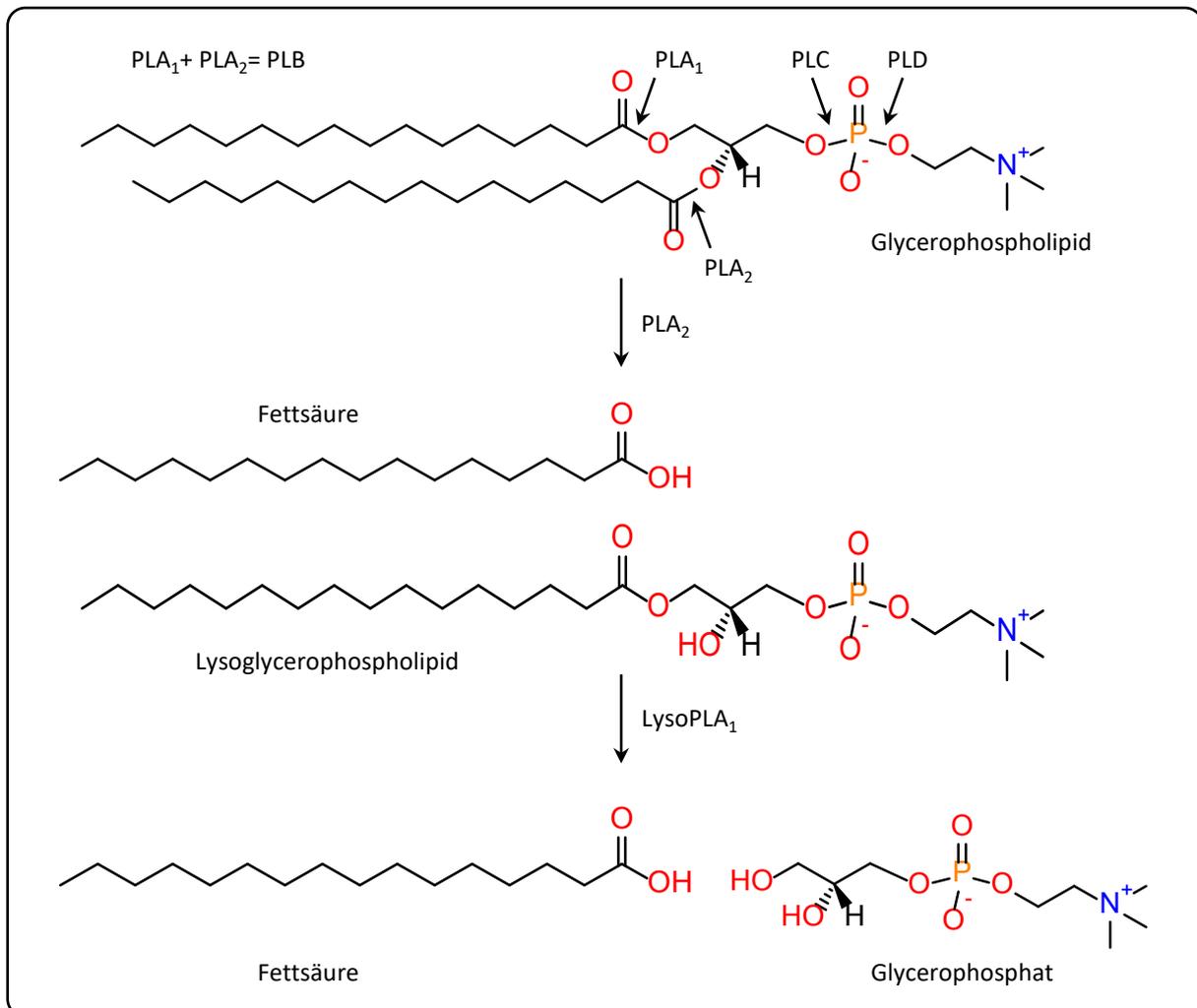


Abb. 1.4: Klassifizierung der Phospholipasen anhand ihrer hydrolytischen Spaltungsstellen am Beispiel von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC).

Phospholipasen A₁ und A₂ (PLA₁/PLA₂) hydrolysieren an der sn-1 bzw. sn-2 Position. Phospholipasen B (PLB) sind in der Lage beide Positionen zu hydrolysieren. Die Phosphodiesterbindungen werden durch die Phospholipase C (PLC) und D (PLD) hydrolysiert (Jaeger & Kovačić, 2014). Nach der Hydrolyse des Phospholipids durch eine PLA₂ entstehen als Reaktionsprodukt eine freie Fettsäure und ein Lysoglycerophospholipid. Das Lysoglycerophospholipid kann dann wiederum von einer Lyso-phospholipase (LysoPLA) hydrolysiert werden. Als Reaktionsprodukt entstehen dann eine freie Fettsäure und das Glycerophosphat. Sauerstoff und Wasserstoff sind in rot, Phosphat in orange und Stickstoff in blau dargestellt.

Wird nun ein Phospholipid an der sn-1 Position hydrolysiert, entsteht als Reaktionsprodukt eine freie Fettsäure (*free fatty acid*, FFA). Diese freie Fettsäure kann z.B. für die β -Oxidation verwendet werden (Banerji *et al.*, 2008). Zeitgleich entsteht ein toxisches Lysophospholipid (E 3.1.1.5), wie z.B. das Lysophosphatidylcholin, welches zu einer erhöhten Membranpermeabilität führt (Prabhakaran *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2005). In biologischen Membranen kommen

Lysophospholipide nur in geringen Mengen vor (0,5-6 % des gesamten Membran-Lipid Gewichtes; Wilton, 2008; Ailte *et al.*, 20161), da sie die Membrangestaltung und die Aktivität von Membrangebundenen Proteinen stören können (Weltzien, 1979; Wang & Dennis, 1999). Lysophospholipide werden von Lysophospholipasen (LysoPLA) weiter in eine freie Fettsäure und z.B. ein Glycerophosphocholin abgebaut (Richmond & Smith, 2011). Auch hier gibt es eine analoge Unterteilung in Lysophospholipasen A₁ und A₂ (Richmond & Smith, 2011). Die Hydrolyse von Phospholipiden führt folglich zu einer Freisetzung zahlreicher Komponenten, die dann weitere biologische Funktionen haben bzw. für diese benötigt werden (Ramrakhiani & Chand, 2011). Die Substratspektren von Phospholipasen unterscheiden sich hinsichtlich der polaren Kopfgruppe, aber auch der Länge und Sättigungsgrad der gebundenen Fettsäuren (Schmiel & Miller, 1999). Im Allgemeinen spielen Phospholipasen eine wichtige Rolle für die Erhaltung, Neugestaltung der Membran und für die Prozesse der Signaltransduktion. Die Spaltung von Lysoglycerophospholipiden durch eine Lysophospholipase D resultiert in der Freisetzung von Lysophosphatidsäure. Durch die enzymatische Aktivität einer Phospholipase A₂ wird die Fettsäure Arachidonsäure von einem Phospholipid freigesetzt. Sowohl Lysophosphatidsäure als auch Arachidonsäure stellen einen sekundären Botenstoff dar, welcher in Eukaryoten unter anderem an Prozessen wie der Proliferation, dem Proteintransport beteiligt ist (Richmond & Smith, 2011) und Entzündungsreaktionen aktiviert (Schmiel & Miller, 1999). Phospholipasen sind beim Eintritt in den Wirt für die Lyse der Wirtsmembran verantwortlich und an der Zytokinsekretion beteiligt (Schmiel & Miller, 1999). Durch 1,2-Diacylglycerol (DAG), welches als Produkt der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch eine PLC entsteht, verändern sich die biophysikalischen Membraneigenschaften wie Ladung, Fluidität und Permeabilität (Flores-Diaz *et al.*, 2016). Die Phospholipase PlcH ist unter anderem hämolytisch für menschliche Erythrozyten und zytotoxisch für Makrophagen (Vasil *et al.*, 2009).

1.5.1 *L. pneumophila*, ein Modellorganismus für die Untersuchung von Phospholipasen

Legionellen gehören ebenfalls wie Pseudomonaden zu den Gram-negativen, stäbchenförmigen γ -Proteobakterien (Diederer, 2008), sind ubiquitär verbreitet (Friedman *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2006) und zeigen eine hohe Toleranz gegenüber Temperaturschwankungen sowie Antibiotika (Kuhle, 2014). Legionellen unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Lebensweise, sie sind in der Regel nicht freilebend, sondern replizieren intrazellulär in Amöben, welche den natürlichen Wirt darstellen (Taylor *et al.*, 2009). Sie können aber auch Makrophagen und Epithelzellen infizieren und dort replizieren. In Wassersystemen wurde *L. pneumophila* auch in Biofilmen gefunden

(Rogers *et al.*, 1994; Newton *et al.*, 2010). *L. pneumophila* ist einer der bekanntesten Vertreter dieser Gattung und als Humanpathogen für die Legionärskrankheit, einer schweren Form der Lungenentzündung verantwortlich (Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977). In *L. pneumophila* wurden bereits 15 für PLA codierende Gene identifiziert, welche den GDSL-Hydrolasen, den Patatin-ähnlichen Proteinen (*Patatin-like proteins*, PLP) und der PlaB-Gruppe zugeordnet werden konnten (Banerji *et al.*, 2008; Bender *et al.*, 2009; Lang & Flieger, 2011; Hiller *et al.*, 2018). In Abb. 1.5 sind die bekannten Phospholipasen aus *L. pneumophila* und deren Lokalisation dargestellt.

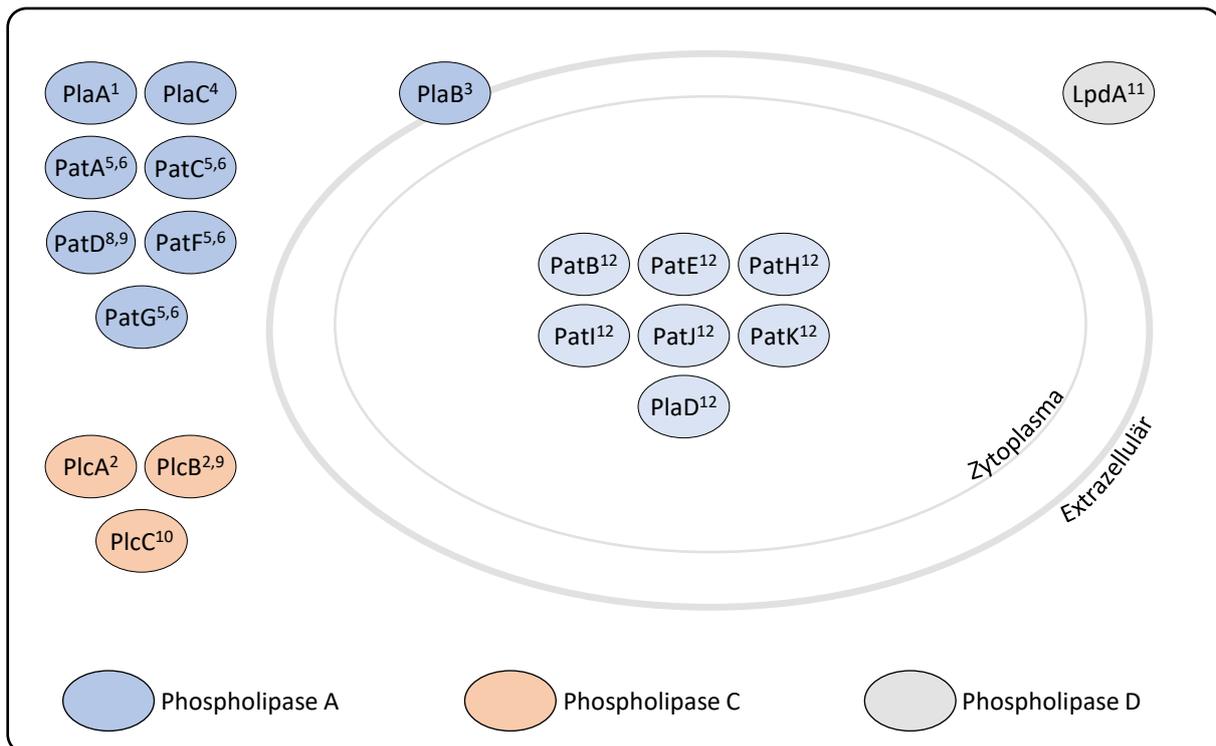


Abb. 1.5: Bekannte Phospholipasen aus *L. pneumophila* und ihre Lokalisation.

Blau hinterlegte Proteine stellen Phospholipasen A dar, orange repräsentiert Phospholipasen C und grau steht für Phospholipasen D. PlaA, PlaC, PatA, PatC, PatD, PatF, PatG, PlcA, PlcB, PlcC, LpdA sind sekretierte Phospholipasen. PlaB ist in der äußeren Membran lokalisiert. Ein hellblauer Hintergrund signalisiert Proteine, deren Lokalisation noch nicht experimentell bestätigt werden konnte. Referenzen: 1= Flieger *et al.*, 2002; 2= Aragon *et al.*, 2002; 3= Flieger *et al.*, 2004; 4= Banerji *et al.*, 2005; 5= Shohdy *et al.*, 2005; 6= VanRheenen *et al.*, 2006; 7= Banerji *et al.*, 2008; 8= Aurass *et al.*, 2009.; 9= Lang & Flieger, 2011; 10= Aurass *et al.*, 2013; 11= Schroeder *et al.*, 2015; 12= Hiller *et al.*, 2018.

1.5.2 PlaB aus *L. pneumophila*, eine virulenzassoziierte Phospholipase A

PlaB aus *L. pneumophila* (LpPlaB) wurde 2004 als wichtigste zellassoziierte Phospholipase A während eines Screenings einer *L. pneumophila* Genbibliothek in *E. coli* auf hämolytische Aktivität entdeckt (Flieger *et al.*, 2004). LpPlaB ist ein 53,7 kDa großes, aus 474 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein, welches in zwei Domänen unterteilt werden kann (Flieger *et al.*, 2004; Kuhle, 2014). In der N-terminalen Domäne des Proteins (AS 1-303) befindet sich die experimentell bestätigte katalytische Triade, bestehend aus Ser85, Asp203 und His251 (Bender *et al.*, 2009).

Abgesehen von dem konservierten Bereich der katalytisch aktiven Aminosäuren, welcher ähnlich zu Enzymen der Lipasefamilie I ist, konnten keine weiteren konservierten Motive identifiziert werden (Banerji & Flieger, 2004, Kuhle, 2014). LpPlaB wurde als erstes Mitglied einer neuen Lipasefamilie beschrieben, deren aktives Serin nicht in einem typischen Gly-X-Ser-X-Gly Motiv eingebettet ist, sondern in einem Thr-X-Ser-X-Gly Motiv (Arpigny & Jaeger, 1999; Bender *et al.*, 2009). Ebenfalls ungewöhnlich ist, dass die Aminosäuren Asp und His in einem Gly-Ser-Asp-Gly-Val-Val bzw. Ser-His-Ser Motiv lokalisiert sind (Flieger *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2009). Für LpPlaB konnten keine Homologien zu bereits bekannten Phospholipasen gefunden werden, jedoch zeigten sich für den N-Terminus homologe Bereiche zu drei hypothetischen Proteinen aus *Nostoc sp.*, *P. aeruginosa* und der putativen Lipase LipB aus *L. pneumophila* (Flieger *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2009). Unter Anwendung einer Hydrophobizitätsskala, welche den hydrophoben Effekt eines Moleküls beschreibt, konnte keine membranintegrierte Lokalisation vorhergesagt werden, weshalb eine Membranverankerung oder Protein-Protein-Interaktion als Verbindung zur Membran als am wahrscheinlichsten bewertet wurde (Schunder *et al.*, 2010). LpPlaB ist in der äußeren Membran lokalisiert und liegt wahrscheinlich Oberflächen exponiert vor (Schunder *et al.*, 2010). In einer aktuellen Studie konnte die Kristallstruktur von LpPlaB als Tetramer erstmals gelöst werden (Diwo *et al.*, 2020; Abb. 1.6).

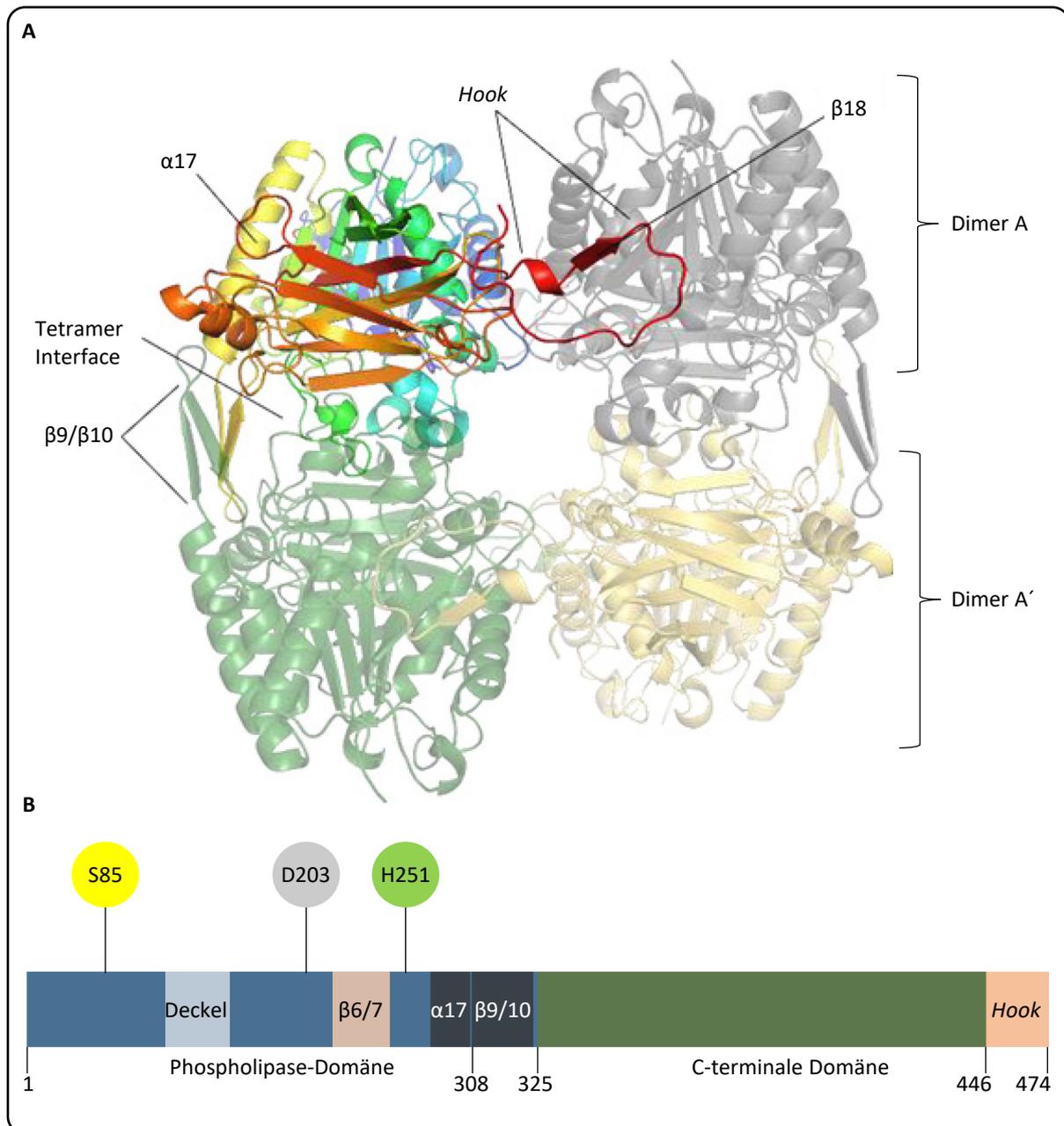


Abb. 1.6: Struktur von LpPlaB.

A: LpPlaB kristallisiert als Tetramer aus zwei identischen Dimeren: Dimer A (buntes und graues Monomer) und Dimer A' (grün und gelbes Monomer). Die $\alpha 17$ Helix (AS 285-305) führt zu dem β -Faltblatt $\beta 9/\beta 10$, welches die Schnittstelle zwischen den beiden Dimeren bildet. In der C-terminalen Domäne befindet sich die *Hook*-Struktur, welche die zwei LpPlaB Moleküle eines Dimers durch eine Kopf-Schwanz-Wechselwirkung verbindet. Diese Abbildung wurde aus Diwo *et al.* (2020) entnommen, welches durch die *Creative Commons Attribution* (CC BY; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) Lizenz genehmigt wurde. Es wurden inhaltlich keine Veränderungen vorgenommen. **B:** Schematische Darstellung des Aufbaus von LpPlaB. Von AS 1-324 erstreckt sich die in blau dargestellte Phospholipase-Domäne. In dieser Domäne befindet sich auch das in dunkelgrau dargestellte β -Faltblatt ($\beta 9/\beta 10$, AS308-321). Die katalytisch aktiven Aminosäuren befinden sich an Position 85 (Serin, gelb), 203 (Asparaginsäure, grau) und 251 (Histidin, grün). Der C-terminale Bereich des Proteins, in dunkelgrün dargestellt, erstreckt sich von AS 325-474. Die letzten 25 AS bilden die *Hook*-Domäne (orange). Die Informationen der Struktur von LpPlaB wurden aus Diwo *et al.* (2020) entnommen (PDB: 6ZTI, noch nicht hinterlegt).

Mit dieser Struktur (Abb. 1.6, **A**) wurde ein β -Faltblatt am Ende der N-terminalen Domäne entdeckt. Untersuchungen zeigten, dass dieses β -Faltblatt ($\beta 9/\beta 10$, AS 308-321) für die

Membranlokalisierung mit verantwortlich ist. Mutationen innerhalb dieses Faltblattes bzw. die komplette Deletion führten zu einer Anreicherung des Proteins in der zytoplasmatischen Membran und nur noch einer teilweisen Lokalisation in der äußeren Membran. Dieses Phänomen wurde in *E. coli* und *L. pneumophila* beobachtet, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Membranverankerung von LpPlaB auf Protein-Lipid-Interaktionen zurückzuführen ist (Michel, 2020).

Mit Hilfe der Struktur konnte gezeigt werden, dass dem N-terminalen Bereich des Proteins eine β -Sandwich-Domäne folgt. Diese wird durch zwei nicht-kanonische β -Stränge aus der N-terminalen Domäne ergänzt ($\beta 6/\beta 7$, AS 216-237). Der C-terminale Bereich von LpPlaB, welcher sich von AS 304-474 erstreckt, ist für die Aktivität und die Dimerisierung wichtig (Diwo *et al.*, 2020). Von AS 446-474 ist eine *Hook*-Domäne vorzufinden (Abb. 1.6, **B**), durch deren Deletion LpPlaB nur noch Monomere und keine Dimere ausbildet (Diwo *et al.*, 2020). Erstaunlicherweise zeigte die *Hook*-Deletionsmutante keine PLA-Aktivität mehr, wofür der Grund bis *dato* unbekannt ist. Dies erklärt jedoch wie vormalig beobachtete, die Bedeutung der letzten 15 AS für die Aktivität von LpPlaB (Bender *et al.*, 2009; Kuhle *et al.*, 2014; Kuhle, 2014). Möglich ist, dass der *Hook*-Bereich für die Lipidbindung benötigt wird oder der Bereich im monomeren Zustand in die Nähe des aktiven Zentrums gelangt (Diwo *et al.*, 2020). Wie bereits bei anderen α/β -Hydrolasen bekannt (Bauer *et al.*, 2020), besitzt LpPlaB ebenfalls einen Deckel, welcher in der gelösten Struktur eine geschlossene Konformation annimmt. Bei der Bildung von Tetrameren werden diese Deckel geschlossen und verhindern somit die Interaktion mit Phospholipiden (Diwo *et al.*, 2020). Für die Stabilität des Tetramers scheinen acht Nicotinamidadenindinukleotid (NAD(H)) Moleküle notwendig zu sein, welche an der Dimer/Dimer-Grenzfläche spezifisch gebunden vorliegen. Vermutlich führt NAD(H) zur Deckelimmobilisierung, welcher nur im dimeren Zustand geöffnet vorliegt (Diwo *et al.*, 2020).

LpPlaB ist sehr aktiv in besonders geringen Konzentrationen. So liegt das Protein in nanomolaren Bereich als Monomer vor und formt Dimere bei Konzentrationen um 0,1 μ M. Bei steigender Konzentration (> 5,4 μ M) formt LpPlaB Tetramere, welche keine enzymatische Aktivität aufweisen (Kuhle *et al.*, 2014). Zurzeit wird folgendes Modell für die Aktivierung von LpPlaB vorgeschlagen: Eine hohe intrazelluläre NAD(H) Konzentration bewirkt die Bildung von inaktiven Tetrameren, diese sollen die Zelle vor z.B. Zelllyse schützen. Sobald das Enzym exportiert wird, sinkt die NAD(H) Konzentration, dies hat die Aufspaltung in zwei aktive Dimere zur Folge. Hierbei wird das $\beta 9/\beta 10$ -Faltblatt frei und der Proteinkomplex ist in der Lage, mit der Membran zu interagieren (Diwo *et al.*, 2020).

LpPlaB wurde, wie weiter oben bereits erwähnt, durch ein Screening auf hämolytische Aktivität entdeckt. Mit dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase nimmt die kontaktabhängige hämolytische Aktivität ab (Flieger *et al.*, 2004; Schunder *et al.*, 2010).

Für LpPlaB konnte kein Sec- bzw. Tat-abhängiges Signalpeptid identifiziert werden, weshalb zahlreiche, für *L. pneumophila* typische Sekretionswege (T1SS, T2SS, T4SS und Tat), mutiert wurden (Schunder *et al.*, 2010). Aus dieser Studie ging hervor, dass die Lokalisation von LpPlaB nicht beeinflusst wurde und der genaue Transportmechanismus weiterhin ungeklärt bleibt (Schunder *et al.*, 2010; Kuhle, 2014).

Zusätzlich zur PLA-Aktivität von LpPlaB konnte Lysophospholipase A-Aktivität (LPLA) nachgewiesen werden (Flieger *et al.*, 2004). Somit ist LpPlaB in der Lage, toxische Lysophospholipide abzubauen (Bender *et al.*, 2009). LpPlaB hydrolysiert bevorzugt Phospholipide mit PC und PG als Kopfgruppe und langkettigen Fettsäuren, d.h. mit mehr als 12 Kohlenstoffatomen (Flieger *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2009). Die Fähigkeit PC zu hydrolysieren stellt einen großen Vorteil dar, denn Lungensurfactants (**surface active agent**; Substanz, welche die Oberflächenspannung der Lungenbläschen verringert) bestehen hauptsächlich aus PC und stellen somit einen sehr guten Angriffspunkt für LpPlaB dar. Durch die Zerstörung der Lipideinzelschicht kommt es zum Verlust der Lungenfunktion (Flieger *et al.*, 2000).

Bereits 2010 konnte LpPlaB als Virulenzfaktor in einem Experiment mit Meerschweinchen als Modellorganismen beschrieben werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die *plaB*-Mutante eine geringere Koloniezahl in Lunge- und Milz zeigten und eine geringere Entzündungsreaktion ausgelöst wurde (Schunder *et al.*, 2010). In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass LpPlaB essenziell für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in RAW 264.7 Mausemakrophagen ist (Kuhle *et al.*, 2014).

1.5.3 Phospholipasen aus *P. aeruginosa*

Verglichen mit *L. pneumophila* ist für *P. aeruginosa* bisher nur eine sehr geringe Anzahl von Phospholipasen genauer beschrieben (Abb. 1.7).

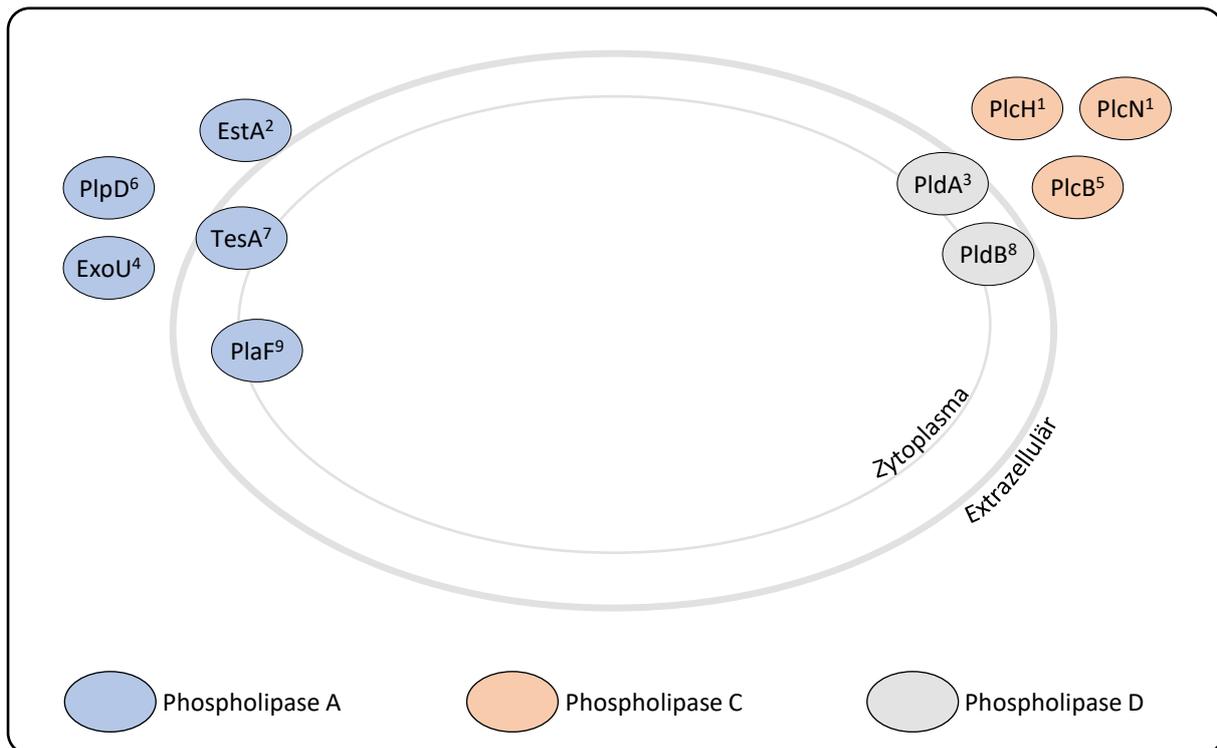


Abb. 1.7: Bekannte Phospholipasen aus *P. aeruginosa* und ihre Lokalisation.

Blau hinterlegte Proteine stellen Phospholipasen A dar, orange repräsentiert Phospholipasen C und grau steht für die Klasse der Phospholipasen D. PlpD, ExoU, PlcH, PlcN, PlcB sind sekretierte Phospholipasen, EstA ist in der äußeren Membran lokalisiert. PldA und TesA sind periplasmatische Proteine, PlaF stellt ein in der Zytoplasmamembran verankertes Protein dar. Referenzen: **1=** Ostroff *et al.*, 1990; **2=** Wilhelm *et al.*, 1999; **3=** Wilderman *et al.*, 2001; **4=** Sato *et al.*, 2003, Sato & Frank, 2004; **5=** Barker *et al.*, 2004; **6=** Salacha *et al.*, 2010; **7=** Kovačić *et al.*, 2013; **8=** Jiang *et al.*, 2014; **9=** Kovačić, 2010; Bleffert *et al.* (under revision).

PlcH, PlcN und PlcB gehören zu den Phospholipasen C und werden alle sekretiert. PlcH ist eine hämolytische Phospholipase C, welche bevorzugt Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hydrolysiert (Ostroff *et al.*, 1990). Gereinigtes PlcH führt zu Gefäßpermeabilität und zum Tod nach Injektion in Mäuse (Meyers *et al.*, 1992; Berk *et al.*, 1987). Im Gegensatz dazu stellt PlcN eine nicht-hämolytische Phospholipase C dar, mit Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin als bevorzugtes Substrat (Ostroff *et al.*, 1990). PlcN zeigt im Vergleich zu PlcH keinen Einfluss auf die Pathogenität (Terada *et al.*, 1999). Beide Proteine, PlcH und PlcN besitzen ein Tat-Signalpeptid und werden über den Tat-abhängigen Proteintransport über die innere Membran sekretiert (Voulhoux *et al.*, 2001). Die Sekretion über die äußere Membran erfolgt mit dem Typ II-Sekretionsweg (Barker *et al.*, 2004). PlcB wird über den Sec-Sekretionsweg sekretiert und ist die einzige Phospholipase C, welche Phosphatidylethanolamin hydrolysiert (Barker *et al.*, 2004). PldA ist ein periplasmatischer H2-T6SS-abhängiger Phospholipase D Effektor (Wilderman *et al.*, 2001), welcher in Verbindung mit einer Verschlimmerung der Bronchiektasie steht und durch die Hydrolyse von Phosphatidylethanolamin antibakterielle Aktivität zeigt (Luo *et al.*, 2019; Wettstadt *et al.*, 2019; Russell *et al.*, 2013). PldB ist ein periplasmatischer H3-T6SS-abhängiger Phospholipase D Effektor

(Jiang *et al.*, 2014), welcher das Eindringen in den Wirt durch die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges (PI3K/Akt) ermöglicht (Jiang *et al.*, 2014). Beide Phospholipasen werden mit der Internalisierung in humane Epithelzellen in Verbindung gebracht, bei der sich das Pathogen der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes entzieht (Jiang *et al.*, 2014).

Insgesamt sind fünf Phospholipasen A aus *P. aeruginosa* bekannt. PlA_F (PA2949), welches in der zytoplasmatischen Membran verankert ist und zu den Phospholipasen A₁ gehört, konnte in einem *Drosophila melanogaster*-Virulenzmodell als Virulenzfaktor bestätigt werden (Bleffert *et al.* (*under revision*); Kovačić, 2010). TesA ist die erste für *P. aeruginosa* beschriebene Lysophospholipase A mit einem großen Substratspektrum (Leščić Ašler *et al.*, 2010, Kovačić *et al.*, 2013). In der äußeren Membran von *P. aeruginosa* ist EstA lokalisiert und ist eine virulenzassoziierte Autotransporteresterase mit zusätzlicher Phospholipase A₂-Aktivität (Gdynia, 2006; Kovačić, 2010). Zu den sekretierten Phospholipasen gehören PlpD und ExoU. Der N-terminale Bereich von PlpD (Plp, *patatin-like protein*) wird sekretiert, der C-terminale Bereich verbleibt gefaltet in der äußeren Membran (Salacha *et al.*, 2010). PlpD gehört zu den Phospholipasen A₁ und ist das erste Beispiel einer Phospholipase, die im aktiven Zustand über das Typ V-Sekretionssystem sekretiert wird (da Mata Madeira *et al.*, 2016). Die bekannteste (Lyso-) Phospholipase A₂ stellt das Toxin ExoU dar. ExoU wird über das Typ III-Sekretionssystem direkt in den Wirt sekretiert (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2004). Die Injektion von ExoU in Säugertierzellen führt zu irreversiblen Schäden der Membranen und zum nekrotischen Zelltod (Sato & Frank, 2004).

1.6 Ziel der Arbeit

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives, ubiquitär verbreitetes Bakterium, das als opportunistisches Humanpathogen vor allem an nosokomialen Infektionen beteiligt ist. Ein bedeutsames Charakteristikum dieses Bakteriums in diesem Zusammenhang ist die Produktion einer Vielzahl an Virulenzfaktoren. Von besonderem Interesse sind die Phospholipasen, welche durch die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden z.B. an der Neu- und Umgestaltung von Membranen, Prozessen der Signaltransduktion und dem Eindringen in den Wirt beteiligt sind. In einer vorangegangenen Arbeit wurde das hypothetische Protein PA2927 aus *P. aeruginosa* durch ein Aminosäuresequenzvergleich und die Messung der PLA₂-Aktivität als putative Phospholipase identifiziert (Kovačić, 2010), jedoch nicht weiter charakterisiert. Dies bildet den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit, deren übergeordnetes Ziel die physiologische und biochemische Charakterisierung der putativen Phospholipase PaPlaB darstellt.

Im Verlauf dieser Arbeit sollte die Expression und Aufreinigung von PaPlaB etabliert werden, um durch biochemische Charakterisierung von isoliertem Protein Aufschluss über (I) das Substratspektrum und (II) den Oligomerisierungszustand von PaPlaB zu gewinnen. Zudem sollte analysiert werden, (III) wo PaPlaB in der Zelle lokalisiert ist. Für die Untersuchung des physiologischen Einflusses von PaPlaB sollte (IV) ein *P. aeruginosa* *plaB*-defizienter Stamm hergestellt und phänotypisch charakterisiert werden. Des Weiteren sollte mit diesem Stamm geklärt werden, ob es sich bei PaPlaB um einen neuen Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* handelt (V). Unter diesem Aspekt sollten die Biofilmproduktion und die Virulenz (Kooperation mit Prof. Dr. S. Häußler aus Braunschweig) in einem *Galleria mellonella*-Virulenzmodell nachgewiesen werden. Globale Proteomstudien (VI) sollten zusätzlich Aufschluss über die regulatorischen Funktionen von PaPlaB in *P. aeruginosa* geben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstigen Reagenzien wurden, falls nicht anders beschrieben, von folgenden Herstellern bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Heidelberg, Deutschland).

Chemikalien: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Enzyme: Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA); Lysozym Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme (Tab. 2.1) und Plasmide (Tab. 2.2) verwendet.

Tab. 2.1: Übersicht über alle verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U196</i> (<i>phi80</i> Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> CC118 λ pir	Δ (<i>ara, leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galk phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA</i> λ pir phage lysogen	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Ec294:: [RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] Tp^r, Sm^r, tra⁺ recA, pro, res</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	<i>recA thi pro hsdR</i> ⁻ <i>M⁺</i> <i>RP4::2-TC::Mu::Km Tn7</i> λ pir phage lysogen	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>P. aeruginosa</i> PA01	PA01, Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaB</i>	PA01 <i>paplaB::Gm^r</i> ; Gendeletion von <i>pa2927</i> (1332 Bp), Integration einer aus dem Vektor pBSL142 isolierten Gentamicin Resistenzkassette (1590 Bp)	Diese Arbeit

Tab. 2.2: Übersicht über alle verwendeten Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pET22b	<i>ColE1 PT7Φ10lacIq Amp^R</i>	EMD Millipore
pET22b- <i>paplaB_{h6}</i>	pET22b, <i>NdeI/SacI</i> -Fragment mit 1350 Bp <i>paplaB</i> aus <i>P. aeruginosa</i> und C-terminalen His ₆ -tag an <i>paplaB</i>	Strunk, unveröffentlicht
pET22b- <i>paplaB_{h6}</i> S79A	pET22b- <i>paplaB_{h6}</i> mit einem Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin an Position 711	Diese Arbeit
pET22b- <i>paplaB_{h6}</i> D196A	pET22b- <i>paplaB_{h6}</i> mit einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Alanin an Position 588	Diese Arbeit
pET22b- <i>paplaB_{h6}</i> H244A	pET22b- <i>paplaB_{h6}</i> mit einem Aminosäureaustausch von Histidin zu Alanin an Position 732	Diese Arbeit
pEMG	Km ^R <i>lacZα traJ oriT oriR6K</i>	Martinez-Garcia & de Lorenzo, 2011
pEMG-Δ <i>paplaB</i>	pEMG mit einem <i>EcoRI/MluI</i> -Fragment mit 814 Bp vor <i>paplaB</i> , gefolgt von einer Gentamicin-Resistenzkassette und einem <i>MluI/XbaI</i> -Fragment mit 584 Bp hinter <i>paplaB</i> aus <i>P. aeruginosa</i> PA01	Diese Arbeit
pSW-2	Gm ^R , <i>oriRK2, xyIS, Pm</i> →I- <i>scel</i>	Martinez-Garcia & de Lorenzo, 2011
pBSL142	pBluescript-Derivat, MCS, <i>ColE1 Ap^r</i> Gm ^r	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2.3) wurden von der Firma MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch das Lösen in entsprechenden Volumina dH₂O wurde eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Diese Stammlösung wurde für PCR-Ansätze zehnfach verdünnt eingesetzt. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C.

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz [5' - 3']	Eigenschaften
QuikChange®		
<i>paplaB_{h6}</i> S79A-fw	CGGTTGACGTGGTGGTGCACGCC ACCGGCACCCTGGTGCTGCG	Aminosäureaustausch von Serin zu
<i>paplaB_{h6}</i> S79A-rw	CGCAGCACCAGGGTGCCGGTGG CGTGCACCACCACGTCAACCG	Alanin an Position 79 im nativen PaPla _{B_{H6}}
<i>paplaB_{h6}</i> D196A-fw	AGGCCGGCAGCGCCGGCACTGT GCGGATCGCCACGGCGAACC	Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Alanin
<i>paplaB_{h6}</i> D196A-rw	GGTTCGCCGTGGCGATCCGCA CAGTGCCGGCGCTGCCGGCCT	an Position 196 im nativen PaPla _{B_{H6}}
<i>paplaB_{h6}</i> H244A-fw	CATCGTCGACGGCGAGAACGCCG CCAGCGTGGCGCTGAAGG	Aminosäureaustausch von Histidin
<i>paplaB_{h6}</i> H244A-rw	CCTTCAGCGCCACGCTGGCGGCCG TTCTCGCCGTCGACGATG	zu Alanin an Position 244 im nativen PaPla _{B_{H6}}
Klonierungen pEMG		
Up_ <i>EcoRI</i> -fw	CCGGAATTCATTTCAACCTGTGG AGCCAC	802 Bp Fragment
Up_ <i>MluI</i> -rw	CGACGCGTGTCCGGCATCCTCTG GGGCT	stromaufwärts von <i>paplaB</i> im Genom von <i>P. aeruginosa</i> PA01
Dw_ <i>MluI</i> -fw	CGACGCGTATCGGCGCCCGGCC CCC	591 Bp Fragment
Dw_ <i>XbaI</i> -rw	TGCTCTAGAGGAGCGTTTTCCCA GTACC	stromabwärts von <i>paplaB</i> im Genom von <i>P. aeruginosa</i> PA01
Nachweis-Primer		
fw- <i>paplaB</i>	GGAATTGAGCTCTCAGGGTTCC TGAAGACGAATAC	Flankieren von <i>paplaB</i> am Start- und Stoppcodon
rw- <i>paplaB</i>	CTCTAGAGATGCCCCGTTTCGATC GTCATC	
fw-up- <i>paplaB</i>	AGAAGGTGCAACGGCAGTATC	Primer für den Nachweis der Gendeletion. Binden im Genom stromaufwärts/stromabwärts
rw-down- <i>paplaB</i>	GCGTTGTACCGTCGCTATG	Bereich von <i>paplaB</i>

2.4 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1 Nähr- und Testmedien

LB-Medium (*Lysogeny broth*; Sambrook & Fritsch, 1989): 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

LB-Agar: LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar.

2YT-Medium (Sambrook & Fritsch, 1989): 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.

Sterilisation von Nährmedien

Das Autoklavieren der Medien erfolgte für 20 min bei 121 °C und 200 kPa. Temperatursensitive Komponenten wurden durch Filtration (Porendurchmesser 0,2 µm) sterilisiert, bevor diese dem Medium zugesetzt wurden (< 60 °C).

Tab. 2.4: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin [µg/ml]	100	-
Irgasan [µg/ml]	-	25
Gentamicin [µg/ml]	10	30
Kanamycin [µg/ml]	50	300

2.4.2 Kultivierung von Bakterien

Soweit nicht anders beschrieben, wurden sowohl *E. coli* Zellen als auch *P. aeruginosa* in 10 ml LB-Medium über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und 120-150 Umdrehungen pro Minute (UpM) oder auf LB-Agar Platten kultiviert. Die Hauptkulturen wurden mit einer Übernachtskultur (ÜK) auf eine optische Dichte bei 580 nm (O.D._{580nm}) von 0,05 eingestellt. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Probe in eine Halbmikroküvette mit einem Messvolumen von 1 ml überführt (1 cm Schichtdicke, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Für die Messung wurde das Spektrophotometer „Genesys10 S UV-VIS“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet. Abhängig von dem verwendeten Plasmid wurde das entsprechende Antibiotikum (Tab. 2.4) dem Medium zugegeben. Für die Kultivierung in Erlenmeyerkolben betrug das Kulturvolumen maximal 1/10 des Gefäßvolumens. Die Berechnung der Wachstumsrate während der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte durch folgende Formel: $r_B(t) = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{\Delta t}$

$r_B(t)$ = Wachstumsrate [h^{-1}]; N_1 = Biomasse in der frühen logarithmischen Phase, N_2 = Biomasse in der frühen logarithmischen Phase; t = Zeit [h]

2.4.3 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen (modifiziert nach Sambrook & Russell, 2001) wurden 500 ml 2YT-Medium mit einer *E. coli* ÜK auf eine O.D._{580nm} von 0,05 eingestellt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 120-150 UpM kultiviert bis zum Erreichen einer O.D._{580nm} von 0,4-0,6. Anschließend wurde die Kultur für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und einer Geschwindigkeit von 2700 x g (Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 200 ml eiskaltem de-ionisiertem Wasser (Milli

Q-Wasser, Reinstwassersysteme, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) suspendiert und bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (2700 x g). Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet in 4 ml 10 % (v/v) Glycerol suspendiert, zu 50 µl aliquotiert und bis zur Anwendung bei -80 °C gelagert.

Elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert. Hierzu wurde 1 µl der gereinigten Plasmid-DNA (ca. 100 ng/µl; Kapitel 2.5.1) zu 50 µl elektrokompetenten Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden in sterile und gekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten (0,2 cm Porengröße, #1652082, BioBudget, Krefeld, Deutschland) überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Elektroporation erfolgte in einem „MicroPulser“ (BioRad, München, Deutschland) mit dem Programm EC2 (5 ms, 2,5 kV). Im Anschluss wurden 700 µl LB-Medium zugegeben, die Zellen in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend abhängig von dem verwendeten Antibiotikum bei 37 °C für einen Zeitraum von 0,5 h (Ampicillin) oder 3 h (alle anderen Antibiotika) kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen zentrifugiert (1 min; 21380 x g, Raumtemperatur (RT); Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), in 100 µl LB-Medium suspendiert, auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C ü.N. inkubiert.

2.4.4 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch transformationskompetenter Zellen (modifiziert nach Bagge *et al.*, 2002) wurden 500 ml LB-Medium mit einer *E. coli* ÜK auf eine O.D._{580nm} von 0,05 eingestellt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer O.D._{580nm} von 0,4-0,6 bei 37 °C und 120-150 UpM kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Zellen für 10 min auf Eis und folgend für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (2790 x g). Das Zellpellet wurde anschließend in 35 ml FB-Puffer (100 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 10 % (w/v) Glycerol, 10 mM Kaliumacetat, pH 6,4) suspendiert und auf Eis gelagert (20 min). Nach der Inkubation auf Eis erfolgte ein erneutes Zentrifugieren der Zellen für 10 min (2790 x g) bei 4 °C, gefolgt von der Suspension des Zellpellets in 8,5 ml FB-Puffer. Die Zellen wurden aliquotiert (100 µl) und bei -80° C gelagert.

Für die Transformation wurde 1 µl Plasmid-DNA (ca. 100 ng/µl; Kapitel 2.5.1) oder 10 µl eines Ligationsansatzes (Kapitel 2.5.8) den Zellen zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (90 sek, 42 °C) und die Zugabe von 700 µl LB-Medium. Abhängig von dem verwendeten Antibiotikum (Tab. 2.4) wurden die Zellen bei 37 °C für 0,5 h (Ampicillin) oder für 3 h (alle anderen Antibiotika) kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen zentrifugiert (1 min; 21380 x g; RT, Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG,

Tuttlingen, Deutschland), in 100 µl LB-Medium suspendiert, auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C ü.N. inkubiert.

2.4.5 Herstellung und Transformation von elektrokompetenter *Pseudomonaden*

Die Herstellung von elektrokompetenten *Pseudomonaden* erfolgte nach der modifizierten Methode von Choi *et al.* (2006). Eine *P. aeruginosa* PA01 ÜK (4 ml) wurde in vier Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt und zentrifugiert (1 min, 21380 x *g*, RT), Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Die Kulturüberstände wurden verworfen und die Zellen je in 1 ml Saccharose (300 mM) suspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen aus allen vier Aliquots in insgesamt 100 µl Saccharose (300 mM) suspendiert. 50 µl dieser Zellen wurde 500 ng Plasmid-DNA zugegeben, in sterile, gekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten (0,2 cm Porengröße, #1652082, BioBudget, Krefeld, Deutschland) überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einem „MicroPulser“ (BioRad, München) mit dem Programm EC2 (5 ms, 600 Ω, 2,5 kV). Darauffolgend wurden 700 µl LB-Medium zugegeben, die Zellen in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 37 °C für einen Zeitraum von 3 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 21380 x *g*, RT, Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), in 100 µl LB-Medium suspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C ü.N. inkubiert.

2.4.6 Transfer von Plasmid-DNA mittels Konjugation

Die Methode der Konjugation wurde modifiziert nach Winson *et al.* (1998). Für die Konjugation von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ *plaB* wurde *E. coli* S17-1 (Tab. 2.1) als Plasmid-Donorstamm verwendet. Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit dem Donorstamm der das gewünschte Plasmid trägt (Tab. 2.2) inokuliert und ü.N. (120-150 UpM, 37 °C) kultiviert. 10 ml LB-Medium wurden mit der ÜK des Donorstammes auf eine O.D._{580nm} von 0,05 inokuliert und bis zum Erreichen einer O.D._{580nm} von 0,5-0,7 kultiviert (120-150 UpM, 37 °C). Darauffolgend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (4 min, 2700 x *g*, RT, Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und im Anschluss zweimal mit LB-Medium gewaschen, um restliche Antibiotikarückstände zu entfernen.

Für den Akzeptorstamm wurden 10 ml LB-Medium inokuliert und ü.N. kultiviert. 1 ml der Akzeptorstamm Kultur wurden zu den zuvor vorbereiteten Donorzellen hinzugegeben und für fünf

Sekunden durchmischt (VF2 Vortex Mixer, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland). Die Zellen wurden zentrifugiert (1 min, 21380 x *g*, RT, Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), in 50 µl LB-Medium suspendiert und auf einen Membranfilter (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland), welcher auf einer LB-Agarplatte platziert war, überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C für 5-6 h inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen auf dem Membranfilter in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 100-500 µl der Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert. Diese enthielten Irgasan (25 µg/ml), welches das Wachstum des Donorstammes verhindert und das Plasmid abhängige Antibiotikum (Tab. 2.4) für die Selektion der Pseudomonaden. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert.

2.4.7 Kultivierung von Biofilmen von *P. aeruginosa*

Die Kultivierung und die Färbung von Biofilmen erfolgte nach der modifizierten Methode von O'Toole (2011). Die Hauptkulturen wurden aus einer ÜK (Kapitel 2.4.2) angesetzt und auf eine O.D._{580nm} von 0,05 eingestellt. Darauffolgend wurden jeweils 100 µl der ÜK in jedes *well* einer sterilen 96er Mikrotiterplatte (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit flachem Boden überführt. Als Negativkontrolle wurden acht *wells* nur mit LB-Medium befüllt. Im Anschluss wurden die Kulturen in den Mikrotiterplatten in verschließbare Boxen mit einer Flasche de-ionisierten Wassers überführt, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit zu garantieren und für einen definierten Zeitraum (8-216 h) stehend bei 37 °C inkubiert.

2.4.7.1 Färbung von Biofilmen mit Kristallviolett

Der Inkubation (Kapitel 2.4.7) folgend, wurden die planktonischen Zellen aus den *wells* der Mikrotiterplatten durch das zweimalige Eintauchen in einem mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) befüllten Behältnis entfernt. Das überschüssige VE-Wasser wurde durch Trocknung der Platte für ca. 30-45 min bei 37 °C entfernt. Das Anfärben der Biofilme erfolgte durch die Zugabe von 150 µl 0,1 % (v/v) Kristallviolett gelöst in de-ionisiertem Wasser (Milli Q-Wasser, Reinstwassersysteme, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 15 min bei RT, welches anschließend entfernt wurde. Überschüssiges Kristallviolett wurde durch zweimaliges Eintauchen in VE-Wasser entfernt, gefolgt von einer erneuten Trocknung. Im letzten Schritt wurden 150 µl 30 % (v/v) Essigsäure in die *wells* pipettiert und ebenfalls 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 550 nm im Plattenphotometer „SpectraMax i3“ (Molecular devices, LLC., Kalifornien, USA). Wenn die Absorption einen Wert von 0,9 überschritt, wurden die Proben 1:2 mit VE-Wasser verdünnt.

2.4.8 Kultivierung von *Pseudomonas* in Fließkammern

Die Kultivierung und die fluoreszenzbasierte Analyse (Kapitel 2.4.8.1) der Biofilme wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Wolfgang Streit und Mirja Gudzhun an der Universität Hamburg an dem Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie nach der Methode von Tolker-Nielsen & Sternberg (2011) durchgeführt.

Die Kultivierung erfolgte in einem 3-Kanal-Durchflusssystem. Die Biofilme wurden auf einem Deckglas gezüchtet (24 mm x 50 mm; Dicke: 0,17 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), welches oberhalb der Durchflusskammer mit Silikon (Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Schweiz) fixiert wurde. Die Durchflusskammern und Schläuche (Standardschläuche (ID 0,8 mm, 1/16"); Tygon Standard R-3607 (ID 1,02 mm), Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) wurden mit sterilem Chlordioxid-Spray (Crystel TITANIUM, Tristel Solutions Ltd., Snailwell, Cambridgeshire, Großbritannien) durchgespült und sterilisiert. Im Anschluss wurden die Kammern mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit befüllt und die Röhrchen autoklaviert. Die Analyse wurde bei 37 °C mit 1:10 verdünntem LB-Medium durchgeführt. Vor Benutzung der Kammern wurden diese mit 1:10 verdünntem LB-Medium für 30 min durchgespült (Durchflussgeschwindigkeit 100 µl/min unter Benutzung des „IPC12 High Precision Multichannel Dispenser“, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland).

Aus einer ÜK wurden die zu untersuchenden *P. aeruginosa* Stämme (PA01 und $\Delta plaB$) auf eine O.D._{580nm} von 0,5 in 1:10 verdünntem LB-Medium eingestellt. Pro Kanal der Durchflusskammer wurden 300 µl der verdünnten Kultur injiziert. Nachdem der Medienzufuhr (50 µl/min) für eine Stunde unterbrochen wurde, erfolgte die Bilderfassung (Kapitel 2.4.8.1).

2.4.8.1 Fluoreszenzbasierte Untersuchung von Biofilmen in Fließkammern

Unter Verwendung des „LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kits“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden die Zellen mit lebend/tot Farbstoffen angefärbt (Propidiumiodid und SYTO 9). Die Visualisierung der Biofilme erfolgte mit einem konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskop (CLSM) „Axio Observer.Z1/7 LSM 800 mit Airyscan“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und dem Objektiv C-Apochromat 63x/1.20W Korr UV VisIR. Die Aufnahmen der fluoreszenzbasierten Untersuchung der Biofilmarchitektur für den Wildtyp *P. aeruginosa* PA01 werden ebenfalls in der Dissertation von Caliskan, M. (unveröffentlicht, Institut für Molekulare Enzymtechnologie) dargestellt.

Die Einstellungen des Mikroskops für die verschiedenen Farbstoffe können aus Tab. 2.5 entnommen werden. Die Analyse der mikroskopischen Aufnahmen und der 3D-Rekonstruktion erfolgte mit dem Programm „ZEN Version 2.3“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland).

Tab. 2.5: Einstellungen für das Mikroskop.

	Propidiumiodid	SYTO 9
Gammakorrektur	1,0	
Lochblende	51 μm	
<i>Detector digital</i>	1,0	
Laser Intensität	0,2 %	
Laser Wellenlänge	561 nm	488 nm
Detektionswellenlänge	460-700 nm	410-560 nm
Detektorverstärkung	650 V	600 V

Zusätzlich erfolgte eine statistische Auswertung der Biofilmaufnahmen mit dem Programm „BiofilmQ“ (Hartmann *et al.*, 2019). Mit diesem Programm wurde jeweils vier Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten (Abb. 8.2) analysiert. Hierbei wurden die Höhe der Biofilme, die *mean thickness*, die *roughness* und die Anzahl der lebenden bzw. toten Zellen gemessen. Der *Threshold* zum Herausfiltern der Hintergrundfluoreszenz wurde für jedes Bild einzeln und manuell eingestellt.

2.4.9 Nachweis der Expression von *paplaB_{h6}* in *E. coli* C43(DE3)

Nach der Transformation (Kapitel 2.4.4) der *E. coli* C43(DE3) Zellen mit den Expressionsplasmiden (pET22b-*paplaB_{h6}*, pET22b-*paplaB_{h6}*S79A, pET22b-*paplaB_{h6}*D196A, pET22b-*paplaB_{h6}*H244A, Tab. 2.2) wurden diese in LB-Medium mit Ampicillin (Tab. 2.4) ü.N. bei 37 °C (120-150 UpM) kultiviert. Die Hauptkulturen wurden wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben angesetzt. Nachdem die Zellen die logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580nm} von 0,4-0,6) erreicht haben, wurde den Kulturen Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 1 mM) zur Induktion der Genexpression zugegeben. Vor der Zugabe des Induktors und über einen Zeitraum von fünf Stunden wurde stündlich eine Probe entnommen. Hierzu wurde 1 ml der Hauptkultur zentrifugiert (1 min, 21380 x g, RT) und mit 100 mM Tris-HCl pH 8 auf eine O.D._{580nm} von 10 eingestellt. Diese Probe wurde für die elektrophoretische Größenauftrennung mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE, Kapitel 2.6.1) und dem immunologischen Nachweis mittels Western Blot (Kapitel 2.6.2) verwendet. Für den enzymatischen Nachweis der Esteraseaktivität (Kapitel 2.6.4) von Ganzzelllysaten wurden die Zellen nach der Suspension in 100 mM Tris-HCl, pH 8 (O.D._{580nm} von 10) mit der Sonotrode (2 x 1 min, 35 % Intensität, Sonoplus

Generator HD 20270 mit Ultraschallwandler UW 2070; Sonotrode KE76, MS72, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) aufgeschlossen.

2.4.10 Zelluläre Lokalisation von PaPlaB_{H6} und Isolierung von bakteriellen Membranen

Die Isolierung der Membranen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kovačić *et al.* (2013). Die Zellen einer *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{H6}* Expressionskultur wurden vor und über einen Zeitraum von fünf Stunden nach der Zugabe des Induktors (1 mM IPTG) zentrifugiert (1 min, 21380 x *g*, RT) gefolgt von der Suspension der Zellen in 1 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8 (in 50 ml Puffer wurde eine Tablette „SigmaFAST™ Protease Inhibitor Cocktail“ gelöst; Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, USA). Unter Verwendung einer Sonotrode (Sonoplus Generator HD 20270 mit Ultraschallwandler UW 2070; Sonotrode KE76, MS72, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) wurden die Zellen aufgeschlossen (2 x 1 min, 35 % Intensität). Für das Entfernen von Zelltrümmern und Einschlusskörperchen wurden die Proben erneut zwei Minuten bei RT zentrifugiert (380 x *g*, Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurden dann in für Ultrazentrifugen (Ultrazentrifuge, Optima I-80 Xp, Rotor 55.2 Ti, Beckmann Coulter, Kalifornien, USA) geeignete Gefäße (1,5 ml Polypropylen Röhrchen) überführt und die Sedimentation von Membranen durchgeführt (zwei Stunden, 201000 x *g*, 4 °C). Die Überstände aus der Ultrazentrifuge wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 x SDS-Probenpuffer (Kapitel 2.6.1) zugegeben. Die isolierten Membranen wurden in 100 mM Tris-HCl, pH 8 (mit Protease Inhibitor) suspendiert. Anschließend wurden die Proben für die elektrophoretische Größenauftrennung der Proteine unter Verwendung der SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1) mit nachfolgendem immunologischen Nachweis mittels Western Blot (Kapitel 2.6.2) verwendet. Als Kontrolle wurden *E. coli* C43(DE3) Zellen, die den Leervektor pET22b tragen, parallel vorbereitet.

Für die Separation von integral und peripher gebundenen Proteinen (Kapitel 2.4.11) sowie die Trennung der inneren- und äußeren Membran (Kapitel 2.4.12) erfolgte die Suspension der *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{H6}* Zellen (fünf Stunden nach Zugabe des Induktors) in 1 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8 ohne Proteaseinhibitor.

Für die Proteinreinigung wurden die Zellen einer 6 l *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{H6}* Expressionskultur fünf Stunden nach der Induktion mit 1 mM IPTG für 10 min bei 6350 x *g* und 4 °C zentrifugiert (Sorvall R6 Zentrifuge, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) und mit Hilfe der „FrenchPress“ (Cell Disrupter, Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, USA) in 100 mM Tris-HCl,

pH 8 (ohne Proteaseinhibitor) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in sechs Durchflusszyklen mit einem Zellinnendruck von 800 bar gefolgt von der Zugabe von Lysozym (2 mg/ml) und DNaseI (0,5 mg/ml) und 30-minütiger Inkubation auf Eis. Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden Zelltrümmer und Einschlusskörperchen durch Zentrifugation entfernt (10 min, 6350 x g, 4 °C). Die Sedimentation von Membranen erfolgte in der Ultrazentrifuge (zwei Stunden, 201000 x g, 4 °C). Die isolierten Membranen wurden dann für die Proteinreinigung (Kapitel 2.6.3) verwendet.

2.4.11 Separation von integral und peripher gebundenen Proteinen

Die Separation von integral und peripher an die Membran gebundenen Proteine erfolgte nach der von Kovačić (2010) beschriebenen Methode. Für den Nachweis, ob es sich bei PaPlaB_{H6} um ein integral oder peripher gebundenes Protein handelt, wurden die Membranen einer *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{H6}* Expressionskultur (100 ml) fünf Stunden nach der Induktion isoliert (Kapitel 2.4.10). Nachdem die Zelltrümmer und Einschlusskörperchen durch Zentrifugation entfernt wurden, wurde der Überstand für die Ultrazentrifugation auf vier 1,5 ml Polypropylen Röhrchen aufgeteilt. Die isolierten Membranen wurden je in einem der folgenden Puffer suspendiert (500 µl; MES-Puffer: 20 mM MES, pH 6,5; Na₂CO₃-Puffer: 10 mM Na₂CO₃, pH 11; Harnstoff-Puffer: 4 M Harnstoff, 20 mM MES-Puffer; TritonX-100-Puffer: 2 % (v/w) TritonX-100, 20 mM MES-Puffer), gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 22 °C im Heizblock (Thermomixer Komfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Anschließend erfolgte die erneute Sedimentation der Membranen in der Ultrazentrifuge (Optima I-80 Xp; Rotor 55.2 Ti, Beckmann Coulter, Kalifornien, USA) bei 20000 x g (4 °C) gefolgt von der Suspension der Membranen in 100 µl Tris-HCl, pH 8. Diese suspendierten Membranen und die lösliche Fraktionen wurden für die elektrophoretische Größenauftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1), dem immunologischen Nachweis der Proteine (Kapitel 2.6.2) und für den enzymatischen Nachweis der Esteraseaktivität mit dem Substrat 4-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB, Kapitel 2.6.4) verwendet.

2.4.12 Trennung der inneren und äußeren Membran mittels Saccharosegradienten

Die Anfertigung des Saccharosegradienten, die Ultrazentrifugation und die Sammlung der Fraktionen wurden in Kooperation mit Jun.-Prof. Dr. Alexej Kedrov und Michael Kamel an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am Institut für Synthetische Membransysteme nach der Methode von Kanonenberg *et al.* (2019) durchgeführt. Für die Trennung der inneren und äußeren Membranen wurden die Membranen einer *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{H6}* Expressionskultur

(25 ml) fünf Stunden nach Zugabe des Induktors, als auch der Leervektorkontrolle (pET22b) isoliert (Kapitel 2.4.10). Die isolierten Membranen wurden in 150 μ l 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,4 gelöst und anschließend auf den Saccharosegradienten (20-70 % (w/v)) gegeben. Hierfür wurden 5 ml 20 % (w/v) Saccharose-Lösung in ein Glasröhrchen überführt, gefolgt von 5 ml 70 % (w/v) Saccharose-Lösung, welche auf den Boden des Glasröhrchens pipettiert wurde. Das Glasröhrchen wurde für 15 min mit Hilfe des Gradientenmischers „Gradient Station ip“ (Biocomp Instruments, Fredericton, Kanada) geschwenkt, wodurch sich ein diskontinuierlicher Gradient einstellte. Die zu separierenden Proben wurden auf den Gradienten pipettiert, gefolgt von einer 16 stündigen Ultrazentrifugation im Schwenk-Rotor SW40 (110,000 x g, 4 °C, Beckmann Coulter, Kalifornien, USA). Die Trennung der einzelnen Fraktionen erfolgte ebenfalls am Gradientenmischer, welcher einen Fraktionierer beinhaltet (*Gradient Station ip*; Biocomp Instruments, Fredericton, Kanada). Die Absorption wurde mit dem „Triax™ Full Spectrum Flow cell“ (Biocomp Instruments, Fredericton, Kanada) gemessen. In Tab. 2.6 sind die Einstellungen für die Fraktionierung aufgelistet. Im Anschluss konnten die einzelnen Fraktionen für die elektrophoretische Größenauftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1) oder dem enzymatischen Nachweis der Esteraseaktivität (Kapitel 2.6.4) verwendet werden. Mit Hilfe eines Refraktometers (OPTECH, Optimal Technology, Baldock, UK) konnte die Saccharosekonzentration der einzelnen Fraktionen bestimmt werden.

Tab. 2.6: Einstellungen für die Fraktionierung der Proben an der *Gradient Station*.

Fraktionierung		Scan-Einstellungen	
Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl der Fraktionen	12	Kanal A Wellenlänge	280 nm
Abstand/Fraktion	7,06 mm	Kanal B	Alexa 488
Volumen/Fraktion	1,007 ml	Anregung	495 nm
Messgeschwindigkeit	0,30 mm/sek	Anregung Filter A	500/40 nm
Absolute Distanz	84,7 mm	Emission Filter A	527/50 nm
Totvolumen gesamt	0,299 ml	Sensitivität	0

2.4.13 Herstellung eines *paplaB*-defizienten *P. aeruginosa* Stammes

Zunächst wurde der Mutagenesevektor pEMG- Δ *paplaB* generiert. Dieser enthält ein 814 Bp großes *EcoRI/MluI* Fragment der stromaufwärts Region von *paplaB*, gefolgt von einer Gentamicin-Resistenzkassette und einem 584 Bp großen *MluI/XbaI* Fragment der stromabwärts Region von *paplaB*. Die Gentamicin-Resistenzkassette wurde durch hydrolytische Spaltung des Vektors pBSL142 (Tab. 2.2) unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *MluI* verfügbar gemacht und in den Mutagenesevektor pEMG- Δ *paplaB* kloniert (Kapitel 2.5.8). Die Amplifikation der stromaufwärts bzw. stromabwärts liegenden Genbereiche von *paplaB* erfolgte unter Verwendung

der in Kapitel 2.3 (Tab. 2.3) aufgelisteten Oligonukleotiden. Durch hydrolytische Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI/XbaI* (Kapitel 2.5.5) und Sequenzierung wurde die korrekte Integration der Genfragmente in den Vektor pEMG (Kapitel 2.2) überprüft (Kapitel 2.5.9). Für die Replikation des Mutagenesevektors pEMG- Δ *papIaB* wurde der Stamm *E. coli* CC118 λ pir verwendet (Tab. 2.1). Die Konjugation von *P. aeruginosa* PA01 Zellen (Kapitel 2.4.6) erfolgte im Anschluss an die Transformation des Donorstammes *E. coli* S17-1 λ pir mit dem Mutagenesevektor pEMG- Δ *papIaB* (Kapitel 2.4.4). Die erfolgreiche Aufnahme des Mutagenesevektors in das Chromosom von *P. aeruginosa* PA01 wurde durch die Selektion der konjugierten Zellen auf LB-Agarplatten, die Gentamicin (30 μ g/ml), Kanamycin (300 μ g/ml; eine zusätzliche Kanamycin Resistenzkassette ist auf dem pEMG Vektor enthalten) und Irgasan (25 μ g/ml) enthielten, überprüft. Das Irgasan wurde verwendet, um das Wachstum des Donorstammes zu unterbinden. Nach erfolgter Selektion wurden die Transformanten mit dem Plasmid pSW-2 (Kapitel 2.4.6), welches das für die I-SceI Restriktionsendonuklease codierende Gen enthält, transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, die 2 mM Benzoesäure, Gentamicin (30 μ g/ml) und Irgasan enthielten (25 μ g/ml), ausplattiert. Die Benzoesäure diente als Induktor der Expression der I-SceI Megaendonuklease, welche die SceI Restriktionsschnittstelle auf dem Mutagenesevektor erkennt und die DNA hydrolysiert. Dies führt zum Verlust des Plasmidrückgrats und gleichzeitig zur Reparatur des Doppelstrangbruchs durch homologe Rekombination.

2.4.14 Messung von Pyoverdin in *P. aeruginosa* Kulturüberständen

Für die Messung der Pyoverdine in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ *pIaB* wurden die Stämme 24 h in LB-Medium bei 37 oder 30 °C kultiviert (120-150 UpM). Anschließend erfolgte die Separation von Zellen und Kulturüberstand durch Zentrifugation (1 min, 21380 \times g, RT). 100 μ l des KÜ wurde anschließend in eine 96er Mikrotiterplatte (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit flachem Boden überführt. Die Messung der Pyoverdin spezifischen Fluoreszenz erfolgte im „Tecan infinite M1000Pro“ (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bei λ Ex = 398 nm, λ Em = 455 nm.

2.4.15 Lagerung von Bakterien

Das Lagern von Bakterien in Form von Gefrierkulturen erfolgte in Kryoröhrchen bei -80 °C. Hierfür wurden 1,8 ml einer ÜK mit 138 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) vermischt.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse und Säulen-Reinigung mit Hilfe des „innuPREP Plasmid mini Kit“ von Analytik Jena (Jena, Deutschland) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Die Elution der isolierten DNA erfolgte in dH₂O.

2.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus *P. aeruginosa*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *P. aeruginosa* erfolgte mit dem „DNasy Blood and Tissue Kit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben (Protokoll für Gram-negative Bakterien).

2.5.3 Photometrische Messung von DNA und Protein-Konzentrationen

Mit Hilfe des Mikro UV-Vis Spektralphotometers „NanoDrop 2000c“ von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) wurden die Konzentration der DNA (Absorption: 260 nm) und von gereinigtem PaPlaB_{H6} bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde unter Angabe des Molekulargewichts (49,6 kDa) und des Extinktionskoeffizient von PaPlaB_{H6} ($\epsilon = 73.005 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ermittelt, welcher mit Hilfe des „Expasy-Servers“ kalkuliert wurde (Wilkins *et al.*, 1999).

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten oder der Einbau von Mutationen wurde die Methode der PCR genutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Varianten sind im Folgendem dargestellt.

2.5.4.1 Phusion®-PCR

Für die Vervielfältigung von DNA-Fragmente wurden flankierende Oligonukleotide (Tab. 2.3) für den bestimmten Genbereich in die PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz (Tab. 2.7) und die PCR-Reaktionsbedingungen (Tab. 2.8) werden im Folgenden aufgelistet.

Tab. 2.7: Zusammensetzung des *Phusion*[®]-PCR Reaktionsansatzes.

Menge	Komponente
32 µL	<i>A. dest.</i>
10 µL	5 x <i>Phusion</i> [®] GC-Puffer
1 µL	10 mM dNTP-Mix
3 µL	<i>template</i> DNA (50-100 ng/µl)
1 µL	Vorwärts Primer (10 pmol/µl)
1 µL	Rückwärts Primer (10 pmol/µl)
1,5 µL	DMSO (3 %, w/v)
0,5 µL	<i>Phusion</i> [®] Polymerase

Tab. 2.8: Reaktionsbedingungen für die *Phusion*[®]-PCR.

Vorgang	Temperatur	Zeit (min:sek)	
Initiale Denaturierung	98 °C	00:30	} 30 x Wiederholungen
Denaturierung	98 °C	00:30	
Hybridisierung	45-65 °C	00:30-01:30	
Elongation	72 °C	x	
Finale Elongation	72 °C	10:00	

Abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden (Tab. 2.3) wurde die Hybridisierungstemperatur gewählt. Hierzu wurde das Programm „Clone Manager“ Version 9 (Scientific & Educational Software) verwendet. Alternativ wurde ein Temperaturgradient verwendet, um die optimale Hybridisierungstemperatur zu ermitteln. Für den Temperaturgradienten wurden mehrere Reaktionsansätze angefertigt und für jeden Ansatz wurde eine andere Hybridisierungstemperatur gewählt. Die Elongationszeit wurde basierend auf der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes gewählt. Dies basierte auf der Annahme, dass die Synthesegeschwindigkeit der „*Phusion*[®]Polymerase,, durchschnittlich 500 Bp/sek beträgt. Die PCR wurde in dem „Mastercycler ep-Gradient S“ (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

2.5.4.2 *QuikChange*[®]-PCR

Für den Austausch einzelner Nukleotide auf einem Plasmid wurde die Methode der *QuikChange*[®]-PCR angewendet (Edelheit *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich um eine Zwei-Schritt PCR (Tab. 2.9). Im ersten Schritt wurden fünf Zyklen durchlaufen mit jeweils nur einem Oligonukleotid (Tab. 2.3), sodass eine Hybridisierung der Primer untereinander unterbunden werden konnte. Jeder der beiden Reaktionsansätze beinhaltete jeweils die Hälfte (Volumen) aller in Tab. 2.7 genannten Komponenten und je nur ein Oligonukleotid. Nach Ablauf des ersten Schrittes wurden beide Reaktionsansätze vereint und der zweite Schritt der PCR gestartet.

Tab. 2.9: Reaktionsbedingungen für die *QuikChange*[®]-PCR.

Vorgang	Temperatur	Zeit (min:sek)	
Initiale Denaturierung	98 °C	01:00	
Denaturierung	98 °C	00:30	} 5 x Wiederholungen
Hybridisierung	x °C	00:30	
Elongation	72 °C	03:30	
Finale Elongation	72 °C	07:00	
Beide Reaktionsansätze wurden vereint.			
Vorgang	Temperatur	Zeit (min:sek)	
Initiale Denaturierung	98 °C	00:30	} 18 x Wiederholungen
Denaturierung	98 °C	00:20	
Hybridisierung	x °C	00:30	
Elongation	72 °C	03:30	
Finale Elongation	72 °C	07:00	

Die Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden (Tab. 2.3) gewählt. Um zu verhindern, dass das Ausgangs-Plasmid mit in den Transformationsansatz gelangt, wurden im Anschluss an die PCR 3 µl (10 U/µl) des Restriktionsenzym *DpnI* dem Reaktionsansatz zugefügt und ü.N. bei 37 °C inkubiert. *DpnI* hydrolysiert ausschließlich methylierte DNA.

2.5.5 Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde angewendet, um Plasmide zu konstruieren und zu überprüfen (Smith & Birnstiel, 1976). Die Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten: 1-5 U Restriktionsenzym(e), x µl Puffer, x µl DNA (100-150 ng) und wurden bis 10 µl mit *A. dest* aufgefüllt. Um eine bestmögliche Effizienz zu gewährleisten, wurden die Reaktionsbedingungen mit Hilfe des Programms *double digest calculator* von Thermo Fischer Scientific Inc. (Waltham, USA) gewählt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Reaktionsansätze für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte nach Angaben des Herstellers bei definierter Dauer und Temperatur.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Agarose-Gelelektrophorese (Vogelstein & Gillespie, 1979) wurde für die Überprüfung von hydrolytischen Spaltungen von DNA (Kapitel 2.5.5), PCR-Produkten (Kapitel 2.5.4) und zur Isolierung von DNA-Fragmenten (Kapitel 2.5.7) angewendet. Dazu wurde ein Agarosegel (1 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer mit 98 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris), 89 mM Borsäure, 2,5 mM Na₂-EDTA) als Trennmatrix verwendet. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt (Qiagen, Hilden, Deutschland). Als DNA-Molekulargewichtsstandard wurde der *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* von Thermo Fisher

Scientific Inc. (Waltham, USA) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V für 20-30 min in horizontalen Gelkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde der Farbstoff „Midori Green Advance“ (NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:80000 dem 1 % Agarosegel zugefügt.

2.5.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das „QIAquick Gel Extraction Kit“ von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) wurde für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNA erfolgte in H₂O.

2.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) und ein molekulares Verhältnis von Vektor zu *insert* von 1:3 verwendet (Duoaczyk *et al.*, 1975). Alle Ligationsansätze beinhalteten folgende Komponenten: 1 µl T4 Ligase-Puffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µL), x µl Vektor DNA (50 ng), x µl *insert* DNA, mit x µl *A. dest* auf ein Gesamtvolumen von 10 µl auffüllen. Der „ligation calculator“ (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) wurde für die Berechnung der einzusetzenden Menge an *insert* DNA verwendet. Anschließend erfolgte die Ligation für eine Stunde bei 22 °C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65 °C. Unter Verwendung der „Fast AP Thermosensitive alkaline Phosphatase“ nach Herstellerangaben erfolgte die Dephosphorylierung der DNA.

2.5.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) und wurden von der Firma MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt:

M13-uni: 5' - AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT - 3'

M13-21: 5' - TGTA AACGACGGCCAGT - 3'

M13-rev: 5' - GAGCGGATAACAATTTACACAGG - 3'

T7-mod: 5' - CCCGCGAAATTAATACGACTCAC - 3'

T7: 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Proteintrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Größenauftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Proben wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und auf eine definierte O.D._{580nm} eingestellt. Im Anschluss erfolgte das Erhitzen der Proben für zehn Minuten bei 95 °C, um die Proteine zu denaturieren (Laemmli, 1970).

Für die Elektrophorese wurde 1 x SDS-Laufpuffer (3,03 g/l Tris, 14,41 g/l Glycin, 1,0 g/l SDS) verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht jeweils aus einem Trenn- und einem Sammelgel, deren Zusammensetzungen in Tab. 2.10 beschrieben werden.

Tab. 2.10: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Komponente	Sammelgel 5 %	Trenngel 12 %
Acrylamid (37 %, v/v)	0,83 ml	4 ml
Tris-HCl	1,3 ml (0,5 mM, pH 6,8)	2,5 ml (1,5 mM, pH 8,8)
<i>A. dest.</i>	2,8 ml	3,4 ml
SDS (10 % w/v)	50 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l
APS (10 % w/v)	50 μ l	100 μ l

Die Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde für die elektrophoretische Trennung der Proteine verwendet (100 V, 15 min; 200 V, 45 min, 1 x SDS-Laufpuffer). Die Geltaschen wurden mit den zu testenden Proben und einem Proteingrößenstandard „Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) beladen. Nachfolgend wurden die Gele entweder mit „Colloidal Coomassie“ (Merril, 1990) angefärbt oder für den immunologischen Nachweis mittels Western Blot vorbereitet (Kapitel 2.6.2).

2.6.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Nach der SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1) erfolgte der Transfer der Proteine (Dunn, 1986) mit der Transferapparatur „mini-Protean 3 cell“ auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (BioRad, München, Deutschland) in Dunn-Carbonat-Puffer (3,18 g/l Na₂CO₃, 8,40 g/l NaHCO₃, 20 % (v/v) Methanol) für 15 min bei 150 mA und für weitere 45 min bei 300 mA. Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver, welches in 1 x TBST-Puffer (3,003 g/l Tris-HCl, 8,77 g/l NaCl, 0,112 g/l KCl, 0,2 % (v/v) Tween 20) gelöst wurde, für eine Stunde bei RT inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Für die

Detektion von spezifischen Proteinen wurden jeweils verschiedene Primärantikörper (anti-His(C-term)-HRP Konjugat, Thermo Fisher Scientific Inc., (Waltham, USA); anti-TolC, Leihgabe von Kooperationspartnern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aus dem Institut für Biochemie) und der Sekundärantikörper „Goat-anti-rabbit-HRP“ (Meerrettich-Peroxidase Konjugat) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) verwendet. Der Sekundärantikörper wurde für die Detektion von TolC eingesetzt. Für den Nachweis von PaPlaB wurde die PVDF-Membran nach dem Blockieren der Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver eine Stunde lang bei RT mit dem in TBST-Puffer verdünnten (1:5000) Antikörper „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“ inkubiert. Für die Detektion von TolC wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran nach dem Proteintransfer für eine Stunde in 1 x TBST-Puffer mit 3 % (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Im Anschluss erfolgte die zweistündige Inkubation der Membran in 1 x TBST-Puffer mit 3 % (w/v) BSA und dem Primärantikörper „anti-TolC“, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper „Goat-anti-rabbit-HRP“ (Verdünnung 1:5000 in 1 x TBST-Puffer mit 3 % (w/v) BSA) bei RT. Den Inkubationen mit den Antikörpern folgend wurde die Membran dreimal mit 1 x TBST-Puffer für jeweils 10 min bei RT gewaschen. Danach wurde die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase durch Chemielumineszenz unter Verwendung des Substrats „Pierce™ ECL Western Blotting Substrate“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) detektiert und mit Hilfe des „Intas Advanced Fluorescence Imager“ (Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland) visualisiert.

2.6.3 Reinigung von Proteinen mit IMAC

(immobilisierter Metallaffinitätschromatographie)

Um PaPlaB_{H6}, welches einen 6-Histidin-Affinitätstag besitzt, in Reinform zu erhalten, wurde die Methode der IMAC (modifiziert nach Hochuli *et al.*, 1987) verwendet. Hierzu wurde Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) als Chelatgruppe verwendet, welches in der Lage ist, stabil an die Matrix zu binden (durch Belegung von vier Bindungsstellen eines Ni²⁺ Ions durch NTA). Die Imidazol-Ringe der Histidine binden an die immobilisierten divalenten Kationen der Ni-NTA. Für Proteinreinigungen im Verlauf dieser Arbeit wurde immer Zellmaterial aus 6 l *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB*_{H6} Expressionskultur (5 h Inkubation nach Zugabe des Induktors) verwendet (Kapitel 2.4.9). In Kapitel 2.4.10 wird die Isolierung der Membranen beschrieben. Nach der Ultrazentrifugation (zwei Stunden, 201000 x g, 4 °C; Ultrazentrifuge, Optima I-80 Xp, Rotor 55.2 Ti, Beckmann Coulter, Kalifornien, USA) wurde der Überstand verworfen, die isolierten Membranen in 17,5 ml Solubilisierungspuffer (5 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄,

20 mM Imidazol, 1 % (v/v) TritonX-100) suspendiert und ü.N. schüttelnd (120 UpM) bei 4 °C inkubiert. Das Tensid Tritonx-100 wurde dem Solubilisierungspuffer zugegeben, um PaPlaB aus der Membran zu lösen (Schnaitman, 1971). Um nicht gelöste Membranen zu sedimentieren, wurden die Proben erneut in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (30 min, 20000 x g, 4 °C). Für die Aufreinigung wurde der Überstand, der die gelösten Membranproteine enthielt verwendet und auf die Ni-NTA *Superflow* (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgetragen. Mit dem Proteinaufreinigungssystem „Äkta™ pure device,“ (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) erfolgte die Aufreinigung. Zu Beginn wurde die Ni-NTA Säule mit einem zehnfachen Säulenvolumen (SV) des Equilibrierungspuffers (5 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 1 % (v/v) TritonX-100) equilibriert. Die Ni-NTA-Agarose (4 ml) wurde mit dem Überstand aus der Ultrazentrifuge vermischt und für ca. 10 min inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Proteine und das TritonX-100 zu entfernen, wurde die Säule mit 30 ml Waschpuffer 1 (5 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄, 20 mM Imidazol) und darauffolgend mit 30 ml Waschpuffer 2 (5 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄, 50 mM Imidazol, 0,22 mM DDM) gewaschen. Das milde, nichtionische Detergens DDM (*n*-Dodecyl-β-D-Maltosid, Endkonzentration 0,22 mM) wurde den Puffern für die IMAC Reinigung zugegeben, um PaPlaB in Lösung zu halten. Hierbei wurde die kritische Mizellkonzentration (*critical micelle concentration*; CMC) nicht unterschritten. Die Elution des Zielproteins erfolgte in 7,5 ml Elutionspuffer (5 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄, 500 mM Imidazol, 0,22 mM DDM). Zur Entfernung des Imidazols wurden PD10-Säulen (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) nach Herstellerangaben unter Verwendung des Lagerungspuffers (100 mM Tris-HCl pH 8, 0,22 mM DDM) genutzt. Für das Anreichern der Elutionsfraktion durch das Verringern des Volumens wurden Amicon®Ultra4 Ultrafiltrationsröhrchen mit einer regenerierten Zellulosemembran eingesetzt (Porengröße: 10 kDa). Infolge der Reduktion des Gesamtvolumens erfolgte eine nicht gewünschte Anreicherung der Detergensmoleküle (*n*-Dodecyl-β-D-Maltosid, DDM). Um diese zu reduzieren, wurden „BioBeads™ SM-2 Resins“ (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Diese wurden zunächst mit Tris-HCl, pH 8 equilibriert und dann zu den angereicherten Proteinproben zugegeben, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurden die Proteinprobe für zwei Minuten bei 21380 x g (4 °C) zentrifugiert und die „BioBeads“ entfernt (Mikroliterzentrifuge Mikro200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das gereinigte Protein PaPlaB_{H6} ohne Benennung des C-terminalen His₆-tags als PaPlaB bezeichnet.

2.6.4 Bestimmung der Esteraseaktivität

Für den enzymatischen Nachweis von Esterasen wurde das Substrat 4-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB) unter Anwendung der modifizierten Methode von Wilhelm *et al.* (1999) verwendet. Dazu wurden 20 mM *p*NPB in Ethanol *pro analysis* (*p.a.*) gelöst und anschließend 1:20 in 100 mM K₂HPO₄ pH 7,4 verdünnt. 150 µl dieser Substratlösung wurden mit 10 µl der zu testenden Probe versetzt. Es erfolgte eine zeitaufgelöste Absorptionsmessung der Umsetzung des Substrats über einen Zeitraum von zwei Stunden im Intervall vom 15 sek bei 37 °C und 410 nm in dem Plattenphotometer „SpectraMAx250“ (Marshall Scientific, Hampton, USA). Die volumetrische Enzymaktivität (U/ml) wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

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

V_{gesamt}= Gesamtvolumen [ml]; VF= Verdünnungsfaktor; d= Schichtdicke [cm];

ε= Extinktionskoeffizient [ml/µmol * cm]; t= Zeit [min]; V_{Probe}= Volumen der Probe [ml]

2.6.5 Nachweis der Phospholipaseaktivität mit natürlichen Lipiden

Für den Nachweis von freien Fettsäuren nach der Hydrolyse von (Lyso-) Phospholipiden (Flieger *et al.*, 2002) wurde das „NEFA-Kit“ (FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden 13,4 mM der unterschiedlichen Lipide (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA, Tab. 2.11) in NEFA-Puffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 % (v/v) TritonX-100, pH 7,2) gelöst.

Für den enzymatischen Nachweis der freien Fettsäuren in Ganzzelllysaten wurde 1 ml der Hauptkultur zentrifugiert (1 min, 21380 x *g*, RT), in 100 mM Tris-HCl pH 8 suspendiert und auf eine O.D._{580nm} von 10 eingestellt, gefolgt vom Zellaufschluss mit der Sonotrode (2 x 1 min, 35 % Intensität; Sonoplus Generator HD 20270 mit Ultraschallwandler UW 2070; Sonotrode KE76, MS72, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Für die Aktivitätsmessungen wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung der Lipid-Stammlösung eingesetzt. Die Inkubation der Probe (Ganzzelllysat oder gereinigtes Protein) und den Lipiden (Volumetrischen Mengenverhältnis 1:1) erfolgte für 15 min bei 37 °C in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

Zur Detektion der freien Fettsäuren wurden 5 µl des Enzym-Lipidgemisches verwendet. Zusätzlich wurden drei unterschiedliche Kontrollen verwendet, welche endogene Fettsäuren (Enzym mit NEFA-Puffer) und Autohydrolyse (NEFA-Puffer mit Proteinpuffer bzw. Lipidlösung mit NEFA-Puffer) nachweisen. Als Referenz und gleichzeitige Kontrolle für die Funktionalität des

„NEFA-Kits“ wurden 5 µl Ölsäure in verschiedenen Mengen (0 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM) für eine Standardkurve eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 546 nm im Plattenphotometer „SpectraMax i3“ (Molecular devices, LLC., Kalifornien, USA).

Tab. 2.11: Alle in dieser Arbeit verwendeten (Lyso-) Phospholipide.

Name	Abkürzung	Bestell-Nr.:
1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin	PC 12	850335P
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	PC 16	850355P
1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	PG 12	840435P
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	PG 16	840455P
1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	PE 6	850697P
1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	PE 10	850700P
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	PE 14	850745P
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	PE 18	850715P
1-lauroyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin	LPC 12	855475P
1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin	LPC 16	855675P
1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	LPG 14	858120P
1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	LPG 16	858122P
1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	LPE 16	856705P
1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin	PC16:0-18:1	850457P

2.6.6 Bestimmung der Phospholipase A₁ - und A₂ - Aktivität mit synthetischen Lipiden

Für die Untersuchung, ob es sich bei PaPlaB um eine Phospholipase A₁ oder A₂ handelt, wurden die beiden Kits „EnzChek™ Phospholipase A1 bzw. A2 Assay Kit“ (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Als Positivkontrollen wurden die Phospholipase PLA₁ aus *Thermomyces lanuginosus* (5 U/ml) und die PLA₂ aus *Naja mocambique mocambique* (0,7 U/ml) verwendet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im „Tecan infinite M1000Pro“ (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) über einen Zeitraum von 30 min (Messintervall: 15 sek.).

2.6.7 Nachweis der Hydrolyse von Acyl-CoA Thioestern

Hierzu wurden die verschiedenen Acyl-Coenzyme A (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA, Tab. 2.12) in NEFA-Puffer (Kapitel 2.6.5) gelöst (Stocklösung: 5 mM). 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, 10 mM) wurden in Tris-HCl (0,4 M, pH 8) gelöst und 5 µl je well in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. 75 µl der zu testende Probe wurden mit 25 µl des Substrates vermischt und zum DTNB gegeben. Es erfolgte eine zeitaufgelöste Messung der Umsetzung des Substrats in einem Plattenphotometer (SpectraMAX250, Marshall Scientific, Hampton, USA) über einen Zeitraum zwei Stunden in einem Intervall von 15 sek bei 37 °C und 412 nm. Die Berechnung der Aktivität

erfolgte, wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben. Der zur Berechnung der Aktivitäten verwendete Extinktionskoeffizient für DTNB beträgt $13300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tab. 2.12: Alle in dieser Arbeit verwendeten Acyl-Coenzym A Substrate.

Name	Abkürzung	Bestell-Nr.:
Octanoyl-Coenzym A	CoA-C8	870708P
Decanoyl-Coenzym A	CoA-C10	870710P
Lauroyl-Coenzym A	CoA-C12	870712P
Myristoyl-Coenzym A	CoA-C14	870714P
Palmitoyl-Coenzym A	CoA-C16	870716P

2.6.8 Enzyminhibierung durch Lipase-Inhibitoren

Drei verschiedenen Serinprotease-Inhibitoren wurden für die Inhibierung von PaPlaB getestet (Kovačić *et al.*, 2016). Dazu wurden 38 mM Tetrahydrolipstatin (THL, Hadvary *et al.*, 1991), 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Nam *et al.*, 2009) und 100 mM Paraoxon (Crow *et al.*, 2012) jeweils in Isopropanol gelöst. 250 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Borkar *et al.*, 2009) als Inhibitor für Metalloenzyme wurde in Tris-HCl (100 mM, pH 8) gelöst. Für den Versuch wurden 100 µl PaPlaB (1,21 µM) mit 5,54 µl THL (Endkonzentration 2 mM), 1,01 µl PMSF (Endkonzentration 1 mM), 1,01 µl Paraoxon (Endkonzentration 1 mM) oder 4,16 µl EDTA (Endkonzentration 10 mM) für 1,5 h bei 30 °C inkubiert, gefolgt von dem Nachweis der Esteraseaktivität (Kapitel 2.6.4).

2.6.9 Thermostabilität von PaPlaB

Die Temperaturstabilität von Proteinen wurde durch „nano differential scanning fluorimetry“ (nanoDSF) nachgewiesen. Hierbei wird die Tryptophan-abhängige Fluoreszenz gemessen, welche sich je nach chemischer Umgebung der Tryptophane ändert (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Die Emission der Tryptophane ändert sich (von 350 nm zu 330 nm) durch Entfaltung des Proteins. Aus dem Verhältnis der Emission bei 350 nm und 330 nm kann der Schmelzpunkt des Proteins kalkuliert werden, welcher angibt, wann 50 % des Proteins in einem entfalteten Zustand vorliegt. Für die Messung wurden Kapillare „Prometheus NT.Plex nanoDSF Grade Standard Capillary Chips“ mit 10 µl des zu testenden Proteins (optimal 1 mg/ml) beladen und mit Hilfe des „Prometheus NT.Plex“ (Nanotemper Technologies GmbH, München, Deutschland) gemessen. Der Temperaturgradient verlief zwischen 20-90 °C mit einem gewählten Temperaturanstieg von 0,1 °C/min. Für den Nachweis der enzymatisch basierten Thermostabilität wurde das Protein im „Mastercycler ep-Gradient S“ (Eppendorf AG, Hamburg, Eppendorf) für eine Stunde erhitzt (30-70 °C) und anschließend die Esteraseaktivität mit dem Substrat *p*NPB (Kapitel 2.6.4) bestimmt.

2.6.10 Fettsäure-Extraktion und GC-MS Analyse

(Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)

Um nachzuweisen, ob die Hydrolyse eines Phospholipids an der sn1 oder sn2-Position stattgefunden hat, wurden 2 ml PaPlaB (4,28 µg/mL) mit 2 ml PC 16:0-18:1 (0,5 mM; Tab. 2.11) bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Extraktion der freien Fettsäuren mittels Chloroform-Methanol-Extraktion (Wewer *et al.*, 2011). Hierzu wurde das Gesamtvolumen des Enzym-Lipidgemisches mit NEFA-Puffer auf 5 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Probe in einen Scheidetrichter überführt und 12 ml Chloroform:Methanol (Verhältnis 2:1) zugegeben. Es erfolgte kräftiges Schütteln mit regelmäßigem Druckausgleich. Die Chloroform-Phase (untere Phase) wurde abgenommen und in einen Rundkolben überführt. Erneut wurden 8 ml Chloroform zugegeben, die Proben erneut dreimal kräftig geschüttelt und die Chloroform-Phase abgenommen. Chloroform wurde bei 474 bar und 42 °C in einem Rotationsverdampfer (Rotavapor®R-100, Büchi, Essen, Deutschland) verdampft. Nach Erreichen eines Volumens von ca. 1 ml wurden die Extrakte in Schraubverschlussröhrchen aus Glas mit Teflon-Kappe überführt und final abgedampft. Es erfolgte die Begasung mit Argon, um das Oxidieren der Fettsäuren zu vermeiden. Bis zur weiteren Vermessung wurden die Proben bei -20 °C gelagert

Die Analyse der extrahierten Fettsäuren mittels GC-MS wurde in Kooperation mit Dr. Björn Thiele am Forschungszentrum Jülich am Institut für Bio- und Geowissenschaften, Pflanzenwissenschaften (IBG-2) durchgeführt. Nach der Extraktion wurden die Rückstände in 1 ml Acetonitril:Methylenchlorid (Verhältnis 4:1) gelöst und derivatisiert. Hierzu wurden 100 µl jeder Probe mit 700 µl Acetonitril, 100 µl Pyridin und 100 µl *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid bei 90 °C für eine Stunde erhitzt. Ein 1 mM Fettsäure-Gemisch (C10-, C12-, C14-, C16-, C18 und C18:1) wurde verdünnt (50, 100, 200 und 400 µM) und ebenfalls derivatisiert. Der Gaschromatograph bestehend aus einem „Agilent gas chromatograph 7890A“ und einem Fraktionssammler G4513A (Agilent, Santa Clara, USA) wurde mit einem „TOF Massenspektrometer JMS-T100GCV AccuTOF GCv“ (Jeol, Tokio, Japan) gekoppelt. Die Analyten wurden mit Hilfe einer „Zebron-5-HT Inferno Säule“ (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm Filmdicke, Phenomenex Inc., Torrance, USA) separiert. Als Trägergas wurde Helium mit einem Gasfluss von 1 ml/min verwendet. Für silylierte Fettsäuren wurde das Ofenprogramm wie folgt gewählt: 80 °C; 5 °C/min bis 300 °C für 1 min. Die Temperatur des Injektors wurde bei 300 °C gehalten und die Injektionen (1 µl) wurden alle im „split mode“ vorgenommen (1:10). Das Massenspektrometer wurde in dem Elektronenstoß-Modus (EI) bei einer ionisierenden

Spannung von 70 V und Strom (300 μ A) verwendet. Mit einem Aufzeichnungsintervall von 0,4 sek wurden die Analyten über einen Bereich von m/z 50-750 gescannt. Die Temperatur der GC-Schnittstelle und der Ionisationskammer wurden beide bei 250 °C gehalten. Mit dem Programm „XCalibur 2.0.7“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) wurde die Umwandlung der Rohdaten durchgeführt. Die freien Fettsäuren wurden mit Hilfe der Retentionszeiten und Massenspektren der Standards identifiziert.

2.6.11 Größenausschlusschromatographie zur Analyse der konzentrationsabhängigen Oligomerisierung

(SEC, *Size exclusion chromatography*)

Die Messung des Oligomerisierungszustandes erfolgte mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (LC-10Ai isokratische Pumpe und SPD-M20A Photodioden-Array-Detektor, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) unter Verwendung der „BioSep-SEC-S3000 Säule“ (300x 7,8 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Für die Kalibrierung wurden sechs Standardproteine (Tab. 2.13) verwendet, welche ebenso wie PaPlaB in 100 mM Tris-HCl, pH 8 mit 0,22 mM DDM gelöst wurden. Für die Analyse wurden 100 μ l PaPlaB der jeweiligen Proteinkonzentration (0,1, 0,5 und 1 mg/ml) auf die Säule aufgetragen und mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min bei 26 °C separiert.

Tab. 2.13: Standardproteine für die Größenausschlusschromatographie.

Standardprotein	Retentionszeit [min]	Molekulargewicht [Da]
Ribonuklease A	20,714	13700
Myoglobin	19,597	17800
Hühnereiweiß (<i>albumin egg</i>)	17,642	45000
Aldolase (Kaninchen)	16,947	160000
Katalase (Rind)	16,259	240000
Ferritin (Pferd)	14,444	450000

Um das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins zu berechnen, wurde zunächst mit nachfolgender Formel der Kapazitätsfaktor K_{AV} berechnet:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{AV} = Kapazitätsfaktor [ml]; V_e = Elutionsvolumen des Standards [ml]; V_0 = Totvolumen [ml]; V_t = Säulenvolumen [ml].

Aus den berechneten K_{AV} -Werten und der Retentionszeit der Standardproteine wurde eine Kalibriergerade bestimmt, mit deren Formel (hier: $y = -2,9095x + 6,3603$) das Molekulargewicht des

zu testenden Proteins ermittelt werden konnte. Hierzu wurde erst der LogMR-Wert berechnet (K_{av} -Wert in die Formel einsetzen), welcher dann als Exponent zur Basis 10 genommen wurde. Das Ergebnis entsprach dem Molekulargewicht des zu testenden Proteins in Da.

2.7 Untersuchung des Proteoms mittels LC-ESI-MS

(Flüssigchromatographie und Elektrospray-Ionisation mit Massenspektrometrie-Kopplung)

Die Analyse des Proteoms mittels LC-ESI-MS wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Kai Stühler und Dr. Gereon Poschmann an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am *Molecular Proteomics Laboratory* durchgeführt. Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* Δ *plaB* wurden während des Wachstums in LB-Medium (30 °C, 120-150 UpM) nach 4 und 24 h geerntet. Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 21380 x *g*, RT), in Lyse-Puffer (30 mM Tris, 7 M Harnstoff, 2 M Thiourea, 4 % (w/v) CHAPS, pH 8,5) suspendiert (O.D._{580nm} von 5) und anschließend mit der Sonotrode aufgeschlossen (2 x 1 min, 35 % Intensität, Sonoplus Generator HD 20270 mit Ultraschallwandler UW 2070; Sonotrode KE76, MS72, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Darauffolgend wurden die Zelllysate erneut sedimentiert, um Zelltrümmer zu entfernen (15 min, 21380 x *g*, 4 °C). Bis zur weiteren LC-ESI-MS Analyse wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Zu Beginn wurden die Zelllysate elektrophoretisch separiert (SDS-PAGE (4-12 % v/v), 5 mm Laufstrecke) und mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt. Folgend wurden die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und vorbereitet (Grube *et al.*, 2018). Die Proteine wurden durch die Zugabe von Dithiothreitol reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und mit Trypsin verdaut. Die Peptide wurden mit 20 fmol „Retention time calibration mixture“ (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) vermischt und in 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure suspendiert. Für die Analyse mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung wurden 500 ng/Probe verwendet. Diese wurden durch das „RSLC Nanochromatographie System“ (*rapid separation liquid chromatography*, Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) unter Verwendung eines zweistündigen Lösemittelgradienten separiert und per Injektion in einem „QExactive Plus Massenspektrometer“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach Elektrospray-Ionisation analysiert. Zunächst wurde ein Untersuchungsspektrum aufgenommen (Auflösung 70000 im Profil-Modus). Später wurde eine Auflösung von 175000 verwendet.

Mit dem Programm „MaxQuant Version 1.6.6.0“ (MPI für Biochemie, Planegg, Deutschland) erfolgte die Datenanalyse mit Standard Parametern (Grube *et al.*, 2018). Die Suche nach

Übereinstimmungen erfolgte mit einem Datenset, bestehend aus *P. aeruginosa* Sequenz-Einträgen (heruntergeladen von UniProt KB am 01.07.2019) und den Retentionszeiten-Standards. Die markierungsfreie Quantifizierung, die „match between runs“ Option und die iBAC Quantifizierung wurden vermessen. Die Methionin-Oxidation, N-terminale Acetylierung, schwere Arginine (+10) und Lysine (+8) wurden als „variable“ eingestellt während die Carbamidomethyl als „feste“ Einstellung gewählt wurden.

2.8 Das *Galleria mellonella*-Virulenzmodell

Die Virulenz von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* Δ *plaB* wurde in Wachsmotten, *Galleria mellonella* (Fauna Topics GmbH, Marbach am Neckar, Deutschland) getestet (Koch *et al.*, 2014). Das Experiment wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Susanne Häußler und Dr. Sebastian Felgner am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung am Institut für Molekulare Bakteriologie in Braunschweig durchgeführt. Für jeden Bakterienstamm wurde zunächst eine ÜK in LB-Medium vorbereitet und bei 37 °C und 180 UpM kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur 1:30 verdünnt und drei Stunden bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Hauptkultur auf eine O.D._{580nm} von 0,055 eingestellt. Diese O.D._{580nm} entspricht bei den hier verwendeten Bakterienstämmen einer ungefähren Bakterienkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Bakterien pro 100 μ l. Diese Suspensionen wurde entsprechend verdünnt und 10 μ l in jede Larve injiziert (10 Larven pro Stamm). Die Larven wurden vorher nach Größe sortiert, um vergleichbare Gruppen zu erhalten. Um die Bewegung der Larven während der Applikation einzuschränken, wurden diese vor Versuchsbeginn 60 min bei 8 °C gelagert.

Für die Injektion wurden die Larven überstreckt und die Bakteriensuspension in das erste Segment hinter dem letzten Bauchfuß injiziert und bei 30 °C gelagert. Anschließend wurde zu festgelegten Zeitpunkten festgehalten, wie viele Larven verstorben sind. Als Kontrolle wurden jeweils 10 Larven mit PBS-Puffer (138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) infiziert und 10 Larven blieben unbehandelt.

2.9 *In silico* Methoden

Für die Planung von Klonierungen und die Auswertungen von Sequenzierungsergebnissen wurde das Programm „Clone Manager“ Version 9 (Scientific & Educational Software) verwendet. Für die Analyse von Aminosäuresequenzen und Homologie-Studien wurden die Programme „SignalP 5.0-Server“ (Petersen *et al.*, 2011), „TatP 1.0-Server“ (Bendtsen *et al.*, 2005), „Basic Local Alignment

Search“ (BLAST) von „The National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; Altschul *et al.*, 1990), Phyre² „Protein homology/analogy recognition engine“ V2.0 (Kelley *et al.*, 2015) und PyMOL „The PyMOL Molecular Graphics System“ Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC. verwendet. Für die Visualisierung des Alignments wurde die Software „BioEdit“ (Hall, 1999) verwendet. Die Vorhersage der Sekundärstruktur erfolgte mit dem „JPred4-Server“ basierend auf dem Hidden Markov Model (Drozdetskiy *et al.*, 2015). Für Kalkulierungen des Extinktionskoeffizienten wurde der „Expasy-Server“ (<http://www.expasy.org>; Wilkins *et al.*, 1999) benutzt. Für die Validierung des 3D-Modells wurde das Programm „TopScore“ (Mulnaes & Gohlke, 2018) verwendet. Berechnungen und Bildbearbeitungen zur graphischen Darstellung wurden mit „Microsoft Excel 2016“ und „Microsoft PowerPoint 2016“ angefertigt.

3 Ergebnisse

Auf der Suche nach neuen putativen Phospholipasen aus *P. aeruginosa* wurde basierend auf bioinformatischen Analysen das durch den ORF *pa2927* kodierte Protein identifiziert (Kovačić, 2010). In der *Pseudomonas*-Datenbank ist das Protein PA2927 bisher nur als hypothetisches Protein annotiert (Winsor *et al.*, 2016). Aufgrund der Homologie zu dem bekannten Virulenzfaktor PlaB aus *Legionella pneumophila* (UniProt-Nr.: Q70LR1_LEGPN) wurde das Gen als *paplaB* und das durch dieses Gen kodierende Protein als PaPlaB bezeichnet. Aufbauend auf diesen ersten Untersuchungen sollte in der vorliegenden Arbeit die putative Phospholipase systematisch untersucht werden. Hierzu wurden Methoden zur Bestimmung der biochemischen Eigenschaften angewendet. Weiterhin sollte durch die Konstruktion eines *P. aeruginosa paplaB*-defizienten Stammes Erkenntnisse über die physiologische Rolle von PaPlaB in *P. aeruginosa* gewonnen werden und eine mögliche Beteiligung an der Virulenz klären. Globale Proteomstudien sollten dabei erste Hinweise auf den Einfluss von PaPlaB auf das komplexe Regulationsnetzwerk in *P. aeruginosa* geben.

3.1 Identifizierung von PaPlaB aus *P. aeruginosa*

Verschiedene *in silico* Analysen wurden mit Hilfe von Datenbanken (Kapitel 2.9) durchgeführt, welche erste Informationen über das Gen und das Protein PaPlaB lieferten. Diese Ergebnisse bildeten das Fundament für die weitere Charakterisierung.

3.1.1 Bioinformatische Analyse und Identifizierung neuer lipolytischer Enzyme

Für die Identifizierung neuer Phospholipasen aus *P. aeruginosa* PA01 wurde zunächst ein Set an Aminosäuresequenzen von bereits bekannten bakteriellen Phospholipasen (Flores-Diaz *et al.*, 2016; Banerji *et al.*, 2008) zusammengestellt und mittels BLASTp (Altschul *et al.*, 1990), eingeschränkt auf *P. aeruginosa* (taxid 287), auf sequenzhomologe Proteine durchsucht. Hierbei wurden die Treffer nach dem maximalen *Score* sortiert und nur beschriebene Proteine als Homologe gewertet. Parallel wurde mit dem „UniProt-Server“ (The UniProt, 2018) nach Homologen gesucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Liste der verwendeten Phospholipasen für die BLAST- und UniProt-Suche.

Protein	Organismus	Lokus	Homolog in <i>P. aeruginosa</i>
PatA (VipD)	<i>L. pneumophila</i> Paris	Lpp_2888	ExoU, WP_033995863.1
PatB	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_3093	/
PatC (VpdA)	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_2065	/
PatD	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_1784	/
PatE	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_1417	/
PatF	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0842	/
PatG (VpdB)	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0696	ExoU, WP_096069296.1; PA3339
PatH	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_2335	/
PatI	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_2623	/
PatJ	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0369	
PatK	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0015	/
PlaA	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_1811	EstA precursor, CRP86129.1
PlaB	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_1029	PA2927
PlaC	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_3121	/
PlaD	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0558	/
PlcA	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_2843	/
PlcA	<i>L. monocytogenes</i> ¹	Lmo_0201	/
PlcB	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0870	/
PlcB	<i>L. monocytogenes</i> ¹	Lmo_0205	/
PlcC	<i>L. pneumophila</i> Corby	Lpc_0013	/
PLC	<i>Mycobacterium abscessus</i>	MAB_0555	PA3319
PLC	<i>Burkholderia pseudomallei</i> ²	BPSS_0067	PA3319
PLD	<i>Rickettsia prowazekii</i> ³	RP_819	/
PLD	<i>Acinetobacter baumannii</i> ⁴	A1S_2989	/
PLD	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BANRA_05901	/
LpdA	<i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1	Lpg_1888	/
SlaA	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotyp M28	M28-Spy 1222	/
YplA	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ERS008580_01585	/

¹*Listeria monocytogenes* Serovar 1/2a; ²*Burkholderia pseudomallei* (Stamm K96243); ³*Rickettsia prowazekii* (Stamm Madrid E); ⁴A1S= *Acinetobacter baumannii*.

Aus der Aminosäuresequenz basierten Suche nach homologen Phospholipasen konnte PaPlaB, ein als hypothetisch annotiertes Protein identifiziert werden (Winsor *et al.*, 2016; Kovačić, 2010), welches Homologien zu PlaB, einer bereits bekannten intrazellulären Phospholipasen A aus *L. pneumophila* Corby aufweist (Flieger *et al.*, 2004; Schunder *et al.*, 2010; Bender *et al.*, 2009; Banerji *et al.*, 2008; Kuhle *et al.*, 2014; Lang & Flieger, 2011). Das Gen *pa2927* kodiert ein 49,6 kDa großes Protein (443 AS), welches für den N-terminalen Bereich eine 23,3 % Sequenzähnlichkeit und für den C-terminalen Bereich eine 14,8 % Ähnlichkeit zu LpPlaB aufweist. Insgesamt beträgt die Sequenzidentität ca. 25 %.

3.1.2 Sequenzbasierte Analyse von PaPlaB aus *P. aeruginosa* PA01

Unter Verwendung der Pfam-Datenbank (El-Gebali *et al.*, 2018) wurde die Aminosäuresequenz von PaPlaB hinsichtlich konservierter Domänen überprüft, jedoch wurden keine signifikanten Domänen gefunden, ausgenommen der Bereich zwischen AS 5-134. Dieser Bereich wurde der Familie der α/β -Hydrolasen zugeordnet (*Accession*: PF12697; E-value:3.1E-9). Des Weiteren wurde überprüft, ob die Aminosäuresequenz eine Sequenz für Signalpeptide der konventionellen Sekretion aufweist. Hierzu wurde sowohl der „SignalP 5.0-Server“ und der „TatP 1.0-Server“ verwendet (Petersen *et al.*, 2011; Bendtsen *et al.*, 2005). PaPlaB weist jedoch keine klassischen Signalpeptid-Motive auf. Für LpPlaB ist bekannt, dass es an der äußeren Zellmembran lokalisiert ist (Banerji *et al.*, 2008), jedoch konnte in Versuchen mit diversen *L. pneumophila* Corby Sekretionsmutanten (*tatC*; *IssB* (T1SS); *IspDE* (T2SS); *Ivh* (T4ASS), *dotA* (T4BSS); *dotB* (T4BSS), *dotB/Ivh* (T4A/BSS) kein Sekretionssystem dem Transport von LpPlaB zugeordnet werden (Kuhle, 2014). Die Suche nach einer Transmembranhelix für beide Proteine unter Verwendung des „TMHMM-Servers v.2.0“ verlief negativ (Krogh *et al.*, 2001; Kuhle, 2014).

Eine BLASTp-Suche mit der Aminosäuresequenz von PaPlaB ergab, dass PaPlaB Homologien (27-43 % Sequenzgleichheit) zu nicht charakterisierten Proteinen und putativen Phospholipasen aufweist. Für ein multiples Alignment wurden neben LpPlaB noch fünf weitere Proteine verwendet, die Auswahl erfolgte in Anlehnung an (Kovačić, 2010; Abb. 3.1).

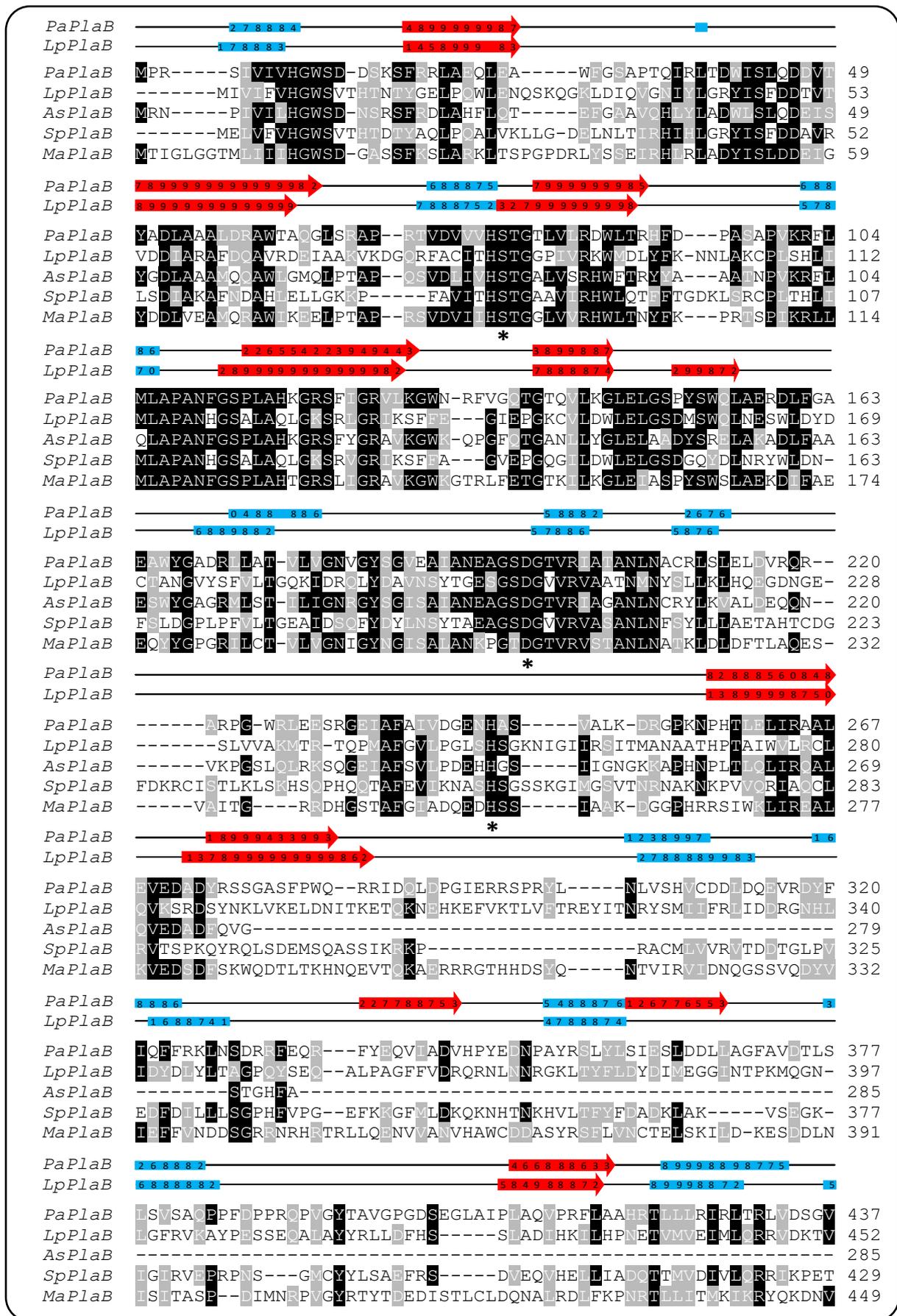


Abb. 3.1: Sequenzvergleich und vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von PaPlaB aus *P. aeruginosa*. Für das Alignment wurden die Sequenzen von PaPlaB aus *P. aeruginosa* PA01 (PaPlaB, Q9HZ50_PSEAE), *Legionella pneumophila* Corby (LpPlaB; Q70LR1_LEGPN), *Alishewanella sp.32-51-5* (AsPlaB, B7Z18_11620),

Shewanella pealeana (SpPlaB, A8GZA7_SHEPA) und *Marinobacter algicola* (MaPlaB, A6EVY1_9ALTE) verwendet. Ein schwarzer bzw. grauer Hintergrund kennzeichnet identische und ähnliche Aminosäuren in mindestens drei Proteinen. Die putativ katalytisch aktiven Aminosäuren (Ser, Asp, His) sind mit einem schwarzen Stern markiert. Die auf Basis der Aminosäuresequenz von PaPlaB und LpPlaB vorhergesagten Sekundärstrukturelemente sind oberhalb des Alignements dargestellt. Hierbei werden α -Helices in rot, β -Faltblätter in blau dargestellt. Die Nummern in den Boxen repräsentieren den von der Software „Jpred4“ (Drozdetskiy *et al.*, 2015) für jede Aminosäure (AS) vorhergesagten *secondary structure prediction score* (1= sehr unwahrscheinlich, 10= sehr wahrscheinlich). Das Alignement wurde mit der Software „BioEdit“ (Hall, 1999) angefertigt. Zur vereinfachten Darstellung wurden die letzten sechs AS von PaPlaB und 22 AS von LpPlaB nicht dargestellt.

Aus dem multiplen Sequenzalignement ist ersichtlich, dass der N-terminale Bereich des Proteins (AS 1-270) stark konserviert vorliegt, der C-terminalen Bereich des Proteins (AS 271-443) jedoch wenige homologe Bereiche aufweist. Die für LpPlaB vorhergesagte katalytische Triade (Ser85, Asp203, His251; Bender *et al.*, 2009) ermöglichte die Identifizierung der putativen katalytischen Triade in PaPlaB aus *P. aeruginosa* PA01, bestehend aus den Aminosäuren Ser79, Asp169 und His244, welche in allen PlaB Homologen hoch konserviert vorliegen. Das putativ aktive Serin von PaPlaB ist genauso wie in LpPlaB in einem VHSTG-Motiv eingebettet, welches sich durch das fehlende Glycin vor dem Serin von dem typischen kanonischen G-X-S-X-G-Motiv von Lipasen unterscheidet (Arpigny & Jaeger, 1999). In LpPlaB ist das Threonin an Position 83 funktionell wichtig. Durch einen Austausch dieser Aminosäure zu Glycin wird die Aktivität von LpPlaB um 95 % reduziert (Bender *et al.*, 2009). Unter Verwendung der Pfam-Datenbank (El-Gebali *et al.*, 2018) konnte für den Sequenzbereich zwischen Aminosäure 420-431 eine geringe Komplexität vorhergesagt werden, einschließlich sich wiederholender hydrophober Aminosäuren (Alanin, Prolin, Leucin) aufgrund dessen eine mögliche Membranlokalisierung für PaPlaB denkbar ist. Die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente des Proteins für den N-terminalen Bereich unterstreichen die vermutete Position der katalytischen Triade, da dieser Bereich die typische α/β -Faltung darstellt.

Um einen besseren Überblick zu bekommen, ob PaPlaB ein Zwei-Domänen Protein ist, wurde eine Modellierung der 3D-Struktur durchgeführt. Hierzu wurde der „Phyre² homology modeling server“ verwendet (Kelley *et al.*, 2015). Da die 3D-Struktur von LpPlaB zum gegenwärtigen Zeitpunkt (17.12.2020) noch nicht in der RSCB *Protein Data Bank* (PDB; Berman *et al.*, 2000) hinterlegt ist, wurde ein Protein mit unbekannter Funktion aus *Listeria innocua* (PDB Code:3DS8) als *template* verwendet (Abb. 3.2).

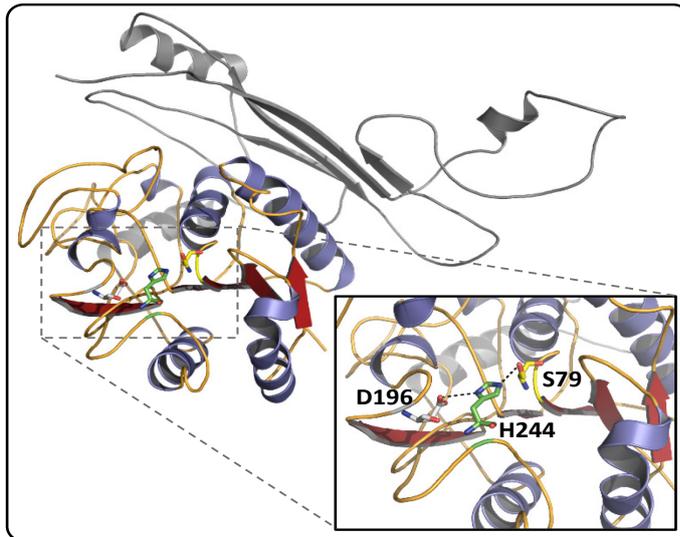


Abb. 3.2: PaPlaB 3D-Homologiemodell unter Verwendung des Proteins mit unbekannter Funktion aus *Listeria innocua* (PDB Code:3DS8) als *template*, angefertigt mit dem Phyre² Server (Kelley *et al.*, 2015). Der N-terminale Bereich ist farbig dargestellt. Der C-terminale Bereich, der mit Hilfe von *ab initio* Einstellungen vorhergesagt wurde, ist in grau unterlegt. Der Bereich der putativen katalytischen Triade ist vergrößert dargestellt. Die putativ aktiven Aminosäuren sind in gelb (Serin, S79), grau (Asparaginsäure, D196) und grün (Histidin, H244) dargestellt. Das *template* wird von dem Programm gewählt.

Das Homologiemodell der 3D-Struktur zeigt für den N-terminalen Bereich eine für lipolytische Enzyme typische α/β -Faltung (Ollis *et al.*, 1992; übereinstimmend mit der Vorhersage der Sekundärstruktur; Abb. 3.2). Für den C-terminalen Bereich des Proteins, in grau dargestellt, wurden keine strukturhomologe Proteine gefunden, weshalb die Struktur dieses Bereiches mit Hilfe von *ab initio* Einstellung des Programms „Phyre²“ vorhergesagt wurde. Mit dieser Einstellung wurden vier β -Faltblätter in unmittelbarer Nähe zueinander vorhergesagt. Da dem C-terminalen Bereich des Proteins keine eindeutige Homologie und somit Funktion zugewiesen werden konnte, wird dieser Bereich im weiteren Verlauf als DUF-Domäne (*domain of unknown function*) bezeichnet. Aus dem Modell geht hervor, dass die Aminosäuren Serin (gelb), Asparaginsäure (grau) und Histidin (grün) in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Die Validierung des 3D-Modells erfolgte mit dem Programm „TopScore“ (Mulnaes & Gohlke, 2018; Abb. 3.3).

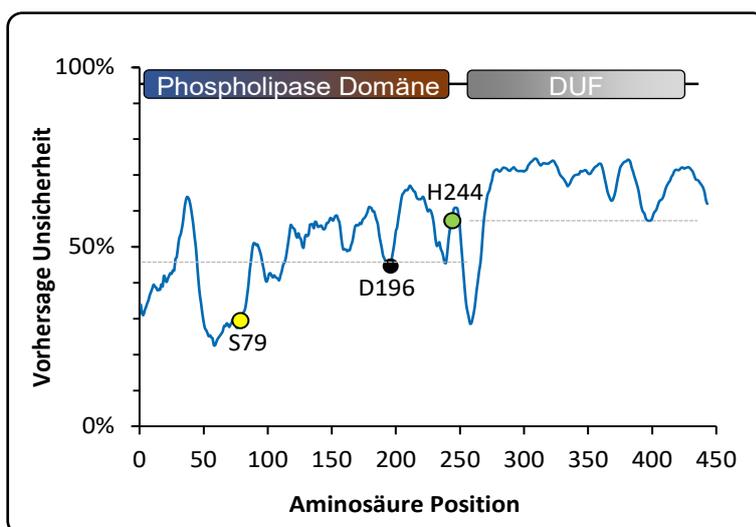


Abb. 3.3: Validierung des 3D-Modells von PaPlaB mittels TopScore (Mulnaes & Gohlke, 2018). Berechnung der Unsicherheit der vorhergesagten Struktur an jeder einzelnen Aminosäure (in Kooperation mit Prof. Dr. H. Gohlke & Dr. S. Schott-Verdugo, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie). Die grau gestrichelten Linien markieren den Mittelwert der Unwahrscheinlichkeiten für die jeweilige Domäne. Bis AS 270 erstreckt sich die putative Phospholipase Domäne, gefolgt von der DUF-Domäne (As 271-443).

Die Validierung bestätigte eine bessere Qualität und Zuverlässigkeit des TopScore 3D-Modells für den N-terminalen Bereich im Vergleich zu dem C-Terminus des Proteins.

- Sowohl das Sequenzalignement als auch die vorhergesagte Sekundärstruktur von PaPlaB deuten darauf hin, dass PaPlaB aus einer Phospholipase-Domäne mit einer typischen α/β -Faltung im N-terminalen Bereich des Proteins besteht und einem C-terminalen Bereich mit unbekannter Funktion.
- Für den C-terminalen Bereich des Proteins konnte aufgrund fehlender Strukturhomologen keine zuverlässige Struktur vorhergesagt werden.
- Basierend auf dem Sequenzalignement und den konservierten Bereichen innerhalb der Proteine wurde eine katalytische Triade aus Ser79, Asp196 und His244 angenommen.

3.2 Die heterologe Expression von *paplaB* ermöglicht Lokalisationsstudien und die Reinigung aus Membranen

Die heterologe Überexpression von Zielgenen in *E. coli* Stämmen stellt eine fundamentale Methode zur Gewinnung von Proteinen für die biochemische und strukturelle Charakterisierung dar. Des Weiteren kann die heterologe Produktion eines rekombinanten Proteins erste Hinweise auf dessen Lokalisation im homologen Wirt geben.

3.2.1 Das Gen *paplaB_{h6}* kann heterolog in *E. coli* C43(DE3) überexprimiert werden

Das Expressionsplasmid pET22b-*paplaB_{h6}* (Tab. 2.2), welches für die heterologe Expression in *E. coli* Stämmen, die das T7-RNA Polymerase Gen enthalten, geeignet ist, wurde für die heterologe Expression verwendet. Die Klonierung *in frame* mit der kodierenden Sequenz für den C-terminalen Hexahistidin-*tag* (His₆, Tab. 2.2, Tab. 2.3) soll die Reinigung des Fusionsproteins (Kapitel 2.6.3) und dessen immunologischen Nachweis (Kapitel 2.6.2) ermöglichen. Im Rahmen einer mit dieser Arbeit assoziierten Masterarbeit konnte die heterologe *paplaB_{h6}* Expression in *E. coli* BL21(DE3) durch Koexpression der beiden Chaperonen GroES/EL bereits erstmals etabliert und das Protein für erste biochemische Untersuchungen ausreichend gereinigt werden (Berger, 2018). Da die Zellen nicht nur PaPlaB überproduzieren müssen, sondern auch die beiden Chaperone, stellt die Koexpression einen zusätzlichen Stressfaktor dar. Ein weiterer Nachteil der Koexpression ist der zeitliche Aspekt. Die Genexpression der Chaperone wurde mit L-Arabinose eine Stunde vor der Expression von *paplaB_{h6}* induziert. Aufgrund dessen wurde nach einem alternativen Wirt für die Überexpression gesucht. Bei *E. coli* C43(DE3) handelt es sich um ein Derivat von *E. coli* BL21(DE3).

Durch Mutationen im Promotorbereich (*lacUV5*), welcher die T7-RNA-Polymerase steuert, ist der Stamm besonders für die Expression von Membranproteinen geeignet. Diese Mutationen führen zu einer verlangsamten Transkription der Gene, die für Membranproteine kodieren (Kwon *et al.*, 2015). Dies hat zur Folge, dass das Sec-Translokon nicht überlastet ist, die Proteine in die Membran eingebaut werden können, diese nicht in der Zelle aggregieren und somit nicht toxisch für die Zelle sind (Wagner *et al.*, 2008). Darauf aufbauend wurde die heterologe Expression von *paplaB_{h6}* in dem für die Produktion toxischer Proteine, wie z.B. Membranproteine, geeigneten Stamm *E. coli* C43(DE3) (Miroux & Walker, 1996; Wagner *et al.*, 2008) nach erfolgter Transformation mit dem Expressionsplasmid pET22b-*paplaB_{h6}* (Kapitel 2.4.4) bzw. dem Leervektor als Kontrolle (pET22b, Tab. 2.2), durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass die Koexpression der Chaperone nicht mehr benötigt wurde. Nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580nm} von 0,4-0,6) wurde den Hauptkulturen 1 mM IPTG als Induktor der Genexpression zugegeben (Kapitel 2.4.9). Über einen Zeitraum von fünf Stunden wurden stündlich Proben entnommen. Diese wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1), Western Blot (Kapitel 2.6.2) und enzymatischem Nachweis der Esteraseaktivität von PaPlaB (Kapitel 2.6.4) analysiert (Abb. 3.4).

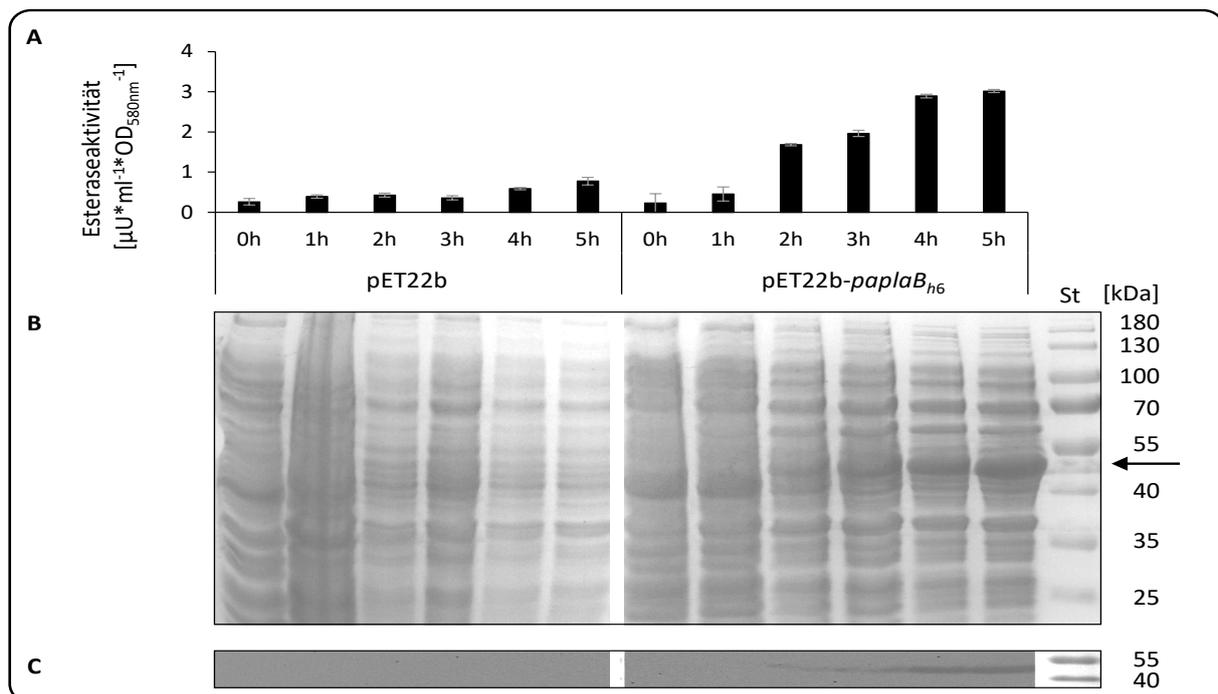


Abb. 3.4: Nachweis der Produktion und Esteraseaktivität von PaPlaB in *E. coli* C43(DE3). Die Expression von *paplaB_{h6}* in *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* wurde mit 1 mM IPTG induziert (LB-Medium, 37 °C). Vor der Induktion (0 h) und über einen Zeitraum von fünf Stunden (1-5 h) nach der Induktion wurden stündlich Proben entnommen. **A:** Enzymatischer Nachweis der Esteraseaktivität mit dem Substrat pNPB. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer technischen Dreifachbestimmung dar. **B:** SDS-PAGE (12 % (w/v)) mit anschließender Coomassie-Färbung für den Nachweis der PaPlaB Produktion. **C:** Immunologischer Nachweis von PaPlaB mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* C43(DE3) Zellen mit dem Leervektor pET22b unter denselben Bedingungen getestet. Für die Analysen wurden jeweils 10 µl des Zelllysats (O.D._{580nm} von 10) eingesetzt. Der Proteingrößenstandard (St) ist jeweils rechts dargestellt, der schwarze Pfeil markiert die PaPlaB Bande bei ~50 kDa.

Die plasmidbasierte Expression des für PaPlaB kodierenden Gens führte zwei Stunden nach Induktion mit IPTG zu einer nachweisbaren Proteinmenge von PaPlaB, die durch SDS-PAGE (Abb. 3.4, **B**) und Western Blot (Abb. 3.4, **C**) bestätigt wurde. Die dem PaPlaB zugeordnete Bande besitzt ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa, dies entspricht dem theoretischen Molekulargewicht von 49,6 kDa, ermittelt mit dem ExPasy-Server (Wilkins *et al.*, 1999). Die Esteraseaktivität (Abb. 3.4, **A**) und die Proteinmenge sind vier bzw. fünf Stunden nach Zugabe des Induktors am höchsten ($\sim 3 \mu\text{U} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit für *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB*_{h6} eine Kultivierungszeit von fünf Stunden nach Zugabe des Induktors gewählt.

3.2.2 Aktives PaPlaB ist in *E. coli* in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert

Lokalisationsstudien sind ein wichtiger Bestandteil der Proteincharakterisierung, stellen jedoch gerade in heterologen Expressionssystemen häufig Probleme dar, wie der Bildung von Einschlusskörperchen (Schlieker *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2008). Die nachweisbare Enzymaktivität deutete aber darauf hin, dass PaPlaB zumindest teilweise auch in *E. coli* im nativen Zustand produziert wurde und somit die Lokalisation im Expressionsstamm Hinweise auf die natürliche Lokalisation geben kann, wie für andere PLA bereits gezeigt (Kovačić *et al.*, 2016). PlaB aus *L. pneumophila* Corby ist in der äußeren Membran lokalisiert (Flieger *et al.*, 2004), aufgrund dessen wurde für das homologe PaPlaB ebenfalls eine membranassoziierte Lokalisation vermutet. Nach erfolgter Transformation von *E. coli* C43(DE3) (Wagner *et al.*, 2008) mit dem Expressionsplasmid pET22b-*paplaB*_{h6} (Kapitel 2.4.4) und dem Leervektor (pET22b, Tab. 2.2) als Kontrolle, wurde nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580nm} von 0,4-0,6) den Hauptkulturen 1 mM IPTG als Induktor der Genexpression zugegeben. Über einen Zeitraum von fünf Stunden wurden stündlich Zellen entnommen und die Membranen wie in Kapitel 2.4.10 beschrieben, isoliert. Die Bestimmung der Lokalisation erfolgte anschließend durch den immunologischen Nachweis von PaPlaB unter Verwendung des Antikörpers „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“ (Abb. 3.5).

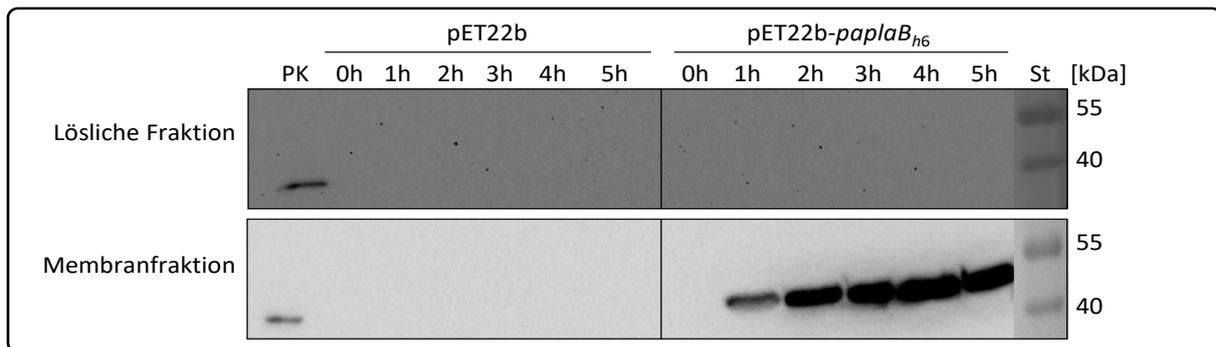


Abb. 3.5: Immunologischer Nachweis von PaPlaB in isolierten Membranen aus *E. coli* C43(DE3).

Die Expression von *paplaB_{h6}* in *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* wurde in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580nm} von 0,4-0,6) mit 1 mM IPTG induziert. Vor der Induktion (0 h) und über einen Zeitraum von fünf Stunden (1-5 h) nach der Induktion wurden stündlich Proben entnommen. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung der Sonotrode aufgeschlossen und die Membranen isoliert. Für die Analyse wurde jeweils 10 µl der isolierten Membranen und der löslichen Fraktion (O.D._{580nm} von 25) eingesetzt. Für den immunologischen Nachweis von PaPlaB wurde der Antikörper „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“ verwendet. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* C43(DE3) Zellen mit dem Leervektor pET22b unter denselben Bedingungen getestet. Der Proteingrößenstandard (St) ist rechts dargestellt; gereinigtes PaPlaB wurde als Positivkontrolle (PK) eingesetzt.

PaPlaB war bereits eine Stunde nach Zugabe des Induktors in der Membranfraktion nachweisbar. In der löslichen Fraktion, welche die peri- und zytoplasmatischen Proteine enthält, konnte kein PaPlaB nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde untersucht, ob PaPlaB ein integral oder peripher an die Membran gebundenes Protein ist. Für diese Analyse wurden *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* Zellen fünf Stunden nach Induktion geerntet und die Membranen isoliert (Kapitel 2.4.11). Die isolierten Membranen wurden mit MES-Puffer, Na₂CO₃, Harnstoff bzw. TritonX-100 behandelt (Kapitel 2.4.11; Abb. 3.6).

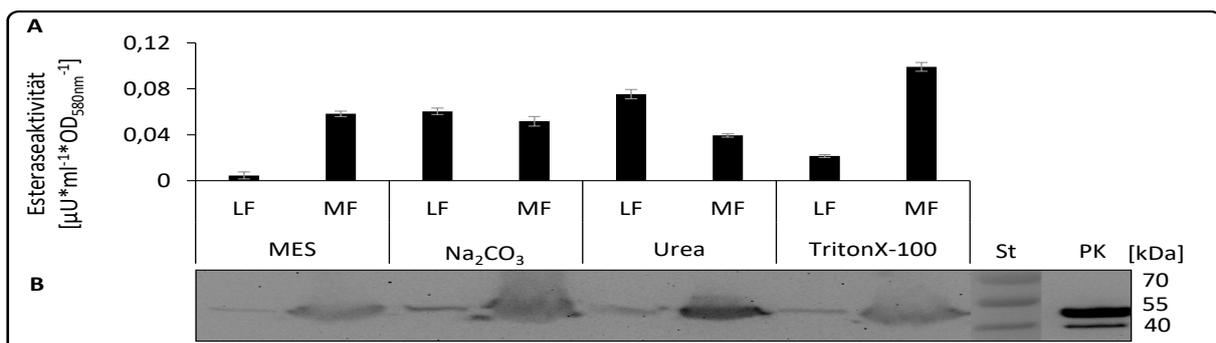


Abb. 3.6: Enzymatischer und immunologischer Nachweis der Membranassoziiierung von PaPlaB in *E. coli* C43(DE3).

Fünf Stunden nach Zugabe des Induktors (1 mM IPTG) wurden die Membranen aus einer 100 ml *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* Expressionskultur (LB-Medium, 37 °C) isoliert und in MES (MES-Puffer: 20 mM MES, pH 6,5) als Negativkontrolle; Natriumcarbonat (Na₂CO₃, 10 mM Na₂CO₃, pH 11); Harnstoff (4 M Harnstoff, 20 mM MES-Puffer) und TritonX-100 (2 % (v/w) TritonX-100, 20 mM MES-Puffer) suspendiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 22 °C und Sedimentation der Membranen durch Ultrazentrifugation. 10 µl (O.D._{580nm} von 125) der löslichen Fraktionen (LF) und der Membranfraktionen (MF) wurden für Analysen verwendet. **A:** Enzymatischer Nachweis der Esteraseaktivität mit dem Substrat pNPB. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer technischen Dreifachbestimmung dar. **B:** Immunologischer Nachweis von PaPlaB mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“. Der Proteingrößenstandard (St) ist rechts dargestellt; gereinigtes PaPlaB wurde als Positivkontrolle (PK, obere Bande) eingesetzt.

Aus dem in Abb. 3.6, **B** gezeigtem Western Blot geht hervor, dass PaPlaB hauptsächlich in den Membranfraktionen der behandelten Proben nachweisbar war. Die Inkubation der Membranen mit MES-Puffer zeigte wie erwartet, dass PaPlaB nicht aus der Membran gelöst werden konnte. Die Esteraseaktivität (Abb. 3.6, **A**) war in der Membranfraktion um ca. 90 % höher ($0,06 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$) als in der löslichen Fraktion ($0,04 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$). Nach der Inkubation der Membranen mit Na_2CO_3 zeigte der immunologische Nachweis von PaPlaB, dass nur eine geringe Menge des Proteins von der Membran gelöst wurde und sich dieses hauptsächlich in der Membranfraktion befand. Natriumcarbonat (Na_2CO_3) löst schwache Protein-Membran Interaktionen (periphere gebundene Proteine, Gabrielle *et al.*, 2003; Viarre *et al.*, 2009) weshalb die Proteine folglich in der löslichen Fraktion nachweisbar sind. Die Aktivitätsmessung zeigte jedoch keinen deutlichen Unterschied der Esteraseaktivität in der löslichen Fraktion ($0,06 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$) verglichen mit der Membranfraktion ($0,051 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$). In der Membranfraktion konnte nach der Inkubation mit Harnstoff, welches ebenfalls periphere Proteine solubilisiert (Viarre *et al.*, 2009), das stärkste Signal im Western Blot nachgewiesen werden. In der löslichen Fraktion zeigte sich jedoch nur ein schwaches Signal. Daraus kann geschlossen werden, dass sich nur eine geringe Mengen PaPlaB von der Membran gelöst hat. Anders als nach der Inkubation mit Natriumcarbonat zeigte die lösliche Fraktion der Harnstoff behandelten Probe eine ca. zweifach höhere Aktivität als die Membranfraktion ($0,075/0,039 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$). Die Behandlung der Membranen mit TritonX-100, welches integral gebundene Proteine solubilisiert (Viarre *et al.*, 2009), zeigte im Western Blot, dass der Großteil von PaPlaB in der Membranfraktion lokalisiert ist und das Protein nicht von der Membran gelöst wurde. Die Aktivitätsmessung ergab eine Esteraseaktivität der löslichen Fraktion von $0,021 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$, diese war um ein Drittel geringer als die Aktivität der Membranfraktion ($0,099 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$). Im Western Blot zeigten alle löslichen Fraktionen nahezu ähnliche intensive Proteinbanden, dieses Ergebnis war nicht zu erwarten. Eine mögliche Begründung für dieses Phänomen könnte sein, dass die PaPlaB Konzentration in den löslichen Fraktionen nach dem abzentrifugieren der Membranen, bedingt durch das größere Gesamtvolumen ($500 \mu\text{l}$), deutlich niedriger war, im Vergleich zu den Membranfraktionen ($100 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen). In einem Vorversuch wurde das Anreichern der löslichen Fraktionen durch eine TCA-Fällung (Trichloressigsäure) getestet. Hierbei stellte sich jedoch das Problem, dass die präzipitierten Proteine nach der Fällung nicht mehr in Lösung gebracht werden konnten und somit eine Auftragung auf ein SDS-Gel nicht möglich war. Aus diesem Experiment kann vorläufig geschlossen werden, dass PaPlaB ein stark an die Membran gebundenes Protein ist, welches nicht vollständig durch Harnstoff oder Natriumcarbonat von der Membran gelöst werden konnte.

Bezugnehmend auf die nachgewiesene Membranlokalisation von PaPlaB (Abb. 3.5) sollte im Folgenden analysiert werden, ob PaPlaB in der zytoplasmatischen oder äußeren Membran von *E. coli* C43(DE3) lokalisiert ist. Hierzu wurden die Membranen aus *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* nach fünfstündiger Kultivierung isoliert (Kapitel 2.4.10) und nachfolgend durch Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten voneinander getrennt (Kapitel 2.4.12). Nach erfolgter Separation der einzelnen Fraktionen erfolgte die Messung der Saccharosekonzentration mit einem Refraktometer (Kapitel 2.4.12). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot (Kapitel 2.6.2) und dem Nachweis der Esteraseaktivität (Kapitel 2.6.4) analysiert (Abb. 3.7).

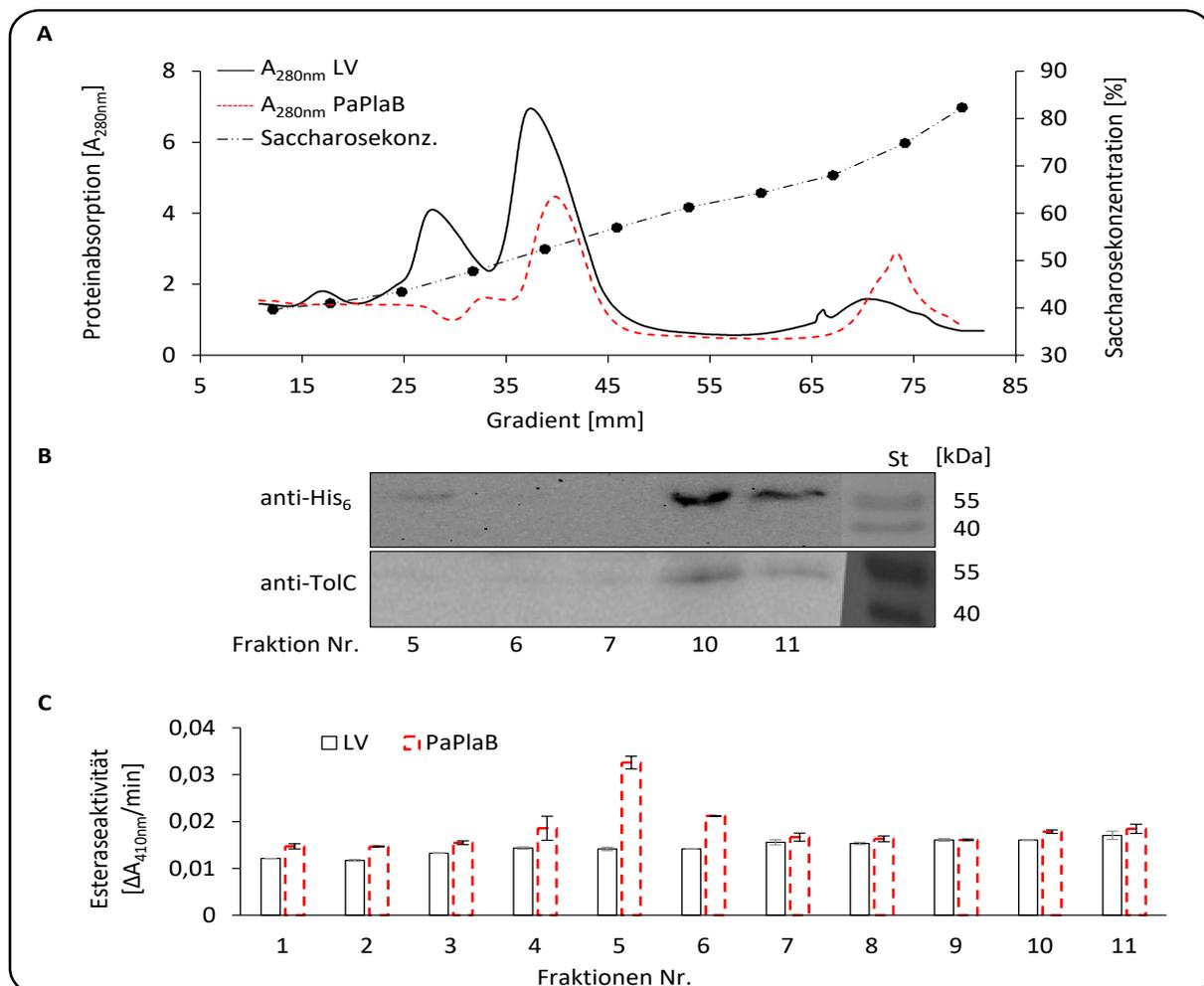


Abb. 3.7: Membranlokalisation von PaPlaB in *E. coli* C43(DE3).

Fünf Stunden nach Zugabe des Induktors IPTG (1 mM) wurden die Membranen der *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* Expressionskultur (LB-Medium, 37 °C) isoliert. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* C43(DE3)-pET22b unter denselben Bedingungen kultiviert und analysiert. **A:** Ultrazentrifugation und Separation der Membranen in einem Saccharosegradienten [mm] (in Kooperation mit Jun.-Prof. Dr. A. Kedrov & M. Kamel, Institut für Synthetische Membransysteme). Die Saccharosekonzentration jeder Fraktion (Volumen 1 ml, schwarze Punkte) wurde unter Verwendung eines Refraktometers (gestrichelte Linie) bestimmt. Die Proteinabsorption bei 280 nm wird durch die schwarze Linie dargestellt. **B:** 10 μl der Fraktionen wurden für den Western Blot entnommen, der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit den Primärantikörpern „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“ (Detektion von PaPlaB) und „anti-TolC“ für die Detektion von TolC. Zum Nachweis des TolC Antikörpers wurde zusätzlich der Sekundärantikörper „Goat-anti-rabbit-HRP“ verwendet. **C:** Nachweis der Esteraseaktivität mit pNPB, 10 μl jeder Fraktion wurden für die Messung eingesetzt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten, repräsentativ für zwei unabhängige Experimente, dar.

Durch UV-Spektroskopie wurde der Proteingehalt ($A_{280\text{nm}}$) in den einzelnen Fraktionen analysiert (Abb. 3.7, A). Die zytoplasmatische Membran befindet sich in Fraktion 5, die äußere Membran in Fraktion 11. Die Messung der Saccharosekonzentration, welche sich nach der Ultrazentrifugation der Proben in den Fraktionen befindet, ergab eine Konzentration von 45 % in der inneren und 67 % in der äußeren Membran (Kotarski & Salyers, 1984). Durch den immunologischen Nachweis von TolC aus *E. coli* (Abb. 3.7, B) konnte bestätigt werden, dass in Fraktion 11 die äußere Membran enthalten war (Benz *et al.*, 1993). In Fraktion 5 konnte kein TolC detektiert werden. Eine kleine Menge PaPlaB konnte mit Hilfe des immunologischen Nachweises in Fraktion 5 und ein starkes Signal in Fraktion 11 detektiert werden. Des Weiteren zeigte die Messung der Esteraseaktivität der einzelnen Fraktionen (Abb. 3.7, C), dass Fraktion 5, welche eine geringe Konzentration an Saccharose enthielt, eine mehr als zweimal höhere Aktivität ($0,032 \Delta A_{410\text{nm}}/\text{min}$) verglichen mit der Leervektorkontrolle ($0,014 \Delta A_{410\text{nm}}/\text{min}$) zeigte. Eine Berechnung der Esteraseaktivität in Units war nicht möglich, da nicht genau bestimmt werden konnte, welche Menge an PaPlaB in den einzelnen Fraktionen vorhanden war. Obwohl in Fraktion 11 das stärkste PaPlaB Signal im Western Blot detektiert werden konnte, zeigte die Messung der Esteraseaktivität, der leervektortragenden Zellen, eine ähnlich geringe Aktivität. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um verbliebene Einschlusskörperchen handelt, die trotz Zentrifugation während der Probenvorbereitung, in der Probe verblieben sind. PaPlaB Einschlusskörperchen wurden mit demselben Verfahren getestet und befanden sich ebenfalls in Fraktion 11 (Abb. 8.1). Aktives PaPlaB befand sich in der inneren Membran, wohingegen inaktives PaPlaB aggregierte und mit der äußeren Membran sedimentierte. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass das aktive PaPlaB, genauso wie die PLA₁ PlaF, in der inneren Membran des homologen Wirts *P. aeruginosa* lokalisiert ist (Bleffert *et al.* (*under revision*)).

3.2.3 PaPlaB kann aus *E. coli* Membranen isoliert und gereinigt werden

Nachdem gezeigt wurde, dass PaPlaB ein membranassoziertes Protein mit augenscheinlich starker Bindung an die Lipidschichten ist, lag der Schluss nahe, dass die Reinigung über die Isolierung der Membranfraktionen aus Expressionskulturen ein vielversprechender Ansatz sein könnte, um das Protein für die biochemische Charakterisierung in ausreichender Menge und Reinheit zu gewinnen. Hierzu wurde der Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB*_{h6} in 6 L LB-Medium kultiviert und die Genexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580nm} von 0,4-0,6) induziert. Nach fünfstündiger Kultivierung folgten der Zellaufschluss und die Isolierung der Membranen wie in Kapitel 2.4.10

beschrieben. Die Reinigung erfolgte mit immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung des Proteinaufreinigungssystem „Äkta™ pure device“ gereinigt in Gegenwart von 0,22 mM DDM (Endkonzentration, Kapitel 2.6.3). Die verschiedenen Fraktionen der Proteinreinigung (Abb. 3.8, A-B) und die aus allen Fraktionen angereicherte Probe (Abb. 3.8, C) wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1) analysiert (Abb. 3.8).

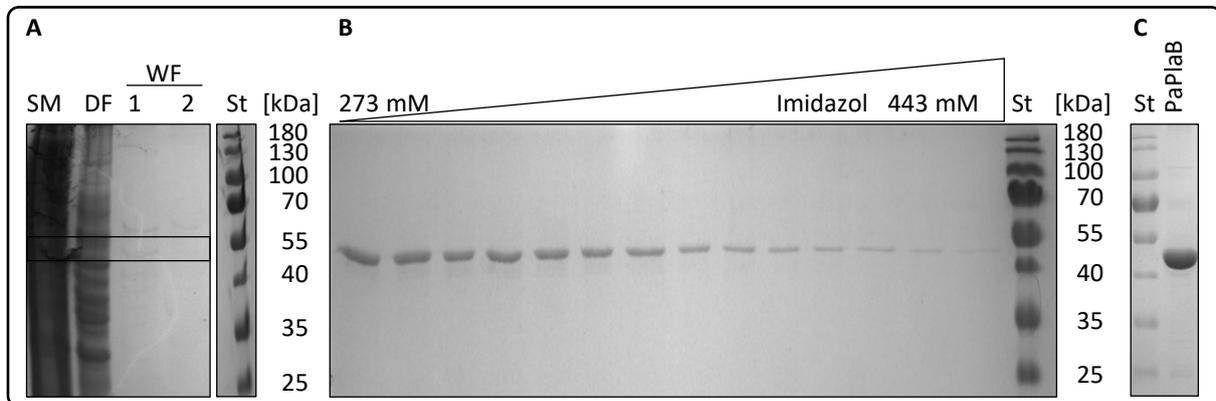


Abb. 3.8: Reinigung von PaPlaB aus *E. coli* C43(DE3) Membranen.

Im Anschluss an eine fünfstündige Kultivierung von *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* nach Zugabe des Induktors (1 mM IPTG, LB-Medium, 37 °C) erfolgte die Isolierung der Membranen mit nachfolgender Reinigung des Proteins über eine IMAC. 10 µl der verschiedenen Fraktionen der PaPlaB Reinigung wurden mittels SDS-PAGE (12 % (w/v)) und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. **A:** Solubilisierte Membranen (SM), Durchfluss (DF), Waschfraktion 1 und 2 (WF). **B:** Für die Elution von PaPlaB wurde ein Imidazolgradient (273- 443 mM) gewählt. **C:** Vereinte Elutionsfraktionen nach dem Vereinen durch Ultrafiltration und dem Entsalzen mit PD-10 Säulen. PaPlaB hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Der Proteingrößenstandard (St) ist jeweils rechts dargestellt.

Die Analyse der Elutionsfraktionen (Abb. 3.8, B) verdeutlichte, dass PaPlaB erfolgreich aus *E. coli* Membranen isoliert und gereinigt werden konnte. Die Analyse der konzentrierten Elutionsfraktionen (Abb. 3.8, C) zeigte, dass PaPlaB sehr rein vorlag und nur eine geringe Anzahl an unspezifischen Proteinbanden nachgewiesen werden konnten. Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde unter Verwendung des Mikro UV-Vis Spektralphotometers „NanoDrop 2000c“ (Kapitel 2.5.3) ermittelt. Mit dieser Reinigungsmethode konnte 0,25 mg PaPlaB pro Liter Expressionskultur (*E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}*) aus den Membranen gereinigt werden. Gereinigtes PaPlaB zeigte eine spezifische Esteraseaktivität von 3,41 U/mg (Daten nicht gezeigt).

- Rekombinantes PaPlaB konnte heterolog unter Verwendung des induzierbaren T7-Promotors in *E. coli* C43(DE3) produziert werden.
- PaPlaB wurde ausschließlich in der Membranfraktion von *E. coli* Zellen nachgewiesen. Ob PaPlaB ein integral oder peripher gebundenes Protein ist konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Es scheint aber fest an die Membran gebunden zu sein. Eine Trennung der inneren und äußeren Membran ergab, dass der Großteil des Proteins als inaktive Form in der äußeren

Membran lokalisiert war. Eine geringe Menge des aktiven PaPlaB war in der zytoplasmatischen Membran nachweisbar.

- PaPlaB konnte aus *E. coli* Membranen isoliert und in Gegenwart von DDM über die IMAC in reiner Form gewonnen werden. Dies erlaubte eine weitere biochemische Charakterisierung des Proteins.

3.3 Biochemische Charakterisierung der Phospholipase PaPlaB

Um Rückschlüsse auf die Funktion von PaPlaB zu erlangen, ist die biochemische Charakterisierung enorm wichtig. Für PaPlaB aus *P. aeruginosa* sind bisher die Eigenschaften, wie z.B. dem Substratspektrum, noch nicht bekannt. Das aus *E. coli* C43(DE3) Membranen gereinigte PaPlaB (Kapitel 3.2.3) wurde für die biochemische Charakterisierung verwendet.

3.3.1 PaPlaB hydrolysiert bevorzugt mittel- und langkettige Phospholipide als auch endogene Lipide

Die Analyse der Phospholipaseaktivität (PLA-Aktivität) von PaPlaB erfolgte nach der Reinigung des Proteins aus *E. coli* C43(DE3) Membranen (Kapitel 2.6.3). Für den Nachweis der (Lyso-) PLA-Aktivität wurden je 54 ng des Proteins mit den natürlichen (Lyso-) Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen (Ethanolamin, Glycerol und Cholin) und Fettsäurekettenlängen (jeweils 1,34 mM; Tab. 2.11) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Nachweis der freigesetzten Fettsäuren erfolgte anschließend unter Verwendung des „NEFA-Kits“ (Kapitel 2.6.5; Abb. 3.9).

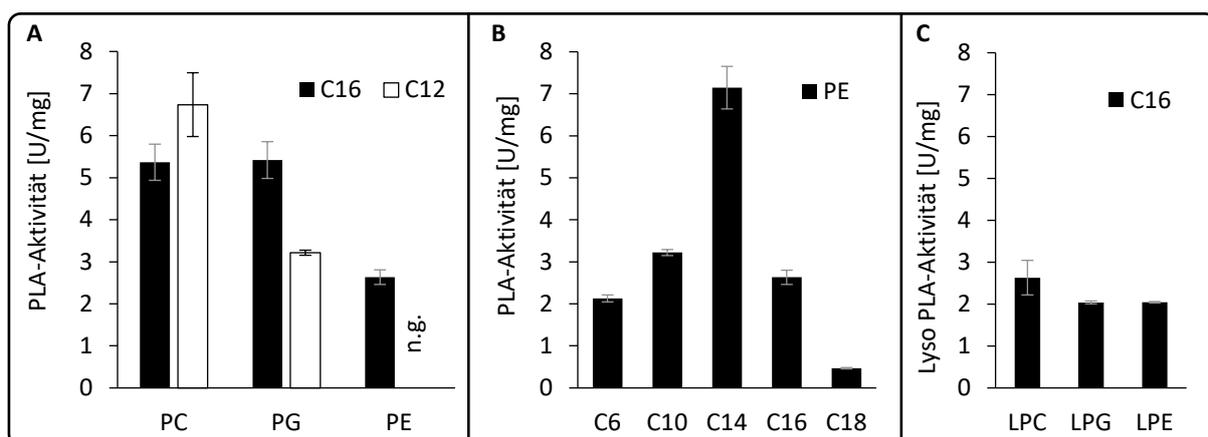


Abb. 3.9: (Lyso-) PLA-Aktivität von PaPlaB gegenüber natürlichen Phospholipiden mit variierenden Kopfgruppen und Kettenlängen.

Gereinigtes PaPlaB (54 ng) wurde mit den verschiedenen natürlichen Lipiden für 15 min bei 37 °C inkubiert und die freien Fettsäuren unter Verwendung des „NEFA-Kits“ gemessen. **A:** Hydrolyse von PE, PG und PC mit ungesättigten Fettsäuren und Kettenlängen von C16 bzw. C12, n.g. = nicht getestet. **B:** Hydrolyse von PE mit unterschiedlich langen Fettsäureketten (C6-C18). **C:** Hydrolyse von den Lysophospholipiden LPC, LPG und LPE mit ungesättigten Fettsäuren und einer Kettenlänge von 16 C-Atomen (C16). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten.

PaPlaB kann bei allen verwendeten Phospholipiden die Fettsäuren hydrolytisch spalten und ist somit eine Phospholipase A (PLA). Das Aktivitätsspektrum umfasst Phospholipide mit Cholin, Ethanolamin und Glycerol als Kopfgruppen (Abb. 3.9, A) und ein großes Spektrum an Fettsäurekettenlängen (Abb. 3.9, B). Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 2 U/mg PE 6 (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) und 7 U/mg PE 14/PC 12 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin/1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin) mit der höchsten Aktivität. Lysophosphoglyceride besitzen eine an die sn1-Position gebundene Fettsäure und wurden als Substrate getestet. Die getesteten Lysophosphoglyceride besaßen unterschiedliche Kopfgruppen (Ethanolamin, Glycerol, Cholin; Abb. 3.9, C). Die spezifischen Aktivitäten zeigten, dass alle drei getesteten Lysophosphoglyceride als Substrate geeignet waren. Jedoch war die Lysophospholipaseaktivität mit 2-2,5 U/mg geringer als die PLA-Aktivität von PaPlaB. Sowohl die Lokalisation von PaPlaB in der Membran (Kapitel 3.2.2) als auch die *in vitro* PLA-Aktivität ließen die Vermutung zu, dass PaPlaB auch aus Membranen isolierte Phosphoglyceride hydrolysieren kann. Hierzu wurden Phospholipide (ein Gemisch aus allen in Membranen vorkommenden Phospholipiden) aus *P. aeruginosa* PA01 Membranen isoliert (Bleffert *et al.*, *under revision*) und mit PaPlaB inkubiert (2 h, 37 °C). Die Messung der freien Fettsäuren erfolgte mit dem „NEFA-Kit“ (Kapitel 2.6.5). Für die Analyse wurden die Extrakte in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (3,3 und 0,46 mg/ml). Für PaPlaB wurden die Konzentrationen 450, 45, 4,5 und 0,45 ng/ml gewählt (Abb. 3.10).

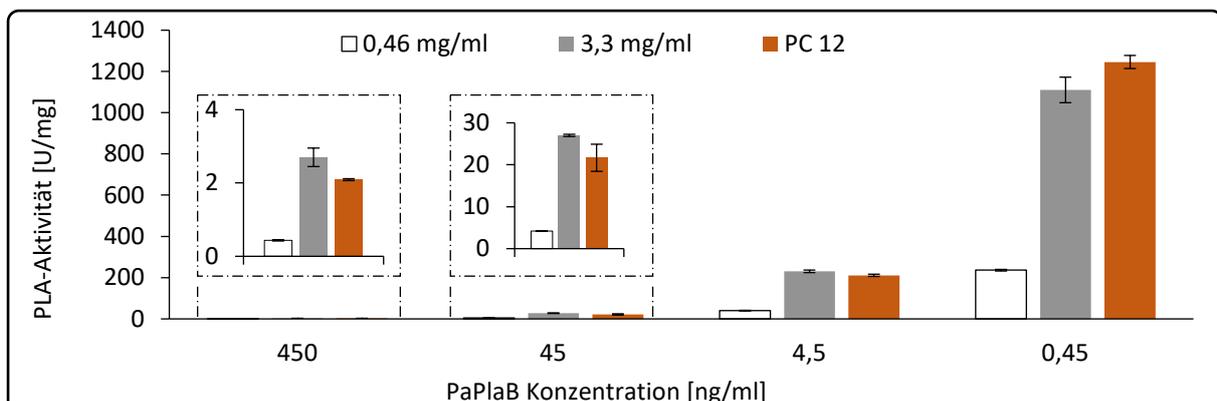


Abb. 3.10: PaPlaB hydrolysiert endogene Phospholipide isoliert aus *P. aeruginosa* PA01.

Gereinigtes PaPlaB wurde mit den aus *P. aeruginosa* PA01 isolierten Phosphoglyceriden inkubiert und die freien Fettsäuren unter Verwendung des „NEFA-Kits“ nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C analysiert. Getestet wurden zwei unterschiedliche Lipidkonzentrationen (0,46 und 3,3 mg/ml) und vier unterschiedliche Proteinkonzentrationen (450, 45, 4,5 und 0,45 ng/ml). Die Phosphoglyceride aus drei *P. aeruginosa* PA01 Stämmen wurden isoliert und vereint. Als Kontrolle wurde das Substrat PC 12 verwendet (0,38 mg/ml). Die umrandeten Diagramme (schwarz gestrichelte Linie) zeigen vergrößert die Ergebnisse mit einer eingesetzten PaPlaB Konzentration von 450 und 45 ng/ml. Die Aktivitäten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten.

PaPlaB kann endogene Phosphoglyceride hydrolysieren (Abb. 3.10). Die erreichten Aktivitäten sind vergleichbar mit den Aktivitäten nach der Hydrolyse von PC 12. Die Aktivität von PaPlaB stieg mit zunehmender Substratkonzentration. Des Weiteren stieg die spezifische Aktivität von PaPlaB enorm, je geringer die eingesetzte Enzymkonzentration war. Bei einer eingesetzten PaPlaB Konzentration von 450 ng/ml und 3,3 mg/ml endogenen Phosphoglyceride wurde eine PLA-Aktivität von 2 U/mg gemessen. Bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 0,45 ng/ml (3,3 mg/ml endogene Phosphoglyceride) wurde eine Aktivität von 1100 U/mg ermittelt. Diese Beobachtung wurde bestätigt durch Verdünnung von PaPlaB bei 0,46 mg/ml des Substrats PC 12, was den gleichen Effekt zeigte, die Aktivität nahm zu.

3.3.2 PaPlaB gehört zu der Klasse der Phospholipasen B

Durch die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Messungen der PLA-Aktivität mit verschiedenen Substraten konnte veranschaulicht werden, dass PaPlaB eine Phospholipase A ist. Mit den verwendeten Substraten und Methode konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ob die getesteten Phospholipide an der sn1 oder sn2-Position hydrolysiert wurden. Für diese Analyse wurden die beiden Kits „EnzChek™ Phospholipase A1 bzw. A2 Assay Kit“ (Kapitel 2.6.6) verwendet. Eingesetzt wurde gereinigtes PaPlaB in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,015, 0,03 und 0,06 mg/ml). Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Anregung von 515 nm. Die Messung der PLA-Aktivität basierte auf der Freisetzung einer *BODYPY(R)FL* markierten Acylkette an der sn1 bzw. sn2-Position eines Glycerophosphoethanolamin/cholin. PED-A₁ und PC-A_{2R/G} konnten als Substrate nicht von PaPlaB hydrolysiert werden (Daten nicht gezeigt).

Als Alternative wurde die Hydrolyse des Phospholipids 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin (PC 18:1-16:0) durch PaPlaB untersucht. Das Phospholipid besitzt eine ungesättigte Fettsäure (18:1) an der sn1-Position und eine gesättigte, kürzere Fettsäure (C16) an der sn2-Position. Nach der Inkubation (1 h bei 37 °C) von PaPlaB (4,3 µg/ml) mit PC 18:1-16:0 (0,5 mM) erfolgte die Messung der freien Fettsäuren (Kapitel 2.6.5; Abb. 3.11).

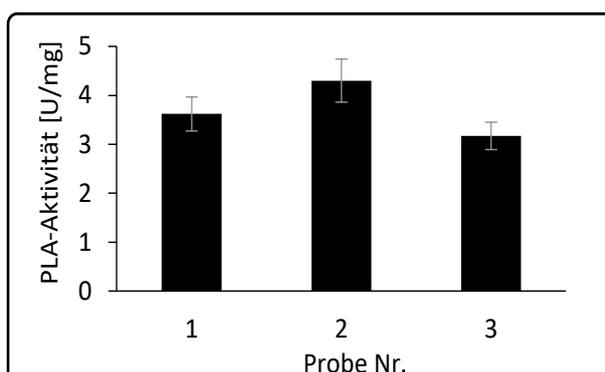


Abb. 3.11: Bestimmung der PLA-Aktivität von PaPlaB nach der Hydrolyse von PC 18:1-16:0.

Messung der freien Fettsäuren mit dem „NEFA-Kit“ nach einstündiger Inkubation des Phospholipids PC 18:1-16:0 (0,5 mM) mit PaPlaB (4,3 µg/ml) bei 37 °C. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Proben (Probe 1-3) mit jeweils drei technischen Replikaten.

Die spezifischen Aktivitäten von PaPlaB nach der Hydrolyse von PC 18:1-16:0 lagen bei $3,7 \pm 0,6$ U/mg. Mit dieser Messung konnte bestätigt werden, dass die Hydrolyse des verwendeten Phospholipids erfolgreich war. Nachfolgend wurden die Fettsäuren extrahiert und per GC-MS (Kapitel 2.6.10) analysiert, welche der beiden Fettsäuren (C18:1 oder C16) hauptsächlich in den Proben nachweisbar war (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: GC-MS Quantifizierung von Ölsäure (C18:1) und Palmitinsäure (C16) nach der Hydrolyse von PC 18:1-16:0 durch PaPlaB.

Extrakt	Messung *	n(C16:0) [μ mol]	n(C18:1) [μ mol]
1	1	1,32	1,57
1	2	1,38	1,62
2	1	1,69	1,78
2	2	1,83	1,89
3	1	1,59	1,54
3	2	1,61	1,55
Mittelwert		1,57	1,66
Std.-Abw.		0,19	0,14

*Jedes der drei PaPlaB PC 18:1-16:0 Extrakte wurde zweimal gemessen.

Die Quantifizierung der Proben ergab, dass beide Fettsäuren mit nahezu identischer Menge nachgewiesen werden konnten. $1,6 \pm 0,2$ μ mol Ölsäure und $1,7 \pm 0,1$ μ mol Palmitinsäure wurden quantifiziert. Das deutete darauf hin, dass PaPlaB beide Esterverbindungen von PC 18:1-16:0 hydrolysiert und somit als Phospholipase B bezeichnet werden kann.

3.3.3 PaPlaB ist in der Lage, Acyl-CoA Thioester zu hydrolysieren

Im Rahmen der Analyse des Substratprofils wurde nicht nur überprüft, ob PaPlaB Phospholipide hydrolysieren kann, sondern auch, ob das Enzym Thioesteraseaktivität besitzt. Bereits die Phospholipase A₁ PlaF aus *P. aeruginosa* zeigte neben Esteraseaktivität auch Thioesteraseaktivität (Kovačić, 2010). Thioesterasen spielen eine Rolle bei der Lipidhydrolyse, dem Metabolismus und der Membransynthese (Zhuang *et al.*, 2008). Der Nachweis der Thioesteraseaktivität erfolgte durch die Hydrolyse von Acyl-CoA Thioestern mit unterschiedlichen Acylresten (Tab. 2.12). Die Proben wurden wie in Kapitel 2.6.7 beschrieben, verbreitet (Abb. 3.12).

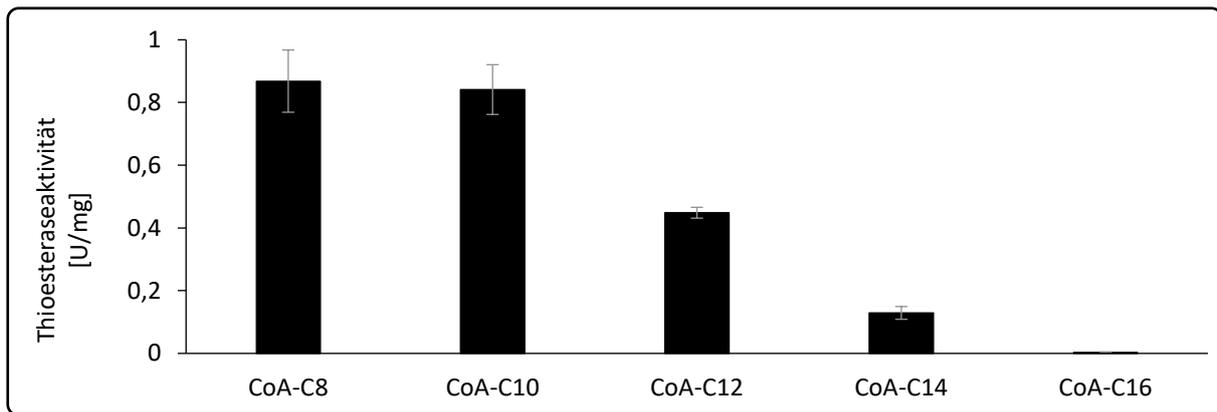


Abb. 3.12: PaPlaB hydrolysiert Acyl-CoA Thioester mit variierenden Kettenlängen.

75 μ l gereinigtes PaPlaB (0,0003 mg/ml) wurde mit 25 μ l der verschiedenen Acyl-CoA Thioester vermischt und zu DTNB zugegeben. CoA-C8: Octanoyl-Coenzym A, CoA-C10: Decanoyl-Coenzym A, CoA-12: Lauroyl-Coenzym A, CoA-C14: Myristoyl-Coenzym A, CoA-C16: Palmitoyl-Coenzym A. Die zeitaufgelöste Messung der Substratumsetzung erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von 2 h. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer technischen Dreifachbestimmung.

PaPlaB ist in der Lage Acyl-CoA Thioester zu hydrolysieren, bevorzugt mit kurz- und mittelkettigen Acylresten (8-12 C-Atomen). Octanoyl-CoA (CoA-C8) und Decanoyl-CoA (CoA-C10) wurden mit einer Aktivität von ca. 0,68 U/mg bevorzugt hydrolysiert. Bei einer Kettenlänge von 14 C-Atomen betrug die Aktivität lediglich 0,12 U/mg. Dieser Wert ist mehr als ein Zehntel geringer als nach der Hydrolyse von 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC 12; ca. 7 U/mg; Abb. 3.9). Palmitoyl-CoA (CoA-C16) konnte nicht umgesetzt werden. PaPlaB ist somit hauptsächlich als Phospholipase zu betrachten, mit einer Thioesterase-Nebenaktivität.

3.3.4 Die Aktivität von PaPlaB ist abhängig von der Proteinkonzentration und dem Oligomerisierungszustand

In Kapitel 3.3.1 wurde durch die Hydrolyse von endogenen Phospholipiden gezeigt, dass die spezifische Aktivität von PaPlaB mit abnehmender Proteinkonzentration anstieg, ähnlich zu den Beobachtungen, die für das homologe Protein LpPlaB beschrieben wurden (Kuhle *et al.*, 2014). Gezeigt wurde dort, dass LpPlaB im niedrigen nanomolaren Bereich die höchste PLA-Aktivität aufweist und mit zunehmender Konzentration Dimere bzw. Tetramere bildet, die katalytisch inaktiv oder nur sehr schwach aktiv sind (Kuhle *et al.*, 2014). Darauf aufbauend wurden die Phospholipide 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC 12) und 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC 16) in verschiedenen Konzentrationen mit PaPlaB inkubiert. Hierzu wurden vier PaPlaB Konzentrationen eingesetzt (450, 45, 4,5 und 0,45 ng/ml). Nach der Inkubation (15 min, 37 °C) der Phospholipide mit PaPlaB erfolgte die Messung der freien Fettsäuren mit dem „NEFA-Kit“ (Kapitel 2.6.5; Abb. 3.13).

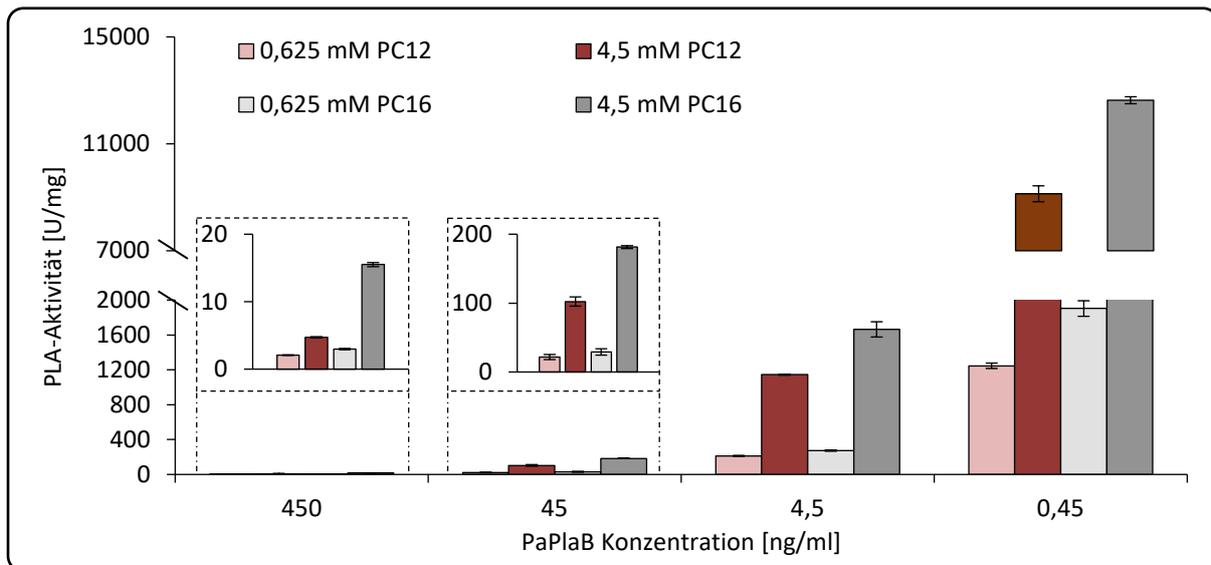


Abb. 3.13: Zunahme der PLA-Aktivität mit abnehmender Proteinkonzentration.

Gereinigtes PaPlaB wurde mit den Phospholipiden PC 12 und PC 16 für 15 min bei 37 °C inkubiert. Darauffolgend wurden die freien Fettsäuren unter Verwendung des „NEFA-Kits“ gemessen. Getestet wurden zwei unterschiedliche Lipidkonzentrationen (0,625 und 4,5 mM) und vier unterschiedliche PaPlaB Konzentrationen (450, 45, 4,5 und 0,45 ng/ml). Vergrößert dargestellt (schwarz gestrichelte Linien) sind die Ergebnisse mit einer eingesetzten PaPlaB Konzentration von 450 und 45 ng/ml. Die Aktivitäten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten.

Die PLA-Aktivität nahm zu, je geringer die eingesetzte Proteinkonzentration war (Abb. 3.13). Bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 450 ng/ml und 0,625 mM PC 12 wurde eine Aktivität von ~2 U/mg nachgewiesen. Bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 0,45 ng/ml und gleichbleibender Lipidkonzentration stieg die Aktivität auf 1245 U/mg. Derselbe Effekt konnte auch für das eingesetzte Phospholipid PC 16 (0,625 mM) nachgewiesen werden. Hier stieg die Aktivität von ~3 auf 1900 U/mg bei einer eingesetzten PaPlaB Konzentration von 450 bzw. 0,45 ng/ml. Einen ebenfalls positiven Effekt auf die Aktivität hat die Erhöhung der eingesetzten Phospholipidmenge auf 4,5 mM. Mit dieser Lipidmenge und 0,45 ng/ml PaPlaB wurden Aktivitäten von 9100 und 12600 U/mg für PC 12 bzw. PC 16 nachgewiesen. Das deutet daraufhin, dass es bei den höheren Konzentrationen zur Ausbildung von inaktiven Oligomeren kommt. Für LpPlaB wurde gezeigt, dass das Protein im nanomolaren Bereich als Monomer vorliegt, wohingegen eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu der Bildung von Dimeren (<5,4 μ M) und Tetrameren (5,4-24 μ M) führt (Kuhle *et al.*, 2014). Für die Analyse auf konzentrationsabhängige Oligomerisierung von PaPlaB in Lösung (mit DDM stabilisiert) wurden eine Größenausschlusschromatographie (SEC, Kapitel 2.6.11) mit drei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt (1, 0,5 und 0,1 mg/ml; Abb. 3.14).

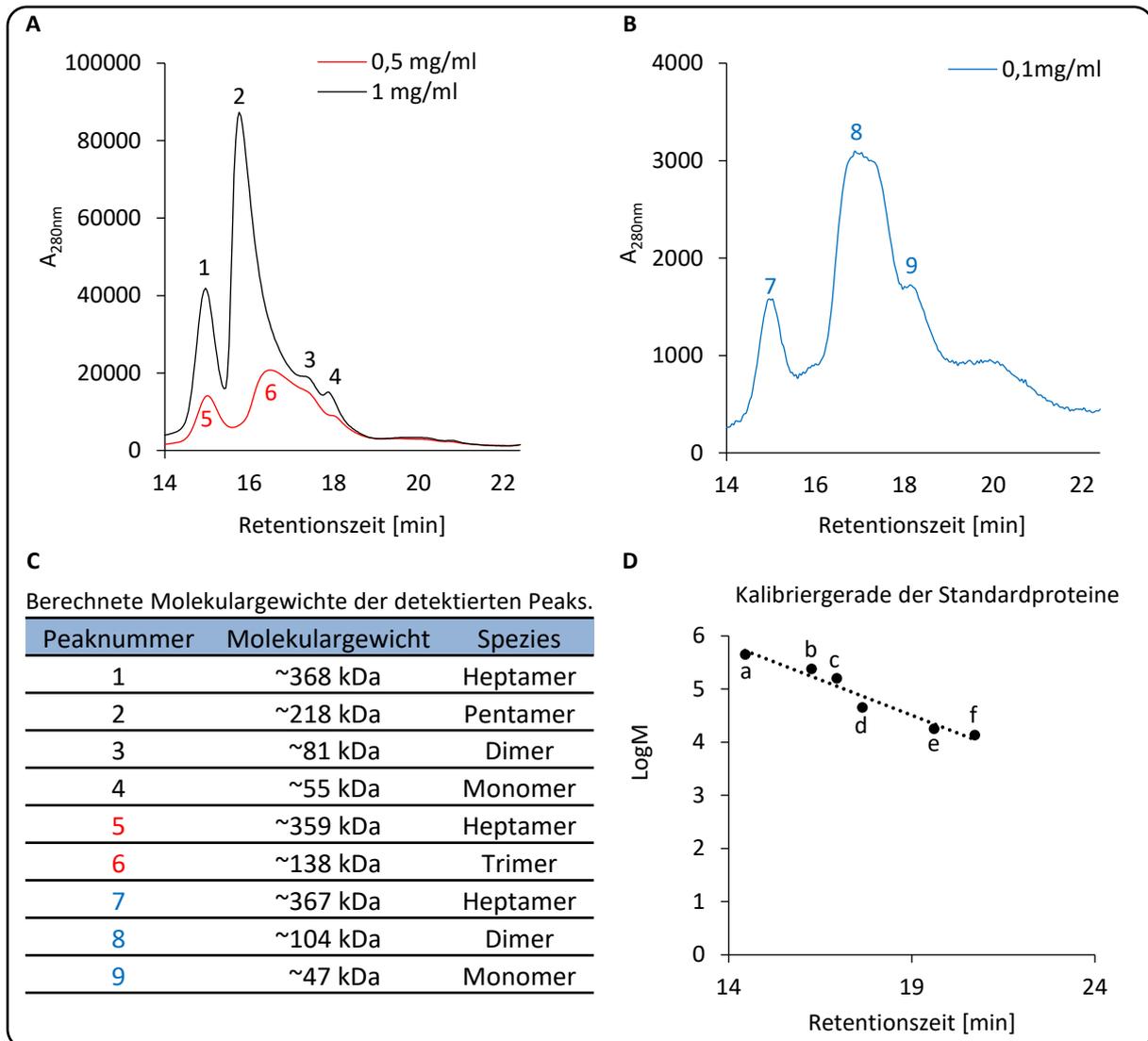


Abb. 3.14: Konzentrationsabhängige Oligomerisierung von PaPlaB.

100 μ l PaPlaB (DDM-haltiger Tris-Puffer) wurde in verschiedenen Konzentrationen unter Verwendung der „BiosepSEC-S3000“ Säule der Größe nach aufgetrennt. **A:** SEC-Analyse von PaPlaB mit einer Konzentration von 1 mg/ml (schwarz) bzw. 0,5 mg/ml (rot). **B:** SEC-Analyse von PaPlaB mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml. **C:** Für die mit Zahlen markierten Proteinpeaks wurden die ungefähren Molekulargewichte kalkuliert. **D:** Kalibriergerade der in DDM-haltigen Tris-Puffer (0,22 mM DDM, pH 8) gelösten Standardproteine, welche ebenfalls auf die Säule aufgetragen wurden. a= Ferritin, b= Katalase, c= Aldolase, d= Albumin, e= Myoglobin, f= Ribonuklease A. Die Molekulargewichte und die Retentionszeiten der Standardproteine können Tab. 2.13 entnommen werden. Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm detektiert.

Die Größenausschlusschromatographie von PaPlaB mit unterschiedlichen Konzentrationen (1, 0,5 und 0,1 mg/ml) zeigte, dass mindestens vier verschiedene Spezies von PaPlaB vorlagen. Mit Hilfe der verwendeten Standardproteine und der daraus resultierenden Eichgerade (Tab. 2.13, Abb. 3.14, **D**), wurden für alle getesteten PaPlaB Konzentrationen Proteinarten von ~45 bis ~360 kDa detektiert (Abb. 3.14, **C**). Diese wurden als Monomere, Dimere, Trimere, Tetramere, Pentamere und Heptamere von PaPlaB beurteilt (Abb. 3.14, **C**). Für eine PaPlaB Konzentration von 1 mg/ml (Abb. 3.14, **A**) wurden hauptsächlich Heptamere und Pentamere identifiziert (Peak 1, 2). In deutlich geringere Menge konnten PaPlaB als Mono- und Dimer (Peak 4, 3) detektiert werden. Bei

einer Konzentration von 0,5 mg/ml (Abb. 3.14, **A**) lag PaPlaB ebenfalls als Heptamer, aber auch als Trimer vor (Peak 5, 6). Kleinere Proteinspezies konnten bei dieser Messung nicht einwandfrei ermittelt werden. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung monomeren und dimeren Zustand konnte bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml (Abb. 3.14, **B**) nachgewiesen werden (Peak 8, 9). Auffallend war, dass trotz der enorm geringen Proteinkonzentration auch Heptamere (Peak 7) nachgewiesen wurden. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten und könnte mit dem Detektionslimit der Methode erklärt werden, wodurch eine zuverlässige Analyse der Proben mit einer so geringen Konzentration nicht möglich war. Mit zunehmender Proteinkonzentration stellt sich mehr und mehr ein Gleichgewicht zu Gunsten von großen Oligomeren ein.

3.3.5 Bis zu einer Temperatur von 42 °C ist PaPlaB stabil und aktiv

Im Folgendem wurde die Thermostabilität von PaPlaB in Detergens-haltigen Puffer auf Basis der Aktivität und auf Basis der strukturellen Entfaltung untersucht. Zunächst wurde gereinigtes PaPlaB (0,24 mg/ml) im „Mastercycler ep-Gradient S“ (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für eine Stunde bei verschiedenen Temperaturen (30-70 °C) inkubiert. Der Nachweis der Esteraseaktivität erfolgte mit dem Substrat *p*NPB (Kapitel 2.6.4, Abb. 3.15, **A**). Die zweite Methode stellte die Messung der strukturellen Veränderung des Proteins dar. Hierzu wurde die temperaturabhängige intrinsische Tryptophanfluoreszenz von PaPlaB durch *nano differential scanning fluorimetry* ermittelt (Kapitel 2.6.9; Abb. 3.15, **B**).

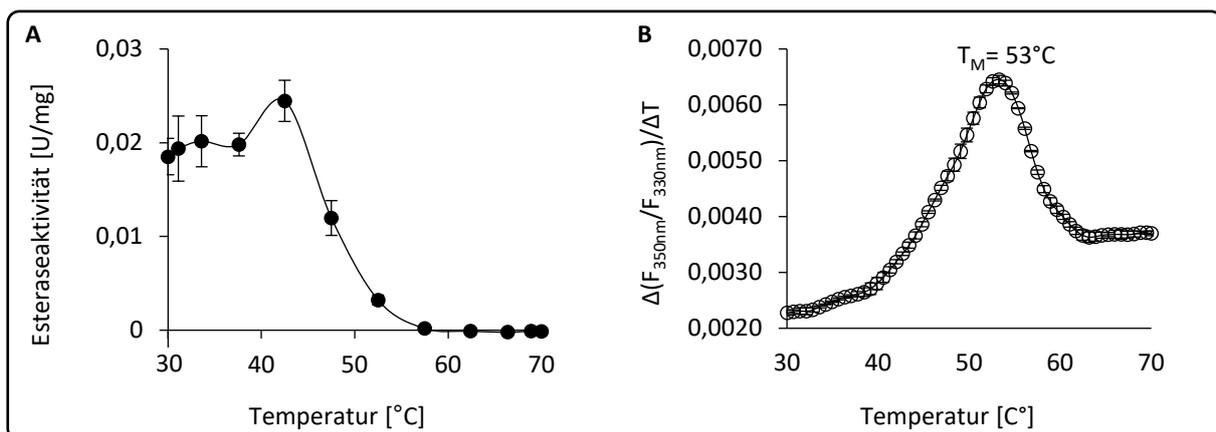


Abb. 3.15: Thermostabilität von PaPlaB.

A: Enzymatischer Nachweis der temperaturabhängigen Stabilität von PaPlaB (0,24 mg/ml) nach der Inkubation des Proteins für eine Stunde bei unterschiedlichen Temperaturen (30-70 °C) mit anschließendem Nachweis der Esteraseaktivität mit dem Substrat *p*NPB. **B:** Messung der intrinsischen Tryptophan Fluoreszenz von PaPlaB (0,24 mg/ml) im „Prometheus NT.Plex“. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Messungen.

Die Messung der Esteraseaktivität (Abb. 3.15, **A**) zeigte, dass PaPlaB nach einer einstündigen Inkubation bis 42 °C stabil ist (0,025 U/mg). Mit steigender Temperatur nahm die Aktivität nachweislich ab. Bei einer Temperatur von ca. 57 °C konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden und stellt die Schmelztemperatur dar. Dieses Ergebnis wurde mit der Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz (Abb. 3.15, **B**) bestätigt, welche das Entfalten des Proteins nachweist. Die Schmelztemperatur betrug ca. 53 °C und gibt den Übergang von einem gefalteten zu einem entfalteten Proteinzustand an. Die Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgte durch das temperaturabhängige Fluoreszenzintensitätsverhältnisses bei $\lambda = 350$ nm und $\lambda = 330$ nm.

3.3.6 PaPlaB kann durch Paraoxon inhibiert werden

PaPlaB wurde aufgrund von bioinformatischen Analysen (Kapitel 3.1.2) den Serin-Hydrolase mit einem katalytisch aktiven Zentrum bestehend aus den Aminosäuren Serin (S79), Asparaginsäure (D196) und Histidin (H244) zugeordnet. Für ein genaueres Verständnis des katalytischen Mechanismus wurden typische Lipaseinhibitoren und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung auf PaPlaB untersucht (Kim *et al.*, 1997). EDTA inhibiert Metalloenzyme und Paraoxon verursacht kovalente Modifikationen des katalytisch aktiven Serins (Crow *et al.*, 2012). Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inhibiert durch Sulfonierung der Hydroxygruppe des Serins das aktive Zentrum (Fahrney & Gold, 1963). Der vierte verwendete Inhibitor Tetrahydrolipstatin (THL) bindet kovalent an das aktive Zentrum durch den reaktiven β -Lacton Ring (Hadvary *et al.*, 1991). Für die Analyse wurde PaPlaB für 1,5 h mit den Inhibitoren EDTA, Paraoxon, PMSF und THL bei 30 °C inkubiert, gefolgt von der Messung der verbliebenen Esteraseaktivität mit *p*NPB (Kapitel 2.6.4; Abb. 3.16).

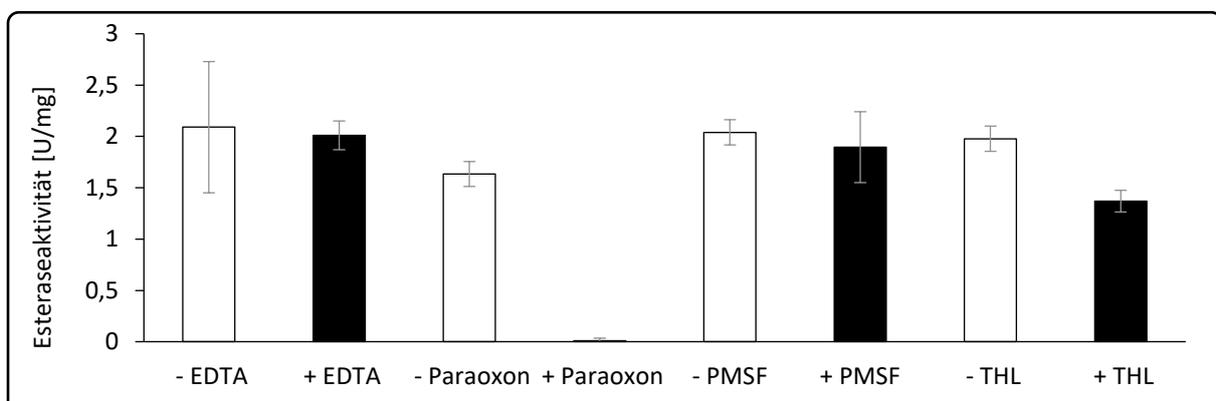


Abb. 3.16: Inhibierung von PaPlaB.

PaPlaB (1,21 μ M) wurde mit den Inhibitoren EDTA (10 mM), Paraoxon (1 mM), PMSF (1 mM) und THL (2 mM) für 1,5 h bei 30 °C inkubiert. Der Nachweis der restlichen Esteraseaktivität des inhibiertem PaPlaB (2,5 μ l) erfolgte mit dem Substrat *p*NPB (100 μ l) bei 37 °C. Die mit einem – markierten Proben stellen nicht inhibierte Proben dar. Diese Proben enthielten statt des Inhibitors nur das Lösungsmittel des Inhibitors (Isopropanol für Paraoxon und PMSF bzw. 100 mM Tris-HCl, pH 8 für EDTA). Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Reaktionen mit jeweils drei technischen Replikaten dar.

EDTA stellt einen Inhibitor für Metalloenzyme dar und hat keinen Einfluss auf die Esteraseaktivität von PaPlaB. Sowohl die mit EDTA behandelte Probe als auch die unbehandelte Probe zeigten Aktivitäten im Bereich von ~ 2 U/mg. Ein sehr ähnliches Ergebnis wurde durch den Inhibitor PMSF erzielt. Sowohl mit als auch ohne PMSF lagen die Aktivitäten im Bereich von 1,9-2,1 U/mg und somit keine Inhibierung nachweisbar war. Nach Inkubation von PaPlaB mit THL konnte eine Restaktivität von 1,4 U/mg gemessen werden, dies entsprach einer Reduzierung der Esteraseaktivität von 0,6 U/mg. Paraoxon, welches genauso wie PMSF ein irreversibler Inhibitor ist, zeigte einen drastischen Einfluss auf die Esteraseaktivität von PaPlaB. Für PaPlaB ohne Paraoxon konnte eine Esteraseaktivität von $\sim 1,8$ U/mg gemessen werden, wohingegen für die Probe mit Paraoxon keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Funktionalität von PaPlaB konnte nur durch Paraoxon beeinträchtigt werden, welches das nukleophile Serin in der katalytischen Triade beeinträchtigt. Dieses Ergebnis ist aufgrund der vorherigen Analyse der Aminosäuresequenz (Kapitel 3.1.2) zu erwarten gewesen.

3.3.7 Die Aminosäuren S79, D196 und H244 bilden die katalytische Triade

Mittels *Quick[®]-Change* PCR (Kapitel 2.5.4.2) wurden die Aminosäuren, welche die putative katalytische Triade darstellen (Abb. 3.1), durch Alanin ersetzt. Das Expressionsplasmid pET22b-*paplaB_{h6}* wurde als *template* eingesetzt, die verwendeten Oligonukleotide sind der Tab. 2.3 zu entnehmen. Im Anschluss an die *Quick[®]-Change* PCR (Kapitel 2.5.4.2) und Überprüfung durch Sequenzierung (Kapitel 2.5.9) erfolgte die Transformation von *E. coli* C43(DE3) Zellen (Kapitel 2.4.3) mit den Expressionsplasmiden pET22b-*paplaB_{h6}*, pET22b-*paplaB_{h6}*S79A, pET22b-*paplaB_{h6}*D196A, pET22b-*paplaB_{h6}*H244A und pET22b als Leervektorkontrolle mit anschließender Kultivierung (Kapitel 2.4.9). Vor der Induktion mit 1 mM IPTG in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580nm} von 0,4-0,6) und fünf Stunden nach der Induktion der Genexpression wurden Proben für den immunologischen Nachweis der Proteinproduktion (Kapitel 2.6.2), die SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1) und dem enzymatischen Nachweis der Esteraseaktivität mit pNPB (Kapitel 2.6.4) entnommen (Abb. 3.17).

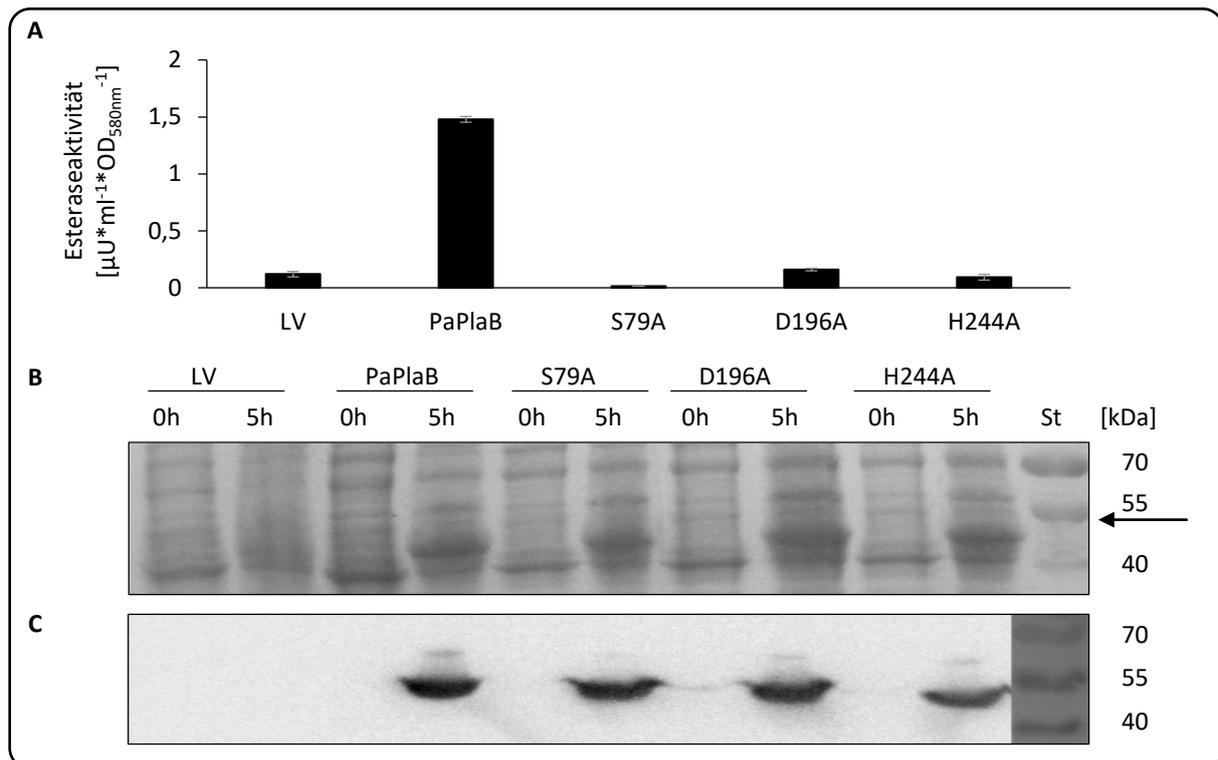


Abb. 3.17: Nachweis der Produktion und Esteraseaktivität von PaPlaB-Varianten in *E. coli* C43(DE3).

Die Expression der *paplaB_{h6}*-Varianten in *E. coli* C43(DE3) mit den Expressionsplasmiden pET22b-*paplaB_{h6}* S79A, pET22b-*paplaB_{h6}* D196A, pET22b-*paplaB_{h6}* H244A wurde mit 1 mM IPTG induziert. Vor und fünf Stunden nach der Induktion wurden Proben entnommen. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bei 37 °C. **A:** Enzymatischer Nachweis der Esteraseaktivität mit dem Substrat *p*NPB. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer technischen Dreifachbestimmung dar. **B:** SDS-PAGE (12 % (w/v)) mit anschließender Coomassie-Färbung. **C:** Immunologischer Nachweis der PaPlaB-Varianten mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“. Als Positivkontrolle wurde *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}*, als Negativkontrolle *E. coli* C43(DE3)-pET22b unter denselben Bedingungen getestet. Für die Analysen wurden jeweils 10 μl des Zelllysates (O.D._{580nm} von 20) eingesetzt; der Proteingrößenstandard (St) ist jeweils rechts dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert die Proteinbanden der PaPlaB-Varianten bei ~50 kDa.

Die Produktion der PaPlaB Varianten S79A, D196A und H244A konnte mit Western Blot (Abb. 3.17, C) und auf Coomassie gefärbten SDS-Gelen (Abb. 3.17, B) nachgewiesen werden. Der Austausch der Aminosäuren Serin, Asparaginsäure und Histidin zu Alanin hatte keinen negativen Einfluss auf die Proteinproduktion. Alle PaPlaB Varianten zeigte die erwartete Größe von ca. 50 kDa und wurden in vergleichbaren Mengen produziert. Die Messung der Esteraseaktivität der Ganzzellsate (Abb. 3.17, A) zeigte, dass die Aktivität der PaPlaB-Varianten um mehr als 90 % reduziert war. Die Esteraseaktivität des Ganzzellsates von *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* (PaPlaB) wies eine Aktivität von ca. $1,5 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$ auf. Die Esteraseaktivitäten der getesteten Ganzzellsaten der PaPlaB-Varianten zeigten Aktivitäten zwischen $0,013\text{-}0,15 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$, dies entsprach ungefähr der Esteraseaktivität der Leervektorkontrolle (LV: $0,12 \mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{O.D.}_{580\text{nm}}^{-1}$). Die Wachstumsanalyse von *E. coli* C43(DE3) mit den verschiedenen Expressionsplasmiden zeigte keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen

(Daten nicht gezeigt). S79A, D196A und H224A konnten erfolgreich als katalytisch aktive Aminosäuren von PaPlaB bestätigt werden.

- PaPlaB hydrolysierte bevorzugt Phospholipide mit einer Kettenlänge von 6-16 C-Atomen unabhängig von der jeweiligen Kopfgruppe des Phospholipids. Die Hydrolyse von endogenen Phospholipiden, isoliert aus *P. aeruginosa* PA01 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte PaPlaB eine geringe Thioesteraseaktivität.
- Durch GC-MS Analysen wurde bestätigt, dass PaPlaB zu der Klasse der Phospholipasen B gehört. PaPlaB ist bis 42 °C stabil und mit abnehmender Proteinkonzentration konnte ein Anstieg der PLA-Aktivität von PaPlaB beobachtet werden.
- Mit zunehmender Proteinkonzentration bildete PaPlaB vermehrt große Oligomere (Heptamere) aus, wohingegen Mono- und Dimere hauptsächlich bei geringen Proteinkonzentration durch SEC-Analysen detektiert wurden. Es handelt sich um eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung des Proteins.
- Die Esteraseaktivität von PaPlaB wurde durch den Inhibitor Paraoxon vollständig inhibiert, wohingegen EDTA keinen Einfluss auf die Aktivität zeigte. Die PaPlaB-Varianten, bei denen jeweils eine Aminosäure des aktiven Zentrums durch Alanin ersetzt wurden, konnten erfolgreich produziert werden und zeigten eine deutlich reduzierte Esteraseaktivität verglichen zu PaPlaB.
- Als katalytische aktive Aminosäuren wurden Serin (S79), Asparaginsäure (D196) und Histidin (H244) identifiziert. Ihr Austausch gegen Alanin inaktivierte das Enzym, hatte aber keinen Einfluss auf die Proteinmenge und das Wachstum der jeweiligen *E. coli* C43(DE3) Expressionskulturen.

3.4 Physiologische Rolle von PaPlaB in *P. aeruginosa*

Im Verlauf dieser Arbeit wurde PaPlaB als eine neue, membranständige Phospholipase B aus *P. aeruginosa* charakterisiert, welche Phospholipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen, Fettsäurekettenlängen und endogene Lipide hydrolysiert. Um nun zu analysieren, ob PaPlaB ebenso wie sein Homolog aus *L. pneumophila* einen Virulenzfaktor darstellt (Schunder *et al.*, 2010), wurde zunächst eine *paplaB*-Deletionsmutante erstellt, anschließend der Einfluss von PaPlaB auf die Physiologie und die Virulenz von *P. aeruginosa* untersucht.

3.4.1 *paplaB* ist unter Standardlaborbedingungen nicht essenziell und kann deletiert werden

Um die Fragestellung zu behandeln, welche Funktionen PaPlaB in *P. aeruginosa* übernimmt und welche Auswirkungen die Deletion dieses Gens auf den Organismus hat, wurde zunächst ein *paplaB*-defizienter *P. aeruginosa* Stamm konstruiert (Kapitel 2.4.13). Für den Nachweis der erfolgreichen Deletion des Gens *paplaB* wurde die genomische DNA aus *P. aeruginosa* Δ *paplaB* isoliert (Kapitel 2.5.2) und die Genbereiche stromauf-/abwärts von *paplaB* durch PCR Amplifikation überprüft (Kapitel 2.5.4.1). Als Kontrolle wurde die genomische DNA des Wildtyps *P. aeruginosa* PA01 ebenfalls isoliert und unter denselben Bedingungen überprüft. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.3, Tab. 2.3 aufgelistet. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung eines 1 % Agarosegels (Kapitel 2.5.6) überprüft (Abb. 3.18).

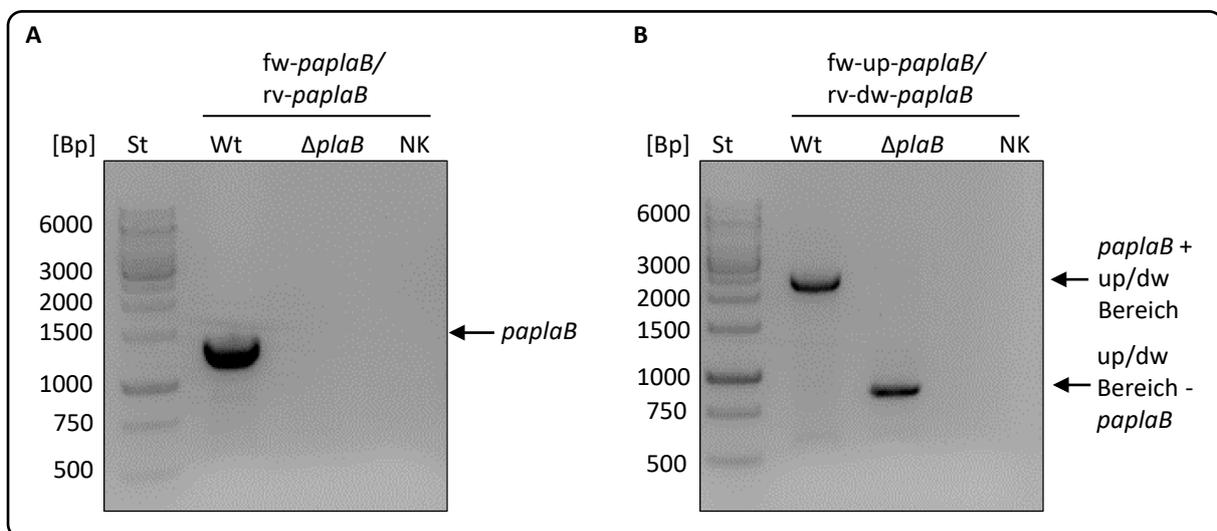


Abb. 3.18: PCR Nachweis der erfolgreichen Deletion von *paplaB* in *P. aeruginosa* Δ *paplaB*.

Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR Amplifikation von *paplaB* im Wildtyp *P. aeruginosa* PA01 und der Deletionsmutante *P. aeruginosa* Δ *paplaB*. **A:** PCR mit flankierenden Oligonukleotiden, die an den ersten und letzten 20 Bp von *paplaB* binden (*fw-paplaB* 5'-GGAATTGAGCTCTCAGGGTCTCTGAAGACGAATAC-3' und *rv-paplaB* 5'-CTCTAGAGATGCCCGTTCGATCGTCATC-3'). Im Wildtyp hat das PCR Produkt eine Größe von 1332 Bp, in der Deletionsmutante wird kein Produkt erwartet. **B:** Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR Produkte unter Verwendung der Oligonukleotide *fw-up-paplaB* (5'-AGAAGGTGCGAACGGCAGTATC-3') und *rv-dw-paplaB* (5'-GCGTTGTACCGTCGCTATG-3'), welche 668 Bp stromaufwärts und 415 Bp stromabwärts von *paplaB* binden. Die PCR Produkte haben eine Größe von 2415 Bp (*paplaB* + up/dw Bereich) für den Wildtypen und 1082 Bp (up/dw Bereich - *paplaB*) für die Deletionsmutante. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1 % Agarosegel verwendet. Der DNA Größenstandard (St) ist jeweils links dargestellt. Als Negativkontrolle (NK) wurde *A. dest* als *template* in die PCR eingesetzt.

Unter Verwendung der flankierenden Oligonukleotiden von *paplaB* konnte im Wildtyp ein 1332 Bp großes PCR Produkt nachgewiesen werden, welches der erwarteten Größe entsprach. Für *P. aeruginosa* Δ *paplaB* konnte wie erwartet kein PCR Produkt detektiert werden (Abb. 3.18, **A**). Als zusätzliche Kontrolle wurden Oligonukleotide in die PCR eingesetzt, die im stromaufwärts und stromabwärts Bereich von *paplaB* binden (Abb. 3.18, **B**). Für den Wildtyp konnte ein 2415 Bp und für *P. aeruginosa* Δ *paplaB* ein 1082 Bp großes PCR Produkt nachgewiesen werden. Dies entsprach

beides den erwarteten Größen und bestätigt die erfolgreiche Deletion von *paplaB* in *P. aeruginosa* Δ *paplaB*.

3.4.2 *P. aeruginosa* Δ *paplaB* zeigt eine verminderte intrazelluläre PLA-Aktivität

Im Anschluss an die erfolgreiche Deletion des Gens *paplaB* wurde getestet, ob der Deletionsstamm im Vergleich zum dem Wildtyp *P. aeruginosa* PA01 eine verringerte PLA-Aktivität aufweist. Beide Stämme wurden 24 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert mit nachfolgendem Zellaufschluss durch eine Sonotrode (Kapitel 2.6.5). Die Aktivität gegenüber dem Lipid PC 12 innerhalb von 15 min bei 37 °C wurde durch anschließende Messung der freigesetzten Fettsäuren (Abb. 3.19) unter Verwendung des „NEFA-Kits“ (Kapitel 2.6.5) analysiert.

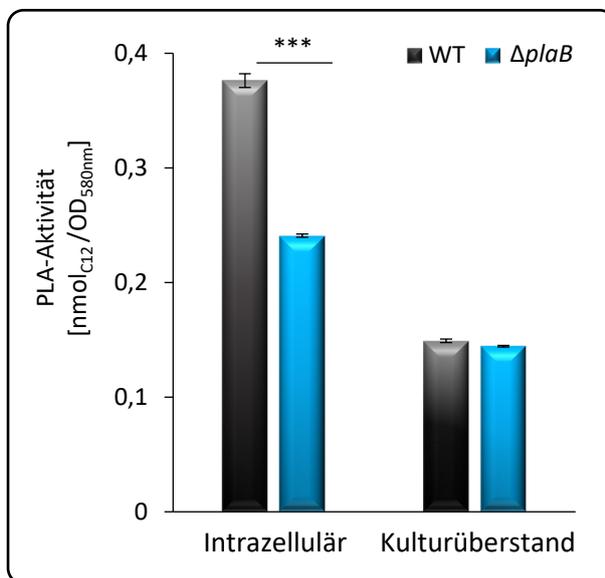


Abb. 3.19: *P. aeruginosa* Δ *paplaB* zeigt eine verringerte intrazelluläre PLA-Aktivität.

P. aeruginosa PA01 und *P. aeruginosa* Δ *paplaB* Zellen wurden 24 h kultiviert (LB-Medium, 37 °C) und anschließend mit einer Sonotrode aufgeschlossen. 25 μ l des Zelllysats (O.D._{580nm} von 10) bzw. des zellfreien Kulturüberstandes wurden mit 25 μ l des Substrats PC 12 (1,34 mM, 15 min bei 37 °C) inkubiert. Die Messung der freien Fettsäuren erfolgte im Anschluss durch Anwendung des „NEFA-Kits“. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachmessung von biologischen Triplikaten dar. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des *t*-Test und der Shapiro-Wilk Methode durchgeführt, um signifikante Unterschiede von normalverteilten Werten zu ermitteln, *** $p < 0,0001$.

Die PLA-Aktivität der beiden getesteten Kulturüberstände war nahezu identisch, daraus geht hervor, dass es sich bei PaPlA um eine zellassoziierte Phospholipase handelt. Jedoch unterschied sich die PLA-Aktivität der beiden Zelllysate voneinander. Für *P. aeruginosa* Δ *paplaB* konnte eine um ca. 35 % reduzierte zellassoziierte PLA-Aktivität nachgewiesen werden (WT: 0,75/ Δ *paplaB*: 0,48 nmol_{C12}/OD_{580nm}).

3.4.3 Während der exponentiellen Wachstumsphase zeigt *P. aeruginosa* Δ *paplaB* ein verzögertes Wachstum

Im weiteren Verlauf wurde das Wachstum der Deletionsmutante mit dem Wachstum des Wildtyps *P. aeruginosa* PA01 über den Verlauf der logarithmischen Wachstumsphase verglichen, um den Einfluss von *paplaB* auf das Wachstum zu analysieren. Standardmäßig wird *P. aeruginosa*, wie viele andere Bakterien auch, unter Laborbedingungen in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Diese

Temperatur stellt gleichzeitig die Körpertemperatur des Menschen dar. Da es sich um ein Humanpathogen handelt (Kunert *et al.*, 2007), ist dieser Bezug gerade bei *P. aeruginosa* nicht außer Acht zu lassen. *P. aeruginosa* ist nicht nur ein bekannter Humanpathogen, sondern auch ubiquitär in der Natur verbreitet und somit verschiedenen Stressfaktoren wie Temperaturunterschieden ausgesetzt. Um diese Bedingungen nachzuempfinden, wurden die Zellen bei 25 °C, 30 °C und 42 °C ebenfalls kultiviert (Vasil, 1986; LaBauve & Wargo, 2012). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Erlenmeyerkolben über einen Zeitraum von acht Stunden, mit einer stündlichen Messung der O.D._{580nm} (Kapitel 2.4.2; Abb. 3.20).

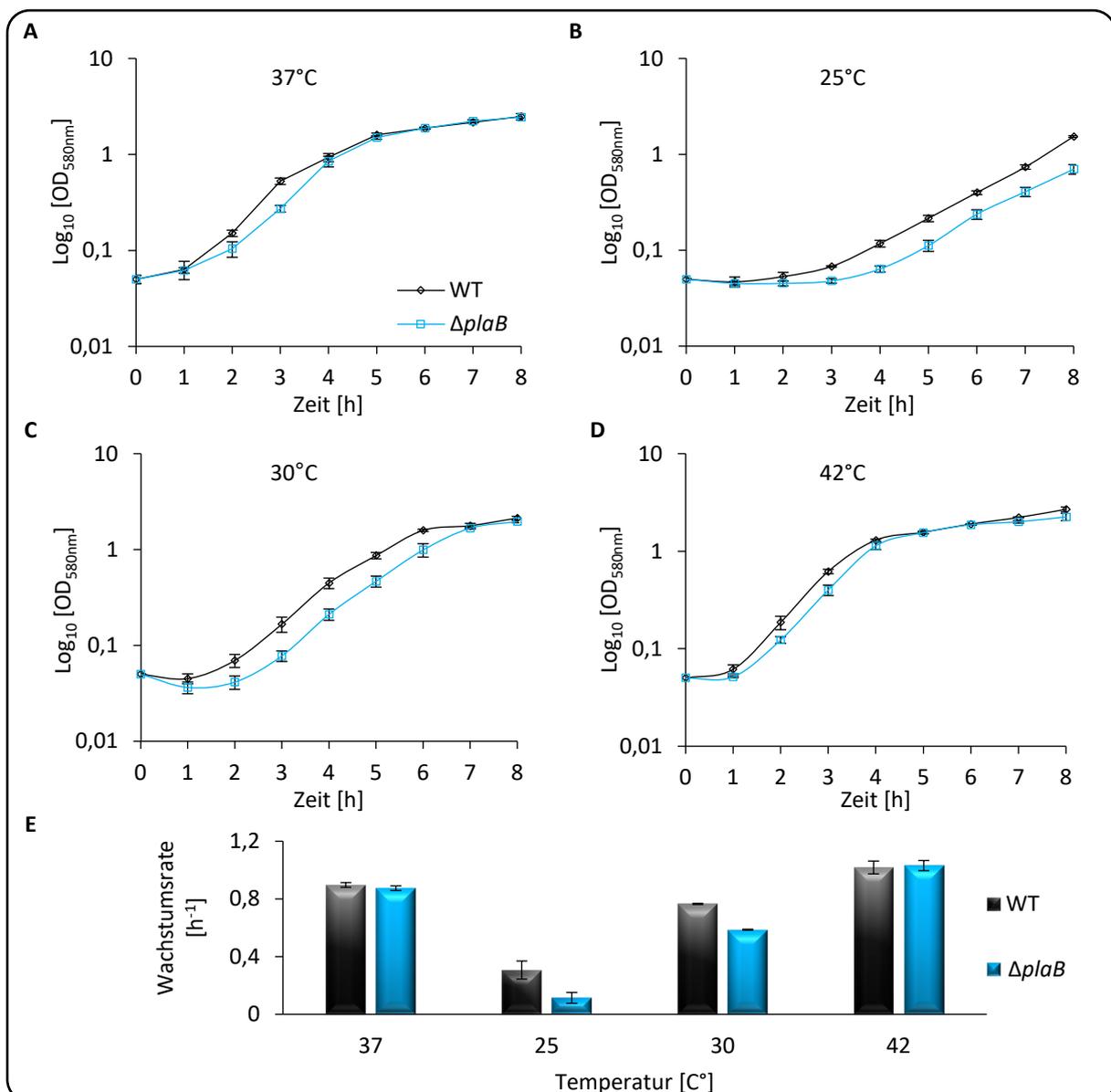


Abb. 3.20: *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ zeigt ein verlangsamtes logarithmisches Wachstum.

Wachstumsanalyse von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ vergleichend über den Verlauf der logarithmischen Wachstumsphase (0-8 h) in LB-Medium unter verschiedenen Temperaturbedingungen. **A:** 37 °C, **B:** 25 °C, **C:** 30 °C und **D:** 42 °C. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben mit stündlicher Messung der O.D._{580nm}. **E:** Bestimmung der Wachstumsrate (Kapitel 2.4.2) der beiden Stämme in den ersten vier Stunden der Kultivierung. Die Berechnung erfolgte für alle getesteten Temperaturen. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von biologischen Triplikaten dar.

Unter Standardbedingungen (37 °C, Abb. 3.20, **A**) war für beide Stämme ein sigmoidaler Kurvenverlauf zu erkennen, der die vier Phasen des Wachstums widerspiegelt. In der ersten Stunde findet die Adaptation der Bakterien an die Umgebung statt, welche als lag-Phase bezeichnet wird. Es folgt der Übergang in die exponentielle Wachstumsphase (log-Phase), in dieser Phase findet die Vermehrung der Zellen unter konstanter Generationszeit statt. Die Wachstumsrate von *P. aeruginosa* Δ *plaB* betrug nach vierstündiger Kultivierung $0,87 \text{ h}^{-1}$ und war damit etwas geringer als die Wachstumsrate des Wildtyps ($0,89 \text{ h}^{-1}$, Abb. 3.20, **E**). Ab fünf Stunden gingen die Zellen in die stationäre Phase über. Nahezu identisch war der Kurvenverlauf und damit das Wuchsverhalten der Stämme bei 42 °C (Abb. 3.20, **D**). Die Kultivierung der Zellen bei 30 °C (Abb. 3.20, **C**) führte für den Wildtyp und *P. aeruginosa* Δ *plaB* zu einem verzögerten Übergang in die stationäre Phase. Diese wurde erst nach sieben Stunden erreicht. Die Wachstumsrate (0-4 h) betrug für den Wildtyp $0,76$ und $0,58 \text{ h}^{-1}$ für den Deletionsstamm, wodurch ersichtlich wurde, dass *P. aeruginosa* Δ *plaB* ein deutlich beeinträchtigtes Wachstum hat. Bei 25 °C, einer deutlich niedrigeren Temperatur (Abb. 3.20, **B**) war deutlich zu erkennen, dass sich die lag-Phase über einen Zeitraum von zwei Stunde erstreckte und die Zellen mehr Zeit benötigten, um sich zu adaptieren. Ein exponentielles Wachstum war für beide Stämme erst nach vier Stunden zu erkennen. Innerhalb des gemessenen Zeitraumes wurde die stationäre Phase von beiden Stämmen nicht erreicht. Die Wachstumsrate (Abb. 3.20, **E**) innerhalb der ersten vier Stunden von *P. aeruginosa* PA01 war mit $0,3 \text{ h}^{-1}$ fast dreimal so hoch, wie die des Deletionsstammes ($0,11 \text{ h}^{-1}$). Aus der Wachstumsanalyse kann geschlossen werden, dass PaPlaB einen Einfluss auf das Wachstum während der logarithmischen Wachstumsphase hat, besonders auffallend bei 25 und 30 °C. Dies spiegelt auch der Vergleich der Wachstumsrate der Stämme wider. Für beide Temperaturen zeigte *P. aeruginosa* Δ *plaB* eine deutlich geringere Wachstumsrate im Vergleich zu dem Wildtyp. Eine mögliche Erklärung ist eine verlangsamte Adaptation der Zellen an die Bedingungen bedingt durch Deletion von *paplaB*.

3.4.4 Innerhalb von 72 h produziert *P. aeruginosa* Δ *plaB* unter statischen Bedingungen signifikant weniger Biofilm

Im Verlauf dieser Arbeit konnte bereits bestätigt werden, dass PaPlaB zu den membrangebundenen Phospholipasen B gehört und endogene Glycerophospholipide (GLP) hydrolysieren kann. Sobald die Bakterien von einem planktonischen zu einem sessilen Lebensstil übergehen, ändert sich die Zusammensetzung dieser GLPs, was bei der Biofilmbildung der Fall ist (Benamara *et al.*, 2014). Die Freisetzung von Phosphorylcholin durch die Phospholipase C PlcH

aktiviert die Biofilmbildung und den anaeroben Stoffwechsel, welches das Überleben der Bakterien in der Lunge ermöglicht (Flores-Diaz *et al.*, 2016). Darauf basierend wurde die Frage adressiert, ob PaPlaB einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* hat. Über einen zeitlichen Verlauf von 8-216 h wurde die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* Δ plaB im Vergleich zu dem Wildtyp untersucht (Abb. 3.21). Für die Kultivierung der Zellen und die Kristallviolett-Färbung der Biofilme wurden die Proben wie in den Kapiteln 2.4.7 und 2.4.7.1 beschrieben, vorbereitet.

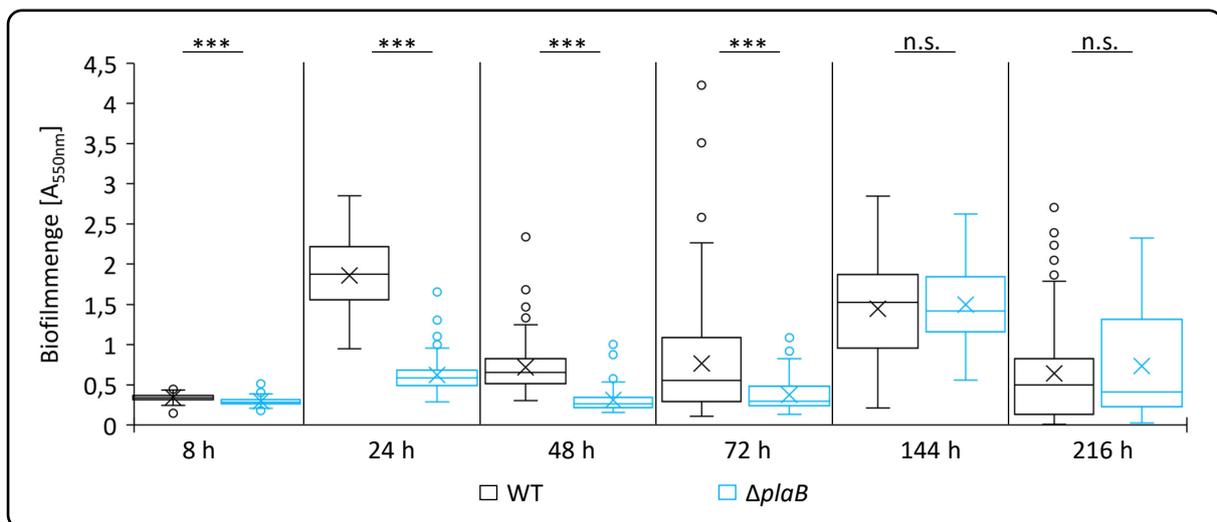


Abb. 3.21: Quantitativer Nachweis der Biofilmproduktion von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ plaB. Die Kultivierung von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ plaB erfolgte in 96er Mikrotiterplatten über einen Zeitraum von 8-216 h unter statischen Bedingungen (LB-Medium, 37 °C). Das Anfärben der Biofilme erfolgte durch die Zugabe von 150 μ l 0,1 % (v/v) Kristallviolett gelöst in de-ionisiertem Wasser (15 min, RT). Überschüssiges Kristallviolett wurde entfernt, 150 μ l 30 % (v/v) Essigsäure wurden in die wells pipettiert mit nachfolgender Inkubation (15 min, RT). Die Messung der Absorption erfolgte bei 550 nm. Die Ergebnisse stellen die Verteilung der Kristallviolett-spezifischen Absorptionswerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils fünf biologischen und acht technischen Replikaten dar. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des *t*-Test und der Shapiro-Wilk Methode, um signifikante Unterschiede von normalverteilten Werten zu ermitteln, *** $p < 0,0001$, n.s.= nicht signifikant unterschiedlich.

Unter den getesteten, statischen Konditionen produziert *P. aeruginosa* Δ plaB in 8, 24, 48 und 72 h signifikant weniger Biofilm als der Wildtyp. Die genauen Werte können Tab. 8.1 entnommen werden. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h zeigten die Stämme den deutlichsten Unterschied in der Biofilmproduktion. Für *P. aeruginosa* PA01 lag die gemittelte Absorption bei ca. $1,86_{A550nm} \pm 0,42$, für *P. aeruginosa* Δ plaB bei $0,62_{A550nm} \pm 0,2$ und war damit um ein Drittel niedriger. 144 h und 216 h nach Inokulation konnte gezeigt werden, dass die Menge des produzierten Biofilms für beide Stämme nicht signifikant unterschiedlich war (144 h: $p=0,45$ /216 h: $p=0,28$).

Um auch die Biofilmproduktion unter dynamischen Bedingungen mit kontinuierlicher Nährstoffversorgung zu testen, wurden beide Stämme in Fließkammern kultiviert (Kapitel 2.4.8). Die fluoreszenzbasierte Analyse der gewachsenen Biofilme erfolgte durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (Kapitel 2.4.8.1). In der folgenden Abb. 3.22 ist pro Stamm und

Kultivierungsdauer (24, 72, 144 h) jeweils eine CLSM-Aufnahme dargestellt. Die Gesamtheit aller aufgenommenen Bilder ist im Anhang (Abb. 8.2) dargestellt.

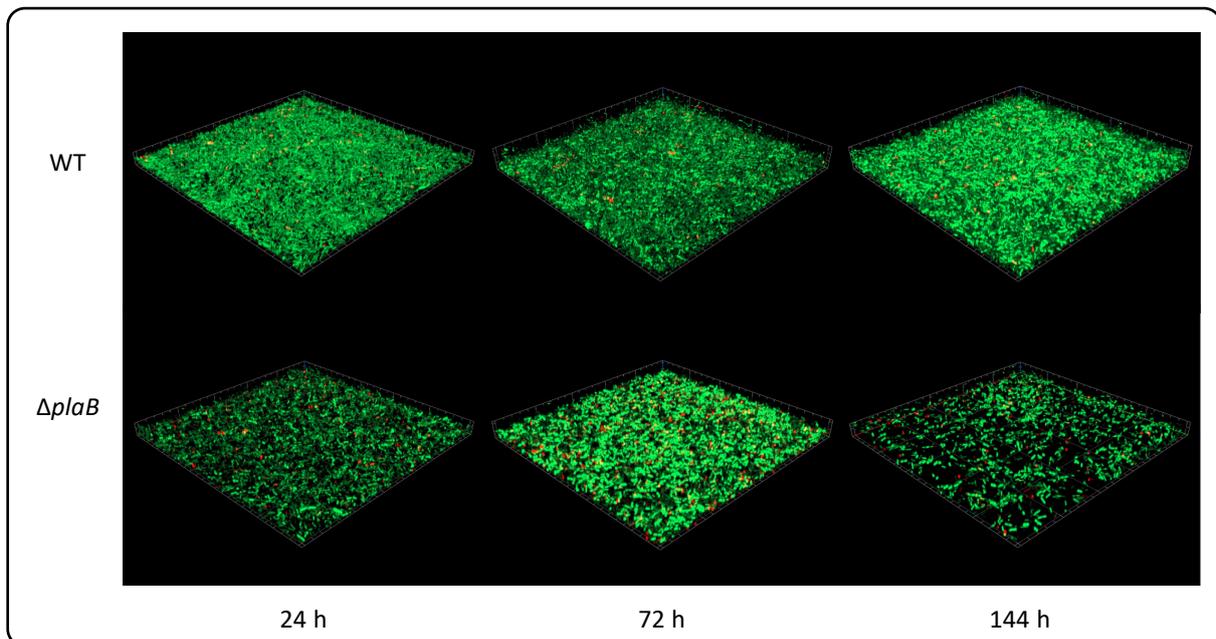


Abb. 3.22: CLSM-Aufnahmen von Biofilmen gewachsen unter dynamischen Bedingungen.

CLSM-Analyse der Biofilmmarchitektur, nachdem *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ 24, 72 und 144 h unter dynamischen Bedingungen in Durchflusskammern mit kontinuierlichem Zufluss von LB-Medium (50 $\mu\text{l}/\text{min}$) kultiviert wurden. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander wiederholt, jeweils mit einem biologischen Replikate, welches an drei verschiedenen Punkten analysiert wurde. Es wurde jeweils ein 100 x 100 μm großer Ausschnitt aufgenommen. Im Rahmen einer Charakterisierungsstudie (in Kooperation mit Prof. Dr. W. Streit & M. Gudzhun, Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie) wurde die Biofilmbildung von verschiedenen *P. aeruginosa* Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp in einem Fließkammerexperiment untersucht. Aus diesem Grund werden Aufnahmen der Biofilmmarchitektur des Wildtyps *P. aeruginosa* PA01 ebenfalls in der Dissertation von Caliskan, M. (unveröffentlicht, Institut für Molekulare Enzymtechnologie) dargestellt. Alle aufgenommenen Bilder sind im Anhang (Abb. 8.2) dargestellt.

Mit Hilfe des Programms „BiofilmQ“ (Hartmann *et al.*, 2019) wurden die Höhe (Dicke des Biofilms an der höchsten Stelle, μm) der Biofilme, die *mean thickness* (durchschnittliche Höhe der höchsten Punkte des Biofilms, μm), die *roughness* (Unebenheiten im Biofilm, welche durch rauere, unebene Oberflächen hervorgerufen werden) und die Anzahl der lebenden bzw. toten Zellen, hier als Verhältnis dargestellt, gemessen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Quantifizierung der CLSM-Aufnahmen mit dem Programm BiofilmQ.

	24 h		72 h		144 h	
	WT	$\Delta plaB$	WT	$\Delta plaB$	WT	$\Delta plaB$
Dicke [μm]	5,65 \pm 1,19	5,29 \pm 0,95	10,86 \pm 5,96	6,69 \pm 1,11	8,63 \pm 2,51	6,41 \pm 2,23
<i>mean thickness</i> [μm]	3,75 \pm 0,48	3,80 \pm 0,89	4,49 \pm 1,49	3,67 \pm 0,41	4,82 \pm 1,46	3,96 \pm 0,81
<i>roughness</i>	0,13 \pm 0,48	0,13 \pm 0,03	0,26 \pm 0,14	0,19 \pm 0,04	0,16 \pm 0,06	0,19 \pm 0,05
<i>dead/live</i>	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	0,15 \pm 0,07*	0,03 \pm 0,01	0,74 \pm 0,17*

Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des *t*-Test und der Shapiro-Wilk Methode, um signifikante Unterschiede von normalverteilten Werten zu ermitteln, * $p < 0,005$. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Aufnahmen dar (Abb. 8.2).

Nach einer 24-stündigen Kultivierung betrug die Dicke der Biofilme für beide Stämme ca. 5 μm . Mit 10 μm verdoppelte sich die Dicke des Biofilms von *P. aeruginosa* PA01 mit zunehmender Kultivierungsdauer (72 h), jedoch ergab die statistische Analyse keinen Unterschied zu dem von *P. aeruginosa* ΔplaB gebildeten Biofilm (72 h: WT 10,86/ ΔplaB 6,69 μm). Dies bestätigte auch die Berechnung der durchschnittlichen Höhe der höchsten Punkte im Biofilm (*mean thickness*). Nach 72 h erreichte der Biofilm für beide Stämme die maximale Dicke. Die hohe Standardabweichung der Biofilmdicke nach 72-stündiger Kultivierung ergibt sich aus den doch unterschiedlich gewachsenen Biofilmen in den beiden Experimenten (Abb. 8.2). Die statistische Auswertung (Tab. 3.3) stellt die Auswertung beider Experimente dar. Nach 144 h zeigten die CLSM-Aufnahmen einen optischen Unterschied zwischen den Biofilmen der beiden Stämme. Der Wildtyp zeigte einen dichten, konfluenten Biofilm, wohingegen für die Deletionsmutante ein weniger dichter Biofilm beobachtet wurde. Aber auch hier zeigte die statistische Analyse der Daten keine Unterschiede (144 h: WT 8,63/ ΔplaB 6,41 μm). Signifikante Unterschiede konnten jedoch nach einer Kultivierungsdauer von 72 und 144 h für das *dead/live* Verhältnis berechnet werden. Für beide Zeitpunkte konnten mehr tote *P. aeruginosa* ΔplaB Zellen detektiert werden (rot im Bild dargestellt).

Mit Hilfe der beiden Analysen wurde die Biofilmbildung der beiden *Pseudomonas* Stämme unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Da bei der Kristallviolett-Färbung nicht nur die Biofilmproduktion, sondern auch die Fähigkeit der Zellen sich an die Oberfläche zu heften berücksichtigt wird, können diese Ergebnisse nicht in den direkten Vergleich mit der Analyse der Biofilmbildung unter dynamischen Bedingungen gesetzt werden. Mit Blick auf die statistische Auswertung der Biofilm-Analyse unter dynamischen Bedingungen zeigte *P. aeruginosa* ΔplaB keine Beeinträchtigung in der Biofilmbildung.

3.4.5 Im *Galleria mellonella*-Virulenzversuch ist *P. aeruginosa* ΔplaB weniger virulent

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit, soll die Auswirkung der Deletion von *paplaB* auf die Virulenz von *P. aeruginosa* im *Galleria mellonella*-Virulenzmodell untersucht werden. Gallerien eignen sich sehr gut als Modellorganismus, da sie relativ groß sind, weshalb die Injektion der zu testenden Bakterien einfach ist. Des Weiteren sind sie kostengünstig und benötigen keine besondere Laborausstattung (Ramarao *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2016). Um zu analysieren, ob PaPlaB *in vivo* einen Einfluss auf die Virulenz von *P. aeruginosa* hat, wurden *Galleria mellonella* Larven mit dem Wildtyp oder *P. aeruginosa* ΔplaB infiziert (Kapitel 2.8) und das Überleben der Larven im zeitlichen Verlauf dokumentiert (Abb. 3.23).

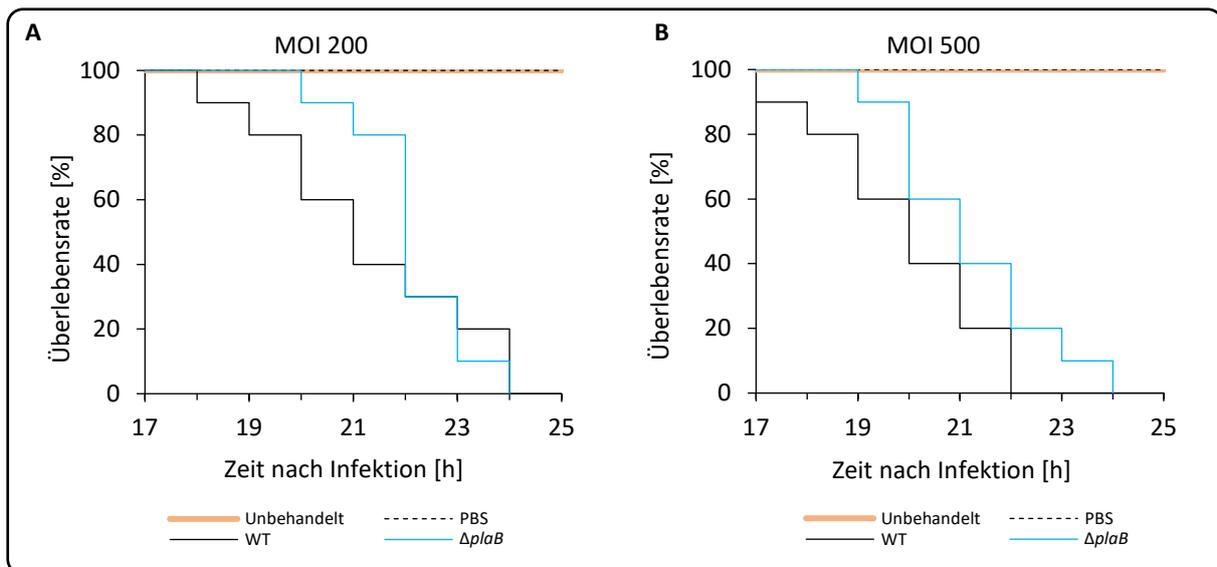


Abb. 3.23: Im *Galleria mellonella*-Virulenzversuch ist *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ weniger virulent.

Kaplan-Meier Plot repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit jeweils 10 Larven pro Versuchsgruppe (in Kooperation mit Prof. Dr. S. Häußler & Dr. S. Felgner, Institut für Molekulare Bakteriologie). Getestet wurde die Virulenz von *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ im Vergleich zu dem Wildtyp *P. aeruginosa* PA01. **A:** Den Larven wurden jeweils 200 Bakterienzellen injiziert. **B:** Den Larven wurden jeweils 500 Bakterienzellen injiziert. Für die Überprüfung der Lebensfähigkeit der Larven wurden jeweils 10 Larven nicht infiziert (unbehandelt). Mit PBS behandelte Larven dienten als Negativkontrolle. Über einen Zeitraum von 24 h wurde das Überleben der Larven dokumentiert. MOI= multiplicity of infection.

Nach der Injektion von 200 Bakterienzellen (Abb. 3.23, **A**) zeigten sich deutliche Unterschiede in der Überlebensrate der Larven, die mit dem Wildtyp bzw. *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ infiziert wurden. Die Überlebensrate, der mit dem Wildtyp infizierten Larven, lag 19 h nach der Injektion bei 80 %, für die mit *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ bei 100 %.

21 h nach der Infektion lebten noch 80 % der mit *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ infizierten Larven, jedoch nur noch 40 % der mit dem Wildtyp infizierten Larven. Nach 24 h konnte in beiden Versuchsgruppen keine lebende Larve gezählt werden. Nach der Injektion von 500 *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ Zellen lag die Überlebensrate nach 18 h bei 100 % (Abb. 3.23, **B**). Für die Larven, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, lag die Überlebensrate bei 80 % und eine Stunde später bei 60 % (*P. aeruginosa* $\Delta plaB$: 90 %). Bereits 22 h nach der Infektion waren alle mit dem Wildtyp infizierten Larven tot, wohingegen 20 % der Larven, die mit *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ infiziert wurden, noch lebten. Trotz der höheren injizierten Zellzahl (MOI 500) überlebten die mit *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ infizierten Larven genauso lange, wie bei einer MOI von 200.

Für die mit dem Wildtyp (MOI 500) infizierten Larven ergab sich eine erhöhte Sterblichkeit, 22 h nach der Infektion konnte keine lebende Larve gezählt werden (Vergleich mit MOI 200: nach 22 h lebten noch 30 % der Larven). 100 % der Larven, denen PBS injiziert wurde und der unbehandelten Larven überlebten einen Zeitraum von 25 h.

Nach der Injektion einer deutlich geringeren Bakterienzellzahl (MOI 100, Abb. 8.3, **A**) überlebten die Larven 25 h unabhängig von dem injizierten Bakterienstamm. Die Injektion einer Zellzahl von 1000 (MOI 1000, Abb. 8.3, **B**) führte für beide getesteten *Pseudomonas* Stämme zu einem verfrühten Sterben der Larven, 22 h nach der Infektion waren alle Larven verstorben. Bis 20 h nach der Infektion zeigte *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ eine höhere Überlebensrate, 40 % der Larven lebten zu diesem Zeitpunkt noch. Von den mit dem Wildtyp infizierten Larven lebten nur noch 10 %.

Für beide getesteten Zellzahlen (MOI 200/500) konnte gezeigt werden, dass die mit *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ infizierten Larven eine höhere Überlebensrate aufwiesen als die mit dem Wildtyp infizierten Larven, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass PaPlaB einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Virulenz von *P. aeruginosa* hat.

- Die Deletion des Gens *pa2927* konnte erfolgreich bestätigt werden und führte zu einer verminderten intrazellulären PLA-Aktivität in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$.
- PaPlaB hat einen Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa*-Kulturen während der logarithmischen Wachstumsphase, am ausgeprägtesten bei niedrigeren Temperaturen.
- Innerhalb der ersten 72 h produzierte *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ unter statischen Bedingungen signifikant weniger Biofilm im Vergleich zum Wildtyp.
- Statistische Analyse der CLSM-Analysen zeigten, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ unter dynamischen Bedingungen keinen signifikant unterschiedlichen Biofilm produzierte.
- Im *G. mellonella*-Virulenzmodell war *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ weniger virulent als *P. aeruginosa* PA01. Bei einer eingesetzten Zellzahl von 200 überlebten beispielsweise 90 % der mit *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ infizierten Larven die ersten 20 h. Von den mit dem Wildtyp infizierten Larven lebten nur noch 60 %.

3.5 Globale Proteomstudien

Die Deletion von *paplaB* zeigte einen Einfluss auf den Phänotypen von *P. aeruginosa*. Im Vergleich mit dem Wildtyp *P. aeruginosa* PA01 zeigte *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ eine geringere Biofilmmenge unter statischen Bedingungen in den ersten 72 h (Kapitel 3.4.4), ein verzögertes Wachstum innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (Kapitel 3.4.3) und eine geringere Mortalität im *G. mellonella*-Virulenzmodell (Kapitel 3.4.5). Die Deletion von *paplaB* beeinträchtigt die Virulenz von *P. aeruginosa*, weshalb PaPlaB als Virulenzfaktor angesehen werden kann. Phospholipasen haben einen Einfluss auf Signalwege und die Wirtszelle. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation tritt PaPlaB nicht in direkten Kontakt mit der Wirtszelle. Welchen

Einfluss PaPlaB auf regulatorische Netzwerke und auf die Zelle hat, sollte mit globalen Proteomstudien geklärt werden.

3.5.1 Die Deletion von *paplaB* führt zu Veränderungen im Proteom von *P. aeruginosa*

Für die Proteomanalysen wurden die Hauptkulturen des Wildtyps *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ *paplaB* bei 30 °C in LB-Medium für 4 und 24 h kultiviert. Unter diesen Bedingungen zeigte *P. aeruginosa* Δ *paplaB* während der exponentiellen Wachstumsphase (4 h) ein verzögertes Wachstum (Abb. 3.20). Zusätzlich entspricht dies ungefähr der Kultivierungsdauer der Bakterien, bevor sie den Gallerien infiziert wurden (Kapitel 2.8). Des Weiteren wurden Proteomstudien nach einer 24-stündigen Kultivierung durchgeführt, um Veränderungen in der stationären Wachstumsphase zu ermitteln. Zu diesem Zeitpunkt zeigten beide Stämme eine ähnliche O.D._{580nm} (Daten nicht gezeigt). Für die massenspektrometrischen Analysen per LC-ESI-MS (Kapitel 2.7) wurden für beide Stämme jeweils fünf biologische Replikate gemessen.

Für die Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurden alle Proteine berücksichtigt, für die mindestens zwei eindeutige Peptidbruchstücke (*unique peptides*) sicher detektiert werden konnten. Weiterhin wurden nur Proteine berücksichtigt, deren Änderung der relativen Proteinmenge (Verhältnis Δ *paplaB*/Wt) größer als 1,5 war und die statistische Analyse der LFQ Intensitäten (*label-free quantification intensities*) einen p-Wert $\leq 0,05$ ergab. Alle unter diesen Filterkriterien detektierten Proteine wurden als signifikant unterschiedlich abundant in *P. aeruginosa* Δ *paplaB* bezeichnet (Abb. 3.24). Änderungen der relativen Proteinmenge $\leq 0,66$ wurden als „niedrig abundant“, Änderungen $\geq 1,5$ als „hoch abundant“ in *P. aeruginosa* Δ *paplaB* bezeichnet. Die Hauptkomponenten-Analyse der Stämme (Abb. 8.4) zeigte, dass sich die Proteomprofile der beiden Stämme deutlich voneinander unterschieden. Alle signifikant unterschiedlichen Proteine (4 und 24 h) sind im Anhang (Tab. 8.2) aufgelistet.

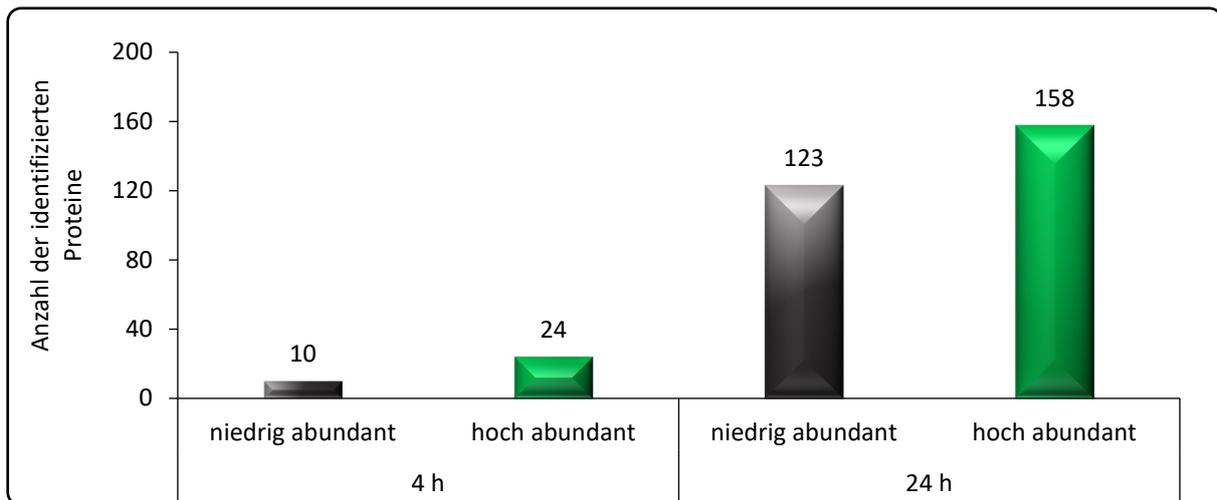


Abb. 3.24: Von 1870 detektierten Proteinen wurden 315 signifikant unterschiedlich abundante Proteine in *P. aeruginosa* Δ *plaB* identifiziert.

Die Stämme *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ *plaB* wurden 4 und 24 h in LB bei 30 °C kultiviert. Anschließend erfolgte die Zellernte und der Zellaufschluss (Zellen wurden in Lyse-Puffer suspendiert, OD_{580nm} von 5). Anschließend erfolgte die LC-ESI-MS Analyse (in Kooperation mit Prof. Dr. K. Stühler & Dr. G. Poschmann, *Molecular Proteomics Laboratory*). Die Proteine mit mindestens zwei identifizierten Peptiden wurden durch eine markierungsfreie Quantifizierung (*label-free quantification approach*, Lfq) analysiert. Signifikant unterschiedliche Proteine ($p \leq 0,05$) mit einer Änderung der relativen Proteinmenge $\geq 1,5$ (Verhältnis Δ *plaB*/Wt) wurden als signifikant unterschiedlich abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* bezeichnet. Gezeigt sind die Ergebnisse von fünf biologischen Replikaten nach einer Kultivierungsdauer von 4 und 24 h.

Durch massenspektrometrische Analysen wurden insgesamt 1870 Proteine in den Proben identifiziert. Dies entspricht ca. 33 % der in *P. aeruginosa* PA01 vorhandenen offenen Leserahmen (5570 ORFs). Verglichen mit dem wildtypischen Proteom konnten in *P. aeruginosa* Δ *plaB* nach einer vierstündigen Kultivierung 34 und nach 24-stündiger Kultivierung 281 signifikant abundante Proteine identifiziert werden. Nach einer vierstündigen Kultivierung wurden 10 Proteine als niedrig und 24 als hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* definiert. Nachdem die Stämme 24 h kultiviert wurden, konnten von 281 Proteinen 123 als niedrig und 158 als hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* identifiziert werden. 25 Proteine wurden zu beiden Zeitpunkten identifiziert. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird, um einen Überblick zu bekommen, zunächst die Gesamtheit der signifikant abundanten Proteine betrachtet und zusammengefasst, wo die Proteine innerhalb der Zelle lokalisiert sind und welchen Prozessen diese zugeordnet werden können. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dann noch genauer auf einzelne Prozesse bzw. Netzwerke eingegangen.

In einem ersten Schritt wurde überprüft, wo die identifizierten Proteine in der Zelle lokalisiert sind. Hierzu wurden die Daten aus der *Pseudomonas*-Datenbank verwendet (Winsor *et al.*, 2016), in der unter anderem alle Proteine aus *P. aeruginosa* PA01 gelistet und den einzelnen Zellkompartimenten (Zytoplasma, zytoplasmatische Membran, Periplasma, äußere Membran, extrazellulärer Bereich) zugeordnet wurden (Abb. 3.25).

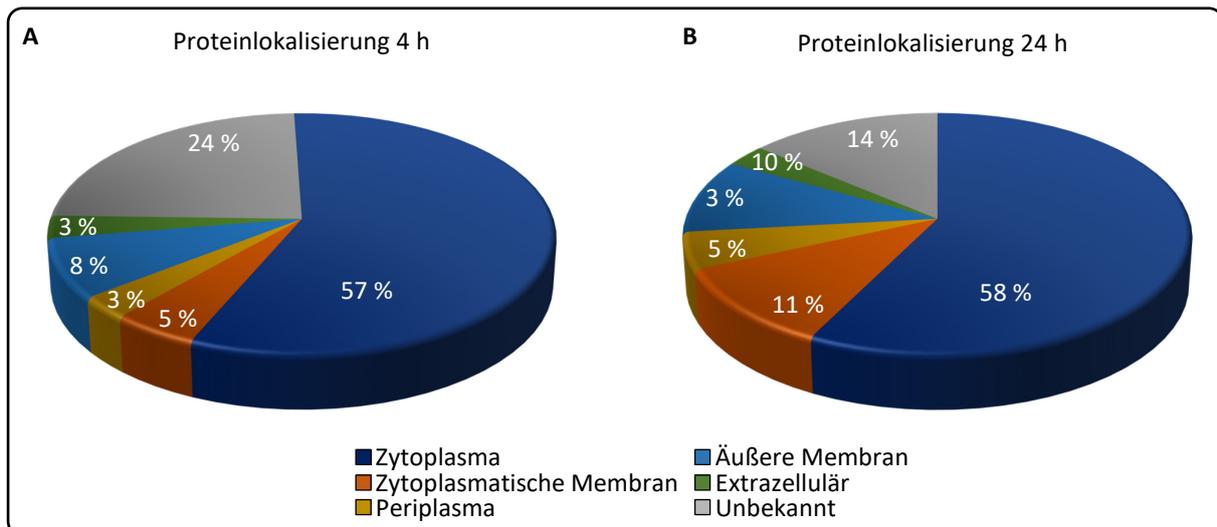


Abb. 3.25: 57 % der durch LC-ESI-MS Analysen quantifizierte Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert.

Für die Gruppierung der Proteine bezüglich ihrer Lokalisation in der Zelle wurde die *Pseudomonas*-Datenbank (Winsor *et al.*, 2016) zur Hilfe genommen. Dargestellt ist die Verteilung (in %) der identifizierten Proteine im Zytoplasma, der zytoplasmatischen Membran, im Periplasma, der äußeren Membran, extrazelluläre Proteine und Proteine mit unbekannter Lokalisation (Unbekannt). **A** Die Verteilung der Proteine nach einer vierstündigen Kultivierung. **B**: Nach einer Kultivierung von 24 h. Die Zuordnungen basieren zum einen auf experimentellen Daten in Stämmen derselben Spezies (Klasse 1), ähnlichen Proteinen in anderen Organismen oder einem Paralog im selben Organismus (Klasse 2). Alle in Klasse 3 genannten Zuordnungen basieren auf rechnerischen Vorhersagen (Yu *et al.*, 2010). Somit ist es möglich, dass für ein Protein mehrere putative Lokalisationen gelistet wurden. Aufgrund dessen ist die Summe der Proteine nicht identisch mit den tatsächlich identifizierten Proteinen. Unter der Kategorie „äußere Membran“ wurden auch die Proteine, die in äußeren Membranvesikeln und flagellar lokalisiert sind, zusammengefasst.

57 % der identifizierten Proteine sind im Zytoplasma der nach 4 h geernteten Zellen lokalisiert (Abb. 3.25, **A**). Für 24 % der Proteine konnte keine Aussage zur Lokalisation getroffen werden. Dem Periplasma und dem extrazellulären Bereich wurden 3 % der Proteine zugeordnet. 5 % sind in der zytoplasmatischen Membran und 8 % in der äußeren Membran lokalisiert. Eine ähnliche Verteilung der Proteine konnte ebenfalls für die 24 h Proben (Abb. 3.25, **B**) ermittelt werden. Bei 58 % und damit der Mehrheit, handelte es sich um zytoplasmatische Proteine. 14 % der Proteine konnte kein Bestimmungsort zugeordnet werden. 10 bzw. 11 % der Proteine wurden als äußere und zytoplasmatische Membranproteine identifiziert. Bei 5 % der Proteine handelte es sich um periplasmatische Proteine und 3 % stellten extrazelluläre Proteine dar.

3.5.1.1 Ein Großteil der identifizierten Proteine können dem Transport zugeordnet werden

Nachdem die quantifizierten Proteine den einzelnen Zellkompartimenten zugeordnet wurden, erfolgte anschließend die Gruppierung hinsichtlich ihrer Funktionen. Hierzu wurde die Datenbank *clusters of orthologous groups* (COG, Galperin *et al.*, 2015, Tatusov *et al.*, 1997) verwendet. In dieser Datenbank sind unter anderem alle Proteine aus *P. aeruginosa* PA01 und deren putative Funktionen hinterlegt. Diese wurden mit den Ergebnissen der LC-ESI-MS Analysen der in der

logarithmischen Wachstumsphase (4 h) geernteten Zellen abgeglichen. Nachstehend ist die funktionelle Gruppierung der 34 signifikant unterschiedlich abundanten Proteine (Abb. 3.24) dargestellt (Abb. 3.26).

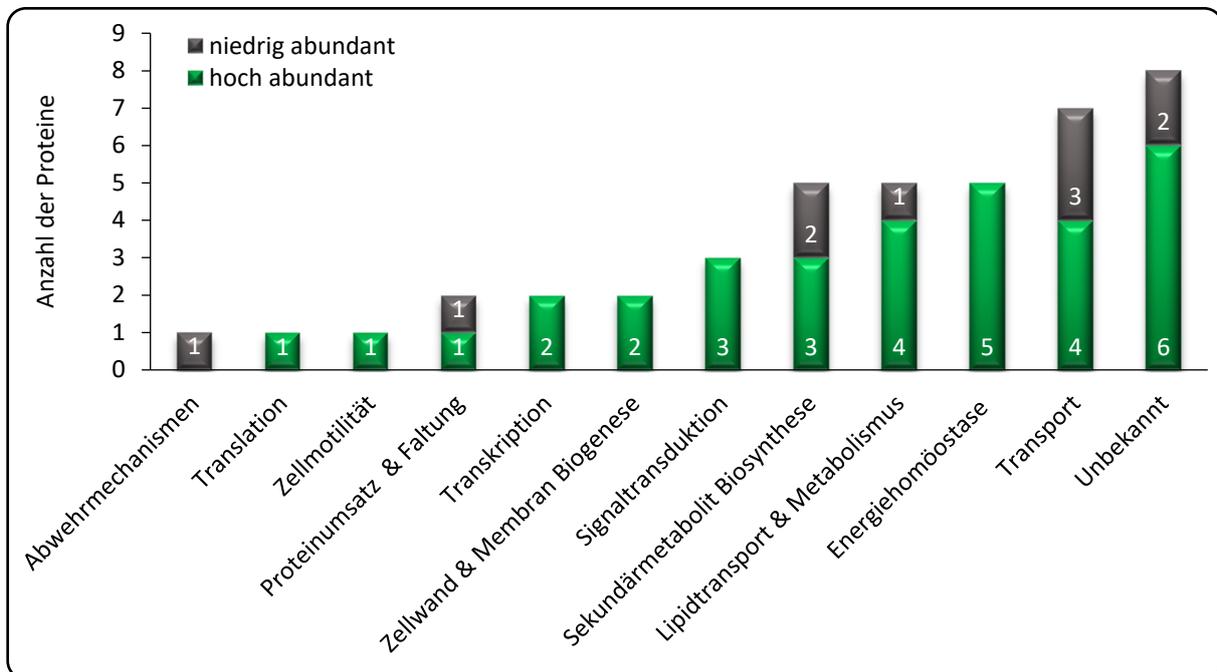


Abb. 3.26: Funktionelle Gruppierung der in der logarithmischen Wachstumsphase abundanten Proteine.

Alle 34 signifikant unterschiedlich abundanten Proteine in *P. aeruginosa* Δ *plaB* wurden gruppiert und ihren putativen Funktionen zugeordnet. Für die Gruppierung wurde die COG-Datenbank zur Hilfe genommen (Galperin *et al.*, 2015). In dieser Datenbank ist für manche PA-Nummern mehr als eine putative Funktion hinterlegt, welche für die Gruppierungen jedoch alle berücksichtigt wurden. Aufgrund dessen ergibt die Summe der in dem Diagramm dargestellten Protein 42. Für die funktionelle Gruppierung wurden einige Untergruppen zusammengefasst. So sind in der Kategorie „Transport“ alle identifizierten Proteine des Aminosäure-, Kohlenhydrat- und anorganischen Ionentransports zusammengefasst.

Aus dem Diagramm geht hervor, dass jeweils ein weniger abundantes Protein in *P. aeruginosa* Δ *plaB* identifiziert wurde, welches den Prozessen des „Abwehrmechanismus“ (PA4223), des „Proteinumsatzes & Faltung“ (PA2007) sowie den „Lipidtransport & Metabolismus“ (PA2320) beeinflusst. Zwei weniger abundante Proteinen wurden der „Sekundärmetabolit Biosynthese“ (PA2302, PA2009) zugeordnet bzw. konnten keiner Funktion zugeordnet werden. Die Verteilung der identifizierten Proteine, welche als hoch abundant bezeichnet wurden zeigte, dass jeweils ein Protein dem Prozess der „Translation“ (PA2071), der „Zellmotilität“ (PA0176) sowie dem „Proteinumsatz & Faltung“ (PA2620) zugeordnet werden konnte. Zwei Proteine wurden den Kategorien „Transkription“ (PA2572, PA0784) bzw. „Zellwand & Membran Biogenese“ (PA0157, PA1041) zugeteilt. Jeweils drei Proteine sind Teil der Kategorie „Signaltransduktion“ (PA3858, PA2572, PA0176) und der „Sekundärmetabolit Biosynthese“ (PA1344, PA2424, PA3924). In der Kategorie „Lipidtransport & Metabolismus“ wurden fünf Proteine (PA2330, PA3924, PA1344, PA2717, PA2424) identifiziert. Dem Prozess der „Energiehomöostase“ konnten fünf hoch

abundante Proteine (PA3723, PA2247, PA3417, PA2248, PA3416) zugeordnet werden. Neben acht Proteinen, die in keine funktionelle Gruppe eingeteilt werden konnte, wurden die meisten Proteine (sieben) aus der COG-Kategorie „Transport“ identifiziert (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Unterschiedlich abundante Proteine in *P. aeruginosa* Δ plaB, die verschiedenen COG-Transportprozessen zugeordnet werden konnten (4 h Kultivierung).

PA-Nummer	Name	Produkt	Verhältnis Δ plaB/WT*	Lokalisation	Transportprozess
PA5100	HutU	Urocanase	0,33	Zytoplasma	Aminosäure
PA2394	PvdN	PvdN	0,49	Periplasma	Aminosäure
PA3858	AapJ	Putatives Aminosäure Bindeprotein	2,84	Periplasma	Aminosäure
PA3418	Idh	Leucin Dehydrogenase	3,21	Zytoplasma	Aminosäure
PA0865	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenase	4,58	Zytoplasma	Aminosäure
PA2300	ChiC	Chitinase	0,07	Extrazellulär	Kohlenhydrat
PA3901	FecA	Fe(III)-Dicitrat Transportprotein	1,85	Äußere Membran	Anorganische Ionen

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ plaB.

Beim Histidinkatabolismus sind die Proteine HutHUIFGC für die Umwandlung von L-Histidin zu *N*-formimino-L-glutamat verantwortlich (Martí-Arbona *et al.*, 2006). HutU war niedrig abundant (0,33-fach) in *P. aeruginosa* Δ plaB. HutICG wurden in der Proteomstudie identifiziert, waren aber nicht signifikant abundant. PvdN (0,49-fach) ist verantwortlich für die Bildung funktionsfähiger Pyoverdine, durch Modifizierung der Seitenkette (Ringel *et al.*, 2016).

Das Aap-System in *Rhizobium leguminosarum* gehört zu der Klasse der ABC-Transporter und stellt ein aktives Aufnahmesystem dar. AapJ ist verantwortlich für den Transport löslicher L-Aminosäuren (Walshaw & Poole, 1996) und mit 2,84-fach hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ plaB. PA3418 ist in den Zitronensäurezyklus involviert und ebenfalls hoch abundant (3,21-fach) in *P. aeruginosa* Δ plaB (Crousilles *et al.*, 2018). Ebenfalls hoch abundant (4,58-fach) war PA0865, welches die Bildung von Homogentinsäure aus 4-Hydroxyphenylpyruvat katalysiert und somit am Katabolismus von Phenylalanin beteiligt ist (Rüetschi *et al.*, 1992). Auch ein extrazelluläres Protein wurde identifiziert, die Chitinase ChiC (0,07-fach). Dessen Identifizierung in der intrazellulären Fraktion passt aber zu der in der Literatur beschriebenen intrazellulären Akkumulation und gradueller Sekretion von ChiC, die über mehrere Tagen der Kultivierung erfolgt (Folders *et al.*, 2001). FecA (PA3019) agiert als Eisenzitrat-Rezeptor an der äußeren Membran von Zellen, die unter Zitratmangel gewachsen sind und ein Eisendefizit aufweisen (Marshall *et al.*, 2009). Nach

einer vierstündigen Kultivierung konnten lediglich einzelne Proteine von verschiedenen Stoffwechselwegen identifiziert werden.

In der folgenden Abbildung ist die funktionelle Gliederung der 281 identifizierten Proteine der in der stationären Phase geernteten Zellen dargestellt (Abb. 3.27).

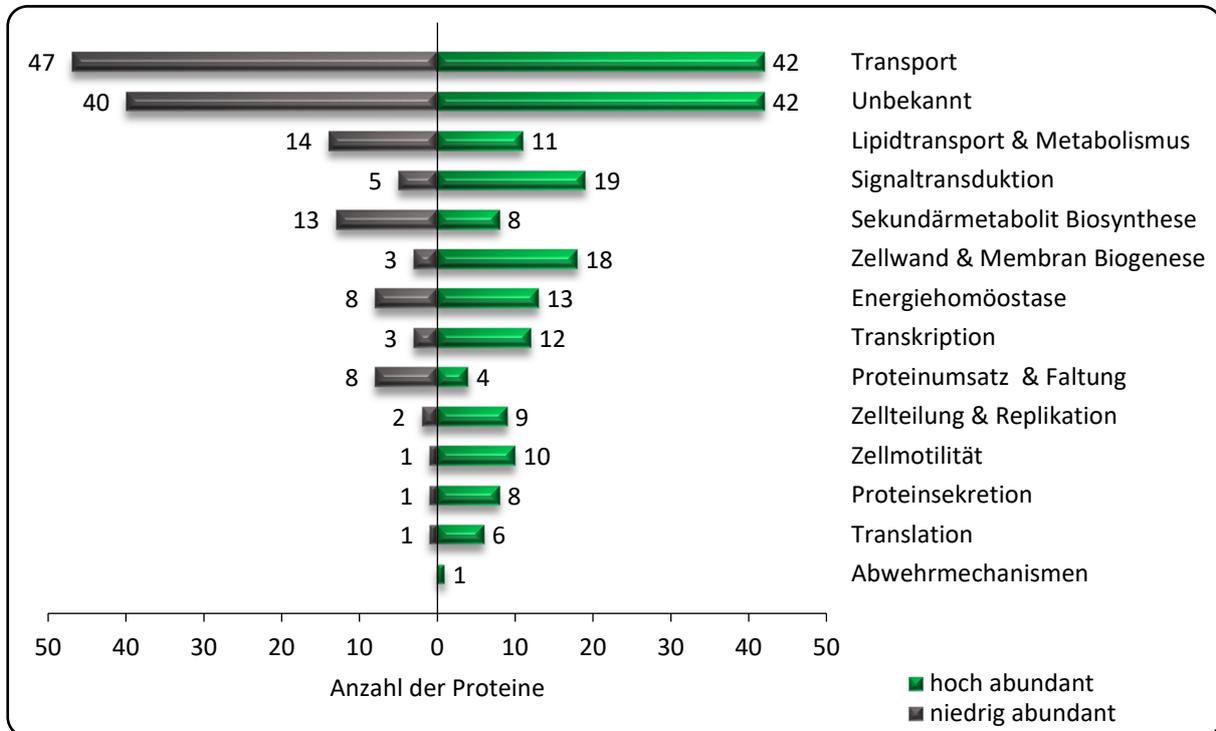


Abb. 3.27: In der stationären Wachstumsphase konnten 89 Proteine dem Transport zugeordnet werden.

Alle 281 signifikant unterschiedlich abundanten Proteine aus *P. aeruginosa* Δ plaB wurden gruppiert und ihren putativen Funktionen zugeordnet. Für die Gruppierung wurde die COG-Datenbank zur Hilfe genommen (Galperin *et al.*, 2015). In dieser Datenbank ist für manche PA-Nummern mehr als eine putative Funktion hinterlegt, welche für die Gruppierungen jedoch alle berücksichtigt wurden. Aufgrund dessen ist die Summe der in dem Diagramm dargestellten Protein 349. Für die funktionelle Gruppierung wurden einige Untergruppen zusammengefasst. So sind in der Kategorie „Transport“ alle Proteine des Aminosäure-, Kohlenhydrat-, Coenzym-, Nukleotid- und anorganischen Ionentransports zusammengefasst. Links der y-Achse ist die Anzahl aller niedrig abundanten Proteine in grau dargestellt. In grün und rechts der Y-Achse ist die Anzahl aller Proteine gelistet, die als hoch abundant identifiziert wurden.

Aus den in Abb. 3.27 dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, dass nach einer 24-stündigen Kultivierung der Zellen der Hauptteil, der durch globale Proteomstudien identifizierten Proteine, der funktionellen Gruppe des „Transports“ zugeordnet werden konnte (47 niedrig und 42 hoch abundante Proteine). 82 Proteine konnten keiner funktionellen Gruppe zugeordnet werden. In der Kategorie „Lipidtransport & Metabolismus“ befanden sich 14 niedrig und 11 hoch abundante Proteine und stellten gleichzeitig die drittgrößte Kategorie dar. 24 der identifizierten Proteine wurden dem Prozess der „Signaltransduktion“ zugeordnet (fünf niedrig und 19 hoch abundante). In den drei Kategorien „Sekundärmetabolitbiosynthese“, „Zellwand- & Membranbiogenese“ und „Energiehomöostase“ wurden jeweils 21 Proteine zusammengefügt. Drei niedrig und 12 hoch abundante Proteine wurden in der Kategorie „Transkription“ zusammengefasst. Im Bereich des

„Proteinumsatzes & Faltung“ wurden 12 Proteine identifiziert (acht niedrig und vier hoch abundant). Jeweils 11 Proteine bilden die funktionelle Gruppe der „Zellteilung & Replikation“ und der „Zellmotilität“. Ein niedrig abundantes Protein und acht hoch abundante Proteine sind in der Kategorie „Proteinsekretion“ zusammengefasst. Dem Bereich der „Translation“ konnten sieben Proteine zugeordnet werden (eins niedrig und sechs hoch abundant). Lediglich ein als hoch abundant definiertes Protein (PA1876) konnte der Kategorie „Abwehrmechanismen“ zugeteilt werden.

Eine vollständige Auflistung aller an Transportprozessen beteiligten identifizierten Proteine, die signifikant abundanten waren, kann dem Anhang (Tab. 8.3) entnommen werden. In der folgenden Tab. 3.5 wird exemplarisch auf Transportwege eingegangen, bei denen mehrere Proteine beeinflusst waren.

Tab. 3.5: Unterschiedlich abundante Proteine in *P. aeruginosa* Δ plaB, die der COG-Kategorie „Transport“ zugeordnet werden konnten (24 h Kultivierung).

PA-Nummer	Name	Produkt	Verhältnis Δ plaB/WT*	Lokalisation
Aminosäure-Transport				
PA2393	PvdM	Putative Dipeptidase	0,38	Zytoplasma
PA2394	PvdN	PvdN	0,40	Periplasma
PA2413	PvdH	L-2,4-diaminobutyrat:2-ketoglutarat 4-Aminotransferase	0,45	Zytoplasma
PA5100	HutC	Urocanase	0,45	Zytoplasma
PA5100	HutU	Urocanat Hydratase	0,45	Zytoplasma
PA5098	HutH	Histidin Ammonium-lyase	0,47	Zytoplasma
PA0051	PhzH	Putatives Phenanzin modifizierendes Protein	0,53	Zytoplasma
PA5215	GcvT1	Aminomethyltransferase	0,45	Zytoplasma
PA5214	GcvH1	Glycin Spaltungssystem Protein H1	0,58	Unbekannt
PA5213	GcvP1	Glycine Spaltungssystem Protein P2	2,53	Zytoplasma
PA5173	ArcC	Carbamat Kinase	1,73	Zytoplasma
PA5172	ArcB	Ornithin Carbamoyltransferase	1,85	Zytoplasma
PA5171	ArcA	Arginin-Deiminase	1,93	Zytoplasma
PA5170	ArcD	Antiporter für Arginin/Ornithin	2,48	Zytoplasmatische Membran
PA3120	LeuD	3-Isopropylmalat Dehydratase; kleine Untereinheit	2,30	Zytoplasma
PA3121	LeuC	3-Isopropylmalat Dehydratase; große Untereinheit	3,53	Zytoplasma
PA3118	LeuB	3-Isopropylmalat Dehydrogenase	4,23	Zytoplasma
PA3792	LeuA	2-Isopropylmalat Synthase	44,06	Zytoplasma

Fortsetzung Tab. 3.5.

PA-Nummer	Name	Produkt	Verhältnis $\Delta plaB/WT^*$	Lokalisation
Kohlenhydrat-Transport				
PA2144	GlgP	Glykogenphosphorylase	2,37	Zytoplasma
PA2153	GlgB	1,4-alpha-glucan <i>branching</i> Enzym	2,56	Zytoplasma
PA2160	GlgX	Putative Glycosyl Hydrolase	3,70	Zytoplasma
PA2165	GlgA	Putative Glykogensynthase	8,81	Zytoplasma
Coenzym-Transport				
PA4216	PhzG1	Putative Pyridoxamin 5'-phosphatoxidase	0,47	Zytoplasma
PA4217	PhzS	Flavin beinhaltende Monooxygenase	0,48	Zytoplasma

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$.

Das Protein HutU wurde nicht nur nach einer vierstündigen Kultivierung identifiziert, sondern auch während der stationären Phase (4 h: 0,33-fach/24 h: 0,45-fach) und formt Urocanase zu 4-Imidazol-5-Propionsäure um (Martí-Arbona *et al.*, 2006). HutH ist niedrig abundant in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ (0,47-fach). Beim Histidinkatabolismus sind nicht nur die Proteine HutHUIFG für die Umwandlung von L-Histidin zu *N*-formimino-L-glutamat verantwortlich (Martí-Arbona *et al.*, 2006), sondern auch HutC. HutC, dient als Repressor des *hut*-Operons durch die Bindung von Urocanat (Imidazolacrylat) und ist ebenfalls niedrig abundant (0,45-fach). Das *hut*-Operon ist abhängig von dem Sigmafaktor σ^{54} (Li & Lu, 2007). Das Zweikomponenten-System CbrAB ist als wichtiges Element für den Katabolismus von verschiedenen Stoffwechselprodukten beschrieben. Zweikomponenten-Systeme (*two-component systems*, TCS) dienen der Signaltransduktion in Bakterien, damit diese die Genexpression an veränderte Konditionen anpassen können. Typischerweise bestehen diese Systeme aus einer membran-gebundenen Sensor-Histidin-Kinase (HK) und einem zytosolischen *response regulator* (RR), welcher mit den Promotorregionen interagiert, um die DNA-Transkription zu starten (Monteagudo-Cascales *et al.*, 2019). CbrA (PA4725, HK) ist in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ hoch abundant (1,5-fach), CbrB (PA4726, RR) wurde ebenfalls identifiziert, ist jedoch nicht signifikant abundant. Es wird angenommen, dass CbrAB zusammen mit dem TCS NtrBC (wurde nicht identifiziert) das Gleichgewicht von Kohlenstoff und Stickstoff in der Zelle kontrolliert. Diese aktivieren dann σ^{54} -Promotoren und somit das *hut*-Operon (Li & Lu, 2007).

Besonders interessant sind die niedrig abundanten Proteine GcvT1 (0,45-fach), GcvH1 (0,58-fach) und GcvP1 (2,53-fach). Diese Proteine sind an dem Syntheseweg für *S*-Adenosylmethionin (SAM) beteiligt. Eine niedrige intrazelluläre SAM-Konzentration führt zu einer reduzierten Produktion von AHL durch LasI/RhIR (Kai *et al.*, 2009). Dies führt wiederum zu einer reduzierten Bildung von

Toxinen und einer reduzierten *quorum sensing*-abhängigen Virulenz von *P. aeruginosa* (Kai *et al.*, 2009).

In *P. aeruginosa* gibt es zwei redundante Operons, welche für Proteine kodieren, die an der Synthese von Phenazin-1-Carbonsäure (PCA), einem Vorläufer zahlreicher Phenazin Derivaten, beteiligt sind. Es handelt sich hierbei um *phzA1-G1* (*phz1*) und *phzA2-G2* (*phz2*) (Recinos *et al.*, 2012). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das *phz2*-Operon für die Besiedlung der Lunge in einem murinen Infektionsmodell essentiell war und somit als Virulenzfaktor angesehen werden kann (Déziel *et al.*, 2005; Recinos *et al.*, 2012). Phz1 ist umgeben von *phzM* und *phzS*, welche für PhzMS kodieren und für die Umwandlung von Phenanzin-1-Carbonsäure zu Pyocyanin verantwortlich sind. Pyocyanin ist toxisch für eukaryotische Zellen und wichtig für Infektionen im Mausmodell, wodurch es ein Ziel für die Entwicklung von Antiinfektiva ist (Ho Sui *et al.*, 2012). PhzS (PA4217) war niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* (0,48-fach), wohingegen PhzM nicht identifiziert wurde. PhzH (PA0051) ebenfalls niedrig abundant (0,53-fach) ist ebenfalls ein Phenazin-modifizierendes Protein und wandelt Phenanzin-1-Carbonsäure zu Phenazin-1-Carboxamid um (Recinos *et al.*, 2012). Ein weiteres, an der Biosynthese von Phenazin beteiligtes Protein, PhzB2 (PA1900, 0,3-fach) wurde identifiziert. Dieses Protein wird durch Raloxifen gebunden, einem Östrogenrezeptormodulator, das als Prävention von Osteoporose eingesetzt wird (Ho Sui *et al.*, 2012).

Die Expression des *phz*-Operons ist durch das PQS-System kontrolliert (Dietrich *et al.*, 2006). PqsE (PA1000) war nach einer vierstündigen Kultivierung hoch abundant (1,53-fach) in *P. aeruginosa* Δ *plaB*. Nach einer 24-stündigen Kultivierung konnte PqsD (PA0999) als niedrig abundantes Protein (0,46-fach) identifiziert werden. Pyocyanin reguliert *quorum sensing* gesteuerte Gene in der stationären Phase und dient als Signalmolekül (Dietrich *et al.*, 2006).

Der Arginin-Deiminase-Syntheseweg, welcher für die Bildung von ATP wichtig ist, ist ebenfalls durch die Deletion von *paplab* beeinflusst. Hierbei wird Arginin zu Ornithin und Carbamoylphosphat konvertiert. Arginin wird als extrazelluläre Energiequelle für die Bewegung und das Wachstum unter anaeroben Konditionen benötigt. Das Operon umfasst die Gene *arcDABC*. *arcD* kodiert für ein Transmembranprotein, welches als Antiporter für Arginin:Ornithin fungiert (Lüthi *et al.*, 1990). Alle vier Proteine (ArcA: 1,93-fach; ArcB: 1,85-fach; ArcC: 1,73-fach; ArcD: 2,48-fach) wurden in der Proteomstudie identifiziert und sind hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB*.

Von *E. coli* ist bekannt, dass die Proteine LeuA, LeuB, LeuC und LeuD an der Biosynthese von Leucin beteiligt sind (Hoang & Schweizer, 1997; Amorim Franco & Blanchard, 2017). Alle vier Proteine waren in *P. aeruginosa* Δ *plaB* hoch abundant. Besonders auffallend war hier LeuA, welches mit 44,06-fach am höchsten abundant von allen identifizierten Proteinen war. Für den letzten Schritt der Leucinsynthese, der Aminierung von 2-Ketoisocaproat zu Leucin, sind die beiden Proteine TyrB (PA3139) und IlvE (PA5013) notwendig (Vartak *et al.*, 1991). Jedoch wurde TyrB in der Proteomstudie nicht identifiziert und IlvE war nicht signifikant abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB*. In *Mycobacterium bovis* konnte gezeigt werden, dass ein Defekt im *leuD* Gen zu einem verminderten Wachstum und Virulenz im Mausmodell führte (Amorim Franco & Blanchard, 2017).

Die Proteine GlgP (PA2144), GlgB (PA2153) und GlgA (PA2164) sind an der Synthese und dem Abbau von Glykogen beteiligt (Waite *et al.*, 2006) und hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB*. Die Glykogenbiosynthese steht unter dem Regulationsprotein CsrA (PA0905), welches nach vier und 24-stündiger Kultivierung identifiziert wurde, jedoch nicht signifikant abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* war. CsrA unterdrückt posttranskriptionell das *glgCAP*-Operon (Jackson *et al.*, 2002). GlgP ist wichtig für den langsamen Abbau von endogenem Glykogen während der stationären Phase und abhängig vom *quorum sensing*-System (Yu *et al.*, 1988; Schuster *et al.*, 2003). Für GlgX (PA2160; 8,81-fach) wird angenommen, dass es an der Hydrolyse von Speicher-Polysacchariden beteiligt und in planktonischen Biofilmen durch Ca^{2+} induzierbar ist (Waite *et al.*, 2006). Des Weiteren wird angenommen, dass RpoN (PA4462) den Katabolismus von Glykogen kontrolliert (Damron *et al.*, 2012), welches für beide Zeitpunkte jedoch nicht signifikant abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* war.

Des Weiteren wurden einige niedrig abundante Proteine identifiziert, die mit der Pyoverdinsynthese in Verbindung stehen (PA2393, PA2394, PA2413). Auf die Pyoverdinproduktion in *P. aeruginosa* Δ *plaB* wird im folgenden Kapitel 3.5.1.2 detailliert eingegangen.

3.5.1.2 Die Pyoverdinproduktion von *P. aeruginosa* Δ *plaB* ist reduziert

Mit Hilfe der globalen Proteomstudie wurden Proteine identifiziert, die einen Einfluss auf die Pyoverdinsynthese in *P. aeruginosa* Δ *plaB* haben. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da bereits während der Kultivierung von *P. aeruginosa* Δ *plaB* beobachtet wurde, dass die Kulturen eine schwächere grün Färbung als der Wildtyp aufwiesen. Dies führte zu der Annahme, dass die Pyoverdinproduktion durch die Deletion von *paplaB* beeinträchtigt wird. In *P. aeruginosa* sind

zahlreiche Proteine an der Pyoverdinsynthese beteiligt. Mit Ausnahme von OpmQ (PA2391) sind in Abb. 3.28 nur die Proteine des Synthesewegs dargestellt, die auch in der Proteomstudie identifiziert wurden (Tab. 3.6).

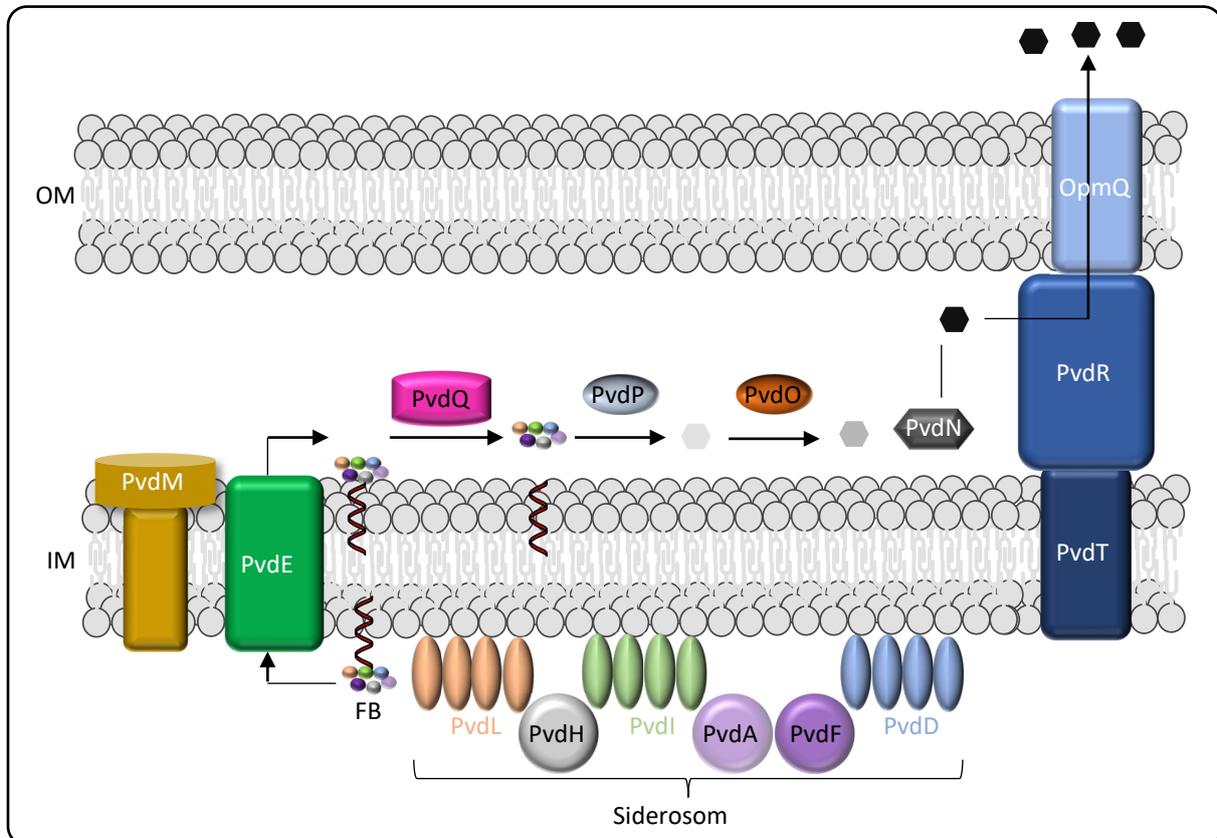


Abb. 3.28: Schematische Darstellung der Pyoverdinsynthese in *P. aeruginosa*.

Die Pyoverdinsynthese beginnt an der inneren Membran (IM) mit den Proteinen PvdL, PvdI, PvdD und PvdH. Das inaktive Ferribaktin (FB, bunte Punkte) ist so lange an Myristinsäure gebunden, bis es ins Periplasma transportiert wird. Durch PvdQ erfolgt die Deacylierung und PvdP katalysiert die oxidative Zyklisierung zu Dihydropyoverdin. Die Proteine PvdO und PvdN führen dann die finale Bildung des Chromophors und dessen Aktivierung aus. Das nun aktive Pyoverdin wird über die äußere Membran (OM) durch das PvdR-OpmQ-System in die Umgebung transportiert, um Eisenionen zu binden. Die Abbildung wurde nach Ringel & Brüser (2018) modifiziert, welches durch die *Creative Commons Attribution* (CC BY) Lizenz genehmigt wurde.

Tab. 3.6: Signifikant abundanten Proteine, die der Pyoverdinsynthese zugeordnet werden konnten.

Zeitpunkt	Lokus	Name	Produktname	Verhältnis $\Delta plaB/WT^*$
4 h	PA2394	PvdN	PvdN	0,48
	PA2424	PvdL	nicht-ribosomale Pyoverdinsynthetase	5,98
24 h	PA2386	PvdA, Pvd-1	L-ornithin N(5)-Monooxygenase	0,31
	PA2393	PvdM	Putative Dipeptidase	0,38
	PA2395	PvdO	PvdO	0,38
	PA2394	PvdN	PvdN	0,40
	PA2392	PvdP	PvdP	0,41
	PA2413	PvdH	L-2,4-diaminobutyrat:2-ketoglutarat 4-aminotransferase	0,44
	PA2385	PvdQ, qsc112	Acyl-homoserin Lacton Acylase	0,63
	PA2424	PvdL	nicht-ribosomale Pyoverdinsynthetase	4,36

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$.

Durch PvdL, eine im Zytoplasma lokalisierte nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS), wird zusammen mit weiteren NRPS PvdI, PvdJ und PvdD das acylierte Ferribaktin zusammengesetzt. NRPS fügen spezifische Aminosäuren an ein wachsendes Peptid. Ferribaktin ist ein Peptidvorläufer des Pyoverdins (Ringel & Brüser, 2018). PvdL (PA2424) war in *P. aeruginosa* Δ *plaB* für beide gemessenen Zeitpunkte hoch abundant (4 h: 5,98-fach/24 h: 4,36-fach). Die ersten drei Aminosäuren des Ferribaktins, welche von PvdL eingebaut werden sind immer L-Glutaminsäure, D-Thyrosin und L-2,4-Diaminobutyrat. Auffällig ist, dass die drei weiteren NRPS nicht in ihrer Abundanz beeinflusst zu sein scheinen. L-2,4-Diaminobutyrat als nicht-kanonische Aminosäure wird durch PvdH (PA2413) synthetisiert. Hierbei wird L-2,4-Diaminobutyrat aus L-Aspartat- β -Semialdehyd produziert. PvdH war niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* (0,44-fach). Ebenfalls niedrig abundant (0,31-fach) war PvdA (PA2386), welches aus L-Ornithin in zwei Schritten L-N⁵-Formyl-N⁵-hydroxyornithin bildet. PvdH, PvdA und PvdF (wurde nicht identifiziert) bilden einen Komplex an der inneren Membran, welcher als Siderosom bezeichnet wird (Ringel & Brüser, 2018). Der ABC-Transporter PvdE (PA2397), welcher nicht signifikant abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* war, transportiert das acylierte Ferribaktin ins Periplasma. Im Periplasma wird die Acylierung des Ferribaktin durch PvdQ (PA2385, 0,63-fach) rückgängig gemacht. In einem nächsten Schritt wird das Dihydroxyquinolon Ringsystem gebildet, welches das deacylierte Ferribaktin zu Pyoverdin transformiert. Hierbei katalysiert PvdP (PA2392, 0,41-fach) die Hydroxylierung und Oxidationsschritte. Dies führt gleichzeitig zur Zyklisierung des Dihydropyoverdins. PvdO (PA2395), ebenfalls niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB*, führt die finale Oxidierung durch. Beide Enzyme agieren immer zusammen und sind direkt in die Bildung des Fluorophors beteiligt (Ringel & Brüser, 2018). *pvdMNO* liegen in einem Operon. Die genaue Funktion von PvdM ist nicht bekannt, jedoch wird angenommen, dass es für die Maturierung des Pyoverdins essenziell ist (Ringel *et al.*, 2016). PvdN (PA2394, 0,4-fach) ist an der Bildung des Chromophors, durch eine Modifizierung an der Seitenkette des Pyoverdins beteiligt (Schalk & Guillon, 2013; Ringel *et al.*, 2016).

Zusätzlich zu der Analyse des Proteoms wurde die Pyoverdinmenge in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ *plaB* untersucht. Hierzu wurden die Stämme in LB-Medium bei 30 und 37 °C für 24 h kultiviert mit anschließender Separation der Zellen von den Kulturüberständen. Es folgte die Fluoreszenzmessung der Pyoverdine in den Kulturüberständen (Kapitel 2.4.14; Abb. 3.29).

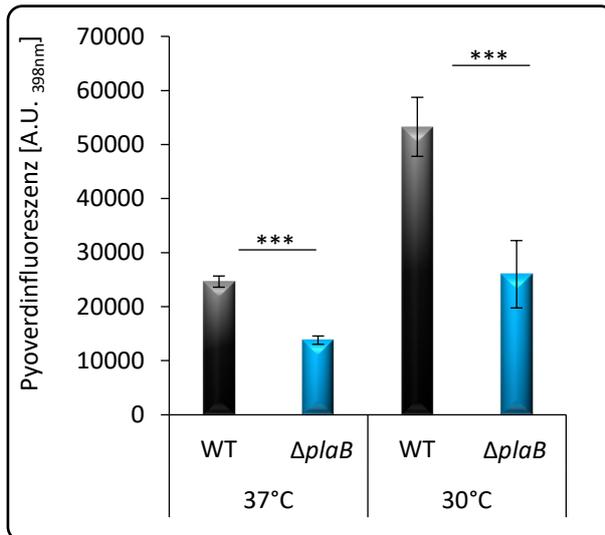


Abb. 3.29: Die Pyoverdinmenge im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ war reduziert.

Die Kultivierung von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ erfolgte in Erlenmeyerkolben für 24 h bei 30 bzw. 37 °C (LB-Medium). Anschließend erfolgte die Trennung der Zellen und dem Kulturüberstand durch Zentrifugation. 100 μ l der Kulturüberstände wurde in 96er Mikrotiterplatten überführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei $\lambda_{Ex} = 398$ nm, $\lambda_{Em} = 455$ nm. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von biologischen und technischen Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des t-Test und der Shapiro-Wilk Methode, um signifikante Unterschiede von normalverteilten Werten zu ermitteln, *** $p < 0,0001$.

In den Kulturüberständen von *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ bei 37 und 30 °C war signifikant weniger Pyoverdin nachweisbar als beim Wildtyp (Abb. 3.29). Unter Laborbedingungen 37 °C lagen die Fluoreszenzwerte für *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ um mehr als 44 % niedriger als beim Wildtyp (24.632 A.U._{398nm}). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Messung der fluoreszierenden Pyoverdine in den Kulturüberständen nach einer Kultivierung bei 30 °C. Allgemein waren die Fluoreszenzwerte doppelt so hoch, jedoch spiegelte sich auch hier wider, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ ca. 50 % weniger Pyoverdin produziert als der Referenzstamm *P. aeruginosa* PA01 (WT: 53.256/ $\Delta plaB$: 25.991 A.U._{398nm}). Eine Messung der Fluoreszenz nach einer vierstündigen Kultivierung war nicht möglich (Daten nicht gezeigt), da zu diesem Zeitpunkt noch keine ausreichende Pyoverdinmenge produziert wurde.

Aus den Proteomdaten ist ersichtlich, dass die pyoverdinassoziierten Proteine während der stationären Wachstumsphase in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ niedrig abundant waren und der Stamm signifikant weniger Pyoverdin produzierte als der Wildtyp.

3.5.1.3 Die Deletion von *paplaB* hat Einfluss auf den zentralen Metabolismus

In Kapitel 3.4.3 konnte bereits gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ während der exponentiellen Wachstumsphase ein verzögertes Wachstum aufwies (Abb. 3.20). Daraus resultierte die Fragestellung, ob PaPlaB einen Einfluss auf den primären Stoffwechsel und die Energiehomöostase in *P. aeruginosa* hat. Hierzu wurden die Proteomdaten analysiert und alle Proteine, die den COG-Kategorien „Lipidtransport & Metabolismus“ und „Energiehomöostase“ zugeordnet werden konnten, gelistet (Tab. 8.4). In der folgenden Tab. 3.7 wird exemplarisch auf einzelne Prozesse eingegangen, bei denen mehrere Proteine beeinflusst waren.

Tab. 3.7: Signifikant abundanten Proteine, die dem „Lipidtransport & Metabolismus“ und der „Energiehomöostase“ zugeordnet wurden.

Zeitpunkt	PA-Nummer	Name	Produkt	Verhältnis $\Delta plaB/WT^*$
Lipidtransport & Metabolismus				
4 h	PA3924	/	Putative mittelkettige Acyl-CoA-Ligase	2,30
	PA2000	DhcB	Dehydrocarnitin-CoA-Transferase, Untereinheit B	0,23
24 h	PA1999	DhcA	Dehydrocarnitin-CoA-Transferase, Untereinheit A	0,40
	PA0887	AcsA	Acetyl-CoA Synthetase 1	0,47
	PA4733	AcsB	Acetyl-CoA Synthetase 2	1,75
	PA1748	/	Putative Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase	0,49
	PA5188	/	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,49
	PA1610	FabA	Beta-Hydroxydecanoyl-ACP-Dehydrase	0,58
	PA4786	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	1,75
	PA3924	/	Putative mittelkettige Acyl-CoA-Ligase	1,87
	PA4785	/	Putative Acyl-CoA Thiolase	2,00
	PA0227	/	Putative CoA-Transferase, Untereinheit B	2,05
Energiehomöostase				
4 h	PA2247	BkdA1	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,45
	PA2248	BkdA2	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,66
	PA3417	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Alpha-Untereinheit	2,65
	PA3416	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Betakette	2,66
24 h	PA3415	/	Putative Dihydrolipoamid-Acetyltransferase	2,11
	PA2247	BkdA1	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,45
	PA2248	BkdA2	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,87
	PA3417	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Alpha-Untereinheit	3,08
	PA3416	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Betakette	3,15

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$.

Die RpoS abhängigen Proteine PA3415-3417 sind an der Pyruvatsynthese und somit am Zitronensäurezyklus beteiligt (Schuster *et al.*, 2004, Bielecki *et al.*, 2011). PA3416 und PA3417 sind während der logarithmischen Wachstumsphase hoch abundant (2,66-fach/2,65-fach) in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$. Der Sigma-Faktor RpoS (PA3622, 10,3-fach) ist ein Regulator genereller Stressantworten während der stationären Wachstumsphase und an der Produktion von

Virulenzfaktoren beteiligt. Gene, die am *quorum sensing*-System beteiligt sind werden durch *rpoS* reguliert und teilweise unterdrückt (Schuster *et al.*, 2004). Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase wird die Expression von *rpoS* induziert (Fujita *et al.*, 1994). RpoS ist an zahlreichen Prozessen beteiligt, so konnte gezeigt werden, dass eine *P. aeruginosa rpoS*-Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Tobramycin aufwies, sowie Biofilme mit erhöhter Biomasse produzierte (Whiteley *et al.*, 2001). Weitere RpoS regulierte Proteine (Schuster *et al.*, 2004), die in *P. aeruginosa ΔplaB* hoch abundant waren, können Tab. 8.5 entnommen werden. Interessant ist, dass unter diesen hochregulierten Genen auch PaPlaB (4,2-fach) zu finden war (Schuster *et al.*, 2004).

BkdA12 sind am ersten Schritt des Katabolismus von verzweigt-kettigen Aminosäuren (*branched-chain amino acids*), zu denen Leucin, Isoleucin und Methionin gehören, beteiligt. Beide zusammen bilden das Enzym 2-Oxoisovalerat Dehydrogenase (Sriramulu *et al.*, 2005) und waren zu beiden Zeitpunkten (4 und 24 h) hoch abundant in *P. aeruginosa ΔplaB*. Das Operon besteht aus *bkdA1A2B-lpdV* (BkdB und LpdV nicht signifikant abundant) und ist durch das Zweikomponenten-System CbrAB reguliert (Sonnleitner *et al.*, 2012, CbrA hoch abundant, CbrB nicht signifikant abundant).

DhcAB (PA1999/PA2000) sind an dem Katabolismus der Aminosäure L-Phenylalanin beteiligt und wandeln Acetoacetat zu Acetoacetyl-CoA um (Ketelboeter, 2016). Beide Proteine waren nach vierstündiger Kultivierung niedrig abundant in *P. aeruginosa ΔplaB* (0,23-fach/0,4-fach). AtoB (PA2001), welches den letzten Schritt des Katabolismus durchführt, und zwar die Umwandlung von Acetoacetyl-CoA zu Acetyl-CoA, war nicht signifikant abundant. Acetyl-CoA als Endprodukt wird dann weiter im Zitronensäurezyklus verstoffwechselt (Ketelboeter, 2016).

AcsA (PA0887) ist für das Wachstum auf Ethanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle essenziell (Kretzschmar *et al.*, 2001; Kretzschmar *et al.*, 2010). AcsA und AcsB (1,75-fach) katalysieren die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA (Rossi *et al.*, 2018). Der *response-regulator* ErdR (PA3604) ist für die Induktion von AcsA verantwortlich (Kretzschmar *et al.*, 2010), war aber zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant abundant in *P. aeruginosa ΔplaB*.

PA0227 war hoch abundant (2,05-fach) in *P. aeruginosa ΔplaB*. Es wird vermutet, dass PA0227 an dem Katabolismus von Anthranilat beteiligt ist, in dem es zusammen mit PA0226, welches in der Proteomstudie nicht identifiziert wurde, die Reaktion von 3-Oxadipat zu 3-Oxadipyl-CoA durchführt (Costaglioli *et al.*, 2012). Anthranilat wird durch den Abbau von Tryptophan über den Kynurein-Weg oder durch die Synthese von Chorismat durch zwei Anthranilat-Synthasen

produziert (Farrow & Pesci, 2007). Aufgrund einer BLAST-Suche wurden diese beiden Proteine als PcaI und PcaJ bezeichnet (Romero & Karp, 2003). PcaF (PA0228, liegt im Operon mit *pa0226/7*, ebenfalls nicht identifiziert), katalysiert den Schritt von 3-Oxo adipyl-CoA zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA, welche dann in den Zitronensäurezyklus eingespeist werden (Costaglioli *et al.*, 2012).

PA4786 und PA4785 bilden das *fadAB4*-Operon, eines von drei Operons, die an der β -Oxidation beteiligt sind. Der Fettsäureabbau (Fad) nimmt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von *P. aeruginosa* bei dem Abbau von Phosphatidylcholin in Lungen ein (Kang *et al.*, 2008). Wenn Phosphatidylcholin durch eine Phospholipase C gespalten wird, werden drei Abbauwege benötigt, um alle Bestandteile abzubauen: Der *bet*-Weg für den Abbau der Kopfgruppe, der *glp*-Abbauweg für den Glycerol-Metabolismus und die β -Oxidation für den Abbau der Fettsäure (Sun *et al.*, 2014). Sowohl PA4786 als auch PA4785 waren hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* (1,75-fach/2,0-fach).

PA3924 ist ein Homolog von *E. coli* FadD und war zu beiden Zeitpunkten hoch abundant (4 h: 2,30-fach/24 h: 1,87-fach). Während einer akuten Infektion mit Zystischer Fibrose werden mehrere *fad*-Gene in *P. aeruginosa* exprimiert (*fadD1*: PA3299, *fadD2*: PA3300, *fadA5*: PA3013, *fadB5*: PA3014), welche die Aktivierung der Fettsäuren unter Verwendung von ATP und CoA ermöglichen (Zarzycki-Siek *et al.*, 2013). Mit Hilfe der Proteomstudie konnten die Proteine (PA3299, PA3300, PA3013, PA3014) für beide Zeitpunkte identifiziert werden, jedoch war keins signifikant abundant. Ebenfalls an der β -Oxidation beteiligt ist PA5188, welches als FadB deklariert wurde (Min, 2012) und niedrig abundant (0,49-fach) in *P. aeruginosa* Δ *plaB* war.

Die Synthese von ungesättigten Fettsäuren erfolgt durch den anaeroben FabAB-Syntheseweg an dem die Proteine DesABCT und FabAB beteiligt sind (Schweizer & Choi, 2011). FabA (PA1610) war als einziges Protein des Synthesewegs nach 24-stündiger Kultivierung niedrig abundant (0,58-fach) in *P. aeruginosa* Δ *plaB* und ist der Hauptregulator der *de novo* Synthese von ungesättigten Fettsäuren (Schweizer & Choi, 2011). Bis auf DesA, welches nicht signifikant abundant war, wurde keins der Des-Proteine identifiziert.

Resümierend verdeutlichte die Analyse der Proteome, dass PaPlaB einen direkten oder indirekten Einfluss auf zahlreiche metabolische Synthesewege und Abbauwege von Aminosäuren, (z.B. Leucin, Histidin, Arginin, Tryptophan) und auch deren Intermediate einen Einfluss auf den Zitronensäurezyklus haben. Des Weiteren hat PaPlaB einen Einfluss auf *quorum sensing* regulierte Proteine, die Pyoverdinsynthese und den Fettsäureabbau. Der Großteil der beeinflussten Proteine wurde jedoch nach einer 24-stündigen Kultivierung identifiziert. Möglich ist, dass die Eisenmenge

während einer Kultivierung in LB-Medium für das verzögerte Wachstum in der logarithmischen Wachstumsphase mit verantwortlich ist.

- Durch globale Proteomstudien konnten insgesamt 315 signifikant unterschiedlich abundante Proteine in *P. aeruginosa* Δ *plaB* identifiziert werden. Nach einer Kultivierungszeit von 4 h wurden 34 signifikant unterschiedlich abundante Proteine quantifiziert, von denen 57 % im Zytoplasma lokalisiert sind. Nach einer 24-stündigen Kultivierung wurden 281 Proteine quantifiziert, von denen 58 % im Zytoplasma lokalisiert sind.
- Für beide Zeitpunkte wurden hauptsächlich hypothetische Proteine identifiziert und solche die dem Transport zugeordnet werden konnten.
- Die Deletion von *paplaB* führte zu einer Beeinflussung der Pyoverdinsynthese, aufgrund dessen *P. aeruginosa* Δ *plaB* eine geringere Pyoverdinmenge produzierte.
- Durch globale Proteomstudien konnte gezeigt werden, dass PaPlaB zahlreiche Prozesse im Bereich der Aminosäuresynthese und dem Aminosäurekatabolismus beeinflusst, welche sich z.B. auf den Zitronensäurezyklus auswirken. Dies führt zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums.
- Die Deletion von *paplaB* hatte einen Einfluss auf den Sigma-Faktor RpoS, welcher hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaB* war (10-fach) und einen Regulator von Stressantworten darstellt.
- Des Weiteren hat PaPlaB einen Einfluss auf Virulenzfaktoren wie das Phenazin- und Pyoverdinsystem und *quorum sensing* regulierte Proteine.

4 Diskussion

P. aeruginosa ist ubiquitär verbreitet und zeichnet sich durch seine enorme Anpassungsfähigkeit aus (Stover *et al.*, 2000). Das Bakterium gehört zu den nosokomialen Keimen und ist Atemwegserkrankungen verantwortlich (Cross *et al.*, 1983; Winstanley & Fothergill, 2009). Durch seine Resistenzen gegenüber Antibiotika und seine Fähigkeit, schnell weitere Resistenzen auszubilden (Lister *et al.*, 2009), stellt dieser Keim in der Medizin ein großes Problem dar. *P. aeruginosa* produziert eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, unter anderem Phospholipasen, die, soweit bekannt, verschiedene Entzündungsreaktionen und Signalwege beeinflussen (Flores-Diaz *et al.*, 2016). Aus diesem Grund ist die Erforschung von weiteren Virulenzfaktoren von großer Bedeutung und bildet die Grundlage für neue Therapie-Ansätze in der Medizin. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung der Phospholipase B PaPlaB aus *P. aeruginosa*, welche bisher nicht charakterisiert ist. Hierzu wurden zunächst die biochemischen Eigenschaften der Phospholipase PaPlaB mit rekombinantem Protein untersucht. Die pleiotropen Effekte der Deletion von *paplaB* auf die Physiologie und Regulationsnetzwerke von *P. aeruginosa* und Beiträge, ob PaPlaB als ein neuer Virulenzfaktor betrachtet werden kann, wurde in einem weiteren Themenkomplex analysiert.

4.1 Bioinformatische Analysen

Auf der Suche nach neuen Phospholipasen aus *P. aeruginosa* wurde zunächst ein Set an bereits bekannten Phospholipasen (Tab. 3.1; Flores-Diaz *et al.*, 2016; Banerji *et al.*, 2008) verwendet und untersucht, ob diese homologe Proteine in *P. aeruginosa* haben. Das hypothetische Protein PA2927 aus *P. aeruginosa* PA01 war das interessanteste Protein, da es ca. 38 % Sequenzähnlichkeit zu PlaB aus *L. pneumophila* Corby aufwies. LpPlaB beschreibt das erste Mitglied einer neuen Phospholipase-Familie (Bender *et al.*, 2009). Unter Verwendung der STRING-Datenbank (Szklarczyk *et al.*, 2019) konnte keine phylogenetische Verwandtschaft für PaPlaB festgestellt werden, aufgrund dessen angenommen werden kann, dass PaPlaB ein einzigartiges, nicht für das bakterielle Leben notwendige Protein ist. Eine sequenzbasierte Homologiesuche (Abb. 3.2) mit anderen (putativen) Phospholipasen zeigte, dass PaPlaB in zwei Domänen unterteilt werden kann (Abb. 3.3). Der N-terminale Bereich stellt die Phospholipase-Domäne dar, die auch die katalytisch aktiven Aminosäuren (Ser79, Asp196, His244) enthält. Eine DUF-Domäne stellt den C-terminalen Bereich dar. Für PaPlaB und LpPlaB sind keine vergleichbaren Strukturen für den C-terminalen Bereich bekannt (Diwo *et al.*, 2020). Das α/β -Hydrolase Faltungsmotiv liegt in beiden Proteinen konserviert vor. Durch die Lösung der LpPlaB-Kristallstruktur konnte gezeigt werden,

dass dieser Bereich aus einem zweilappigen β -Sandwich besteht, welche aus insgesamt sechs Strängen ($\beta_6, \beta_7, \beta_{11}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{17}$) und drei anti-parallel β -Faltblättern ($\beta_{12}, \beta_{15}, \beta_{16}$) besteht (Diwo *et al.*, 2020). Es wird vermutet, dass das β -Faltblatt $\beta_{6/7}$ zur Stabilisierung der Phospholipase-Domäne gebraucht wird (Diwo *et al.*, 2020).

Basierend auf der kürzlich gelösten Kristallstruktur von LpPlaB (Diwo *et al.*, 2020) wurden wichtige Strukturelemente mit dem multiplen Sequenzalignement von PaPlaB und dessen vorhergesagten Sekundärstruktur abgeglichen (Abb. 3.1). Hierbei wurde das Augenmerk auf die Deckelstruktur (α -Helices α_8/α_9 , AS G127-G144), die Faltblätter $\beta_{6/7}$ (AS 216-237), $\beta_{9/10}$ (AS 308-321) und der *Hook*-Domäne gelegt (AS R446-D474). Der Bereich der Deckelstruktur liegt in PaPlaB ebenfalls konserviert vor (AS G120-G139) und die Vorhersage der Sekundärstruktur bestätigt hier zwei aufeinander folgende α -Helices. In der geschlossenen Konformation versperrt der Deckel das aktive Zentrum, weshalb das Substrat nicht binden kann (Bauer *et al.*, 2020). Die Deletion des β -Faltblatts $\beta_{6/7}$ führte zu Inaktivität von LpPlaB, wohingegen durch die Deletion des β -Faltblatts $\beta_{9/10}$ die Lokalisation von LpPlaB beeinträchtigt wird. Das Protein wurde nicht nur in der äußeren, sondern auch inneren Membran detektiert (Diwo *et al.*, 2020). In LpPlaB ist die Aminosäure S129 für die Erkennung von PC verantwortlich und die Aminosäuren R130/R133 für die Erkennung von PG (Diwo *et al.*, 2020). LpPlaB und PaPlaB (Abb. 3.9) bevorzugen mittel- und langkettige Acylketten (Bender *et al.*, 2009). Für den Bereich des β -Faltblatts $\beta_{6/7}$ stimmen die Vorhersagen nur teilweise mit der gelösten Struktur von LpPlaB überein. Zum einen liegen die Aminosäuren in diesem Bereich nicht konserviert vor und zum anderen stimmt die Vorhersage der Sekundärstruktur nicht mit der tatsächlichen Struktur überein. Es wurde lediglich ein β -Faltblatt zwischen AS 216-219 (LpPlaB) vorhergesagt. Ähnlich sieht es bei dem β -Faltblatt $\beta_{9/10}$ aus. In diesem Bereich unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der Proteine stark voneinander, somit konnte für diesen Bereich keine Sekundärstruktur vorhergesagt werden. Laut vorhergesagter Sekundärstruktur beginnt das β -Faltblatt erst ab AS 323-348. Sie wurden als räumlich versetzt vorhergesagt. Hierfür gibt es zwei mögliche Gründe. Möglich ist, dass die beiden Proteine einfach eine leicht unterschiedliche Struktur haben, da sie aus verschiedenen Organismen mit unterschiedlichen Lebensweisen stammen. Zum anderen ist LpPlaB 31 AS größer als PaPlaB, wodurch es zu einer Verschiebung der vorhergesagten Sekundärstruktur kommen kann. Die *Hook*-Domäne liegt ebenfalls nicht konserviert in den Proteinen vor. Jedoch konnte, wenn auch räumlich leicht vorgezogen (AS 422-433), ein β -Faltblatt in PaPlaB für diesen Bereich vorhergesagt werden. Auch wenn die vorhergesagte Sekundärstruktur von LpPlaB (Abb. 3.1) nicht vollständig mit der gelösten Struktur übereinstimmt, konnte durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen

und der vorhergesagten Sekundärstrukturen gezeigt werden, dass PaPlaB einen ähnliche Aufbau aufweist und sich ähnlich verhalten könnte, wie für LpPlaB gezeigt (Diwo *et al.*, 2020). Diese Vermutung wird durch die konzentrationsabhängige Aktivität (Abb. 3.13) der beiden Proteine und die Bildung von Tetrameren bei hohen Proteinkonzentrationen (Abb. 3.14) bestärkt (Kuhle *et al.*, 2014). Die NAD(H) bindenden Aminosäuren in LpPlaB (Y320-R187-Y190, F362-F363-F378-Arg366 und Y343-R368-R373) liegen im C-terminalen Bereich und sind nicht konserviert (Diwo *et al.*, 2020).

4.2 Produktion, Reinigung und Lokalisation der Phospholipase PaPlaB

Um eine biochemische Charakterisierung eines Proteins durchzuführen, ist es essenziell, dieses in ausreichender Menge und in gereinigter Form zur Verfügung zu haben. Es war nicht möglich, PaPlaB im homologen Wirt zu exprimieren. Unter Verwendung eines konstitutiven Promotors wurde versucht, *paplaB* in *P. aeruginosa* zu exprimieren, jedoch konnte über einen Zeitraum von 24 h keine Proteinproduktion mittels Western Blot und Aktivitätsmessung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglich ist, dass eine posttranskriptionale Regulation stattfindet damit nur eine ganz bestimmte Menge PaPlaB in der Zelle vorhanden ist (Mata *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde ein für toxische Proteine geeigneter *E.coli* Stamm, *E. coli* C43(DE3), verwendet (Miroux & Walker, 1996; Wagner *et al.*, 2008). Allgemein kann eine Überproduktion von heterologen Membranproteinen zu einer Überlastung des Sec-Translokons und Transportern führen. Daraus resultiert eine geringere Proteinausbeute, die Proteine können nicht in die zytoplasmatische Membran eingebaut werden, aggregieren unter Umständen im Zytoplasma oder werden an die falschen Zielorte transportiert (Wagner *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015). Um dieses Phänomen zu umgehen, ist es daher von Vorteil, nicht die maximale Proteinausbeute pro Zelle zu erreichen, sondern die Biomasse zu erhöhen (Wagner *et al.*, 2008). Trotz der Bildung von Einschlusskörperchen, welche häufig bei der Produktion von Membranproteinen zu beobachten ist (Geertsma *et al.*, 2008), konnte eine ausreichende Menge von PaPlaB in einem gelösten und aktiven Zustand produziert werden. Im Verlauf einer assoziierten Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von DDM eine höhere Proteinausbeute während der Aufreinigung erreicht wurde, im Vergleich zu Octyl β -D-Glucopyranosid (OG; Berger, 2018). Des Weiteren hatte DDM einen positiven Effekt während der Anreicherung des Proteins unter Verwendung der Amicon® Ultra4 Ultrafiltrationsröhrchen. Messungen der Proteinkonzentrationen ergaben, dass in Gegenwart von DDM weniger Protein an der regenerierten Zellulosemembran haften blieb (Daten

nicht gezeigt). Möglich ist, dass an der Proteinoberfläche hydrophobe Bereiche durch DDM gesättigt werden, sodass das Protein nicht mehr an der Zellulosemembran haften kann.

Basierend auf Sequenzhomologien zu LpPlaB wurde für PaPlaB ebenfalls eine Membranlokalisation angenommen: LpPlaB ist in der äußeren Membran lokalisiert (Schunder *et al.*, 2010). Mit Hilfe der Pfam-Datenbank (El-Gebali *et al.*, 2018) konnte für den Sequenzbereich zwischen AS 420-431 eine geringe Komplexität vorhergesagt werden. Dieser Bereich beinhaltet eine Wiederholung von hydrophoben Aminosäuren (Alanin, Prolin, Leucin), welche auf eine mögliche Membranassoziiierung von PaPlaB hindeuten (MacKenzie, 2006). Eine Fraktionierung der *E. coli* Zellen ergab, dass PaPlaB hier als ein intrazelluläres, an die Membran gebundenes Protein vorliegt (Abb. 3.5). Um zu analysieren, ob PaPlaB integral oder peripher an die Membran gebunden ist, wurden *E. coli* Membranen mit verschiedenen Reagenzien inkubiert (Abb. 3.6). Das Ergebnis aus dieser Analyse war jedoch nicht eindeutig. Nach der Behandlung der Membranen mit MES-Puffer, war der Großteil von PaPlaB weiterhin in der Membranfraktion enthalten. Dies war zu erwarten, da für MES-Puffer keine solubilisierende Wirkung bekannt ist. Die Messung der Esteraseaktivität unterstützte das Ergebnis des Western Blots. Im Anschluss an die Inkubation der Membranen mit Harnstoff und Natriumcarbonat sollte ein Großteil von PaPlaB, im Falle einer peripheren Membranbindung, in der löslichen Fraktion nachweisbar sein. Im Western Blot war für beide Reagenzien etwas mehr Protein in der löslichen Fraktion nachweisbar, verglichen mit der in MES-Puffer inkubierten Proben. Jedoch zeigte die Messung der Esteraseaktivität, dass in den löslichen Fraktionen höhere Aktivitäten messbar waren als in den Membranfraktionen. Hierfür könnte die konzentrationsabhängige Aktivität des Proteins eine Rolle spielen (Abb. 3.13). Obwohl Harnstoff und Natriumcarbonat Proteine denaturieren war eine Messung der Aktivität möglich. Denkbar ist, dass zum einen das Detergens PaPlaB von den Reagenzien „abgeschirmt“ hat oder dass andere Proteine, die sich in den Fraktionen befanden, schneller denaturiert sind und PaPlaB länger stabil blieb. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von PaPlaB abhängig von der Proteinkonzentration war (Abb. 3.13) und eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung des Proteins stattfand (Abb. 3.14). Mit zunehmender Proteinkonzentration sank die enzymatische Aktivität von PaPlaB und das Protein lag vermehrt als große, inaktive Oligomere vor. Aus der Literatur sind lipolytische Enzyme bekannt, deren Dimerisierung zur Aktivierung führen. Bei OMPLA (äußere Membran Phospholipase A) aus *E. coli* werden erst durch die Dimerisierung des Proteins das Oxyanionen-Loch und die Substratbindetasche frei (Snijder *et al.*, 1999). Die Endothellipase (LIPG) wird von vaskulären Endothelzellen in Gewebe abgesondert und hat Einfluss auf Lipoproteinmetabolismus, Expression von Zytokinen, die Lipidzusammensetzung und bildet

Kopf-Schwanz-Homodimere (Yu *et al.*, 2018). Diese Dimere bilden die aktive Form des Proteins und schützen es gleichzeitig vor der Inaktivierung durch Proproteinkonvertasen (Griffon *et al.*, 2009). Proteine, bei denen die Deoligomerisierung zur Aktivierung führen sind jedoch nicht so stark verbreitet (Traut, 1994). Ein Beispiel stellt die Purinnukleosid Phosphorylase aus der Rindermilz dar. Das tetramere Enzym dissoziiert in Monomere und die Verdünnung des Enzyms führt zu einer 50-fachen Erhöhung der spezifischen Aktivität (Ropp & Traut, 1991). Ein weiteres Beispiel ist die dimere alkaline Phosphatase aus *Neurospora crassa*, welche nach 40-minütiger Inkubation bei 50 °C in Monomere zerfällt und dann in eine aktive Konformation übergeht (Palma *et al.*, 1989). Eine Inaktivierung des akkumulierten Proteins in der äußeren Membran kann als ein Schutzmechanismus dienen, der den Wirt vor der Zersetzung der eigenen Membran, dem Lipidabbau und dem Zelltod schützt, wie es für LpPlaB bereits beschrieben wurde (Kuhle *et al.*, 2014).

Für die mit TritonX-100 behandelten Proben wurde erwartet, dass sich PaPlaB vollständig aus der Membran löst (Schnaitman, 1971), da Tritonx-100 bereits erfolgreich zum Solubilisieren der Membranen für die Reinigung des Proteins verwendet wurde (Abb. 3.8). Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.6). Ein Problem der Methode für den Nachweis der Lokalisation lag in der Probenvorbereitung. Die Volumina der Membran- sowie löslichen Fraktion waren verschieden. Mittels TCA-Fällung wurde versucht, die Volumina der löslichen Fraktionen zu verringern, jedoch war es nicht möglich, das präzipitierte Protein durch Aufkochen oder Ultraschallbehandlung wieder in Lösung zu bekommen. Eine mögliche Alternative könnte eine Ammoniumsulfat-Fällung darstellen, welche nicht denaturierend auf das Protein wirkt und somit sogar für Aktivitätsmessungen verwendbar wäre (Wingfield, 1998). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob PaPlaB integral oder peripher an die Membran gebunden ist. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass PaPlaB stark an die Membran gebunden ist, da weder Harnstoff noch Natriumcarbonat in der Lage waren, das Protein vollständig von der Membran zu lösen.

Mit Hilfe eines Saccharosegradienten konnte gezeigt werden, dass PaPlaB in aktiver Form mit der inneren Membran assoziiert ist, wohingegen inaktives und gegebenenfalls aggregiertes Protein in der äußeren Membran akkumuliert (Abb. 3.7). Für LpPlaB wurde hingegen gezeigt, dass das aktive PlaB mit dem äußeren Membranprotein MOMP in *L. pneumophila* kolokalisiert (Schunder *et al.*, 2010). Das deutet daraufhin, dass sich die beiden homologen Proteine in ihrer Lokalisation unterscheiden. Dies wurde auch durch Lokalisationsstudien von LpPlaB in *E. coli* Top10 bestätigt

(Michel, 2020). Möglich ist, dass die Überexpression in *E. coli* ein Grund für die abweichende Lokalisation ist. Eine Überexpression von *paplaB* im homologen Wirt mit anschließender Lokalisation des Proteins könnte klären, ob es eine Wirts- oder Proteinabhängige Lokalisation ist.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Einschlusskörperchen, welche ebenfalls in Fraktionierungsexperimenten in der äußeren Membran lokalisierten (Abb. 8.1; Marani *et al.*, 2006) der Grund für das intensive PaPlaB Signal im Western Blot waren (Abb. 3.7). Dies würde auch die geringe Aktivität in den Fraktionen erklären, da Einschlusskörperchen meistens katalytisch inaktiv sind (García-Fruitós *et al.*, 2005). Möglich ist jedoch auch, dass aufgrund der konzentrationsabhängigen Aktivität von PaPlaB die Aktivität bei der starken Akkumulation in der äußeren Membran gering war. Eine Möglichkeit dies zu testen wäre eine Verdünnung der Fraktionen, welche die äußere Membran enthalten. Wenn die Aktivität dann zunimmt, kann PaPlaB ebenfalls als äußeres Membranprotein bestätigt werden. Diesbezüglich wäre die Aktivität von PaPlaB in der inneren Membran auf eine geringe Proteinkonzentration zurückzuführen (Abb. 3.13) oder durch Protein, welches gerade über die innere Membran zu der äußeren Membran transportiert wird. Ebenfalls zu berücksichtigen ist ein eventueller Einfluss der Saccharose, welche nicht entfernt wurde, auf die Enzymaktivität. Eine mögliche Optimierung stellt die Reinigung der Fraktionen mittels PD10-Säulen dar, um PaPlaB von der Saccharose zu trennen und danach die Aktivität zu bestimmen. Einen anderen Ansatz zur Analyse der Lokalisation eines Proteins stellt die Untersuchung der Proteome jeder einzelnen Fraktion dar. Ein Vorteil dieser Methode wäre dabei, dass unabhängig von der Sensitivität von Antikörpern, Proteine identifiziert werden können, welche als Kontrolle für eine saubere Fraktionierung dienen (z.B. TolC: äußere Membran (Benz *et al.*, 1993); SecY: innere Membran (Akiyama & Ito, 1985). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass PaPlaB ein membranständiges Protein ist, welches in aktiver Form aus *E. coli* Membranen gereinigt werden konnte. Bisher sind nur wenige intrazelluläre Phospholipasen und deren Funktionen identifiziert worden (Flores-Diaz *et al.*, 2016). Die Lokalisation in der inneren Membran könnte aber auch ein Artefakt sein, welches durch die Überexpression und dem daraus resultierenden Proteinüberschuss zu erklären ist. Dieses Phänomen wurde auch bei der Überexpression von LpPlaB in einem komplementierten *L. pneumophila* Corby Stamm beobachtet (Kuhle, 2014).

4.3 Biochemische Charakterisierung von PaPlaB

Basierend auf Sequenzhomologien und der Ähnlichkeit zu LpPlaB (Flieger *et al.*, 2004) wurde zunächst vermutet, dass PaPlaB der Klasse der Phospholipasen A zuzuordnen ist. Die Testung verschiedener (Lyso-) Phospholipasen ergab, dass PaPlaB Phospholipaseaktivität hat und

bevorzugt mittel- und langkettige Fettsäureketten, unabhängig der Kopfgruppe, hydrolysiert (Abb. 3.9). 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC12) ist das bevorzugte Substrat von PaPlaB dessen Hydrolyse die höchste Aktivität erreichte. Lungensurfactants bestehen hauptsächlich aus PC, dies stellt einen Angriffspunkt wie schon für LpPlaB beschrieben dar und ist gleichzeitig das dominanteste Lipid des *outer leaflets* von Eukaryoten (Flieger *et al.*, 2000; Devaux & Morris, 2004). Dies würde für PaPlaB Sinn ergeben, wenn davon ausgegangen wird, dass die Lokalisation in der inneren Membran ein Artefakt darstellt, ansonsten müsste die Frage geklärt werden, wie PaPlaB das Substrat erreichen kann. Aufgrund der in Kapitel 4.1 bereits beschriebenen ähnlichen Deckelstruktur der beiden Proteine lag die Vermutung nahe, dass beide ein paralleles Substratspektrum aufweisen. Das 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (PE14) wurde ebenfalls bevorzugt hydrolysiert. Phosphatidylethanolamin ist das dominanteste Phospholipid in Pseudomonaden (Murzyn *et al.*, 2005; Kondakova *et al.*, 2015), mit verantwortlich für die Bewegung und Chemotaxis. Die Deletion der beiden Gene *pss* (kodiert für Phosphatidylserin Synthase) und *psd* (kodiert für Phosphatidylserin Decarboxylase), welche beide an der Synthese von PE beteiligt sind, führt zu einer verminderten PE-Menge in der Zelle und eine reduzierten Beweglichkeit (Shi *et al.*, 1993) und bildet einen Vorläufer für Lipopolysaccharide (Raetz *et al.*, 2007). Die Fragestellung, ob *P. aeruginosa* Δ *plaB* in seiner Motilität beeinträchtigt ist und somit schwerer neue Nährstoffquellen erreichen kann, stellt einen Ansatzpunkt für zukünftige Analysen dar. PE ist hauptsächlich in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert und wird durch eine Lipid Flippase zur äußeren Membran transportiert, welches für Glycerophospholipide nicht ungewöhnlich ist, um neue Membranen aufzubauen (Sanyal & Menon, 2009). Es ist jedoch schwer zu beurteilen, ob die Phospholipasen einen Effekt auf die eigenen oder Wirts-Phospholipide haben. Bis *dato* sind nur wenige intrazelluläre Phospholipasen und deren Funktion bekannt (Flores-Diaz *et al.*, 2016).

Eine Präferenz, Fettsäuren an der sn1 oder sn2-Position zu hydrolysieren, konnte durch GC-MS-Analysen nicht gezeigt werden (Tab. 3.2). Daraus resultierend wurde PaPlaB der Klasse der Phospholipasen B zugeordnet (Sitkiewicz *et al.*, 2007). Zudem zeigte PaPlaB ebenso wie LpPlaB LysoPLA-Aktivität (Flieger *et al.*, 2004). Das passt zu Literaturberichten, dass Phospholipasen B auch LysoPLA-Aktivität haben und eine Akkumulation von toxischen Lysophospholipiden somit verhindert wird (Lee *et al.*, 1994). Die LysoPLA-Aktivität kann jedoch durch Glycerophosphocholin/ethanolamin kompetitiv gehemmt werden, um den Abbau der Lipide in der Membran zu minimieren (Fallbrook *et al.*, 1999).

Durch SEC-Analysen konnte das Molekulargewicht des monomeren PaPlaB mit 50 kDa bestätigt werden (Abb. 3.14). Dies deutete gleichzeitig darauf hin, dass das Protein nicht an eine große Menge Detergens gebunden war. Unterstützend zu den SEC-Analysen wurden MALS-Analysen angewendet, welche im Vergleich zur SEC-Analyse weniger Fehler anfällig sind. MALS-Analysen bestätigten die Bildung großer Oligomere (Daten nicht gezeigt). PaPlaB ist bis zu einer Temperatur von 42 °C stabil und enzymatisch aktiv (Abb. 3.15). Mit steigender Temperatur sank die enzymatische Aktivität gegen Null. Für mesophile Bakterien, zu denen auch *P. aeruginosa* PA01 gehört, war dies zu erwarten (Cesarini *et al.*, 2012). Dieses Ergebnis wurde mit der Untersuchung der strukturellen Veränderung des Proteins unter Verwendung der *nano differential scanning fluorimetry* (Abb. 3.15) bestätigt. Die ermittelte Schmelztemperatur lag bei 53 °C. Das Erwärmen kann bereits zu strukturellen Änderungen des Proteins führen, wenn diese dann im Bereich des aktiven Zentrums oder dem Bereich der Substratbindung stattfinden, kommt es zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Jedoch kann eine höhere Temperatur notwendig sein, damit 50 % des Proteins entfaltet vorliegen.

Um den Katalysemechanismus von PaPlaB zu untersuchen, wurden verschiedene α/β -Hydrolasinhhibitoren verwendet. Als effektivster Inhibitor von PaPlaB konnte Paraoxon identifiziert werden. Die Inkubation mit Paraoxon führte zum vollständigen Verlust der Aktivität von PaPlaB (Abb. 3.16), dies spricht für die Vermutung, dass PaPlaB zu den Serinproteasen gehört (Crow *et al.*, 2012). Interessanterweise wurde die Aktivität durch PMFS nicht inhibiert. PMSF inhibiert durch Sulfonierung der Hydroxygruppe des aktiven Serins ebenfalls die Aktivität von Serinproteasen (Fahrney & Gold, 1963). Die Aktivität von PMSF ist abhängig von der Temperatur als auch dem pH-Wert und PMSF besitzt mit ca. 55 min eine recht kurze Halbwertszeit. Dies könnte erklären, warum PMSF nicht als Inhibitor unter den hier getesteten Bedingungen geeignet war (James, 1978). Durch EDTA wurde die Aktivität ebenfalls nicht beeinträchtigt, weshalb ausgeschlossen werden konnte, dass PaPlaB zu den Metalloenzymen gehört (Borkar *et al.*, 2009). Nach Inkubation mit THL wurde keine komplette Inhibierung der Aktivität von PaPlaB nachgewiesen. In der Literatur ist beschrieben, dass THL die Aktivität von Phospholipasen nicht signifikant beeinträchtigt (Ballinger & Peikin, 2002). Aufgrund des beobachteten inhibitorischen Effekts des Serinhydrolaseinhibitors Paraoxon wurde eine inaktive PaPlaB Variante, bei der das aktive Serin (Ser79) durch Alanin ausgetauscht wurde, erstellt. Nach Expression dieser Variante zeigten die Zellen keine PLA-Aktivität (Abb. 3.17). Zusätzlich wurden die Aminosäuren Asp196 und His244 ebenfalls durch Alanin ersetzt und gezeigt, dass diese Aminosäuren zusammen mit Ser79 essenziell für die Aktivität von PaPlaB sind (Abb. 3.17). Diese beiden Ergebnisse bestätigten die

durch bioinformatische Analysen (Abb. 3.1) vorhergesagten katalytische Triade von PaPlaB. Für eine detaillierte strukturelle Aufklärung von PaPlaB ist es in Zukunft essenziell die Kristallstruktur von PaPlaB zu lösen. Mit Hilfe dieser Struktur könnte der Wirkmechanismus des Enzyms, weitere funktionell wichtige Aminosäuren als auch das Dimerisierungsmotiv analysiert und verstanden werden. Zusätzlich würde die Struktur einen direkten Vergleich mit dem homologen Protein LpPlaB ermöglichen. Für LpPlaB wurde gezeigt, dass acht NAD(H)-Moleküle das Tetramer stabilisieren und die Aktivität des Enzyms inhibieren. Dieser Mechanismus könnte eine schützende Funktion für das Bakterium selbst haben, um z.B. nicht die eigenen Phospholipide zu zerstören (Michel, 2020; Andersen & von Meyenburg, 1977). Diese Erkenntnisse bilden einen interessanten Ansatz für weitere biochemische Charakterisierungen von PaPlaB-Oligomeren und der Funktion von NAD(H) als möglicher Regulator der Dimerisierung.

4.4 PaPlaB ist ein Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand nicht nur die biochemische Charakterisierung der Phospholipase B PaPlaB, sondern vor allem, Einblicke in die physiologische Bedeutung des Proteins zu gewinnen. PaPlaB hydrolysiert nicht nur endogene Phospholipide, welche aus *P. aeruginosa* PA01 isoliert wurden (Abb. 3.10), sondern besitzt auch ein großes Substratspektrum (Abb. 3.9). Basierend auf diesen Fähigkeiten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass PaPlaB einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung in der Membran und deren Fluidität hat und diese gegebenenfalls umgestalten kann. Dies wurde bereits für eine wasserlösliche Phospholipase A₂ beschrieben, deren Spaltprodukte die lokalen Membraneigenschaften verändern (Jakobsen *et al.*, 2005). In einem stetigen Prozess werden Membranlipide auf- und abgebaut (*lipid turnover*), jedoch bleibt die Lipidzusammensetzung immer konstant. Um dies zu gewährleisten sind die drei Prozesse des Lipidaufbaus- Abbaus und der Transport enorm wichtig. Die genaue Regulation ist nicht bekannt, jedoch müssen Enzyme wie den Phospholipasen korrekt reguliert sein, damit kein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau herrscht. Es konnte gezeigt werden, dass sogenannte A-Typ Phospholipasen überschüssig produzierte Phospholipide abbauen, um die Membranlipid-Homöostase aufrechtzuerhalten (Sommerharju *et al.*, 2009). Die Membranfluidität wird durch Umweltstressoren herabgesetzt, wodurch die *cis-trans* Isomerase (Cti) in die Membran eindringen kann. In der Membran erreicht sie ihr bevorzugtes Substrat, die *cis*-Doppelbindungen von Fettsäuren. Cti katalysiert die Isomerisierung von *cis*- zu *trans* ungesättigten Fettsäuren (Eberlein *et al.*, 2018). Im Allgemeinen ist bekannt, dass Phospholipasen im Lipidstoffwechsel beteiligt sind und somit die Zusammensetzung der Membranen verändern (Jakobsen *et al.*, 2005). Dies würde

wiederum Lipid-Protein Interaktionen beeinflussen (McMahon & Gallop, 2005; Vijayaraj *et al.*, 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die erhöhte Aktivität von OMPLA (*outer membrane phospholipase A*) aus *E. coli* zu einer verminderten Integrität der Zellwand führt (Snijder & Dijkstra, 2000). Eine erhöhte Phospholipaseaktivität führt zu einem erhöhten Level an Lysophospholipiden und freien Fettsäuren. Diese sind dann wiederum Substrate für die *cis-trans* Isomerase. Dieses Enzym isomerisiert *cis*-Fettsäuren in die *trans*-Konformation. *Trans*-Fettsäuren in Phospholipiden setzten die Membranfluidität und Permeabilität herunter (Snijder & Dijkstra, 2000).

Einen Hinweis, ob und welchen Einfluss PaPlaB auf die Lipidzusammensetzung hat, könnten Lipidomstudien liefern, bei denen die Lipidome von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ *plaB* Membranen miteinander verglichen werden. PaPlaB als Phospholipase B ist maßgeblich an der Freisetzung von Fettsäuren beteiligt, aufgrund dessen vermutet werden kann, dass PaPlaB einen Einfluss auf die Fettsäuresynthese und β -Oxidation hat. Beide Prozesse müssen nach Verfügbarkeit der Fettsäuren an bzw. aus geschaltet werden können, um die Membranlipid-Homöostase aufrechtzuerhalten (Fujita *et al.*, 2007). Für gereinigtes PaPlaB konnte eine geringere Thioesteraseaktivität als Phospholipaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Der Deletionsstamm wies jedoch keine reduzierte Thioesteraseaktivität auf (Abb. 8.5). Wahrscheinlich wird der geringe Verlust der Thioesteraseaktivität, verursacht durch PaPlaB, durch andere Thioesterasen aus *P. aeruginosa* kompensiert. Auch für PlaF, eine weitere Phospholipase aus *P. aeruginosa* konnte Thioesteraseaktivität nachgewiesen werden (Kovačić, 2010). Dazu zeigten auch TesA, eine periplasmatische Lysophospholipase (Kovačić *et al.*, 2013) und PqsE Thioesteraseaktivität. PqsE ist im Biosyntheseweg von Alkylquinolon Signalmolekülen beteiligt (Drees & Fetzner, 2015). Weitere Beispiele sind die zwei putativen Thioesterasen PA2801 und PA5202.

Nach der erfolgreichen Gendeletion von *paplaB* aus dem Genom von *P. aeruginosa* (Abb. 3.18), konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre PLA-Aktivität von *P. aeruginosa* Δ *plaB* um 35 % reduziert war (Abb. 3.19). Phänotypisch unterscheidet sich *P. aeruginosa* Δ *plaB* von dem Wildtyp *P. aeruginosa* PA01. Zunächst konnte dies, während der Flüssigkultivierung beobachtet werden (Abb. 3.20). *P. aeruginosa* Δ *plaB* zeigte ein verlangsamtes Wachstum während der logarithmischen Wachstumsphase besonders bei niedrigen Temperaturen. Des Weiteren konnte eine geringere Pyoverdinmenge in den Kulturüberständen der Deletionsmutante gemessen werden (Abb. 3.29), weshalb die Kulturen eine deutlich schwächere grüne Färbung aufwiesen. Zudem führt die Deletion der Phospholipase zu einer verringerten Biofilmproduktion unter statischen Bedingungen (Abb. 3.21). Im *G. mellonella*-Virulenzversuch konnte gezeigt werden,

dass der Stamm weniger virulent ist (Abb. 3.23) und PaPlaB einen neuen Virulenzfaktor in *P. aeruginosa* darstellt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Phänotypen kann davon ausgegangen werden, dass PaPlaB eine wichtige Funktion in *P. aeruginosa* hat. Es muss berücksichtigt werden, dass mit Hilfe des Virulenzversuches nicht zu klären ist, ob die verminderte Virulenz ausschließlich auf die Abwesenheit von PaPlaB zurück zu führen ist oder auf die verminderte Fitness des Deletionsstammes, wie es auch bei Deletionen von ArcAB und TolC in *Enterobacter cloacea* beobachtet wurde (Pérez *et al.*, 2012). Des Weiteren können auch Antibiotikaresistenzen die Fitness und Virulenz beeinflussen wie am Beispiel von *Salmonella typhimurium* gezeigt (Abdelraouf *et al.*, 2011). Um zu testen, ob die Aktivität oder die reine Abwesenheit von PaPlaB einen Einfluss auf die Virulenz hat, wäre es möglich, einen *P. aeruginosa* Stamm mit einer inaktiven PaPlaB Variante zu testen. Dies könnte mit einer genomischen Komplementation von *P. aeruginosa* Δ plaB mit *paplaB* und einer inaktiven *paplaBS79A* Variante erfolgen.

Wie bereits erwähnt, ist die Pyoverdinproduktion in *P. aeruginosa* Δ plaB beeinträchtigt (Abb. 3.29). Der sekretierte Siderophor (Eisenträger) ist zusammen mit dem Eisenaufnahmeregulator Fur verantwortlich für den Eisenhaushalt in der Zelle (Neilands, 1981; Ringel & Brüser, 2018). Pyoverdine spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Komplexierung von Fe³⁺-Ionen, sondern sie fungieren auch als Signalmoleküle (Meyer & Abdallah, 1978; Lamont *et al.*, 2002). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein Pyoverdin-defizienter *P. aeruginosa* Stamm in der Maus nicht mehr virulent war und Pyoverdin die Produktion von wenigstens drei Virulenzfaktoren reguliert, weshalb Pyoverdine zu den Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* gehören (Takase *et al.*, 2000; Lamont *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 1996). Die globale Proteomstudie zeigten, dass mit Ausnahme von PvdL alle anderen identifizierten Proteine (Abb. 3.28) niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ plaB waren. Daraus resultiert eine verminderten Pyoverdinproduktion, aber auch Sekretion. Erstaunlich ist, dass lediglich PvdL hoch abundant vorliegt, welches als Startpunkt den Zusammenbau des Ferribaktins startet, indem L-Glu, D-Tyr und L-Dab angefügt werden (Visca *et al.*, 2007). Eventuell ist PvdL in der Lage mit anderen NRPs der Pyoverdinsynthese das Ferribaktin aufzubauen (Mossialos *et al.*, 2002). Um dies nachzuweisen wäre ein Vergleich der Ferribaktinkonzentration von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ plaB denkbar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass äußere Einflüsse wie dem pH-Wert, die Eisenmenge und Konkurrenz zwischen Bakterien nicht nur den Aufenthalt in der Lunge beeinflussen, sondern auch das PQS-System und die Pyoverdinproduktion (Palmer *et al.*, 2005). So wird die Pyoverdinproduktion herabgesetzt, wenn die Eisenkonzentration zunimmt (Butaitè *et al.*, 2018). Wenn die Zellen also nicht unter eisenlimitierten Bedingungen kultiviert werden, besteht keine Notwendigkeit in der

Hochregulierung der pyoverdinassoziierten Gene (Jankiewicz, 2006). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die verringerte Pyoverdinproduktion von *P. aeruginosa* Δ *pIaB* eine Folge der Gendeletion ist, da beide Stämme unter denselben Bedingungen in LB-Medium mit wenig Eisen kultiviert wurden. Aufgrund der Vielzahl an bekannten Regulationsfaktoren der Pyoverdinsynthese in *P. aeruginosa* (Ravel & Cornelis, 2003; Lamont & Martin, 2003) sind verschiedene Auswirkungen der *papIaB*-Deletion auf diesen Prozess denkbar. Mit Hilfe der Proteomdaten kann nicht ausgeschlossen werden, dass PaPlaB primär einen Regulator wie z.B. Fur reguliert und daraus dann sekundär die Einflüsse auf beispielsweise die Pyoverdinsynthese entstehen. Der Regulator RpoS war hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *pIaB* und es konnte bereits gezeigt werden, dass RpoS auch PaPlaB reguliert (Schuster *et al.*, 2004). Somit ist es auch möglich, dass die Deletion von *papIaB* auch einen Einfluss auf RpoS regulierte Proteine hat, weshalb nicht eindeutig bestimmt werden kann, ob PaPlaB wirklich einen direkten Einfluss auf die regulatorischen Netzwerke hat oder ob es sich hierbei um indirekte, sekundäre durch andere Regulatoren (RpoS) verursachte Einflüsse handelt.

In Bakterien sind funktionelle Membranmikrodomänen (FMM), in Anlehnung an die *lipid rafts* aus Eukaryoten, bekannt, welche an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind. Dazu gehören die Signaltransduktion (López & Kolter, 2010; Schneider *et al.*, 2015), die Regulation des Metabolismus und der Membrantransport (Donovan & Bramkamp, 2009; Bach & Bramkamp, 2013). FMMs bestehen aus einer bestimmten Lipid-Proteinzusammensetzung aus Polyisoprenoiden wie den Hopanoiden und Carotinoiden (Lopez & Koch, 2017; Fleitas Martínez *et al.*, 2019). Hopanoide sind sehr wichtig für die Membranintegrität und Anpassung an Stressbedingungen. Beide Moleküle besitzen eine hydrophobere Struktur als Phospholipide und verleihen der Membran Stabilität (Bramkamp & Lopez, 2015; Sohlenkamp & Geiger, 2016). Diese kolokalisieren mit Flotilin-ähnlichen Proteinen. Diese dienen als Proteingerüst bei der Rekrutierung für Proteine, die in den FMMs lokalisiert sein müssen. Dies ermöglicht z.B. deren Oligomerisierung und Aktivierung (Bramkamp & Lopez, 2015). Möglich ist, dass die Deletion von *papIaB* zu einer Umgestaltung der Membran führt oder diese aktiv beeinflusst, weshalb keine funktionellen Mikrodomänen mehr vorhanden sind. Dies hätte dann auch einen Einfluss auf die im Zytoplasma startende Membranverankerung der NRPs (PvdLIJD) für die Pyoverdinproduktion und Lipid- Signalwege.

Biofilme entstehen, wenn eine Vielzahl an Bakterien an einer Oberfläche anheften. Dieses Phänomen stellt gerade in der Medizin ein Problem dar, wenn die Biofilme auf medizinischen Geräten oder in Patienten mit chronischer Lungenentzündung wachsen (Petrova & Sauer, 2009).

Innerhalb der ersten 72 h zeigte *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ eine signifikant reduzierte Biofilmbildung (Abb. 3.21). Innerhalb der ersten acht Stunden findet die initiale Anheftung der Zellen, welche zunächst um die eigene Achse rotieren, statt (Sauer *et al.*, 2002). Diese Rotation ist Flagellum-abhängig, welche durch c-di-GMP inhibiert wird und gleichzeitig führt ein erhöhtes Level an c-di-GMP zur erhöhten Produktion von Exopolysacchariden (Laventie *et al.*, 2019). Zwischen 24 und 48 h heften sich die Zellen irreversibel an die Oberfläche in dem sie extrazelluläre polymere Substanzen sekretieren, bilden Cluster und das Las-System wird aktiviert (Sauer *et al.*, 2002; Petrova & Sauer, 2009; Renner & Weibel, 2011). Nach drei Tagen wird das Rhl-System aktiviert und als erster Schritt der Reifung (Maturation-I) bezeichnet. Hierbei wird die Aktivität des Reportergens *rhlA* als Beginn bezeichnet (Sauer *et al.*, 2002). Unter dynamischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass zu diesem Zeitpunkt der Biofilm eine Dicke von ca. 10 μm hat (Sauer *et al.*, 2002). Für den Wildtyp konnte das in dieser Studie ebenfalls beobachtet werden (Tab. 3.3). Die Dispersion des Biofilms findet im letzten Stadium nach neun Tagen statt (Figure 1.2). Zu diesem Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen mehr nachgewiesen werden. Auf Basis der Kristallviolett-Färbung scheint PaPlaB die Reifung des Biofilms direkt oder indirekt zu beeinflussen, insbesondere die irreversible Anheftung der Zellen an die Oberfläche innerhalb der ersten 24 h. Unter dynamischen Bedingungen konnte jedoch kein Unterschied zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen werden. In CLSM-Analysen konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ nach 72 h einen dünneren Biofilm produziert als der Wildtyp (Tab. 3.3), jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Aus der Literatur ist bekannt, dass Pyoverdine-defiziente Stämme bzw. Stämme, die in ihrer Eisenaufnahme beeinträchtigt sind, einen dünneren Biofilm bilden (Banin *et al.*, 2005). Mit Hilfe der CLSM-Analysen unter dynamischen Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmbildung gezeigt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass im Verlauf der Biofilmentwicklung eine Vielzahl an Proteinen unterschiedlich reguliert werden (Sauer *et al.*, 2002). Innerhalb dieser Studie konnte durch Vergleich der Proteome von Wildtyp und Deletionsmutante einige PaPlaB-beeinflusste Proteine identifiziert werden, für die eine Mitwirkung bei der Biofilmbildung beschrieben wurde. PA4781 ist eine zyklische-di-GMP (c-di-GMP) Phosphodiesterase, welche hoch abundant in *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ ist. Der sekundäre Messenger c-di-GMP ist massiv als Signalmolekül an der Ausbildung und Reifung von Biofilmen beteiligt (Valentini & Filloux, 2016), dementsprechend führte die Deletion dieses Proteins beispielsweise zu einem wenig heterogenen Biofilm und zu einer verminderten Virulenz in *G. mellonella* (Ryan *et al.*, 2009). Die Hochregulierung (3,8-fach) des c-di-GMP degradierenden Enzyms PA4781 könnte zu einer Akkumulation des Signalmoleküls zum falschen Zeitpunkt des Biofilmzyklus, d.h. in seiner Frühphase führen und den geordneten

Aufbau hemmen. Bei der Auswertung der Kristallviolett-Färbung ist zu berücksichtigen, dass nicht nur die Biofilmbildung betrachtet wird, sondern auch die Stärke der Zellbindung an der Oberfläche als auch alle Art von Material, das an die Oberfläche heftet, gefärbt wird (Merritt *et al.*, 2005). Durch das Entfernen der planktonischen Zellen werden auch schwach an die Oberfläche gebundene Zellen entfernt, woraus eine schwächere Färbung entsteht. Das flagellare-Cap Protein FliD (PA1094), welches direkt in die Mucin Anheftung involviert ist (Arora *et al.*, 1998), wurde als schwach abundantes Protein in der Proteomstudie identifiziert. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die Zellen des Deletionsstammes *P. aeruginosa* Δ *pilA* schlechter an die Oberfläche binden können. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die vergleichende Analyse der Proteomprofile hier von Zellen erfolgt ist, die unter planktonischen Bedingungen kultiviert wurden. Dementsprechend sollten die Hinweise auf den PaPlaB Einfluss auf die Biofilmbildung auf Proteomebene mit unter statischen Biofilmbedingungen gewachsenen Zellen überprüft werden.

Möglich ist, dass aufgrund der hohen Abundanz von Proteinen, die an Aminosäureabbauwegen beteiligt sind, es zu einer erhöhten Synthese dieser kommt. Dies führt wiederum zu einer ungewünschten Akkumulation in der Zelle (Zampieri *et al.*, 2019). Dies wiederum würde für die Zelle bedeuten, dass diese Aminosäuren abgebaut oder sekretiert werden müssen. Gerade die Sekretion könnte ein limitierender Faktor aufgrund geringer Kapazität sein. Mit Hilfe einer Metabolom-Analyse könnte spezifischer getestet werden, welche Metabolite durch die Deletion von *paplaB* beeinflusst sind und in welchen Konzentrationen diese vorliegen. Es ist wahrscheinlich, dass die Deletion von *paplaB* einen indirekten Einfluss auf das Proteom und Regulationsnetzwerke hat (z.B. Aminosäureabbauwege), aufgrund dessen das Wachstum von *P. aeruginosa* Δ *pilA* verlangsamt ist. Die integrale Phospholipase A PldA, welche in der äußeren Membran lokalisiert ist und das Mla-System fungieren zusammen, um den Abbau von fehllokalisierten Phospholipiden zu gewährleisten. Dadurch das PldA sekundäre Botenstoffe generiert, ist es am *lipid-signaling* und der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase beteiligt (May & Silhavy, 2018).

Oxidativer Stress unter aeroben Konditionen führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2). H_2O_2 führt zu einer Hochregulierung der Isopropylmalate-Synthase LeuA (3,3-fach) wie es nicht nur bei *Neisseria gonorrhoeae* sondern auch bei *P. aeruginosa* (*leuA* Expressionsprofil, *Pseudomonas*-Datenbank) beobachtet werden konnte (Stohl *et al.*, 2005). Durch H_2O_2 sind ebenfalls Fur-regulierte Gene beeinflusst, welche wiederum den Eisenhaushalt in der Zelle beeinträchtigen (Stohl *et al.*, 2005). Es scheint eine Koregulation zwischen PaPlaB und LeuA zu geben. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Gens *pa2449*, welches für die Pyocyaninbiosynthese wichtig ist, zu einer Runterregulierung von *paplaB*

und Hochregulierung von *leuA* führte (Lundgren *et al.*, 2013). Zudem ist Leucin ein Vorläufer für den *diffusible signalling factor* cis-11-methyl-dodecansäure in *Burkholderia cepacia* und die Zugabe von Leucin erhöhte die *diffusible signalling factor*-Synthese (Zhou *et al.*, 2017). Expressionsstudien in *E. coli* zeigten, dass verzweigt-kettige Aminosäuren durch die Proteinüberproduktion runterreguliert werden, wodurch die Theorie gestärkt wird, dass es eine Wechselwirkung zwischen LeuA und PaPlaB gibt (Oh & Liao, 2000).

Für eine weitere, detaillierte Aufklärung der Funktion von PaPlaB ist es sehr interessant zu untersuchen, ob PaPlaB *per se* einen physiologischen Einfluss hat oder ob die Aktivität der ausschlaggebende Punkt ist. Für die Aufklärung dieser Fragestellung könnte die Generierung eines *P. aeruginosa* Stammes mit einer inaktiven PaPlaB Variante von Nutzen sein. PaPlaB ist kein für das Überleben von *P. aeruginosa* notwendiges Protein, jedoch kann aufgrund der beeinträchtigten Biofilmbildung und der Tatsache, dass *P. aeruginosa* Δ *plaB* im Virulenzversuch weniger virulent war, PaPlaB als neuer Virulenzfaktor angesehen werden. Proteomstudien unter Biofilmbedingungen können die Frage klären, welche biofilmassoziierten Regulationsnetzwerke durch die Deletion von *paplaB* beeinflusst werden. Das PaPlaB einen Einfluss auf zahlreiche Aminosäuren hat, wäre es sehr interessant, das Metabolom zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

P. aeruginosa steht wegen seiner humanpathogenen Eigenschaften und der Fähigkeit, leicht Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika zu entwickeln, im Fokus der Wissenschaft. Die Pathogenität des Bakteriums beruht hauptsächlich auf der Produktion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren und seiner hohen physiologischen Anpassungsfähigkeit. Phospholipasen im Allgemeinen sind an der Kontrolle der Membranzusammensetzung und -Synthese beteiligt. Sekundäre Botenstoffe, die durch die Hydrolyse von Phospholipiden freigesetzt werden, sind an Entzündungsreaktionen beteiligt. Dementsprechend könnte eine Hemmung der Phospholipase-Aktivität helfen, bakterielle Infektionen einzudämmen. Trotz der bekannten wichtigen Rolle solcher Enzyme bei Infektionen sind viele putative Phospholipasen von *P. aeruginosa* noch völlig unbekannt bzw. nicht charakterisiert. Das Ziel dieser Arbeit war die detaillierte biochemische und physiologische Charakterisierung von PA2927, einer putativen Phospholipase, anhand von Sequenzhomologie-Studien.

Es wurde bestätigt, dass das Gen *pa2927* für die Phospholipase PaPlaB, ein Mitglied der Serinhydrolase-Familie, kodiert. Um ausreichende Mengen an aktivem Protein für die biochemische Charakterisierung zu erhalten, wurde erstmals die heterologe Expression in *E. coli* C43(DE3) eingesetzt und damit die komplexen regulatorischen Prozesse in *P. aeruginosa* selbst umgangen. Biochemische Analysen des gereinigten Proteins zeigten, dass PaPlaB bis zu 42 °C stabil und enzymatisch aktiv ist. So gelang es, PaPlaB der Klasse der Phospholipasen B zuzuordnen und eine membranassoziierte Lokalisation des Proteins aufzudecken. Mittels Größenausschlusschromatographie und MALS wurde gezeigt, dass PaPlaB in mehreren Aggregationsformen vorliegt.

Die Konstruktion eines PaPlaB-defizienten *P. aeruginosa* Stammes ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der physiologischen Rolle von PaPlaB. Obwohl *P. aeruginosa* zahlreiche (putative) Phospholipase-kodierende Gene besitzt, wurde die Phospholipaseaktivität durch die alleinige Deletion von *paplaB* um 35 % reduziert. Die Deletionsmutante zeigte phänotypisch (I) ein verlangsamtes Wachstum während der logarithmischen Wachstumsphase, (II) eine verringerte Biofilmbildung und (III) eine um 50 % reduzierte Pyoverdinproduktion. Die Menge vieler Pvd-Proteine waren reduziert, aber PvdL zeigte sich in besonderem Maße beeinflusst. Globale Proteomstudien zeigten weitere bemerkenswerte pleiotrope Effekte der *paplaB*-Deletion auf *P. aeruginosa* Stoffwechselwege wie der Leucin-Biosynthese oder β -Oxidation. Darüber hinaus erwies sich der *P. aeruginosa* Δ *paplaB*-Stamm im *G. mellonella*-Virulenzmodell als weniger virulent als der Wildtyp.

Zusammenfassend zeigte diese Studie zum ersten Mal die bedeutende Funktion der Phospholipase B PaPlaB, innerhalb der regulatorischen Netzwerke von *P. aeruginosa* und stellt somit einen wichtigen Schritt zum Verständnis des Phospholipase-Netzwerks für die Physiologie dieses wichtigen Humanpathogens dar. Der hier gezeigte Beitrag zur Virulenz und Biofilmbildung legt nahe, dass dieses Enzym ein vielversprechendes Ziel für zukünftige Anti-Virulenz-Medikamente zur Bekämpfung von Infektionen mit antibiotikaresistenten *P. aeruginosa* ist.

6 Summary

P. aeruginosa is in the focus of science because of its human pathogenic properties and the ability to easily develop resistance to numerous antibiotics. The bacterium's pathogenicity relies mainly on the production a variety of virulence factors and its high physiological adaptability. Phospholipases in general are involved in the control of membrane composition and synthesis. Secondary messengers released by the hydrolysis of phospholipids are involved in inflammatory responses. Accordingly, inhibition of phospholipase activity could help to fight bacterial infections. Despite the known major role of such enzymes in infections, many putative phospholipases of *P. aeruginosa* are still completely uncharacterized. The aim of this work was the detailed biochemical and physiological characterization of PA2927, a putative phospholipase according to sequence homology studies.

It was confirmed that the *pa2927* gene encodes the phospholipase PaPlaB, a member of the serine hydrolase family. To obtain sufficient amounts of active protein for biochemical characterization, heterologous expression in *E. coli* C43(DE3) was used for the first time, thus avoiding the complex regulatory processes in *P. aeruginosa* itself. Biochemical analyses of the purified protein showed that PaPlaB is stable up to 42 °C and enzymatically active. This way, it succeeded to assign to the phospholipases B class and to reveal a membrane-associated localization of the protein. Using size exclusion chromatography and MALS, PaPlaB was shown to exist in multiple aggregation forms.

The construction of a *paplaB*-deficient *P. aeruginosa* strain allowed for a detailed investigation of the physiological role of PaPlaB. Although *P. aeruginosa* possesses numerous (putative) phospholipase encoding genes, phospholipase activity was reduced by 35% by the sole deletion of *paplaB*. The deletion mutant phenotypically exhibited (I) slowed growth during the logarithmic growth phase, (II) reduced biofilm formation, and (III) 50% reduced pyoverdine production. The levels of many Pvd proteins were reduced but PvdL levels showed to be particularly affected. Global proteomic analyses revealed further remarkable pleiotropic effects of *paplaB* deletion on *P. aeruginosa* metabolic pathways like leucine-biosynthesis or β -oxidation. In addition, the *P. aeruginosa* Δ *paplaB* strain was proven to be less virulent than the wild type in the *G. mellonella* virulence model.

Conclusively, this study showed for the first time the significant function of the phospholipase B PaPlaB, within the regulatory networks of *P. aeruginosa* and constitutes thus an important step towards the understanding of the phospholipase network on the physiology of this important human pathogen. Its contribution to virulence and biofilm formation revealed herein suggests this

enzyme to be promising target for future anti-virulence drugs to tackle infections of antibiotic-resistant *P. aeruginosa*.

7 Referenzen

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F. & Déziel, E. (2010).** Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1323-1336.
- Abdelraouf, K., Kabbara, S., Ledesma, K. R., Poole, K. & Tam, V. H. (2011).** Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1311-1317.
- Abrusci, P., McDowell, M. A., Lea, S. M. & Johnson, S. (2014).** Building a secreting nanomachine: A structural overview of the T3SS. *Curr Opin Struct Biol*, 25(100), 111-117.
- Aiello, D., Williams, J. D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N. P., Huang, J., Lory, S., Bowlin, T. L. & Moir, D. T. (2010).** Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(5), 1988-1999.
- Ailte, L., Lingelem, A. B. D., Kavaliauskiene, S., Bergan, J., Kvalvaag, A. S., Myrann, A.-G., Skotland, T. & Sandvig, K. (2016).** Addition of lysophospholipids with large head groups to cells inhibits Shiga toxin binding. *Sci Rep*, 6(1), 30336.
- Akiyama, Y. & Ito, K. (1985).** The SecY membrane component of the bacterial protein export machinery: Analysis by new electrophoretic methods for integral membrane proteins. *The EMBO Journal*, 4(12), 3351-3356.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. & Maier, R. M. (2000).** Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol*, 66(8), 3262-3268.
- Albelo, S. T. & Domenech, C. E. (1997).** Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 156(2), 271-274.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. (1995).** Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, 160(1), 63-67.
- Aloulou, A., Ali, Y. B., Bezzine, S., Gargouri, Y. & Gelb, M. H. (2012).** Phospholipases: An overview. *Methods Mol Biol*, 861, 63-85.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410.
- Amorim Franco, T. M. & Blanchard, J. S. (2017).** Bacterial branched-chain amino acid biosynthesis: Structures, mechanisms, and drugability. *Biochemistry*, 56(44), 5849-5865.
- Anantharajah, A., Mingeot-Leclercq, M. P. & Van Bambeke, F. (2016).** Targeting the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol Sci*, 37(9), 734-749.
- Andersen, K. B. & von Meyenburg, K. (1977).** Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 252(12), 4151-4156.
- Aragon, V., Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2002).** *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology*, 148(7), 2223-2231.
- Armstrong, S., Yates, S. P. & Merrill, A. R. (2002).** Insight into the catalytic mechanism of

- Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Studies of toxin interaction with eukaryotic elongation factor-2. *J Biol Chem*, 277(48), 46669-46675.
- Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. (1998).** The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun*, 66(3), 1000-1007.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K.-E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochem J*, 343 Pt 1, 177-183.
- Auer, G. K. & Weibel, D. B. (2017).** Bacterial cell mechanics. *Biochemistry*, 56(29), 3710-3724.
- Aurass, P., Pless, B., Rydzewski, K., Holland, G., Bannert, N. & Flieger, A. (2009).** *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(13), 4506-4515.
- Aurass, P., Schlegel, M., Metwally, O., Harding, C. R., Schroeder, G. N., Frankel, G. & Flieger, A. (2013).** The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *J Biol Chem*, 288(16), 11080-11092.
- Bach, J. N. & Bramkamp, M. (2013).** Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular Microbiology*, 88(6), 1205-1217.
- Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J. I. A., Givskov, M. & Hoiby, N. (2002).** Constitutive high expression of chromosomal -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(11), 3406-3411.
- Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J. M., Madoulet, C., Plotkowski, M. C., Chippaux, C. & Puchelle, E. (1994).** Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun*, 62(10), 4481-4487.
- Ball, C. A., Dolinski, K., Dwight, S. S., Harris, M. A., Issel-Tarver, L., et al. (2000).** Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 77-80.
- Ballinger, A. & Peikin, S. R. (2002).** Orlistat: Its current status as an anti-obesity drug. *European Journal of Pharmacology*, 440(2), 109-117.
- Ballok, A. E. & O'Toole, G. A. (2013).** Pouring salt on a wound: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors alter Na⁺ and Cl⁻ flux in the lung. *J Bacteriol*, 195(18), 4013-4019.
- Banerji, S., Aurass, P. & Flieger, A. (2008).** The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int J Med Microbiol*, 298(3-4), 169-181.
- Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N. P. & Flieger, A. (2005).** Characterization of the major secreted zinc metalloprotease-dependent glycerophospholipid: Cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 73(5), 2899-2909.
- Banerji, S. & Flieger, A. (2004).** Patatin-like proteins: A new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology*, 150(3), 522-525.
- Banin, E., Vasil, M. L. & Greenberg, E. P. (2005).** Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31), 11076-11081.
- Banno, Y., Yamada, T. & Nozawa, Y. (1985).** Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties.

Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology, 23(1), 47-54.

Barker, A. P., Vasil, A. I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P. J. & Vasil, M. L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol*, 53(4), 1089-1098.

Bauer, T. L., Buchholz, P. C. F. & Pleiss, J. (2020). The modular structure of α/β -hydrolases. *The FEBS Journal*, 287(5), 1035-1053.

Belyy, A., Raoux-Barbot, D., Saveanu, C., Namane, A., Ogryzko, V., et al. (2016). Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. *Nature Communications*, 7(1), 13582.

Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H. & Khedher, M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)*, 69(4), 393-403.

Benamara, H., Rihouey, C., Abbes, I., Ben Mlouka, M. A., Hardouin, J., Jouenne, T. & Alexandre, S. (2014). Characterization of membrane lipidome changes in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm growth on glass wool. *PLoS One*, 9(9), e108478-e108478.

Bender, J., Rydzewski, K., Broich, M., Schunder, E., Heuner, K. & Flieger, A. (2009). Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: Protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *J Biol Chem*, 284(40), 27185-27194.

Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. & Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*, 6, 167.

Benz, R., Maier, E. & Gentschev, I. (1993). TolC of *Escherichia coli* functions as an outer

membrane channel. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 278(2), 187-196.

Berger, J. (2018). Phospholipase PlaB of *Pseudomonas aeruginosa*: Expression and purification from membranes. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Masterarbeit.

Berk, R. S., Brown, D., Coutinho, I. & Meyers, D. J. (1987). *In vivo* studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 55(7), 1728-1730.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 235-242.

Berthelot, P., Attree, I., Plésiat, P., Chabert, J., de Bentzmann, S., Pozzetto, B. & Grattard, F. (2003). Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: Evidence for a possible association between O serotypes and *exo* genes. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(4), 512-518.

Bielecki, P., Puchałka, J., Wos-Oxley, M. L., Loessner, H., Glik, J., et al. (2011). *In-vivo* expression profiling of *Pseudomonas aeruginosa* infections reveals niche-specific and strain-independent transcriptional programs. *PLoS One*, 6(9), e24235.

Bingle, L. E. H., Bailey, C. M. & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: A beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 3-8.

Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*, 121(s136), 1-58.

Bleffert, F., Granzin, J., Caliskan, M., Schott-Verdugo, S. N., Siebert, M., et al. (under revision). Structural and mechanistic insights into phospholipase A-mediated membrane phospholipid degradation associated with bacterial virulence.

- Blevins, S. M. & Bronze, M. S. (2010).** Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(9), e744-e751.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 5(2), 279-313.
- Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R. & Khobragade, C. N. (2009).** Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Braz J Microbiol*, 40(2), 358-366.
- Bramkamp, M. & Lopez, D. (2015).** Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 79(1), 81-100.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. (2011).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- Brint, J. M. & Ohman, D. E. (1995).** 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(24), 7155-7163.
- Butaitė, E., Kramer, J., Wyder, S. & Kümmerli, R. (2018).** Environmental determinants of pyoverdine production, exploitation and competition in natural *Pseudomonas* communities. *Environ Microbiol*, 20(10), 3629-3642.
- Bystrova, O. V., Knirel, Y. A., Lindner, B., Kocharova, N. A., Kondakova, A. N., Zähringer, U. & Pier, G. B. (2006).** Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(1), 85-99.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q. & O'Toole, G. A. (2005).** Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187(21), 7351-7361.
- Cesarini, S., Bofill, C., Pastor, F. I. J., Reetz, M. T. & Diaz, P. (2012).** A thermostable variant of *P. aeruginosa* cold-adapted LipC obtained by rational design and saturation mutagenesis. *Process Biochemistry*, 47(12), 2064-2071.
- Cezard, C., Farvacques, N. & Sonnet, P. (2015).** Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr Med Chem*, 22(2), 165-186.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B. P. & Faure, K. (2009).** Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun*, 77(5), 2065-2075.
- Choi, K. H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2006).** A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods*, 64(3), 391-397.
- Cooper, G. M. (2000).** Cell membranes in the cell: A molecular approach. Chapter 2. Sinauer Associates (2nd ed.).
- Costaglioli, P., Barthe, C., Claverol, S., Brözel, V. S., Perrot, M., Crouzet, M., Bonneu, M., Garbay, B. & Vilain, S. (2012).** Evidence for the involvement of the anthranilate degradation pathway in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 326-339.
- Costerton, J. W., Geesey, G. & Cheng, K. J. (1978).** How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

- Coulthurst, S. (2019).** The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. *Microbiology*, 165(5), 503-515.
- Cross, A., Allen, J. R., Burke, J., Duce, G., Harris, A., et al. (1983).** Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: Review of recent trends. *Rev Infect Dis*, 5 Suppl 5, S837-845.
- Crousilles, A., Dolan, S. K., Brear, P., Chirgadze, D. Y. & Welch, M. (2018).** Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 293(37), 14260-14269.
- Crow, J. A., Bittles, V., Herring, K. L., Borazjani, A., Potter, P. M. & Ross, M. K. (2012).** Inhibition of recombinant human carboxylesterase 1 and 2 and monoacylglycerol lipase by chlorpyrifos oxon, paraoxon and methyl paraoxon. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258(1), 145-150.
- Cryz, S. J., Jr., Pitt, T. L., Fürer, E. & Germanier, R. (1984).** Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 44(2), 508-513.
- da Mata Madeira, P. V., Zouhir, S., Basso, P., Neves, D., Laubier, A., et al. (2016).** Structural basis of lipid targeting and destruction by the type V secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol*, 428(9, Part A), 1790-1803.
- Damron, F. H., Owings, J. P., Okkotsu, Y., Varga, J. J., Schurr, J. R., Goldberg, J. B., Schurr, M. J. & Yu, H. D. (2012).** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* regulon controlled by the sensor kinase KinB and sigma factor RpoN. *J Bacteriol*, 194(6), 1317-1330.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 185(3), 1027-1036.
- Davies, D. G. & Marques, C. N. H. (2009).** A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol*, 191(5), 1393-1403.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- de Beer, D., Stoodley, P. & Lewandowski, Z. (1994).** Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 44(5), 636-641.
- De Beer, D., Stoodley, P. & Lewandowski, Z. (1996).** Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Research*, 30(11), 2761-2765.
- de Bentzmann, S. & Plésiat, P. (2011).** The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol*, 13(7), 1655-1665.
- Deng, Y., Wu, J., Tao, F. & Zhang, L.-H. (2011).** Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev*, 111(1), 160-173.
- Dennis, E. A. (1983).** 9 Phospholipases. *The Enzymes*, 16, 307-353.
- Devaux, P. F. & Morris, R. (2004).** Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, 5(4), 241-246.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G. & Rahme, L. G. (2005).** The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: Multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhIRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular Microbiology*, 55(4), 998-1014.

- Diederer, B. M. W. (2008).** *Legionella spp.* and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, 56(1), 1-12.
- Dietrich, L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M. & Newman, D. K. (2006).** The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1308-1321.
- Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P. & Winzer, K. (2006).** The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 8(6), 1095-1104.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M. & Williams, P. (2003).** 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. *Molecular Microbiology*, 50(1), 29-43.
- Diwo, M., Michel, W., Aurass, P., Kuhle-Keindorf, K., Pippel, J., Krausze, J., Lang, C., Blankenfeldt, W. & Flieger, A. (2020).** NAD(H)-mediated tetramerization controls the activity of *Legionella pneumophila* phospholipase PlA_B. *bioRxiv*.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Donovan, C. & Bramkamp, M. (2009).** Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology (Reading)*, 155(Pt 6), 1786-1799.
- Drees, S. L. & Fetzner, S. (2015).** PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* acts as pathway-specific thioesterase in the biosynthesis of alkylquinolone signaling molecules. *Chemistry & Biology*, 22(5), 611-618.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J. & Barton, G. J. (2015).** JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W389-394.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L. & Zhu, G. (2013).** Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol*, 53(1), 1-8.
- Dunn, S. D. (1986).** 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(1), 144-153.
- Duoaiczyk, A., Boye, H. W. & Goodman, H. M. (1975).** Ligation of *EcoRI* endonuclease generated DNA fragment into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* (1976), 96, 171-184.
- Duong, F., Bonnet, E., Géli, V., Lazdunski, A., Murgier, M. & Filloux, A. (2001).** The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: A new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene*, 262(1), 147-153.
- Eberlein, C., Baumgarten, T., Starke, S. & Heipieper, H. J. (2018).** 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2583-2593.
- ECDC. (2018).** Healthcare-associated infections acquired in intensive care units in: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2016-HAI_0.pdf.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A. & Hanukoglu, I. (2009).** Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein

structure-function studies. *BMC Biotechnol*, 9, 61.

El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., et al. (2018). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D427-D432.

Ernst, R. K., Hajjar, A. M., Tsai, J. H., Moskowitz, S. M., Wilson, C. B. & Miller, S. I. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by toll-like receptor 4. *Journal of endotoxin research*, 9(6), 395-400.

Exton, J. H. (1997). New developments in phospholipase D. *J Biol Chem*, 272(25), 15579-15582.

Fahrney, D. E. & Gold, A. M. (1963). Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin and trypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 85(7), 997-1000.

Fallbrook, A., Turenne, S. D., Mamalias, N., Kish, S. J. & Ross, B. M. (1999). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolites may regulate brain phospholipid catabolism via inhibition of lysophospholipase activity. *Brain Research*, 834(1), 207-210.

Farinha, M. A., Conway, B. D., Glasier, L. M., Ellert, N. W., Irvin, R. T., Sherburne, R. & Paranchych, W. (1994). Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. *Infect Immun*, 62(10), 4118-4123.

Farrow, J. M., 3rd & Pesci, E. C. (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol*, 189(9), 3425-3433.

Filloux, A. (2009). The type VI secretion system: A tubular story. *The EMBO Journal*, 28(4), 309-310.

Filloux, A. (2011). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An essay on diversity, evolution, and function. *Front Microbiol*, 2, 155.

Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M. J., Wu, C., Mende-Mueller, L. & Frank, D. W. (1997). ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Molecular Microbiology*, 25(3), 547-557.

Fleitas Martínez, O., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M. & Franco, O. L. (2019). Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Front Cell Infect Microbiol*, 9, 74.

Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.

Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Deeg, M., Bartmann, P. & Neumeister, B. (2000). Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J Bacteriol*, 182(5), 1321-1327.

Flieger, A., Neumeister, B. & Cianciotto, N. P. (2002). Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect Immun*, 70(11), 6094-6106.

Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M. & Heuner, K. (2004). Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infect Immun*, 72(5), 2648-2658.

Flores-Diaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Giron, A. & Flieger, A. (2016). Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), 597-628.

- Folders, J., Algra, J., Roelofs, M. S., van Loon, L. C., Tommassen, J. & Bitter, W. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a gradually secreted protein. *J Bacteriol*, 183(24), 7044-7052.
- Fothergill, J. L., Winstanley, C. & James, C. E. (2012). Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(2), 219-235.
- Frank, L. H. & DeMoss, R. D. (1959). On the biosynthesis of pyocyanine. *J Bacteriol*, 77(6), 776-782.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., et al. (1977). Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*, 297(22), 1189-1197.
- Friedman, H., Yamamoto, Y. & Klein, T. W. (2002). *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 13(4), 273-279.
- Fujita, M., Tanaka, K., Takahashi, H. & Amemural, A. (1994). Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Molecular Microbiology*, 13(6), 1071-1077.
- Fujita, Y., Matsuoka, H. & Hirooka, K. (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 66(4), 829-839.
- Fuqua, C., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 439-468.
- Gabrielle, P., Jeana, M. & Lorenza, E.-C. (2003). Cytosolic choline acetyltransferase binds specifically to cholinergic plasma membrane of rat brain synaptosomes to generate membrane-bound enzyme. *Neurochemical Research*, 28(3), 543-549.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 184(23), 6472-6480.
- Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: Recent developments. *Molecular Microbiology*, 5(10), 2315-2321.
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2015). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D261-269.
- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol*, 173(9), 3000-3009.
- Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun*, 61(4), 1180-1184.
- García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., Ventura, S. & Villaverde, A. (2005). Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact*, 4, 27-27.
- Gastmeier, P., Geffers, C., Herrmann, M., Lemmen, S., Salzberger, B., Seifert, H. S., Kern, W. & Fätkenheuer, G. (2016). Nosokomiale Infektionen und Infektionen mit multiresistenten Erregern – Häufigkeit und Sterblichkeit. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 141, 421-426.
- Gdynia, A. (2006). Untersuchungen zur physiologischen Funktion der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Inaugural-Dissertation.

- Geertsma, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D.-J. & Poolman, B. (2008).** Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5722-5727.
- Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 67(3), 159-173.
- Ghannoum, M. A. (2000).** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 122-143.
- Ghisaidoobe, A. B. & Chung, S. J. (2014).** Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Forster resonance energy transfer techniques. *Int J Mol Sci*, 15(12), 22518-22538.
- Gilboa-Garber, N. (1982).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods in Enzymology*, 83, 378-385.
- Green, E. R. & Mecsas, J. (2016).** Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology spectrum*, 4(1).
- Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. K. & Vitanza-jack, V. B. (1974).** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*, 28(6), 987-991.
- Griffon, N., Jin, W., Petty, T. J., Millar, J., Badellino, K. O., et al. (2009).** Identification of the active form of endothelial lipase, a homodimer in a head-to-tail conformation. *J Biol Chem*, 284(35), 23322-23330.
- Grishin, A. V., Krivozubov, M. S., Karyagina, A. S. & Gintsburg, A. L. (2015).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta naturae*, 7(2), 29-41.
- Grube, L., Dellen, R., Kruse, F., Schwender, H., Stuhler, K. & Poschmann, G. (2018).** Mining the secretome of C2C12 muscle cells: Data dependent experimental approach to analyze protein secretion using label-free quantification and peptide based analysis. *J Proteome Res*, 17(2), 879-890.
- Guttenplan, S. B. & Kearns, D. B. (2013).** Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 849-871.
- Hadvary, P., Sidler, W., Meister, W., Vetter, W. & Wolfer, H. (1991).** The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *J Biol Chem*, 266(4), 2021-2027.
- Haiko, J. & Westerlund-Wikström, B. (2013).** The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242-1267.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hardalo, C. & Edberg, S. C. (1997).** *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(1), 47-75.
- Hartmann, R., Jeckel, H., Jelli, E., Singh, P. K., Vaidya, S., et al. (2019).** BiofilmQ, a software tool for quantitative image analysis of microbial biofilm communities. *bioRxiv*, 735423.
- Hauser, A. R. (2009).** The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 654-665.
- Hengge, R. (2009).** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7(4), 263-273.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of

foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 172(11), 6557-6567.

Hiller, M., Lang, C., Michel, W. & Flieger, A. (2018). Secreted phospholipases of the lung pathogen *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(1), 168-175.

Ho Sui, S. J., Lo, R., Fernandes, A. R., Caulfield, M. D. G., Lerman, J. A., Xie, L., Bourne, P. E., Baillie, D. L. & Brinkman, F. S. L. (2012). Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3), 246-251.

Hoang, T. T. & Schweizer, H. P. (1997). Identification and genetic characterization of the *Pseudomonas aeruginosa leuB* gene encoding 3-isopropylmalate dehydrogenase. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(2), 166-170.

Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography A*, 411, 177-184.

Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev*, 43(1), 73-102.

Holst, O. & Molinaro, A. (2010). Chapter 3 - Core region and lipid A components of lipopolysaccharides. *Microbial Glycobiology*, 29-55.

Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., et al. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host & Microbe*, 7(1), 25-37.

Hsu, B.-M., Chen, C.-H., Wan, M.-T. & Cheng, H.-W. (2006). *Legionella* prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. *Water Research*, 40(17), 3267-3273.

Huang, F., Subbaiah, P. V., Holian, O., Zhang, J., Johnson, A., Gertzberg, N. y. & Lum, H. (2005). Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: Role of PKC α and RhoA cross talk. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(2), L176-L185.

Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E. & Romeo, T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184(1), 290-301.

Jaeger, K.-E. (1994). Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors. *Immun Infekt*, 22(5), 177-180.

Jaeger, K.-E. & Kovačić, F. (2014). Determination of lipolytic enzyme activities. *Pseudomonas Methods and Protocols*, 111-134.

Jakobsen, A., Mouritsen, O. & Weiss, M. (2005). Close-up view of the modifications of fluid membranes due to phospholipase A2. *J. Phys.: Condens. Matter*, 17, S4015-4024.

James, G. T. (1978). Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical Biochemistry*, 86(2), 574-579.

Jankiewicz, U. (2006). Synthesis of siderophores by soil bacteria of the genus *Pseudomonas* under various culture condition. *Acta Sci. Pol., Agricultura* 5(2) 2006, 33-44.

Jenkins, G. M. & Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: A lipid centric review. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(19-20), 2305-2316.

Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G. & Jin, Q. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host & Microbe*, 15(5), 600-610.

- Kai, T., Tateda, K., Kimura, S., Ishii, Y., Ito, H., Yoshida, H., Kimura, T. & Yamaguchi, K. (2009).** A low concentration of azithromycin inhibits the mRNA expression of N-acyl homoserine lactone synthesis enzymes, upstream of *lasI* or *rhII*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 22(6), 483-486.
- Kang, Y., Nguyen, D. T., Son, M. S. & Hoang, T. T. (2008).** The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* β -oxidation operon. *Microbiology*, 154(6), 1584-1598.
- Kanonenberg, K., Royes, J., Kedrov, A., Poschmann, G., Angius, F., et al. (2019).** Shaping the lipid composition of bacterial membranes for membrane protein production. *Microb Cell Fact*, 18(1), 131.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. I. J. E. (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols*, 10(6), 845-858.
- Ketelboeter, L. M. (2016).** Protective effects of pigmentation in *Pseudomonas aeruginosa*: Insights on pyomelanin production and inhibition by Ntbc. University of Wisconsin Milwaukee. Inaugural-Dissertation.
- Kida, Y., Taira, J., Yamamoto, T., Higashimoto, Y. & Kuwano, K. (2013).** EprS, an autotransporter protein of *Pseudomonas aeruginosa*, possessing serine protease activity induces inflammatory responses through protease-activated receptors. *Cellular Microbiology*, 15(7), 1168-1181.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y. & Suh, S. W. (1997).** The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 5(2), 173-185.
- Kirisits, M. J. & Parsek, M. R. (2006).** Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cellular Microbiology*, 8(12), 1841-1849.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*, 48(6), 1511-1524.
- Klein, S., Lorenzo, C., Hoffmann, S., Walther, J. M., Storbeck, S., et al. (2009).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Molecular Microbiology*, 71(3), 551-565.
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2014).** Assessing *Pseudomonas* virulence with nonmammalian host: *Galleria mellonella*. *Methods Mol Biol*, 1149, 681-688.
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechère, J. C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*, 182(21), 5990-5996.
- Kondakova, T., D'Heygere, F., Feuilloley, M. J., Orange, N., Heipieper, H. J. & Duclairoir Poc, C. (2015).** Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*. *Chem Phys Lipids*, 190, 27-42.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. & Hol, W. G. (2012).** The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*, 10(5), 336-351.
- Kotarski, S. F. & Salyers, A. A. (1984).** Isolation and characterization of outer membranes of *Bacteroides thetaiotaomicron* grown on different carbohydrates. *J Bacteriol*, 158(1), 102-109.
- Kovačić, F. (2010).** Novel phospholipases A of *Pseudomonas aeruginosa*: Biochemical characterisation and cellular localisation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Inaugural-Dissertation.

- Kovačić, F., Bleffert, F., Caliskan, M., Wilhelm, S., Granzin, J., Batra-Safferling, R. & Jaeger, K. E. (2016).** A membrane-bound esterase PA2949 from *Pseudomonas aeruginosa* is expressed and purified from *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio*, 6(5), 484-493.
- Kovačić, F., Granzin, J., Wilhelm, S., Kojić-Prodić, B., Batra-Safferling, R. & Jaeger, K.-E. (2013).** Structural and functional characterisation of TesA - A novel lysophospholipase A from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 8(7), e69125.
- Kretzschmar, U., Khodaverdi, V. & Adrian, L. (2010).** Transcriptional regulation of the acetyl-CoA synthetase gene *acsA* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 192(8), 685-690.
- Kretzschmar, U., Schobert, M. & Görisch, H. (2001).** The *Pseudomonas aeruginosa acsA* gene, encoding an acetyl-CoA synthetase, is essential for growth on ethanol. *Microbiology*, 147(10), 2671-2677.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3), 567-580.
- Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B. E., Jeffries, J. L., Ohman, D. E. & Lau, G. W. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One*, 6(11), e27091-e27091.
- Kuchma, S. L., Griffin, E. F. & O'Toole, G. A. (2012).** Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J Bacteriol*, 194(19), 5388-5403.
- Kuhle, K. (2014).** Charakterisierung der zellassoziierten Phospholipase A PlaB aus *Legionella pneumophila*, das erste beschriebene Mitglied einer neuen Lipasefamilie. Technische Universität Carolo-
- Wilhelmina zu Braunschweig. Inaugural-Dissertation.
- Kuhle, K., Krausze, J., Curth, U., Rossle, M., Heuner, K., Lang, C. & Flieger, A. (2014).** Oligomerization inhibits *Legionella pneumophila* PlaB phospholipase A activity. *J Biol Chem*, 289(27), 18657-18666.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszin, C., Hühn, M., Kaendler, K., et al. (2007).** Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *The Journal of Immunology*, 179(5), 2979.
- Kwon, S.-K., Kim, S. K., Lee, D.-H. & Kim, J. F. (2015).** Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Sci Rep*, 5, 16076-16076.
- LaBauve, A. E. & Wargo, M. J. (2012).** Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, Chapter 6, Unit-6E.1.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 7072-7077.
- Lamont, I. L. & Martin, L. W. (2003).** Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 149(4), 833-842.
- Lang, C. & Flieger, A. (2011).** Characterisation of *Legionella pneumophila* phospholipases and their impact on host cells. *Eur J Cell Biol*, 90(11), 903-912.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** 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. *Molecular Microbiology*, 21(6), 1137-1146.

Laventie, B.-J., Sangermani, M., Estermann, F., Manfredi, P., Planes, R., et al. (2019). A surface-induced asymmetric program promotes tissue colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Host & Microbe*, 25(1), 140-152.e146.

Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., et al. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature chemical biology*, 9(5), 339-343.

Lee, J. & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26-41.

Lee, K. S., Patton, J. L., Fido, M., Hines, L. K., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., Henry, S. A. & Levin, D. E. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *J Biol Chem*, 269(31), 19725-19730.

Leighton, T. L., Buensuceso, R. N. C., Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environ Microbiol*, 17(11), 4148-4163.

Leo, J. C., Grin, I. & Linke, D. (2012). Type V secretion: Mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1088-1101.

Leščić Ašler, I., Ivić, N., Kovačić, F., Schell, S., Knorr, J., Krauss, U., Wilhelm, S., Kojić-Prodić, B. & Jaeger, K.-E. (2010). Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases. *Chembiochem*, 11(15), 2158-2167.

Lewenza, S., Falsafi, R., Bains, M., Rohs, P., Stupak, J., Sprott, G. D. & Hancock, R. E. W. (2011). The *olsA* gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility. *FEMS Microbiol Lett*, 320(2), 95-102.

Leyton, D. L., Rossiter, A. E. & Henderson, I. R. (2012). From self sufficiency to dependence: Mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 213-225.

Li, W. & Lu, C.-D. (2007). Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189(15), 5413-5420.

Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 582-610.

Livermore, D. M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(3), 247-250.

Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34(5), 634-640.

Lopez, D. & Koch, G. (2017). Exploring functional membrane microdomains in bacteria: An overview. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 76-84.

López, D. & Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev*, 24(17), 1893-1902.

Lu, H. M. & Lory, S. (1996). A specific targeting domain in mature exotoxin A is required for its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*, 15(2), 429-436.

- Lundgren, B. R., Thornton, W., Dornan, M. H., Villegas-Peñaranda, L. R., Boddy, C. N. & Nomura, C. T. (2013). Gene *pa2449* is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 195(9), 2087-2100.
- Luo, R. G., Miao, X. Y., Luo, L. L., Mao, B., Yu, F. Y. & Xu, J. F. (2019). Presence of *pldA* and *exoU* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is associated with high risk of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(5), 601-606.
- Lüthi, E., Baur, H., Gamper, M., Brunner, F., Villeval, D., Mercemier, A. & Haas, D. (1990). The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene*, 87(1), 37-43.
- MacKenzie, K. R. (2006). Folding and stability of α -helical integral membrane proteins. *Chem Rev*, 106(5), 1931-1977.
- Maeda, T., Garcia-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L. R., Tomas, M. & Wood, T. K. (2012). Quorum quenching quandary: Resistance to antivirulence compounds. *Isme j*, 6(3), 493-501.
- Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2000). Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Molecular Microbiology*, 37(5), 981-988.
- Majumdar, S. & Pal, S. (2017). Cross-species communication in bacterial world. *Journal of cell communication and signaling*, 11(2), 187-190.
- Maldonado, R. F., Sá-Correia, I. & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 480-493.
- Manafi, A., Kohanteb, J., Mehrabani, D., Japoni, A., Amini, M., Naghmachi, M., Zaghi, A. H. & Khalili, N. (2009). Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. *BMC Microbiology*, 9(1), 23.
- Marani, P., Wagner, S., Baars, L., Genevoux, P., De Gier, J.-W., Nilsson, I., Casadio, R. & Von Heijne, G. (2006). New *Escherichia coli* outer membrane proteins identified through prediction and experimental verification. *Protein Science*, 15(4), 884-889.
- Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J.-M. & Poole, K. (2009). Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology*, 155(1), 305-315.
- Martí-Arbona, R., Xu, C., Steele, S., Weeks, A., Kutty, G. F., Seibert, C. M. & Raushel, F. M. (2006). Annotating enzymes of unknown function: *N*-formimino-l-glutamate deiminase is a member of the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, 45(7), 1997-2005.
- Martinez-Garcia, E. & de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, 13(10), 2702-2716.
- Mata, J., Marguerat, S. & Bähler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: A genome-wide perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(9), 506-514.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., et al. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3100.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 56(1), 289-314.

- May, K. L. & Silhavy, T. J. (2018).** The *Escherichia coli* phospholipase PldA regulates outer membrane homeostasis via lipid signaling. *mBio*, 9(2), e00379-00318.
- McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J. & Costerton, J. W. (1981).** Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol*, 27(9), 910-917.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. & Dowdle, W. R. (1977).** Legionnaires' disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med*, 297(22), 1197-1203.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000).** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182(10), 2702-2708.
- McMahon, H. T. & Gallop, J. L. (2005).** Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590-596.
- Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol*, 182, 477-488.
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E. & O'Toole, G. A. (2005).** Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in microbiology*, Chapter 1, Unit-1B.1.
- Meyer, J. M. & Abdallah, M. A. (1978).** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*, 107(2), 319-328.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A. (1996).** Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 64(2), 518-523.
- Meyers, D. J., Palmer, K. C., Bale, L. A., Kernacki, K., Preston, M. J., Brown, T. & Berk, R. S. (1992).** *In vivo* and *in vitro* toxicity of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicon*, 30(2), 161-169.
- Michel, W. (2020).** Untersuchungen zum Export, zur Membranassoziation und Aktivität der Phospholipase A PlaB von *Legionella pneumophila*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Inaugural-Dissertation.
- Migula, W. (1897).** System der Bakterien: Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien. (2 v., 24 leaves of plates), 2 v., 24 leaves of plates.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M. & Filloux, A. (2011).** Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 13(7), 1666-1681.
- Min, W. (2012).** Evolution of structure and function among hotdog-fold thioesterases and HAD family phosphatases. The University of New Mexico. Inaugural-Dissertation.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3), 289-298.
- Monteagudo-Cascales, E., García-Mauriño, S. M., Santero, E. & Canosa, I. (2019).** Unraveling the role of the CbrA histidine kinase in the signal transduction of the CbrAB two-component system in *Pseudomonas putida*. *Sci Rep*, 9(1), 9110.
- Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.-P., et al. (2002).** Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *Pseudomonads* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Molecular Microbiology*, 45(6), 1673-1685.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., et al. (2006).** A virulence locus of

- Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5779), 1526-1530.
- Mulnaes, D. & Gohlke, H. (2018).** TopScore: Using deep neural networks and large diverse data sets for accurate protein model quality assessment. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(11), 6117-6126.
- Murzyn, K., Róg, T. & Pasenkiewicz-Gierula, M. (2005).** Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. *Biophysical Journal*, 88(2), 1091-1103.
- Nam, K. H., Kim, S. J., Priyadarshi, A., Kim, H. S. & Hwang, K. Y. (2009).** The crystal structure of an HSL-homolog EstE5 complex with PMSF reveals a unique configuration that inhibits the nucleophile Ser144 in catalytic triads. *Biochem Biophys Res Commun*, 389(2), 247-250.
- Neilands, J. B. (1981).** Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem*, 50, 715-731.
- Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R. & Hartland, E. L. (2010).** Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 274-298.
- Ng, W.-L. & Bassler, B. L. (2009).** Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 197-222.
- Nickzad, A. & Déziel, E. (2014).** The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Lett Appl Microbiol*, 58(5), 447-453.
- O'Toole, G. A. (2011).** Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(47), 2437.
- O'Toole, G. A., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54(1), 49-79.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R. & Jung, R. (2004).** National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4606.
- Ochsner, U. A., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem*, 269(31), 19787-19795.
- Ochsner, U. A., Snyder, A. J., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12), 8312-8317.
- Ofek, I., Bayer, E. A. & Abraham, S. N. (2013).** Bacterial adhesion. *The Prokaryotes: Human Microbiology*, 107-123.
- Oh, M.-K. & Liao, J. C. (2000).** DNA microarray detection of metabolic responses to protein overproduction in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2(3), 201-209.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., et al. (1992).** The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, 5(3), 197-211.
- Olsen, G. J., Woese, C. R. & Overbeek, R. (1994).** The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J Bacteriol*, 176(1), 1-6.
- Ostroff, R. M., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1990).** Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 172(10), 5915-5923.

- Palleroni, N. J. (1986).** Taxonomy of the *Pseudomonads*. *The bacteria, Vol X: The biology of Pseudomonas*, 3-20.
- Palma, M. S., Han, S. W. & Rossi, A. (1989).** Dissociation and catalytic activity of phosphate-repressible alkaline phosphatase from *Neurospora crassa*. *Phytochemistry*, 28(12), 3281-3284.
- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K. & Whiteley, M. (2005).** Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol*, 187(15), 5267-5277.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R. & Zhou, W. W. (1990).** Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 58(9), 3009-3014.
- Parrino, B., Diana, P., Cirrincione, G. & Cascioferro, S. (2018).** Bacterial biofilm inhibition in the development of effective anti-virulence strategy. *The open medicinal chemistry journal*, 12, 84-87.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1993).** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, 260(5111), 1127-1130.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1994).** Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 197-201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1995).** A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5), 1490-1494.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997).** Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, 179(18), 5756-5767.
- Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., del Carmen Fernández, M., Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M. P. & Bou, G. (2012).** Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(4), 2084.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999).** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20), 11229-11234.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997).** Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 179(10), 3127-3132.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011).** SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth*, 8(10), 785-786.
- Petrova, O. E. & Sauer, K. (2009).** A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLOS Pathogens*, 5(11), e1000668-e1000668.
- Phillips, R. M., Six, D. A., Dennis, E. A. & Ghosh, P. (2003).** *In vivo* phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem*, 278(42), 41326-41332.
- Pier, G. B. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*, 297(5), 277-295.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R. & Goldberg, J. B. (1996).** Role of mutant CFTR in

- hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*, 271(5245), 64-67.
- Poole, K. (2001).** Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3(2), 255-264.
- Prabhakaran, K., Harris, E. B. & Randhawa, B. (1996).** Properties of lysophospholipase in *Mycobacterium leprae*. *Journal of Basic Microbiology*, 36(5), 341-349.
- Raetz, C. R. H., Reynolds, C. M., Trent, M. S. & Bishop, R. E. (2007).** Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, 76, 295-329.
- Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. (2002).** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71(1), 635-700.
- Ramachandran, G. (2014).** Gram-positive and Gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence*, 5(1), 213-218.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C. & Lereclus, D. (2012).** The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(70), e4392-e4392.
- Ramírez-Estrada, S., Borgatta, B. & Rello, J. (2016).** *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infection and drug resistance*, 9, 7-18.
- Ramrakhiani, L. & Chand, S. (2011).** Recent progress on phospholipases: Different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(7), 991-1022.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. & El Jaziri, M. (2015).** The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 759348.
- Ravel, J. & Cornelis, P. (2003).** Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in Pseudomonads. *Trends in Microbiology*, 11(5), 195-200.
- Recinos, D. A., Sekedat, M. D., Hernandez, A., Cohen, T. S., Sakhtah, H., Prince, A. S., Price-Whelan, A. & Dietrich, L. E. P. (2012).** Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19420.
- Renner, L. D. & Weibel, D. B. (2011).** Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin*, 36(5), 347-355.
- Richmond, G. S. & Smith, T. K. (2011).** Phospholipases A₁. *Int J Mol Sci*, 12(1), 588-612.
- Ringel, M. T. & Brüser, T. (2018).** The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 5(10), 424-437.
- Ringel, M. T., Dräger, G. & Brüser, T. (2016).** PvdN enzyme catalyzes a periplasmic pyoverdine modification. *J Biol Chem*, 291(46), 23929-23938.
- Roberts, C. G. (2013).** The role of biofilms in reprocessing medical devices. *American Journal of Infection Control*, 41(5, Supplement), S77-S80.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. & Keevil, C. W. (1994).** Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol*, 60(5), 1585-1592.
- Romero, P. & Karp, P. (2003).** PseudoCyc, a pathway-genome database for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 5(4), 230-239.

- Ropp, P. A. & Traut, T. W. (1991).** Purine nucleoside phosphorylase. Allosteric regulation of a dissociating enzyme. *J Biol Chem*, 266(12), 7682-7687.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2000).** Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, 82(11), 1023-1032.
- Rossi, E., Falcone, M., Molin, S. & Johansen, H. K. (2018).** High-resolution *in situ* transcriptomics of *Pseudomonas aeruginosa* unveils genotype independent pathophenotypes in cystic fibrosis lungs. *Nature Communications*, 9(1), 3459.
- Rüetschi, U., Odelhög, B., Lindstedt, S., Barros-Söderling, J., Persson, B. & Jörnvall, H. (1992).** Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *European Journal of Biochemistry*, 205(2), 459-466.
- Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. I. A., Wai, S. N. & Mougous, J. D. (2013).** Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 496(7446), 508-512.
- Ryan, R. P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T. & Dow, J. M. (2009).** HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 11(5), 1126-1136.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W. & Prince, A. S. (2005).** Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(11), 1209-1223.
- Salacha, R., Kovačić, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R. & Bleves, S. (2010).** The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ Microbiol*, 12(6), 1498-1512.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001).** Molecular Cloning: A laboratory manual 3rd, ed.
- Sambrook, L. & Fritsch, E. F. M. (1989).** Molecular Cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & A.R., C. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry*, Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467,.
- Sanyal, S. & Menon, A. K. (2009).** Flipping lipids: Why an' what's the reason for? *ACS chemical biology*, 4(11), 895-909.
- Sato, H. & Frank, D. W. (2004).** ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol*, 53(5), 1279-1290.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., et al. (2003).** The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo j*, 22(12), 2959-2969.
- Sato, S., St-Pierre, C., Bhaumik, P. & Nieminen, J. (2009).** Galectins in innate immunity: Dual functions of host soluble β -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological Reviews*, 230(1), 172-187.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*, 184(4), 1140.
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G. & Gilbert, P. (2004).** Characterization of Nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol*, 186(21), 7312-7326.
- Schalk, I. J. & Guillon, L. (2013).** Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal

homeostasis. *Environ Microbiol*, 15(6), 1661-1673.

Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: Implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol*, 96(1), 13-21.

Schmiel, D. H. & Miller, V. L. (1999). Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and Infection*, 1(13), 1103-1112.

Schnaitman, C. A. (1971). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J Bacteriol*, 108(1), 545-552.

Schneider, J., Klein, T., Mielich-Süss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O. P., Kovács, Á. T., Sauer, M. & Lopez, D. (2015). Spatio-temporal remodeling of functional membrane microdomains organizes the signaling networks of a bacterium. *PLOS Genetics*, 11(4), e1005140.

Schroeder, G. N., Aurass, P., Oates, C. V., Tate, E. W., Hartland, E. L., Flieger, A. & Frankel, G. (2015). *Legionella pneumophila* effector LpdA is a palmitoylated phospholipase D virulence factor. *Infect Immun*, 83(10), 3989.

Schunder, E., Adam, P., Higa, F., Remer, K. A., Lorenz, U., et al. (2010). Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*, 300(5), 313-323.

Schuster, M. & Greenber, E. P. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2), 73-81.

Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. & Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 51(4), 973-985.

Schuster, M. a., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: A transcriptome analysis. *J Bacteriol*, 185(7), 2066-2079.

Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: Unanswered questions. *Genet Mol Res*, 2(1), 48-62.

Schweizer, H. P. & Choi, K.-H. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Archives of Microbiology*, 193(3), 227-234.

Shallcross, L. J. & Davies, D. S. C. (2014). Antibiotic overuse: A key driver of antimicrobial resistance. *Br J Gen Pract*. 64(629), 604-605.

Shi, W., Bogdanov, M., Dowhan, W. & Zusman, D. R. (1993). The *pss* and *psd* genes are required for motility and chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175(23), 7711-7714.

Shohdy, N., Efe, J. A., Emr, S. D. & Shuman, H. A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(13), 4866-4871.

Shrout, J. D., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2011). The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS bulletin*, 36(5), 367-373.

Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Biotech*, 1(9), 784-791.

Sitkiewicz, I., Stockbauer, K. E. & Musser, J. M. (2007). Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: Better living through

phospholipolysis. *Trends in Microbiology*, 15(2), 63-69.

Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1976). A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res*, 3(9), 2387-2398.

Snijder, H. J. & Dijkstra, B. W. (2000). Bacterial phospholipase A: Structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1), 91-101.

Snijder, H. J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K. H., Verheij, H. M., Egmond, M. R., Dekker, N. & Dijkstra, B. W. (1999). Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature*, 401(6754), 717-721.

Soberón-Chávez, G., Lépine, F. & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718-725.

Sohlenkamp, C. & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133-159.

Sohlenkamp, C. & Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133-159.

Somerharju, P., Virtanen, J. A., Cheng, K. H. & Hermansson, M. (2009). The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1788(1), 12-23.

Sonawane, A., Jyot, J. & Ramphal, R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. *Infect Immun*, 74(12), 7035-7039.

Sonnleitner, E., Valentini, M., Wenner, N., Haichar, F. Z., Haas, D. & Lapouge, K. (2012). Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 7(10), e44637.

Sriramulu, D. D., Nimtz, M. & Romling, U. (2005). Proteome analysis reveals adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment. *Proteomics*, 5(14), 3712-3721.

Srivastava A., C. N., Kumar S. (2019). The role of biofilms in medical devices and implants. *Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control*.

Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. (1966). The aerobic Pseudomonads a taxonomic study. *Microbiology*, 43(2), 159-271.

Stohl, E. A., Criss, A. K. & Seifert, H. S. (2005). The transcriptome response of *Neisseria gonorrhoeae* to hydrogen peroxide reveals genes with previously uncharacterized roles in oxidative damage protection. *Molecular Microbiology*, 58(2), 520-532.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warren, et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406 (6799), 959-964.

Strateva, T. & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*, 61(4), 717-732.

Strateva, T. & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148.

Sun, Z., Kang, Y., Norris, M. H., Troyer, R. M., Son, M. S., Schweizer, H. P., Dow, S. W. & Hoang, T. T. (2014). Blocking phosphatidylcholine utilization in *Pseudomonas aeruginosa*, via mutagenesis of

fatty acid, glycerol and choline degradation pathways, confirms the importance of this nutrient source *in vivo*. *PLoS One*, 9(7), e103778.

Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222-227.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., et al. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D607-d613.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18(3), 318-327.

Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K. & Otani, T. (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, 68(4), 1834-1839.

Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L. R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P. & Sawa, T. (2004). Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Commun*, 316(2), 323-331.

Tang, Y. & Hollingsworth, R. I. (1998). Regulation of lipid synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: Low oxygen concentrations trigger phosphatidylinositol biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 64(5), 1963-1966.

Tatusov, R. L., Koonin, E. V. & Lipman, D. J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science*, 278(5338), 631-637.

Taylor, M., Ross, K. & Bentham, R. (2009). *Legionella*, protozoa, and biofilms: Interactions

within complex microbial systems. *Microb Ecol*, 58(3), 538-547.

Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun*, 67(5), 2371-2376.

The UniProt, C. (2018). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D506-D515.

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, 151(5), 1313-1323.

Titball, R. W. (1998). Bacterial phospholipases. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 27, 127s-137s.

Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: A second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol Microbiol*, 5(8), 2003-2010.

Tolker-Nielsen, T. & Sternberg, C. (2011). Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 1, Unit 1B.2.

Traut, T. W. (1994). Dissociation of enzyme oligomers: A mechanism for allosteric regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29(2), 125-163.

Tredget, E. E., Shankowsky, H. A., Rennie, R., Burrell, R. E. & Logsetty, S. (2004). *Pseudomonas* infections in the thermally injured patient. *Burns*, 30(1), 3-26.

Tsai, C. J.-Y., Loh, J. M. S. & Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229.

- Valentini, M. & Filloux, A. (2016).** Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J Biol Chem*, 291(24), 12547-12555.
- Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1998).** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551-560.
- van Ulsen, P., Rahman, S., Jong, W. S. P., Daleke-Schermerhorn, M. H. & Luirink, J. (2014).** Type V secretion: From biogenesis to biotechnology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1592-1611.
- VanRheenen, S. M., Luo, Z.-Q., O'Connor, T. & Isberg, R. R. (2006).** Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (Phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infect Immun*, 74(6), 3597-3606.
- Vartak, N. B., Liu, L., Wang, B. M. & Berg, C. M. (1991).** A functional *leuABCD* operon is required for leucine synthesis by the tyrosine-repressible transaminase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 173(12), 3864-3871.
- Vasil, M. L. (1986).** *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *The Journal of Pediatrics*, 108(5, Part 2), 800-805.
- Vasil, M. L., Stonehouse, M. J., Vasil, A. I., Wadsworth, S. J., Goldfine, H., Bolcome, R. E., III & Chan, J. (2009).** A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLOS Pathogens*, 5(5), e1000420.
- Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G. P. F., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2009).** HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J Biol Chem*, 284(49), 33815-33823.
- Vijayan, M. & Chandra, N. (1999).** Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 707-714.
- Vijayaraj, P., Sabarirajan, J. & Nachiappan, V. (2011).** Enhanced phospholipase B activity and alteration of phospholipids and neutral lipids in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to N-nitrosornicotine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 567-577.
- Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I. L. (2007).** Pyoverdine siderophores: From biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22-30.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979).** Preparation and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(2), 615-619.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L.-F. & Filloux, A. (2001).** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *The EMBO Journal*, 20(23), 6735-6741.
- Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. & de Gier, J.-W. (2006).** Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, 24(8), 364-371.
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., et al. (2008).** Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14371.
- Waite, R. D., Paccanaro, A., Papakonstantinou, A., Hurst, J. M., Saqi, M., Littler, E. & Curtis, M. A. (2006).** Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC genomics*, 7, 162-162.
- Walshaw, D. L. & Poole, P. S. (1996).** The general l-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that

also influences efflux of solutes. *Molecular Microbiology*, 21(6), 1239-1252.

Wang, A. & Dennis, E. A. (1999). Mammalian lysophospholipases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1439(1), 1-16.

Wei, Q. & Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20983-21005.

Welch, M., Mikkelsen, H., Swatton, J. E., Smith, D., Thomas, G. L., Glansdorp, F. G. & Spring, D. R. (2005). Cell-cell communication in Gram-negative bacteria. *Molecular BioSystems*, 1(3), 196-202.

Weltzien, H. U. (1979). Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 559(2), 259-287.

Wettstadt, S., Wood, T. E., Fecht, S. & Filloux, A. (2019). Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-dependent manner. *Front Microbiol*, 10, 1718.

Wewer, V., Dombrink, I., vom Dorp, K. & Dörmann, P. (2011). Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of lipid research*, 52(5), 1039-1054.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. & Salmond, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), 365-404.

Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860-864.

WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery

and development of new antibiotics. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.

Wick, M. J., Hamood, A. N. & Iglewski, B. H. (1990). Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Molecular Microbiology*, 4(4), 527-535.

Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z. & Vasil, M. L. (2001). Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Molecular Microbiology*, 39(2), 291-304.

Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Martin, W. E., Murphy, R. C. & Vasil, M. L. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J Bacteriol*, 184(17), 4792-4799.

Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol*, 189(18), 6695-6703.

Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 181(22), 6977-6986.

Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D. & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-552.

Wilkinson, S. G. (1996). Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Progress in Lipid Research*, 35(3), 283-343.

Williams, B. J., Dehnbostel, J. & Blackwell, T. S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: Host

defence in lung diseases. *Respirology*, 15(7), 1037-1056.

Wilton, D. C. (2008). In biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. 5th edition, Elsevier, 305-329.

Wingfield, P. (1998). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 13(1), A.3F.1-A.3F.8.

Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A. & Smith, G. H. (1917). The families and genera of the bacteria: Preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol*, 2(5), 505-566.

Winson, M. K., Swift, S., Hill, P. J., Sims, C. M., Griesmayr, G., Bycroft, B. W., Williams, P. & Stewart, G. S. (1998). Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett*, 163(2), 193-202.

Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A. & Brinkman, F. S. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D646-653.

Winstanley, C. & Fothergill, J. L. (2009). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett*, 290(1), 1-9.

Wolfgang, M. C., Jyot, J., Goodman, A. L., Ramphal, R. & Lory, S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6664-6668.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W.

(1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, 17(9), 3469-3478.

Woods, D. E. & Iglewski, B. H. (1983). Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: New perspectives. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(Supplement_4), S715-S722.

Yahr, T. L., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1996). Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 178(5), 1412-1419.

Young, G. M., Schmiel, D. H. & Miller, V. L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6456-6461.

Yu, F., Jen, Y., Takeuchi, E., Inouye, M., Nakayama, H., Tagaya, M. & Fukui, T. (1988). Alpha-glucan phosphorylase from *Escherichia coli*. Cloning of the gene, and purification and characterization of the protein. *J Biol Chem*, 263(27), 13706-13711.

Yu, J. E., Han, S.-Y., Wolfson, B. & Zhou, Q. (2018). The role of endothelial lipase in lipid metabolism, inflammation, and cancer. *Histology and histopathology*, 33(1), 1-10.

Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., et al. (2010). PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13), 1608-1615.

Zaidi, T. S., Fleiszig, S. M., Preston, M. J., Goldberg, J. B. & Pier, G. B. (1996). Lipopolysaccharide outer core is a ligand for corneal cell binding and ingestion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(6), 976-986.

Zampieri, M., Hörl, M., Hotz, F., Müller, N. F. & Sauer, U. (2019). Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 10(1), 3354.

Zarzycki-Siek, J., Norris, M. H., Kang, Y., Sun, Z., Bluhm, A. P., McMillan, I. A. & Hoang, T. T. (2013). Elucidating the *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid degradation pathway: Identification of additional fatty acyl-CoA synthetase homologues. *PLoS One*, 8(5), e64554.

Zhang, W., Sun, J., Ding, W., Lin, J., Tian, R., Lu, L., Liu, X., Shen, X. & Qian, P. Y. (2015). Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 40.

Zhou, L., Zhang, L.-H., Cámara, M. & He, Y.-W. (2017). The DSF family of quorum sensing signals: Diversity, biosynthesis, and turnover. *Trends in Microbiology*, 25(4), 293-303.

Zhuang, Z., Song, F., Zhao, H., Li, L., Cao, J., Eisenstein, E., Herzberg, O. & Dunaway-Mariano, D. (2008). Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily: The bacterial thioesterase YciA. *Biochemistry*, 47(9), 2789-2796.

Zolfagher, I., Evans, D. J. & Fleiszig, S. M. J. (2003). Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 71(9), 5389-5393.

Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S. & Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 74(6), 3134-3147.

8 Anhang

8.1 Ergänzung für Kapitel 3.2.2

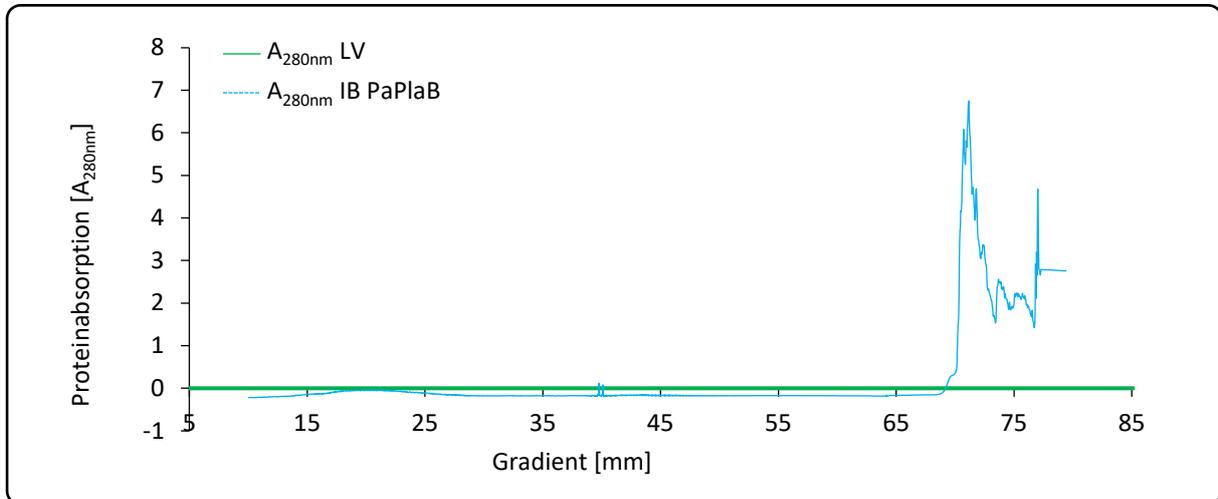


Abb. 8.1: Lokalisation von PaPlaB Einschlusskörperchen.

Fünf Stunden nach Zugabe des Induktors IPTG (1 mM) wurden die Einschlusskörperchen der *E. coli* C43(DE3)-pET22b-*paplaB_{h6}* Expressionskultur (LB-Medium, 37 °C) durch Zentrifugation isoliert. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* C43(DE3)-pET22b unter denselben Bedingungen kultiviert und analysiert. Separation der Einschlusskörperchen in einem Saccharosegradienten. Die Proteinabsorption erfolgte bei 280 nm. Die Einschlusskörperchen befinden sich in derselben Gradientenfraktion wie PaPlaB. In Kooperation mit Jun.-Prof. Dr. A. Kedrov & M. Kamel, Institut für Synthetische Membransysteme.

8.2 Ergänzung für Kapitel 3.4.4

Tab. 8.1: Zahlenwerte für die Erstellung des Box-Plot Diagramms für die Biofilmanalyse mit Kristallviolett.

	8 h		24 h		48 h		72 h		144 h		216 h	
	WT	$\Delta plaB$	WT	$\Delta plaB$	WT	$\Delta plaB$						
Anzahl	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Mittelwert	0,34	0,29	1,86	0,62	0,72	0,31	0,76	0,37	1,44	1,49	0,64	0,73
Stabws.	0,05	0,05	0,42	0,20	0,30	0,15	0,64	0,19	0,57	0,44	0,64	0,66
Minimum	0,14	0,18	0,94	0,28	0,30	0,15	0,11	0,13	0,21	0,55	0,01	0,02
Median	0,34	0,28	1,87	0,58	0,65	0,26	0,55	0,29	1,52	1,42	0,49	0,41
Maximum	0,50	0,51	2,84	1,65	2,33	1,06	4,22	1,12	2,84	2,62	2,78	2,32

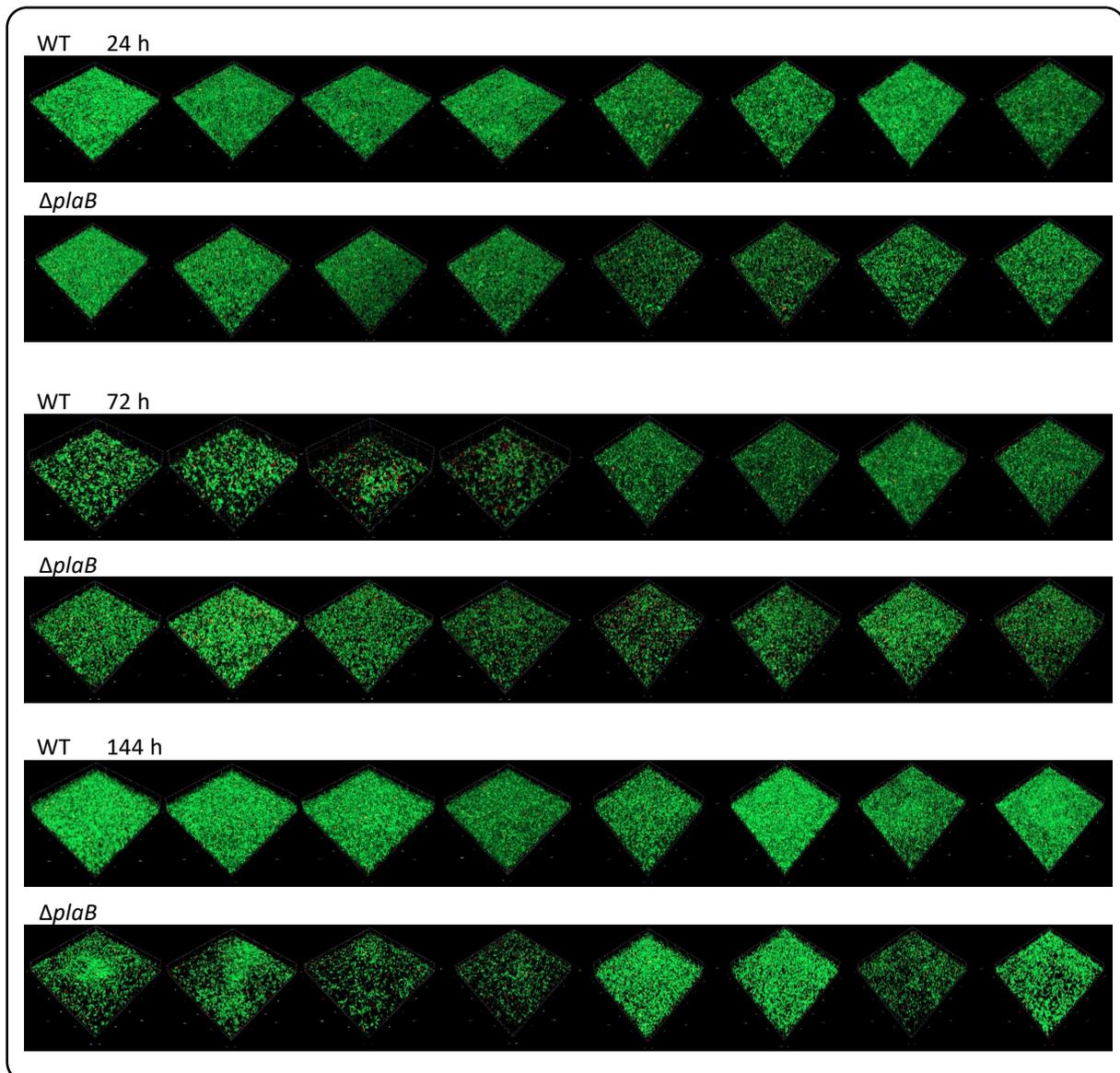


Abb. 8.2: Analyse der Biofilmarchitektur von *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Δ plaB.

Analyse der Biofilmarchitektur mittels CLSM nachdem die Zellen 24, 72 und 144 h in Durchflusskammern mit kontinuierlichem Zufluss von LB-Medium (50 μ L/min) unter dynamischen Bedingungen kultiviert wurden. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, jeweils mit einem biologischen Replikat, welches an drei verschiedenen Punkten analysiert wurde (in Kooperation mit Prof. Dr. W. Streit & M. Gudzhun, Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie). Es wurde jeweils ein 100 x 100 μ m großer Abschnitt aufgenommen. Die Aufnahmen der Biofilmarchitektur für den Wildtyp *P. aeruginosa* PA01 werden ebenfalls in der Dissertation von in der Dissertation von Caliskan, M. (unveröffentlicht, Institut für molekulare Enzymtechnologie) dargestellt.

Nach einer Kultivierungsdauer von 72 h (Abb. 8.2) zeigte der Wildtyp keinen konfluenten Biofilm. Diese konnte weder nach 24, 144 h noch im zweiten Experiment beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass der Biofilm dieser Proben abnormal gewachsen ist und mit Abstand bewertet werden sollte.

8.3 Ergänzung für Kapitel 3.4.5

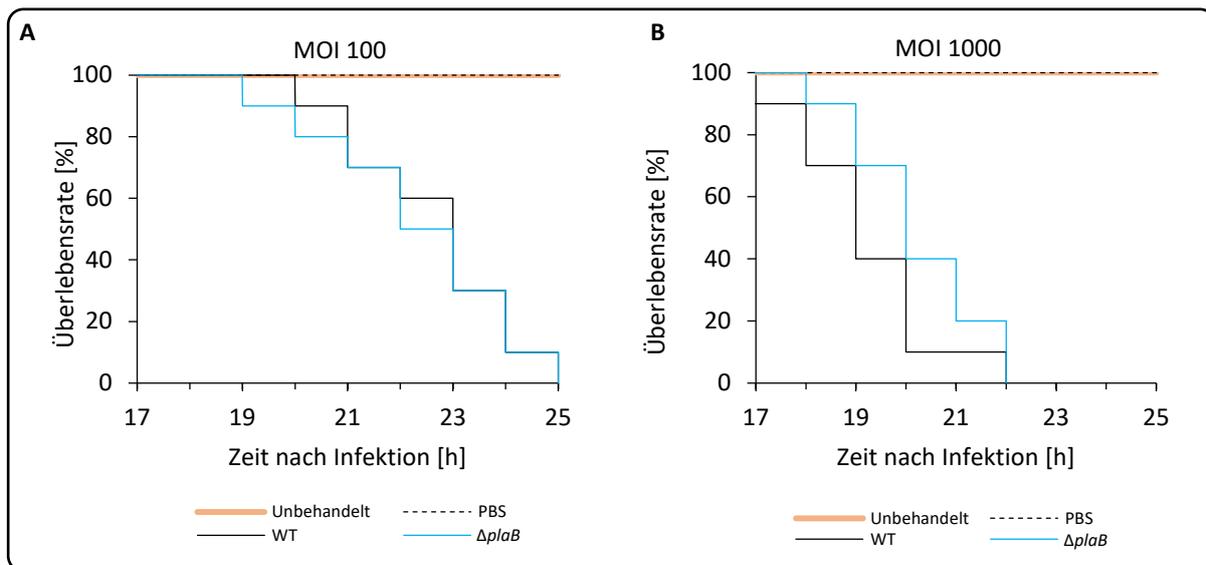


Abb. 8.3: Einfluss von PaPlaB auf die Virulenz von *P. aeruginosa* im *Galleria mellonella*-Virulenzmodell.

Kaplan-Meier Plot repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit jeweils 10 Larven pro Versuchsgruppe (in Kooperation mit Prof. Dr. S. Häußler & Dr. S. Felgner, Institut für Molekulare Bakteriologie). Getestet wurde die Virulenz von *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ im Vergleich zu dem Wildtyp *P. aeruginosa* PA01. **A:** Den Larven wurden jeweils 100 Bakterienzellen injiziert. **B:** Den Larven wurden jeweils 1000 Bakterienzellen injiziert. Für die Überprüfung der Lebensfähigkeit der Larven wurden jeweils 10 Larven nicht infiziert (unbehandelt). Mit PBS behandelte Larven dienten als Negativkontrolle. Über einen Zeitraum von 24 h wurde das Überleben der Larven dokumentiert. MOI= multiplicity of infection.

8.4 Ergänzung für Kapitel 3.5.1

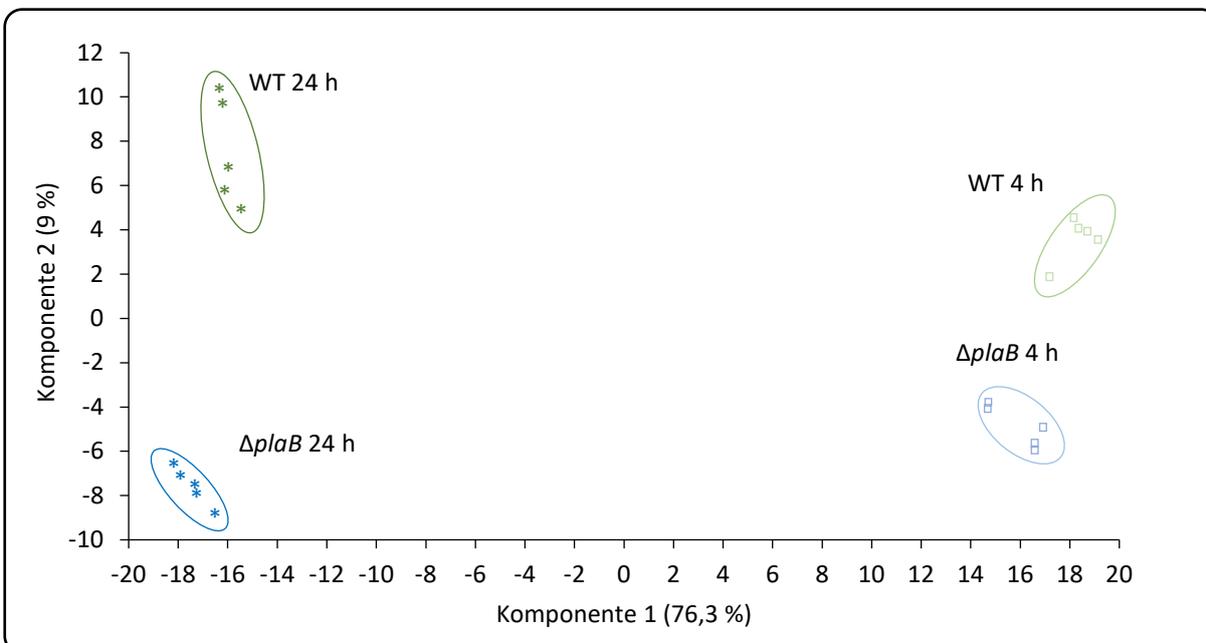


Abb. 8.4: Hauptkomponenten-Analyse der globalen Proteomstudie.

Gezeigt sind die Ergebnisse der globalen Proteomstudien von beiden getesteten Stämme *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* $\Delta plaB$ nach 4 und 24-stündiger Kultivierung. Gezeigt sind jeweils fünf biologische Replikate (in Kooperation mit Prof. Dr. K. Stühler & Dr. G. Poschmann, Molecular Proteomics Laboratory).

8.5 Ergänzung für Kapitel 3.5.1

Tab. 8.2: Alle durch Proteomstudien als signifikant abundanter in *P. aeruginosa* Δ plaB identifizierten Proteine.

PA-Nummer	Produkt	Funktion	Verhältnis Δ plaB/WT*
4 h			
PA2300	ChiC	chitinase	0,07
PA3366	AmiE	aliphatic amidase	0,17
PA2302	AmbE	ambE	0,24
PA2330	/	hypothetical protein	0,27
PA2007	MaiA	maleylacetoacetate isomerase	0,31
PA5100	HutU	urocanase	0,33
PA4223	PchH	probable ATP-binding component of ABC transporter	0,46
PA2009	HmgA	homogentisate 1,2-dioxygenase	0,48
PA2394	PvdN	pvdN	0,49
PA2570	LecA	lecA	0,50
PA1000	PqsE	quinolone signal response protein	1,54
PA2572	/	probable two-component response regulator	1,55
PA3901	FecA	Fe(III) dicitrate transport protein FecA	1,85
PA0784	/	Probable transcriptional regulator	1,92
PA0157	TriB	Probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein	2,20
PA2620	ClpA	ATP-binding protease component ClpA	2,23
PA3723	YqjM	Probable FMN oxidoreductase	2,28
PA3924	/	Probable medium-chain acyl-CoA ligase	2,30
PA1344	YvaG	Probable short-chain dehydrogenase	2,42
PA2071	FusA2	Elongation factor G 2	2,43
PA2247	BkdA1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	2,45
PA1324	/	Uncharacterized protein	2,52
PA3417	PpdhA	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	2,65
PA2248	BkdA2	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	2,66
PA3416	/	Probable pyruvate dehydrogenase E1 component	2,66
PA3858	AapJ	Probable amino acid-binding protein	2,84
PA3418	Idh	Leucine dehydrogenase	3,21
PA2717	Cpo	Chloroperoxidase	3,27
PA1041	/	Probable outer membrane protein	3,46
PA5220	/	Uncharacterized protein	3,60
PA5060	PhaF	Polyhydroxyalkanoate synthesis protein PhaF	4,39
PA0865	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	4,58
PA2424	PvdL	PvdL	5,98
PA0176	Aer2	Aerotaxis transducer Aer2	8,24
24 h			
PA2302	AmbE	AmbE	0,10
PA2300	ChiC	Chitinase	0,13
PA3327	/	Probable non-ribosomal peptide synthetase	0,18
PA1746	/	Uncharacterized protein	0,21

Fortsetzung Tab. 8.2

PA2328	/	Uncharacterized protein	0,22
PA2000	DhcB	DhcB, dehydrocarnitine CoA transferase, subunit B	0,23
PA1662	/	Probable ClpA/B-type protease	0,24
PA2204	/	Probable binding protein component of ABC transporter	0,26
PA2069	/	Probable carbamoyl transferase	0,28
PA3364	AmiC	Aliphatic amidase expression-regulating protein	0,28
PA2448	/	Uncharacterized protein	0,28
PA3450	/	Probable antioxidant protein	0,28
PA3195	HexC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,29
PA1900	PhzB2	Phenazine biosynthesis protein PhzB2	0,30
PA3363	AmiR	Aliphatic amidase regulator	0,31
PA0872	PhhA	Phenylalanine-4-hydroxylase	0,31
PA2386	PvdA	L-ornithine N(5)-monooxygenase	0,32
PA1658	/	Uncharacterized protein	0,32
PA0283	Abp	Sulfate-binding protein	0,32
PA3366	AmiE	Aliphatic amidase	0,33
PA0852	CbpD	Chitin-binding protein CbpD	0,35
PA5150	/	Probable short-chain dehydrogenase	0,35
PA4352	/	Uncharacterized protein	0,36
PA3441	/	Probable molybdopterin-binding protein	0,36
PA4587	CcpA	Cytochrome c551 peroxidase	0,37
PA2393	/	Probable dipeptidase	0,38
PA2330	/	Uncharacterized protein	0,39
PA2395	PvdO	PvdO	0,39
PA3022	/	Uncharacterized protein	0,39
PA1999	DhcA	DhcA, dehydrocarnitine CoA transferase, subunit A	0,40
PA2119	/	Alcohol dehydrogenase	0,40
PA5027	/	Uncharacterized protein	0,40
PA2394	PvdN	PvdN	0,40
PA1579	/	Uncharacterized protein	0,41
PA2392	PvdP	PvdP	0,41
PA1555	CcoP2	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	0,42
PA1556	CcoO2	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoO subunit	0,42
PA2331	/	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	0,44
PA1159	/	Probable cold-shock protein	0,44
PA2413	PvdH	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase	0,45
PA3330	/	Probable short chain dehydrogenase	0,45
PA5100	HutU	Urocanate hydratase	0,45
PA1292	SseA	Probable 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	0,45
PA5215	GcvT	Aminomethyltransferase	0,45
PA2116	/	Putative hydro-lyase PA2116	0,45
PA1946	RbsB	Binding protein component of ABC ribose transporter	0,46
PA0999	PqsD	Anthraniloyl-CoA anthraniloyltransferase	0,46
PA0263	HcpC	Major exported protein	0,46

Fortsetzung Tab. 8.2

PA5098	HutH	Histidine ammonia-lyase	0,47
PA0887	AcsA1	Acetyl-coenzyme A synthetase 1	0,47
PA3332	/	Uncharacterized PhzA/B-like protein PA3332	0,47
PA4216	PhzG1	Probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0,47
PA2575	/	Uncharacterized protein	0,48
PA4217	PhzS	5-methylphenazine-1-carboxylate 1-monooxygenase	0,48
PA1748	/	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	0,49
PA4224	PchG	Pyochelin biosynthetic protein PchG	0,49
PA5188	/	Probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,49
PA3836	/	Uncharacterized protein	0,49
PA2444	GlyA2	Serine hydroxymethyltransferase 2	0,49
PA5176	/	Uncharacterized protein	0,50
PA0335	/	Uncharacterized protein	0,50
PA5186	/	Probable iron-containing alcohol dehydrogenase	0,50
PA0403	PyrR	Bifunctional protein PyrR	0,50
PA1801	ClpP1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1 (EC 3.4.21.92) (Endopeptidase Clp 1)	0,50
PA4443	CysD	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	0,50
PA0519	NirS	Nitrite reductase	0,50
PA1817	/	Uncharacterized protein	0,51
PA5080	/	Proline iminopeptidase	0,51
PA5505	/	Probable TonB-dependent receptor	0,51
PA0660	/	Uncharacterized protein	0,52
PA2007	MaiA	Maleylacetoacetate isomerase	0,52
PA2111	/	Uncharacterized protein	0,52
PA3790	oprC	Putative copper transport outer membrane porin OprC	0,53
PA0607	Rpe	Ribulose-phosphate 3-epimerase	0,53
PA3295	/	Probable HIT family protein	0,53
PA0085	Hcp1	Protein hcp1	0,53
PA0051	PhzH	Potential phenazine-modifying enzyme	0,53
PA5167	DctP	C4-dicarboxylate-binding periplasmic protein DctP	0,54
PA4190	PqsL	Probable FAD-dependent monooxygenase	0,54
PA0381	ThiG	Thiazole synthase	0,54
PA1828	/	Probable short-chain dehydrogenase	0,54
PA4389	SpeA	Probable short-chain dehydrogenase	0,55
PA2199	/	Probable dehydrogenase	0,55
PA1094	FliD	B-type flagellar hook-associated protein 2	0,55
PA2009	HmgA	Homogentisate 1,2-dioxygenase	0,56
PA0943	/	Uncharacterized protein	0,56
PA1597	/	Uncharacterized protein	0,56
PA1493	CysP	Sulfate-binding protein of ABC transporter	0,56
PA5453	Gmd	GDP-mannose 4,6-dehydratase	0,56
PA3266	CspA	Major cold shock protein CspA	0,56
PA3818	SuhB	Inositol-1-monophosphatase	0,57
PA5018	MsrA	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	0,57

Fortsetzung Tab. 8.2

PA5163	RmlA	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	0,57
PA3844	/	Uncharacterized protein	0,57
PA5427	AdhA	Alcohol dehydrogenase	0,57
PA4180	/	Probable acetolactate synthase large subunit	0,57
PA2329	/	Probable ATP-binding component of ABC transporter	0,57
PA2554	/	Probable short-chain dehydrogenase	0,57
PA0938	/	Uncharacterized protein	0,57
PA0932	CysM	Cysteine synthase B	0,57
PA5475	/	Acetyltransferase PA5475	0,58
PA3190	/	Probable binding protein component of ABC sugar transporter	0,58
PA2616	TrxB1	Thioredoxin reductase	0,58
PA2951	EtfA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	0,58
PA2952	EtfB	Electron transfer flavoprotein subunit beta	0,58
PA4400	/	Probable pyrophosphohydrolase	0,58
PA5214	GcvH2	Glycine cleavage system H protein 2	0,58
PA1610	FabA	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	0,58
PA2945	CobW	Protein CobW	0,59
PA1684	MtnD	Acireductone dioxygenase (1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase)	0,59
PA5025	MetY	Homocysteine synthase	0,60
PA5153	/	(Lysine/arginine/ornithine/histidine/octopine) ABC transporter periplasmic binding protein	0,60
PA3618	/	Uncharacterized protein	0,60
PA1766	/	Uncharacterized protein	0,61
PA1155	NrdB	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	0,62
PA2707	/	Uncharacterized protein	0,62
PA4026	/	Probable acetyltransferase	0,63
PA5507	/	Uncharacterized protein	0,63
PA2385	PvdQ	Acyl-homoserine lactone acylase PvdQ	0,63
PA4235	BfrA	Bacterioferritin	0,64
PA3846	/	Uncharacterized protein	0,64
PA1687	SpeE1	Polyamine aminopropyltransferase 1	0,65
PA1829	/	Uncharacterized protein	0,66
PA4725	CbrA	Two-component sensor CbrA	1,51
PA0590	ApaH	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase, symmetrical	1,51
PA0768	LepB	Signal peptidase I (SPase I)	1,52
PA0565	/	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	1,53
PA2721	/	Uncharacterized protein	1,54
PA3855	/	Uncharacterized protein	1,57
PA2167	/	Uncharacterized protein	1,57
PA1076	/	Uncharacterized protein	1,64
PA0455	DbpA	RNA helicase DbpA	1,70
PA4408	FtsA	Cell division protein FtsA	1,70
PA4788	/	Uncharacterized protein	1,71

Fortsetzung Tab. 8.2

PA4417	MurE	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	1,72
PA5253	AlgP	Transcriptional regulatory protein AlgP	1,72
PA2072	/	Uncharacterized protein	1,73
PA3710	/	Probable GMC-type oxidoreductase	1,73
PA5173	ArcC	Carbamate kinase	1,73
PA4624	/	Uncharacterized protein	1,74
PA4786	/	Probable short-chain dehydrogenase	1,75
PA4733	AcsA2	Acetyl-coenzyme A synthetase 2	1,75
PA0747	/	Probable aldehyde dehydrogenase	1,76
PA0587	/	UPF0229 protein PA0587	1,77
PA4115	/	Uncharacterized protein	1,78
PA3559	/	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,79
PA1544	Anr	Transcriptional activator protein anr	1,80
PA3617	RecA	Protein RecA (Recombinase A)	1,81
PA4411	MurC	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	1,82
PA1340	/	Amino acid ABC transporter membrane protein	1,83
PA0396	PilU	Twitching motility protein PilU	1,83
PA2445	GcvP1	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 1	1,83
PA1180	PhoQ	Two-component sensor PhoQ	1,83
PA0743	/	NAD-dependent L-serine dehydrogenase	1,84
PA3347	/	Uncharacterized protein	1,84
PA1876	/	Probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	1,84
PA5172	ArcB	Ornithine carbamoyltransferase, catabolic	1,85
PA1529	LigA	DNA ligase	1,86
PA2622	CspD	Cold-shock protein CspD	1,87
PA4296	PprB	Two-component response regulator, PprB	1,87
PA5528	/	Uncharacterized protein	1,87
PA3924	/	Probable medium-chain acyl-CoA ligase	1,87
PA1408	/	Uncharacterized protein	1,88
PA5060	PhaF	Polyhydroxyalkanoate synthesis protein PhaF	1,89
PA0540	/	Uncharacterized protein	1,89
PA0586	/	Uncharacterized protein	1,90
PA2737	/	Uncharacterized protein	1,90
PA5022	/	Uncharacterized protein	1,92
PA3048	RlmL	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K/L	1,92
PA2365	/	Uncharacterized protein	1,93
PA5171	ArcA	Arginine deiminase (ADI)	1,93
PA2787	Cpg2	Carboxypeptidase G2	1,94
PA0176	Aer2	Aerotaxis transducer Aer2	1,95
PA4414	MurD	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	1,95
PA4362	/	Uncharacterized protein	1,99
PA3459	/	Probable glutamine amidotransferase	2,00
PA4785	/	Probable acyl-CoA thiolase	2,00
PA2771	/	Uncharacterized protein	2,03

Fortsetzung Tab. 8.2

PA3723	/	Probable FMN oxidoreductase	2,04
PA1341	/	Amino acid ABC transporter membrane protein	2,04
PA0227	/	Probable CoA transferase, subunit B	2,05
PA3848	/	Uncharacterized protein	2,08
PA0195	PntAA	Putative NAD(P) transhydrogenase, subunit alpha part 1	2,08
PA3415	/	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	2,11
PA2853	OprI	Major outer membrane lipoprotein	2,12
PA3620	MutS	DNA mismatch repair protein MutS	2,14
PA0428	RhIE	ATP-dependent RNA helicase RhIE	2,14
PA4651	/	Probable pili assembly chaperone	2,16
PA2514	AntC	Anthranilate dioxygenase reductase	2,17
PA4412	MurG	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	2,18
PA3289	/	Uncharacterized protein	2,18
PA2345	/	Uncharacterized protein	2,19
PA4646	Upp	Uracil phosphoribosyltransferase	2,22
PA1943	/	Uncharacterized protein	2,24
PA2235	PsIE	PsIE	2,25
PA2841	/	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	2,25
PA4130	/	Probable sulfite or nitrite reductase	2,30
PA3120	LeuD	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	2,30
PA4958	FimW	Cyclic-di-GMP receptor FimW	2,30
PA1745	/	Uncharacterized protein	2,31
PA2169	/	Uncharacterized protein	2,33
PA2034	/	Uncharacterized protein	2,35
PA3452	Mqo1	Probable malate:quinone oxidoreductase 1	2,35
PA4735	/	Uncharacterized protein	2,36
PA3460	/	Probable acetyltransferase	2,36
PA2290	Gcd	Glucose dehydrogenase	2,37
PA2144	GlgP	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	2,37
PA2071	FusB	Elongation factor G 2	2,42
PA0861	/	Uncharacterized protein	2,42
PA4171	/	Probable protease	2,44
PA2247	BkdA1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	2,45
PA5170	ArcD	Arginine/ornithine antiporter	2,48
PA2158	/	Probable alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)	2,49
PA1041	/	Probable outer membrane protein	2,49
PA0919	/	Uncharacterized protein	2,50
PA3418	Ldh	Leucine dehydrogenase	2,51
PA5213	GcvP2	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2 (2,53
PA2153	GlgB	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	2,56
PA1914	/	Uncharacterized protein	2,56
PA3921	/	Probable transcriptional regulator	2,66

Fortsetzung Tab. 8.2

PA2173	/	Uncharacterized protein	2,68
PA2618	Bpt	Aspartate/glutamate leucyltransferase	2,71
PA2162	/	Probable glycosyl hydrolase	2,71
PA1874	/	Uncharacterized protein	2,72
PA3554	ArnA	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA	2,73
PA1875	/	Probable outer membrane protein	2,75
PA4420	RsmH	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	2,78
PA2184	/	Uncharacterized protein	2,79
PA2147	KatE	Catalase HPII	2,80
PA2939	Lap	Aminopeptidase	2,80
PA2402	/	Probable non-ribosomal peptide synthetase	2,84
PA0178	/	Probable two-component sensor	2,86
PA2248	BkdA2	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	2,87
PA2142	/	Probable short-chain dehydrogenase	2,88
PA2573	/	Probable chemotaxis transducer	2,92
PA5210	/	Probable secretion pathway ATPase	2,93
PA2572	/	Probable two-component response regulator	2,98
PA2067	/	Probable hydrolase	2,99
PA4648	/	Uncharacterized protein	3,01
PA5497	NrdJa	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	3,02
PA5299	/	Uncharacterized protein	3,03
PA1327	/	Serine protease (EC 3.4.21.-)	3,03
PA4656	/	Uncharacterized protein	3,05
PA0704	/	Probable amidase	3,05
PA2920	/	Probable chemotaxis transducer	3,07
PA3417	PdhA	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	3,08
PA2609	/	Uncharacterized protein	3,09
PA3416	/	Probable pyruvate dehydrogenase E1 component	3,15
PA2443	SdaA	L-serine dehydratase	3,18
PA3465	/	Uncharacterized protein	3,30
PA0575	/	Uncharacterized protein	3,32
PA2400	PvdJ	PvdJ	3,41
PA1930	/	Probable chemotaxis transducer	3,47
PA3121	LeuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	3,53
PA2164	/	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	3,57
PA5058	PhaC2	Poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2	3,59
PA3340	/	Uncharacterized protein	3,63
PA2160	/	Probable glycosyl hydrolase	3,70
PA0132	BauA	Beta-alanine--pyruvate aminotransferase	3,71
PA4781	/	Cyclic di-GMP phosphodiesterase	3,80
PA0180	CttP	Chemotactic transducer for trichloroethylene	3,84
PA0784	/	Probable transcriptional regulator	3,94
PA4925	/	Uncharacterized protein	3,98
PA3118	LeuB	3-isopropylmalate dehydrogenase	4,23
PA1880	/	Probable oxidoreductase	4,26

Fortsetzung Tab. 8.2

PA2424	PvdL	PvdL	4,37
PA2620	ClpA	ATP-binding protease component ClpA	4,58
PA4112	/	Histidine kinase (EC 2.7.13.3)	4,96
PA5220	/	Uncharacterized protein	5,06
PA2151	GlgE	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase	5,21
PA2108	/	Probable decarboxylase	5,21
PA1877	/	Probable secretion protein	5,46
PA2152	/	Probable trehalose synthase	5,91
PA2570	LecA	PA-I galactophilic lectin	6,39
PA0788	/	Uncharacterized protein	6,40
PA5546	/	Uncharacterized protein	6,83
PA2165	GlgA	Glycogen synthase	8,81
PA5181	/	Probable oxidoreductase	9,81
PA3622	RpoS	RNA polymerase sigma factor RpoS	10,33
PA2682	/	Uncharacterized protein	15,91
PA3792	LeuA	2-isopropylmalate synthase	44,06

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ pldB.

8.6 Ergänzung für Kapitel 3.5.1.1

Tab. 8.3: Identifizierte Proteine, die verschiedenen COG-Transportprozessen zugeordnet werden können (24-stündige Kultivierung).

PA- Nummer	Name	Produkt	Verhältnis Δ pldB/WT*	Lokalisation
Aminosäure-Transport				
PA2204	/	Putativer ABC-Transporter, Proteinbinde Komponente	0,26	Periplasma
PA3364	AmiC	Aliphatisches Amidase Expressionsregulierendes Protein	0,28	Zytoplasma
PA0872	PhhA	Phenylalanin-4-hydroxylase	0,31	Zytoplasma
PA2393	PvdM	Putative Dipeptidase	0,38	Zytoplasma
PA2119	adh	Zink-abhängige Alkoholdehydrogenase	0,40	Zytoplasma
PA2394	PvdN	PvdN	0,40	Periplasma
PA2413	PvdH	L-2,4-diaminobutyrat:2-ketoglutarat 4-aminotransferase	0,45	Zytoplasma
PA5100	HutC	Urocanase	0,45	Zytoplasma
PA5215	GcvT1	Aminomethyltransferase	0,45	Zytoplasma
PA5098	HutH	Histidin Ammonium-lyase	0,47	Zytoplasma
PA2444	GlyA2	Serin hydroxymethyltransferase 2	0,49	Zytoplasma
PA0051	PhzH	Putatives Phenanzin modifizierendes Protein	0,53	Zytoplasma
PA0932	CysM	Cysteinsynthase B	0,57	Zytoplasma
PA5214	GcvH1	Glycine Spaltungssystem Protein H1	0,58	Unbekannt
PA5025	MetY	Homocystein Synthase	0,60	Zytoplasma

Fortsetzung Tab. 8.3

PA5153	/	Putativer ABC-Transporter, Proteinbinde Komponente (Lysin, Arginin, Histidin)	0,60	Periplasma
PA1687	SpeE	Spermidin Synthase	0,65	Zytoplasma
PA4725	CbrA	Zweikomponenten-Sensor	1,51	Zytoplasmatische Membran
PA3710	/	Putative GMC-Typ Oxidoreduktase	1,73	Zytoplasmatische Membran
PA5173	ArcC	Carbamat Kinase	1,73	Zytoplasma
PA1340	AatM	ABC-Transporter Membranprotein	1,83	Zytoplasmatische Membran
PA2445	GcvP2	Glycine Spaltungssystem Protein P2	1,83	Zytoplasma
PA5172	ArcB	Ornithin Carbamoyltransferase	1,85	Zytoplasma
PA5171	ArcA	Arginin-Deiminase	1,93	Zytoplasma
PA2787	Cpg2	Carboxypeptidase G2 Precursor	1,94	Unbekannt
PA3459	AsnB	Putative Glutamin Amidotransferase	2,00	Zytoplasma
PA1341	AatQ	ABC-Transporter Membranprotein	2,04	Zytoplasmatische Membran
PA3120	LeuD	3-Isopropylmalat Dehydratase kleine Untereinheit	2,30	Zytoplasma
PA5170	ArcD	Antiporter für Arginin/Ornithin	2,48	Zytoplasmatische Membran
PA2158	/	Zink-abhängige Alkoholdehydrogenase	2,49	Zytoplasma
PA3418	Idh	Leucin Dehydrogenase	2,51	Zytoplasma
PA5213	GcvP1	Glycine Spaltungssystem Protein P2	2,53	Zytoplasma
PA2443	SdaA	L-serin Dehydratase	3,18	Zytoplasma
PA3121	LeuC	3-Isopropylmalat Dehydratase große Untereinheit	3,53	Zytoplasma
PA3118	LeuB	3-Isopropylmalat Dehydrogenase	4,23	Zytoplasma
PA2108	/	Putative Decarboxylase	5,21	Zytoplasmatische Membran
PA3792	LeuA	2-Isopropylmalat Synthase	44,06	Zytoplasma
Kohlenhydrat-Transport				
PA2300	ChiC	Chitinase	0,13	Extrazellulär
PA3195	GapA	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	0,29	Zytoplasma
PA1946	RbsB	ABC Ribose Transporter, Proteinbinde Komponente	0,46	Periplasma
PA0607	Rpe	Ribulose-phosphat 3-Epimerase	0,53	Zytoplasma
PA5167	DctP	C4-dicarboxylat-periplasmatisches Bindeprotein	0,54	Periplasma
PA3818	SuhB	Supressorprotein	0,57	Zytoplasma
PA3190	GltB	ABC-Transporter für Zucker	0,58	Periplasma
PA2290	Gcd	Glucose Dehydrogenase	2,37	Zytoplasma
PA2144	GlgP	Glycogen Phosphorylase	2,37	Zytoplasma
PA2153	GlgB	1,4-alpha-glucan <i>branching</i> Enzym	2,56	Zytoplasma

Fortsetzung Tab. 8.3

PA2162	/	Putative Glycosyl-Hydrolase	2,71	Zytoplasma
PA3554	ArnA	Polymyxin Resistenzprotein	2,73	Zytoplasma
PA2164	/	Putative Glycosyl Hydrolase	3,57	Zytoplasma
PA2160	GlgX	Putative Glycosyl Hydrolase	3,70	Zytoplasma
PA2152	/	Putative Trehalose Synthase	5,91	Zytoplasma
PA2165	GlgA	Putative Glyogen Synthase	8,81	Zytoplasma
Coenzym-Transport				
PA3441	SsuF	Putatives Molybdopterin-Bindeprotein	0,36	Unbekannt
PA4216	PhzG1	Putative Pyridoxamin 5'-phosphatoxidase	0,47	Zytoplasma
PA4217	PhzS	Flavin beinhaltende Monooxygenase	0,48	Zytoplasma
PA4190	PqsL	Putative FAD-abhängige Monooxygenase	0,54	Zytoplasma
PA0381	ThiG	Thiamin Biosynthese Protein	0,54	Zytoplasma
PA4180	/	Putative Acetolactat-Synthase, große Untereinheit	0,57	Zytoplasma
PA4400	MuT	Putative Pyrophosphorylase	0,58	Zytoplasma
PA0132	BauA	Pyruvat-Transaminase	3,71	Zytoplasma
PA2514	AntC	Anthranilat Dioxygenase Reduktase	2,17	Zytoplasma
PA3460	/	Putative Acetyltransferase	2,36	Zytoplasma
Inorganischer Ionentransport				
PA0283	Sbp	Sulfat-Bindeprotein	0,32	Periplasma
PA4587	CcpR	Cytochrom c551 Peroxidase	0,37	Periplasma
PA1292	/	Putative 3-mercaptopyruvat Sulfurtransferase	0,45	Periplasma
PA5505	/	Putativer TonB-abhängiger Rezeptor	0,51	Zytoplasmatische Membran
PA3790	OprC	Putative Kupfertransport Porin (OM)	0,53	Äußere Membran
PA1493	CysP	ABC-Transporter, Sulfat-Bindeprotein	0,56	Periplasma
PA2329	/	Putativer ABC-Transporter, ATP-binde Komponente	0,57	Zytoplasmatische Membran
PA4235	FtnA	Bacterioferritin	0,64	Zytoplasma
PA4130	/	Putative Sulfit oder Nitritreduktase	2,30	Zytoplasma
PA2147	KatE	Katalase HPII	2,80	Zytoplasma
Nukleotid-Transport				
PA0403	PyrR	Transkriptionsregulator PyrR	0,50	Zytoplasma
PA3295	/	Putatives HIT Protein	0,53	Zytoplasma
PA1155	NrdB	Ribonukleosid-diphosphat Reduktase	0,62	Zytoplasma
PA4646	Upp	Uracil Phosphoribosyltransferase	2,22	Zytoplasma
PA5497	NrdJa	Ribonukleosid-diphosphat Reduktase, Cobalamin-abhängig	3,02	Zytoplasma
PA1327	/	Serin Protease	3,03	Extrazellulär

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ plaB.

8.7 Ergänzung für Kapitel 3.5.1.3

Tab. 8.4: Signifikant abundanten Proteine, die dem „Lipidtransport & Metabolismus“ und der „Energiehomöostase“ zugeordnet wurden.

Zeitpunkt	PA-Nummer	Name	Produkt	Verhältnis $\Delta plaB/WT^*$
4h	PA2330	/	Hypothetisches Protein	0,27
	PA3924	/	Putative mittelkettige Acyl-CoA-Ligase	2,30
	PA1344	YvaG	Putative kurzkettige Dehydrogenase	2,42
	PA2717	Cpo	Chloroperoxidase	3,27
24 h	PA2000	DhcB	Dehydrocarnitin-CoA-Transferase, Untereinheit B	0,23
	PA5150	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	0,35
	PA2330	/	Hypothetisches Protein	0,39
	PA1999	DhcA	Dehydrocarnitin-CoA-Transferase, Untereinheit A	0,40
	PA3330	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	0,45
	PA0999	PqsD	3-Oxoacyl-[Acyl-Träger-Protein] Synthase III	0,46
	PA0887	AcsA, FabH1	Acetyl-CoA Synthetase 1	0,47
	PA1748	/	Putative Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase	0,49
	PA5188	/	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,49
	PA1828	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	0,54
	PA4389	/	3-Oxacyl-Acyl-Trägerprotein-Reduktase	0,55
	PA2199	/	Putative Dehydrogenase	0,55
	PA2554	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	0,57
	PA1610	FabA	Beta-Hydroxydecanoyl-ACP-Dehydrase	0,58
	PA4788	/	Hypothetisches Protein	1,71
	PA4786	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	1,75
	PA4733	AcsB	Acetyl-CoA Synthetase 2	1,75
	PA0743	/	3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase	1,84
	PA3924	/	Putative mittelkettige Acyl-CoA-Ligase	1,87
	PA4785	/	Putative Acyl-CoA Thiolase	2,00
	PA0227	/	Putative CoA-Transferase, Untereinheit B	2,05
	PA2841	PcaJ	Putative Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase	2,25
	PA2142	/	Putative kurzkettige Dehydrogenase	2,88
	PA5058	PhaC2, YhxC	Poly(3-hydroxyalkansäure)-Synthase 2	3,59
Energiehomöostase				
4 h	PA3723	YqjM	Putative FMN Oxidoreduktase	2,28
	PA2247	BkdA1	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,45
	PA3417	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Alpha-Untereinheit	2,65
	PA2248	BkdA2	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,66
	PA3416	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Betakette	2,66

Fortsetzung Tab. 8.4

24 h	PA1555	CooP2	Cytochrom-c-Oxidase, CooP Untereinheit	0,42
	PA1556	CcoO2	Cytochrom-c-Oxidase, CcoO Untereinheit	0,42
	PA5186	/	Putative eisenhaltige Alkohol-Dehydrogenase	0,50
	PA0519	NirS	Nitrit-Reduktase-Vorläufer	0,50
	PA2951	EtfA	Elektronentransfer-Flavoprotein-alpha-Untereinheit	0,58
	PA2952	EtfB	Elektronentransfer-Flavoprotein-beta-Untereinheit	0,58
	PA0747	/	Putative Aldehyd-Dehydrogenase	1,76
	PA3723	YqjM	Putative FMN Oxidoreduktase	2,04
	PA0195	PntAA	Putative NAD(P)-Transhydrogenase, Untereinheit alpha Teil 1	2,08
	PA3415	/	Putative Dihydrolipoamid-Acetyltransferase	2,11
	PA2514	AntC	Anthranilat-Dioxygenase-Reduktase	2,17
	PA2247	BkdA1	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,45
	PA2248	BkdA2	2-Oxoisovaleriansäure-Dehydrogenase	2,87
	PA5299	/	Hypothetisches Protein	3,03
	PA3417	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Alpha-Untereinheit	3,08
	PA3416	/	Putative Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente, Betakette	3,15
	PA1880	/	Putative Oxidoreduktase	4,26
	PA5181	/	Putative Oxidoreduktase	9,81

*alle Werte <0,66 sind niedrig abundant, alle Werte >1,5 sind hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ pldB.

Tab. 8.5: Hoch abundante Protein in *P. aeruginosa* Δ pldB, die RpoS reguliert sind (24 h).

PA-Nummer	Name	Produkt	Verhältnis Δ pldB/WT*
PA1745	/	Uncharacterized protein	2,31
PA1880	/	Probable oxidoreductase	4,26
PA1930	/	Probable chemotaxis transducer	3,47
PA2365	/	Uncharacterized protein	1,93
PA2572	/	Probable two-component response regulator	1,55
PA2573	/	Probable chemotaxis transducer	2,92
PA2939	Lap	Aminopeptidase	2,80
PA4296	PprB	Two-component response regulator, PprB	1,87
PA4648	/	Uncharacterized protein	3,01
PA4651	/	Probable pili assembly chaperone	2,16
PA4925	/	Uncharacterized protein	3,98
PA1914	/	Uncharacterized protein	2,56
PA2570	LecA	PA-I galactophilic lectin	6,39
PA2345	/	Uncharacterized protein	2,19
PA5058	PhaC2	Poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2	3,59

*PA2717 (Cpo) ist ebenfalls hoch abundant (3,27-fach) jedoch nach 4 h.

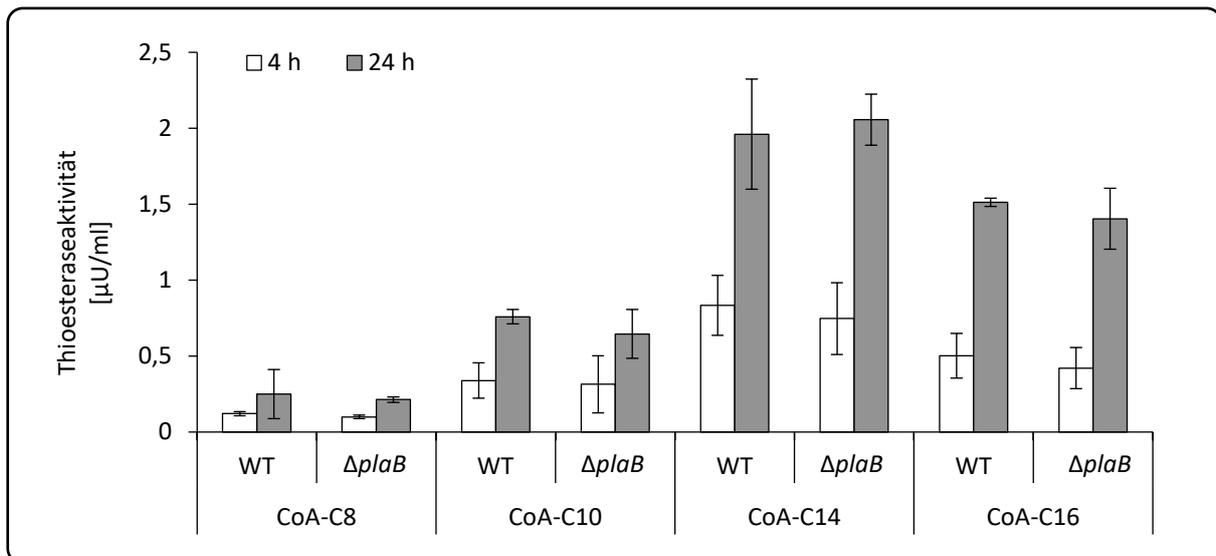
8.8 Ergänzung für Kapitel 4.3

Abb. 8.5: Die Thioesteraseaktivität von *P. aeruginosa* PA01 und $\Delta plaB$ unterscheidet sich nicht.

75 μ l Ganzzelllysate (O.D._{580nm} von 10) wurde mit 25 μ l der verschiedenen Acyl-CoA Thioester vermisch und zu DTNB zugegeben. CoA-C8: Octanoyl-Coenzym A, CoA-C10: Decanoyl-Coenzym A, CoA-C12: Lauroyl-Coenzym A, CoA-C14: Myristoyl-Coenzym A, CoA-C16: Palmitoyl-Coenzym A. Die zeitaufgelöste Messung der Substratumsatz erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von 2 h. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachmessung von biologischen Triplikaten dar.