

**Physiologische Charakterisierung der
Phospholipase PlaF aus *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Muttalip Caliskan

aus Marl

Düsseldorf, Januar 2024

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

Die vorliegende 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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
2. Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Oktober 2024

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation mit dem Titel „Physiologische Charakterisierung der Phospholipase PlaF aus *Pseudomonas aeruginosa*“ von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Alle Textstellen und Graphiken, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, sind mit entsprechenden Quellenangaben kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis angegeben. Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät eingereicht und ich habe bisher keine erfolglose Promotionsprüfung unternommen.

Düsseldorf, den _____

Muttalip Caliskan

für meine fltern

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber all jenen ausdrücken, die mich während meiner gesamten Promotionszeit unterstützt und an meiner Seite gestanden haben.

Besonders hervorheben möchte ich meinen Doktorvater, Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, der mir ein äußerst faszinierendes wissenschaftliches Thema zur Verfügung gestellt hat. Im Rahmen des SFB1208 schenkte er mir das Vertrauen das PlaF-Projekt voranzubringen. Die hilfreichen Tipps, insbesondere bei Vorbereitungen für Tagungen und wissenschaftliche Vorträge, haben dem Ganzen immer den letzten Schliff gegeben.

Auf diesem Wege möchte ich mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann für die Übernahme des Koreferats bedanken. Nachdem ich meine Bachelorarbeit bei ihm absolvieren durfte, unterstützte er mich auch darüber hinaus als Zweitgutachter für die Masterarbeit und nun auch für die Promotion.

Ein Dankeschön gilt Dr. Filip Kovacic für die jahrelange und sehr gute Zusammenarbeit an dem spannenden PlaF-Projekt. Ich bedanke mich für die unzähligen und stundenlangen wissenschaftlichen Diskussionen, die mir ermöglichten, die Forschungsarbeit aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Kai Stühler, Dr. Daniel Waldera-Lupa sowie Dr. Gereon Poschmann aus dem „Molecular Proteomics Laboratory“ des BMFZ der HHU für die durchgeführte Proteomstudie und den wissenschaftlichen Austausch. Ich danke auch Prof. Dr. Peter Dörmann und Dr. Meike Siebers aus dem Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn für die durchgeführte Lipidomstudie.

Ich möchte mich bei sämtlichen Mitarbeitern des IMETs herzlich für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und das äußerst angenehme Arbeitsklima bedanken. Ebenso gebührt meiner Arbeitsgruppe "Bacterial Enzymology" mein aufrichtiger Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich Peter und Flo für die äußerst humorvollen und unterhaltsamen Augenblicke, die wir im Labor geteilt haben. Vielen Dank Christoph für die schöne Zusammenarbeit am PlaF-Projekt. Danke auch an Dr. Stephan Thies für den wissenschaftlichen Austausch und die sehr hilfreichen Tipps und Tricks bei vielen experimentellen Ansätzen.

Mein Dank gilt allen Angehörigen des Sonderforschungsbereichs 1208 für die wöchentlichen Donnerstag-Meetings, den jährlichen Retreats, den Konferenzen und den geselligen Grillabenden.

Vielen herzlichen Dank an alle Beteiligten für die Durchsicht des Manuskripts.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken. Besonders danken möchte ich Andrea für die unermüdliche Hilfsbereitschaft sowohl beruflich als auch privat. Lieben Dank an Vanessa für die stundenlangen Videotelefonate, herzlichen Dank an Ariane für die unzähligen Spa-Aufenthalte und ganz lieben Dank an Marvin für die gemeinsame Zeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie meinen tiefen Dank aussprechen. Durch eure grenzenlose Geduld und eure liebevolle, bedingungslose Unterstützung habe ich die Möglichkeit erhalten, zu dem Menschen heranzuwachsen, der ich heute bin.

Publikationen

Caliskan, M., Poschmann, G., Gudzuhn, M., Waldera-Lupa, D., Molitor, R., Strunk, C. H., Streit, W. R., Jaeger, K.-E., Stühler, K., Kovacic, F. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* responds to altered membrane phospholipid composition by adjusting the production of two-component systems, proteases and iron uptake proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1868(6), 159317, doi: 10.1016/j.bbalip.2023.159317.

Bleffert, F., Granzin, J., Caliskan, M., Schott-Verdugo, S. N., Siebers, M., Thiele, B., Rahme, L., Felgner, S., Dörmann, P., Gohlke, H., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E., Kovacic, F. (2022). Structural, mechanistic, and physiological insights into phospholipase A-mediated membrane phospholipid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife*, 11, e72824, doi: 10.7554/eLife.72824.

Kovacic, 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, doi: 10.1002/2211-5463.12061.

Vorträge

Caliskan, M., Poschmann, G., Waldera-Lupa, D., Molitor, R., Jaeger, K.-E., Stühler, K., Kovacic, F.* (2023). *Pseudomonas aeruginosa* responds to altered membrane phospholipid composition by adjusting the production of two-component systems, proteases and iron uptake proteins. Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 10.-13.09.2023; Göttingen/Deutschland; Vortragsnummer MT06.

Kovacic, F.*, Caliskan, M., Waldera-Lupa, D., Siebers, M., Dörmann, P., Stühler, K., Jaeger, K.-E. (2019). Proteomics and lipidomics reveal modulation of virulence adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* by cytoplasmic membrane phospholipase A PlaF. 17th International conference on *Pseudomonas*. 22.-26.07.2019; Kuala Lumpur/Malaysia; Vortragsnummer PA-2019-062.

Caliskan, M.*, Waldera-Lupa, D., Stühler, K., Kovacic, F., Jaeger, K.-E. (2019). Modulation of virulence adaptation by the cytoplasmic membrane bound phospholipase PlaF disclosed by proteomics. Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 17.-20.03.2019; Mainz/Deutschland; Vortragsnummer SeSiV08.

Caliskan, M., Molitor, R., Siebers, M., Waldera-Lupa, D., Stühler, K., Dörmann, P., Kovacic, F.*, Jaeger, K.-E. (2018). Deletion of phospholipase PlaF affects membrane lipid composition and expression of virulence-related proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 15.-18.04.2018; Wolfsburg/Deutschland; Vortragsnummer MTV02.

*präsentierende:r Autor:in

Posterpräsentationen

Caliskan, M.*, Waldera-Lupa, D., Siebers, M., Dörmann, P., Stühler, K., Kovacic, F., Jaeger, K.-E. (2019). Modulation of virulence adaptation by a cytoplasmic membrane phospholipase A of *Pseudomonas aeruginosa* as disclosed by proteomics and lipidomics. 2nd International conference „Dynamics of Membrane Systems“. 12.-14.03.2019; Düsseldorf/Deutschland.

Caliskan, M.*, Strunk, C. H., Bleffert, F., Granzin, J., Batra-Safferling, R., Dörmann, P., Siebers, M., Rahme, L., Kovacic, F., Jaeger, K.-E. (2017). A membrane bound phospholipase A PlbF of *Pseudomonas aeruginosa*. 1st International conference „Dynamics of Membrane Systems“. 13.-15.09.2017; Düsseldorf/Deutschland.

Caliskan, M., Strunk, C. H., Bleffert, F., Granzin, J., Siebers, M., Schott, S., Dörmann, P., Rahme, L., Gohlke, H., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E., Kovacic, F.* (2017). Phospholipase A PlbF of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible role for membrane remodelling. 16th International conference on *Pseudomonas*. 05.-09.09.2017; Liverpool/England; Posternummer P178.

Kovacic, F.*, Bleffert, F., Schwabroch, T., Strunk, C., Caliskan, M., Granzin, J., Siebers, M., Dörmann, P., Rahme, L., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* phospholipases and lectins are potential therapeutic targets. 7th Congress of European Microbiologist by the Federation of European Microbiological Societies (FEMS) and the Spanish Society for Microbiology (SEM). 09.-13.07.2017; Valencia/Spain; Posternummer 348.

Strunk, C. H.*, Caliskan, M., Bleffert, F.; Granzin, J., Siebers, M., Dörmann, P., Rahme, L., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E., Kovacic, F. (2017). The role of phospholipase PlbF of *Pseudomonas aeruginosa* for virulence. Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 05.-08.03.2017; Würzburg/Deutschland; Posternummer 636.

*präsentierende:r Autor:in

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungen.....	VIII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Virulenzfaktoren von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2.1 Typ-IV-Pili	3
1.2.2 Flagellum	4
1.2.3 Lipopolysaccharide.....	4
1.2.4 Exotoxine.....	5
1.2.5 Proteasen	5
1.2.6 Pyoverdin	6
1.3 Biofilm	6
1.4 Zell-Zell-Kommunikationssysteme	8
1.5 Die Zytoplasmamembran Gram-negativer Bakterien.....	10
1.6 Phospholipasen.....	14
1.6.1 Biochemische Funktion von Phospholipasen.....	14
1.6.2 Phospholipasen aus <i>P. aeruginosa</i>	14
1.6.3 Phospholipase A PlaF	16
1.6.4 3D-Kristallstruktur von PlaF	18
1.6.5 PlaF ist ein Virulenzfaktor	20
1.7 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Geräte und Materialien.....	23
2.2 Chemikalien und Enzyme	24
2.3 Antikörper	24
2.4 Kits.....	24
2.5 DNA- und Proteingrößenstandards	25

2.6	Plasmide	25
2.7	Oligonukleotide.....	26
2.8	Bakterien.....	27
2.9	Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	28
2.9.1	Sterilisation von Medien	28
2.9.2	Lagerung und Anzucht von Bakterien	28
2.9.3	Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i>	29
2.9.4	Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i>	29
2.9.5	Biofilmproduktion unter statischen Bedingungen in 96-Mikrotiterplatten	30
2.9.6	Färben von adhärennten Zellen mit Kristallviolett	30
2.10	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.10.1	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.10.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.10.3	Sequenzierung von Plasmid-DNA	31
2.10.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.10.5	Zielgerichtete Mutagenese durch <i>In-Fusion Cloning Kit HD</i>	33
2.10.6	Enzymatische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	33
2.10.7	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA	33
2.10.8	Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	33
2.10.9	Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	34
2.10.10	Isolierung von RNA aus <i>P. aeruginosa</i>	34
2.10.11	Reverse Transkription	35
2.10.12	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	36
2.11	Biochemische Methoden	37
2.11.1	Herstellen von Proteinproben für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	37
2.11.2	Proteintrennung durch PAGE.....	37
2.11.3	Proteintrennung mittels SDS-PAGE	37
2.11.4	Coomassie-Färbung von Proteingelen	38
2.11.5	Immunhistochemische Detektion von Proteinen	38
2.11.6	Esteraseaktivität mit Ganzzellextrakten	39
2.11.7	Phospholipase A ₁ -Aktivität mit Ganzzellextrakten	40
2.11.8	Quantifizierung der proteolytischen Aktivität mit Ganzzellextrakten.....	41
2.11.9	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen aus Ganzzellextrakten	42

2.11.10	Lipidomstudie mittels <i>Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>	43
2.11.11	Quantifizierung der Pyoverdine	43
2.11.12	Kolorimetrische Quantifizierung von Eisen.....	44
2.11.13	Fluoreszenzmessung des <i>sfGFPs</i> in <i>E. coli ArcticExpress</i>	44
2.12	Programme und Datenbanken.....	45
3	Ergebnisse	47
3.1	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> zeigt verringerte Phospholipase A ₁ -Aktivität	47
3.2	Das verzögerte Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> unter pH- und Temperaturstress	49
3.3	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> bildet weniger Biofilm	55
3.4	Die Proteome von <i>P. aeruginosa</i> WT und Δ <i>plaF</i> unterscheiden sich	57
3.4.1	Die Deletion von <i>plaF</i> führt zu pleiotropen Effekten in allen zellulären Kompartimenten.....	59
3.4.2	Zweikomponentensysteme, c-di-GMPs und Chemotaxisproteine sind in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> beeinflusst.....	61
3.4.2.1	Biofilm-assoziierte Proteine sind stark beeinflusst	65
3.4.2.2	Proteine des regulatorischen PprAB-Netzwerks sind hoch abundant	66
3.4.3	Die Deletion von <i>plaF</i> hat Einfluss auf Transportprozesse und den zellulären Metabolismus	69
3.4.4	An der Phospholipid-Homöostase beteiligte Proteine sind beeinträchtigt.....	72
3.4.4.1	Die Phospholipidzusammensetzung unterscheidet sich in <i>P. aeruginosa</i> WT und Δ <i>plaF</i>	73
3.4.5	Die Eisen-Homöostase ist stark beeinflusst.....	76
3.5	Das TOXGREEN-System zur Analyse von Transmembran-Dimerisierung.....	79
3.5.1	Modifikation und Aufbau des PlaF-basierten TOXGREEN-Systems.....	81
3.5.2	ToxR-PlaF-Fusionskonstrukt (PlaF*) wird exprimiert und dimerisiert <i>in vivo</i>	82
3.5.3	Konstruktion von PlaF*-Varianten zur Untersuchung der Dimerisierung	84
4	Diskussion	87
4.1	Das Dimerisierungsverhalten von PlaF im TOXGREEN-System.....	87
4.2	PlaF modifiziert die Membranlipidzusammensetzung	90
4.3	PlaF beeinflusst zahlreiche Proteine unter Biofilmbedingung.....	94
4.4	PlaF beeinflusst Zweikomponentensysteme	95

4.5	PlaF beeinflusst die Eisen-Homöostase	98
4.6	PlaF beeinflusst Transportprozesse	100
5	Literaturverzeichnis	105
6	Anhang	126
6.1	Ergänzung zu Kapitel 3.1	126
6.2	Ergänzung zu Kapitel 3.4	126
6.3	Ergänzung zu Kapitel 3.4.2	135
6.4	Ergänzung zu Kapitel 3.4.2.2	136
6.5	Ergänzung zu Kapitel 3.4.3	137
6.6	Ergänzung zu Kapitel 4.3	138
6.7	Ergänzung zu Kapitel 4.1	140
	Erklärung zu veröffentlichten Werken	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i>	3
Abbildung 1.2: Die Entwicklung des Biofilms in fünf Phasen.	7
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der drei <i>Quorum sensing</i> -Systeme in <i>P. aeruginosa</i>	9
Abbildung 1.4: Aufbau eines Phospholipids und einer Zytoplasmamembran.....	12
Abbildung 1.5: Angriffspunkte von Phospholipasen.	14
Abbildung 1.6: PlaF zeigt Homologien zu bekannten Lipasen und Esterasen.	17
Abbildung 1.7: 3D-Kristallstruktur von PlaF als Homodimer mit endogenen Liganden.	19
Abbildung 1.8: Die Regulation der Aktivität von PlaF als Modell.....	20
Abbildung 1.9: <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> weist geringere Virulenz im Modellorganismus <i>G. mellonella</i> auf.....	21
Abbildung 3.1: <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> wies verringerte Phospholipase A ₁ -Aktivität auf.	48
Abbildung 3.2: Der Primärstoffwechsel von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> ist nicht beeinträchtigt.....	50
Abbildung 3.3: Das Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> unter verschiedenen Temperaturbedingungen.	52
Abbildung 3.4: Das Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> ist bei pH 5,0 deutlich verzögert.....	54
Abbildung 3.5: <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> produziert weniger Biofilm in den ersten 72 h.....	56
Abbildung 3.6: Die Proteome von <i>P. aeruginosa</i> WT und Δ <i>plaF</i> unterscheiden sich.	58
Abbildung 3.7: Proteine aus allen zellulären Kompartimenten sind beeinflusst.....	60
Abbildung 3.8: Funktionelle Kategorisierung bezüglich der biologischen Funktion nach COG.	61
Abbildung 3.9: Signalübertragungssysteme in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> sind beeinflusst.....	63
Abbildung 3.10: Biofilm-assoziierte Proteine sind in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> beeinflusst.....	66
Abbildung 3.11: Gene des PprAB-Netzwerks sind vereinzelt hochreguliert.....	68
Abbildung 3.12: PlaF beeinflusst das metabolische Netzwerk.	70
Abbildung 3.13: Zahlreiche ABC-Transportproteine sind in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> beeinflusst.....	71
Abbildung 3.14: PlsX und Cfa der Membranlipidhomöostase sind in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> beeinflusst.	73
Abbildung 3.15: Die Zusammensetzung der Phospholipide unterscheiden sich in <i>P. aeruginosa</i> WT und Δ <i>plaF</i>	75
Abbildung 3.16: Die Eisen-Homöostase-Netzwerke sind in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i> beeinflusst.	77
Abbildung 3.17: Das PlaF-basierte TOXGREEN-System als schematische Übersicht dargestellt... ..	80
Abbildung 3.18: Aufbau und Klonierung des PlaF-basierten TOXGREEN-Systems.	81
Abbildung 3.19: PlaF* ist funktional und dimerisiert im TOXGREEN-System.	83

Abbildung 3.20: PlaF-Varianten mit Einzelmutationen im TOXGREEN-System. 85

Abbildung 4.1: Schematisches Modell für das Zusammenspiel zwischen PlaF, PL-Modifizierung und Biofilmwegen..... 103

Abbildung 6.1: Positivkontrolle der Phospholipase A₁-Aktivität mit dem Enzym Lecitase Ultra. 126

Abbildung 6.2: Phänotypische Analyse von *P. aeruginosa* Δ *plaF* zeigt Biofilmdefekt unter dynamischer Kultivierungsmethode. 139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Materialien	23
Tabelle 2.2: Verwendeter Antikörper	24
Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Kits	24
Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Größenstandards.....	25
Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Plasmide	25
Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	26
Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten prokaryotischen Zellen.....	27
Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Antibiotika	28
Tabelle 2.9: Zusammensetzung der PCR	32
Tabelle 2.10: Programm-Einstellung des Thermozyklers.....	32
Tabelle 2.11: Zusammensetzung der cDNA-Synthese.....	36
Tabelle 2.12: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes	36
Tabelle 2.13: Programm-Einstellung der <i>Real-Time</i> PCR	36
Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE	38
Tabelle 2.15: Einstellung der Parameter für PLA ₁ -Aktivitätsmessung im <i>Tecan M1000Pro</i>	41
Tabelle 2.16: Einstellung der Parameter für Protease-Aktivitätsmessung im <i>Tecan M1000Pro</i> ...	42
Tabelle 2.17: Einstellung der Parameter für <i>sfGFP</i> -Fluoreszenz im <i>Tecan M1000Pro</i>	45
Tabelle 2.18: Übersicht der verwendeten Programme und Datenbanken.....	45
Tabelle 3.1: Liste der PprAB-regulierten Proteine, die in <i>P. aeruginosa ΔplaF</i> beeinflusst wurden	67
Tabelle 6.1: Alle signifikanten Proteine, die in <i>P. aeruginosa ΔplaF</i> hoch abundant waren	126
Tabelle 6.2: Alle signifikanten Proteine, die in <i>P. aeruginosa ΔplaF</i> niedrig abundant waren	131
Tabelle 6.3: Beeinträchtigte Proteine des regulatorischen Biofilm-Netzwerks in <i>P. aeruginosa ΔplaF</i>	135
Tabelle 6.4: Liste der Proteine des PprAB-Netzwerks.....	136
Tabelle 6.5: Liste der Transporter, die in <i>P. aeruginosa ΔplaF</i> beeinflusst wurden	137
Tabelle 6.6: Liste aller Wechselwirkungen innerhalb der PlaF-Dimer-Schnittstelle.	140

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
≈	Rundungszeichen, „etwa gleich“
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µs	Mikrosekunden
3-oxo-C12-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Dodecanoyl)-L-Homoserin-Lacton
∞	unendlich
Å	Ångström
A _{550nm}	Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm
ADP	Adenosindiphosphat
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
Asp ₂₅₈	Asparaginsäure an der Position 258
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search</i>
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophage</i> , aus dem Knochenmark stammende Makrophage
BP	Basenpaare
BPS	Bathophenanthrolindisulfonsäure Dinatriumsalz Trihydrat
bzw.	beziehungsweise
C11	Undecansäure
C12	Dodecansäure
C4-HSL	<i>N</i> -Butanoyl-L-Homoserin-Lacton
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
c-di-GMP	bis-(3'-5')-zyklische di-Guanosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CL	Cardiolipin
cm	Zentimeter
COG	<i>Clusters of orthologous groups</i> , Cluster orthologer Gruppen
C-terminal	Carboxyl-terminal
cUMP	zyklisches Uridinmonophosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DGC	Diguanylatcyclase
dm	Dezimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i> , numerisches Klassifikationssystem für Enzyme
eDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em _{515 nm}	Emission bei einer Wellenlänge von 515 nm
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESI-MS	<i>electrospray ionisation mass spectrometer</i>

Abkürzung	Bedeutung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EX _{490 nm}	Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm
fw	<i>forward</i> , vorwärts
x g	x-fache der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
Glu	Glutaminsäure
GMP	Guanosinmonophosphat
GpA	Glykophorin A
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺ -Kanal	Protonenkanal
H ₂ O	Wasser
HHQ	2-Heptyl-4-hydroxyquinoline
His	Histidin
His ₂₈₆	Histidin an Position 286
HK	Histidinkinase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Hz	Hertz
Ile	Isoleucin
IPA	Isopropylalkohol
JM	Juxtamembrandomäne
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
Leu	Leucin
Log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
Log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MBP	Maltosebindeprotein
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPL	<i>Molecular Proteomics Laboratory</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
MYR	Myristidinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
N-terminal	Amino-terminal
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD _{580nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm
OG	<i>n</i> -Octyl-β-D-Glucosid
OMV	<i>outer membrane vesicles</i>
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzung	Bedeutung
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
PLA ₁	Phospholipase A1
PLA ₂	Phospholipase A2
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pmol	Pikomol
pNPB	<i>para</i> -Nitrophenylbutyrat
Pqs	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
PS	Phosphatidylserin
Pvd	Pyoverdin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QS	<i>Quorum sensing</i>
Q-TOF-MS	<i>quadrupole-time of flight-mass spectrometry</i>
Rhl	Rhamnolipid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RND	<i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>
RR	<i>response regulator</i> , Regulationsprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time</i> PCR
rv	<i>reverse</i> , rückwärts
SBP	Substrat bindendes Protein
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Ser ₁₃₇	Serin an Position 137
sfGFP	<i>super folder</i> Grün-fluoreszierende Protein
sn	<i>stereospecific numbering</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
TPS	<i>two-partner secretion</i> , Zwei-Partner-Sekretion
u.a.	unter anderem
U/μl	Units pro Mikroliter
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
Val	Valin
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
WHO	<i>world health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
ZF	Zystische Fibrose
ZKS	Zweikomponentensystem
ZM	Zytoplasmamembran
α	alpha
β	beta

Zusammenfassung

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives opportunistisches Humanpathogen und weltweit die häufigste Ursache nosokomialer Infektionen. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens und der Fähigkeit, zahlreiche Antibiotikaresistenzen zu entwickeln, stuft die WHO im Jahr 2017 *P. aeruginosa* in die höchste Prioritätsklasse für die Erforschung und Entwicklung neuer medikamentöser Therapien ein. Die Pathogenität dieses Bakteriums beruht auf einer Vielzahl von Zell-assoziierten und sekretierten Virulenzfaktoren. Diese stehen besonders im Fokus der medizinischen Forschung, da sie alternative Angriffspunkte für neue antimikrobielle Therapien darstellen. Zahlreiche hydrolytische Enzyme, wie beispielsweise Phospholipasen, wurden bereits in *P. aeruginosa* als Virulenzfaktoren identifiziert. Allerdings kodieren immer noch mehr als 40 Prozent des *P. aeruginosa*-Genoms für Gene, deren Funktionen noch unbekannt und nicht näher charakterisiert sind.

Das Gen *pa2949* (*plaF*) aus *P. aeruginosa* kodiert für eine membranverankerte Phospholipase A₁, die maßgeblich zur Virulenz des Humanpathogens beiträgt. In ersten Forschungsarbeiten war es gelungen, die 3D-Struktur von PlaF aufzuklären und die Aktivität, die über ein Liganden-vermitteltes Monomer-Dimer-Gleichgewicht reguliert wird, gegen verschiedene Substrate zu spezifizieren. Allerdings ist die genaue physiologische Rolle, durch die PlaF zur Virulenz beiträgt, bislang noch unerforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von PlaF im physiologischen Kontext näher untersucht. Wie aufgrund der zellulären Lokalisation in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* vermutet, konnte im Rahmen einer vergleichenden Lipidomstudie (WT vs. Δ *plaF*) eine Beteiligung von PlaF an der Membranlipidhomöostase nachgewiesen werden. *P. aeruginosa* Δ *plaF* wies eine deutlich verzögerte *lag*-Phase bei Wachstumsanalysen unter Stressbedingungen und ein signifikantes Defizit in der Biofilmbildung im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT auf. Quantitative Proteomstudien unter Biofilmbedingungen zeigten pleiotrope Effekte in *P. aeruginosa* Δ *plaF*, die sich in unterschiedlichen Expressionslevels zahlreicher Transporter, Zweikomponentensysteme, Eisenaufnahmesysteme und Biofilm-assoziierten Proteinen widerspiegelten. Das am stärksten beeinflusste Zweikomponentensystem war PprAB, das in *P. aeruginosa* eine entscheidende Schlüsselrolle beim Wechsel aus der planktonischen zur sessilen Lebensform einnimmt. Darüber hinaus waren in *P. aeruginosa* Δ *plaF* nahezu alle Proteine des Pyoverdin-abhängigen Eisenaufnahmesystems niedrig abundant, während Proteine aus alternativen Eisenaufnahmesystemen (Feo-, Pyochelin- und Citrat-System) hoch abundant waren. Insgesamt

verdeutlicht die Studie, dass die veränderte Membranlipidhomöostase in *P. aeruginosa* Δ *plaF* eine wesentliche Rolle in der Anpassung von regulatorischen Proteinnetzwerken spielt.

Um die Regulation der PlaF-Dimerisierung als molekularer Schlüsselvorgang für die Aktivität des Proteins näher untersuchen zu können, wurde das PlaF-basierte TOXGREEN-System entwickelt. Es wurde gezeigt, dass PlaF* (ToxR-PlaF-Fusionsprotein) *in vivo* dimerisiert. Verschiedene PlaF*-Varianten mit einzelnen Mutationen in der Transmembrandomäne wurden untersucht. Dabei ergaben die Analysen unterschiedliche Auswirkungen auf die Dimerisierung der PlaF*-Varianten. Mithilfe des etablierten PlaF-basierten TOXGREEN-Systems werden zukünftige Analysen zur PlaF-Dimerisierung unter verschiedenen Bedingungen ermöglicht.

Summary

The Gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for the majority of nosocomial infections worldwide. In 2017, the WHO categorized *P. aeruginosa* in the highest priority class for the urgent research and development of novel drugs. The pathogenicity of this bacterium is linked to a range of cell-associated and secreted virulence factors, which are of particular interest for medical research as they represent alternative targets for novel antimicrobial therapies. Hydrolytic enzymes, such as phospholipases, have already been characterized as virulence factors in *P. aeruginosa*. However, over 40 percent of the *P. aeruginosa* genome still encodes genes with unknown function.

The gene *pa2949* (*plaF*) from *P. aeruginosa* was found to encode a novel membrane-bound phospholipase A₁, which contributes to bacterial virulence. Initial research led to the resolution of the crystal structure of PlaF and revealed a ligand-mediated monomer-dimer equilibrium dependent on the catalytic activity towards natural phospholipid substrates. However, the precise physiological role by which PlaF contributes to virulence remains unknown and requires further elucidation.

The involvement of PlaF in the membrane lipid homeostasis was demonstrated by a comparative lipidome study of the *P. aeruginosa* WT and Δ *plaF* strain. Further studies indicated that the early growth phase and the biofilm formation were affected in *P. aeruginosa* Δ *plaF* compared with *P. aeruginosa* WT. Additional quantitative proteomic studies under biofilm conditions revealed pleiotropic effects in *P. aeruginosa* Δ *plaF*, by which numerous transporters, two-component systems, iron uptake systems and biofilm-associated proteins were significantly dysregulated. PprAB was the most affected two-component system, which plays a crucial key role in *P. aeruginosa* to switch from the planktonic to the biofilm lifestyle. Moreover, the pyoverdine-dependent iron uptake system was one of the most downregulated protein networks, whereas proteins from alternative iron uptake systems (*feo*-, *pyocheline*- and *citrate*-system) were highly abundant. In summary, this study highlights that the altered membrane lipid composition affected in *P. aeruginosa* Δ *plaF* plays an essential role in the adaptation of the global regulatory protein network.

To understand the regulation of PlaF dimerization on the molecular level, a PlaF-based TOXGREEN system has been developed. PlaF* (ToxR-PlaF fusion protein) was shown to dimerise *in vivo* using the TOXGREEN system. Different PlaF*-variants, by which single mutations in the transmembrane domain were introduced, were also constructed. Further analysis revealed different effects on the

dimerization of the PlaF-variants. Using the established PlaF-based TOXGREEN system, future analysis of PlaF-dimerization under different conditions will be enabled.

1 Einleitung

Die verstärkte Ausbreitung bakterieller Infektionen gilt als eine der großen Herausforderungen der nahen Zukunft. Weltweit werden zunehmend neue Resistenzmechanismen von pathogenen Erregern gegen antimikrobielle Substanzen entdeckt, die die Wirksamkeit von Antibiotika umgehen (Lambraki *et al.*, 2022). Antibiotika sind die Arzneimittel der ersten Wahl, wenn es um die Behandlung von bakteriellen Infektionen geht. Jedoch stellt die übermäßige Verabreichung in der Medizin und auch der prophylaktische Einsatz in der landwirtschaftlichen Massentierhaltung eine globale Bedrohung dar (Mulchandani *et al.*, 2023). Dementsprechend werden in der Medizin dringend alternative Therapien benötigt, die sich beispielsweise gegen Virulenz-assoziierte Proteine des pathogenen Erregers richten (Fair & Tor, 2014, Butler & Paterson, 2020). Um moderne Therapien zu entwickeln, erfordert dieses Ziel ein tiefes Verständnis über die komplexen regulatorischen Netzwerke, insbesondere der Virulenz-assoziierten Proteine. Aus diesem Grund ist die Grundlagenforschung ein unverzichtbarer Baustein in der medizinischen Forschung.

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Der Krankenhauskeim *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Gram-negatives, polar-begeißeltes Stäbchenbakterium der Klasse der *Gammaproteobacteria*. Innerhalb der *Gammaproteobacteria* ist die Spezies *P. aeruginosa* der Gattung *Pseudomonas*, welche zur Familie *Pseudomonadaceae* und der Ordnung *Pseudomonadales* angehören, untergeordnet (Winslow *et al.*, 1917, Orla-Jensen, 1921, Palleroni, 1993).

P. aeruginosa ist aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit ubiquitär in feuchten Böden, Gewässern, aber auch in Schwimmbädern oder Sanitäreinrichtungen weit verbreitet (Kehl *et al.*, 2022). Da *P. aeruginosa* auch in Desinfektionsmitteln oder Seifenspender überlebensfähig ist, stellt der Krankenhauskeim auch in medizinischen Einrichtungen mit hohen Hygienestandards ein ernstzunehmendes Problem dar (Lanini *et al.*, 2011, Kehl *et al.*, 2022). Besonders die Anwendung von medizinischen Materialien wie Katheter, Atemschläuche oder Beatmungsgeräte an immungeschwächten Patienten stellen ein erhöhtes Risiko für eine nosokomiale Infektion durch *P. aeruginosa* dar (Gaynes *et al.*, 2005). Demgegenüber sind Menschen mit einem intakten Immunsystem weniger gefährdet, weshalb der Keim auch als opportunistisches Pathogen bezeichnet wird. Patienten mit der erbbedingten Stoffwechselerkrankung Zystische Fibrose (ZF) leiden besonders an einer *P. aeruginosa*-Infektion, da betroffene Organe zähflüssigen Schleim bilden und dadurch ideale Bedingungen für den Organismus darbieten (Williams *et al.*, 2010). Zu den am häufigsten beobachteten nosokomialen Erkrankungen, die durch *P. aeruginosa* verursacht

werden, gehören Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Enterokolitis oder Meningitis (Bodey *et al.*, 1983, Gaynes *et al.*, 2005). Ein weiterer Punkt, weshalb *P. aeruginosa* als besorgniserregendes Pathogen betrachtet wird, ist die zunehmende Resistenzbildung gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika (Hancock, 1998). Daher stufte die Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) im Jahr 2017 *P. aeruginosa* in die höchste Prioritätsklasse für die dringende Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika ein (Tacconelli *et al.*, 2018). Mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms war es erstmals im Jahr 2000 gelungen, 5570 offene Leserahmen (ORFs, *open reading frames*) von *P. aeruginosa* zu identifizieren (Stover *et al.*, 2000), was die Grundlage für die Erforschung von *Pseudomonas*-Infektionen darstellt.

1.2 Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Pathogenität von *P. aeruginosa* beruht auf einer Vielzahl von Zell-assoziierten und Nicht-Zell-assoziierten Virulenzfaktoren, die ein breites Spektrum an Funktionen erfüllen (Abbildung 1.1). Dabei unterstützen Virulenzfaktoren unter anderem die Fähigkeit, sich im Wirtsorganismus zu vermehren, die Immunantwort des Wirtes zu umgehen sowie die gezielte Schädigung der Wirtszelle zu erzielen (Hall *et al.*, 2016, Thi *et al.*, 2020). Zu den Zell-assoziierten Virulenzfaktoren gehören u.a. Typ-IV-Pili (Kapitel 1.2.1), Flagellum (Kapitel 1.2.2) sowie Lipopolysaccharide (Kapitel 1.2.3). Demgegenüber gehören beispielsweise Exotoxine (Kapitel 1.2.4), Proteasen (Kapitel 1.2.5), Pyoverdine (Kapitel 1.2.6), Exopolysaccharide (Kapitel 1.3) und Phospholipasen (Kapitel 1.6.2) zu den Nicht-Zell-assoziierten Virulenzfaktoren (Abbildung 1.1).

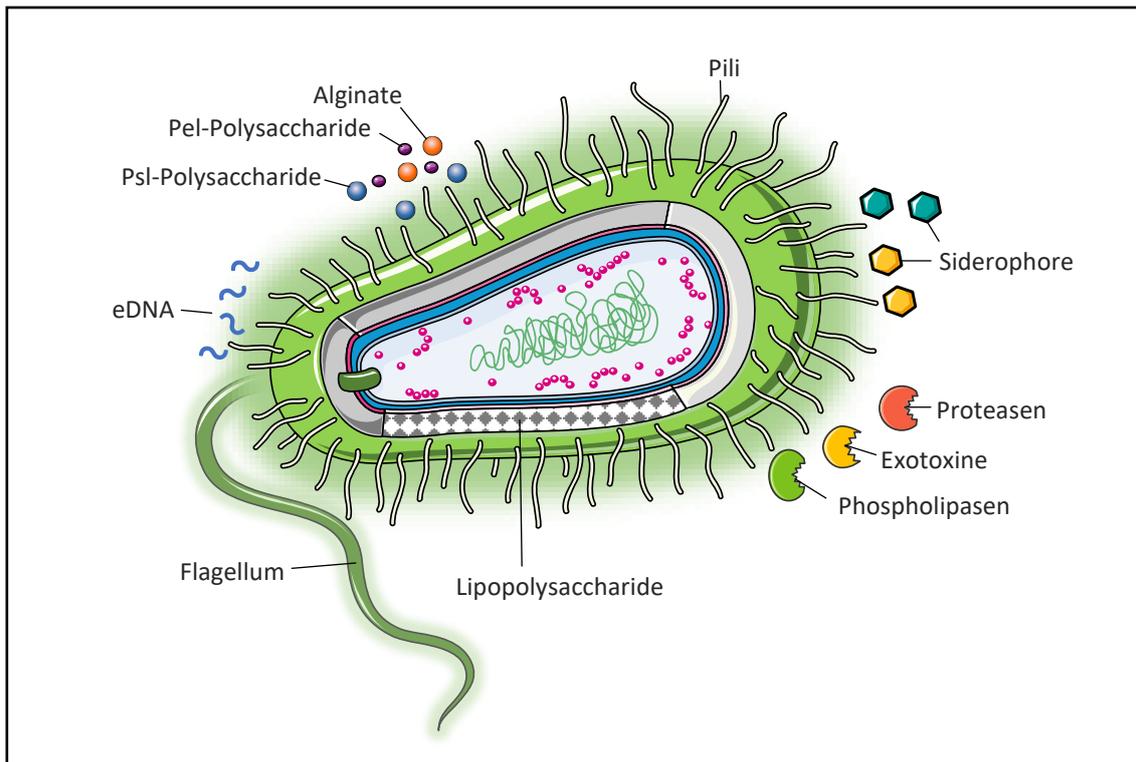


Abbildung 1.1: Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*.

Die Pathogenität von *P. aeruginosa* wird durch zahlreiche Virulenzfaktoren vermittelt. Zu den Zell-assoziierten Virulenzfaktoren gehören unter anderem das Flagellum, die Typ-IV-Pili sowie Lipopolysaccharide. Zu den sekretierten Virulenzfaktoren gehören Exopolysaccharide (Pel, Psl und Alginat), extrazelluläre DNA (eDNA), Siderophore sowie Proteasen, Exotoxine und Phospholipasen. Die Abbildung wurde mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0).

1.2.1 Typ-IV-Pili

Typ-IV-Pili, bestehend aus mehreren kleinen Proteinkomponenten, können als fadenförmige Zellfortsätze von zahlreichen Prokaryoten gebildet werden (Craig *et al.*, 2004). In *P. aeruginosa* sind bisher drei Pili-Klassen (Typ-IVa, Typ-IVb und Typ-IVb-Tad) beschrieben, die sich aufgrund ihrer Zusammensetzung und Größe unterscheiden. Physiologisch betrachtet sind Pili maßgeblich an der Adhäsion an Oberflächen, Biofilmbildung und *Twisting*-Motilität beteiligt (Burrows, 2012). Dabei liefern zytoplasmatische ATPasen die Triebkraft für die zyklische Extension und Kontraktion der nach außen gerichteten Pili, wobei im Falle einer Kontraktion die Zelle in Richtung des Anheftungspunktes gezogen wird (Takhar *et al.*, 2013). Außerdem wird die kontraktile Pili-Bewegung mit der Aktivierung des chemosensorischen Chp-Systems in Verbindung gebracht (Persat *et al.*, 2015). Das Chp-System ist ein komplexes Signaltransduktionssystem, welches den cAMP-Spiegel (zyklisches Adenosinmonophosphat) in *P. aeruginosa* reguliert (Fulcher *et al.*, 2010), das wiederum den Transkriptionsfaktor Vfr (*Virulence factor regulator*) aktiviert, um folglich die Transkription von weiteren Virulenzfaktoren zu regulieren (Fuchs *et al.*, 2010).

1.2.2 Flagellum

Das Flagellum ist ein weiterer fadenförmiger Zellfortsatz von *P. aeruginosa* und dient primär zur Fortbewegung, Adhäsion und Biofilmbildung. *P. aeruginosa* besitzt ein einzelnes Flagellum, welches an einem Zellpol des Bakteriums lokalisiert ist (Haiko & Westerlund-Wikstrom, 2013). Der Aufbau eines Flagellums besteht aus einem Basalkörper mit einem ringförmigen Rotor, der sich aus mehreren Proteinkomponenten zusammensetzt und in der äußeren Membran, im Periplasma und in der Zytoplasmamembran eingebettet ist (Belas, 2014). Am Basalkörper sind die Statorproteine MotA und MotB verknüpft und bilden zusammen einen Protonenkanal (H⁺-Kanal), der die Rotation des Flagellums ermöglicht (Toutain *et al.*, 2005). Der äußere Teil besteht aus einem Filament und einem sogenannten *Hook*-Element. Dabei ist das Filament hauptsächlich aus Flagellin, dem Hauptbestandteil des Flagellums, aufgebaut (Turner *et al.*, 2000, Samatey *et al.*, 2004). Das humane TLR5 aus der Familie der *Toll-like*-Rezeptoren erkennt bakterielles Flagellin und ist verantwortlich für die Immunantwort (Akira *et al.*, 2001, Feuillet *et al.*, 2006). Einer Studie zufolge konnte gezeigt werden, dass in Epidermiszellen (Keratinozyten), die mit gereinigtem Flagellin behandelt wurden, eine Reihe von Entzündungsreaktionen, wie beispielweise die Bildung von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden hervorgerufen werden (Garcia *et al.*, 2018).

1.2.3 Lipopolysaccharide

Die in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien lokalisierten Lipopolysaccharide (LPS) stellen Endotoxine dar und bilden eine schützende Barriere gegen äußere Umwelteinflüsse (Pier, 2007). LPS setzen sich aus dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen zusammen (Bertani & Ruiz, 2018). Das Lipid A besteht aus variablen hydrophoben Acylketten, die über Ester- oder Amidbindungen an ein Glucosamindimer gebunden sind. Es stellt das eigentliche Endotoxin dar, welches durch Membranvesikel (*OMV*, *outer membrane vesicles*) oder durch bakterielle Zellyse freigesetzt wird und stark toxisch wirkt (Miller *et al.*, 2012). Lipid A wird durch den humanen *Toll-like*-Rezeptor 4 (TLR4) zusammen mit MD2 (*Myeloid Differentiation factor 2*) erkannt, was zur Folge hat, dass Zytokine und antimikrobielle Peptide ausgeschüttet werden (Park *et al.*, 2009). Die Kernregion, welche an Lipid A gebunden ist, setzt sich im Wesentlichen aus 2-Keto-3-desoxy-octonat und Oligosacchariden wie beispielsweise Glukose, Galaktose und Heptose zusammen (King *et al.*, 2009). In *P. aeruginosa* ist die innere Kernregion der LPS hoch konserviert und ist aus zwei phosphorylierten Heptosen aufgebaut, wobei vermutet wird, dass die Phosphorylierung zu einer höheren Resistenz gegenüber Antibiotika führt (Walsh *et al.*, 2000). Den äußeren Bereich

der LPS stellt das O-Antigen dar. Dieses besteht aus linear oder verzweigt angeordneten Oligosacchariden (u.a. Glukose, Galaktose, Mannose, Rhamnose), welche sich in der Zusammensetzung je nach Spezies enorm unterscheiden (Lerouge & Vanderleyden, 2002, King *et al.*, 2009). In Infektionsstudien zeigten *P. aeruginosa* Mutanten mit fehlendem O-Antigen eine deutlich geringere Virulenz (Kintz & Goldberg, 2008).

1.2.4 Exotoxine

ExoS, ExoT, ExoU (Kapitel 1.6.2) und ExoY sind Effektorproteine von *P. aeruginosa*, die mithilfe des Typ III-Sekretionssystems in die Wirtszelle injiziert werden. Die beiden Exotoxine ExoS und ExoT sind bifunktionale Proteine, die einerseits eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Adenosindiphosphat) aufweisen und andererseits als GTPase-aktivierendes Enzym (Guanosintriphosphat) agieren. Beide Aktivitäten haben eine degradierende Wirkung auf das eukaryotische Aktinzytoskelett, die zum Apoptose-ähnlichem Zelltod führt (Hauser, 2009, Kaminski *et al.*, 2018). ExoY ist eine Adenylylcyclase und gehört zur Klasse der molekülpaltenden Lyasen (Yahr *et al.*, 1998). In Studien wurde gezeigt, dass die Injektion von ExoY über das Typ III-Sekretionssystem zu einer Akkumulation von zyklischen Nukleotidmonophosphaten wie cAMP, cGMP oder cUMP (zyklisches Adenosinmonophosphat, Guanosinmonophosphat, Uridinmonophosphat) führt (Beckert *et al.*, 2014).

1.2.5 Proteasen

AprA, LasA und LasB sind die am häufigsten beschriebenen Proteasen aus *P. aeruginosa*. AprA ist eine alkalische Protease und ist in der Lage, die humane Komplementkomponente C3 zu degradieren und damit die Aktivierung des Komplementsystems zu blockieren (Laarman *et al.*, 2012). Da das Komplementsystem ein Teil des angeborenen Immunsystems ist, kann dessen Inaktivierung zu schwerwiegenden bakteriellen Infektionen führen (Audemard-Verger *et al.*, 2016). LasA und LasB sind Elastasen und können Schädigungen im Lungengewebe und in Blutgefäßen durch den Abbau von Elastin herbeiführen (Toder *et al.*, 1994, Saint-Criq *et al.*, 2018). Neben einer elastolytischen Aktivität wird LasA auch eine staphylolytische Aktivität zugeschrieben. Hierbei werden die Pentaglycinbrücken des Peptidoglykans aus *Staphylococcus aureus* hydrolysiert, um damit die Konkurrenz während einer Kolonisierung zu eliminieren (Kessler *et al.*, 1993). LasB ist eine Zink-abhängige Metalloprotease mit der Fähigkeit, neben Elastin auch weitere Substrate zu degradieren. Dazu zählen u.a. Strukturproteine der

extrazellulären Matrix wie Kollagen und Laminin, Immunglobuline, Zytokine, aber auch Proteine bakteriellen Ursprungs wie Flagellin, ExoS oder ExoT (Everett & Davies, 2021).

1.2.6 Pyoverdin

Eisen stellt ein wichtiges Element für zahlreiche biologische Prozesse wie den Stoffwechsel, die Genregulation oder die DNA-Biosynthese dar (Andrews *et al.*, 2003). Das Pyoverdin (Pvd) aus *P. aeruginosa* ist eines von zwei hochaffinen Siderophoren, welche spezifisch Fe³⁺-Ionen aus der Umgebung komplexieren können und diese dem Pathogen zur Verfügung stellen. Die Pyoverdinbiosynthese sowie die Eisenaufnahme sind in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit in *P. aeruginosa* durch den übergeordneten Eisenregulator Fur (*ferric uptake regulator*) streng reguliert (Cornelis *et al.*, 2009). PvdS stellt einen Sigmafaktor für die Transkription der Gene, welche für die Pyoverdinbiosynthese erforderlich sind, dar. Zugleich ist PvdS für die Genexpression weiterer Virulenzfaktoren, u.a. das Exotoxin A oder die alkalische Protease AprA (Kapitel 1.2.5), verantwortlich (Shigematsu *et al.*, 2001, Lamont *et al.*, 2002). Pyoverdin selbst wird ebenfalls als Virulenzfaktor betrachtet, da es im Rahmen einer Kolonisation mit Eisenchelatoren anderer Organismen aus der Umgebung um das verfügbare Eisen konkurriert. Einer Studie zufolge wurde gezeigt, dass Pyoverdin bis in die Mitochondrien von *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) eindringt und dem Organell das Eisen entzieht. Der Eisenentzug wiederum schädigt Mitochondrien dermaßen, dass ein autophagozytischer Prozess eingeleitet wird, was zur Folge hat, dass die Mitochondrien abgebaut werden (Kang *et al.*, 2018).

1.3 Biofilm

Eine charakteristische Eigenschaft von Mikroorganismen ist die Fähigkeit der Biofilmbildung, welche erwiesenermaßen die bevorzugte Lebensform in natürlichen Habitaten ist (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Dennoch stellen Biofilme vieler Bakterien heutzutage immer noch ein erhebliches Problem in natürlichen Nischen, auf industriellen Oberflächen und in der Therapie von Infektionen dar (Camara *et al.*, 2022). Biofilme bieten den Zellen einen natürlichen Schutz gegenüber Temperaturschwankungen, Nährstoffmangel und auch medikamentösen Therapien wie Antibiotika (Rollet *et al.*, 2009, Colvin *et al.*, 2011). Besonders für *P. aeruginosa* wird Biofilmbildung in Fachjournalen als ein Schlüsselfaktor für die Virulenz eingestuft. So ist bekannt, dass eine chronische Infektion der Lungen durch *P. aeruginosa* häufig mit der Bildung von Biofilmen einhergeht und eine lang-andauernde und intensive Behandlung durch entsprechende Therapeutika fordert (Romling & Balsalobre, 2012). Daher stellt die Erforschung der

Biofilmproduktion und -eliminierung ein wichtiges Forschungsgebiet in der Medizin dar (Rollet *et al.*, 2009, Colvin *et al.*, 2011).

Im Allgemeinen besteht der *P. aeruginosa*-Biofilm aus Zellaggregaten, welche in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), extrazellulärer DNA (eDNA) und Proteinen eingebettet sind (Toyofuku *et al.*, 2012, Turnbull *et al.*, 2016). Die Entwicklung des Biofilms unterliegt dem hochkomplexen *Quorum sensing*-System (Kapitel 1.4) und durchläuft im Wesentlichen fünf Phasen (Abbildung 1.2) (Kostakioti *et al.*, 2013): In der ersten Phase bewegen sich planktonische *P. aeruginosa*-Zellen mithilfe des Flagellums schwimmend fort, um neue Nischen zu erkunden und zu besiedeln (O'Toole & Kolter, 1998). Innerhalb der zweiten Phase heften sich *P. aeruginosa*-Zellen reversibel auf biotischen oder abiotischen Oberflächen mithilfe des Flagellums und der Typ-IV-Pili an. Die dritte Phase umfasst die Bildung von Mikrokolonien. Hierbei erfolgt die irreversible Anheftung der *P. aeruginosa*-Zellen an der Oberfläche (Caiazza & O'Toole, 2004). Zusätzlich werden auf molekularer Ebene Gene zur Synthese von Alginaten, Pel- und Psl-Polysacchariden aktiviert, um die Biofilmbildung zu initiieren, wohingegen andere Gene, die für die Flagellen-vermittelte Motilität verantwortlich sind, inhibiert werden (Franklin *et al.*, 2011, Baker *et al.*, 2016). Während der vierten Phase bildet sich der Biofilm weiter aus, sodass dreidimensionale Strukturen gebildet werden, die sogenannten pilzartigen (*mushroom-like*) Strukturen. Diese stellen die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über Kanäle sicher (Miller *et al.*, 2012). Die letzte Phase des Biofilms stellt die Dispersion dar, bei welcher sich einzelne Zellen aus der Biofilm-Matrix herauslösen und in den planktonischen Lebensstil wechseln, um neue Nischen zu besiedeln (Abbildung 1.2) (Petrova & Sauer, 2016).

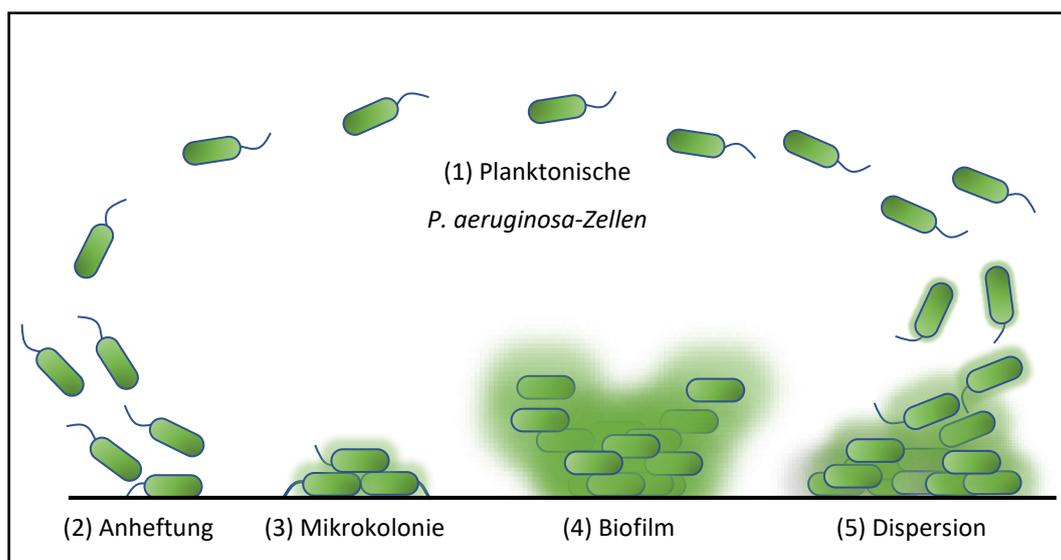


Abbildung 1.2: Die Entwicklung des Biofilms in fünf Phasen.

(1) *P. aeruginosa*-Zellen bewegen sich mithilfe des Flagellums planktonisch fort, um neue Nischen zu erschließen. (2) Einzelne Zellen heften sich auf Oberflächen reversibel an. (3) Zellen wechseln zur sessilen Lebensform und bilden Mikrokolonien. (4) Der Biofilm reift weiter aus und es bilden sich dreidimensionale Strukturen. (5) Einzelne Zellen lösen sich aus der Matrix heraus und wechseln zum planktonischen Lebensstil zurück. Die Abbildung wurde in Anlehnung und mit der Genehmigung des Rechteinhabers (*Current Opinion in Microbiology*, Copyright Elsevier) aus Valentini *et al.* (2018) erstellt.

Die EPS setzen sich u.a. aus Alginat, Pel- und Psl-Polysacchariden zusammen. Das Pel-Polysaccharid ist im Wesentlichen ein kationisches Polysaccharid bestehend aus *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylgalactosamin (Jennings *et al.*, 2015). Die Sekretion von Pel-Polysacchariden verbessert die Anheftung von *P. aeruginosa*-Zellen auf Oberflächen und trägt zur Aufrechterhaltung des Biofilms bei. Psl ist ein Pentasaccharid bestehend aus den Komponenten D-Glukose, D-Mannose und L-Rhamnose (Byrd *et al.*, 2009). In einer Studie wurde gezeigt, dass Psl positiv auf die Diguanylatcyclasen (SiaD und SadC) wirkt, welche wiederum die Produktion des sekundären Botenstoffes c-di-GMP (bis-(3'-5')-zyklische di-Guanosinmonophosphat) katalysiert. Ein erhöhtes c-di-GMP-Level in Zellen führt dann zu dickeren und robusteren Biofilmen (Irie *et al.*, 2012). Alginat ist ein negativ geladenes Polysaccharid bestehend aus D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure. Aus Studien ist bekannt, dass Biofilme mit erhöhtem Alginatanteil häufig bei chronisch infizierten ZF-Patienten vorgefunden werden (Candido Cacador *et al.*, 2018).

1.4 Zell-Zell-Kommunikationssysteme

Zell-Zell-Kommunikation, auch *Quorum sensing* (QS) genannt, ermöglicht Bakterien in Abhängigkeit der Zelldichte Informationen mithilfe von Signalmolekülen auszutauschen. In dichten Populationen wird QS genutzt, um schnell auf äußere Umweltbedingungen reagieren zu können und somit das bakterielle Überleben zu sichern (Wilder *et al.*, 2011). In *P. aeruginosa* sind diverse QS-Systeme bekannt, die maßgeblich die Physiologie des Bakteriums regulieren. Dazu zählen beispielsweise das Wachstumsverhalten, die Virulenz sowie die Biofilmbildung (Davies *et al.*, 1998). Zu den bekanntesten QS-Systemen gehören das Las-, Rhl- und Pqs-System, welche zusammen ein hierarchisches Netzwerk bilden (Lee & Zhang, 2015). Die Funktionsweise aller drei QS-Systeme basiert auf demselben Grundprinzip: Erreicht die Konzentration eines gebildeten Signalmoleküls einen gewissen Schwellenwert, wird ein spezifischer Transkriptionsfaktor durch Bindung des Signalmoleküls aktiviert, der wiederum durch positive Rückkopplung die Synthese weiterer Signalmoleküle induziert. Da Signalmoleküle über Membranen frei diffundieren können, kann der Informationsaustausch interzellulär erfolgen (Seed *et al.*, 1995).

Der Transkriptionsfaktor LasR und die Synthase LasI bilden zusammen das Las-System (Abbildung 1.3, grün). Hierbei synthetisiert LasI das Signalmolekül *N*-(3-oxo-Dodecanoyl)-L-Homoserin-Lacton

(3-oxo-C12-HSL), welches durch LasR gebunden wird und aktiv als Komplex weiterhin die Genexpression von *lasI* induziert, um noch mehr Signalmoleküle zu produzieren. Gleichzeitig wird auch die Transkription von weiteren Virulenz-assoziierten Genen wie *lasA*, *lasB* und *aprA*, welche alle für Proteasen kodieren (Kapitel 1.2.5), durch das aktivierte LasR initiiert (Abbildung 1.3, grün) (Gambello *et al.*, 1993, Pearson *et al.*, 1997).

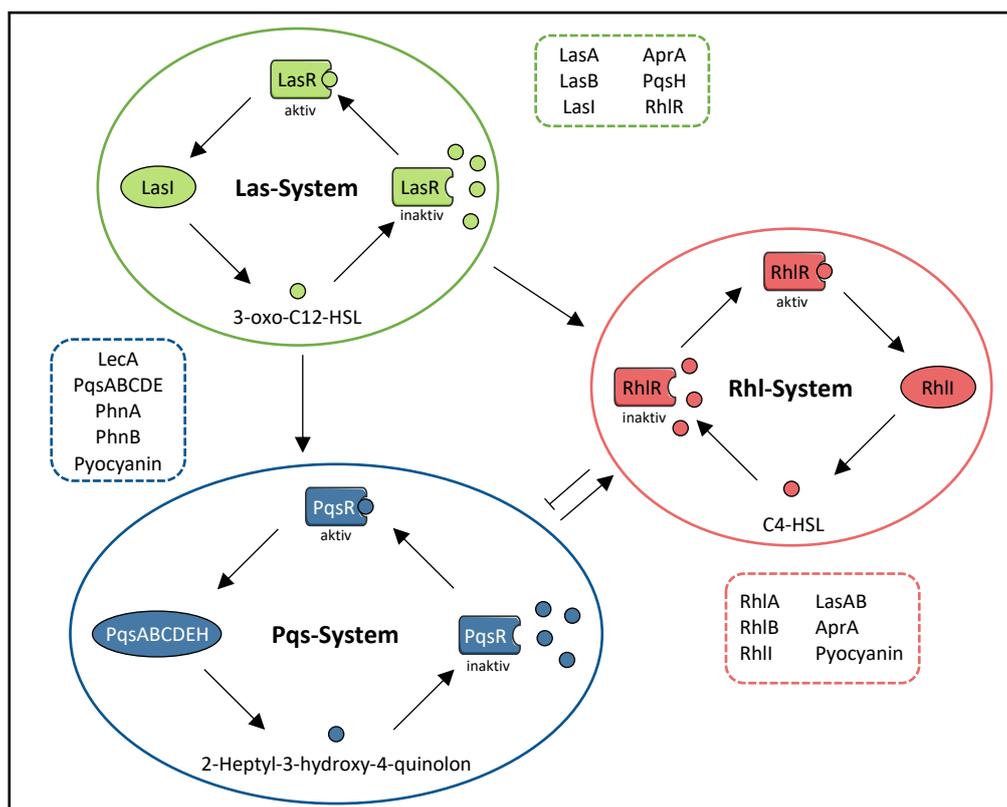


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der drei Quorum sensing-Systeme in *P. aeruginosa*.

Das Las-, Rhl- und Pqs-System stellen die bekanntesten Quorum sensing-Systeme in *P. aeruginosa* dar. Die Signalmoleküle (farbige Kreise) werden mithilfe von Synthesen (*LasI*, *RhII*, *PqsABCDEH*) produziert. Erreicht die Konzentration der Signalmoleküle in einer dichten Population einen Schwellenwert, so werden die Signalmoleküle durch die jeweiligen Transkriptionsfaktoren (*LasR*, *RhIR*, *PqsR*) gebunden und aktiviert. Folglich führt eine Aktivierung dazu, dass entsprechende Virulenzfaktoren (gestrichelte Boxen) durch die Initiierung der Genexpression produziert werden. Die Regulation der drei Systeme ist in einem hierarchischen Netzwerk organisiert, wobei das Las-System gegenüber den anderen beiden Systemen (*Rhl* und *Pqs*) eine übergeordnete Funktion einnimmt (Pfeile zwischen den Kreisen). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Publikationen von Lee & Zhang (2015) und Li *et al.* (2022) in modifizierter Form erstellt. Die Publikationen sind unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0). Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von Servier Medical Art (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0).

Analog zum Las-System ist auch das Rhl-System aufgebaut. Hierbei wird das Signalmolekül *N*-Butanoyl-L-Homoserin-Lacton (C4-HSL) durch die Synthase *RhII* gebildet (Abbildung 1.3, rot). C4-HSL ist im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor *RhIR* verantwortlich für die Transkription von *rhIA* und *rhIB*, beides Protein-kodierende Gene, welche für die Produktion von Rhamnolipiden

essenziell sind (Reis *et al.*, 2011). Gleichzeitig steht auch die Produktion der Proteasen LasA, LasB und AprA, aber auch die Bildung von Pyocyanine unter der Kontrolle des Rhl-Systems (Abbildung 1.3, rot) (Pearson *et al.*, 1997, Mukherjee *et al.*, 2017).

Pseudomonas quinolone signal (Pqs) stellt das dritte Kommunikationssystem dar (Abbildung 1.3, blau). Die Synthese des Signalmoleküls 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon erfolgt durch die Proteine PqsABCDH. PqsR dient hierbei als Transkriptionsfaktor und wird durch die Bindung des Signalmoleküls aktiviert. So reguliert das aktivierte PqsR die Transkription der Gene *pqsABCDH*, die für die Synthese von 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon verantwortlich sind, aber auch weitere Virulenz-assoziierte Gene wie beispielsweise *lecA* oder *phnAB* (Abbildung 1.3, blau) (Cao *et al.*, 2001).

Alle drei QS-Systeme sind, wie bereits oben erwähnt, in einem hierarchischen Netzwerk organisiert (Abbildung 1.3). So ist das Las-System den anderen beiden QS-Systemen Rhl und Pqs übergeordnet (Lee & Zhang, 2015). Hierbei hängt die Aktivierung des Rhl-Systems vom Transkriptionsfaktor LasR ab, der im Komplex mit 3-oxo-C12-HSL die Transkription des *rhlR*-Gens induziert. Zugleich ist LasR auch verantwortlich für die Genexpression von *pqsH*, dessen Funktion die Hydroxylierung von 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline (HHQ, Vorstufe des Pqs-Signalmoleküls) zu 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon ist (Deziel *et al.*, 2004). Außerdem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass PqsR im Komplex mit 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon unabhängig vom Las-System die Genexpression von *RhlI* massiv steigern kann, was zeigt, dass das Pqs-System einen positiven Einfluss auf das Rhl-System ausübt (McKnight *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurde für *RhlR* eine reprimierende Eigenschaft auf die Transkription von *pqsA* zugeschrieben, wobei vermutet wird, dass die Aktivierung des Pqs-Systems abhängig von dem Verhältnis von 3-oxo-C12-HSL des Las-Systems zu C4-HSL des Rhl-Systems ist (McGrath *et al.*, 2004, Xiao *et al.*, 2006).

1.5 Die Zytoplasmamembran Gram-negativer Bakterien

Ein charakteristisches Merkmal von Zellen ist das Vorhandensein von Biomembranen, welche in sämtlichen Domänen des Lebens vorkommen. Biomembranen stellen eine natürliche Schutzbarriere vor ständig wechselnden Umweltbedingungen dar, indem diese sich in ihrer Zusammensetzung stetig anpassen und das Zytoplasma vom extrazellulären Raum trennen (Siliakus *et al.*, 2017). Hierbei nehmen Phospholipide, die in vielfältiger chemischer Struktur vorkommen, eine wesentliche Funktion beim Aufbau von Biomembranen ein. Im Allgemeinen besteht die Struktur eines Phospholipids aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten (Abbildung 1.4 A). Dabei umfasst der hydrophile Bereich ein

Glycerolrückgrat, eine Phosphatgruppe und eine variable polare Kopfgruppe wie beispielsweise Ethanolamin, Glycerol, Cholin oder Serin. Im hydrophoben Teil hingegen sind Kohlenwasserstoffe mit variablen Kettenlängen und Sättigungsgraden über eine Esterbindung mit dem Glycerolrückgrat verbunden (Abbildung 1.4 A) (Shevchenko & Simons, 2010). Phospholipide bilden aufgrund der amphiphilen Eigenschaft in wässrigen Umgebungen eine Lipiddoppelschicht, die bei Zellen das Grundgerüst der Zytoplasmamembran bildet. Dabei ordnen sich Phospholipide so an, dass der hydrophobe Bereich zum Inneren und der hydrophile Kopf zum Äußeren der Lipiddoppelschicht gerichtet ist (Abbildung 1.4 C) (Zhang & Rock, 2008). Membranproteine stellen eine weitere Hauptkomponente der Zytoplasmamembran dar, welche zusammen mit den Phospholipiden in einem fluiden und dynamischen Mosaik-Modell organisiert sind. So sind die Moleküle beider Komponenten in der Lage sich lateral frei in der Membran zu bewegen (Abbildung 1.4 C) (Singer & Nicolson, 1972, Strahl & Errington, 2017). Funktionell betrachtet sind Membranproteine an bedeutenden Prozessen wie Transport, Sekretion, Zell-Zell-Kommunikation, Signaltransduktion und Energiehomöostase beteiligt (Dowhan, 1997, Davies *et al.*, 1998, Costa *et al.*, 2015). Neben der Schutzfunktion dient die Zytoplasmamembran auch als Permeabilitätsbarriere, welche ermöglicht, dass hydrophobe oder kleine polare Moleküle, wie beispielsweise Harnstoff, über einfache Diffusion die Zytoplasmamembran passieren können (Davis & Silbert, 1974). Hingegen erfolgt der Transport von geladenen Ionen oder polaren Stoffen über sogenannte membranverankerte Transportproteine, die entweder aktiv oder passiv den Transport der Moleküle ermöglichen (Tanaka *et al.*, 2018).

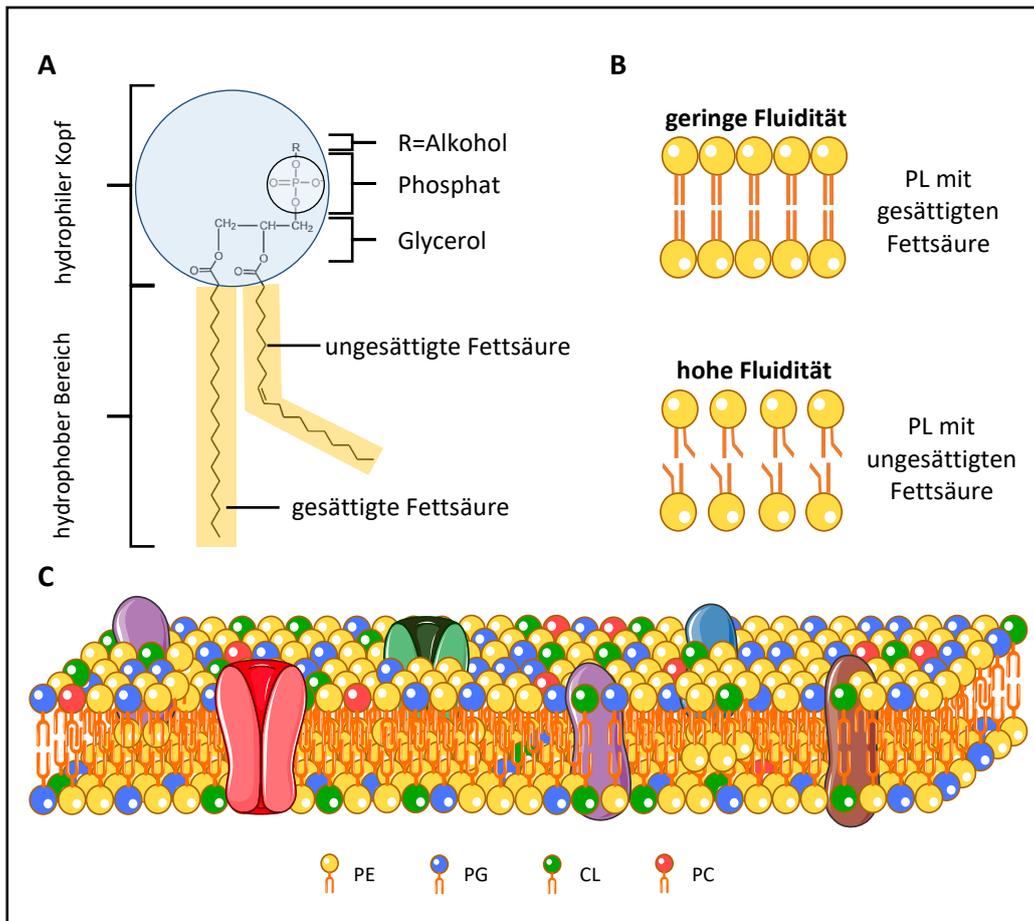


Abbildung 1.4: Aufbau eines Phospholipids und einer Zytoplasmamembran.

A: Der Aufbau eines Phospholipids lässt sich in zwei Bereiche einteilen. Der hydrophile Kopf umfasst ein Glycerolrückgrat, eine Phosphatgruppe und eine variable Kopfgruppe (R) wie beispielsweise Ethanolamin, Glycerol oder Cholin. Der hydrophobe Bereich umfasst meistens zwei Kohlenwasserstoffketten, die jeweils über eine Esterbindung am Glycerol verknüpft vorliegen. **B:** Die Fluidität der Membran ist abhängig von der Zusammensetzung der Fettsäureacylketten im Phospholipid. Phospholipide (PL) mit langen und gesättigten Fettsäuren weisen eine verminderte Fluidität auf, wohingegen PL mit kurzen und ungesättigten Fettsäuren in *cis*-Konformation eine höhere Fluidität aufweisen. **C:** Schematische Darstellung der Zytoplasmamembran mit Membranproteinen. Am Beispiel von *P. aeruginosa* ist Phosphatidylethanolamin (PE) das häufigste vorkommende Phospholipid, gefolgt von Phosphatidylglycerol (PG), Cardiolipin (CL) und Phosphatidylcholin (PC) (Epanand *et al.*, 2010, Benamara *et al.*, 2011). Verschiedene Proteine wie beispielsweise Transporter, Rezeptoren oder ATPasen können in der Zytoplasmamembran verankert vorkommen. Teile dieser Abbildung wurden in Anlehnung an Publikationen von Bitzenhofer *et al.* (2021) und Ohashi (2021) in modifizierter Form erstellt. Die Publikationen sind unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0). Die Abbildung wurde mithilfe von Objekten von Servier Medical Art (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0).

Die Aufrechterhaltung einer intakten Zytoplasmamembran sowie die ständige Anpassung der Membranlipidzusammensetzung wird auch Membranlipidhomöostase genannt. Diese beinhaltet unter anderem Prozesse, die die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen an veränderte Umweltbedingungen (Temperatur, Osmolarität, Salzgehalt, pH-Wert) anpassen. Dazu zählen beispielsweise die *de novo* Membranbiogenese, die Modifizierung der Fettsäureacylketten sowie die Änderungen der Phospholipidkopfgruppen (Zhang & Rock, 2008, Holthuis & Menon, 2014).

Besonders bei pathogenen Bakterien stellt die Membranlipidhomöostase eine überlebenswichtige Strategie dar. Hierbei wird die Membranzusammensetzung dem Wirtsmilieu während der Infektion so angepasst, dass dadurch die Kolonisierung begünstigt werden kann (Zhang & Rock, 2008, Adams *et al.*, 2021). Da das Themengebiet „Membranlipidhomöostase“ sehr umfangreich ist, wird im nachfolgenden Abschnitt nur das Thema „Modifizierung der Fettsäureacylketten“ näher erläutert.

Die Fettsäureacylketten von Phospholipiden können, wie bereits erwähnt, in der Länge und auch im Sättigungsgrad (Anzahl der Doppelbindungen) stark variieren. Diese beeinflussen je nach Zusammensetzung die Fluidität von Membranen, um umweltbedingten Stress, wie beispielsweise Temperaturschwankungen, auszugleichen (Segura *et al.*, 1999). So bewirkt das Vorkommen von langen und gesättigten Fettsäuren (ohne Doppelbindungen) eine dichte Anlagerung von Phospholipiden, die zu einer verringerten Fluidität der Membran führt (Abbildung 1.4 B). Demgegenüber erhöhen kurze und ungesättigte Fettsäuren (mit *cis*-Doppelbindungen) durch ihre Struktur die Fluidität, da Doppelbindungen einen Knick in der Fettsäureacylkette hervorbringen können, die wiederum mehr Raum in der Lipiddoppelschicht einnehmen (Abbildung 1.4 B) (Siliakus *et al.*, 2017). Am Beispiel von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgt die Synthese von ungesättigten Fettsäuren durch die Dehydratasen/Isomerasen FabA und FabB. Diese Enzyme integrieren Doppelbindungen in die wachsende Fettsäureacylkette durch Kondensationsreaktionen. In *P. aeruginosa* hingegen wurde neben den Enzymen FabA und FabB noch die Desaturasen DesA und DesB identifiziert (Zhang & Rock, 2008). DesA und DesB können die Fettsäureacylketten von bereits bestehenden gesättigten Phospholipiden in der Zytoplasmamembran durch Einbau einer Doppelbindung zu einem ungesättigten Phospholipid modifizieren (Zhu *et al.*, 2006). Außerdem wird vermutet, dass DesB eine wichtige Funktion in der Virulenz von *P. aeruginosa* einnimmt, da *desB*-defiziente Stämme neben einer verminderten Virulenz im *C. elegans*-Infektionsmodell auch signifikant reduzierte Mengen von Virulenzfaktoren wie LasAB und AprA aufweisen (Schweizer & Choi, 2011).

Die Ausbildung von Cyclopropanringen sowie die *cis-trans*-Isomerisierung sind zwei weitere Möglichkeiten, die Bakterien bei der Modifizierung von Fettsäureacylketten bei bestehenden Phospholipiden anwenden. So bieten diese Arten der Modifizierungen neben der Anpassung der Fluidität auch eine höhere Toleranz gegenüber pH-Änderungen oder osmotischem Stress (Cronan, 2002, Eberlein *et al.*, 2018).

1.6 Phospholipasen

1.6.1 Biochemische Funktion von Phospholipasen

Phospholipasen sind Hydrolasen und gehören damit zur Gruppe 3 der internationalen EC-Klassifikation (*Enzyme Commission*). Dabei besteht die Hauptfunktion von Phospholipasen darin die Hydrolyse von Phospholipiden (Kapitel 1.5) zu katalysieren (Abbildung 1.5) (Ali *et al.*, 2012).

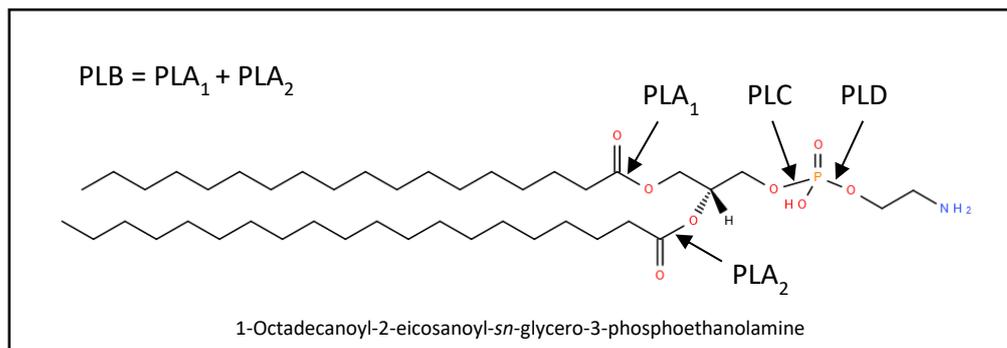


Abbildung 1.5: Angriffspunkte von Phospholipasen.

Phospholipasen (PLA₁, PLA₂, PLC, PLD) können die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden katalysieren. Die Pfeile markieren die Angriffspunkte der Phospholipasen. Phospholipasen, welche eine PLA₁- und PLA₂-Aktivität aufweisen, werden als Phospholipase B kategorisiert. Der systematische Name des DOPEs ist am unteren Rand der Abbildung zu entnehmen. Die Struktur wurde mithilfe des *Online-Tools „The LIPID MAPS® Lipidomics Gateway“* (Tabelle 2.18) erstellt (Fahy *et al.*, 2007). Alle LIPID MAPS®-Datenbanken sind unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

Phospholipasen lassen sich anhand der Position der durch sie hydrolysierten Bindung in die vier Hauptgruppen A bis D einteilen. Während eine Phospholipase A₁ bzw. A₂ die Esterbindung zwischen dem Glycerol und der Kohlenwasserstoffkette an der spezifischen Position *sn*-1 bzw. *sn*-2 eines Phospholipids hydrolysiert, kann eine Phospholipase B beide Esterbindungen spalten. Demgegenüber hydrolysieren Phospholipasen C und D spezifisch die zentrale und die terminale Phosphodiesterbindung am Phosphat (Abbildung 1.5). Funktionell betrachtet werden bakterielle Phospholipasen häufig als Virulenzfaktoren eingestuft, da diese durch die Hydrolyse von Phospholipiden einerseits Wirtzellmembranen schädigen können und andererseits biologisch aktive Reaktionsprodukte freisetzen können (Flores-Diaz *et al.*, 2016).

1.6.2 Phospholipasen aus *P. aeruginosa*

In *P. aeruginosa* wurden bis heute diverse Phospholipasen näher charakterisiert. Erst kürzlich wurde PaPlaB als membranassoziierte Phospholipase B aus *P. aeruginosa* beschrieben (Weiler *et al.*, 2022). Es wurde nachgewiesen, dass PaPlaB nicht nur endogene Phospholipide, sondern auch andere natürliche Phospholipide (kommerziell erworben), insbesondere solche mit einer

Kettenlänge zwischen C6 bis C16, unabhängig von der Kopfgruppe, bevorzugt hydrolysieren kann. Außerdem wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* $\Delta paplaB$ ein verlangsamtes Wachstumsverhalten, eine verminderte Biofilmproduktion und eine reduzierte Virulenz im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell aufweist (Weiler *et al.*, 2022). Eine der bekanntesten Phospholipasen A aus *P. aeruginosa* ist Exotoxin U (ExoU) (Finck-Barbancon *et al.*, 1997, Sato *et al.*, 2003). Dieses Effektorprotein wird mithilfe des Typ III-Sekretionssystems in die Wirtszelle sekretiert (Finck-Barbancon *et al.*, 1997). In der Wirtszelle selbst ist die Aktivität von ExoU abhängig von eukaryotischem Ubiquitin, welches als Cofaktor dient (Anderson *et al.*, 2011). Dabei führt eine Infektion mit ExoU-exprimierenden *P. aeruginosa*-Zellen in Mäusen zu irreversiblen, zytotoxischen Schäden und somit zum schnellen Zelltod durch Zelllyse (Rabin & Hauser, 2003, Howell *et al.*, 2013). PlpD (Plp, *Patatin-like protein*) ist ein weiteres sekretiertes Enzym mit Phospholipase A₁-Aktivität (Salacha *et al.*, 2010, da Mata Madeira *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu ExoU wird PlpD über das Typ V-Sekretionssystem in die äußere Membran von *P. aeruginosa* sekretiert (da Mata Madeira *et al.*, 2016). Zum Substratspektrum von PlpD gehören Phospholipide wie Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) jedoch nicht Phosphatidylethanolamin (Hauptbestandteil bakterieller Membranen). Die putativen Substrate sind überwiegend an Signaltransduktionsprozessen oder am apoptotischen Zelltod in eukaryotischen Zellen beteiligt (da Mata Madeira *et al.*, 2016). Mit einem breiten Substratspektrum von mittel- bis langkettigen Lysophospholipiden wurde TesA als eine Lysophospholipase A aus *P. aeruginosa* beschrieben (Kovacic *et al.*, 2013). Aufgrund der periplasmatischen Lokalisation wird vermutet, dass TesA an der Membranlipidhomöostase beteiligt ist (Kovacic *et al.*, 2013).

Zudem sind in *P. aeruginosa* bislang drei Arten von sekretierten Phospholipasen C (PlcH, PlcN, PlcB) beschrieben (Constantino-Teles *et al.*, 2022). Alle drei Phospholipasen werden durch das Typ II-Sekretionssystem nach außen transportiert. PlcH stellt eine hämolytische Phospholipase C dar und hydrolysiert vorzugsweise eukaryotisches Phosphatidylcholin und Sphingomyelin der äußeren Membranseite (Ostroff *et al.*, 1990). Die Phospholipase PlcN hingegen ist nicht-hämolytisch und hydrolysiert neben Phosphatidylcholin auch vorzugsweise zum Zytosol ausgerichtete Phospholipide wie Phosphatidylserin (Ostroff *et al.*, 1990). Beide Phospholipasen werden über das Tat-abhängige Sekretionssystem (*twin arginine translocation*) über die Zytoplasmamembran ins Periplasma transportiert. Im Gegensatz dazu wird PlcB über das Sec-Sekretionssystem ins Periplasma transportiert. PlcB hydrolysiert Phosphatidylethanolamin (PE) als präferiertes Substrat (Barker *et al.*, 2004). Die genaue biologische Funktion von PlcB ist noch nicht geklärt, jedoch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Deletion des *plcB*-Gens zum Verlust der *Twitching*-Motilität (Barker *et al.*, 2004) und zu erhöhter Biofilmproduktion (Lewenza *et al.*, 2017)

von *P. aeruginosa* führt. Neben ExoU sind zwei weitere Effektorproteine (PldA und PldB) mit Phospholipase D-Aktivität in *P. aeruginosa* beschrieben. Dabei erfolgt die Injektion von PldA über das H2-TypVI-Sekretionssystem (Russell *et al.*, 2013) und die von PldB über das H3-TypVI-Sekretionssystem (Jiang *et al.*, 2014). Als Wirtszellen können sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten betroffen sein, weshalb beide Proteine auch als *Trans-Kingdom*-Effektorproteine beschrieben werden (Bleves *et al.*, 2014). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass gereinigtes PldA Phospholipide mit den Kopfgruppen Glycerol oder Ethanolamin effizient hydrolysieren kann (Spencer & Brown, 2015).

1.6.3 Phospholipase A PlaF

Das Gen *pa2949* (*plaF*, früher *plbF*) aus *P. aeruginosa* kodiert für eine Phospholipase A₁ (Kovacic, 2010). PlaF als Vollängenprotein besteht aus 315 Aminosäuren (AS) und hat eine Molekülmasse von etwa 34,8 kDa (Winsor *et al.*, 2016). Auf Sequenzebene wies PlaF Homologien zu einer bereits bekannten Esterase EstA aus *P. aeruginosa* 1001 sowie zwei Lipasen aus den psychrophilen Bakterien *Moraxella sp.* und *Psychrobacter immobilis* auf (Abbildung 1.6 B) (Kovacic *et al.*, 2016). Mithilfe von *in silico*-Analysen konnte für PlaF eine katalytische Triade mit Ser₁₃₇ (Serin) im charakteristischen G-X-S-X-G Lipasemotiv, Asp₂₅₈ (Asparaginsäure) und His₂₈₆ (Histidin) bestimmt werden (Abbildung 1.6, rote Rauten). Des Weiteren konnte eine α -helikale Transmembranhelix im N-terminalen Bereich identifiziert werden (Abbildung 1.6 A).

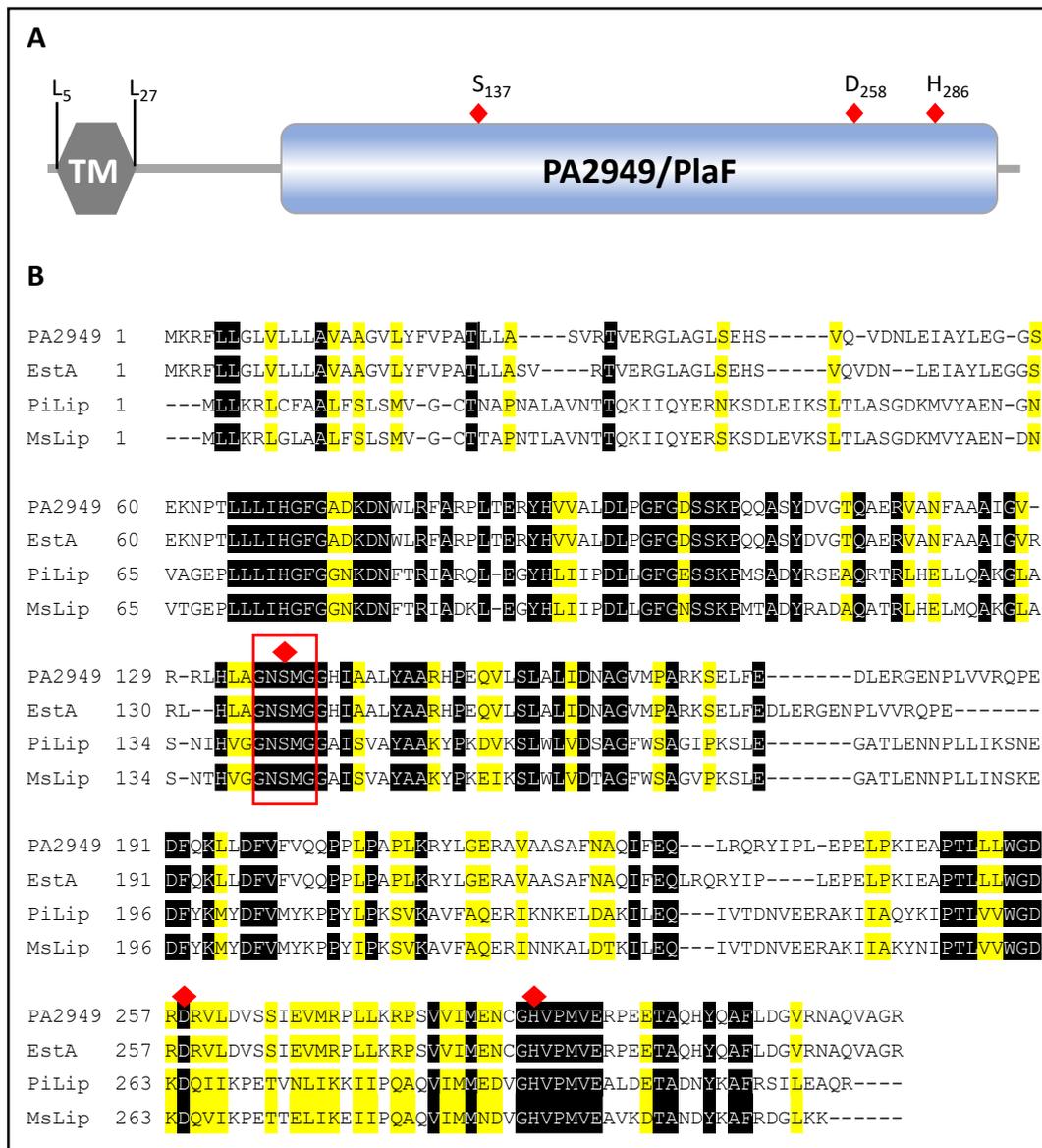


Abbildung 1.6: Plaf zeigt Homologien zu bekannten Lipasen und Esterasen.

A: Schematischer Aufbau von PA2949 (Plaf). Plaf zeigt im N-terminalen Bereich eine putative Transmembrandomäne (L₅-L₂₇) und eine zum Periplasma exponierte Domäne mit der katalytischen Triade Ser₁₃₇, Asp₂₅₈ und His₂₈₆ (Rauten in rot). **B:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von Plaf aus *P. aeruginosa* PAO1, EstA aus *P. aeruginosa* 1001, PiLip aus *Psychrobacter immobilis* und MsLip aus *Moraxella* sp. Ein schwarzer bzw. gelber Hintergrund hebt die Aminosäuren hervor, welche in allen bzw. mindestens zwei Proteinen identisch sind. Das charakteristische Lipasemotiv G-X-S-X-G ist mit einem roten Kasten hervorgehoben. Diese Abbildung wurde aus Kovacic *et al.* (2016) entnommen und in modifizierter Form dargestellt. Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

Die Reinigung von rekombinantem Plaf aus den Membranfraktionen wurde zunächst aus dem heterologen Expressionswirt *E. coli* BL21 (DE3) und später aus dem homologen Expressionswirt *P. aeruginosa* PAO1 etabliert (Kovacic *et al.*, 2016, Bleffert *et al.*, 2019). Mithilfe eines Saccharosegradienten zur Trennung der äußeren Membran und Zytoplasmamembran wurde Plaf fast ausschließlich in der Zytoplasmamembran durch hydrolytische Aktivitätsmessungen

lokalisiert. Weitere Untersuchungen bewiesen, dass PlaF höchstwahrscheinlich über eine N-terminale Transmembrandomäne in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* integral verankert vorliegt und die katalytische Domäne zum Periplasma gerichtet ist (Bleffert *et al.*, 2022). PlaF hydrolysiert neben synthetisch hergestellten Substraten wie *para*-Nitrophenylacylestern mit variierenden Acylkettenlängen (C4-C10) auch natürliche Substrate mit unterschiedlichen Kopfgruppen wie Ethanolamin, Cholin und Glycerol. Bei weiterführenden Experimenten wurde die Substratspezifität weiter eingegrenzt, sodass für PlaF eine Phospholipase A₁-Aktivität mit vorzugsweise mittleren Acylkettenlängen von C12-C18 zugeschrieben wurde (Bleffert *et al.*, 2022).

1.6.4 3D-Kristallstruktur von PlaF

Erst kürzlich war es gelungen Proteinkristalle von PlaF zu züchten und die PlaF-3D-Struktur mit einer atomaren Auflösung von bis zu 2,0 Å zu bestimmen (Bleffert *et al.*, 2022). Die Struktur, bei welcher die Aminosäuren 1-310 detektiert werden konnten, zeigt zwei PlaF-Moleküle (PlaF_A und PlaF_B) als asymmetrisches Homodimer (Abbildung 1.7 A). Die ersten 38 Aminosäuren (AS) bilden eine geknickte α -Helix, wobei die AS 1 bis 4 im Zytoplasma, die AS 5 bis 27 in der Zytoplasmamembran und die AS 28 bis 37 als Juxtamembrandomäne (JM) im Periplasma vorliegen. Der Knick in der α -Helix wird durch ein Prolin an der Position 23 erzeugt. Die Aminosäuren 39-310 bilden im Periplasma die katalytische α/β -Hydrolasedomäne bestehend aus α -Helices (blau) und β -Faltblättern (grün). Zusätzlich zeigt die 3D-Struktur eine deckelartige *Lid*-Domäne bestehend aus drei α -Helices (braun), die das aktive Zentrum umhüllen. So wird vermutet, dass die *Lid*-Domäne mit den hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipidmembran interagiert und dadurch eine stabilisierende Wirkung auf PlaF bewirkt (Abbildung 1.7 A).

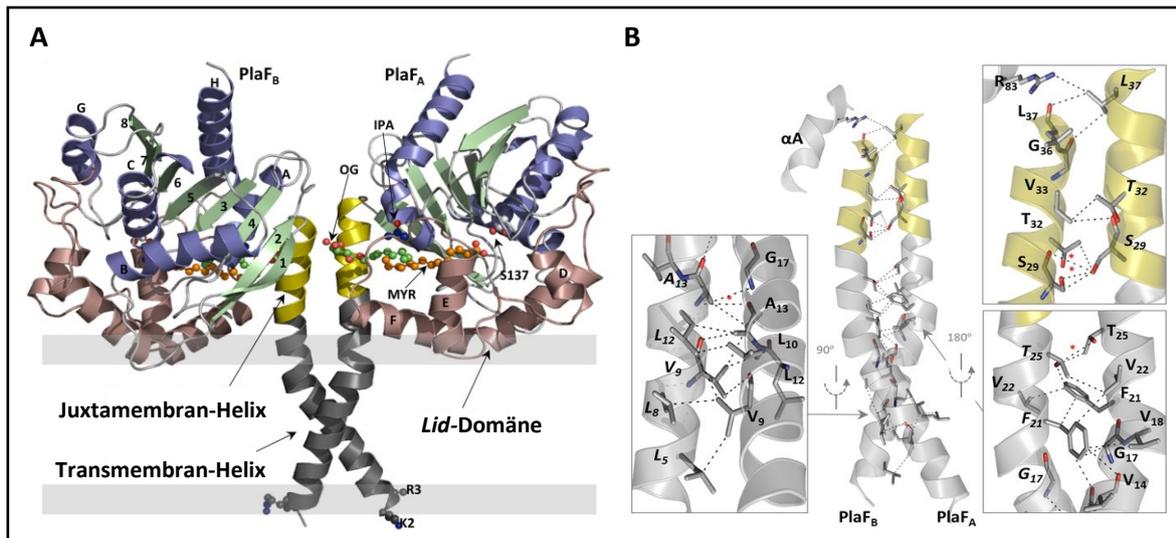


Abbildung 1.7: 3D-Kristallstruktur von PlaF als Homodimer mit endogenen Liganden.

A: Die 3D-Struktur zeigt zwei PlaF-Moleküle (PlaFA und PlaFB), welche zusammen ein asymmetrisches Homodimer bilden. Das monomere PlaF setzt sich aus mehreren Domänen zusammen: einer putativen Transmembranhelix (L5-L27, grau), einer zum Periplasma herausragenden vermuteten Juxtamembranhelix (A28-L37, gelb), einer katalytischen Domäne bestehend aus α -Helices (blau) und β -Faltblättern (grün) und einer Membraninteraktionsdomäne (*Lid*-Domäne) aus drei α -Helices (braun). Die identifizierten Liganden Myristinsäure (MYR, orange), *n*-Octyl- β -D-Glucosid (OG, grün) und Isopropylalkohol (IPA, blau) sind im Komplex als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Als Modell für die Lage des Enzyms in der nativen Zellmembran sind die zum Zytoplasma bzw. Periplasma gerichteten hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipidmembran als Balken (hellgrau) abgebildet. **B:** Dargestellt ist die Dimerisierungsschnittstelle der α -Helices der ersten 37 Aminosäuren von PlaF als Homodimer (PlaFA und PlaFB). Die wesentlichen Interaktionen finden überwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen in der Transmembrandomäne (grau) statt. Daneben wurden aber auch vier schwache Wasserstoffbrückenbindungen in der Juxtamembrandomäne (gelb) identifiziert, die zur Stabilisierung des Dimers beitragen. Als *Stick*-Darstellung wurden die Aminosäuren, die an der Interaktionsschnittstelle beteiligt sind. Die dargestellte Abbildung entspricht einem Ausschnitt aus dem Original und wurde aus der Publikation von Bleffert *et al.* (2022) entnommen und in die deutsche Sprache übersetzt. Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

Die Dimerisierung zweier PlaF-Moleküle wird vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Transmembrandomänen (TM) und durch vier schwache Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Juxtamembrandomänen vermittelt (Abbildung 1.7 B). Dabei sind die α -Helices beider PlaF-Moleküle in einer *coiled-coil*-Interaktion angeordnet, wodurch eine Schnittstelle für die Wechselwirkung der Aminosäurereste zwischen PlaFA und PlaFB entsteht (Abbildung 1.7 B). So wurden unter anderem folgende Interaktionen identifiziert: L8-V9, L12-V9, L12-L10, V14-F21, V14-T25, G17-F21, F21-V22, F21-T25, V22-F21, S29-S29 und S29-T32 (erste Aminosäure jeweils zugehörig zu PlaFA und zweite Aminosäure zu PlaFB) (Bleffert *et al.*, 2022).

Innerhalb der katalytischen Domäne wurden außerdem die Liganden Myristinsäure (MYR, C14), *n*-Octyl- β -D-Glucosid (OG), Isopropylalkohol (IPA) sowie Undecansäure (C11) im Komplex mit PlaF identifiziert (Abbildung 1.7 A). In Folgestudien konnte schließlich eine Liganden-vermittelte Dimerisierung für PlaF nachgewiesen werden. Hierbei bewirkten Fettsäuren mit einer Kettenlänge

von C10 bis C12 bei einer Inkubation mit gereinigtem PlaF einen starken Inhibierungseffekt, der gleichzeitig auch zu einer gesteigerten PlaF-Dimerisierung führte (Bleffert *et al.*, 2022). Aus diesem Grund wird derzeit folgendes Modell für die PlaF-Regulation vorgeschlagen (Abbildung 1.8): PlaF ist vorwiegend als aktives Monomer über die Transmembranhelix in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* verankert. Durch Bindung von Dodecansäure (C12) im monomeren PlaF wird eine Dimerisierung ausgelöst und die enzymatische Aktivität gehemmt (Bleffert *et al.*, 2022).

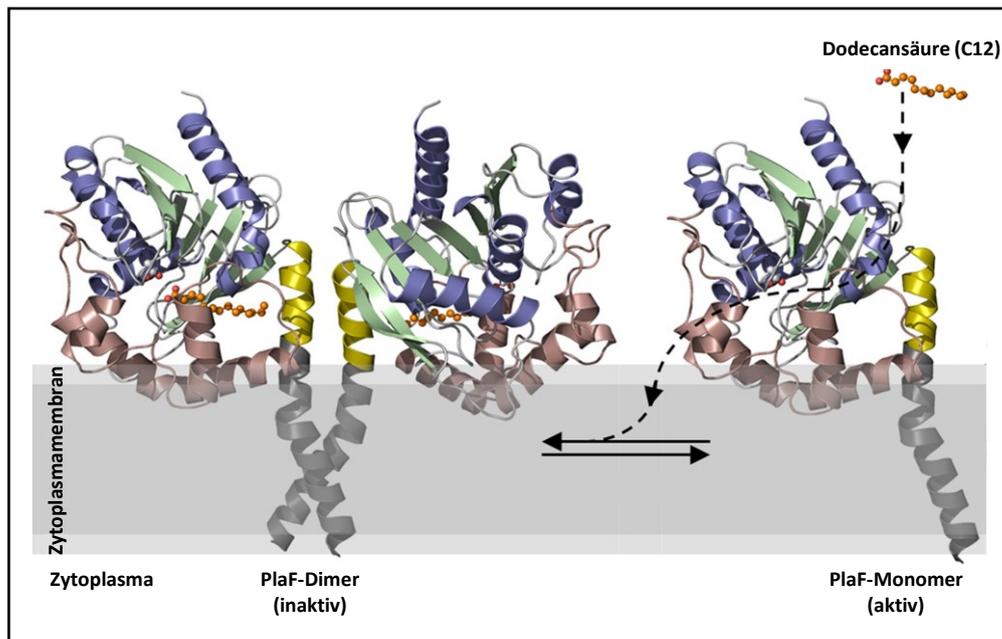


Abbildung 1.8: Die Regulation der Aktivität von PlaF als Modell.

Das monomere PlaF (rechte Seite) ist als aktives Enzym in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* verankert. Die Bindung von Dodecansäure (C12) im PlaF-Monomer löst eine Dimerisierung von zwei PlaF-Molekülen aus, wobei das PlaF-Dimer (linke Seite) als inaktives Enzym vorliegt. Die dargestellte Abbildung entspricht einem Ausschnitt aus dem Original und wurde aus der Publikation von Bleffert *et al.* (2022) entnommen und in die deutsche Sprache übersetzt. Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

1.6.5 PlaF ist ein Virulenzfaktor

Durch die Erzeugung eines *plaF*-defizienten *P. aeruginosa*-Stammes (*P. aeruginosa* Δ *plaF*) war es außerdem möglich, die Virulenz und die Zytotoxizität anhand von verschiedenen Infektionsmodellen zu analysieren. Hierbei wurden im Rahmen von zwei unabhängigen Studien *Drosophila melanogaster*-Fliegen und *Galleria mellonella*-Larven (Abbildung 1.9) mit *P. aeruginosa* WT und *P. aeruginosa* Δ *plaF* infiziert und die Überlebensraten beider Modellorganismen beobachtet. In beiden Studien wiesen sowohl die Fliegen als auch die Larven (Abbildung 1.9), die mit *P. aeruginosa* Δ *plaF* infiziert wurden, eine signifikant höhere Überlebensrate im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT auf (Kovacic, 2010, Bleffert *et al.*, 2022).

Dementsprechend konnte PlaF eine virulente Eigenschaft zugeschrieben werden. Gleichzeitig zeigte der genomisch komplementierte *P. aeruginosa*-Stamm ($\Delta plaF::plaF$) eine nahezu wiederhergestellte Virulenz im *G. mellonella*-Infektionsmodell auf (Abbildung 1.9) (Bleffert *et al.*, 2022).

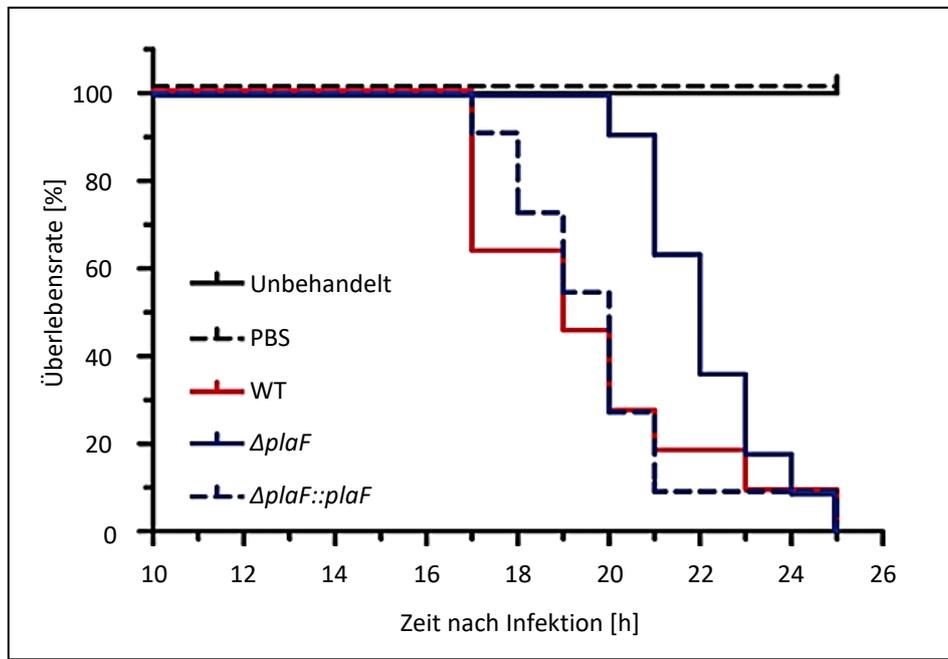


Abbildung 1.9: *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ weist geringere Virulenz im Modellorganismus *G. mellonella* auf.

Zeitlicher Verlauf der Überlebensrate nach „Kaplan-Meier“ von *G. mellonella*-Larven nach einer Infektion mit *P. aeruginosa* WT, $\Delta plaF$ (Deletionsstamm) und $\Delta plaF::plaF$ (komplementierter Stamm). Für die Infektion der Larven wurden *P. aeruginosa*-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Dazu wurden die Zellen auf eine Konzentration von 500 Zellen/ 10 μ l eingestellt und jeweils 10 Larven mit 10 μ l der Zellsuspension mittels Injektion infiziert. Die Raupen wurden über den gesamten Zeitraum bei 30 °C gehalten und stündlich begutachtet. Als Kontrolle dienen unbehandelte Larven sowie Larven, die mit jeweils 10 μ l PBS behandelt wurden. Zur Darstellung wurde die Überlebensrate der Larven gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Die dargestellte Abbildung entspricht dem Original und wurde aus der Publikation von Bleffert *et al.* (2022) entnommen und in die deutsche Sprache übersetzt. Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

Ähnliche Ergebnisse wurden schließlich auch im Rahmen einer Zytotoxizitätsstudie auf BMDM-Zellen (*bone marrow-derived macrophage*) beobachtet. Während *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ signifikant weniger zytotoxisch auf Makrophagen nach 6 h Inkubation wirkte, wies *P. aeruginosa* $\Delta plaF::plaF$ eine annähernd wildtypische Zytotoxizität auf (Bleffert *et al.*, 2022).

1.7 Zielsetzung

Das opportunistische Humanpathogen *P. aeruginosa* ist einer der häufigsten Verursacher von nosokomialen Infektionen (Gaynes *et al.*, 2005). Dabei beruht die Pathogenität des Krankenhauskeims auf einer Vielzahl von Virulenzfaktoren. Außerdem stellen zahlreiche Resistenzen gegenüber Antibiotika ein enormes Problem in der Behandlung von Infizierten, insbesondere bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem, dar. Um neue Therapieansätze zu entwickeln, erfordert es deshalb ein tiefes Verständnis über die physiologischen und regulatorischen Prozesse der Virulenzfaktoren.

In vorangegangenen Arbeiten wurde PlaF aus *P. aeruginosa* als putative membranverankerte Phospholipase A₁ mit Auswirkung auf die Virulenz des Bakteriums identifiziert. Mithilfe von etablierten Methoden war es möglich, PlaF biochemisch zu charakterisieren und das Substratspektrum zu spezifizieren (Kovacic, 2010, Bleffert *et al.*, 2019, Bleffert *et al.*, 2022). Allerdings ist die genaue physiologische Funktion von PlaF noch wenig beschrieben.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, PlaF im physiologischen Kontext näher zu beschreiben. Mithilfe eines zuvor generierten *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Stammes sollten erste phänotypische Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu sollte zunächst das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Bedingungen untersucht und die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen analysiert werden. Außerdem sollten durch Anwendung von quantitativen globalen Studien der Einfluss der *plaF*-Deletion auf Protein- und Lipidebene untersucht werden, um Rückschlüsse auf die physiologische und regulatorische Funktion von PlaF ziehen zu können.

Das Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit war es, die PlaF-Dimerisierung *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte das bereits etablierte TOXGREEN-System herangezogen und für die Untersuchung von PlaF adaptiert werden. Zusätzlich sollten die Auswirkungen von gezielten Punktmutationen auf die Dimerisierung des Proteins im PlaF-basierten TOXGREEN-System untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Die verwendeten Geräte und Materialien des täglichen Gebrauchs sind in Tabelle 2.1 aufgelistet, andernfalls wurden spezifische Geräte in den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Materialien

Name	Hersteller
<i>7900HT Fast Real-Time, PCR-System</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Biophotometer, Genesys 10 UV</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Blue/Green LED Transilluminator</i>	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
<i>Brandplates Mikrotiter Platte 96-well</i>	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
<i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Centrifuge Mikro200</i>	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
<i>Centrifuge Sorvall R6</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>DNA LoBind Tubes, Mikroreaktionsgefäße</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Ep Dualfilter T.I.P.S.®, Pipettierspitzen</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Erlenmeyer Kolben (100-2000 ml)</i>	DWK Life Sciences GmbH, Mainz
<i>Küvetten, Plastibrand® 1.5 ml</i>	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
<i>Dry block heater, Thermomixer comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Electrophoresis Power Supply EPS 601</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Solingen
<i>Electroporation cuvettes (0,2 cm gap)</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
<i>Falcon Reaktionsgefäß (15 ml, 50 ml)</i>	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
<i>French Press, SLM-AMINCO</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Gel electrophoresis cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
<i>Incubator shaker 3033</i>	GFL für Labortechnik mbH, Burgwedel
<i>Infinite® M1000 Pro, Fluoreszenzphotometer</i>	TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz
<i>Intas Advanced Fluorescence Imager</i>	Intas Science Imaging, Göttingen
<i>Kryoröhrchen, CryoTubes™</i>	Nalge Nunc Internat. Corp. Rochester, USA
<i>Laborflaschen (50-1000 ml)</i>	DWK Life Sciences GmbH, Mainz
<i>Micropipette Research Plus (0.5-10 µL)</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Micropipette Research Plus (100-1000 µL)</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Micropipette Research Plus (10-100 µL)</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>MicroPulser</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
<i>Mini Protean II Dual Slap Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
<i>Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
<i>Mini Trans-Blot im Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
<i>NanoDrop 2000 Spektrophotometer</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>PCR Thermocycler, Mastercycler gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>pH Elektrode</i>	Nordantec GmbH, Bremerhaven
<i>pH Meter</i>	Knick Elektr. Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
<i>Plattenphotometer SpectraMax250</i>	Marshall Scientific, Hampton, USA
<i>RT-qPCR Platte 384-well, PP, F-Boden</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Speed Vac-Konzentrator 5301</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Ultracentrifuge, Optima I-80 Xp (Rotor 55.2 TI)</i>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
<i>Vortex Mixer VF2</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
<i>XCell SureLock Mini</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.2 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, Medienkomponenten sowie Antibiotika wurden von folgenden Firmen kommerziell erworben:

- Antibiotika:** AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
- Chemikalien:** Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
- Medium:** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
- Enzyme:** T4-DNA-Ligase, alkaline Phosphatase, Phusion-Polymerase sowie Restriktionsendonukleasen wurden von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) erworben. Lysozym wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) erworben. *RNase-Free DNase Set* wurde von Qiagen GmbH (Hilden) erworben. *Ambion™ DNase I* wurde von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) erworben

2.3 Antikörper

Tabelle 2.2: Verwendeter Antikörper

Antikörper	Gerichtet gegen	Organismus	Verdünnung	Referenz
α -His	6xHistidin	Kaninchen	1:5000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.4 Kits

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
BIS-TRIS 4-12 % Polyacrylamidgele	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
EnzChek™ Phospholipase A1 Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
In-Fusion® HD Cloning Kit	Takara Bio USA, Inc., San Jose, USA
innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0	Analytik Jena AG, Jena
LPS Extraction Kit	ABC Scientific, Glendale, USA
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ ECL Westernblotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Pierce™ Fluorescent Protease Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.5 DNA- und Proteingrößenstandards

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Größenstandards

Name	Größenstandard	Hersteller
GeneRuler 1 Kb DNA-Leiter	10000, 8000, 6000 , 5000, 4000, 3500, 3000 , 2500, 2000, 1500, 1000 , 750, 500, 250 [Bp]	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Ladder	180, 130, 100, 70 , 55, 40, 35, 25, 15, 10 [kDa]	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.6 Plasmide

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pccGFP-GpA	ToxR (DNA-bindende Domäne) aus <i>V. cholerae</i> fusioniert an die Transmembrandomäne von GpA und an MBP, Amp ^R , <i>ori</i> , <i>rop</i> , P _{ctx} (Cholera Toxin Promotor aus <i>V. cholerae</i>), <i>sfGFP</i>	Armstrong & Senes, 2016, Addgene Plasmid #73651
pccGFP-G83I	Aufbau wie pccGFP-GpA mit Substitution von Nukleotiden der DNA-Sequenz von GpA, sodass das Triplet der 83. Aminosäure für ein Isoleucin kodiert	Armstrong & Senes, 2016, Addgene Plasmid #73650
pccGFP-KAN	Aufbau wie pccGFP-GpA ohne kodierende Sequenz von GpA (Leervektor)	Armstrong & Senes, 2016, Addgene Plasmid #73649
pccGFP-PlaF*	Aufbau wie pccGFP-GpA ohne kodierende Sequenzen von GpA und MBP stattdessen <i>plaF</i> -Sequenz fusioniert über eine <i>Linker</i> -Sequenz an das 3'-Ende von <i>toxR</i>	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-L8A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Leucin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-V9A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Valin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-L10A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Leucin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-L12A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Leucin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-G17A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Glycin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-V18A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Valin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-F21A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Phenylalanin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-V22A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Valin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-P23A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Triplet kodiert für Alanin statt Prolin	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pccGFP-PlaF*-T25A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Tripletts kodiert für Alanin statt Threonin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-S29A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Tripletts kodiert für Alanin statt Serin	Diese Arbeit
pccGFP-PlaF*-T32A	Aufbau wie pccGFP-PlaF* mit Austausch von Nukleotiden; Tripletts kodiert für Alanin statt Threonin	Diese Arbeit

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 2.6) wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) kommerziell erworben. Das Lyophilisat wurde in Nuklease-freiem H₂O auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MC_NheI_PlaF_fw	AATAGCTAGCGGTGGTTCTGG TGGTGGTTCTGGTGGCGGAA GCGGATCTAGAAAACGATTCC T	Amplifikation (vorwärts) von <i>plaF</i> ohne Start-Codon, <i>NheI</i> zur Integration in pccGFP-GpA-Rückgrat, Linker-Sequenz (GGSG) ₃ , Restriktionsschnittstelle <i>XbaI</i>
MC_SacI_PlaF_rv	AATAGAGCTCTCAGTGGTGGT GGTGGTGGTGGCG	Amplifikation (rückwärts) von <i>plaF_{h6}</i> , bindet an kodierende Sequenz von Histidin-Epitop, <i>SacI</i> zur Integration in pccGFP-GpA-Rückgrat
MC_PlaF_L8A_fw	CCTCGGTGCGGTTCTGCTGCT GGCGGT	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Leucin kodieren
MC_PlaF_L8A_rv	AGAACCGCACCGAGGAGGAA TCGTTTTCTAGA	
MC_PlaF_V9A_fw	CGGTCTGCGCTGCTGCTGGC GGTCGCC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Valin kodieren
MC_PlaF_V9A_rv	AGCAGCGCCAGACCGAGGAG GAATCG	
MC_PlaF_L10A_fw	TCTGGTTGCGCTGCTGGCGGT CGCCGC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Leucin kodieren
MC_PlaF_L10A_rv	AGCAGCGCAACCAGACCGAG GAGGAATCG	
MC_PlaF_L12A_fw	TCTGCTGCGGCGCGTCCGCGC CGGCGT	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Leucin kodieren
MC_PlaF_L12A_rv	ACCGCGCCAGCAGAACCAG ACCGAGGA	
MC_PlaF_G17A_fw	CGCCGCCCGGTCCTCTACTTC GTCCCGGCTA	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Glycin kodieren
MC_PlaF_G17A_rv	AGGACGGCGGGCGGCGACCGC CAGCA	
MC_PlaF_V18A_fw	CGCCGGCGCGCTCTACTTCGT CCCGGCTACC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Valin kodieren

Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MC_PlaF_V18A_rv	TAGAGCGCGCCGGCGGCGAC CGCCAGC	
MC_PlaF_F21A_fw	CCTCTACGCGTCCCGGCTAC CCTCCTCG	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Phenylalanin kodieren
MC_PlaF_F21A_rv	GGGACGCGGTAGAGGACGCC GGCGGC	
MC_PlaF_V22A_fw	CTACTTCGCGCCGGCTACCCTC CTCGCC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Valin kodieren
MC_PlaF_V22A_rv	GCCGGCGCGAAGTAGAGGAC GCCGGC	
MC_PlaF_P23A_fw	CTTCGTGCGGCTACCCTCCTC GCCAGC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Prolin kodieren
MC_PlaF_P23A_rv	GTAGCCGCGGACGAAGTAGAG GACGCCGG	
MC_PlaF_T25A_fw	TCCCGGCTGCCCTCCTCGCCA GCGTAC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Threonin kodieren
MC_PlaF_T25A_rv	GGAGGGCAGCCGGGACGAAG TAGAGG	
MC_PlaF_S29A_fw	CCTCGCCGCGGTACGCACCGT CGAGCGC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Serin kodieren
MC_PlaF_S29A_rv	CGTACCGCGGCGAGGAGGGT AGCCGG	
MC_PlaF_T32A_fw	CGTACGCGCGGTCGAGCGCG GTCTCGCC	Oligonukleotide (<i>In-Fusion</i>), wobei Tripletts für Alanin statt Threonin kodieren
MC_PlaF_T32A_rv	TCGACCGCGCGTACGCTGGCG AGGAGG	
pccGFP- PlaF_seq_fw	CATGACTTTGTTTGGCGAGAG CAAG	Oligonukleotide für die Sequenzierung von pccGFP-PlaF*
pccGFP- PlaF_seq_rv	CACATTTCCCCGAAAAGTGC	

fw: forward (vorwärts), rv: reverse (rückwärts), rot: modifizierte Tripletts im Vergleich zum WT,
blau: Restriktionsschnittstelle

2.8 Bakterien

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten prokaryotischen Zellen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	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</i> <i>thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA</i> λ pir phage lysogen	Herrero <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> JM110	F ['] <i>traD36 lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ / <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thr leu thi laY galK galT ara fhuA dam</i> <i>dcm glnV44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Ec294:: [RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] Tp'</i> , <i>Sm'</i> , <i>tra</i> ⁺ <i>recA, pro, res</i>	Simon <i>et al.</i> (1983)

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	<i>recA thi pro hsdR⁻M⁺ RP4::2-TC::Mu::Km Tn7</i> <i>λpir</i> phage lysogen	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>E. coli</i> ArcticExpress	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte</i> [<i>cpn10 cpn60 Gent^r</i>]	Agilent Technologies Deutschland GmbH, #230191, Waldbronn
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PAO1, Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> (1979)
<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF</i>	Δ <i>plaF</i>	Bleffert <i>et al.</i> (2022)
<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF::plaF</i>	<i>attTn7::plaF</i>	Heitzer (2019)
<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>plaF::plaF</i> _{S137A}	<i>attTn7::plaF</i> _{S137A}	Heitzer (2019)

2.9 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.9.1 Sterilisation von Medien

Alle verwendeten Medien wurden ohne Antibiotika hergestellt und für 20 min bei 121 °C und 200 kPa in einem Autoklav sterilisiert. Für die Herstellung von Nährböden wurde zusätzlich noch 1,5 % (w/v) Agar-Agar zu den Medien hinzugefügt und autoklaviert. Die Lagerung der sterilisierten Medien erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

2.9.2 Lagerung und Anzucht von Bakterien

Für die Herstellung von Kryo-Kulturen wurden jeweils 1,8 ml Übernachtskulturen mit 138 μ l Dimethylsulfoxid versetzt und anschließend für die langfristige Lagerung bei -80 °C eingefroren. Prokaryotische Zellen wurden in Flüssigmedien unter aeroben Bedingungen bei 150 UpM (Umdrehungen pro Minute) und bei 37 °C kultiviert. Dabei betrug das Kulturvolumen nicht mehr als 1/10 des verwendeten Gefäßvolumens. Die Anzucht auf LB-Agarplatten erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37 °C. Die selektive Kultivierung wurde durch Zugabe von entsprechenden Antibiotika erzielt. Die dabei verwendeten Antibiotikakonzentrationen sind in Tabelle 2.8 gelistet.

Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration <i>E. coli</i> [μ g/ml]	Konzentration <i>P. aeruginosa</i> [μ g/ml]
Ampicillin	100	-
Gentamicin	10	30
Irgasan	-	25
Tetracyclin	10	100

2.9.3 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli*

(Modifiziert nach Sambrook & Russell, 2006)

Für die Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden zunächst Zellen einer Übernachtskultur auf eine initiale OD_{580nm} 0,05 (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm) in 500 ml 2YT-Medium inokuliert und bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 150 UpM kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase zwischen einer OD_{580nm} 0,4-0,6 geerntet und für 15 min bei 4 °C bei 2790 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Von diesem Schritt ausgehend wurden die Zellen durchgehend auf Eis gelagert weiter behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 ml eiskaltem sterilem H₂O (Milli-Q) gewaschen, bei 2790 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Ein dritter Waschschrift erfolgte mit 10 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerol-Lösung. Nach Zentrifugation bei 2790 g wurden die Zellen schließlich erneut in 4 ml einer 10 %igen Glycerol-Lösung gelöst und jeweils 50 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße fraktioniert und bei -80 °C gelagert.

Zur Vorbereitung für die Transformation von Zellen wurden jeweils 50 µl der fraktionierten Zellen 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1,0 µl gereinigter Plasmid-DNA wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Tabelle 2.1) überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem *Micropulser* (Tabelle 2.1) mit den eingestellten Parametern 2,5 kV (Spannung), 200 Ω (Widerstand) sowie 25 µF (Elektrische Kapazität). Im Anschluss wurden die Zellen durch Suspension in 750 µl LB-Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 bis 3 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln für die Expression der Antibiotikaresistenz inkubiert. Zur Isolierung von positiven Transformanten wurden jeweils 100 µl der Zellen auf LB-Agarplatten unter Selektionsdruck mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2YT-Medium: 16 g/l Tryptone, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0

LB-Medium: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller)

LB-Agar: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller), 15 g/l Agar

2.9.4 Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*

(Modifiziert nach Bagge *et al.*, 2002)

Die Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock basiert auf einer modifizierten Calciumchlorid-Methode. Für die Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* wurden zunächst Zellen einer Übernachtskultur auf eine initialen OD_{580nm} 0,05 in 500 ml LB-Medium beimpft und bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 150 UpM kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase zwischen einer OD_{580nm} 0,4-0,6 für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2790 g, 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Darauffolgend wurden die Zellen mit 35 ml eiskaltem sterilem FB-Puffer gewaschen, weitere 20 min auf Eis inkubiert, bei 2790 g pelletiert und der Überstand verworfen. Zum Schluss wurden die Zellen erneut in 8,5 ml eiskaltem sterilen FB-Puffer gelöst und jeweils 100 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße fraktioniert und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation von chemisch-kompetenten Zellen wurde ein Aliquot mit 100 µl der Zellen zuvor 10 min auf Eis aufgetaut. Nachfolgend wurde 1,0 µl gereinigte Plasmid-DNA hinzugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek und eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min. Für die Expression der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen in 750 µl LB-Medium suspendiert und 1 bis 3 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Selektion von positiven Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und durch Inkubation bei 37 °C über Nacht.

LB-Medium: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller)

FB-Puffer: 100 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 10 mM Kaliumacetat, 10 % (w/v) Glycerol, pH 6,4

LB-Agar: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller), 15 g/l Agar

2.9.5 Biofilmproduktion unter statischen Bedingungen in 96-Mikrotiterplatten

(Modifiziert nach Coffey & Anderson, 2014)

Zur Vorbereitung für die Kultivierung wurden zunächst die zu untersuchenden *P. aeruginosa*-Stämme aus einer Übernachtskultur auf eine OD_{580nm} 0,1 in 1 ml LB-Medium verdünnt. Anschließend wurden achtmal jeweils 100 µl der Verdünnung in jeweils eine Vertiefung einer sterilen 96-Mikrotiterplatte (MTP, Tabelle 2.1) pipettiert. Als Referenz wurden jeweils 100 µl LB-Medium verwendet. Für die Inkubation wurde die MTP mit dem Deckel abgedeckt und in eine verschließbare Transportbox mit einer offenen Flasche VE-H₂O (vollentsalztes Wasser) überführt und bei 37 °C unter statischen Bedingungen für eine Dauer von 12 bis 96 h inkubiert.

LB-Medium: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller)

2.9.6 Färben von adhärennten Zellen mit Kristallviolett

(Modifiziert nach Coffey & Anderson, 2014)

Zunächst wurde die Zellkultur aus Kapitel 2.9.5 durch Invertieren der MTP in einen Abfallbehälter verworfen. Anschließend wurden nicht adhärennte Zellen durch zweimaliges Waschen gelöst. Dabei wurde die MTP in ein 5-Liter-Becherglas mit 1 L VE-H₂O eingetaucht. Hier war zu beachten, dass alle Luftblasen aus jeder einzelnen Vertiefung gelöst wurden, um einen gleichmäßigen Wascheffekt zu gewährleisten. Nachfolgend wurde das Wasser aus den Vertiefungen durch Invertieren zurück in das Wasserbad gekippt. Zum schnelleren Trocknen wurde die MTP in einem

Inkubator bei 37 °C für 15-20 min gelagert. Zur Anfärbung des Biofilms wurden im weiteren Verlauf jeweils 150 µl einer wässrigen 0,1 %igen Kristallviolett-Färbelösung (w/v) in jede Vertiefung pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kristallviolettlösung mithilfe einer Pipette abgenommen und in eine gesonderte Abfallflasche überführt. Überschüssige Kristallviolettlösung in den einzelnen Vertiefungen wurde mit jeweils 200 µl VE-H₂O gelöst und ebenfalls in die Abfallflasche überführt. Um einen qualitativ gleichmäßigen Wascheffekt zu gewährleisten, wurde die MTP erneut zweimal im Wasserbad, wie zuvor beschrieben, gewaschen und anschließend bei 37 °C für 15-20 min getrocknet. Zum Lösen des Kristallvioletts wurden jeweils 150 µl einer 30 %igen Essigsäure in jede Vertiefung hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Für die Quantifizierung wurden jeweils 50 µl der gelösten Kristallviolettlösung und 50 µl VE-H₂O in eine neue MTP überführt und im Plattenphotometer (Tabelle 2.1) bei einer Wellenlänge von 550 nm die Absorption gemessen.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch das kommerziell erworbene *innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0* (Tabelle 2.3). Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse von *E. coli*-Zellen und der Bindung von DNA an eine Silica-Membran. Das Verfahren wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.10.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA- oder RNA-Konzentrationen wurden mithilfe des *NanoDrop 2000c UV Spektrophotometer* (Tabelle 2.1) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der ermittelte Absorptionsquotient 260/280 ist ein Maß für die Reinheit der gemessenen DNA- bzw. RNA-Probe. Ein Quotientenwert von ≈1,8 für DNA sowie ≈2,0 für RNA ist akzeptabel und wurde als „rein“ beurteilt.

2.10.3 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von generierter Plasmid-DNA wurde bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) nach der Sanger-Methode (Sanger & Coulson, 1975) durchgeführt.

2.10.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Modifiziert nach Mullis *et al.*, 1986)

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf einer Wiederholung der Schritte Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotiden und Elongation, welche zusammen einen Zyklus ergeben. Zunächst wurden im Denaturierungsprozess bei 95 °C alle doppelsträngigen DNA-Sequenzen in Einzelstränge getrennt, im zweiten Schritt erlaubt die Senkung der Temperatur zwischen 60-71 °C die Anlagerung der Gen-spezifischen Oligonukleotide, im letzten Schritt erfolgt durch die DNA-Polymerase die Anlagerung von komplementären Nukleotiden an die DNA-Matrize. Ein nachfolgender Denaturierungsschritt leitet den Beginn eines weiteren Zyklus ein. Die genaue Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Tabelle 2.9) sowie die Programm-Einstellungen des Thermozyklers (Tabelle 2.10) sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der PCR

Komponente	Volumen	Stocklösung
DNA-Matrix	1,0 µl	10,0 ng/µl
Oligonukleotid 1	2,5 µl	10,0 pmol/µl
Oligonukleotid 2	2,5 µl	10,0 pmol/µl
dNTPs	1,0 µl	10,0 mmol/µl
DMSO	1,5 µl	99,5 %
GC-Puffer	10,0 µl	5,0 x
Phusion-Polymerase	0,5 µl	1,0 U/µl
Nuclease-freies H ₂ O	31,0 µl	

Tabelle 2.10: Programm-Einstellung des Thermozyklers

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	10,0 min	
Denaturierung	95 °C	0,5 min	34x
Anlagerung	x °C	0,5 min	
Elongation	72 °C	x min	
Finale Extension	72 °C	10,0 min	
Halt	15 °C	∞	

Die spezifische Temperatur während der Anlagerung der Oligonukleotide wurde mithilfe des *Online-Tools New England BioLabs* (Tabelle 2.18) ermittelt. Die optimale Elongationszeit wurde entsprechend der Länge der zu amplifizierenden Gensequenz angepasst, wobei die *Phusion-Polymerase* eine DNA-Syntheserate von 2000 Nukleotiden pro Minute aufweist. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.10.8) geprüft und für weitere molekularbiologischen Methoden mithilfe eines PCR-Reinigungskits (Kapitel 2.10.9) gereinigt.

2.10.5 Zielgerichtete Mutagenese durch *In-Fusion Cloning Kit HD*

Der zielgerichtete Austausch von Nukleotiden erfolgte mithilfe der PCR und des *In-Fusion Cloning HD Kits* (Tabelle 2.3). Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 2.6) wurden mithilfe des *In-Fusion Cloning Primer Design Tools* (Tabelle 2.18) konstruiert. Das Verfahren erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

2.10.6 Enzymatische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

(Modifiziert nach Smith & Birnstiel, 1976)

PCR-Produkte und Plasmid-DNA wurden für Klonierungszwecke oder zur Überprüfung von Plasmid-DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen (Kapitel 2.2) hydrolysiert. Die Reaktionsansätze wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers angewendet.

2.10.7 *In vitro* Rekombination von DNA

(Modifiziert nach Dugaiczky *et al.*, 1975)

Die *in vitro* Rekombination ermöglicht die Generierung von neuen Vektoren. Dazu wurde im Vorfeld das PCR-Produkt und die Plasmid-DNA jeweils mit entsprechend gleichen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA mittels alkalinen Phosphatase (Kapitel 2.2) dephosphoryliert. Die zum Einsatz kommende T4-DNA-Ligase (Kapitel 2.2) ist ein Enzym, welches vorzugsweise aneinandergrenzende, doppelsträngige DNA-Fragmente mit den zuvor erzeugten *sticky*-Enden über Phosphodiesterbindungen ligiert. Die Durchführung der Ligation wurde nach Herstellerangaben umgesetzt, dabei wurde überwiegend die Menge an linearisiertem Plasmid und PCR-Produkt im Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Danach wurden *E. coli*-Zellen entweder mittels Elektroporation (Kapitel 2.9.3) oder durch Hitzeschock (Kapitel 2.9.4) transformiert.

2.10.8 Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

(Modifiziert nach Vogelstein & Gillespie, 1979)

Die Untersuchung von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei bildet das hergestellte Agarosegel eine dreidimensionale Matrix mit Poren, wodurch negativ geladene DNA-Fragmente über ein elektrisch angelegtes Feld in Richtung der Anode wandern. Das resultierende Laufverhalten der DNA-Fragmente erlaubt folglich Rückschlüsse über die Größe der untersuchenden DNA zu ziehen. Hinsichtlich der

Abhängigkeit des Laufverhaltens von der DNA-Größe, laufen kleinere DNA-Fragmente schneller und weiter durch das Agarosegel als größere DNA-Fragmente. In Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde eine 1 % (w/v) Agaroselösung in 0,5x TBE-Puffer vollständig aufgeköcht und anschließend wieder auf etwa 60 °C abgekühlt. Zur Visualisierung der DNA wurde Midori-Green-Lösung in einer Verdünnung von 1:80000 hinein pipettiert und vorsichtig durchmischt. Darauffolgend wurde die Agaroselösung in einen vorgesehen Gelschlitten mit einem Kamm gegossen und für 10 min das Gel ausgehärtet. Zu Beginn der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Agarosegel in ein Bad aus 0,5x TBE-Puffer in einer entsprechenden Gelelektrophoresekammer (Tabelle 2.1) hineingelegt. Für die Analyse der DNA-Fragmente wurden jeweils 10-15 µl DNA-Probe, welche zuvor mit 5x DNA-Ladepuffer gemischt wurde, in die jeweilige Tasche hinein pipettiert. Als Größenstandard wurde 6 µl Größenstandard verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 130 V für 30 min. Die Dokumentation erfolgte mithilfe des *Blue/Green LED Transilluminators* (Nippon Genetics Europe GmbH).

5x TBE-Puffer:	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 25 mM Na ₂ EDTA
5x DNA-Ladepuffer:	Qiagen, Hilden
Midori-Green:	Nippon Genetics Europe, Düren
Größenstandard:	Gene Ruler 1 Kb DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Elektrophorese:	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.10.9 Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Produkte nach einer PCR, Restriktion oder Ligation wurden mit dem kommerziell erworbenen *NucleoSpin Gel and PCR clean up Kit* (Tabelle 2.3) gereinigt. In einigen Fällen, wenn notwendig, wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen ausgeschnitten und mithilfe des oben genannten Kits gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

2.10.10 Isolierung von RNA aus *P. aeruginosa*

(Modifiziert nach Skoczinski, 2016)

Die Untersuchung der mRNA-Menge von *P. aeruginosa* erfolgte mithilfe der quantitativen *Real-Time* PCR. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der x-fachen Veränderung der Transkriptmenge eines Gens zwischen zwei verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen. Die RNA wurde zunächst mit dem *NucleoSpin RNA preparation Kit* (Tabelle 2.3) extrahiert. Das Verfahren erfolgte grundsätzlich nach den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurden etwa 10⁹ Zellen aus planktonisch oder statisch wachsenden Kulturen geerntet und diese dann für 10 min bei 4 °C bei 21000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 100 µl TE-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym (Kapitel 2.2) aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 10 min.

Anschließend wurden 350 µl RA1-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und mithilfe eines Vortexers (Tabelle 2.1) durchmischt. Anhand des mitgelieferten violetten Filters wurde das Zelllysate von Zelltrümmern durch Zentrifugation für 1 min bei 11000 g getrennt und der Durchfluss mit 350 µl 70 %igen Ethanol kräftig durchmischt. Darauffolgend wurde das Filtrat auf einen blauen Filter übertragen und die RNA durch erneute Zentrifugation für 1 min bei 11000 g an die Silica Membran gebunden und der Durchfluss verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 350 µl MDB-Puffer und eine Zentrifugation für 1 min bei 11000 g. Im nächsten Schritt wurden die gebundenen Nucleinsäuren mithilfe der gelieferten rekombinanten DNase behandelt, um kontaminierte DNA hydrolytisch in kleinere DNA-Fragmente zu spalten. Dafür wurden 95 µl eines frisch angesetzten rDNase Reaktionsansatzes auf den Filter hinzugegeben, für 15 min bei RT inkubiert und für 30 sek bei 11000 g zentrifugiert. Um eine möglichst reine RNA zu gewinnen wurden im weiteren Verlauf die DNasen *RNase-Free DNase Set* und *Ambion™ DNase I* (Kapitel 2.2) verwendet. In Vorbereitung dazu wurden zunächst 10 µl rDNase mit 70 µl RDD-Puffer (Qiagen) gemischt und 80 µl auf den zuvor behandelten Filter hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nachkommend wurde die behandelte RNA nach den Anweisungen des *NucleoSpin RNA preparation Kits* (Tabelle 2.3) gewaschen und die RNA eluiert. Zu diesem Zweck wurde der Reihe nach 200 µl RAW2-Puffer, 600 µl RA3-Puffer sowie erneut 250 µl RA3-Puffer auf den Filter pipettiert, zwischen den Waschschritten für 1 min bei 11000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurde die DNA-freie RNA mit 47 µl RNase-freiem H₂O in einem *DNA LoBind*-Reaktionsgefäß (Tabelle 2.1) eluiert. Zum Schluss wurde die eluierte RNA mithilfe des *Ambion™ DNase I* (Kapitel 2.2) nach Herstellerangaben behandelt, um noch minimal vorhandene DNA-Fragmente hydrolytisch zu spalten. Die Konzentrationsbestimmung wurde mithilfe des *NanoDrop 2000c* (Tabelle 2.1) über die Absorption bei 260 nm durchgeführt. Für die langfristige Lagerung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,0, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.10.11 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mithilfe des *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Tabelle 2.3) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden jeweils 1000 ng der extrahierten RNA transkribiert. Als Kontrolle diente ein analoger Ansatz, wobei 6 µl Nuklease-freies H₂O anstelle der Reverse Transkriptase eingesetzt wurde. Die genaue Zusammensetzung der cDNA-Synthese ist der untenstehenden Tabelle zu entnehmen (Tabelle

2.11). Anschließend erfolgte die reverse Transkription in vorgeheizten Thermo-Schüttlern in der folgenden Reihenfolge: 10 min bei 25 °C, 30 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der cDNA-Synthese

Komponente	Menge
5x Reaktionsmix	4 µl
Maxima Enzyme Mix	2 µl
RNA-Matrize	1000 ng
Nuklease-freies H₂O	ad 20 µl

2.10.12 Quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR wurde mithilfe des *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Tabelle 2.3) im 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Tabelle 2.1) durchgeführt. Für die PCR wurden jeweils 50 ng cDNA oder 50 ng RNA (Kontrolle) als Matrize eingesetzt. Als Referenz zur Normierung der Expressionsstärke wurde bei jedem Experiment neben dem getesteten Zielgen auch das Haushaltsgen *rpoD* aus *P. aeruginosa* adressiert, dessen Genexpression zu den gewählten Wachstumsbedingungen gleich sein soll. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (Tabelle 2.12) sowie die Einstellungen des Zyklusprogramms (Tabelle 2.13) sind den untenstehenden Tabellen zu entnehmen. Die verwendeten Oligonukleotide wurden mithilfe des *Online-Tools Primer3Web* (Tabelle 2.18) erstellt.

Die relative Transkriptmengenänderung wurde mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008).

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes

Komponente	Menge
cDNA oder RNA (50 ng/µl)	1,0 µl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	0,4 µl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	0,4 µl
<i>Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix</i>	10,0 µl
Nuklease-freies H₂O	8,2 µl

Tabelle 2.13: Programm-Einstellung der *Real-Time* PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 sek	30x
Anlagerung/Elongation	60 °C	60 sek	

2.11 Biochemische Methoden

2.11.1 Herstellen von Proteinproben für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

(Modifiziert nach Laemmli, 1970)

Es wurden 20 µl Proteinproben aus Ganzzellextrakten in einem Reaktionsgefäß mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) gemischt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Für die PAGE wurden jeweils 10-15 µl der Proteinprobe in die Tasche eines Polyacrylamidgels geladen.

SDS-Probenpuffer (5x): 50 mM Tris-HCl, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

2.11.2 Proteintrennung durch PAGE

Mithilfe einer PAGE wurden Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt und anschließend mithilfe einer Coomassie-Färbung gefärbt (Kapitel 2.11.4) oder für eine spezifischere Detektion in einem Westernblot (Kapitel 2.11.5) weiterverarbeitet. In dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, vorzugsweise kommerziell erworbene *NuPAGE BIS-TRIS 4-12 %* Polyacrylamidgele (Tabelle 2.3) verwendet und die Proteine in einem kontinuierlichem PAGE-System getrennt. Die Geltaschen wurden mit jeweils 10-15 µl der Proteinprobe (Kapitel 2.11.1) bzw. 5 µl *Prestained Protein Ladder* (Tabelle 2.4) als Größenstandard beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Apparatur *XCell SureLock Mini* (Tabelle 2.1) mit 500 ml MOPS-SDS-Puffer bei einer konstanten Spannung von 200 V für 35-50 min.

MOPS-SDS-Puffer: 50 mM MOPS, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, pH 7,7

2.11.3 Proteintrennung mittels SDS-PAGE

(Modifiziert nach Laemmli, 1970)

SDS-Polyacrylamid-Gele, bestehend aus einem Sammel- und Trenngel, wurden mithilfe der Gießapparatur *Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting* (Tabelle 2.1) hergestellt. Die Gele wurden entsprechend der Zusammensetzung in Tabelle 2.14 hergestellt und in die Gießapparatur gegossen.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE

Komponente Stocklösung	12 % Trenngel	5 % Sammelgel
Acrylamid-Lösung	4 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	
0,5 M Tris-HCl		1,3 ml
VE-H ₂ O	3,4 ml	2,8 ml
10 % SDS (w/v)	100 µl	50 µl
10 % APS (w/v)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Für die Proteintrennung wurde das zuvor hergestellte SDS-Polyacrylamid-Gel in die Gelapparatur *Mini-Protean II Dual Slap Cell* (Tabelle 2.1) überführt und mit 500 ml SDS-Laufpuffer beschichtet. Die Geltaschen wurden mit jeweils 10-15 µl der Proteinprobe (Kapitel 2.11.1) bzw. 5 µl *Prestained Protein Ladder* (Tabelle 2.4) als Größenstandard beladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte zunächst für 15 min bei 100 V (Trennung im Sammelgel) und anschließend für 45 min bei 200 V (Trennung im Trenngel). Anschließend wurde das Trenngel entweder mittels Coomassie-Färbung angefärbt (Kapitel 2.11.4) oder für die immunhistochemische Detektion mittels Westernblot (Kapitel 2.11.5) weiterverarbeitet.

SDS-Laufpuffer: 3,03 g/l Tris-HCl, 14,41 g/l Glycin, 1,0 g/l SDS

2.11.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE mittels *Roti®Blue quick* (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) nach Herstellerangaben gefärbt. Zu diesem Zweck wurden etwa 30 ml *Roti®Blue quick*-Lösung dem Gel in einer Färbeschale hinzugegeben und unter leichtem Schütteln für 10-30 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Färbung wurde anschließend das Gel in einer Schale mit VE-H₂O gewaschen und anschließend die Dokumentation im *Intas Advanced Fluorescence Imager* (Tabelle 2.1) durchgeführt. Zur Reduzierung von Hintergrundfärbung wurde das Gel gegebenenfalls 3-5 min in 20 % Ethanol gewaschen und anschließend in VE-H₂O gelagert.

2.11.5 Immunhistochemische Detektion von Proteinen

(Modifiziert nach Dunn, 1986)

Für eine spezifischere Detektion von *6x-His Tag* versehenen Proteinen wurde eine Analyse per Westernblot durchgeführt. Hierzu wurde ein primärer *6x-His Tag Monoclonal* Antikörper (Tabelle 2.2), welcher spezifisch gegen ein C-terminal fusioniertes Histidin-Epitop gerichtet ist, verwendet. Zudem besitzt der Antikörper ein HRP-Konjugat (*horse radish peroxidase*), welches die Visualisierung des Westernblots durch Chemolumineszenz erlaubt, da HRP die Oxidation von

Luminol zu 3-Aminophthalat-Dianion katalysiert. Nach der PAGE wurden die Proteine mithilfe des Transfermoduls *Mini Trans-Blot* im *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Tabelle 2.1) nach den Herstellerangaben auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) im Dunn-Carbonat-Puffer transferiert. Der Protein-Transfer erfolgte in zwei Schritten mit den folgenden Parameter-Einstellungen: 15 min bei 150 mA, 45 min bei 300 mA. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zunächst in 20 ml Blockier-Lösung für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem *6x-His Tag Monoclonal* Antikörper (Verdünnung: 1:5000) in 20 ml Blockier-Lösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Um ungebundene Antikörper zu lösen wurde die Membran anschließend 3x 15 min in TBST-Puffer bei RT gewaschen. Im letzten Schritt wurde die PVDF-Membran mithilfe des *Pierce™ ECL Westernblotting-Substrats* (Tabelle 2.3) nach Herstellerangaben beschichtet und die Chemolumineszenz mithilfe des *Intas Advanced Fluorescence Imager* (Tabelle 2.1) dokumentiert.

Dunn-Carbonat-Puffer:	3,18 g/l Na ₂ CO ₃ , 8,40 g/l NaHCO ₃ , 20 % (v/v) Methanol
Blockier-Lösung:	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 5 % (w/v) Milchpulver, 0,2 % (v/v) Tween20, pH 8,0
TBST-Puffer:	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 0,2 % (v/v) Tween20, pH 8,0

2.11.6 Esteraseaktivität mit Ganzzellextrakten

(Modifiziert nach Jaeger & Kovacic, 2014)

Die enzymatische Funktion von PlaF oder PlaF-Fusionskonstrukten wurde mithilfe einer Esteraseaktivitätsmessung mit Ganzzellextrakten untersucht. Dabei wurde *para*-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB) als Substrat verwendet, welches im Falle einer Hydrolyse zu Butyrat und *para*-Nitrophenol gespalten wird. Im deprotonierten Zustand liegt der freigesetzte Chromophor als *para*-Nitrophenolat vor, was zu einem gelben Farbumschlag führt. Mithilfe eines Plattenphotometers (Tabelle 2.1) kann die Zunahme des Farbumschlags über die Zeit bei einer Wellenlänge von 410 nm dokumentiert werden.

In Vorbereitung dazu wurden zunächst *P. aeruginosa*- oder *E. coli*-Zellen auf eine initiale OD_{580nm} 0,05 in 10 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 150 UpM bis zu einer OD_{580nm} 1 kultiviert. Anschließend wurden jeweils 2 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 5 min bei 11000 g und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Es wurden 200 µl TRIS-HCl-Puffer in das Reaktionsgefäß zugegeben und die Zellen durch Mischen auf eine Zelldichte von OD_{580nm} 10 eingestellt. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis jeweils 3x 10 sek mittels Ultraschalls bei einer Pulsfrequenz von 40 %. Für die Aktivitätsmessung wurden jeweils 10 µl des Zelllysats in eine Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Zum Start der Reaktion wurden jeweils 90 µl der

*p*NPB-Substratlösung zugegeben und die Kinetik im Plattenphotometer (Tabelle 2.1) bei einer Wellenlänge von 410 nm alle 30 sek für 30 min bei RT gemessen. Als Referenz diente der 100 mM TRIS-HCl-Puffer. Die volumetrische Aktivität wurde mithilfe der untenstehenden Formel ermittelt. Hierfür wurden die Zeitpunkte t_1 und t_0 aus der linearen Steigung entnommen.

LB-Medium:	25 g/l LB-Medium (Luria/Miller)
Tris-HCl:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
<i>p</i>NPB-Stocklösung:	20 mM <i>p</i> NPB in Ethanol <i>p.a.</i>
<i>p</i>NPB-Substratlösung:	1 mM <i>p</i> NPB, 250 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,2

$$U/ml = \frac{(A_{410nm}(t_1) - A_{410nm}(t_0)) \times V_{total} \times 1000}{(t_1 - t_0) \times V_{Probe} \times d \times \epsilon}$$

$A_{410nm}(t_x)$ = Absorption zum Zeitpunkt x bei einer Wellenlänge von λ_{410nm}
 V_{total} = Reaktionsendvolumen in ml
 V_{Probe} = Volumen der eingesetzten Probe in ml
 d = Schichtdicke von 0,275 bei einem Volumen von 100 μ l
 ϵ = Spezifischer Extinktionskoeffizient von *p*NP 10400 μ mol⁻¹ x dm³ x cm⁻¹

2.11.7 Phospholipase A₁-Aktivität mit Ganzzellextrakten

(Modifiziert nach da Mata Madeira *et al.*, 2016)

Die Phospholipase A₁-Aktivität von *P. aeruginosa* wurde aus Ganzzellextrakten mittels *EnzChek Phospholipase A₁ Assay Kit* (Tabelle 2.3) ermittelt. Zu diesem Zweck wurden zunächst *P. aeruginosa*-Zellen aus einer Übernachtskultur auf eine OD_{580nm} 0,05 in 25 ml LB-Medium inokuliert und bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 150 UpM kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{580nm} 1 wurden 5 ml der Zellkultur durch Zentrifugation geerntet und in 1 ml PLA₁-Puffer (enthalten im Kit) gelöst. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mittels Ultraschalls (3x30 sek) mit einer Pulsfrequenz von 40 % lysiert. Die Aktivitätsmessung und die genaue Versuchsanweisungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Grundsätzlich wurden jeweils 50 μ l Zelllysat mit 50 μ l Substrat-Liposom-Mix, bestehend aus Glycerophosphoethanolaminen mit *BODIPY*[®] FL-Farbstoff-markierter Acylkette an der *sn*-1-Position und einem Gemisch aus DOPC-DOPG-Liposom, gemischt. Die Proben wurden anschließend im *Tecan M1000Pro* (Tabelle 2.1) für 120 Minuten bei RT gemessen. Die Einstellungen des Fluoreszenzphotometers können aus Tabelle 2.15 entnommen werden. Als

Referenz diente eine 1:2 Verdünnungsreihe von gereinigter *Lecitase ultra* (im Kit enthalten) hergestellt.

LB-Medium: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller)

Tabelle 2.15: Einstellung der Parameter für PLA₁-Aktivitätsmessung im Tecan M1000Pro

Parameter	
Schütteln (Dauer)	5 sek
Schütteln (Amplitude)	2 mm
Schütteln (Frequenz)	654 UpM
Messung (Dauer)	120 min
Intervall	1 min
Excitation (Wellenlänge)	490 nm
Emission (Wellenlänge)	515 nm
Excitation (Bandbreite)	5 nm
Emission (Bandbreite)	5 nm
Verstärkung (manuell)	100
Anzahl der Blitze	50
Blitz (Frequenz)	400 Hz
Integration	20 µs
Z-Position (Manual)	20000 µm

2.11.8 Quantifizierung der proteolytischen Aktivität mit Ganzzellextrakten

(Modifiziert nach Ozturkoglu-Budak *et al.*, 2016)

Die proteolytische Aktivität von *P. aeruginosa* wurde mithilfe des kommerziell erworbenen *Pierce Fluorescent Protease Assay Kits* (Tabelle 2.3) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Zu diesem Zweck wurden *P. aeruginosa*-Zellen unter statischen Bedingungen, wie in Kapitel 2.9.5 beschrieben, kultiviert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellkulturen aus 8 Vertiefungen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 4 °C und 11000 g sedimentiert. Der Überstand wurde mithilfe einer Pipette abgenommen und das Zellpellet mit 500 µl kaltem TBS-Puffer gelöst. Für die Lyse wurden die gelösten Zellen 3x20 sek mittels Ultraschalls bei einer Pulsfrequenz von 40 % auf Eis aufgeschlossen. Die proteolytische Aktivitätsmessung erfolgte mit 100 µl Zelllysat, welches in eine Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte vorgelegt wurde. Mit Zugabe von 100 µl FTC-Casein-Substratlösung (Fluoreszeinisothiocyanat) wurde die Reaktion gestartet und die Fluoreszenz mithilfe des *Tecan Infinite M1000 Pro* (Tabelle 2.1) für 60 min bei RT gemessen. Die Einstellungen des Fluoreszenzphotometers können aus Tabelle 2.16 entnommen werden. Trypsin wurde als Referenz in einer 1:2 seriellen Verdünnung zwischen 0,5-0,0078 µg/ml eingesetzt.

TBS-Puffer: 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1,5 mM KCl, pH 8,0

Tabelle 2.16: Einstellung der Parameter für Protease-Aktivitätsmessung im *Tecan M1000Pro*

Parameter	
Schütteln (Dauer)	5 sek
Schütteln (Amplitude)	2 mm
Schütteln (Frequenz)	654 UpM
Messung (Dauer)	60 min
Intervall	1 min
Excitation (Wellenlänge)	485 nm
Emission (Wellenlänge)	538 nm
Excitation (Bandbreite)	5 nm
Emission (Bandbreite)	5 nm
Verstärkung (manuell)	100
Anzahl der Blitze	50
Blitz (Frequenz)	400 Hz
Integration	20 μ s
Z-Position (Manual)	20000 μ m

2.11.9 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen aus Ganzzellextrakten

Die Proteom-Analytik wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Kai Stühler, Dr. Daniel Waldera-Lupa und Dr. Gereon Poschmann vom Zentrallabor *Molecular Proteomics Laboratory* (MPL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Für die Probengewinnung wurden *P. aeruginosa*-Zellen unter statischen Bedingungen (Biofilmbildung) in einer 96-Mikrotiterplatte kultiviert (siehe Kapitel 2.9.5). Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen aus 8 Vertiefungen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 4 °C und 21000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 150 μ l Lyse-Puffer gelöst und mithilfe von Ultraschall jeweils 3x10 sek mit einer Pulsfrequenz von 40 % auf Eis sonifiziert. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteine beginnend mittels Acrylamidgel-elektrophorese getrennt, mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, mit Dithiothreitol reduziert, gefolgt von einer Alkylierung durch Iodoacetamid und schließlich mit Trypsin über Nacht verdaut. Darauffolgend wurden die fragmentierten Peptide aus dem Gel extrahiert und mithilfe eines Vakuumkonzentrators getrocknet und schließlich in 0,1% Trifluoressigsäure gelöst. Die gewonnenen Peptide wurden dann mittels Flüssigchromatographie (*UltiMate 3000 rapid separation liquid nano chromatography system*, Thermo Fisher Scientific) getrennt und anschließend im ESI-MS (*Electrospray ionisation mass spectrometer, QExactive plus*, Thermo Fisher Scientific) analysiert.

Lyse-Puffer: 30 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff, 2 M Thiourea, pH 8,5

2.11.10 Lipidomstudie mittels *Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry*

Die Quantifizierung der Glycerophospholipide wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Peter Dörmann und Dr. Meike Siebers aus dem Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn durchgeführt. *P. aeruginosa*-Zellen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 15 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht für mindestens 16 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 150 UpM kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 15 ml der Zellkultur bei 2790 g und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml sterilem H₂O (MilliQ) resuspendiert und in ein Glasröhrchen überführt. Für die Inaktivierung von intrinsischen Phospholipasen wurde die Zellsuspension für 20 min in einem 100 °C heißem Wasserbad gekocht. Danach wurden die Zelltrümmer bei 2790 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mithilfe einer Pipette entnommen und verworfen. Im ersten Extraktionsschritt wurde zunächst 1 ml Chloroform:Methanol im Verhältnis 1:2 (v/v) mithilfe einer Glas-Pasteurpipette auf das Zellpellet hinzugegeben und vollständig durchmischt. Nach Zentrifugation bei 2790 g für 20 min wurde die organische Phase vorsichtig in ein neues Glasröhrchen überführt. Im zweiten Extraktionsschritt wurde dann 1 ml Chloroform:Methanol im Verhältnis 2:1 (v/v) zu den Zelltrümmern hinzugegeben. und erneut bei 2790 g für 20 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit einer Glas-Pasteurpipette entnommen und mit den Extrakten aus dem ersten Schritt durchmischt. Es wurden dann 1 ml Chloroform und 0,75 ml einer 300 mM Ammoniumacetat-Lösung hinzugegeben und gut durchmischt. Zur klaren Phasentrennung wurde das Gemisch erneut für 20 min bei 2790 g zentrifugiert und die organische Phase mithilfe der Glas-Pasteurpipette in ein neues Glasröhrchen überführt. Das Extrakt wurde schließlich über Nacht lyophilisiert und die Ausbeute durch Wiegen ermittelt. Die hergestellten Extrakte wurde schließlich mittels Q-TOF-MS (*quadrupole-time of flight-mass spectrometry*) analysiert.

LB-Medium: 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller)

2.11.11 Quantifizierung der Pyoverdine

(Modifiziert nach Ferret *et al.*, 2014)

Die Quantifizierung der sekretierten Pyoverdine erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung des zellfreien Kulturüberstandes. Zu diesem Zweck wurden aus einer Übernachtskultur die Zellen zentrifugiert und die Überstände unter der Zuhilfenahme eines Spritzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Überstandes in eine Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption

mithilfe des *Tecan M1000 Pro* (Tabelle 2.1) bei einer Wellenlänge von 403 nm gemessen. LB-Medium diente hierbei als Referenz. Die Stoffmengenkonzentration der Pyoverdine wurde mithilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten von $19000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt (Ferret *et al.*, 2014).

2.11.12 Kolorimetrische Quantifizierung von Eisen

(Modifiziert nach Tamarit *et al.*, 2006)

Die Bestimmung der Eisenmenge in Zellen wurde mithilfe einer kolorimetrischen Methode durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden aus einer Übernachtskultur 5×10^9 Zellen geerntet und das Zellpellet mit 1 ml H_2O (MilliQ) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 400 μl einer 3 %igen Salpetersäure gelöst und über Nacht für mindestens 18 h bei 98 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zelltrümmer sedimentiert und 300 μl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte dann die Zugabe folgender Komponenten der Reihe nach: 94,5 μl einer 1:3 verdünnten Ammoniumacetat Lösung (hergestellt aus einer gesättigten Ammoniumacetat Lösung), 120 μl Natriumascorbat und 240 μl des Eisenchelators BPS (Bathophenanthrolindisulfonsäure Dinatriumsalz Trihydrat). Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption in einem Plattenphotometer (Tabelle 2.1) bei einer Wellenlänge von 535 nm gemessen. Als Standard diente eine 1:2 hergestellte FeSO_4 -Verdünnungsreihe (500 μM bis 7,8125 μM).

2.11.13 Fluoreszenzmessung des *sfGFPs* in *E. coli ArcticExpress*

(Modifiziert nach Armstrong & Senes, 2016)

E. coli ArcticExpress-Zellen mit TOXGREEN-Konstrukten wurden im definierten M9-Medium kultiviert. Dazu wurde am Vortag jeweils eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin in einem Reagenzglas inokuliert und bei 37 °C über Nacht unter ständigem Rotieren inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 20 μl der Übernachtskultur in 10 ml M9-Medium mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin überführt und bei 37 °C über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wurde aus der Übernachtskultur auf eine $\text{OD}_{580\text{nm}}$ 0,05 in 10 ml M9-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin ohne Gentamicin inokuliert und bei 37 °C unter ständigem Schütteln für 6-8 h bis zu einer $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,6 inkubiert. Für die Fluoreszenzmessung wurden alle 2 h jeweils 3x 100 μl der Zellkultur in eine 96-Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz des *sfGFPs* mithilfe des *Tecan Infinite M1000 Pro* (Tabelle 2.1) mit den Einstellungen in Tabelle 2.17 gemessen. Als Kontrollen wurden Zellen, die jeweils mit pccGFP-GpA, pccGFP-G83I sowie pccGFP-KAN transformiert wurden, mitgeführt.

M9-Minimalmedium modifiziert nach Sambrook *et al.* (1989):

Lösung I:	500 g/l Glukose	(autoklaviert)
Lösung II:	20 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O	(autoklaviert)
Lösung III:	2 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O	(autoklaviert)
Lösung IV:	5x M9-Minimalsalz	(autoklaviert)
Lösung V:	1,6 g/L MnSO ₄ ; 2,8 g/l H ₃ BO ₃ ; 0,04 g/l Cu(NO ₃) ₂ ; 0,24 g/l ZnSO ₄ ; 0,8 g/l Na ₂ MoO ₄	(sterilfiltriert)
Lösung VI:	5 g/l FeSO ₄ ; 0,16 % (v/v) HCl	(sterilfiltriert)

Die Lösungen wurden in folgendem Verhältnis (v/v) eingesetzt:

Lösung I:	1 %	Lösung IV:	20 %
Lösung II:	1 %	Lösung V:	0,1 %
Lösung III:	1 %	Lösung VI:	0,12 %

Tabelle 2.17: Einstellung der Parameter für sfGFP-Fluoreszenz im Tecan M1000Pro

Parameter	
Schütteln (Dauer)	5 sek
Schütteln (Amplitude)	2 mm
Schütteln (Frequenz)	654 UpM
Excitation (Wellenlänge)	485 nm
Emission (Wellenlänge)	512 nm
Excitation (Bandbreite)	5 nm
Emission (Bandbreite)	5 nm
Verstärkung (manuell)	100
Anzahl der Blitze	50
Blitz (Frequenz)	400 Hz
Integration	20 µs
Z-Position (Manual)	20000 µm

2.12 Programme und Datenbanken

Die Verwaltung, Planung, Analyse, Auswertung, Kalkulationen sowie Visualisierung von Experimenten wurden mithilfe von Programmen und Datenbanken durchgeführt (Tabelle 2.18).

Tabelle 2.18: Übersicht der verwendeten Programme und Datenbanken

Bezeichnung	Quelle
Clone-Manager 9.2	Scientific and Educational Software, Denver, USA
Double Digest Calculator	https://www.thermofisher.com/
In-Fusion Cloning Primer Design Tool v1.0	https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools
IntasApp	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Lipid Maps Online Tool	https://www.lipidmaps.org (Fahy <i>et al.</i> , 2007)
Microsoft Office Professional Plus 2016	Microsoft Corp., Redmond, USA

Bezeichnung	Quelle
Microsoft Windows 10	Microsoft Corp., Redmond, USA
New England BioLabs	(http://tmcalculator.neb.com)
Primer3Web	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Pseudomonas GenomeDB Version 19.1 (2019-10-09)	http://www.pseudomonas.com/ (Winsor <i>et al.</i> , 2016)
SDS 2.3	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Servier Medical Art (Powerpoint-Vorlage)	https://smart.servier.com/
UniProt: the Universal Protein Knowledgebase	https://www.uniprot.org/ (Consortium, 2022)
VolcaNoseR	https://huygens.science.uva.nl/ (Goedhart & Luijsterburg, 2020)

3 Ergebnisse

Die Phospholipase PlaF aus *P. aeruginosa* PAO1 wurde erstmals im Rahmen einer früheren Arbeit als ein membrangebundenes Enzym beschrieben (Kovacic, 2010). Aufbauend auf den ersten Erkenntnissen wurden in den Folgejahren Methoden etabliert und intensive biochemische sowie biophysikalische Studien über PlaF durchgeführt. Dazu zählten unter anderem die Reinigung von PlaF aus dem homologen Expressionssystem, Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchungen unter verschiedenen Bedingungen, die Analyse der Substratspezifität sowie die Auflösung der 3D-Kristallstruktur (Kovacic *et al.*, 2016, Bleffert *et al.*, 2019, Bleffert *et al.*, 2022). Außerdem wurde im Rahmen einer Studie ein *plaF*-defizienter *P. aeruginosa*-Stamm (*P. aeruginosa* Δ *plaF*) konstruiert und verifiziert (Bleffert *et al.*, 2022). In einer assoziierten Bachelorarbeit von Maurice Heitzer (2019) wurden zwei komplementierte *P. aeruginosa*-Stämme mithilfe des *mini-Tn7*-Systems generiert. So wurde zum einen die wildtypische *plaF*-Sequenz und zum anderen die katalytisch inaktive *plaF*_{S137A}-Sequenz, beide mit dem homologen *plaF*-Promotor, in die einmalig vorkommende *attTn7*-Stelle des *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Genoms durch Transposition integriert und verifiziert (Choi & Schweizer, 2006, Heitzer, 2019). In der vorliegenden Arbeit sollten die bereits erlangten Ergebnisse von PlaF erweitert und im biologischen Kontext weiter vertieft werden. Hierzu sollte insbesondere die physiologische Funktion von PlaF anhand des *plaF*-defizienten *P. aeruginosa*-Stammes (Δ *plaF*) näher untersucht werden, u.a. durch Anwendung von verschiedenen Methoden wie globalen Proteom- und Lipidomanalysen, Wachstumskurven und Biofilmanalysen. Ein weiteres Ziel war die Etablierung eines genetischen *Two-Hybrid* Systems, in Form einer PlaF-basierten Variante des TOXGREEN-Systems, um mehr Aufklärung über die Protein-Protein-Interaktion (Homodimerisierung) von PlaF zu gewinnen.

3.1 *P. aeruginosa* Δ *plaF* zeigt verringerte Phospholipase A₁-Aktivität

In vorherigen Arbeiten wurde für PlaF neben Esteraseaktivität auch Lipase-, Phospholipase A₁- und Lysophospholipase-Aktivität nachgewiesen (Kovacic, 2010, Bleffert *et al.*, 2022). Hierbei wurden sowohl synthetisch hergestellte Substrate als auch natürliche Substrate mit unterschiedlichen Kopfgruppen wie Ethanolamin, Cholin und Glycerol verwendet (Bleffert *et al.*, 2022). Es wurde in den Analysen erwiesen, dass gereinigtes PlaF vorzugsweise *para*-Nitrophenylacylester mit kurzen bis mittleren Acylkettenlängen wie C₄, C₆, C₈ und C₁₀ spaltet, aber auch natürliche Phospho- und Lysophospholipide mit Acylkettenlängen von C₁₂ bis C₁₈ hydrolysiert (Kovacic *et al.*, 2016, Bleffert *et al.*, 2022). Außerdem wurde gezeigt, dass die Deletion des *plaF*-Gens in *P. aeruginosa* zu einer erheblichen Abnahme der Esteraseaktivität gegenüber *para*-Nitrophenylbutyrat um etwa 40 % im

Vergleich zum parentalen *P. aeruginosa* WT führt (Caliskan, 2016). Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde untersucht, ob die Deletion des *plaF*-Gens in *P. aeruginosa* auch zu einer starken Reduzierung der spezifischen Phospholipase A₁-Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Stamm führt. Zudem wurde geprüft, ob einerseits der komplementierte *P. aeruginosa* Δ *plaF*::*plaF*-Stamm eine vergleichbare wiederhergestellte wildtypische Aktivität aufweist und andererseits der katalytisch inaktive *P. aeruginosa* Δ *plaF*::*plaF*_{S137A}-Stamm eine vergleichbare geringe Aktivität zum *P. aeruginosa* Δ *plaF* zeigt. Für die Aktivitätsmessung wurde als Substrat ein synthetisch hergestelltes Phosphatidylethanolamin (PE), welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY® FL an der Acylkette der sn-1-Position markiert ist, verwendet. Als Positivkontrolle wurde das kommerzielle Enzym *Lecitase*® Ultra mitgeführt (Abbildung 6.1, Anhang). Für die Analysen wurden *P. aeruginosa*-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die enzymatische Aktivität nach Zellaufschluss mit Ganzzellextrakten untersucht (Kapitel 2.11.6).

P. aeruginosa Δ *plaF* wies eine Restaktivität von etwa 16 % im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT auf. Zugleich zeigte *P. aeruginosa* Δ *plaF*::*plaF*_{S137A} (katalytisch inaktive PlaF-Variante) mit etwa 25 % Restaktivität ebenfalls eine deutlich reduzierte Phospholipase A₁-Aktivität, welche in etwa der Aktivität von *P. aeruginosa* Δ *plaF* ähnelte, auf. Im Gegensatz dazu zeigte der komplementierte *P. aeruginosa* Δ *plaF*::*plaF*-Kontrollstamm eine um etwa 1,9-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT (Abbildung 3.1).

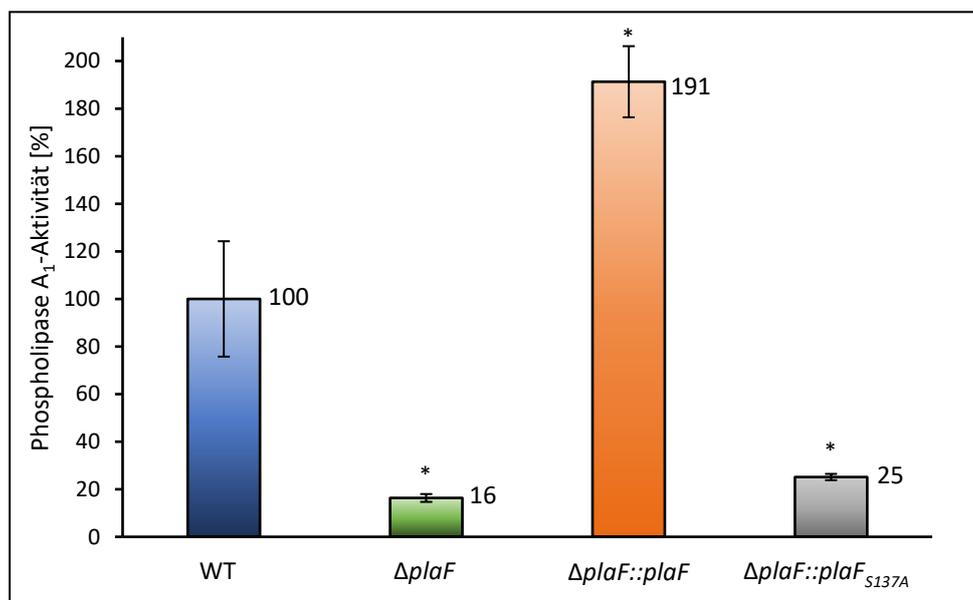


Abbildung 3.1: *P. aeruginosa* Δ *plaF* wies verringerte Phospholipase A₁-Aktivität auf.

Die Phospholipase A₁-Aktivität von *P. aeruginosa*-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurde mithilfe des *EnzChek*® Phospholipase A₁ Assay Kit (Tabelle 2.3) bestimmt. Es wurden 5 ml Zellkultur bei Erreichen einer OD_{580nm} 1 geerntet und das Zellsediment in 1 ml PLA₁-Puffer gelöst. Die Zellen wurden 3x durch Ultraschall für 30 sek mit einer Pulsrate von 40 % auf Eis lysiert. Für die Aktivitätsmessung wurden 50 µl Zellysate mit 50 µl

Substrat-Liposom-Mix in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte (MTP) gemischt und die Entwicklung der Fluoreszenzemission bei $EX_{490\text{ nm}}$ / $Em_{515\text{ nm}}$ über 2 h dokumentiert. Die untersuchten Proben *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ (grün), $-\Delta plaF::plaF$ (orange) sowie $-\Delta plaF::plaF_{S137A}$ (grau) wurden auf den Referenzstamm WT (blau) normiert, wobei WT auf 100 % gesetzt wurde. Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten aus einer biologischen Dreifachbestimmung mit jeweils dreifachen technischen Replikaten. Durch Anwendung des statistischen t-Tests wurde die Signifikanz der Phospholipase A_1 -Aktivität zum WT ermittelt, $*p < 0,05$. Modifiziert nach Bleffert *et al.* (2022).

3.2 Das verzögerte Wachstum von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ unter pH- und Temperaturstress

P. aeruginosa und auch alle anderen Bakterien sind ständig wechselnden Umweltbedingungen wie osmotischem Stress, Temperatur- und pH-Änderungen sowie variierenden Nährstoffangeboten ausgesetzt (Shu & Huang, 2022). Damit das Überleben in unterschiedlichen Bedingungen gewährleistet ist, beherbergen Bakterien regulatorische Netzwerke, welche eine Adaptation der Proteinbiosynthese ermöglichen und so das Wachstum in der neuen Umgebung erlauben (Weber *et al.*, 2006). Mithilfe von Wachstumskurven kann bakterielles Wachstum dokumentiert und charakterisiert werden. So lässt sich das Wachstum in vier Phasen einteilen: lag-, exponentielle-, stationäre- und Absterbephase (Wang *et al.*, 2015).

In diesem Kapitel wurde das Wachstum von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ im Vergleich zum parentalen *P. aeruginosa* WT unter Standard-Laborbedingungen (Erlenmeyerkolben, LB-Medium, Kulturvolumen 10 % des Gefäßvolumens, 37 °C, 150 UpM) untersucht, um die Auswirkungen der Deletion des *plaF*-Gens in *P. aeruginosa* auf das Wachstumsverhalten zu analysieren.

P. aeruginosa WT und $\Delta plaF$ zeigten einen klassischen Wachstumsverlauf mit lag-, exponentieller und stationärer Phase über eine Gesamtinkubationszeit von 24 h (Abbildung 3.2 A). Nach einer kurzen lag-Phase von etwa 1 h wuchsen beide Stämme exponentiell mit vergleichbaren Wachstumsraten von $1,01\text{ h}^{-1}$ für WT und $1,06\text{ h}^{-1}$ für $\Delta plaF$ an (Abbildung 3.2 B) und erreichten die stationäre Phase nach einer Inkubation von 5 h. Für *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ -Kulturen wurde außerdem eine leichte Verlängerung der lag-Phase beobachtet, was auf eine beschränkte Anpassungsfähigkeit auf geänderte Bedingungen hindeuten kann (Abbildung 3.2 A).

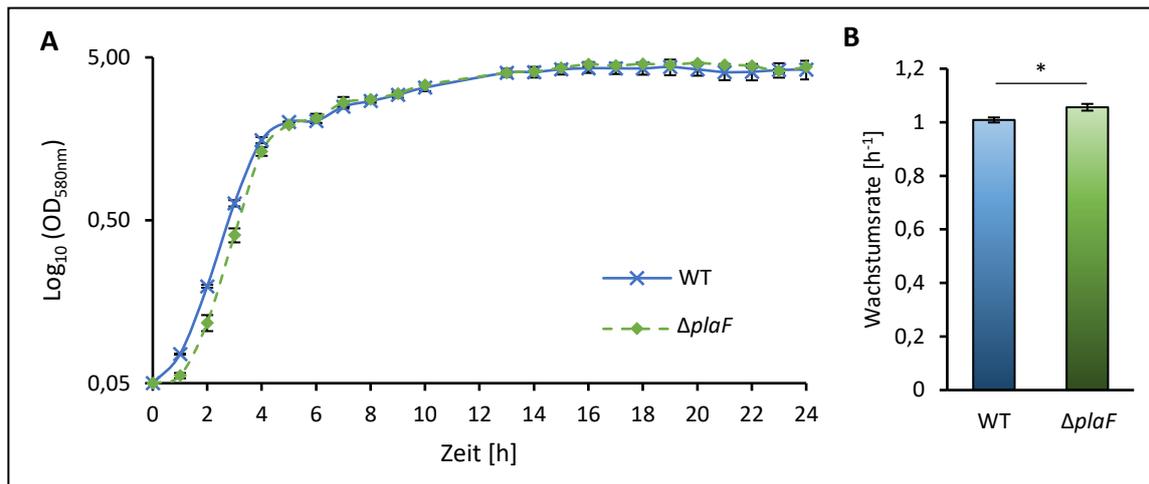


Abbildung 3.2: Der Primärstoffwechsel von *P. aeruginosa* Δ plaF ist nicht beeinträchtigt.

Das bakterielle Wachstum von *P. aeruginosa* wurde unter planktonischen Bedingungen untersucht. *P. aeruginosa*-Zellen aus einer Übernachtskultur wurden auf eine initiale OD_{580nm} 0,05 in 25 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kulturen wurden unter ständigem Schütteln bei 150 UpM und 37 °C inkubiert. Zu jeder Stunde wurden 1 ml Zellkultur in eine Küvette überführt und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 580 nm in einem Photometer bestimmt. **A:** Zur Darstellung des bakteriellen Wachstums von *P. aeruginosa* WT (Kreuz, blauer Verlauf) und *P. aeruginosa* Δ plaF (Raute, grüner gestrichelter Verlauf) wurde der Logarithmus der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden aufgetragen. Modifiziert nach Bleffert *et al.* (2022). **B:** Die Wachstumsraten wurden aus der exponentiellen Phase ($t_1=4$ h, $t_0=1$ h) beider Stämme ermittelt. Durch Anwendung des statistischen *t*-Tests wurde die Signifikanz der Wachstumsrate ermittelt, * $p<0,05$. Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten aus einer biologischen Dreifachbestimmung.

Um ein genaueres Verständnis über die verzögerte Anpassung in der *lag*-Phase zu bekommen, wurde nachfolgend das Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* unter Stressbedingungen untersucht. Hierfür wurden *P. aeruginosa*-Zellen in nährstoffreichem LB-Medium bei 25 °C, 30 °C und 42 °C kultiviert und der Wachstumsverlauf über eine Zeit von 8 h dokumentiert. Die Wachstumskurve bei 37 °C (Abbildung 3.2 A) wurde für die Beurteilung mit einbezogen und diente in diesem Abschnitt als Referenz (Abbildung 3.3 A). Somit ließ sich der typische Wachstumsverlauf von *P. aeruginosa* WT und Δ plaF unter optimalen Bedingungen wie folgt einteilen: die *lag*-Phase bis zum Zeitpunkt $t=1$ h, die exponentielle Phase im Zeitraum von 1 h bis 4 h und die stationäre Phase ab dem Zeitpunkt $t=4$ h. Demgegenüber zeigten die Wachstumskurven bei den getesteten Temperaturen sichtbar unterschiedliche Verlaufsformen. Das Wachstum von *P. aeruginosa* WT und Δ plaF bei 25 °C und 30 °C wies eine deutlich längere *lag*-Phase im Vergleich zu der Wachstumskurve bei 37 °C auf. Entsprechend begann bei 25 °C die exponentielle Wachstumsphase für den WT nach 3 h und für Δ plaF nach 4 h mit unterschiedlichen Wachstumsraten von 0,57 h⁻¹ (WT) und 0,68 h⁻¹ (Δ plaF) (Abbildung 3.3 B, E). Ein Übergang in die stationäre Phase beider Stämme war nach einer Inkubation von 8 h bei 25 °C nicht erkennbar (Abbildung 3.3 B). Bei einer Umgebungstemperatur von 30 °C zeigten *P. aeruginosa* WT und Δ plaF einen typischen Verlauf bakteriellen Wachstums (Abbildung 3.3 C). Während das exponentielle

Wachstum des WT nach 1,5 h begann und nach 5,5 h in eine stationäre Phase überging, fand der Übergang von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ von der *lag*-Phase in die exponentielle Phase erst nach 2 h statt und endete nach 6 h in der stationären Phase (Abbildung 3.3 C). Die Wachstumsrate für *P. aeruginosa* WT betrug während der exponentiellen Phase $0,86 \text{ h}^{-1}$ und für *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ $0,96 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 3.3 E). Bei einem direkten Vergleich der beiden *P. aeruginosa*-Stämmen innerhalb einer Temperatur ($25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $30 \text{ }^\circ\text{C}$) wurde beobachtet, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ erkennbar eine längere *lag*-Phase im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT aufwies. Die Wachstumsraten von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ während der exponentiellen Phase wiesen bei allen getesteten Temperaturen etwas höhere Wachstumsraten als *P. aeruginosa* WT auf (Abbildung 3.3 E). Die Kultivierungen von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ wiesen keine deutlichen Unterschiede in den Wachstumsraten (WT: $1,41 \text{ h}^{-1}$, $\Delta plaF$: $1,50 \text{ h}^{-1}$) auf (Abbildung 3.3 D, E).

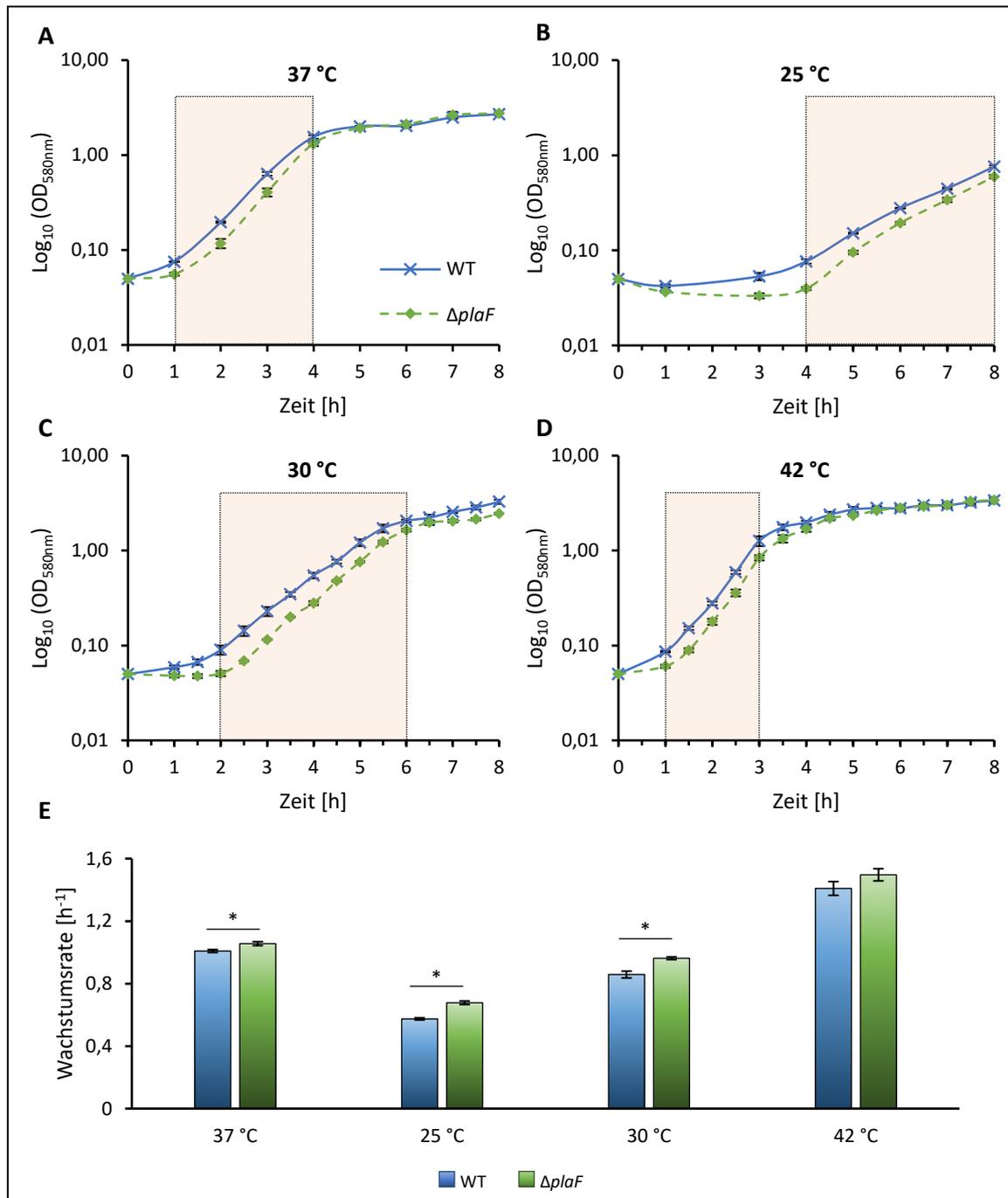


Abbildung 3.3: Das Wachstum von *P. aeruginosa* unter verschiedenen Temperaturbedingungen.

Das bakterielle Wachstum von *P. aeruginosa* wurde unter planktonischen Bedingungen untersucht. *P. aeruginosa*-Zellen (WT vs. $\Delta plaF$) aus einer Übernachtskultur wurden auf eine initiale OD_{580nm} 0,05 in 25 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kulturen wurden unter ständigem Schütteln bei 150 UpM und den angegebenen Temperaturen inkubiert. Zu jeder Stunde wurden 1 ml Zellkultur in eine Küvette überführt und die OD bei einer Wellenlänge von 580 nm in einem Photometer bestimmt. Zur Darstellung des bakteriellen Wachstums von *P. aeruginosa* WT (Kreuz, blauer Verlauf) und *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ (Raute, grüner gestrichelter Verlauf) wurde der Logarithmus der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden aufgetragen. **A**: Modifizierte Wachstumskurve bei 37 °C aus Abbildung 3.2. **B-D**: Wachstumskurven bei den Temperaturen 25 °C, 30 °C und 42 °C. **E**: Die Wachstumsraten wurden aus den exponentiellen Phasen (Rechteck, orange) beider Stämme ermittelt. Durch Anwendung des statistischen *t*-Tests wurde die Signifikanz der Wachstumsrate ermittelt, * $p < 0,05$. Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten aus einer biologischen Dreifachbestimmung.

In Abbildung 3.4 wurde das Wachstumsverhalten der beiden *P. aeruginosa*-Stämme unter verschiedenen pH-Bedingungen verglichen. Hierfür wurde für die Kultivierung von *P. aeruginosa*-Zellen in saurem pH-Bereich von 5 und 6 das LB-Medium mit 50 mM Zitronensäure/ Natriumphosphat gepuffert. Parallel dazu wurde für die Einstellung des pH-Wertes im alkalischen Bereich von 8 und 9 das LB-Medium mit 50 mM Tris-HCl gepuffert. Auch hier zeigten die *P. aeruginosa*-Stämme unterschiedliche Verlaufsformen bakteriellen Wachstums. Während die Zellen bei einer Kultivierung im pH-Bereich von 5 und 6 eine typische Sättigungskurve mit lag-, exponentielle und stationäre Phase aufwiesen (Abbildung 3.4 A, B), erreichten *P. aeruginosa*-Zellen im pH-Bereich von 8 und 9 nach 8 h Inkubation keine stationäre Phase (Abbildung 3.4 C, D). Außerdem zeigten alle Kulturen nach dem pH-Wechsel beim Transfer von der Übernachtskultur in die getesteten Medien innerhalb der ersten Stunden (0 h-2,5 h) der Kultivierung eine deutliche Verringerung der OD_{580nm}-Werte, auf bis zu 30 % der Inokulationszellendichte. Insbesondere *P. aeruginosa* Δ *plaF* wies eine stärkere Verringerung der OD_{580nm} im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT auf.

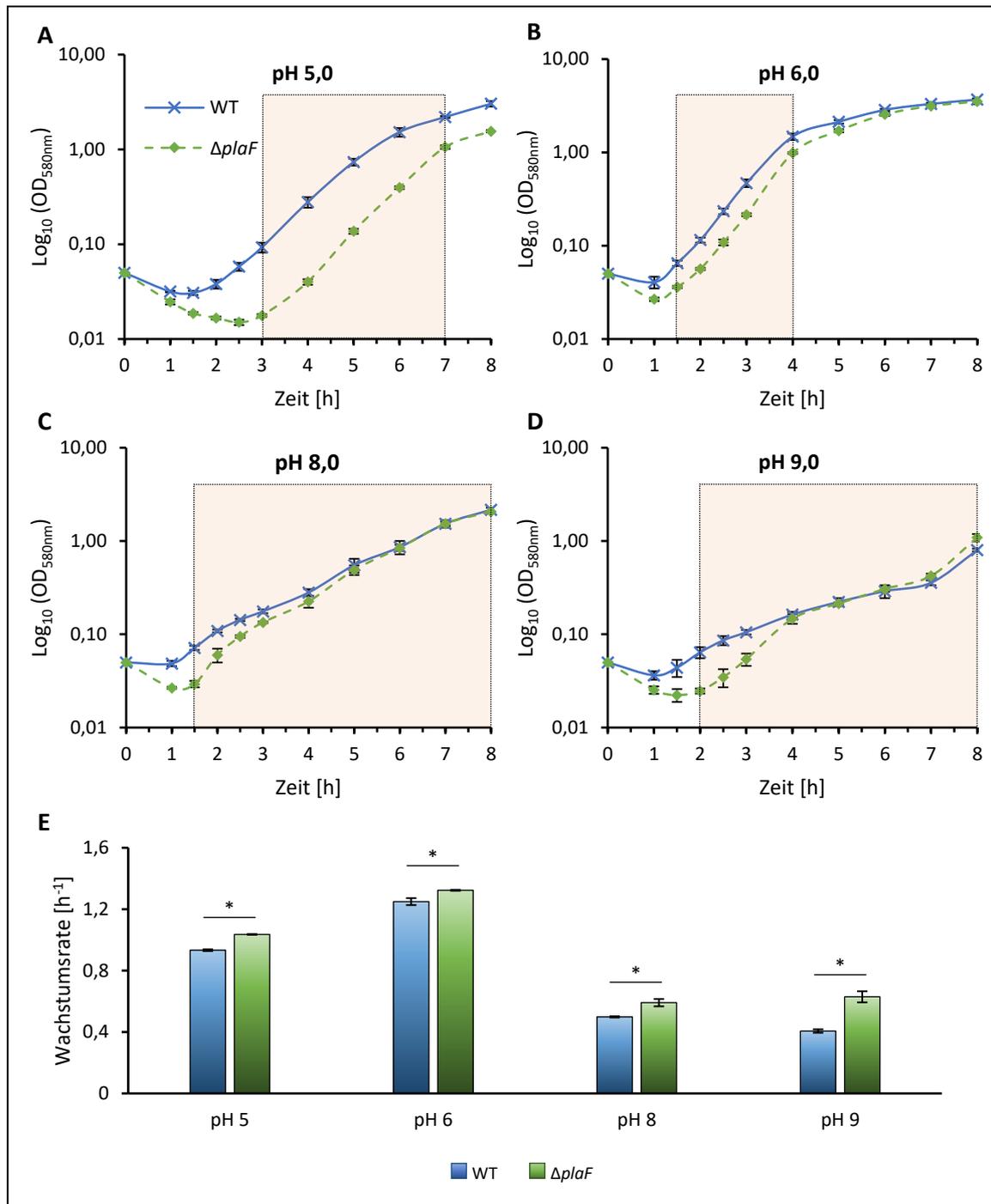


Abbildung 3.4: Das Wachstum von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ ist bei pH 5,0 deutlich verzögert.

Das bakterielle Wachstum von *P. aeruginosa* wurde unter planktonischen Bedingungen untersucht. *P. aeruginosa*-Zellen aus einer Übernachtskultur wurden auf eine initiale OD_{580nm} 0,05 in 25 ml LB-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten in einem Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C und unter ständigem Schütteln bei 150 UpM inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden 1 ml Zellkultur in eine Küvette überführt und die OD bei einer Wellenlänge von 580 nm in einem Photometer bestimmt. Zur Darstellung des bakteriellen Wachstums von *P. aeruginosa* WT (Kreuz, blauer Verlauf) und *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ (Raute, grüner gestrichelter Verlauf) wurde der Logarithmus der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden aufgetragen. **A:** LB-Medium, 50 mM Zitronensäure/ Natriumphosphat, pH 5,0; **B:** LB-Medium, 50 mM Zitronensäure/ Natriumphosphat, pH 6,0; **C:** LB-Medium, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; **D:** LB-Medium, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0. **E:** Die Wachstumsraten wurden aus den exponentiellen Phasen (Rechteck, orange) beider Stämme ermittelt. Durch Anwendung des statistischen *t*-Tests wurde die Signifikanz der Wachstumsrate ermittelt, * $p < 0,05$. Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten aus einer biologischen Dreifachbestimmung.

Ein besonders unterschiedliches Wachstum zeigten *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ im LB-Medium mit pH 5 (Abbildung 3.4 A). Während *P. aeruginosa* WT nach 1,5 h bereits in das exponentielle Wachstum und nach 6 h in die stationäre Phase übergang, dauerte die *lag*-Phase bei *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ bis 3 h nach Inokulation an. Während der exponentiellen Phase wies *P. aeruginosa* WT eine Wachstumsrate von $0,93 \text{ h}^{-1}$ auf, wohingegen *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine höhere Wachstumsrate von $1,04 \text{ h}^{-1}$ aufwies (Abbildung 3.4 E). Ein Übergang in die stationäre Phase erfolgte nach 7 h Inkubation (Abbildung 3.4 A). Das Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* im pH-Bereich von 8 und 9 wies keinen typischen Sättigungsverlauf auf (Abbildung 3.4 C, D). Nach einer *lag*-Phase von bis zu 2 h nach Inokulation zeigten beide Stämme eher ein lineares Wachstum im Vergleich zum Wachstumsverlauf bei pH 7 (Abbildung 3.3 A). Dementsprechend war die stationäre Phase nach 8 h Inkubation nicht definierbar (Abbildung 3.4 C, D). Der direkte Vergleich der Wachstumsraten bei einem pH-Wert von 8 (WT: $0,50 \text{ h}^{-1}$, $\Delta plaF$: $0,59 \text{ h}^{-1}$) und bei einem pH-Wert von 9 (WT: $0,41 \text{ h}^{-1}$, $\Delta plaF$: $0,63 \text{ h}^{-1}$) zeigte erneut, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ höhere Wachstumsraten aufwies als *P. aeruginosa* WT und somit etwas schneller während der exponentiellen Phase wuchs (Abbildung 3.4 E).

Die Wachstumsanalysen veranschaulichten, dass PlaF einen Einfluss während der *lag*-Phase von *P. aeruginosa* ausübt. Besonders bei der Anzucht in einem pH-Wert von 5 wies *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine deutlich längere *lag*-Phase im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT auf. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Adaptation von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ an geänderte Umweltbedingungen beschränkt ist. Hingegen zeigte der Vergleich der Wachstumsraten deutlich, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ während der exponentiellen Phase etwas besser wuchs als der WT-Stamm. Aufgrund dessen kann an dieser Stelle vermutet werden, dass PlaF keinen signifikanten Einfluss auf den Primärstoffwechsel von *P. aeruginosa* ausübt.

3.3 *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ bildet weniger Biofilm

Eine charakteristische Eigenschaft von *P. aeruginosa* ist die Fähigkeit zur Ausbildung von stabilen Biofilmen. Diese Biofilmbildung wurde als ein Schlüsselfaktor für die Virulenz nachgewiesen (Al-Wrafy *et al.*, 2017). In einer Studie wurde eine reduzierte Virulenz von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT beschrieben (Bleffert *et al.*, 2022). Hier stellt sich die Frage, ob diese Beobachtung zumindest teilweise auf eine Reduktion der Biofilmbildung durch *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ zurückzuführen ist. Daher wurde die Biofilmproduktion unter statischen Bedingungen mithilfe der Kristallviolett-Färbung analysiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 2.9.5 zu entnehmen.

In Abbildung 3.5 ist die Untersuchung des produzierten Biofilms nach 8 h, 24 h, 72 h, 144 h sowie 216 h in einem *Box-Whisker-Plot* dargestellt. *P. aeruginosa* WT diente in diesem experimentellen Ansatz als Referenz, um den Biofilm von *P. aeruginosa* Δ *plaF* zu analysieren.

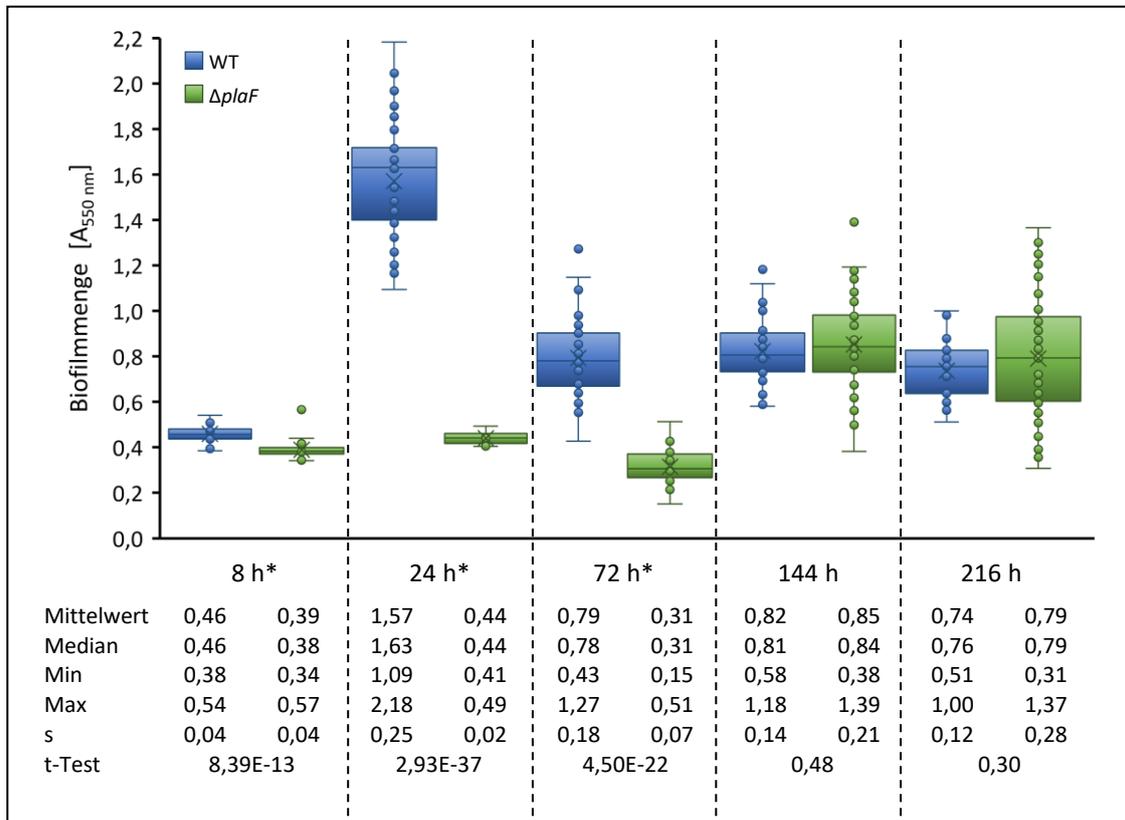


Abbildung 3.5: *P. aeruginosa* Δ *plaF* produziert weniger Biofilm in den ersten 72 h.

P. aeruginosa-Zellen wurden aus einer Übernachtskultur auf eine initiale OD_{580nm} 0,1 mit LB-Medium verdünnt und jeweils 100 μ l in eine Vertiefung einer 96-MTP überführt. Die Inkubation erfolgte für 8 h, 24 h, 72 h, 144 h sowie 216 h bei 37 °C. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit vollentsalztem H_2O entfernt und der gebildete Biofilm mit 0,1 %iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. Die gebundenen Farbmoleküle wurden mit 30 %iger Essigsäure gelöst und mithilfe des Plattenphotometers die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm quantifiziert. Die gemessenen Werte wurde in einem *Box-Whisker-Plot* dargestellt, dabei ist *P. aeruginosa* WT in blau und *P. aeruginosa* Δ *plaF* in grün illustriert. Die Kreise entsprechen den einzelnen Absorptionswerten, das Kreuz stellt den Mittelwert und der Querstrich innerhalb der Box den Median der ermittelten Daten dar. Die oberen und unteren *Whisker* wurden durch die Grenzen außerhalb der Box markiert, wobei Kreise außerhalb der *Whisker* als Ausreißer definiert wurden. Die Werte von *Min* und *Max* stellen den kleinsten bzw. den größten gemessenen Wert dar. Die Standardabweichung (s) wurde aus einer biologischen Fünffachbestimmung mit jeweils achtfachen technischen Wiederholungen ermittelt. Das Sternchen markiert die Signifikanz mit einem $p < 0,0000001$. Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023).

P. aeruginosa Δ *plaF* zeigte in den ersten 72 h der Inkubation signifikante Unterschiede in der Menge des produzierten Biofilms im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT auf. Dabei wurde der größte Unterschied nach einer Inkubation von 24 h beobachtet, bei dem die Biofilmmenge von *P. aeruginosa* Δ *plaF* um das 3,5-fache weniger als bei *P. aeruginosa* WT betrug. Nach 72 h Inkubation betrug der Absorptionswert für *P. aeruginosa* Δ *plaF* 0,31, wohingegen die Absorptionen von *P. aeruginosa* WT im Durchschnitt von 0,46 nach 8 h, 1,57 nach 24 h und 0,79

nach 72 h aufwiesen. Im weiteren Verlauf stieg die Biofilmmenge von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$, jedoch zeigten die Mittelwerte keinen signifikanten Unterschied zum *P. aeruginosa* WT-Stamm. In diesem Fall lagen die Bereiche der Boxen von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ zu den Zeitpunkten 144 h und 216 h alle auf gleicher Höhe mit einem durchschnittlichen Absorptionswert von etwa $0,80 \pm 0,2$ (Abbildung 3.5, Tabelle).

- ➔ *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ bzw. $\Delta plaF::plaF_{S137A}$ wiesen im Vergleich zum WT um etwa 84 % bzw. 75 % weniger Phospholipase A₁-Aktivität auf.
- ➔ Der komplementierte *P. aeruginosa* $\Delta plaF::plaF$ wies eine wiederhergestellte bzw. höhere Phospholipase A₁-Aktivität im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT auf.
- ➔ Unter pH-Stress zeigte *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine deutlich verzögerte lag-Phase.
- ➔ Die Biofilmbildung innerhalb von 72 h war in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ deutlich beeinträchtigt.

3.4 Die Proteome von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ unterscheiden sich

In vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Physiologie von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ deutliche Unterschiede im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT aufwies. Im Wesentlichen wies *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine verzögerte lag-Phase im Wachstumsverlauf (Kapitel 3.2) und eine signifikant geringere Biofilmmenge unter statischen Kultivierungsbedingungen (Kapitel 3.3) im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT auf. Aus diesem Grund wurde die Frage adressiert, welche molekularen Prozesse unter Biofilmbedingungen in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ beeinträchtigt sind. Um einen Überblick über die regulatorischen Netzwerke zu gewinnen, wurde mithilfe von quantitativen Proteomanalysen die Proteine aus Ganzzellextrakten von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ untersucht und die Proteome beider Stämme miteinander verglichen. Für die Analyse wurden beide Stämme mit jeweils 5 biologischen Replikaten unter Biofilmbedingungen (Kapitel 2.9.5) für 24 h kultiviert und die Proben, wie in Kapitel 2.11.9 beschrieben, vorbereitet.

In der massenspektrometrischen Analyse wurden insgesamt 2952 Proteine mit mindestens 2 übereinstimmenden Peptiden je Protein identifiziert. Im Vergleich zu der Anzahl aller offenen Leserahmen aus dem *P. aeruginosa*-Genom entspricht dies mehr als 50 % aller identifizierten Proteine (Winsor *et al.*, 2016). Unter Beachtung der statistischen Normalverteilung wurden nachfolgend 2160 Proteine für weitere Analysen betrachtet und quantifiziert. Die Hauptkomponentenanalyse ergab, dass sich die beiden Stämme *P. aeruginosa* WT (blau) und $\Delta plaF$ (grün) deutlich voneinander abgrenzten, was wiederum bedeutet, dass die Deletion von *plaF* einen erheblichen Einfluss auf das Proteom von *P. aeruginosa* hat (Abbildung 3.6 A).

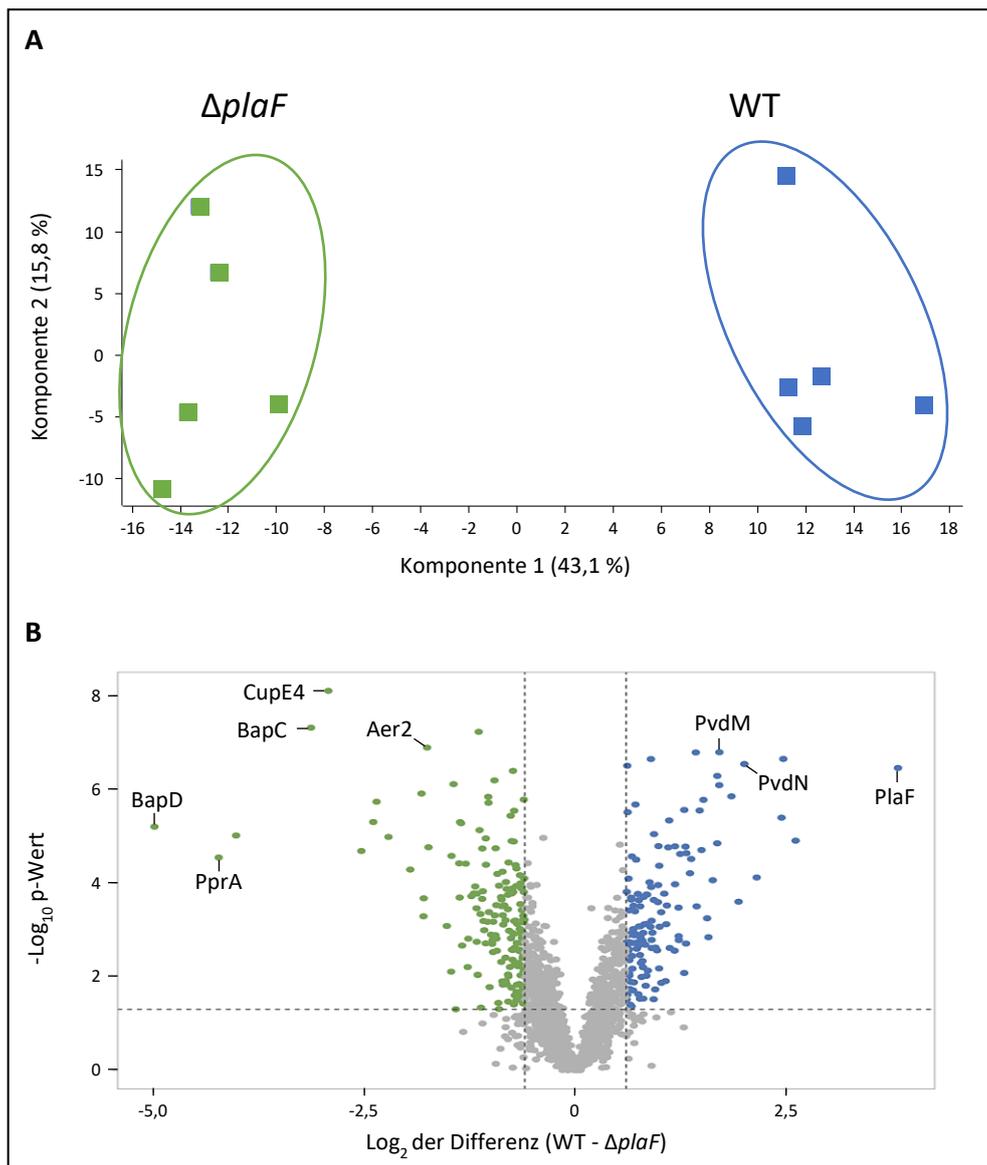


Abbildung 3.6: Die Proteome von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ unterscheiden sich.

A: Die Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Intensitätswerte zeigt eine deutliche Trennung zwischen *P. aeruginosa* WT (blau) und $\Delta plaF$ (grün). Die x- und y-Achse zeigen die Komponente 1 mit einer Varianz von 43,1 % bzw. die Komponente 2 mit einer Varianz von 15,8 %. Für die Proteomanalyse wurden jeweils 5 biologische Replikate untersucht. Die Messungen sowie die Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. K. Stühler und Dr. D. Waldera-Lupa aus dem *Molecular Proteomics Laboratory* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023). **B:** Dargestellt ist ein *Volcano-Plot* der 2160 quantifizierten Proteine. Die grünen Punkte repräsentieren die Proteine, die eine signifikant erhöhte Abundanz in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ aufwiesen, die blauen Punkte repräsentieren die Proteine, die eine signifikant erhöhte Abundanz in *P. aeruginosa* WT zeigten, wohingegen die grauen Punkte keine Signifikanz aufwiesen. Die horizontal gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert der Signifikanz (p -Wert $< 0,05$). Die vertikalen gestrichelten Linien markieren die Schwellenwerte der Expressionslevel mit mindestens 1,5-facher Änderung. Der *Volcano-Plot* wurde mithilfe des *VolcanoR-Tools* (Tabelle 2.18) erstellt (Goedhart & Luijsterburg, 2020).

Der *Volcano-Plot* zeigt die 2160 quantifizierten Proteine von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$, von denen insgesamt 367 Proteine (grün und blau) als hoch abundant identifiziert wurden, das heißt,

dass sie eine mindestens 1,5-fache Änderung im Vergleich zueinander (WT/ Δ plaF und Δ plaF/WT) mit einer Signifikanz von p-Wert $<0,05$ aufwiesen (Abbildung 3.6 B). Entsprechend wurden in *P. aeruginosa* Δ plaF 201 hoch abundante Proteine identifiziert (Abbildung 3.6 B, grün); wohingegen in *P. aeruginosa* WT 166 hoch abundante Proteine identifiziert wurden (Abbildung 3.6 B, blau).

Zur besseren Verständlichkeit und der Einfachheit halber werden in den folgenden Abschnitten „hoch abundante Proteine“ in *P. aeruginosa* WT als „niedrig abundant“ in *P. aeruginosa* Δ plaF bezeichnet, da der Fokus der Proteomstudie auf der Charakterisierung von *P. aeruginosa* Δ plaF lag. Die Auflistung aller signifikant unterschiedlichen Proteine kann dem Anhang entnommen werden (Tabelle 6.1, Tabelle 6.2).

3.4.1 Die Deletion von *plaF* führt zu pleiotropen Effekten in allen zellulären Kompartimenten

In diesem Abschnitt wurde zunächst die zelluläre Lokalisation entsprechend der Proteine mithilfe der *Pseudomonas*-Datenbank (Tabelle 2.18, Version 19.1, Winsor *et al.*, 2016) klassifiziert, um einen Überblick zu schaffen, in welchem der zellulären Kompartimente sich die abundanten Proteine befanden. Dabei ist in der Datenbank für viele Proteine mehr als eine Lokalisation hinterlegt. Hierbei wird zwischen Lokalisierung mit experimenteller Evidenz (Konfidenzklassen 1 oder 2) und Lokalisierung rein auf Basis von computergestützten Prognosen (Konfidenzklasse 3) unterschieden. Die Recherche der 367 differentiell abundanten Proteine ergab, dass die Mehrheit der Proteine mit 46 % im Zytoplasma und 19 % in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* lokalisiert sind. Des Weiteren sind jeweils 8 % der Proteine eine Lokalisierung im Periplasma und der äußeren Membran annotiert. Für 3 % der Proteine ist eine Sekretion in den extrazellulären Raum bekannt (Abbildung 3.7 A).

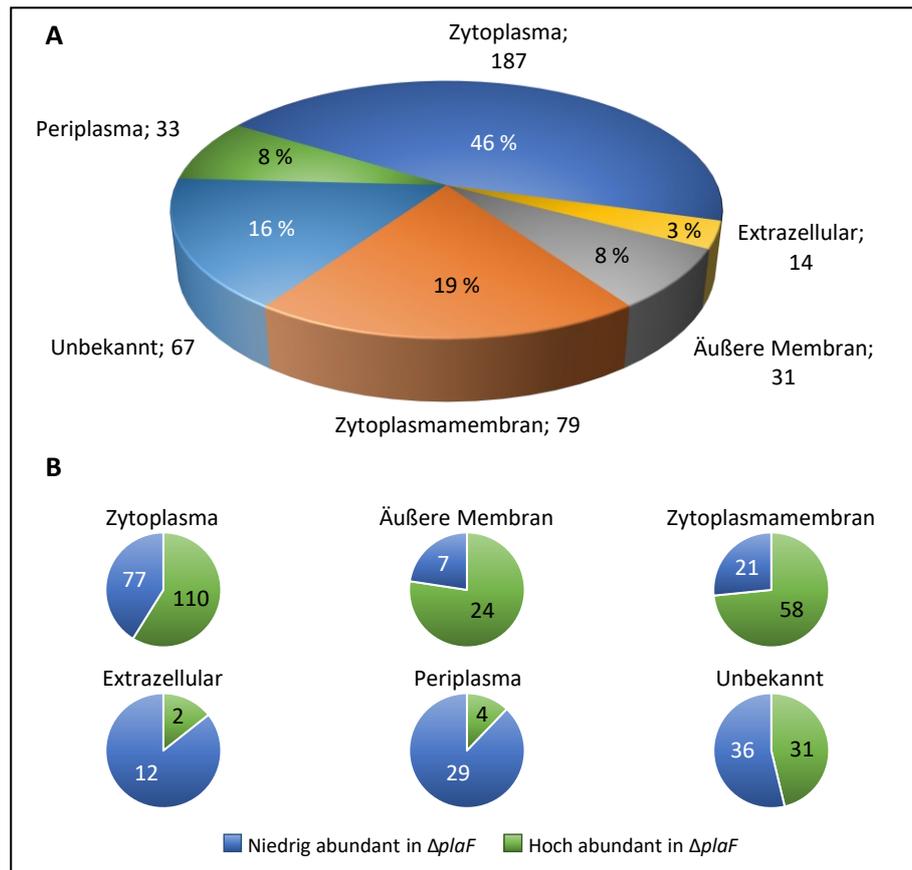


Abbildung 3.7: Proteine aus allen zellulären Kompartimenten sind beeinflusst.

A: Die Verteilung hinsichtlich der zellulären Lokalisation der abundanten Proteine ist im Tortendiagramm dargestellt. Die Informationen der Lokalisation wurden der *Pseudomonas*-Datenbank (www.pseudomonas.com) entnommen (Winsor *et al.*, 2016). Die Lokalisation „Vesikel der äußeren Membran“ wurde der Kategorie „äußere Membran“ zugeordnet. **B:** Die Abbildung zeigt die Verteilung der hoch und niedrig abundanten Treffer in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ in Bezug auf der zellulären Lokalisation.

Um einen Einblick zu gewinnen, welches Kompartiment am meisten hinsichtlich des Proteoms durch das Fehlen von PlaF beeinflusst war, wurde die Verteilung der hoch bzw. niedrig abundanten Treffer in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ verglichen (Abbildung 3.7 B). Hierbei wurde festgestellt, dass etwa zweidrittel der zytoplasmatischen Proteine in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ hoch abundant waren. Außerdem waren etwa dreiviertel der Proteine, die in der äußeren- und zytoplasmatischen Membran lokalisiert sind, in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ hoch abundant. Demgegenüber waren mehr als 80 % der extrazellulären und periplasmatischen Proteine in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ niedrig abundant. Lediglich die Kategorie der Proteine mit unbekannter Lokalisation wies eine ähnliche Verteilung auf (Abbildung 3.7 B).

Um eine Übersicht zu verschaffen, welche Prozesse in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ am meisten betroffen waren, wurden nachfolgend die Proteine mithilfe der COG-Datenbank (*clusters of orthologous groups*) hinsichtlich der biologischen Funktion gruppiert (Galperin *et al.*, 2015). Dabei sind in der

Datenbank alle Proteine aus *P. aeruginosa* PAO1 und deren putativen Funktionen hinterlegt. Die Untersuchung der biologischen Funktion ergab, dass die abundanten Proteine an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind (Abbildung 3.8). Die Mehrheit der Proteine war an zahlreichen Prozessen wie Transport und Metabolismus (79 niedrig abundant in $\Delta plaF$ / 67 hoch abundant in $\Delta plaF$) und Signaltransduktionen (8/29) involviert. Zudem wurden auch Proteine identifiziert, die an weiteren zellulären oder metabolischen Prozessen wie Energie-Homöostase (12/18), Membranbiogenese (5/21), Transkription (5/19), Zellmotilität (0/17), posttranslationale Modifikation (5/7), Zellteilung (3/8), Sekretion (2/7), Translation (2/7) und Abwehrmechanismen (6/3) beteiligt sind. Darüber hinaus wurde auch eine Vielzahl an Proteinen mit unbekannter Funktion (61/45) identifiziert (Abbildung 3.8).

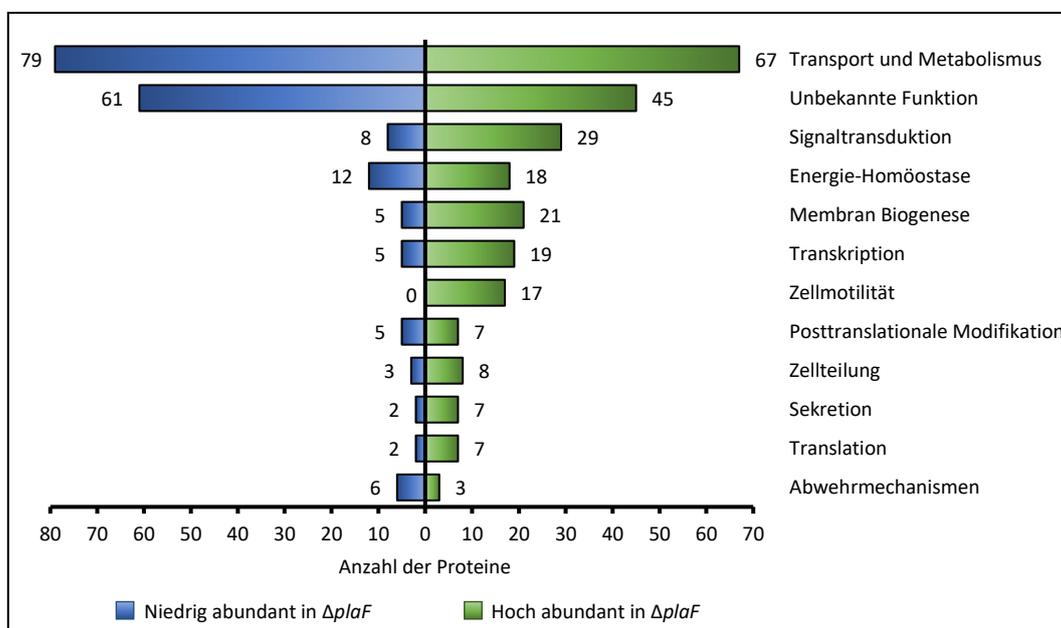


Abbildung 3.8: Funktionelle Kategorisierung bezüglich der biologischen Funktion nach COG.

Die abundanten Proteine wurden entsprechend der Cluster der orthologen Gruppen (COG) kategorisiert. Die Informationen hinsichtlich der COG wurden aus der *Pseudomonas*-Datenbank entnommen (Galperin *et al.*, 2015, Winsor *et al.*, 2016). Die Kategorie Transport und Metabolismus wurde zusammengefasst und umfasst die untergeordneten Kategorien Aminosäure-, Lipid-, Kohlenhydrat-, Coenzym-, Nukleotid-, Sekundärmetabolit- sowie anorganischer Ionen-transport. Die Gruppe Zellteilung umfasst die Kategorien Zellzykluskontrolle, Replikation, Rekombination und Reparatur. Proteine, die zu keiner Kategorie oder zur allgemeinen Funktion zugeordnet waren, wurden zu der Gruppe „Unbekannte Funktion“ zusammengeführt. Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023).

3.4.2 Zweikomponentensysteme, c-di-GMPs und Chemotaxisproteine sind in

P. aeruginosa $\Delta plaF$ beeinflusst

Quantitative Proteomstudien zu *P. aeruginosa* unter Biofilmbedingungen belegen, dass die Proteome erhebliche Unterschiede zu *P. aeruginosa*-Zellen unter planktonischen Bedingungen

aufweisen (Nigaud *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2014, Guilbaud *et al.*, 2017, Erdmann *et al.*, 2019). Der Wechsel vom planktonischen zum sessilen Lebensstil wird dabei durch viele regulatorische Netzwerke wie unter anderem den Zweikomponentensystemen, den *Quorum-Sensing*-Mechanismen und den c-di-GMP (bis-(3'-5')-zyklische di-Guanosinmonophosphat)-abhängigen Signalwegen kontrolliert (Bordi & de Bentzmann, 2011). In diesem Abschnitt wurde genauer untersucht, welche Proteine des Biofilm-Netzwerks in *P. aeruginosa* Δ *plaF* beeinflusst wurden, um Rückschlüsse über die verringerte Biofilmproduktion zu gewinnen. Hierzu wurden zum einen bekannte Proteine von *P. aeruginosa* aus der Literatur und zum anderen Proteine aus der *Pseudomonas*-Datenbank (Tabelle 2.18) mithilfe der Textsuche „Biofilm“ herausgefiltert, um diese dann mit den eigenen Daten zu vergleichen. Insgesamt wurden in *P. aeruginosa* Δ *plaF* 40 hoch bzw. niedrig abundante Proteine gefunden, die im regulatorischen Biofilm-Netzwerk beeinflusst sind (Tabelle 6.3, Anhang).

Zweikomponentensysteme ermöglichen eine schnelle Anpassung an veränderte Umwelteinflüsse, indem die Genexpression zahlreicher Gene reguliert wird (Yeo *et al.*, 2023). In der Regel bestehen Zweikomponentensysteme aus einer membranverankerten sensorischen Histidinkinase (HK) und einem zytoplasmatischem Regulator, dem sogenannten *response regulator* (RR), der die zelluläre Antwort auf extrazelluläre Stimuli durch Aktivierung der Genexpression steuert. Nach heutigem Stand kodiert das Genom von *P. aeruginosa* etwa 63 putative Histidinkinasen und 64 putative regulatorische Proteine (Rodrigue *et al.*, 2000).

Insgesamt wurden elf dieser Zweikomponentensysteme hoch bzw. niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* gefunden (Tabelle 6.3, Anhang). Darunter waren drei Histidinkinasen (PprA, KdpD, PA0178), sechs Regulatoren (PprB, PmrA, FleR, ErdR, PA2572, PA0756) sowie zwei putative Sensor/Regulator-Hybridkinasen (PA4112, PA2583) (Abbildung 3.9). Eine genauere Analyse ergab, dass die membranverankerte Histidinkinase PprA (18,7-fach) am zweitstärksten in *P. aeruginosa* Δ *plaF* beeinflusst wurde. Der korrespondierende Regulator PprB (1,9-fach) war ebenfalls hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF*. Als Paar bilden PprA und PprB das einzige zusammengehörige Zweikomponentensystem, das im Rahmen der Proteomstudie in *P. aeruginosa* Δ *plaF* beeinflusst wurde. Zudem ist bekannt, dass die Aktivität von PprAB beim Wechsel aus der planktonischen Lebensform zur sessilen Lebensform ein wichtiges regulatorisches Netzwerk kontrolliert (de Bentzmann *et al.*, 2012). Die Histidinkinase KdpD war um 2,2-fach hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* (Abbildung 3.9). Bei KdpD handelt es sich um ein Protein, welches an der Kalium-Homöostase beteiligt ist und den Kalium-Transport reguliert (Luttmann *et al.*, 2009). PA0178 (4,6-fach), PA4112 (2,6-fach) und PA2583 (1,5-fach) sind putative und bislang nicht charakterisierte Kinasen in *P. aeruginosa* (Bains *et al.*, 2012, Ducret *et al.*, 2022). Die identifizierten Regulatoren

FleR (2,2-fach), ErdR (1,6-fach) und PmrA (1,6-fach) wirken in *P. aeruginosa* als Transkriptionsfaktoren und aktivieren die Expression zahlreicher Gene, deren Endprodukte verschiedenartige Funktionen besitzen (Abbildung 3.9). Diese sind unter anderem verantwortlich für die Biosynthese des Flagellums durch FleR-aktivierte Gene, die Regulierung des Ethanol-Metabolismus durch ErdR-aktivierte Gene sowie die Ausbildung der Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide und Polymyxin B durch PmrA-aktivierte Gene (Dasgupta *et al.*, 2003, McPhee *et al.*, 2003, Mern *et al.*, 2010). PA2572 (1,5-fach) ist ein putativer Regulator, dessen Aktivierung die Expression von 49 Genen reguliert (Abbildung 3.9). Diese kodieren für Proteine, die unter anderem zur Virulenz oder zur Antibiotikaresistenz beitragen (McLaughlin *et al.*, 2012). PA0756 ist der einzige putative Regulator, der in *P. aeruginosa* Δ *plaF* um 1,5-fach niedrig abundant im Vergleich zum WT war (Abbildung 3.9). In der Literatur wurde gezeigt, dass PA0756 eine erhöhte Expression unter Biofilmbedingungen aufwies und auch eine regulatorische Funktion bei der biofilmspezifischen Antibiotikaresistenz einnahm (Zhang *et al.*, 2013).

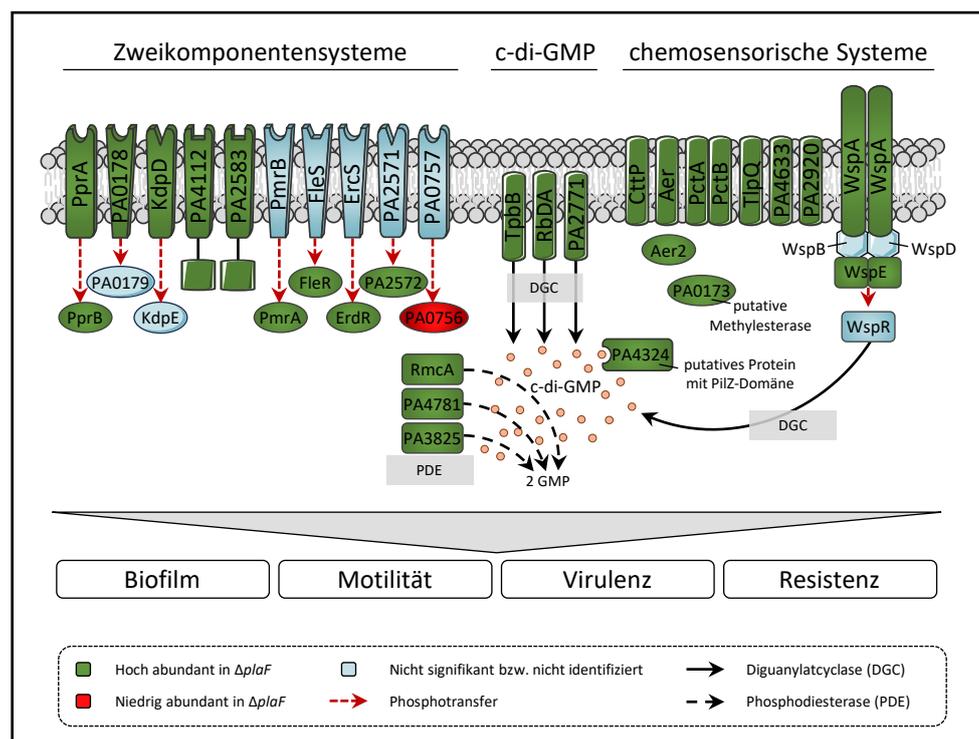


Abbildung 3.9: Signalübertragungssysteme in *P. aeruginosa* Δ *plaF* sind beeinflusst.

Die Biofilmbildung, die Resistenzbildung sowie die Regulierung der Motilität und der Virulenz werden in *P. aeruginosa* unter anderem durch Zweikomponentensysteme, durch chemosensorische Systeme und durch das c-di-GMP-Level kontrolliert. Im Allgemeinen bestehen Zweikomponentensysteme aus einer membranverankerten Histidinkinase und einem zytosomatischen Regulator. Infolge einer sensorischen Wahrnehmung der Histidinkinase erfolgt die Aktivierung des Regulators durch Phosphotransfer (roter Pfeil). Der phosphorylierte Regulator agiert als Transkriptionsfaktor und aktiviert die Transkription spezifischer Gene. Der Auf- bzw. Abbau von c-di-GMP-Signalmolekülen in *P. aeruginosa* erfolgt durch spezifische Diguanylatcyclasen (DGC, schwarzer Pfeil) und Phosphodiesterasen (PDE, schwarzer gestrichelter Pfeil). Die chemotaktische Motilität sowie die Fähigkeit der Umweltwahrnehmung beruhen auf chemosensorischen Systemen. So können

chemotaktische Rezeptoren (Sensoren) beispielsweise anorganische Phosphate, Aminosäuren sowie Histamine sensorisch wahrnehmen und die Regulation der chemotaktischen Motilität kontrollieren. Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0). Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023).

Das bis-(3'-5')-zyklische di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) ist ein vielseitiger und der am häufigsten vorkommende sekundäre Botenstoff in Bakterien (Hengge, 2009). So gelten c-di-GMP-Moleküle als Schlüsselkomponenten, welche den Übergang zwischen der planktonischen und der sessilen Lebensweise von *P. aeruginosa* regulieren (Valentini & Filloux, 2016). Durch Analysen wurden unter anderem die Diguanylatcyclasen (DGC) TpbB (1,7-fach), RbdA (1,6-fach), PA2771 (1,7-fach) und drei c-di-GMP-spezifische Phosphodiesterasen (PDE) RmcA (2,1-fach), PA4781 (2,5-fach) und PA3825 (1,7-fach) hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* gefunden (Abbildung 3.9). Dabei verknüpfen DGCs zwei GTP-Moleküle über 5'-3'-Phosphodiesterverbindung zu einem c-di-GMP-Botenstoff, wohingegen PDEs den Abbau von c-di-GMPs durch Hydrolyse zu zwei GMPs katalysieren (Valentini & Filloux, 2016). Außerdem wurde ein hypothetisches Protein (PA4324) identifiziert, welches in *P. aeruginosa* Δ *plaF* um 16,2-fach hoch abundant war (Abbildung 3.9). Unter der Verwendung der UniProt-Datenbank wurde für PA4324 (Aktenzeichen: Q9HW77_PSEAE) eine c-di-GMP-bindende PilZ-Domäne, die charakteristisch für c-di-GMP bindende Effektorproteine ist, ausfindig gemacht. Die genaue physiologische Funktion von PA4324 ist bislang noch ungeklärt (Consortium, 2022). In *P. aeruginosa* wurden bislang wenige c-di-GMP-bindende Effektorproteine beschrieben, darunter Alg44, FleQ, PelD, FimX sowie BrlR (Jones *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2016).

P. aeruginosa besitzt außerdem eine große Bandbreite von chemosensorischen Systemen, die im Falle einer Wahrnehmung, beispielsweise von chemischen Signalmolekülen, Einfluss auf das Rotieren des Flagellums oder die Kontraktionen der Pili ausüben (O'Connor *et al.*, 2012, Garcia *et al.*, 2017). In *P. aeruginosa* sind bislang vier chemosensorische Systeme (Che-, Che2-, Wsp-, Chp-System), die in 5 Genclustern organisiert sind, beschrieben (Stover *et al.*, 2000). Im Zuge der Proteomstudie wurden insgesamt 11 chemotaktische Proteine hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert (Abbildung 3.9). Hierbei handelt es sich einerseits um Sensoren, die Trichlorethylene (CttP: 5,3-fach), Aminosäuren (PctA: 1,5-fach, PctB: 2,0-fach) oder Histamine (TlpQ: 1,9-fach) wahrnehmen können, aber andererseits auch um Proteine, die an der Wahrnehmung von Sauerstoffmolekülen (Aer: 1,7-fach, Aer2: 3,4-fach) beteiligt sind (Kim *et al.*, 2006). Zudem wurden WspA (1,7-fach) und WspE (1,5-fach) des Wsp-Systems hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert (Abbildung 3.9), welche im Falle einer sensorischen Wahrnehmung die Diguanylatcyclase WspR (nicht identifiziert) aktivieren und die Produktion der

c-di-GMP-Signalmoleküle regulieren (O'Connor *et al.*, 2012). Die Proteine PA4633 (1,5-fach) und PA2920 (2,2-fach) stellen putative Chemosensoren dar, deren physiologische Funktion noch ungeklärt sind (Abbildung 3.9). PA0173 (2,3-fach) ist eine putative Methylsterase des Che2-Systems und bislang nicht charakterisiert (Abbildung 3.9).

3.4.2.1 Biofilm-assoziierte Proteine sind stark beeinflusst

Die Proteine BapA (3,9-fach), BapC (8,8-fach) und BapD (31,7-fach) waren am stärksten in *P. aeruginosa* Δ *plaF* beeinflusst (Abbildung 3.10). Hierbei handelt es sich um Komponenten eines nicht charakterisierten Typ-1-Sekretionssystems, welche durch die Gene *pa1874-pa1877* in einem putativen Operon kodiert werden. Zudem wird beschrieben, dass die Expression der Gene neben einer erhöhten Biofilmproduktion auch zu einer höheren Sensibilität gegenüber Tobramycin führen (de Bentzmann *et al.*, 2012). CupE4 wurde um 7,6-fach höher abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert, ein Chaperon, welches vor allem für die Assemblierung von Biofilm-spezifischen Pili im Frühstadium und auch in der weiteren Entwicklung des Biofilms verantwortlich ist (Abbildung 3.10, Giraud *et al.*, 2011).

Außerdem wurden die Proteine PslA (1,6-fach), PslF (1,8-fach) sowie PslL (1,5-fach) als hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert, die an der Produktion des Exopolysaccharids Psl beteiligt sind und ein wesentlicher Bestandteil der Biofilm-Matrix sind (Abbildung 3.10). Weiterhin wurden CdrB (1,6-fach) als hoch abundant und CdrA (2,8-fach) als niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert, welche zusammen ein Zwei-Partner-Sekretions System (TPS, *two-partner secretion*) bilden und über den c-di-GMP-Botenstoff reguliert werden (Abbildung 3.10). CdrB stellt hierbei die Transporteinheit dar. CdrA hingegen weist auf struktureller Ebene Ähnlichkeiten zu bekannten extrazellulären Adhäsinen auf. Zusätzlich ist bekannt, dass die Interaktion von CdrA-Molekülen mit Psl-Exopolysacchariden zu einer verstärkten Biofilm-Matrix führt (Borlee *et al.*, 2010).

Des Weiteren wurden MucA (2,8-fach) sowie MuiA (1,5-fach) wiederum in *P. aeruginosa* Δ *plaF* als niedrig abundant identifiziert (Abbildung 3.10). Beide Proteine gelten als Negativ-Regulatoren des Biofilmregulationsnetzwerkes und inhibieren indirekt die Produktion von Alginate und somit auch die Bildung des Biofilms (Withers *et al.*, 2014, Chevalier *et al.*, 2018).

HsbA (1,5-fach) war in *P. aeruginosa* Δ *plaF* hoch abundant (Tabelle 6.3, Anhang) und ist ein Anti-anti-Sigma-Faktor, welcher in Abhängigkeit des HptB-Signalweges an der Regulation der Biofilmproduktion, der Motilität (Schwimmen, Schwärmen, *Twitching*) sowie der Chemotaxis beteiligt ist (Valentini *et al.*, 2016). MotB wies eine um 1,6-fach hohe Abundanz in *P. aeruginosa*

$\Delta plaF$ auf (Tabelle 6.3, Anhang). MotB bildet zusammen mit MotA Protonenkanäle, die ringförmig als Statoreinheit um den Flagellumrotor angeordnet sind und die benötigte Energie für die Rotation des Flagellums liefern (Belas, 2014).

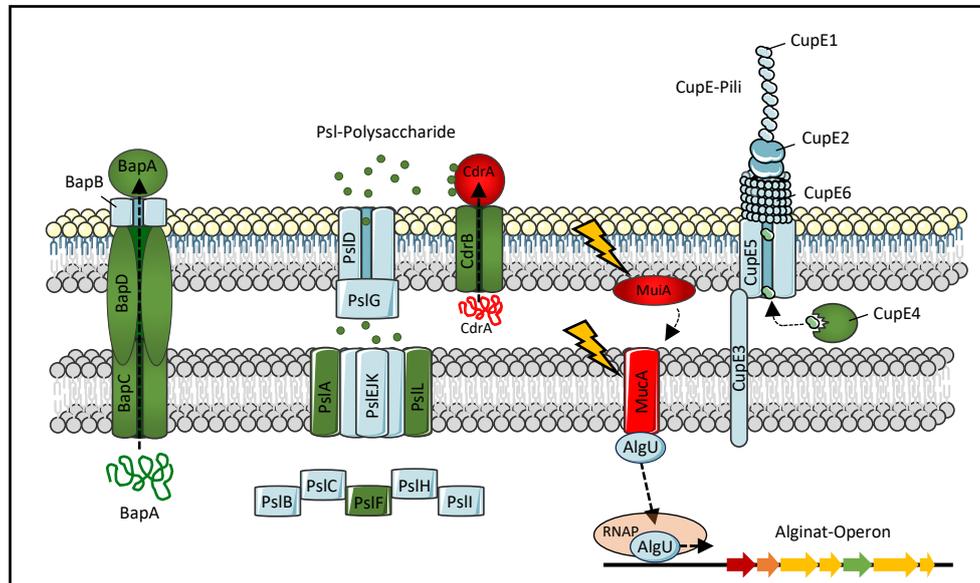


Abbildung 3.10: Biofilm-assoziierte Proteine sind in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ beeinflusst.

Dargestellt sind hoch (grün) und niedrig (rot) abundante Biofilm-assoziierte Proteine in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$. BapABCD ist ein Typ-1-Sekretionssystem, welches das putative Adhäsionsprotein BapA an die äußere Membran sekretiert. Das Psl-Netzwerk (PslABCDEFGHIK) ist für die Bildung der Psl-Polysaccharide verantwortlich. Das Zwei-Partner-Sekretionssystem CdrAB ist verantwortlich für die Reifung der Biofilm-Matrix. Biofilm-spezifische Pili (CupE-Pili) sind im Rahmen der Biofilmbildung maßgeblich an der Anheftung auf Oberflächen verantwortlich. MucA und MuiA stellen Negativ-Regulatoren der Alginatbiosynthese dar, indem MucA den Sigmafaktor AlgU an die Zytoplasmamembran durch Bindung rekrutiert. Der Wechsel in die sessile Lebensform erfordert die Adaptation der Membranlipidhomöostase (Blitz), was infolgedessen zum proteolytischen Abbau des Negativ-Regulators MucA führt. Dieser Abbau hat zur Folge, dass AlgU sich von MucA löst und sich zusammen mit der RNA-Polymerase (RNAP) an den Promoter des Alginat-Operons bindet und die Transkription der Alginatbiosynthese-Gene initiiert. Proteine des Alginat-Netzwerks waren in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ nicht beeinflusst. Proteine, die im Rahmen der Proteomstudie nicht beeinflusst bzw. nicht identifiziert wurden, sind in hellblau dargestellt. Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0).

3.4.2.2 Proteine des regulatorischen PprAB-Netzwerks sind hoch abundant

Nachdem festgestellt wurde, dass ausschließlich das PprAB-Zweikomponentensystem als zusammengehöriges System in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ hoch abundant war, wurde in diesem Abschnitt untersucht, welche Zielproteine des regulatorischen PprAB-Netzwerks in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ ebenfalls betroffen waren. Zu diesem Zweck wurde eine Liste mit 35 identifizierten Genen des PprAB-Netzwerks (Tabelle 6.4, Anhang), die im Zuge einer quantitativen Genexpressionsanalyse erstellt wurde, als Referenz verwendet und mit den hier vorliegenden Proteom-Daten abgeglichen (de Bentzmann *et al.*, 2012). Es zeigte sich, dass viele der

beschriebenen hoch abundanten Proteine zum PprAB-Regulon gehören. Insgesamt ergab die vergleichende Untersuchung, dass 9 von 35 der Protein-kodierenden Gene in *P. aeruginosa* Δ *plaF* hoch abundant waren (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.11, Venn-Diagramm), während 5 Proteine unter dem Schwellenwert einer 1,5-facher Änderung lagen und 21 Proteine im Rahmen der Proteomstudie nicht identifiziert wurden.

Tabelle 3.1: Liste der PprAB-regulierten Proteine, die in *P. aeruginosa* Δ *plaF* beeinflusst wurden

PA-Nr:	Name	Beschreibung	Lokalisierung	n-fache Änderung
PA1877	BapD	Biofilm-assoziiertes Protein D	ZM	+31,7
PA4293	PprA	Zweikomponentensystem (Sensor)	ZM	+18,7
PA1876	BapC	Biofilm-assoziiertes Protein C	ZM	+8,8
PA4651	CupE4	Pilin-Assemblierung Chaperon	U	+7,6
PA4303	TadZ	<i>Tight</i> -Adhesin	U	+5,1
PA1874	BapA	Biofilm-assoziiertes Protein A	U	+3,9
PA4296	PprB	Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	+1,9
PA1001	PhnA	Anthranilat-Synthase	Z	+1,6
PA0998	PqsC	Biosynthese von Quinolone Signal	Z	+1,5

ZM: Zytoplasmamembran, **Z:** Zytoplasma, **U:** unbekannt

Um die Ergebnisse der Proteomstudie zu validieren, wurden nachfolgend die Transkriptmengen der Gene aus dem regulatorischen PprAB-Netzwerk mithilfe der quantitativen RT-PCR (Kapitel 2.10.12) untersucht (Abbildung 3.11, in grün). Zusätzlich wurde auch die Expression von Genen des PprAB-Netzwerks analysiert, welche im Rahmen der Proteomstudie nicht identifiziert wurden (Abbildung 3.11, in blau). Für jede transkriptionelle Einheit wurde die Expression einzelner Gene des jeweiligen Operons analysiert, wie beispielsweise *pqsDE* aus dem *pqs*-Operon, *bapB* aus dem *bap*-Operon, *cupE1* aus dem *cupE*-Operon oder *tadAG* aus dem *tad*-Operon. Für die Auswertung wurden die Werte der n-fachen Änderung (Proteomstudie) gegen die Werte der n-fachen Änderung (qRT-PCR-Analyse) aufgetragen.

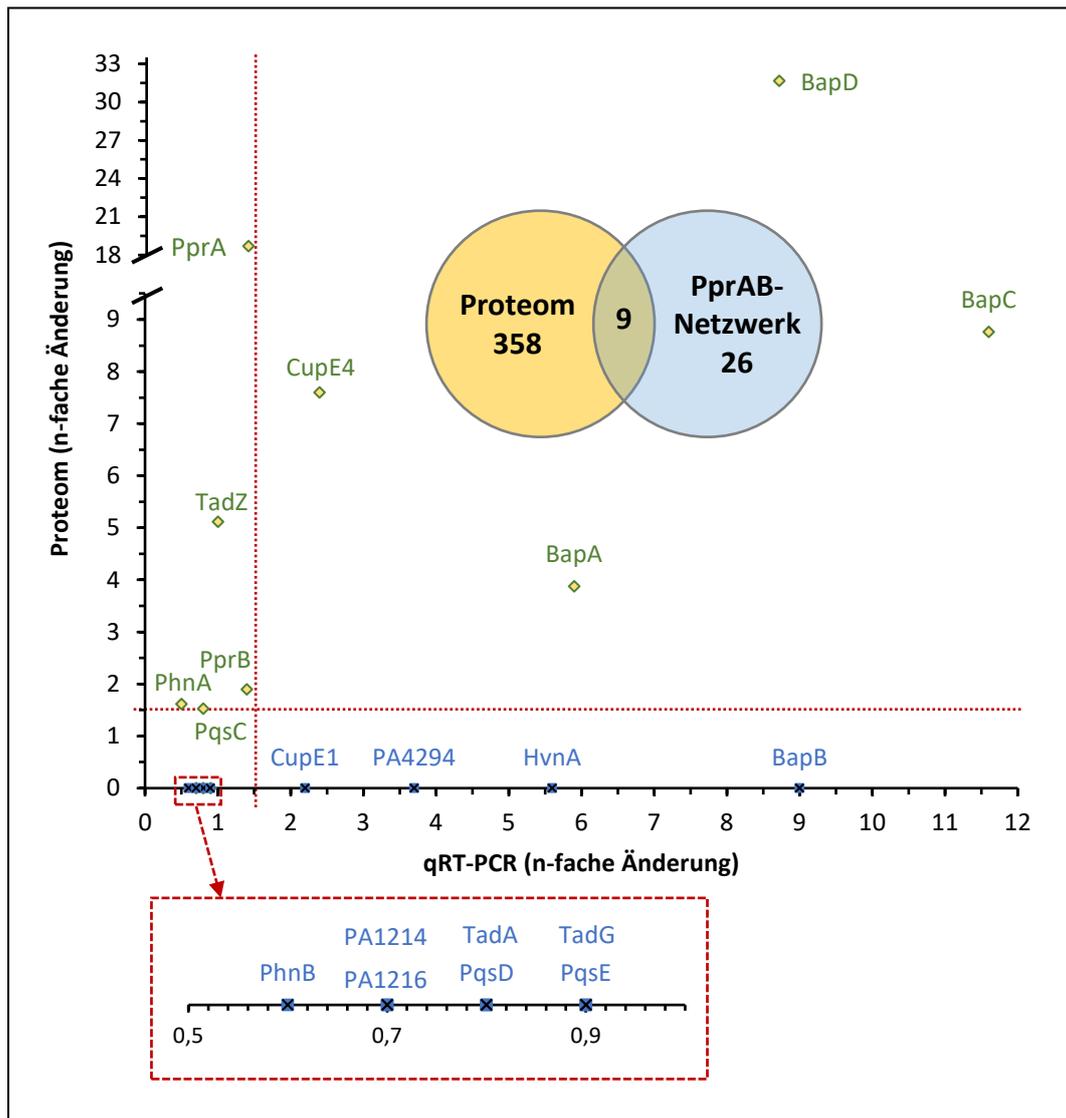


Abbildung 3.11: Gene des PprAB-Netzwerks sind vereinzelt hochreguliert.

Es wurden die n-fachen Änderungen der Expressionsstärke von ausgewählten Genen des regulatorischen PprAB-Netzwerks in *P. aeruginosa* Δ *plaF* untersucht und diese gegen die n-fache Änderung der Proteine aus der Proteomstudie in *P. aeruginosa* Δ *plaF* aufgetragen. Für die Analyse wurden Zellen unter statischen Bedingungen (Kapitel 2.9.5) kultiviert und die RNA, wie in Kapitel 2.10.10 beschrieben, extrahiert. Es wurden jeweils 50 ng cDNA in die RT-PCR eingesetzt und analysiert. Dabei wurden abundante Proteine (PprAB, BapACD, CupE4, PhnA, PqsC, TadZ) aus der Proteomstudie mit einer Raute (grüner Rand, gelbe Füllung) sowie nicht identifizierte Proteine mit einem Viereck (blau) dargestellt. Horizontale und vertikale rote Linien markieren die Schwellenwerte des Signifikanzniveaus ($n \geq 1,5$ -fache Änderung; $p < 0,05$). Datenpunkte im Bereich 0 bis 1 auf der x-Achse wurden im roten Kasten in vergrößerter Form dargestellt. Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023).

Aus dem Diagramm geht hervor, dass die Gene *bapABCD* (*bapA*: 5,9-fach; *bapB*: 9,0-fach; *bapC*: 11,6-fach; *bapD*: 8,7-fach) sowie die Gene *cupE1* (2,2-fach) und *cupE4* (2,4-fach) signifikant höhere Transkriptmengen in *P. aeruginosa* Δ *plaF* aufwiesen (Abbildung 3.11). Interessanterweise wurden die Gene *bapB* aus dem *bap*-Operon sowie *cupE1* aus dem *cupE*-Operon im Rahmen der Proteomstudie auf Peptidebene nicht identifiziert. In der Literatur wird BapB als ein Protein der äußeren Membran vermutet (de Bentzmann *et al.*, 2012): Für den Fall, dass BapB nicht in der

äußeren Membran verankert vorliegt und bei der Probenaufbereitung angereichert wird, könnte das erklären, warum es in der Proteomstudie nicht identifiziert werden konnte. Das Gen *cupE1* kodiert für ein Protein, das für den Aufbau des Pili-Filaments der Zelle und somit für die Anheftung an Oberflächen verantwortlich ist (Abbildung 3.10) (Giraud *et al.*, 2011). Weitere Gene, wie *pprAB*, *tadZ*, *phnA* und *pqsC*, wiesen geringe Transkriptmengen ($n < 1,5$ -fache Änderungen) auf. Außerdem wiesen die Gene *pa4294* (3,7-fach) sowie *hvnA* (5,6-fach), welche in der Proteomstudie nicht identifiziert wurden, ebenfalls eine erhöhte Expression in *P. aeruginosa* Δ *plaF* auf. Weitere verbleibende Gene (*phnB*, *pa1214*, *pa1216*, *tadA*, *tadG*, *pqsD* und *pqsE*) des regulatorischen PprAB-Netzwerks wiesen hingegen niedrigere Transkriptmengen in *P. aeruginosa* Δ *plaF* auf. Hierbei wurden lediglich zwischen 0,6- und 0,9-fache Änderungen der Transkriptmengen in *P. aeruginosa* Δ *plaF* ermittelt (Abbildung 3.11, rot gestrichelter Kasten).

3.4.3 Die Deletion von *plaF* hat Einfluss auf Transportprozesse und den zellulären Metabolismus

Die Mehrheit der Proteine wurde in die Gruppe „Transport und Metabolismus“ kategorisiert (Abbildung 3.8). Transportproteine von zellulären Organismen haben eine wichtige Rolle in metabolischen Netzwerken und ermöglichen primär die Interaktion mit ihrer Umgebung und gewähren somit das Überleben einer Zelle. So werden zahlreiche biochemische Reaktionen durch Transportprozesse miteinander verbunden, um beispielsweise organische Verbindungen zur Energiegewinnung zu nutzen oder makromolekulare Verbindungen für das Zellwachstum zu synthetisieren (Shimizu, 2013).

Um eine Übersicht der COG-Kategorien zu gewinnen, wurden nachfolgend in diesem Abschnitt die Transport-Untergruppen genauer untersucht. Zusammenfassend zeigte die COG-Kategorisierung, dass Proteine der Gruppe „Aminosäure Transport und Metabolismus“ (24 niedrig abundant/20 hoch abundant in Δ *plaF*) am meisten beeinflusst wurden, gefolgt von Transportern für anorganische Ione (14/14), Lipide (18/8), Kohlenhydrate (6/15), Sekundärmetabolite (16/4), Coenzyme (8/11) und Nukleotide (1/2) (Abbildung 3.12 A).

Die Verteilung der zellulären Lokalisation der Transportproteine zeigte, dass Proteine aus dem Zytoplasma (40/40) gleichermaßen beeinflusst wurden (Abbildung 3.12 B). Außerdem waren 7 Proteine aus der Zytoplasmamembran niedrig abundant und 21 Proteine hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF*. Im Gegensatz dazu überwog die Anzahl der niedrig abundanten Proteine aus dem Periplasma (20/2) in *P. aeruginosa* Δ *plaF*. Darüber hinaus wurden Proteine aus der äußeren

Membran (2/6) und aus dem extrazellulären Bereich (7/0) identifiziert. Für 17 Proteine war die zelluläre Lokalisation unbekannt.

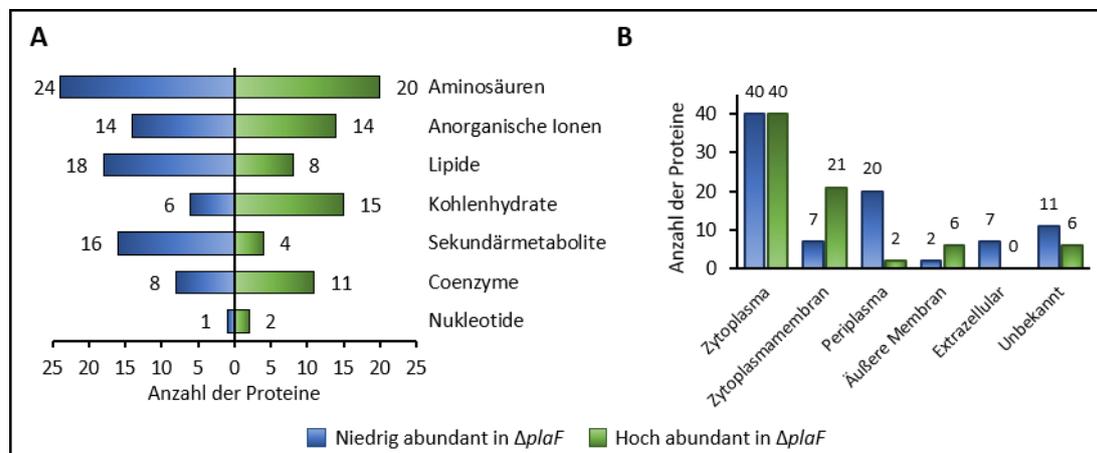


Abbildung 3.12: Plaf beeinflusst das metabolische Netzwerk.

A: Die Proteine aus der Kategorie Transport und Metabolismus (aus Abbildung 3.8 A) wurden entsprechend der Cluster der orthologen Gruppen (COG) kategorisiert. Die Informationen hinsichtlich der COG wurden auf der *Pseudomonas*-Datenbank entnommen (Galperin *et al.*, 2015, Winsor *et al.*, 2016). **B:** Dargestellt ist die Verteilung der Transportproteine innerhalb der zellulären Lokalisation.

Eine der größten Proteingruppe umfasst die Superfamilie der ABC-Transporter. Eine charakteristische Funktion von Vertretern dieser Proteinfamilie besteht darin, Substrate aktiv durch Hydrolyse von ATP über Lipidmembranen zu transportieren (Rice *et al.*, 2014). Im Rahmen der Proteomstudie wurden insgesamt 30 putative ABC-Transportproteine innerhalb der COG-basierten Kategorie „Transport und Metabolismus“ identifiziert. Dabei wurden in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ 12 hoch abundante membranständige Protein-Komponenten gefunden, welche am Transport von spezifischen Aminosäuren (AotM: 2,1-fach, AatQ: 1,5-fach), Peptiden (DppC: 1,6-fach), Phosphaten (PstB: 1,5-fach, PstC: 2,0-fach) oder Kationen (FeoB: 2,3-fach, MgtA: 2,2-fach, KdpB: 1,5-fach) beteiligt sind (Abbildung 3.13). Diese besitzen ATP-bindende Domänen, welche durch Hydrolyse von ATP die Energie freisetzen und den Import oder Export von Ionen oder kleinen Molekülen katalysieren. Des Weiteren wurden drei putative Transporter (PA5231: 1,9-fach, PA5075: 1,5-fach, PA1429: 1,7-fach) mit unbekanntem Substraten sowie eine Komponente eines *Efflux*-Transporters (TriC: 1,5-fach) identifiziert, ein Protein, welches die Resistenzbildung gegenüber Triclosan (Irgasan) durch aktiven Export vermittelt. Die stärksten beeinflussten Proteine waren BapC (8,8-fach) und BapD (31,7-fach) (Abbildung 3.13). Beide Proteine sind Komponenten eines nicht näher charakterisierten Typ1-Sekretionssystems (BapABCD), wobei BapC ein putatives ATP-bindendes membranverankertes Protein und BapD ein putatives periplasmatisches Membranfusionsprotein darstellt (Kapitel 3.4.2.1) (de Bentzmann *et al.*, 2012).

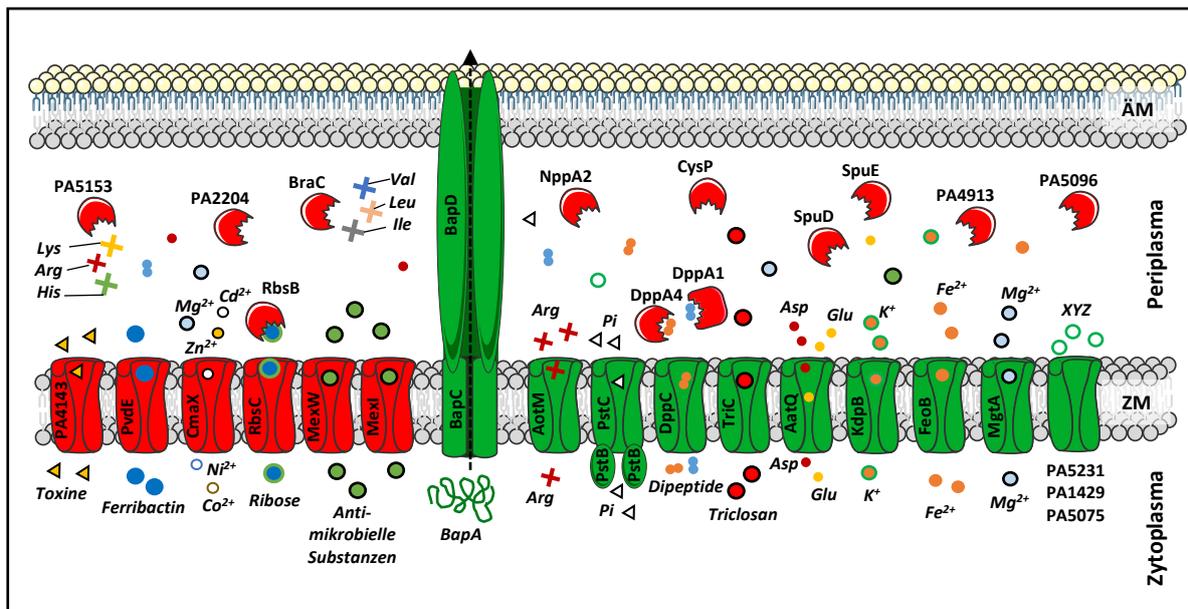


Abbildung 3.13: Zahlreiche ABC-Transportproteine sind in *P. aeruginosa* Δ plaF beeinflusst.

Transportproteine in der Zytoplasmamembran (ZM) sowie Substrat-bindende Proteine (SBP, *substrate binding proteins*) im Periplasma sind hoch (grün) bzw. niedrig (rot) abundant in *P. aeruginosa* Δ plaF. Die membranverankerten Transportproteine enthalten ATP-bindende Domänen, welche die Energie für den aktiven Transport durch die Zytoplasmamembran bereitstellen. Die SBPs weisen hohe Affinitäten zu spezifischen Substraten auf und initiieren den Transport des gebundenen Substrats durch Bindung an den korrespondierenden membranverankerten Transporter. Die spezifischen Substrate in der Abbildung wurden in kursiver Schrift dargestellt. Die Aminosäuren Lysin, Arginin, Histidin, Valin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure und Glutaminsäure wurden im Dreibuchstabencode (*Lys, Arg, His, Val, Leu, Ile, Asp, Glu*) angegeben. Weitere Abkürzungen: Mg^{2+} (Magnesium-Ion), Cd^{2+} (Cadmium-Ion), Zn^{2+} (Zink-Ion), Ni^{2+} (Nickel-Ion), Co^{2+} (Kobalt-Ion), *Pi* (anorganisches Phosphat), K^+ (Kalium-Ion), Fe^{2+} (Eisen-Ion), XYZ (unbekannte Substrate). Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0).

Darüber hinaus wurden in *P. aeruginosa* Δ plaF auch 18 niedrig abundante Transportproteine detektiert. Diesbezüglich ist besonders die große Anzahl von periplasmatischen Proteinen auffällig, welche am Import von Peptiden (CysP: 1,5-fach, NppA2: 1,5-fach, DppA1: 1,5-fach, DppA4: 1,6-fach), Aminosäuren (BraC: 1,7-fach, PA5153: 2,2-fach), Ribose (RbsB: 2,3-fach) sowie Polyaminen (SpuD: 1,5-fach, SpuE: 1,5-fach) beteiligt sind (Abbildung 3.13). Darüber hinaus wurden noch vier weitere periplasmatische Proteine (PA2204: 1,7-fach, PA4913: 4,4-fach, PA5096: 2,3-fach) mit unbekanntem Substrat identifiziert. Hierbei handelt es sich um sogenannte periplasmatische SBPs (*substrate binding proteins*), die eine hohe Affinität für spezifische Substrate aufweisen und den Ligandentransport durch Bindung an den ABC-Transporter initiieren (Cui & Davidson, 2011). Außerdem wurden drei Toxinexporter (MexI: 1,5-fach, MexW: 1,6-fach, PA4143: 2,3-fach), ein Ferribactintransporter (PvdE: 1,9-fach), ein Ribosetransporter (RbsC: 1,6-fach) sowie ein Ionentransporter (CmaX: 2,0-fach) aus der Zytoplasmamembran ermittelt (Abbildung 3.13).

3.4.4 An der Phospholipid-Homöostase beteiligte Proteine sind beeinträchtigt

Ein fundamentales Merkmal von bakteriellen Zellen ist das Vorhandensein von biologischen Membranen mit der Fähigkeit sich rapide an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, um die Integrität der Zelle und damit das bakterielle Überleben zu sichern. Die sogenannte Membranlipidhomöostase beinhaltet unter anderem die Membranbiogenese, die Modifizierung der Fettsäureacylketten sowie die Änderung der Ladung der Phospholipidkopfgruppe mit dem Ziel, die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen zu verändern, die wiederum Einfluss auf membranassoziierte Proteinfunktionen nehmen (Zhang & Rock, 2008, Holthuis & Menon, 2014). Bei der Ermittlung der Proteine, welche am Lipid Transport und Metabolismus involviert sind, wurden insgesamt 26 Proteine (18 niedrig abundant in $\Delta plaF/8$ hoch abundant in $\Delta plaF$) zugeordnet (Abbildung 3.12). Die Mehrheit der Proteine sind als „putative“ Dehydrogenasen annotiert und sind in die Konfidenzklassen 3 oder 4 eingestuft. Dabei zeigen Proteine der Konfidenzklasse 3 konservierte Aminosäuresequenzmotive oder bioinformatisch detektierbare Strukturähnlichkeiten gegenüber bereits bekannten Proteinen auf, wohingegen Proteine der Klasse 4 keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen aufweisen (Winsor *et al.*, 2016). Im Zusammenhang mit der Phospholipid-Homöostase sind Dehydrogenasen unter anderem an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt. Diese katalysieren die Oxidation von Fettsäuren, indem sie Wasserstoffatome von den Fettsäuren abspalten. Dieser Prozess führt zur Bildung von NADH und FADH₂, die dann in der Elektronentransportkette verwendet werden, um ATP zu produzieren (Campbell & Cronan, 2002, Kang *et al.*, 2008).

Durch weitere Analysen aller 367 abundanten Proteine wurden außerdem noch eine Phosphat-Acyl-Transferase PlsX (1,5-fach) und PA5546 (1,8-fach) in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ abundant erhöht vorgefunden. PlsX ist ein peripheres Membranprotein und katalysiert eine wesentliche Reaktion des Phospholipid-Biosynthesewegs durch die Übertragung der Acylkette von einem langkettigen Acyl-ACP (*acyl-carrier-protein*) auf ein anorganisches Phosphat, um folglich reaktives Acyl-Phosphatidsäure (AP) zu bilden (Abbildung 3.14) (Zhang & Rock, 2008).

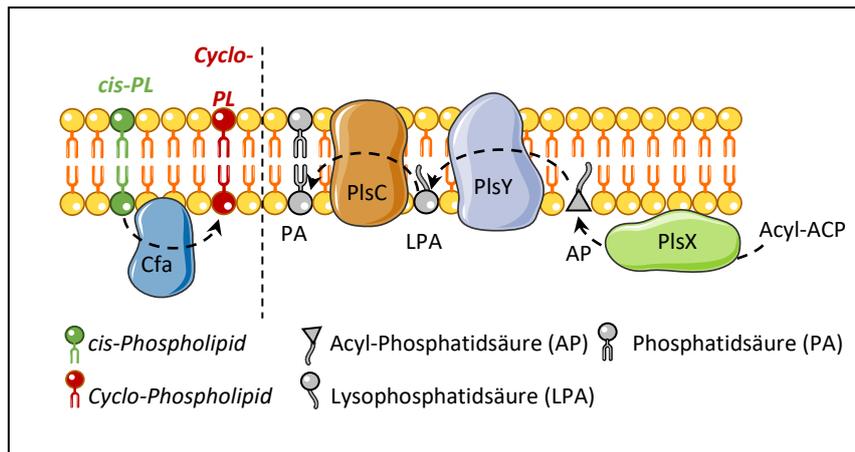


Abbildung 3.14: PlsX und Cfa der Membranlipidhomöostase sind in *P. aeruginosa* Δ plaF beeinflusst.

Auf der linken Seite ist die Bildung des Cyclo-Phospholipids schematisch dargestellt. Die Cyclopropan-Fettsäure-Synthase (Cfa) katalysiert die Bildung eines Cyclopropan-Rings in der Fettsäurekette eines Phospholipids. Auf der rechten Seite ist ein Teilausschnitt des Phospholipid-Biosynthesewegs dargestellt. Die Phosphat-Acyl-Transferase (PlsX) katalysiert die Bildung von Acyl-Phosphatidsäure (AP) durch Übertragung der Acylkette von Acyl-ACP (*acyl-carrier-protein*) auf ein anorganisches Phosphat. Mithilfe von PlsY und PlsC wird die Phosphatidsäure gebildet. In der Membranhomöostase dient das gebildete Endprodukt PA (Phosphatidsäure) als Vorstufe für alle Phospholipid-Spezies. Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0). Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023).

PA5546 ist in der *Pseudomonas*-Datenbank als „konserviertes hypothetisches Protein“ annotiert. Mithilfe der BLAST-Datenbank (*Basic Local Alignment Search*) konnte eine Homologie mit der Cyclopropan-Fettsäure-Synthase (Cfa) aus *E. coli* mit einer Aminosäureidentität von 41 % ausfindig gemacht werden (Caliskan *et al.*, 2023). Dieses Enzym ist verantwortlich für die Katalyse von *cis*-ungesättigten Fettsäuren zu Cyclopropan-Fettsäuren in eingebetteten Phospholipiden (Abbildung 3.14) (Zhang & Rock, 2008).

3.4.4.1 Die Phospholipidzusammensetzung unterscheidet sich in *P. aeruginosa* WT und Δ plaF

In dem vorherigen Kapitel wurden die Proteine PlsX und Cfa neben zahlreichen putativen Dehydrogenasen des Lipid Metabolismus im Rahmen der Proteomstudie hoch abundant identifiziert. Aus diesem Grund wurde in diesem Abschnitt die Frage adressiert, ob die Deletion von *plaF* in *P. aeruginosa* zu einer veränderten Membranlipidhomöostase führt. Hierzu wurde mithilfe der quantitativen Lipidom-Analyse mittels Massenspektrometrie (Q-TOF-MS/MS) die Phospholipidzusammensetzung aus *P. aeruginosa* WT und Δ plaF untersucht und die Phospholipid-Profile miteinander verglichen. Für die Analyse wurden beide Stämme mit jeweils 4 biologischen Replikaten über Nacht für 16 h kultiviert und die Proben, wie in Kapitel 2.11.10 beschrieben, vorbereitet.

Für die Auswertung wurden zunächst die ermittelten Werte auf die Masse der extrahierten Phospholipide normiert. Für die Statistik wurden anschließend die ermittelten Messwerte auf Normalverteilung mithilfe der Shapiro-Wilk-Methode ($p > 0,05$) und auf Signifikanzunterschiede mithilfe des Studententests ($p < 0,05$) getestet. Nur Phospholipid-Spezies, die eine Normalverteilung und einen signifikanten Unterschied aufwiesen, wurden für die Auswertung berücksichtigt und in Abbildung 3.15 dargestellt. Dabei wurden die Fettsäureacylketten der Phospholipid-Spezies in Form von XX:Y dargestellt, wobei XX die Anzahl der Kohlenstoffatome und Y die Anzahl der Doppelbindungen widerspiegeln. Die Analyse zeigte, dass vor allem Spezies von Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG) sowie Phosphatidylcholin (PC), welche die Hauptkomponenten von *P. aeruginosa* Membranen bilden (Sohlenkamp & Geiger, 2016), signifikant unterschiedlich in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ waren (Abbildung 3.15). Phospholipid-Spezies, wie beispielsweise PE 35:1 (178 nmol/mg), PG 35:1 (43 nmol/mg) oder PE 36:2 (53 nmol/mg) waren hoch abundant in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ (Abbildung 3.15, blauer Hintergrund). Im Gegensatz dazu wiesen die Phospholipid-Spezies PE 34:2 (52 nmol/mg), PE 32:1 (13 nmol/mg) und PE 36:4 (5 nmol/mg) eine hohe Abundanz in *P. aeruginosa* WT auf (Abbildung 3.15, gelber Hintergrund). Zusammengefasst ist aus der Lipidomstudie ersichtlich, dass mehrere Phospholipid-Spezies signifikant unterschiedlich waren. Insbesondere Phospholipid-Spezies, welche in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ hoch abundant waren, könnten als putative PlaF-Substrate in Erwägung gezogen werden. Das würde bedeuten, dass diese Lipide bei Fehlen von PlaF nicht im nativen Maße hydrolysiert werden.

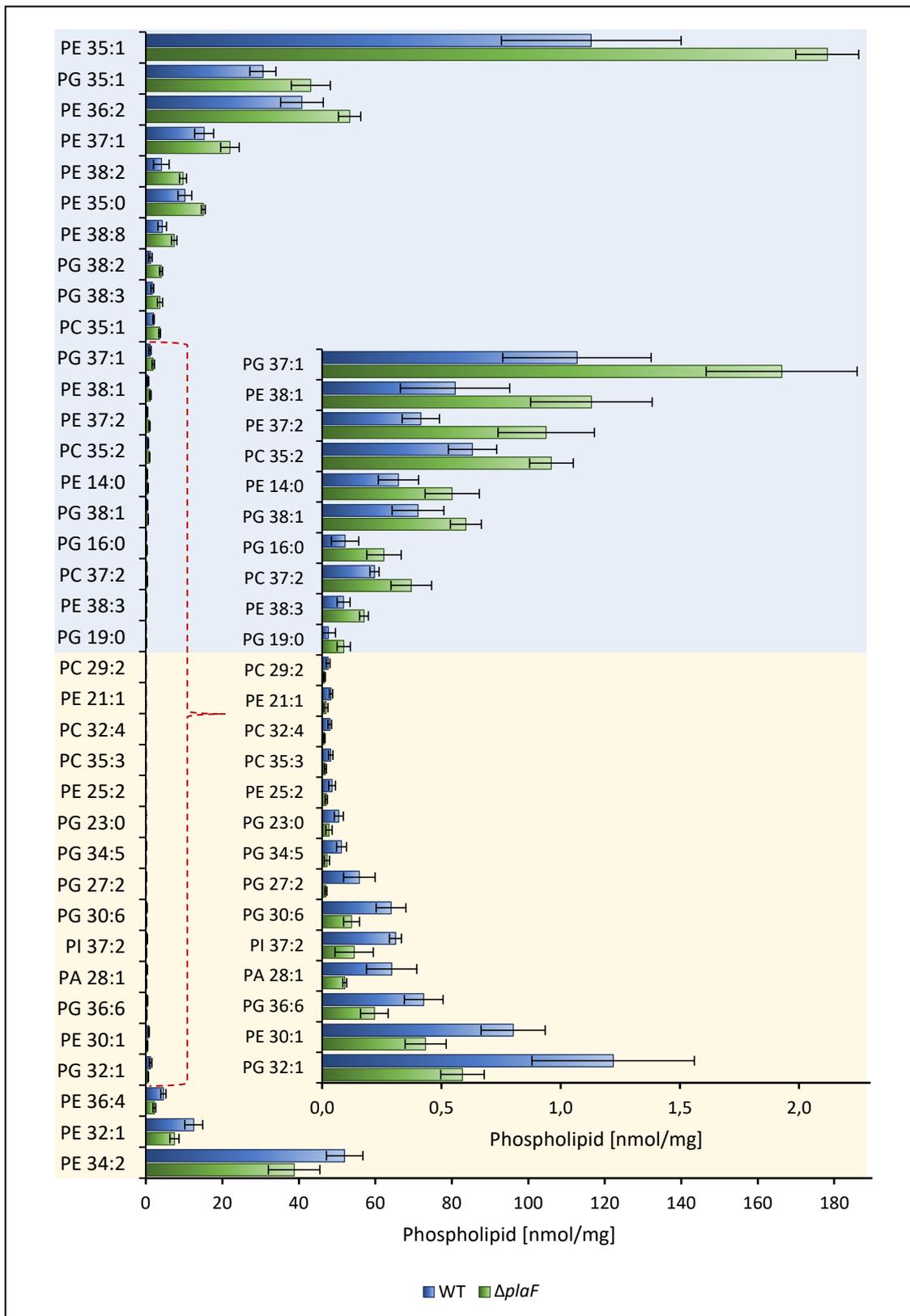


Abbildung 3.15: Die Zusammensetzung der Phospholipide unterscheiden sich in *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$. Dargestellt sind die normalisierten Anteile der Phospholipid-Spezies, die in signifikant unterschiedlicher Menge ($p < 0,05$) zwischen den Extrakten von *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$ detektiert wurden. Die Messungen sowie die Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. P. Dörmann und Dr. M. Siebers aus dem Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn durchgeführt. Identifiziert wurden die Glycerophospholipid-Klassen Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylcholin (PC) sowie Phosphatidsäure (PA) und Phosphatidylinositol (PI). Die gemessenen Werte wurden auf die Masse (in mg)

der extrahierten Phospholipide normiert. Die Fettsäure-Nomenklatur der Phospholipide wird als XX:Y dargestellt, wobei XX die Anzahl der Kohlenstoffatome und Y die Anzahl der Doppelbindungen innerhalb der Fettsäurekette angeben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. Das kleinere Balkendiagramm der Abbildung ist eine Vergrößerung des markierten Bereichs (rote gestrichelte Linie).

3.4.5 Die Eisen-Homöostase ist stark beeinflusst

Im Rahmen der Proteomstudie wurden insgesamt 25 Proteine, die über verschiedene Eisen-Homöostase-Netzwerke die Eisenaufnahme regulieren, als hoch bzw. niedrig abundant identifiziert. Darunter waren nahezu alle Proteine, die am Pyoverdin-System beteiligt sind, niedrig abundant (Abbildung 3.16 A). Fünf zytoplasmatische Proteine (PvdA: 1,8-fach, PvdD: 1,5-fach, PvdF: 2,1-fach, PvdH: 1,6-fach, PvdI: 1,4-fach), die für die Synthese von Ferribactin, einer Vorstufe von Pyoverdin, sowie alle periplasmatischen Proteine (PvdM: 3,3-fach, PvdN: 4,0-fach, PvdO: 2,7-fach, PvdP: 2,8-fach, PvdQ: 2,4-fach, PtaA: 3,2-fach), die an der Reifung von Ferribactin zu Pyoverdin beteiligt sind, waren in *P. aeruginosa* Δ *plaF* niedrig abundant. Zudem waren auch Proteine, die den Transport von Ferribactin (PvdE: 1,9-fach) bzw. Pyoverdin (PvdR: 3,1-fach, PvdT: 6,1-fach) vermitteln, niedrig abundant. Dazu passend waren auch FpvA (1,9-fach), ein Rezeptor des Pyoverdin-Eisen-Komplexes (Pvd:Fe³⁺) der äußeren Membran, TonB1 (1,4-fach), ein membranverankertes Protein, das die Energie an FpvA für den aktiven Transport von Pvd:Fe³⁺-Komplex liefert, und FpvF (2,3-fach) sowie FpvC (1,4-fach), zwei Proteine, die das Eisen von Pvd:Fe³⁺-Komplexen reduzieren, in *P. aeruginosa* Δ *plaF* niedrig abundant. Nur einzelne Komponenten des Pyoverdin-Systems wie die Ferribactin-Biosynthese-Proteine (PvdLG), der Pyoverdinexporter der äußeren Membran (OpmQ) sowie zwei Komponenten des zytoplasmatischen Eisentransporter (FpvDE) wurden in der Proteomanalyse nicht identifiziert (Abbildung 3.16 A).

Einige Proteine, welche die Eisenaufnahme unabhängig vom Pyoverdin-System regulieren, wurden im Gegensatz dazu in *P. aeruginosa* Δ *plaF* als hoch abundant identifiziert (Abbildung 3.16 A). Die Proteine PchA (1,5-fach) und PchC (2,4-fach) sind Bestandteile des Pyochelin-Systems und synthetisieren das zweite *P. aeruginosa*-Siderophor Pyochelin, wobei PchA maßgebend für die Synthese der Pyochelin-Vorstufe Salicylat ist (Patel & Walsh, 2001). Mit Ausnahme von PhzS (1,5-fach), einer Komponente des Phenazin-Biosynthesewegs, waren ebenfalls Proteine des Feo-Systems wie der Eisen-Ionen-Transporter FeoB (2,3-fach), die Anthranilat-Synthase-Komponente I PhnA (1,6-fach) und MvfR (1,5-fach), ein Transkriptionsfaktor der die Genexpression von *phnAB* reguliert, in *P. aeruginosa* Δ *plaF* hoch abundant (Cao *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2011, Cornelis & Dingemans, 2013). Der membranverankerte MgtA-Transporter (2,2-fach) des Citrat-Systems wurde in *P. aeruginosa* Δ *plaF* als hoch abundant identifiziert (Abbildung 3.16 A).

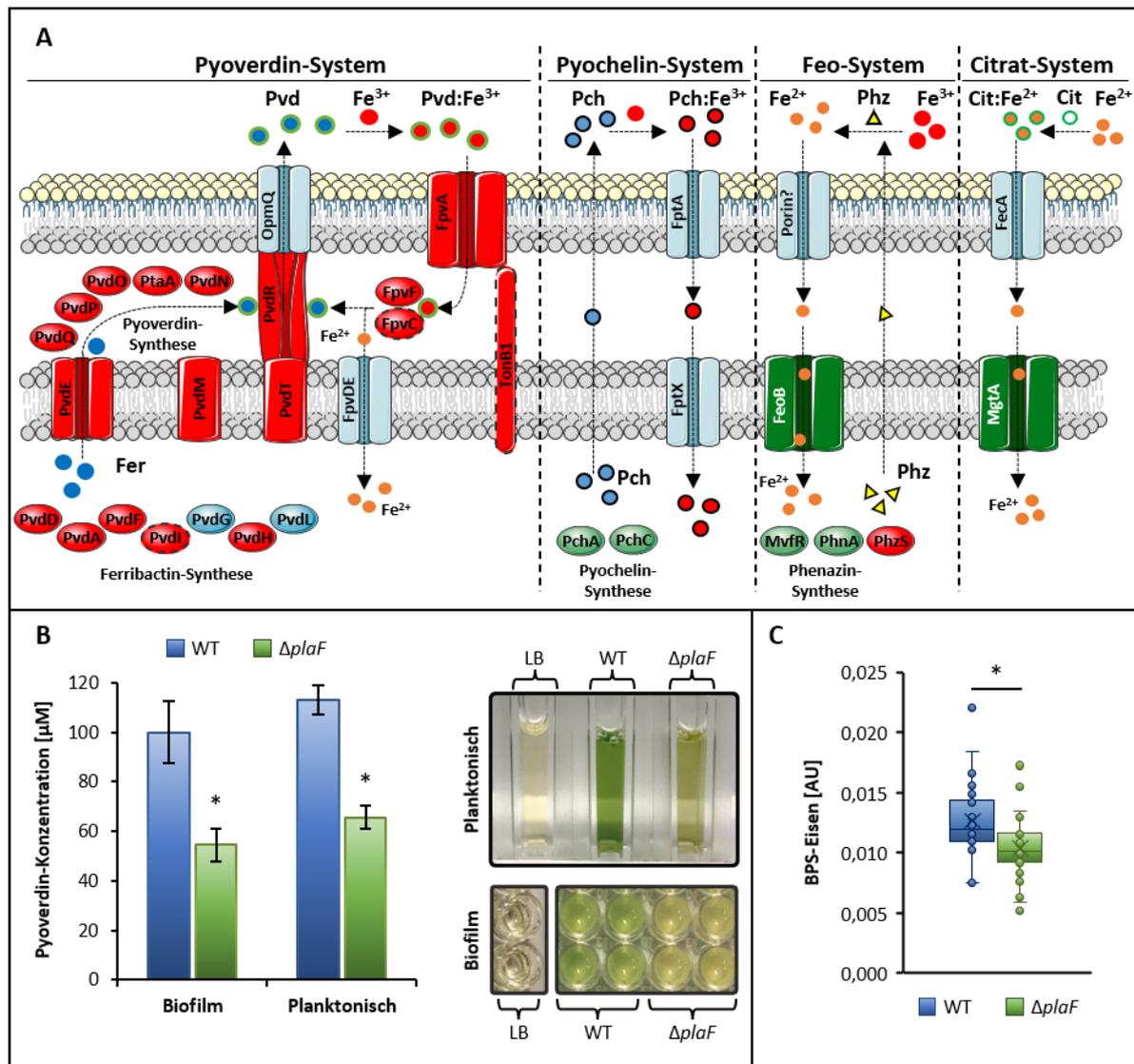


Abbildung 3.16: Die Eisen-Homöostase-Netzwerke sind in *P. aeruginosa* ΔplaF beeinflusst.

A: Proteine des Pyoverdin-, Pyochelin-, Feo- sowie Citrat-Systems sind niedrig (rot) bzw. hoch (grün) abundant in *P. aeruginosa* ΔplaF . Proteine mit hellblauer Füllung wurden in der Proteomstudie nicht identifiziert. Das Pyoverdin-System umfasst folgende Abschnitte: i) die zytoplasmatische Biosynthese der Pyoverdin-Vorstufe Ferribactin durch die Proteine PvdADFGHIL, ii) die periplasmatische Reifung des Pyoverdins durch PtaA und PvdEMNOQ sowie der Export des reifen Pyoverdins durch den PvdRT-OpmQ-Komplex, iii) der Import des Pvd-Eisen-Komplexes durch die Proteine FpvADEGHJKR sowie TonB1 und ExbBD, iv) die Reduktion des Eisens durch die Proteine FpvCF und anschließendem Pyoverdin-Export durch den PvdRT-OpmQ-Komplex. Die Proteine TonB1, PvdI und FpvC fielen unter den Schwellenwert und weisen eine 1,4-fache Änderung mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ auf. Das Pyochelin-System bzw. Citrat-System umfassen die Schritte der Produktion von Pyochelin bzw. Citrat (i), Komplexbildung mit Eisen als Ligand (ii), Import durch die Proteine FptA bzw. FecA sowie der Proteine FptX bzw. MgtA. Beim Feo-System werden Eisen-III-Ionen durch extrazelluläre Phenazine zu löslichem Eisen-II reduziert und der Import durch die Proteine FeoABC gewährleistet. **B:** *P. aeruginosa* ΔplaF produziert weniger Pyoverdin im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT. Für die Bestimmung der Pyoverdinmenge in zellfreien Überständen wurden *P. aeruginosa*-Zellen in einer 96-MTP (Biofilm, statisch) sowie Erlenmeyerkolben (planktonisch) bei 37°C für 24 h kultiviert. Die Sternchen markieren die Signifikanz zum WT mit einem $p < 0,0005$. **C:** *P. aeruginosa* ΔplaF weist eine geringere intrazelluläre Eisenmenge auf. Für die Bestimmung wurden jeweils 5×10^9 *P. aeruginosa*-Zellen aus einer Übernachtskultur geerntet und in $400 \mu\text{l}$ Salpetersäure (3 %) für 18 h bei 98°C inkubiert. Jeweils $300 \mu\text{l}$ der aufgeschlossenen Zellen wurden mit $94,5 \mu\text{l}$ Ammoniumacetat-Lösung, $120 \mu\text{l}$ Natriumascorbat und $240 \mu\text{l}$ BPS (*Bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt trihydrate*) gemischt. Für quantitative Messung des BPS-Eisen-Komplexes wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 535 nm bestimmt und auf die Proteinkonzentration des Zellysats normiert. Das Sternchen markiert die Signifikanz mit

einem $p < 0,0005$. Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0). Modifiziert nach Caliskan *et al.* (2023).

Aufgrund der ermittelten Proteomauswertung wurde nachfolgend untersucht, ob die Deletion von *plaF*, auf physiologischer Ebene, Auswirkungen auf die Pyoverdininproduktion aufweist. Zu diesem Zweck wurden zellfreie Überstände aus planktonisch und aus statisch wachsenden *Pseudomonas*-Kulturen hergestellt und die Stoffmengenkonzentration des Pyoverdins mittels Absorptionsmessung ermittelt. Der zellfreie Überstand von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ unter Biofilmbedingung wies eine Pyoverdinkonzentration von etwa $55 \mu\text{M}$ auf, wohingegen für *P. aeruginosa* WT eine Konzentration von etwa $100 \mu\text{M}$ ermittelt wurde (Abbildung 3.16 B). Gleichfalls zeigte *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine um mehr als 40 % geringere Pyoverdinkonzentration in Kulturüberständen unter planktonischer Bedingung im Vergleich zum parentalen *P. aeruginosa* WT-Stamm. Zudem zeigte *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine signifikant geringere intrazelluläre Eisenmenge im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT (Abbildung 3.16 C).

- ➔ Das Proteom von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ unter Biofilmbedingungen war signifikant unterschiedlich im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT.
- ➔ Es wurden insgesamt 367 Proteine, die eine mindestens 1,5-fache Änderung im Vergleich zueinander (WT/ $\Delta plaF$ und $\Delta plaF$ /WT), mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ identifiziert.
- ➔ Signalübertragungssysteme (Zweikomponentensysteme, c-di-GMPs, chemosensorische Systeme) waren in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ beeinflusst.
- ➔ Das Zweikomponentensystem PprAB war in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ hoch abundant.
- ➔ Die Lipidomstudie zeigte deutliche Unterschiede in der Membranlipidzusammensetzung zwischen *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$.
- ➔ ABC-Transporter waren in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ hoch bzw. niedrig abundant.
- ➔ Die Pyoverdin-abhängige Eisenakkumulation war in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ stark beeinträchtigt.
- ➔ *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ produzierte deutlich weniger Pyoverdin im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT.

3.5 Das TOXGREEN-System zur Analyse von Transmembran-Dimerisierung

PlaF verursacht vermutlich indirekt pleiotrope Effekte in *P. aeruginosa* (Caliskan *et al.*, 2023). Bekanntermaßen bildet PlaF ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomer- und Dimerpopulationen, wobei die monomere Form als katalytisch aktive Variante vermutet wird. Derzeit wird eine Liganden-vermittelte Dimerisierung von PlaF als mögliche Regulation vorgeschlagen (Bleffert *et al.*, 2022). Allerdings ist der molekulare Mechanismus der Dimerisierung nicht näher charakterisiert, weshalb es essenziell ist, sich einen Überblick über die Rolle von PlaF zu verschaffen und die Dimerisierung zu verstehen sowie verfolgen zu können. Dafür wurde in dieser Arbeit die Etablierung eines *in vivo* Systems zur Untersuchung der Transmembran-Helix-Helix-Dimerisierung von PlaF in einer bakteriellen Membranumgebung im *E. coli*-Modellsystem vorangetrieben. Dadurch sollte ermöglicht werden, die Dimerisierung von PlaF durch ortsgerechter Mutationsanalyse zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde das etablierte TOXGREEN-System (Armstrong & Senes, 2016) genutzt und entsprechend für die Analyse des PlaF-Volllängenproteins angepasst. Das TOXGREEN-System ist eine modifizierte Methode des TOXCAT-Systems. Hierbei kommt das *super folder* Grün-fluoreszierende Protein (*sfGFP*) anstelle der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als Reporter zum Einsatz (Russ & Engelman, 1999, Armstrong & Senes, 2016). Das Prinzip beider Systeme beruht auf dem membranverankerten Transkriptionsaktivator ToxR aus dem Humanpathogen *Vibrio cholerae*. Infolge externer Stimuli im Periplasma dimerisieren zwei ToxR-Proteine. Durch die räumliche Annäherung der zytoplasmatischen DNA-bindenden Domänen von ToxR, bindet der Komplex mit hoher Affinität an das repetitive DNA-Element (TTTTGAT)_n des spezifischen *ctx*-Promotors, der die Transkription des *ctxAB*-Operons reguliert (Kolmar *et al.*, 1995). Diese spezifische Genregulation in *V. cholerae* wird sich bei der Anwendung des TOXGREEN-Systems zu Nutze gemacht, in dem der spezifische *ctx*-Promotor aus *V. cholerae* in Kombination mit der DNA-bindenden ToxR-Domäne, die genetisch an ein Zielprotein fusioniert ist, verwendet werden. Im ursprünglichen System wird ToxR mit einer variablen Transmembrandomäne (TMD) und dem Maltosebindepotein (MBP) als chimäres Protein gebildet (Abbildung 3.17 A). Dabei fungiert das MBP als eine zusätzliche Kontrolle für die richtige Orientierung in der Zytoplasmamembran der gebildeten ToxR-Fusionskonstrukte. In der graphischen Darstellung wird die Transmembrandomäne von Glykophorin A (GpA) im ToxR-GpA-MBP Fusionsprotein verwendet, welches aufgrund des vorhandenen ⁷⁹GxxxG⁸³-Dimerisierungsmotivs als Positivkontrolle dient (Abbildung 3.17 A). So führt eine Dimerisierung von zwei GpA-TMDs zur Aktivierung der DNA-bindenden ToxR-Domänen, welche infolgedessen die Genexpression des Reportergens *sfGFP* unter der Kontrolle des *ctx*-Promotors initiieren. Das daraus resultierende *super folder* Grün-fluoreszierende Protein (*sfGFP*) wird dann mithilfe eines

Fluoreszenzspektrometers gemessen und die ermittelte Quantität als Indikator für die Transmembran-Helix-Helix-Dimerisierung betrachtet (Armstrong & Senes, 2016).

Für die Untersuchung von PlaF wurde anstelle der variablen Transmembrandomäne das PlaF-Volllängenprotein an die DNA-bindende ToxR-Domäne fusioniert (Abbildung 3.17 B). Da die Topologie von PlaF so ausgerichtet ist, dass die katalytische Domäne von PlaF zum Periplasma exponiert vorliegt (Bleffert *et al.*, 2022), wurde auf die Fusion an das MBP verzichtet (Abbildung 3.17 B). Die Bildung des ToxR-PlaF-Fusionskonstruktes wurde durch hydrolytische Aktivitätsmessungen (Kapitel 2.11.6) sowie durch Westernblotanalysen (Kapitel 2.11.5) untersucht.

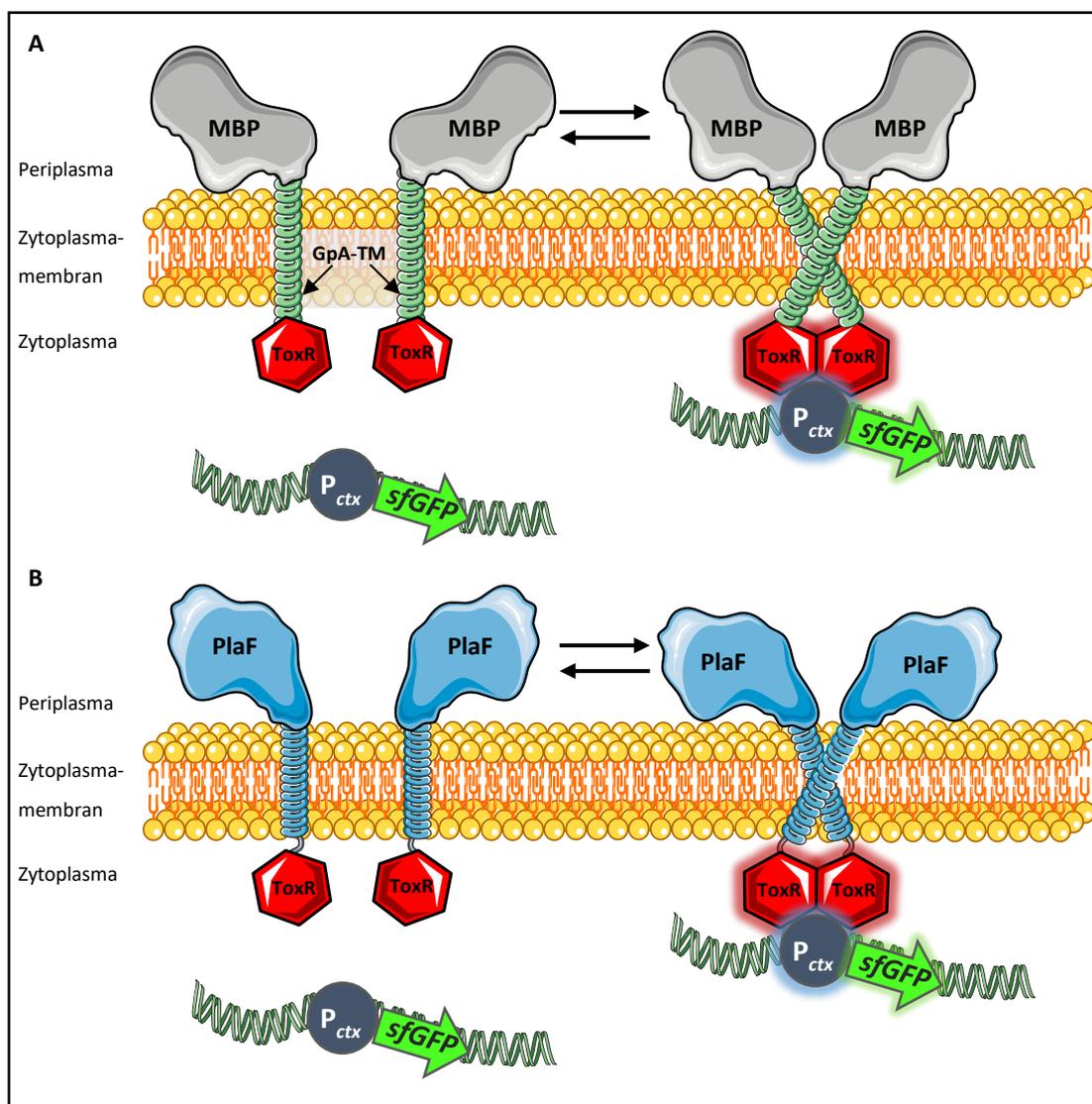


Abbildung 3.17: Das PlaF-basierte TOXGREEN-System als schematische Übersicht dargestellt.

A: Schematische Darstellung des TOXGREEN-Systems. Die zu untersuchende Transmembrandomäne (TMD) wird als ein chimäres ToxR-TMD-MBP Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-bindenden Domäne ToxR (rot) aus *Vibrio cholerae*, der Transmembrandomäne von Glykophorin A (grün) sowie des periplasmatischen Maltosebindeproteins (grau), produziert und in die Zytoplasmamembran von *E. coli* eingebaut (Armstrong &

Senes, 2016). Eine Dimerisierung der GpA-TMD in der Zytoplasmamembran führt zugleich zu einer räumlichen Annäherung der zytoplasmatischen ToxR-Domänen, die infolgedessen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors ToxR führt und die Genexpression des ausgewählten Reportergens *sfGFP* (*super folder Green Fluorescent Protein*) aktiviert. **B:** Schematische Darstellung des PlaF-basierten TOXGREEN-Systems. Im Unterschied zu dem in Abbildung A dargestellten System besteht das chimäre Protein aus zwei Komponenten. Hierbei wird der Transkriptionsfaktor ToxR in Fusion mit dem Volllängenprotein PlaF in *E. coli* produziert und die *sfGFP*-Produktion durch die PlaF-vermittelte Dimerisierung beobachtet und dokumentiert. Die Abbildung wurde mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“ lizenziert (CC BY 3.0).

3.5.1 Modifikation und Aufbau des PlaF-basierten TOXGREEN-Systems

Um zu testen, ob das TOXGREEN-System für die Analyse der Transmembran-Helix-Helix-Dimerisierung von PlaF verwendet werden kann, wurde zunächst die kodierende *plaF*-Zielsequenz über einen flexiblen *Linker*, kodierend für die Aminosäuresequenz (GGSG)₃, an das 3'-Ende von *toxR* über die Endonukleaseschnittstellen *NheI* und *SacI* fusioniert. Dabei steht die Genexpression des *toxR-plaF*-Fusionskonstruktes unter der Kontrolle des nativen *toxR*-Promotors, welcher im Bereich von 262 Basenpaaren stromaufwärts vom *toxR* Start-Codon ATG liegt. Für den immunhistologischen Nachweis enthält das ToxR-PlaF-Fusionsprotein zudem ein sechsfaches Histidin-Epitop, nachfolgend dann als PlaF* benannt.

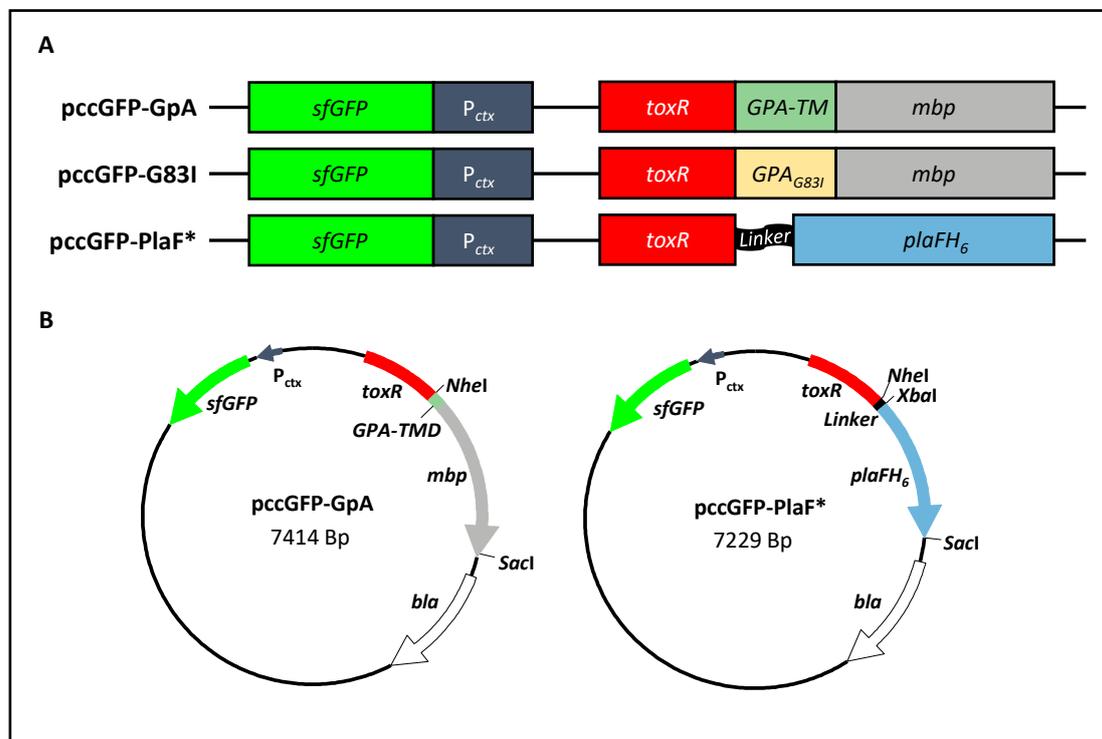


Abbildung 3.18: Aufbau und Klonierung des PlaF-basierten TOXGREEN-Systems.

A: Schematische Übersicht der TOXGREEN-Konstrukte. **B:** Die *plaF*-Zielsequenz wurde mit den Oligonukleotiden MC_*NheI*_PlaF_fw (vorwärts) und MC_*SacI*_PlaF_rv (rückwärts), welche die Endonukleaseschnittstellen *NheI* und *SacI* an den flankierenden Regionen enthalten, aus dem pBBR-*pa2949* Vektor amplifiziert (Kovacic *et al.*, 2016). Die Generierung des pccGFP-PlaF Vektors erfolgte mittels *in vitro* Rekombination. Dazu wurde pccGFP-

GpA entsprechend mit den Endonukleasen *NheI* und *SacI* linearisiert und das Vektorrückgrat verwendet. Somit enthält pccGFP-PlaF* das Fusionskonstrukt *toxR-Linker-plaF* (rot-schwarz-blau), die β -Lactamase (weiß) und das modifizierte *super folder* Grün-fluoreszierende Protein (grün) unter der Kontrolle des Promotors P_{ctx} (dunkelblau) aus *V. cholerae*. Zur einfachen Klonierung bzw. dem Austausch von *plaF* wurde zusätzlich anstelle des Startcodons ATG der *plaF*-Sequenz die Endonukleaseschnittstelle *XbaI* eingebaut.

3.5.2 ToxR-PlaF-Fusionskonstrukt (PlaF*) wird exprimiert und dimerisiert *in vivo*

Für die Durchführung des TOXGREEN-Systems wurden *E. coli ArcticExpress*-Zellen als Expressionswirt gewählt. Diese tragen Plasmide, welche die Gensequenzen *cpn10* und *cpn60* aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica* enthalten und für Chaperone kodieren und somit die Faltung von rekombinanten Proteinen unterstützen. So wurden zuerst *E. coli ArcticExpress*-Zellen mit den Vektoren pccGFP-GpA (Positivkontrolle), pccGFP-G83I (Negativkontrolle), pccGFP-KAN (Hintergrundfluoreszenz-kontrolle) und pccGFP-PlaF* transformiert. Dabei enthält das Konstrukt G83I eine Punktmutation an der Position 83 der GpA-Transmembrandomäne, bei welcher das Glycin des $^{79}\text{GxxxG}^{83}$ -Motivs gegen ein Isoleucin substituiert wurde. Dieser Austausch bewirkt, dass das Glykophorin-Fusionskonstrukt vorwiegend als Monomer vorliegt, was folglich die Bildung des sfGFP-Reporters hemmt (Armstrong & Senes, 2016). Das Plasmid pccGFP-KAN enthält zwar das *toxR*-Gen, jedoch keine Transmembrandomäne und stellt die Kontrolle dar (Armstrong & Senes, 2016). Für die Hauptkultur wurden die Zellen auf eine initiale $\text{OD}_{580\text{nm}}$ 0,05 inokuliert und für sieben Stunden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{580\text{nm}}$ 0,4-0,6) kultiviert. Zum Nachweis der enzymatischen Esteraseaktivität (Kapitel 2.11.6) wurden Proben entnommen und die Zellen mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{580\text{nm}}$ 10 in Tris-HCl-Puffer mittels Ultraschalls lysiert.

PlaF* zeigte als einziger der getesteten Stämme Esteraseaktivität, was bedeutet, dass PlaF* gebildet wurde und funktional ist. (Abbildung 3.19 A, blau). Die Kontrollstämmen *E. coli ArcticExpress* pccGFP-GpA (grün), -G83I (gelb) sowie -KAN (grau) zeigten keinen signifikanten Anstieg der Absorptionsmesspunkte, was bedeutet, dass die Kontrollstämmen keine hydrolytische Aktivität aufwiesen (Abbildung 3.19 A). Für die Analyse des TOXGREEN-Systems wurden jeweils 100 μl der Zellsuspension in eine Vertiefung einer 96-MTP überführt und die Fluoreszenz (Anregung: 485 nm; Emission: 512 nm) im Tecan M1000Pro untersucht.

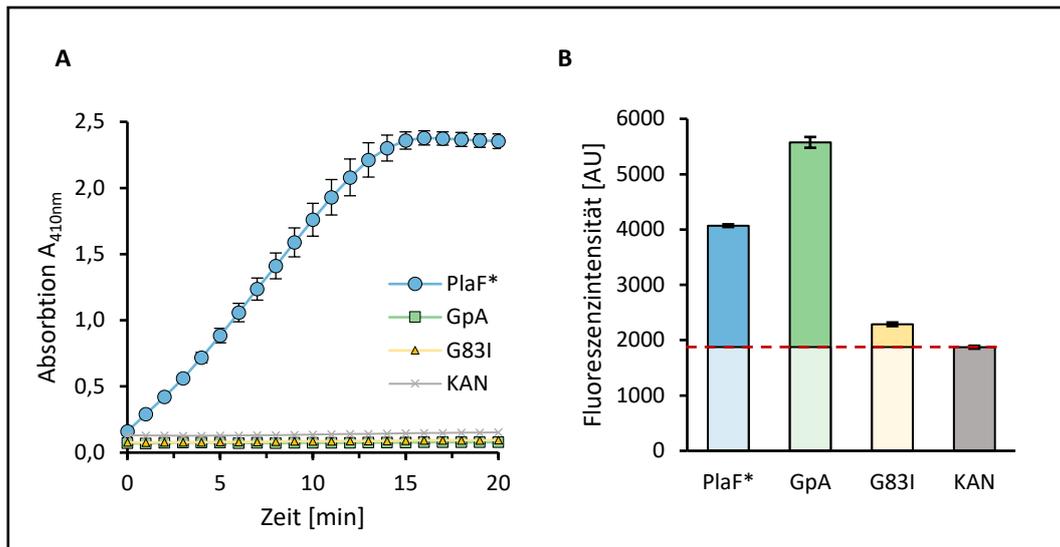


Abbildung 3.19: PlaF* ist funktional und dimerisiert im TOXGREEN-System.

Die Genexpression von *plaF** wurde in *E. coli ArcticExpress*-Zellen während der logarithmischen Wachstumsphase nach einer Inkubationszeit von sieben Stunden untersucht. **A:** Nachweis der hydrolytischen Esteraseaktivität von PlaF* mit dem Substrat *p*NPB. Es wurden jeweils 5 μ l des Zelllysats (OD_{580nm} 10) mit 95 μ l *p*NPB-Substratlösung gemischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm gegen die Zeit in Minuten dokumentiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus einer technischen Dreifachbestimmung ermittelt. **B:** Fluoreszenzmessungen (Anregung: 485 nm; Emission: 512 nm) des *sfGFP*s im TOXGREEN-System. Die Fluoreszenzintensitäten wurden durch Normierung der Fluoreszenzemission bei 512 nm auf die optische Zelldichte der Probe bei 580 nm berechnet. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden *E. coli ArcticExpress*-*pccGFP*-GpA bzw. -*pccGFP*-G83I unter gleichen Bedingungen untersucht. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit *E. coli ArcticExpress*-*pccGFP*-KAN-Zellen gemessen (rote gestrichelte Linie). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus einer technischen Dreifachbestimmung bestimmt.

Die Abbildung 3.19 B zeigt die normierten Fluoreszenzintensitäten der TOXGREEN-exprimierenden *E. coli ArcticExpress*-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{580nm} 0,4-0,6). Die Positivkontrolle GpA wies eine Fluoreszenz von etwa 5575 AU auf, wohingegen die Negativkontrolle G83I nur eine Fluoreszenz von etwa 2287 AU umfasste. In Relation entspricht der ermittelte G83I-Wert ≈ 11 % der Positivkontrolle (nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz), was im Einklang mit den Werten aus der Literatur steht (Armstrong & Senes, 2016). Die Kontrolle KAN, welche die Hintergrundfluoreszenz im TOXGREEN-System repräsentiert, zeigte eine Fluoreszenz von etwa 1873 AU. Für PlaF* wurde, wie vermutet, eine Fluoreszenz von etwa 4070 AU gemessen. Die Aktivierung der Expression des Reportergens *sfGFP* zeigt die Funktionalität dieses neuartigen Systems und zeigt erstmals *in vivo* die Dimerisierung von PlaF* (Abbildung 3.19 B). So lässt sich aus diesem Experiment schließen, dass das TOXGREEN-System hervorragend geeignet ist, um die Dimerisierung von PlaF* *in vivo* zu analysieren und für weitere Experimente zu verwenden. Deshalb wird im Folgenden das PlaF-basierte TOXGREEN-System eingesetzt, um die Auswirkung der in PlaF* eingeführten Mutationen auf die Dimerisierung zu analysieren.

3.5.3 Konstruktion von PlaF*-Varianten zur Untersuchung der Dimerisierung

In der Veröffentlichung von Bleffert *et al.* (2022) wurden die hydrophoben Wechselwirkungen in den Transmembran-Juxtamembran-Domänen von zwei PlaF-Molekülen (PlaF_A und PlaF_B) analysiert. Die α -Helices dieser Moleküle wiesen putative Interaktionsschnittstellen der Aminosäurereste zwischen PlaF_A und PlaF_B auf, wobei spezifische Wechselwirkungen zwischen L8-V9, L12-V9, L12-L10, V14-F21, V14-T25, G17-F21, F21-V22, F21-T25, V22-F21, S29-S29 und S29-T32 (erste Aminosäure jeweils zugehörig zu PlaF_A und zweite Aminosäure zu PlaF_B) identifiziert wurden (siehe auch Kapitel 1.6.4, Abbildung 1.7) (Bleffert *et al.*, 2022). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden verschiedene PlaF-Varianten L8A, V9A, L10A, L12A, G17A, V18A, F21A, V22A, P23A, T25A, S29A und T32A (Tabelle 2.5, Tabelle 2.6) konstruiert, um den Einfluss der jeweiligen Positionen auf die Dimerisierung zu untersuchen. Die Substitutionen gegen die schwach hydrophobe Aminosäure Alanin wurde gewählt, um die Seitenkettenwechselwirkungen zwischen den Interaktionsschnittstellen zu eliminieren ohne die Konformation der α -Helix zu verändern oder sterische Effekte einzuführen.

Die zielgerichtete Substitution von Nukleotiden erfolgte mithilfe des *In-Fusion HD Cloning Kits* (Kapitel 2.10.5). Für die PCR wurde das Plasmid pccGFP-PlaF* als Vektorrückgrat verwendet. Nachdem die generierten Plasmide mittels Sequenzierung validiert wurden, erfolgte die Transformation von *E. coli ArcticExpress*-Zellen mit den Plasmiden pccGFP-GpA, pccGFP-G83I, pccGFP-KAN, pccGFP-PlaF* sowie mit den entsprechenden Varianten aus Tabelle 2.5.

Für die TOXGREEN-Analyse wurden die Hauptkulturen auf eine Start-OD_{580nm} 0,05 in M9-Minimalmedium inokuliert und für sieben Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{580nm} 0,4-0,6) kultiviert. Für die Untersuchung wurden Proben für die Fluoreszenzmessung (Kapitel 2.11.13), enzymatische Aktivitätsmessung (Kapitel 2.11.6) sowie Proben für den Nachweis mittels Westernblot (Kapitel 2.11.5) entnommen. Die verschiedenen PlaF-Fusionsvarianten können im TOXGREEN-System nur miteinander verglichen werden, wenn diese im experimentellen Ansatz ein nahezu gleiches Expressionsniveau aufweisen. Aus diesem Grund wurden die Proteine der entnommenen Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.11.1) nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend im Westernblot (Kapitel 2.11.5) analysiert (Abbildung 3.20 A). Hier wurden für viele PlaF-Varianten ähnlich intensive Signale auf einer Migrationshöhe von etwa 60 kDa detektiert, was dem erwarteten theoretischen Molekulargewicht des Fusionsproteins von etwa 57 kDa entspricht. Die Varianten V18A und P23A zeigten sehr schwache bis schwache Signale. Dagegen wiesen die

Varianten F21 und T25 sehr intensive Proteinsignale auf. Für die Variante L8A wurde eine Proteinbande auf einer Höhe von etwa 70 kDa festgestellt (Abbildung 3.20 A).

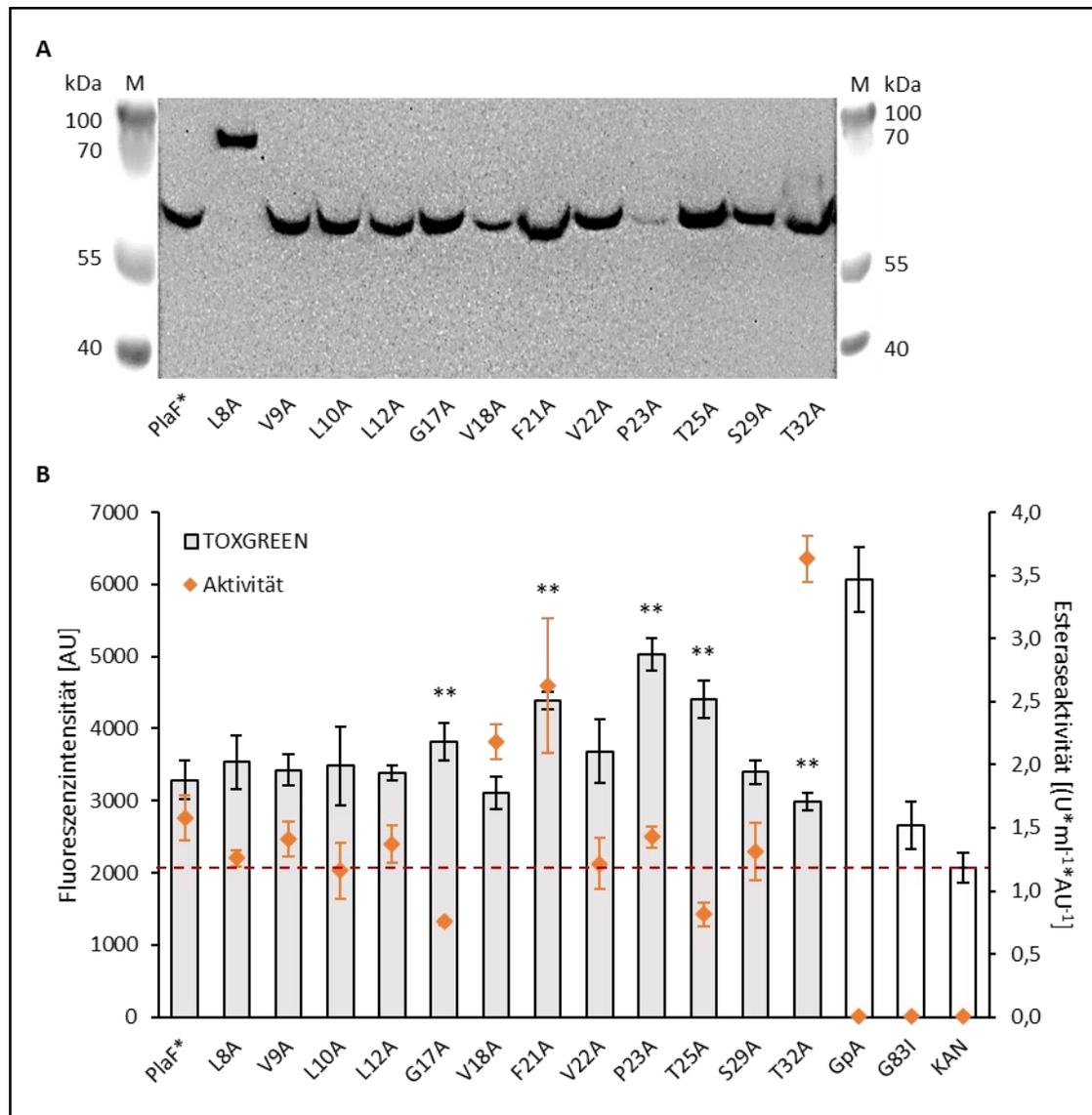


Abbildung 3.20: PlaF-Varianten mit Einzelmutationen im TOXGREEN-System.

A: Nachweis der ToxR-PlaF-Fusionsvarianten mittels Westernblot unter der Verwendung des Antikörpers „anti-His(C-term)-HRP Konjugat“. Für die Analyse wurden 10 μ l des Zelllysats (OD_{580nm} 10) eingesetzt. Der Proteingrößenstandard (M) ist auf der linken und rechten Seite dargestellt. Das theoretische MW der PlaF-Fusionskonstrukten liegt bei \approx 57 kDa. **B:** Fluoreszenzmessungen (Anregung: 485 nm; Emission: 512 nm) des sfGFPs und Esteraseaktivitäten im TOXGREEN-System. Die Fluoreszenzintensitäten AU wurden durch Normierung der Fluoreszenzemission bei 512 nm auf die optische Zelldichte der Probe bei 580 nm berechnet. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden *E. coli ArcticExpress-pccGFP-GpA* bzw. *-pccGFP-G831* unter gleichen Bedingungen untersucht. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit *E. coli ArcticExpress-pccGFP-KAN*-Zellen gemessen (rote gestrichelte Linie). Der Nachweis der hydrolytischen Esteraseaktivität der PlaF-Fusionskonstrukte wurde unter Verwendung des Substrats *pNPB* durchgeführt. Die ermittelten Aktivitäten (U/ml) wurden auf die detektierte Proteinmenge (AU) im Westernblot (mithilfe des Programms *ImageJ*) normiert. Die vertikale Primärachse (links) stellt die Skala der ermittelten Fluoreszenzwerte (Säulendiagramm) dar. Die vertikale Sekundärachse (rechts) stellt die Skala der ermittelten Esteraseaktivitäten (kleine Rauten) dar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten mit jeweils einer technischen Zweifachbestimmung ermittelt. Durch Anwendung des statistischen *t*-Tests wurde die Signifikanz der Fluoreszenzintensitäten zu PlaF* ermittelt, ** $p < 0,05$.

In Abbildung 3.20 B sind die Ergebnisse der ermittelten Fluoreszenzintensitäten (Säulen) sowie die Ergebnisse der enzymatischen Aktivitätsmessung (Rauten) dargestellt. Die Positivkontrolle GpA wies auch in diesem experimentellen Ansatz eine sehr hohe Fluoreszenzintensität von etwa 6064 AU auf. Die Negativkontrolle G83I hingegen umfasste nur eine Fluoreszenzintensität von etwa 2663 AU (Abbildung 3.20 B). Für PlaF* (3289 AU) sowie für die meisten Varianten wurden Fluoreszenzintensitäten >3000 AU und somit größer als der Leervektor KAN ermittelt (Schwellenwert als rote gestrichelte Linie dargestellt). Die geringste Fluoreszenzintensität wies die Variante T32A (2988 AU) auf, was in etwa der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle G83I (2663 AU) entsprach. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten zeigten die Varianten F21A (4389 AU), P23A (5026 AU) und T25A (4401 AU). Im Hinblick auf die Ergebnisse der enzymatischen Aktivitätsmessungen zeigten PlaF* und viele der Varianten (L8A, V9A, L10A, L12A, V22A, P23A, S29A) Aktivitäten im Bereich von $1,16$ - $1,58$ $U \cdot ml^{-1} \cdot AU^{-1}$. Die höchsten Aktivitäten wurden für die Varianten V18A ($2,18$ $U \cdot ml^{-1} \cdot AU^{-1}$), F21A ($2,63$ $U \cdot ml^{-1} \cdot AU^{-1}$) und T32A ($3,63$ $U \cdot ml^{-1} \cdot AU^{-1}$) gemessen, wohingegen die Varianten G17A ($0,75$ $U \cdot ml^{-1} \cdot AU^{-1}$) und T25A ($0,81$ $U \cdot ml^{-1} \cdot AU^{-1}$) die geringsten Aktivitäten aufwiesen. Die Kontrollen GpA, G83I und KAN wiesen keine Aktivität ($<0,01$ AU) auf.

Das Resultat dieser Ergebnisse lässt vermuten, dass die Variante T32A eine bedeutende Rolle für die PlaF-Dimerisierung einnimmt, da diese einerseits eine sehr hohe Esteraseaktivität und andererseits eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität im TOXGREEN-System im Vergleich zu den anderen Varianten aufwies. Im Gegensatz dazu wiesen die Varianten F21A und T25A höhere Fluoreszenzwerte im Vergleich zu PlaF* auf, während für T25A eine verminderte hydrolytische Aktivität und für F21A sogar eine gesteigerte Aktivität gemessen wurde. Ergänzend zeigte die Variante P23A ein unerwartetes Ergebnis. Hierbei wurde eine sehr hohe Fluoreszenzintensität gemessen, während die normierte enzymatische Aktivität auf dem Niveau von PlaF* blieb. Hier kann vermutet werden, dass das Prolin, welches den sogenannten „Knick“ in der α -Helix bewirkt, auch eine bedeutende Rolle in der PlaF-Dimerisierung einnimmt.

- ➔ Das TOXGREEN-System wurde für die Analyse von PlaF adaptiert.
- ➔ Das chimäre ToxR-PlaF-Fusionskonstrukt (PlaF*) wird in *E. coli* funktional gebildet.
- ➔ PlaF* dimerisiert *in vivo* im PlaF-basierten TOXGREEN-System.
- ➔ Gezielte Punktmutationen in der Transmembran-Juxtamembrandomäne von PlaF haben Einfluss auf die PlaF-Dimerisierung, wobei die Variante T32A die geringste Fluoreszenzintensität aufweist.

4 Diskussion

Das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* ist ein ernstzunehmender Krankheitserreger und zählt zu den häufigsten Verursachern von nosokomialen Infektionen. Virulenzfaktoren, die der Krankenhauskeim produziert, nehmen dabei eine wesentliche Rolle in der Pathogenität ein (Gaynes *et al.*, 2005). Darüber hinaus bildet *P. aeruginosa* vermehrt Resistenzen gegenüber Antibiotika aus, sodass die Medizin schnell an ihre Grenzen stößt, wenn es um die Behandlung einer bakteriellen Infektion geht (Hancock, 1998). Aus diesem Grund ist eine breit angelegte Grundlagenforschung zur Entwicklung neuer Therapieansätze, die beispielsweise auf Virulenzfaktoren neutralisierend wirken, ein unabdingbarer Punkt in der medizinischen Forschung (Tacconelli *et al.*, 2018).

In vorherigen Arbeiten wurde PlaF als ein Enzym mit Phospholipase A₁-Aktivität, das zur Virulenz des *P. aeruginosa*-Bakteriums beiträgt, beschrieben (Bleffert *et al.*, 2022). Durch Anwendung von biochemischen und biophysikalischen Methoden war es in den letzten Jahren gelungen die Kristallstruktur von PlaF zu lösen, den Aktivierungsmechanismus über Dimerdissoziation aufzuklären und das Substratspektrum einzugrenzen (Bleffert *et al.*, 2022). Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode bereitzustellen (Kapitel 3.5), um das Dimerisierungsverhalten *in vivo* untersuchen zu können und damit durch Mutagenese der Transmembranhelix weitere Einblicke auf molekularer Ebene in die Aktivierung des Enzyms zu erlangen. Darüber hinaus war es das Ziel, die Funktion von PlaF in physiologischem Kontext zu charakterisieren, um Einblicke in den physiologischen Einfluss des Enzyms auf die Virulenz zu erlangen. Dazu wurde zunächst der Phänotyp von *P. aeruginosa* Δ *plaF* mithilfe von Wachstums- und Biofilmanalysen (Kapitel 3.2 und Kapitel 3.3) im Vergleich zum Wildtypen untersucht. Im weiteren Verlauf wurden außerdem die Effekte der Gendeletion von *plaF* auf Proteom- (Kapitel 3.4.1) und Lipidomebene (Kapitel 3.4.4.1) quantitativ analysiert.

4.1 Das Dimerisierungsverhalten von PlaF im TOXGREEN-System

Die Bildung von spezifischen oligomeren Komplexen beispielsweise durch Homo- oder Heterodimerisierung zweier Proteine ist ein typischer Mechanismus, der die biologische Aktivität dieser Proteine reguliert (Moore *et al.*, 2008). In vorausgegangenen Arbeiten konnte durch die Kristallstrukturanalyse für PlaF eine einzigartige und asymmetrische Dimer-Struktur gezeigt werden. Durch Anwendung von verschiedenen Methoden wie *Crosslinking*, *Microscale Thermophoresis* (MST) und hydrolytischen Aktivitätsmessungen konnte für PlaF eine konzentrationsabhängige Dimerisierung nachgewiesen werden (Bleffert *et al.*, 2019, Bleffert *et al.*, 2022). Außerdem

konnten im Rahmen der Strukturaufklärung innerhalb der katalytischen Domäne Myristinsäure (C14), *n*-Octyl- β -D-Glucosid (OG), Isopropylalkohol (IPA) sowie Undecansäure (C11) im Komplex mit PlaF identifiziert werden. Weitere Folgestudien belegten schließlich eine regulatorische Funktion durch Liganden. Hierbei erwiesen Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C10 bis C12 bei einer Inkubation mit gereinigtem PlaF neben einer gesteigerten PlaF-Dimerisierung auch eine starke Inhibierung der Aktivität von mehr als 80 % (Bleffert *et al.*, 2022).

Die Homodimerisierung erfolgt zwischen den Transmembran-Juxtamembrandomänen zweier PlaF-Moleküle, wobei diese in einer *coiled-coil*-Interaktion zueinander ausgerichtet sind und dadurch eine X-geformte Dimer-Schnittstelle gebildet wird. Eine Dimerisierung erfolgt daher überwiegend durch zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Transmembrandomänen (TM). Zusätzlich wurden vier schwache Wasserstoffbrückenbindungen (H-Bindungen) in den Juxtamembrandomänen (JM) identifiziert, die einen stabilisierenden Effekt auf die Dimerisierung von PlaF bewirken (Bleffert *et al.*, 2022). Eine detaillierte Auflistung aller Wechselwirkungen innerhalb der Transmembran-Juxtamembrandomänen der beiden PlaF-Monomeren kann dem Anhang entnommen werden (Tabelle 6.6) (Bleffert *et al.*, 2022).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PlaF-Dimerisierung mithilfe eines genetischen *in vivo*-Systems analysiert. Zu diesem Zweck wurde das etablierte TOXGREEN-System herangezogen und für die Untersuchung der PlaF-Dimerisierung modifiziert.

Anders zu dem originalen TOXGREEN-System, bei welcher ausschließlich die zu untersuchende TMD in Fusion zwischen ToxR und MBP gebildet wird, wurde hierbei das PlaF-Volllängenprotein in Fusion nur an ToxR gebracht. Hierbei konnte mithilfe von Aktivitätsmessungen gezeigt werden, dass das ToxR-PlaF-Fusionsprotein (PlaF*) im gewählten Expressionsstamm *E. coli ArcticExpress* gebildet wird und funktional ist. Die Messung der Fluoreszenz zeigte, dass *E. coli*-Zellen, die PlaF* produzierten, eine Fluoreszenz von etwa 4070 AU aufwiesen, was in etwa 73 % der Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle (5575 AU) entsprach. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Dimerisierung von zwei PlaF*-Molekülen stattgefunden hat und diese zur Transkription des Reportergens führte.

Um die Rolle von spezifischen Aminosäuren bei der Ausbildung der PlaF-Dimerisierung zu untersuchen, wurden schließlich gezielte Aminosäuren aus der Dimer-Schnittstelle gegen Alanine substituiert. Die Variante T32A wies hierbei neben einer deutlich geringen Fluoreszenzintensität auch eine hohe hydrolytische Aktivität im Vergleich zu PlaF* auf, was darauf rückschließen lässt, dass die Variante T32A vorwiegend in monomerer Form vorlag. Das Threonin an der Position 32 befindet sich in der JM von PlaF und bildet zusammen mit Serin an der 29ten Position H-Bindungen aus, die einen stabilisierenden Effekt auf die Dimerisierung ausüben können (Bleffert *et al.*, 2022).

Der Austausch von Threonin zu Alanin könnte somit eine destabilisierende Wirkung auf die Dimerbildung von PlaF haben. Die Ergebnisse der Varianten F21A, P23A und T25A zeigten unvermutet höhere Fluoreszenzwerte auf, was darauf hindeuten lässt, dass die Substitutionen der Aminosäuren zu einer geänderten Konformation von PlaF und der damit verbundenen gesteigerten PlaF-Dimerisierung führt.

Die höchste Fluoreszenzintensität im TOXGREEN-System wurde bei der Variante P23A ermittelt. Im Westernblot wies P23A eine sehr schwache Proteinbande auf, allerdings belegte die normierte enzymatische Aktivität auf dem Niveau von PlaF*, die Funktionalität dieser Variante. Die erhöhte Fluoreszenz liegt vermutlich daran, dass das Prolin eine wichtige Funktion im Monomer-Dimer-Gleichgewicht einnimmt. Eine Besonderheit von Prolin ist, dass es in der α -Helix einen sogenannten „Knick“ bewirkt, weshalb es auch als „Helixbrecher“ bezeichnet wird (Glatzova *et al.*, 2021). Daher ist es höchstwahrscheinlich, dass die Substitution zu einer strukturellen Änderung der Proteinfaltung führt und dadurch auch die Regulation des Monomer-Dimer-Gleichgewichts beeinflusst wird.

Das Phenylalanin an der Position 21 gehört zur Gruppe der aromatischen Aminosäuren und besitzt in der Seitenkette einen charakteristischen Benzolring. Auf Basis der 3D-Struktur konnten für F21 mehr als 60 mögliche hydrophobe Interaktionen (Tabelle 6.6, Anhang), die eine Distanz von kleiner als 4,5 Å aufwiesen, zugewiesen werden (Bleffert *et al.*, 2022). Aromatische Aminosäuren in Transmembran-domänen (TMD) können starke Wechselwirkungen bei der Dimerisierung von Proteinen vermitteln. So wurde in einer Studie zu EpsM aus *V. cholerae* gezeigt, dass die aromatischen Seitenketten beider Tryptophane im $^{37}\text{WXXW}^{40}$ -Motiv der TMD wichtig für die Homodimerisierung sind. Dagegen zeigten Einzelmutationen keinen erheblichen Einfluss auf die Dimerisierung, weshalb postuliert wurde, dass die aromatische Seitenkette des benachbarten Tyrosins ($^{36}\text{YWXXW}^{40}$) des EpsM-Proteins die Dimerisierung stabilisieren könnte (Sal-Man *et al.*, 2007). Die Variante F21A zeigte zudem einen positiven Einfluss auf die PlaF-Dimerisierung. Dabei weist die Aminosäuresequenz von PlaF ebenfalls ein benachbartes Tyrosin an der Position 20 (Y20) auf. So könnte das Tyrosin in ähnlicher Weise zur Stabilisierung der PlaF-Dimerisierung beitragen, weshalb an dieser Stelle für F21A kein negativer Einfluss beobachtet werden konnte.

Für das humane T-Zelloberflächenprotein CD28 (*cluster of differentiation*), welches für die Aktivierung von T-Zellen verantwortlich ist, wurde im Rahmen eines Sequenzvergleichs das hochkonservierte $^{145}\text{YXXXXT}^{150}$ -Motiv in der Transmembrandomäne identifiziert. So wurde mithilfe des TOXLUC-Systems, ähnlich zum TOXGREEN-System, gezeigt, dass Mutationen die Dimerisierung signifikant einschränken und folglich weniger Luciferase (LUC) gebildet wird (Leddon *et al.*, 2020). Das gleiche Motiv ($^{20}\text{YXXXXT}^{25}$) wurde ebenfalls in der Aminosäuresequenz

von PlaF identifiziert. Allerdings zeigte die Variante T25A (Einzelmutation) im Rahmen dieser Arbeit keinen negativen Einfluss auf die Dimerisierung.

Um zu testen, ob es sich bei PlaF ebenfalls um ein Dimer-Motiv handelt oder ob aromatische Seitenketten einen Einfluss auf die Dimerisierung von PlaF nehmen, könnten weitere PlaF-Varianten mit Einzel- (Y20A) oder sogar Doppelmutationen (Y20A-F21A oder Y20A-T25A) mehr Aufklärung geben. Für ein tieferes Verständnis über das Monomer-Dimer-Gleichgewicht und der Regulation von PlaF ist es außerdem interessant zu untersuchen, ob sich die PlaF-Dimerisierung im TOXGREEN-System steuern lässt. Die Analyse unter verschiedenen Umweltbedingungen, wie beispielsweise Temperatur, stellt eine denkbare Option dar. Da eine Liganden-vermittelte PlaF-Dimerisierung in Abhängigkeit von spezifischen Fettsäuren als mögliche Regulation vermutet wurde (Bleffert *et al.*, 2022), wäre es interessant zu untersuchen, ob PlaF ebenso eine gesteigerte Dimerisierung durch die gesonderte Zugabe von Fettsäuren in das Medium der TOXGREEN-exprimierenden *E. coli*-Zellen zeigt.

4.2 PlaF modifiziert die Membranlipidzusammensetzung

Nachdem PlaF aus *P. aeruginosa* im Rahmen von vorherigen Arbeiten als putative Phospholipase A₁ (PLA₁) biochemisch und biophysikalisch charakterisiert wurde (Bleffert *et al.*, 2022), wurde im Zuge dieser vorliegenden Arbeit die Frage adressiert, welche physiologische Funktion PlaF in *P. aeruginosa* einnimmt. Zu diesem Zweck wurde zuvor im Rahmen einer Masterarbeit ein *plaF*-defizienter Stamm (*P. aeruginosa* Δ *plaF*), bei welchem die vollständige kodierende *plaF*-Sequenz aus dem *P. aeruginosa* Genom entfernt wurde, konstruiert (Bleffert *et al.*, 2022). Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die PLA₁-Aktivitäten in *P. aeruginosa* Δ *plaF* um 84 % und im *P. aeruginosa* Δ *plaF*:*plaF*_{S137A} (komplementierter Stamm mit inaktiver *plaF*-Sequenz) um 75 % im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT reduziert waren (Abbildung 3.1). Der enorme Aktivitätsverlust lässt an dieser Stelle vermuten, dass PlaF eine bedeutende Rolle in *P. aeruginosa* einnimmt. Die verbleibende Restaktivität von 16 % in *P. aeruginosa* Δ *plaF* könnte auf andere intrazelluläre Phospholipasen A₁ zurückgeführt werden. Beispielsweise könnte die Restaktivität mit der jüngst charakterisierten Phospholipase PlaB aus *P. aeruginosa* begründet werden. PlaB ist eine putative intrazelluläre Phospholipase B, welche bevorzugt Phospholipide, unabhängig von der Kopfgruppe, mit mittel- und langkettigen Fettsäureketten hydrolysiert. Außerdem konnte für *P. aeruginosa* Δ *plaB* eine reduzierte PLA₁-Aktivität um 35 % gegenüber dem Lipid 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (PC 12) im Vergleich zum Wildtypen gemessen werden (Weiler *et al.*, 2022). Die vergleichsweise etwas höhere Restaktivität von *P. aeruginosa*

$\Delta plaF::plaF_{S137A}$ (25 % Restaktivität) könnte damit zusammenhängen, dass die katalytisch inaktive Variante $PlaF_{S137A}$ durch einen Co-aktivierenden Mechanismus andere Phospholipasen in *P. aeruginosa* $\Delta plaF::plaF_{S137A}$ reguliert. Diese Besonderheit der Regulation wurde auch für das humane ABHD5 (α/β -hydrolase domain-containing protein 5) beobachtet, das u.a. in der Leber oder im Fettgewebe den Fettstoffwechsel reguliert und die Lipolyse stimuliert. Als Co-Aktivator konnte für ABHD5 eine physische Interaktion mit PNPLA2 und PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase-domain-containing*) nachgewiesen und eine aktivierende Eigenschaft zugeschrieben werden (Yang *et al.*, 2019). Im komplementierten *P. aeruginosa* $\Delta plaF::plaF$ -Stamm konnte hingegen die PLA_1 -Aktivität erfolgreich wiederhergestellt werden und wies darüber hinaus auch eine gesteigerte PLA_1 -Aktivität um 191 % im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT (100 %) auf. Hier kann die erhöhte Aktivität vermutlich mit der *plaF*-Integration in die *attTn7*-Position des Genoms begründet werden, da diese bei *P. aeruginosa* in der Nähe des chromosomalen Replikationsursprungs liegt (Yee & Smith, 1990). Während des bakteriellen Wachstums, insbesondere während der exponentiellen Wachstumsphase, replizieren Bakterien nahezu fortlaufend das eigene Genom, sodass genetische Informationen in der Nähe des Replikationsursprungs in zweifacher Ausführung vorliegen können, welche wiederum dazu führen können höhere Transkriptmengen zu produzieren (Slager & Veening, 2016). Um diese Differenz zu untersuchen, wurden im Rahmen einer assoziierten Bachelorarbeit die relativen Transkriptmengen des *plaF*-Gens im komplementierten *P. aeruginosa* $\Delta plaF::plaF$ im Vergleich zum WT analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass *P. aeruginosa* $\Delta plaF::plaF$ etwa 2-fach höhere Transkriptmengen von *plaF* aufwies als *P. aeruginosa* WT (Heitzer, 2019).

Für $PlaF$ konnte bereits das Substratspektrum durch *in vitro* Untersuchungen spezifiziert werden. Neben synthetisch hergestellten *para*-Nitrophenylacylestern ließen sich auch natürliche Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylcholin (PC) mit verschiedenen Acylkettenlängen von C12-C14 durch $PlaF$ hydrolysieren (Bleffert *et al.*, 2022). Außerdem wurde $PlaF$ in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* lokalisiert, weshalb postuliert wurde, dass $PlaF$ durch die Hydrolyse von Phospholipiden an der Membranlipidhomöostase beteiligt ist (Bleffert *et al.*, 2022). Die Membranlipidhomöostase umfasst im Allgemeinen die Anpassung der Membranlipidzusammensetzung bzw. den Auf- und Abbau und die Modifikation von Phospholipiden beispielsweise durch Phospholipasen (Sebastian *et al.*, 2016), Desaturasen (Zhu *et al.*, 2006) oder Flippasen (Best *et al.*, 2019) und stellt eine überlebenswichtige Strategie bei Prokaryoten dar (Zhang & Rock, 2008). Aus diesem Grund war die Analyse der Glycerophospholipiden ein besonderes Interesse. Die Ergebnisse der Lipidomstudie wiesen

signifikante Unterschiede in der Phospholipidzusammensetzung auf. So wurden insgesamt 20 Phospholipid-Spezies, unter anderem PE 35:1, PG 35:1 und PE 36:2, als akkumulierte Phospholipide in *P. aeruginosa* Δ *plaF* und 17 Phospholipid-Spezies (u.a. PE 34:2, PE32:1, PE 36:4) als akkumulierte Phospholipide in *P. aeruginosa* WT identifiziert (Abbildung 3.15). Im Rahmen einer weiteren Studie war es außerdem gelungen das Lipidom-Profil des komplementierten *P. aeruginosa* Δ *plaF::plaF* mitzubestimmen (Daten nicht gezeigt). Durch Anwendung statistischer Analysen wurden die sechs Phospholipid-Spezies PI 26:0, PE 31:2, PG 36:0, PE 22:1, PG 24:3 und PC 39:0 als akkumulierte Phospholipide in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert. Im komplementierten *P. aeruginosa* Δ *plaF::plaF* hingegen waren die genannten Phospholipid-Spezies dezimiert, weshalb diese auch als putative PlaF-Substrate deklariert wurden (Bleffert *et al.*, 2022). Somit unterstreicht dieses Ergebnis nochmals die vermutete Beteiligung von PlaF an der Membranlipidhomöostase. Neben der Funktion als Permeabilitätsbarriere beeinflussen Phospholipide auch Membran-Konformationen, die sich in Abhängigkeit der Zusammensetzung durch positive oder negative Krümmungen äußern (McMahon & Boucrot, 2015). Dadurch können strukturbeeinflussende Phospholipide wie beispielsweise CL (Cardiolipin) oder DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) auch Interaktionen, Faltungen und Verteilungen von Membran-Protein-Komplexen beeinflussen, die an wesentlichen zellulären Prozessen wie Zellteilung, Signaltransduktion, Sekretion und Biofilmbildung beteiligt sind (Lin & Weibel, 2016). In einer anderen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Phänotypen von *E. coli*-Stämmen, welche entweder kein Phosphatidylethanolamin (PE-defizient), kein Cardiolipin (CL-defizient) oder kein Phosphatidylglycerol und Cardiolipin (PG/CL-defizient) bildeten, wesentlich unterschiedlich waren. So wurden unter anderem mithilfe von Mikroskopieaufnahmen unterschiedliche Morphologien in der Form und Länge einer Zelle festgestellt. Des Weiteren wurden auch signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten, in der Fähigkeit der Biofilmbildung sowie Unterschiede in der LPS-Struktur demonstriert. Insgesamt verdeutlicht die Studie, welchen bedeutenden Einfluss die Phospholipidzusammensetzung auf die Physiologie und Morphologie des Bakteriums ausübt (Rowlett *et al.*, 2017). Die Fähigkeit von PlaF solche strukturbeeinflussenden Lipide zu hydrolysieren konnte im Rahmen einer Studie bereits gezeigt werden. Neben CL und DOPE ließen sich auch BMP (Bis-(monoacylglycero)-phosphat) und HBMP (Hemi-Bis-(monoacylglycero)-phosphat) hydrolysieren (Strunk, 2020).

Die stetige Adaptation der Phospholipidzusammensetzung in *P. aeruginosa* wurde bereits in einer Studie unter Biofilmbedingungen nachgewiesen. Hierbei wurde zum einen ein signifikanter Rückgang von PL-Spezies mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen in ihrer Acylkette

beobachtet und zum anderen eine relative Zunahme von langkettigen PE-Spezies im Vergleich zu *P. aeruginosa*-Zellen aus der planktonischen Phase beschrieben (Benamara *et al.*, 2011).

Bei Wachstumsanalysen unter standardisierten Laborbedingungen (37 °C und 150 UpM), aber auch unter verschiedenen Temperaturbedingungen (25 °C, 30 °C, 42 °C) wurden zunächst keine erheblichen Unterschiede festgestellt. *P. aeruginosa* Δ *plaF* wies einen charakteristischen Kurvenverlauf bakteriellen Wachstums mit einer leicht verlängerten *lag*-Phase im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT auf (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Gram-negative Bakterien passen die Membranfluidität häufig an die gegebene Temperaturbedingung an, indem diese zumeist das Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren der Phospholipide verändern (Zhang & Rock, 2008). Beispielsweise wird in *P. aeruginosa* die Bildung von ungesättigten Phospholipiden durch die Desaturase DesA, welche eine Doppelbindung in existierende Fettsäureketten einfügt, katalysiert (Zhu *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen des *P. aeruginosa*-Wachstums unter verschiedenen pH-Bedingungen zeigten sichtbar andere Resultate. Hierbei wies *P. aeruginosa* Δ *plaF* sowohl im leicht saurem pH-Bereich von 5 als auch im leicht alkalischen pH-Bereich von 8-9 deutlich verlängerte *lag*-Phasen im Vergleich zum Referenzstamm *P. aeruginosa* WT auf. Im weiteren Verlauf jedoch, wuchsen *P. aeruginosa* Δ *plaF*-Zellen unter beiden Bedingungen annähernd ähnlich wie der parentale wildtypische Stamm (Abbildung 3.4). Dass Bakterien ihre Membranlipidzusammensetzung auch an die pH-Bedingung des umgebenden Mediums adaptieren, konnte am Beispiel des Humanpathogens *E. coli* O157:H7, auch bekannt als EHEC (Enterohämorrhagische *Escherichia coli*), gezeigt werden. So wies der untersuchte Pathogen bei Inkubation im Medium mit einem pH-Wert von 5 erhöhte Mengen an Palmitinsäure (C16:0) und eine verringerte Menge an *cis*-Vaccensäure (C18:1 ω 7c) im Vergleich zur Referenz (Inkubation bei pH 7,3) auf (Yuk & Marshall, 2004).

Die *lag*-Phase umfasst im Allgemeinen die Zeit, die bakterielle Zellen in frisch überführten Nährmedien benötigen, um sich neuen Umweltbedingungen anzupassen bevor diese in die exponentielle Wachstumsphase übergehen. Während dieser Phase aktivieren Zellen alle regulatorischen Prozesse, die für das Zellwachstum notwendig sind (Bertrand, 2019). Hierzu wurden in einer Studie des Gram-negativen Bakteriums *Salmonella typhimurium* unter anderem Gene der DNA-Replikation, der Transkription, der Zellteilung, der LPS-Biosynthese, des Proteinabbaus sowie Gene für die Aufnahme von Spurenelementen wie beispielsweise Eisen, Mangan und Calcium und Gene für die Phosphataufnahme während der *lag*-Phase als hochregulierte Gene im Vergleich zur stationären Phase identifiziert (Rolfe *et al.*, 2012). Ob die verlängerte *lag*-Phase aufgrund der gestörten Membranlipidhomöostase bzw. durch das Fehlen von PlaF hervorgerufen wurde oder ob andere Membranassoziierte regulatorische Prozesse

indirekt durch PlaF beeinflusst wurden, könnte im Rahmen von weiteren Lipidomstudien gekoppelt mit Proteom- oder Transkriptom-basierten Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums mehr Aufklärung geben. Außerdem stellt die Fluoreszenz-basierte Anisotropie-Messung eine Möglichkeit zur Untersuchung der Membranfluidität dar (Marielle & Sarrah, 2017).

4.3 PlaF beeinflusst zahlreiche Proteine unter Biofilmbedingung

In natürlichen Habitaten ist die bevorzugte Lebensform von bakteriellen Gemeinschaften hauptsächlich der Biofilm. Dennoch stellt diese Lebensform noch heute drastische Probleme in der Industrie wie auch in der Medizin dar. Dabei sind viele Fragen über das regulatorische Biofilm-Netzwerk noch ungeklärt (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). In dieser vorliegenden Arbeit wurde die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* Δ plaF im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT zu verschiedenen Zeitpunkten näher untersucht (Kapitel 3.3). In den ersten 72 Stunden zeigte *P. aeruginosa* Δ plaF im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT signifikant weniger Biofilmbildung (Abbildung 3.5). Der größte Unterschied des produzierten Biofilms wurde nach 24 Stunden Inkubation festgestellt. Während *P. aeruginosa* WT eine durchschnittliche Absorption von 1,57 aufwies, erreichte *P. aeruginosa* Δ plaF eine durchschnittliche Absorption von 0,44 (Abbildung 3.5). Ein ähnliches Ergebnis wurde schließlich auch bei der Analyse des Biofilms unter dynamischen Bedingungen mithilfe der *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) für die Zeitpunkte 24 h, 72 h sowie 144 h beobachtet (Caliskan *et al.*, 2023). Während *P. aeruginosa* WT zu den verschiedenen Zeitpunkten auf der Oberfläche zunehmend gleichmäßig konfluent wuchs und eine durchschnittliche Höhe (*Height*) von $\approx 10,9$ μm erreichte, zeigte *P. aeruginosa* Δ plaF signifikant geringeres Wachstum und erreichte bei allen Zeitpunkten eine durchschnittliche Höhe von $\approx 5,8$ μm (Abbildung 6.2, Anhang) (Caliskan *et al.*, 2023). Darüber hinaus hatte *P. aeruginosa* Δ plaF zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h eine signifikant geringere mittlere Schichtdicke (*MeanThickness*) im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT (24 h: $\approx 3,75$ μm (WT), $\approx 3,22$ μm (Δ plaF); 72 h: $\approx 4,50$ μm (WT), $\approx 3,41$ μm (Δ plaF)) (Caliskan *et al.*, 2023). Um herauszufinden, welche molekularen Prozesse in *P. aeruginosa* Δ plaF beeinträchtigt waren, wurde im weiteren Verlauf eine quantitative Proteomstudie von Kulturen unter Biofilmbedingungen (nach 24 h) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sich das Proteom von *P. aeruginosa* Δ plaF signifikant von *P. aeruginosa* WT unterscheidet (Abbildung 3.6). So wurden insgesamt 367 Proteine aus verschiedenen zellulären Prozessen wie beispielsweise Transport, Signaltransduktion oder auch Membranbiogenese, Sekretion und Zellmotilität entweder hoch oder niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ plaF identifiziert (Abbildung 3.8). Dieses Ergebnis passt

zu den Beobachtungen zur Membranlipidhomöostase, da in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass jede Phase der Biofilmentwicklung in Abhängigkeit der Membranlipidhomöostase einem hochkomplexen regulatorischen Biofilm-Netzwerk unterliegt, welche die Expression zahlreicher Biofilm-assoziiertes Gene reguliert (Sauer *et al.*, 2002, Petrova & Sauer, 2009). So wurden hier unter anderem die Phosphat-Acyl-Transferase PlsX (1,5-fach) sowie die Cyclopropan-Fettsäure-Synthase Cfa (1,8-fach) in *P. aeruginosa* Δ *plaF* hoch abundant identifiziert (Abbildung 3.14). Während PlsX für den Aufbau von Phospholipiden verantwortlich ist, indem es die Acylkette von Acyl-ACP (*acyl-carrier-protein*) auf ein anorganisches Phosphat katalysiert, katalysiert Cfa die Reaktion von *cis*-ungesättigten Fettsäuren zu Cyclopropan-Fettsäuren von bereits bestehenden Phospholipiden. Letzteres ist Teil eines *rapid response*-Systems für die schnelle adaptive Reaktionen auf umweltbedingte Stresssituationen (Wang & Cronan, 1994). In *P. aeruginosa* Δ *plaF* waren neben Transportproteinen auch Proteine der Eisen-Homöostase und der Signaltransduktion am stärksten verändert in ihrer Abundanz.

4.4 PlaF beeinflusst Zweikomponentensysteme

Bei Prokaryoten stellen Zweikomponentensysteme eine Schlüsselrolle dar, wenn es um die Wahrnehmung von Umweltreizen und der damit verbundenen Anpassung der Genexpression geht (Francis *et al.*, 2017). So besteht ein Zweikomponentensystem grundsätzlich aus einer membranverankerten Histidinkinase (HK) und einem zytoplasmatischem Regulator (RR, *response regulator*). Dabei dient die HK als sensorische Einheit, die Signale bzw. Reize im periplasmatischen Raum wahrnimmt und diese im Zytoplasma durch Autophosphorylierung der Histidin-Domäne die Signalübertragung initiiert. Das Phosphat wiederum wird folglich durch die konservierte Histidin-Domäne auf die Empfänger-Domäne des korrespondierenden Regulators übertragen. Der RR dient hierbei als Transkriptionsfaktor, der im Falle einer Phosphorylierung aktiviert wird und so die Transkription spezifischer Gene initiiert (Sultan *et al.*, 2021). Das Genom von *P. aeruginosa* kodiert etwa 63 solcher putativen Histidinkinasen und etwa 64 putative regulatorische Proteine (RR) (Rodrigue *et al.*, 2000). Hiervon wurden in der Proteomstudie insgesamt drei HKs, sechs RRs und zwei putative Sensor-Regulator-Hybrid-Proteine als hoch bzw. als niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert (Abbildung 3.9). Diese Beobachtung gibt Aufschluss darüber, wie die Deletion von *plaF* die Abundanz von zahlreichen Proteinen (367 Proteine, mind. 1,5-fache Änderung, p-Wert <0,05) in verschiedenen Zellkompartimenten signifikant beeinflussen kann. Zweikomponentensysteme haben die Fähigkeit, die Expression einer Vielzahl von Genen zu

regulieren, von denen einige in Operons kodiert sind. Ein Beispiel hierfür ist das Zweikomponentensystem PprAB, welches nachweislich die Expression von 35 Genen kontrolliert (de Bentzmann *et al.*, 2012). Bei den in *P. aeruginosa* Δ plaF identifizierten Komponenten handelt es sich hierbei um Zweikomponentensystem, die unter anderem Virulenz-assoziierte Gene aktivieren und dadurch die Adhäsion, die Motilität oder die Biofilmbildung modifizieren (Francis *et al.*, 2017). Derartige physiologische Änderungen erfordern, wie in Kapitel 4.1 erwähnt, häufig auch die Adaptation der Membranlipidzusammensetzung (Lin & Weibel, 2016). Beispielsweise können die Anreicherung von Phospholipiden (PLs) mit mehrfach ungesättigten Acylketten die Flagellen-abhängige Adhäsion in *E. coli* verringern (Cazzola *et al.*, 2020), die Anreicherung von PLs mit gesättigten Acylketten den Wechsel aus der planktonischen zu sessilen Lebensform fördern (Dubois-Brissonnet *et al.*, 2016) oder PLs mit kürzeren Acylketten sich in älteren Biofilmen anreichern (Benamara *et al.*, 2014).

Protein-Lipid-Interaktionen können im direkten Zusammenhang mit der Aktivität, Faltung oder Stabilität von Proteinen stehen. Trotz der fortschreitenden Techniken, die in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurden, ist heute immer noch wenig über die Wechselbeziehung zwischen Proteinen und Lipiden bekannt (Contreras *et al.*, 2011). Jedoch gibt es bisher einzelne Belege, die zeigen, dass beispielsweise die Aktivität von sensorischen HKs in Abhängigkeit von spezifischen Phospholipiden steht. Ein Beispiel ist hierfür die Histidinkinase SaeS aus *Staphylococcus aureus*, welche nachweislich durch die Interaktion mit Cardiolipin aktiviert wird (Yeo *et al.*, 2023). SaeR und SaeS bilden zusammen ein Zweikomponentensystem in *S. aureus* und regulieren zahlreiche Virulenz-assoziierte Gene, die beispielsweise für Alphatoxine, Koagulasen, Nukleasen oder Proteasen kodieren (Liu *et al.*, 2016). Ein weiteres Beispiel stellt ExoS/ChvI aus *Sinorhizobium meliloti* dar; ein Zweikomponentensystem dessen Aktivität wichtig für das Wachstum, die Motilität und die Biofilmbildung ist und negativ durch Phosphatidylcholin reguliert wird (Geiger *et al.*, 2021). In Bezug auf Protein-Lipid-Interaktionen und der damit verbundenen Regulation von Histidinkinasen könnte PlaF hierbei eine sekundäre Rolle einnehmen, indem es an der Modifizierung der Membranzusammensetzung beteiligt ist und so die Vorstufe von spezifischen PL liefert. In *Bacillus subtilis* konnte außerdem die Regulation des Zweikomponentensystems YycFG auch durch direkte Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden, bei welcher die Transmembrandomänen der bislang nicht weiter charakterisierten Proteine YycH und YycI einen aktivierenden Effekt zeigten (Szurmant *et al.*, 2008). Daher wäre es auch denkbar, dass die Transmembrandomäne oder die periplasmatische Domäne von PlaF eine physische Interaktion mit membranverankerten Histidinkinasen eingeht und so einen direkten Einfluss auf Zweikomponentensysteme einnimmt.

PprAB wurde als einziges vollständiges Zweikomponentensystem in der Proteomanalyse in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert (Abbildung 3.11). PprAB reguliert die Transkription von Biofilm-assoziierten Genen, die unter anderem im *bap*-, *tad*- und *cupE*-Operon lokalisiert sind und für Oberflächen-lokalisierte Adhäsionsproteine kodieren. Diese sind wichtig für den Wechsel aus der planktonischen in die sessile Lebensform und stellen die Anheftung auf biotischen oder abiotischen Oberflächen sicher – ein Prozess, der primär in der Anfangsphase der Biofilmbildung stattfindet (de Bentzmann *et al.*, 2012). Von den insgesamt 35 PprAB-regulierten Proteinen wurden schließlich neun Proteine ebenfalls hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert. Die höhere Abundanz der PprAB-regulierten Proteine spiegelte sich ferner auch in den Transkriptmengen teilweise wider (Kapitel 3.4.2.2). So zeigten unter anderem die Gene *cupE4*, *bapA*, *bapC* und *bapD* ebenfalls hohe Transkriptmengen in *P. aeruginosa* Δ *plaF* auf. Zusätzlich wiesen die Gene *bapB* und *cupE1* signifikant hohe Transkriptmengen in *P. aeruginosa* Δ *plaF* auf, obwohl diese in der Proteomstudie auf Peptidebene nicht identifiziert wurden. Da es sich hierbei allerdings um putative extrazelluläre Komponenten handelt, liegt die Vermutung nahe, dass diese zwar gebildet wurden, jedoch nicht zweckmäßig als Adhäsionsproteine auf der Oberfläche der Zelle fungierten und dadurch die Anheftung der Zelle verwehrt blieb. Die Transkriptmengen der Gene aus dem *tad*- und *pqs*-Lokus hingegen zeigten keine erhöhten Transkripte, was zu der Annahme führt, dass PprB nicht zur Genexpression dieser Gene führt.

Neben den Zweikomponentensystemen wurden auch diverse andere mit Biofilm- und Taxis-assoziierte Proteine oder auch einzelne Proteine aus dem Kreislauf des sekundären Botenstoffs c-di-GMP identifiziert. Diese waren größtenteils auch hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* mit Ausnahme von den Anti-Sigma-Faktoren MucA (2,8-fach niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF*) und MuiA (1,5-fach), welche die Alginate-Produktion in *P. aeruginosa* regulieren. So inhibiert MucA den alternativen Sigmafaktor AlgU durch Rekrutierung an die Zytoplasmamembran, sodass dieser nicht mehr als Transkriptionsfaktor mit der RNA-Polymerase agieren kann (Chevalier *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019). MuiA wirkt ebenfalls als Anti-Sigma-Faktor und inhibiert die Alginate-Produktion über einen bislang unbekanntem Mechanismus (Withers *et al.*, 2014). Bei den hoch abundanten Proteinen handelt es sich um Komponenten, die unter anderem für die Produktion von Psl-Polysacchariden oder für die Flagellen-abhängige Taxis verantwortlich sind. Weiter wurden auch drei Phosphodiesterasen (RmcA, PA4781, PA3825) sowie drei Diguanylatcyclasen (TpbB, RbdA, PA2771) in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert (Abbildung 3.9). Diese gehören zu c-di-GMP-spezifischen Enzymen, die für den Auf- bzw. Abbau der Signalmoleküle verantwortlich sind und die c-di-GMP-Homöostase regulieren. Dementsprechend wird eine hohe c-di-GMP-Konzentration mit der Sessilität, der Adhäsion und der Biofilmbildung assoziiert, wohingegen eine niedrige

Konzentration mit der Biofilmauflösung, der erhöhten Motilität sowie der vermehrten Produktion von Virulenzfaktoren verbunden wird (Valentini & Filloux, 2016). Im Allgemeinen lässt sich hierbei feststellen, dass das Proteom von *P. aeruginosa* Δ *plaF* diverse Proteine des Biofilm-Netzwerks hoch bzw. niedrig abundant aufwies, welche nachweislich eine bedeutende Rolle in der Bildung des *P. aeruginosa* Biofilms spielen. Dies erklärt auch, warum *P. aeruginosa* Δ *plaF* sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Biofilmbedingungen einen signifikant geringeren Biofilm im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT nach 24 h Inkubation aufwies.

4.5 PlaF beeinflusst die Eisen-Homöostase

Der Mikronährstoff Eisen dient in zahlreichen enzymatischen Prozessen als Cofaktor und stellt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel aller lebenden Organismen dar (Kaplan & Ward, 2013). Bei *P. aeruginosa* ist bekannt, dass die Akkumulation von Eisen einen enormen Einfluss auf die Virulenz sowie die Bildung des Biofilms einnimmt (Minandri *et al.*, 2016, Diaz-Perez *et al.*, 2022). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens besitzt *P. aeruginosa* diverse Mechanismen, um das Eisen aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen. Dazu zählen unter anderem die TonB-abhängigen Siderophor-basierten Eisenaufnahme-Systeme (Fe^{3+}) mittels endogenem Pyoverdin oder Pyochelin oder exogenem Ferrioxamin B oder Ferrichrom von anderen Mikroorganismen (Llamas *et al.*, 2006, Hannauer *et al.*, 2012, Ronnebaum & Lamb, 2018). Zu den TonB-unabhängigen Eisenaufnahme-Systemen (Fe^{2+}) zählen unter anderem das Citrat- sowie Feo-System, wobei das Feo-System innerhalb der Prokaryoten weit verbreitet ist (Marshall *et al.*, 2009, Seyedmohammad *et al.*, 2016).

Im Rahmen der Proteomstudie waren in *P. aeruginosa* Δ *plaF* unter Biofilmbedingungen nahezu alle Proteine des Pyoverdin-Systems niedrig abundant. Gleichzeitig wurden aber auch einzelne Proteine des Pyochelin-, des Feo- und des Citrat-Systems als hoch abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert. Ferner wurde die verringerte Pyoverdinmenge aus dem Überstand sowie die geringere intrazelluläre Eisenkonzentration durch Messungen von *P. aeruginosa*-Kulturen unter statischen und planktonischen Bedingungen bestätigt (Abbildung 3.16).

Die Pyoverdinbiosynthese selbst steht unter der strikten Kontrolle des übergeordneten Eisenregulators Fur (*ferric uptake regulator*), dessen Aktivität in Abhängigkeit des verfügbaren Eisens steht. Sobald die intrazelluläre Eisenkonzentration einen gewissen Schwellenwert überschreitet, bindet der Fur- Fe^{2+} -Komplex als Repressor an die Promotorregion des *pvdS*-Gens und inhibiert so die Transkription. Ist die intrazelluläre Eisenkonzentration jedoch zu niedrig, so bleibt das Fur-Protein inaktiv und die Transkription des *pvdS*-Gens wird gestartet (Ochsner & Vasil,

1996). PvdS selbst dient als Sigma-Faktor, der die Expression der Pyoverdin-abhängigen Gene sowie weitere Virulenz-assoziierten Gene initiiert (Shigematsu *et al.*, 2001, Lamont *et al.*, 2002). In der Proteomstudie wurde PvdS in beiden Stämmen nicht identifiziert. Hingegen konnte zumindest das Fur-Protein identifiziert werden; hierbei gab es jedoch auch keinen signifikanten Unterschied zwischen *P. aeruginosa* WT und $\Delta plaF$. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* im Rahmen einer Infektion und in Abhängigkeit des verfügbaren Eisens die Eisenakkumulation neben Siderophor-basierten Systemen (Pyoverdin und Pyochelin) auch alternative Eisenaufnahme-Systeme (Citrat- und Feo-System) aktiviert (Dumas *et al.*, 2013, Konings *et al.*, 2013). Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die Eisenaufnahme in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ über das metabolisch günstige Feo- und Citrat-System als bevorzugte Quelle im Gegensatz zum energieaufwendigen Pyoverdin-System genutzt wurde (Dumas *et al.*, 2013). Wie bereits erwähnt stellt die Eisenhomöostase auch eine wichtige Komponente im Zuge der Biofilmbildung dar. Daher kann eine Störung des Pyoverdin-Systems wie beispielsweise durch Mutationen auch zu erheblichen Veränderungen der Biofilmstruktur führen (Diaz-Perez *et al.*, 2022). Eine weitere Biofilmanalyse mit exogenem Pyoverdin könnte einen möglichen Ansatz darstellen, um zu testen, ob die verminderte Biofilmproduktion in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ in direktem Zusammenhang mit der geringen Pyoverdinmenge steht.

Während der planktonischen Wachstumsphase, insbesondere in der *lag*-Phase, ist die Akkumulation von Eisen ein wesentlicher Prozess als Vorbereitung für die Phase des exponentiellen Wachstums (Rolfe *et al.*, 2012). Sowohl unter standardisierten laboratorischen Wachstumsbedingungen (37 °C, 150 μ M) als auch unter Stressbedingungen (pH- und Temperatur-Stress) wurde für *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ eine längere *lag*-Phase im Vergleich zu *P. aeruginosa* WT beobachtet. Es kann hierbei vermutet werden, dass PlaF positiv die Pyoverdin-abhängige Eisenakkumulation über einen *bis dato* noch unbekanntem Mechanismus reguliert. Eine weitere denkbare Erklärung für die geringe Pyoverdinmenge in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ ist die veränderte Membranlipidzusammensetzung, die im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte. Bekanntermaßen liegt das Ferribactin (Vorstufe von Pyoverdin) im Reifungsprozess über eine Acylkette mit der Zytoplasmamembran assoziiert vor (Hohlneicher *et al.*, 2001). Nach dem Transport ins Periplasma durch PvdE erfolgt im weiteren Verlauf eine Deacylierung des Membranassoziierten Ferribactins durch die Hydrolase PvdQ (Drake & Gulick, 2011). Außerdem zeigten Untersuchungen, dass einzelne Komponenten des sogenannten „Siderosoms“ (bestehend aus den Proteinen PvdA, PvdF, PvdG und PvdH sowie aus den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen PvdL, PvdI und PvdD) neben einer Interaktion untereinander auch eine Kolokalisation mit der Zytoplasmamembran einhergehen (Imperi & Visca, 2013). An dieser

Stelle könnte PlaF eine wesentliche Rolle bei der Bildung von funktionellen Membranmikrodomänen (FMM) durch Modifizierung bzw. Hydrolyse von Phospholipiden einnehmen. FMMs entstehen in der Zytoplasmamembran von Prokaryoten, ähnlich wie die *lipid rafts* in der eukaryotischen Plasmamembran (Simons & Ikonen, 1997), durch Anreicherung von speziellen Lipid- und Proteinmolekülen, die einen membranverstärkenden Effekt aufweisen und sich in der Zusammensetzung im Vergleich zum Rest der Membran hervorheben. Diese können durch Ansammlung von zyklischen oder nicht-zyklischen Polyisoprenoiden wie beispielsweise Hopanoiden bzw. Carotinoiden gebildet werden (Lopez & Koch, 2017). Funktionell betrachtet bilden FMMs eine Art Interaktionsplattform, bei welcher spezifische Proteine an die Membran rekrutiert werden können, um zahlreiche Prozesse wie Signaltransduktion, Zellteilung oder Membrantransport zu regulieren (Bramkamp & Lopez, 2015, Wagner *et al.*, 2017). Durch das Fehlen von PlaF in *P. aeruginosa* Δ *plaF* könnte die Ausbildung von Membranmikrodomänen beeinträchtigt sein, sodass die Rekrutierung des Siderosoms an die Zytoplasmamembran beschränkt ist und dadurch die Pyoverdinbildung beeinflusst wird.

4.6 PlaF beeinflusst Transportprozesse

ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) stellen eine der größten Proteinfamilie in allen Domänen des Lebens dar. Die Hauptfunktion dieser Gruppe besteht darin Substrate wie beispielsweise Ione, Peptide bis hin zu großen makromolekularen Strukturen über Membranen aktiv unter Verbrauch von energiereichem ATP zu transportieren (Higgins, 2001). Während in Prokaryoten zahlreiche ABC-Transporter entweder als Importer oder Exporter beschrieben wurden, wurde bis vor nicht allzu langer Zeit angenommen, dass Eukaryoten ausschließlich Exporter bilden. Allerdings belegen neueste Forschungen das Vorhandensein von eukaryotischen Importern (Choi & Ford, 2021). Ferner sind Mutationen in humanen ABC-Transportern häufig die Ursache für genetisch bedingte Erkrankungen wie am Beispiel des Chloridionen-Transporters CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), der bei einer Fehlfunktion für die Zystische Fibrose verantwortlich ist (Cant *et al.*, 2014). Für Prokaryoten stellen ABC-Transporter eine wesentliche physiologische Rolle dar. Diese sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt wie beispielsweise an der Aufnahme essenzieller Spurenelemente oder Nährstoffe, an der Sekretion von Antibiotika oder Toxinen, an der Adhäsion auf Oberflächen oder an der Biofilmbildung (Akhtar & Turner, 2022).

Im Rahmen der Proteomstudie konnten insgesamt 30 Proteine aus der Familie der ABC-Transporter, die in *P. aeruginosa* Δ *plaF* hoch bzw. niedrig abundant waren, identifiziert werden

(Abbildung 3.13). Die identifizierten ABC-Transporter sind verantwortlich für den Transport von beispielsweise Aminosäuren, Peptiden oder Phosphaten, wobei einige von denen eine wesentliche Rolle für die Biofilmproduktion einnehmen und im Folgenden näher erläutert werden. In *P. aeruginosa* Δ *plaF* war der Arginin-Transporter AotM um 2,1-fach hoch abundant. Arginin ist eine proteinogene Aminosäure und stellt eine Quelle von energiereichen Stickstoffverbindungen in Prokaryoten dar (Charlier & Bervoets, 2019). In *Pseudomonas putida* KT2440 konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Arginin in direktem Zusammenhang mit der erhöhten Bildung des sekundären Botenstoffs c-di-GMP steht, welches wiederum die Biofilmbildung in Abhängigkeit des c-di-GMP-Levels reguliert. Auf welche Weise Arginin das c-di-GMP-Level auf molekularer Ebene erhöht, ist allerdings noch ungeklärt (Barrientos-Moreno *et al.*, 2020). Der ABC-Transporter DppBCDF und die dazugehörigen Substrat-bindenden Proteine DppA1-A5 sind für den Transport von Dipeptiden in *P. aeruginosa* verantwortlich. Einer Studie zufolge konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *dppA1*-Gens in *P. aeruginosa* PA14 zu einer Einschränkung der *Swarming*-Motilität und zu einer erheblichen Reduktion der Biofilmbildung um das 68-fache im Vergleich zum Wildtypen führt (Lee *et al.*, 2018). In *P. aeruginosa* Δ *plaF* war DppC (1,6-fach) unter Biofilmbedingung hoch abundant, wohingegen DppA1 (1,5-fach) und DppA4 (1,6-fach) niedrig abundant waren.

Im Periplasma vorkommende Substrat-bindende Proteine (SBPs) wie DppA1-A5, die eine entscheidende Rolle in der Aufnahme von spezifischen Substraten über ABC-Transportsysteme einnehmen sind in dieser Studie generell auffällig. Neben DppA1 und DppA4 wurden weitere zehn periplasmatische SBPs niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF* identifiziert. Diese zeigen eine hohe Affinität zu Substraten wie Peptiden (CysP, NppA2), Aminosäuren (BraC), Ribose (RbsB) sowie Polyamine (SpuD, SpuE). Polyamin-Moleküle, wie beispielsweise Spermidine, können von Prokaryoten selbst biosynthetisiert oder auch aus dem umgebenen Milieu über ABC-Transporter aufgenommen werden. In *Vibrio cholerae* O1 und *E. coli* K-12 konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufnahme von exogenem Spermidin einen erheblichen Einfluss auf den Biofilm ausübt (Bridges & Bassler, 2021, Thongbhubate *et al.*, 2021).

Phosphorverbindungen sind in allen zellulären Organismen essenziell und ein wesentlicher Bestandteil von Membranphospholipiden, von Nukleinsäuren in Form von DNA und RNA oder auch von Nukleotiden in Form von ATP, welche in Zellen als Energiequelle dienen. Des Weiteren nehmen Phosphorverbindungen auch wichtige regulatorische Funktionen in Protein-Netzwerken ein, insbesondere bei der Signaltransduktion von bakteriellen Zweikomponentensystemen (Chekabab *et al.*, 2014). In *P. aeruginosa* erfolgt der Transport von Phosphaten durch das Pst-System (PstABCs) (Lamarche *et al.*, 2008). In der Proteomstudie wurden die Komponenten PstB

(1,5-fach) und PstC (2,0-fach) in *P. aeruginosa* Δ *plaF* hoch abundant gefunden, wobei PstC als membranverankertes Protein an der Porenbildung beteiligt ist und PstB als ATP-abhängige Permease an der Energiefreisetzung involviert ist (Lamarche *et al.*, 2008). Neben der Funktion als Transporter reguliert das Pst-System zusammen mit dem Negativ-Regulator PhoU auch die Aktivität des PhoR/PhoB-Zweikomponentensystems. Sobald die Phosphatkonzentration im Überschuss vorliegt, nimmt der ABC-Transporter eine geöffnete Konformation ein, sodass PhoU an die Histidinkinase PhoR bindet und die Kinaseaktivität inhibiert wird. Entsprechend liegt das Regulator-Protein PhoB dephosphoryliert vor und kann infolgedessen nicht als Transkriptionsfaktor die Genexpression unter anderem des *pst*-Operons initiieren. Ist die Phosphatkonzentration jedoch zu niedrig, ändert das Pst-System seine Konformation, sodass PhoU sich von PhoR löst und das Zweikomponentensystem PhoR/PhoB aktiviert wird (Vuppada *et al.*, 2018). Grundsätzlich gibt es diverse Beispiele, die zeigen, dass Substrate oder auch ABC-Transporter im Komplex mit Substraten zur Aktivierung bzw. Inaktivierung von Zweikomponentensystemen führen können (Zeng & Charkowski, 2021). Diese sind, zum Beispiel, das Substrat-bindende Protein AatJ (Aminosäure-Transport), welches das Zweikomponentensystem AauSR in *Pseudomonas syringae* reguliert (Yan *et al.*, 2020) oder das Zucker-bindende Protein ChvE (Zucker-Transport), das mit dem Zweikomponentensystem VirAG im *Agrobacterium tumefaciens* interagiert, um Virulenz-assoziierte Gene zu aktivieren (Hu *et al.*, 2013).

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Arbeit, welche bedeutende Funktion die membranverankerte Phospholipase PlaF in *P. aeruginosa* einnimmt. Zahlreiche regulatorische Prozesse und Mechanismen, die maßgeblich wichtig für die Biofilmbildung sind, wurden anhand der Proteomanalyse identifiziert. Hauptsächlich wurden dabei hoch und niedrig abundante Proteine aus Zweikomponentensystemen, aus Transportsystemen, der Eisenhomöostase, der Taxis-vermittelnde Motilität, der c-di-GMP-Homöostase sowie Membranlipidhomöostase identifiziert (Abbildung 4.1).

Im Rahmen einer Infektionsstudie wies *P. aeruginosa* Δ *plaF* eine deutlich verminderte Virulenz im Vergleich zum *P. aeruginosa* Wildtyp auf (Bleffert *et al.*, 2022). Wie bereits erwähnt konnten mithilfe von Wachstumsanalysen unter Laborbedingungen aber auch unter Stressbedingungen gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* Δ *plaF* zwar verzögerte *lag*-Phasen zu Beginn aufwies, jedoch im weiteren Verlauf leicht höhere Wachstumsraten erreichte als *P. aeruginosa* WT (Abbildung 3.2-Abbildung 3.4). Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass die Deletion von *plaF* keinen Einfluss auf den Primärstoffwechsel bzw. auf die bakterielle Fitness von *P. aeruginosa* im Allgemeinen einnimmt. Zusammen mit den Ergebnissen der Infektionsstudie lässt sich die

Annahme ableiten, dass PlaF als ein weiterer Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* anzusehen ist. In *P. aeruginosa* wurden bereits andere Phospholipasen wie beispielsweise ExoU (Allewelt *et al.*, 2000) oder PlcH (Kida *et al.*, 2011) als Virulenzfaktoren, welche nachweislich eukaryotische Phospholipide als Substrate hydrolysieren, charakterisiert. Im Gegensatz zu PlaF handelt es sich bei diesen Phospholipasen um sekretierte Virulenzfaktoren, wobei PlcH ins äußere Milieu sekretiert wird und ExoU als Effektorprotein in die Wirtszelle injiziert wird (Constantino-Teles *et al.*, 2022). Da PlaF in der Zytoplasmamembran von *P. aeruginosa* verankert vorliegt (Bleffert *et al.*, 2022), wird ein direkter Kontakt zur Wirtszelle bzw. zu potentiellen eukaryotischen Phospholipiden als Substrate eher als unwahrscheinlich betrachtet. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass PlaF indirekt Virulenz-assoziierte Prozesse durch die Modifikation der Membranlipidzusammensetzung steuert. Die Membranlipidzusammensetzung, die durch PlaF erwiesenermaßen beeinflusst wurde, stellt ein wichtiges Kriterium für die Funktionalität und Vernetzung der einzelnen Prozesse dar (Abbildung 4.1). Die hier erzielten Ergebnisse bieten neue Erkenntnisse zur physiologischen Funktion von PlaF und tragen zur Grundlagenforschung bei, die die Entwicklung neuer antivirulenter Therapien vorantreiben kann.

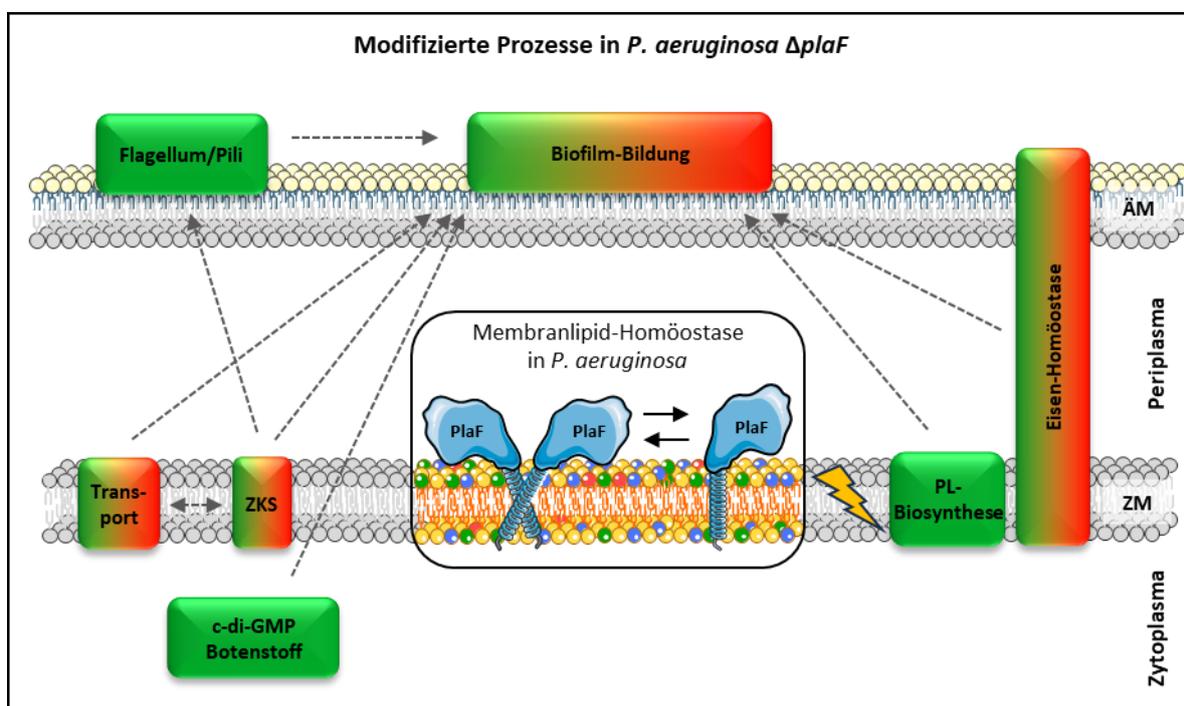


Abbildung 4.1: Schematisches Modell für das Zusammenspiel zwischen PlaF, PL-Modifizierung und Biofilmwegen.

Die Beteiligung von PlaF an der intakten Membranlipidhomöostase durch Monomer-Dimerbildung ist in der Mitte der Abbildung dargestellt (Kasten). Die genomische *plaF*-Deletion hat zur Folge, dass die Membranlipidhomöostase gestört ist (Blitz, Phospholipide in grau) und dadurch zahlreiche Biofilm-assoziierte Proteine und Mechanismen wie beispielsweise ABC-Transporter, Zweikomponentensysteme (ZKS), Phospholipid (PL)-Biosynthese, Taxis-vermittelnde Proteine (Flagellum/Pili), c-di-GMP-assoziierte Proteine und Eisen-Homöostase beeinflusst sind. Hoch bzw. niedrig abundante Proteine/Systeme wurden in grün bzw. rot

dargestellt. Die Abbildung wurde teilweise mithilfe von Objekten von *Servier Medical Art* (Tabelle 2.18) erstellt. Die modifizierten Objekte sind unter der „*Creative Commons Attribution 3.0 unported license*“ lizenziert (CC BY 3.0). Abbildung in Anlehnung nach Caliskan *et al.* (2023).

5 Literaturverzeichnis

Adams, F. G., Trappetti, C., Waters, J. K., Zang, M., Brazel, E. B., Paton, J. C., Snel, M. F. & Eijkelkamp, B. A. (2021). To make or take: bacterial lipid homeostasis during infection. *MBio*, *12*(3), e0092821, doi: 10.1128/mBio.00928-21.

Akhtar, A. A. & Turner, D. P. (2022). The role of bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and virulence: therapeutic and vaccine potential. *Microb Pathog*, *171*, 105734, doi: 10.1016/j.micpath.2022.105734.

Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, *2*(8), 675-680, doi: 10.1038/90609.

Al-Wrafiy, F., Brzozowska, E., Gorska, S. & Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, *71*(0), 78-91, doi: 10.5604/01.3001.0010.3792.

Ali, Y. B., Verger, R. & Abousalham, A. (2012). Lipases or esterases: does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. *Methods Mol Biol*, *861*, 31-51, doi: 10.1007/978-1-61779-600-5_2.

Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P. & Pier, G. B. (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun*, *68*(7), 3998-4004, doi: 10.1128/IAI.68.7.3998-4004.2000.

Anderson, D. M., Schmalzer, K. M., Sato, H., Casey, M., Terhune, S. S., Haas, A. L., Feix, J. B. & Frank, D. W. (2011). Ubiquitin and ubiquitin-modified proteins activate the

Pseudomonas aeruginosa T3SS cytotoxin, ExoU. *Mol Microbiol*, *82*(6), 1454-1467, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07904.x.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, *27*(2-3), 215-237, doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X.

Armstrong, C. R. & Senes, A. (2016). Screening for transmembrane association in divisome proteins using TOXGREEN, a high-throughput variant of the TOXCAT assay. *Biochim Biophys Acta*, *1858*(11), 2573-2583, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.07.008.

Audemard-Verger, A., Descloux, E., Ponard, D., Deroux, A., Fantin, B., Fieschi, C., John, M., Bouldouyre, A., Karkowski, L., Moulis, G., Auvinet, H., Valla, F., Lechiche, C., Davido, B., Martinot, M., Biron, C., Lucht, F., Asseray, N., Froissart, A., Buzele, R., Perlat, A., Boutboul, D., Fremeaux-Bacchi, V., Isnard, S. & Bienvenu, B. (2016). Infections revealing complement deficiency in adults: a french nationwide study enrolling 41 patients. *Medicine (Baltimore)*, *95*(19), e3548, doi: 10.1097/MD.0000000000003548.

Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J. I., Givskov, M. & Hoiby, N. (2002). Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother*, *46*(11), 3406-3411, doi: 10.1128/aac.46.11.3406-3411.2002.

Bains, M., Fernandez, L. & Hancock, R. E. (2012). Phosphate starvation promotes swarming motility and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, *78*(18), 6762-6768, doi: 10.1128/AEM.01015-12.

- Baker, A. E., Diepold, A., Kuchma, S. L., Scott, J. E., Ha, D. G., Orazi, G., Armitage, J. P. & O'Toole, G. A. (2016).** PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 198(13), 1837-1846, doi: 10.1128/JB.00196-16.
- 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, doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04189.x.
- Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M. A., Ramos-Gonzalez, M. I. & Espinosa-Urgel, M. (2020).** Arginine as an environmental and metabolic cue for cyclic diguanylate signalling and biofilm formation in *Pseudomonas putida*. *Sci Rep*, 10(1), 13623, doi: 10.1038/s41598-020-70675-x.
- Beckert, U., Wolter, S., Hartwig, C., Bahre, H., Kaefer, V., Ladant, D., Frank, D. W. & Seifert, R. (2014).** ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 450(1), 870-874, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.088.
- Belas, R. (2014).** Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol*, 22(9), 517-527, doi: 10.1016/j.tim.2014.05.002.
- 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, doi: 10.1371/journal.pone.0108478.
- Benamara, H., Rihouey, C., Jouenne, T. & Alexandre, S. (2011).** Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*, 1808(1), 98-105, doi: 10.1016/j.bbamem.2010.09.004.
- Bertani, B. & Ruiz, N. (2018).** Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1), doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.
- Bertrand, R. L. (2019).** Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *J Bacteriol*, 201(7), e00697-00618, doi: 10.1128/JB.00697-18.
- Best, J. T., Xu, P. & Graham, T. R. (2019).** Phospholipid flippases in membrane remodeling and transport carrier biogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 59, 8-15, doi: 10.1016/j.ceb.2019.02.004.
- Bitzenhofer, N. L., Kruse, L., Thies, S., Wynands, B., Lechtenberg, T., Ronitz, J., Kozaeva, E., Wirth, N. T., Eberlein, C., Jaeger, K.-E., Nikel, P. I., Heipieper, H. J., Wierckx, N. & Loeschcke, A. (2021).** Towards robust *Pseudomonas* cell factories to harbour novel biosynthetic pathways. *Essays Biochem*, 65(2), 319-336, doi: 10.1042/EBC20200173.
- Bleffert, F., Granzin, J., Caliskan, M., Schott-Verdugo, S. N., Siebers, M., Thiele, B., Rahme, L. G., Felgner, S., Dormann, P., Gohlke, H., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E. & Kovacic, F. (2022).** Structural, mechanistic and physiological insights into phospholipase A-mediated membrane phospholipid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife*, 11, e72824, doi: 10.7554/eLife.72824.
- Bleffert, F., Granzin, J., Gohlke, H., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E. & Kovacic, F. (2019).** *Pseudomonas aeruginosa* esterase PA2949, a bacterial homolog of the human membrane esterase ABHD6: expression, purification and crystallization. *Acta*

Crystallogr F Struct Biol Commun, 75(Pt 4), 270-277, doi: 10.1107/S2053230X19002152.

Bleves, S., Sana, T. G. & Voulhoux, R. (2014). The target cell genus does not matter. *Trends Microbiol*, 22(6), 304-306, doi: 10.1016/j.tim.2014.04.011.

Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 5(2), 279-313, doi: 10.1093/clinids/5.2.279.

Bordi, C. & de Bentzmann, S. (2011). Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Ann Intensive Care*, 1(1), 19, doi: 10.1186/2110-5820-1-19.

Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J. & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 75(4), 827-842, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.

Bramkamp, M. & Lopez, D. (2015). Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 79(1), 81-100, doi: 10.1128/MMBR.00036-14.

Bridges, A. A. & Bassler, B. L. (2021). Inverse regulation of *Vibrio cholerae* biofilm dispersal by polyamine signals. *Elife*, 10, e65487, doi: 10.7554/eLife.65487.

Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol*, 66, 493-520, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150055.

Butler, M. S. & Paterson, D. L. (2020). Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019. *J Antibiot (Tokyo)*, 73(6), 329-364, doi: 10.1038/s41429-020-0291-8.

Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Ma,

L., Ralston, B., Parsek, M. R., Anderson, E. M., Lam, J. S. & Wozniak, D. J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol*, 73(4), 622-638, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x.

Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2004). SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol*, 186(14), 4476-4485, doi: 10.1128/JB.186.14.4476-4485.2004.

Caliskan, M. (2016). Protein-protein interaction studies of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase A PlbF. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, Masterarbeit.

Caliskan, M., Poschmann, G., Gudzuhn, M., Waldera-Lupa, D., Molitor, R., Strunk, C. H., Streit, W. R., Jaeger, K.-E., Stuhler, K. & Kovacic, F. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* responds to altered membrane phospholipid composition by adjusting the production of two-component systems, proteases and iron uptake proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1868(6), 159317, doi: 10.1016/j.bbalip.2023.159317.

Camara, M., Green, W., MacPhee, C. E., Rakowska, P. D., Raval, R., Richardson, M. C., Slater-Jefferies, J., Steventon, K. & Webb, J. S. (2022). Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 8(1), 42, doi: 10.1038/s41522-022-00306-y.

Campbell, J. W. & Cronan, J. E., Jr. (2002). The enigmatic *Escherichia coli* *fadE* gene is *yafH*. *J Bacteriol*, 184(13), 3759-3764, doi: 10.1128/JB.184.13.3759-3764.2002.

- Candido Cacador, N., Paulino da Costa Capizzani, C., Gomes Monteiro Marin Torres, L. A., Galetti, R., Ciofu, O., da Costa Darini, A. L. & Hoiby, N. (2018).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the chronic phenotype by mutations in the *algTmucABD* operon in isolates from Brazilian cystic fibrosis patients. *PLoS One*, 13(11), e0208013, doi: 10.1371/journal.pone.0208013.
- Cant, N., Pollock, N. & Ford, R. C. (2014).** CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 52, 15-25, doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.004.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. & Rahme, L. G. (2001).** A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14613-14618, doi: 10.1073/pnas.251465298.
- Cazzola, H., Lemaire, L., Acket, S., Prost, E., Duma, L., Erhardt, M., Cechova, P., Trouillas, P., Mohareb, F., Rossi, C. & Rossez, Y. (2020).** The impact of plasma membrane lipid composition on flagellum-mediated adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *mSphere*, 5(5), e00702-00720, doi: 10.1128/mSphere.00702-20.
- Charlier, D. & Bervoets, I. (2019).** Regulation of arginine biosynthesis, catabolism and transport in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, 51(8), 1103-1127, doi: 10.1007/s00726-019-02757-8.
- Chekabab, S. M., Harel, J. & Dozois, C. M. (2014).** Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence*, 5(8), 786-793, doi: 10.4161/viru.29307.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilleley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Dufour, A. & Cornelis, P. (2018).** Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1862(7), 706-721, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.04.008.
- Choi, C. C. & Ford, R. C. (2021).** ATP binding cassette importers in eukaryotic organisms. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 96(4), 1318-1330, doi: 10.1111/brv.12702.
- Choi, K. H. & Schweizer, H. P. (2006).** mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc*, 1(1), 153-161, doi: 10.1038/nprot.2006.24.
- Coffey, B. M. & Anderson, G. G. (2014).** Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods Mol Biol*, 1149, 631-641, doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_48.
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C. & Parsek, M. R. (2011).** The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*, 7(1), e1001264, doi: 10.1371/journal.ppat.1001264.
- Consortium, T. U. (2022).** UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531, doi: 10.1093/nar/gkac1052.
- Constantino-Teles, P., Jouault, A., Touqui, L. & Saliba, A. M. (2022).** Role of host and bacterial lipids in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. *Front Immunol*, 13, 931027, doi: 10.3389/fimmu.2022.931027.
- Contreras, F. X., Ernst, A. M., Wieland, F. & Brugger, B. (2011).** Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(6), a004705, doi: 10.1101/cshperspect.a004705.

- Cornelis, P. & Dingemans, J. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 75, doi: 10.3389/fcimb.2013.00075.
- Cornelis, P., Matthijs, S. & Van Oeffelen, L. (2009).** Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*, 22(1), 15-22, doi: 10.1007/s10534-008-9193-0.
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M. & Waksman, G. (2015).** Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 13(6), 343-359, doi: 10.1038/nrmicro3456.
- Craig, L., Pique, M. E. & Tainer, J. A. (2004).** Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, 2(5), 363-378, doi: 10.1038/nrmicro885.
- Cronan, J. E., Jr. (2002).** Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 5(2), 202-205, doi: 10.1016/s1369-5274(02)00297-7.
- Cui, J. & Davidson, A. L. (2011).** ABC solute importers in bacteria. *Essays Biochem*, 50(1), 85-99, doi: 10.1042/bse0500085.
- da Mata Madeira, P. V., Zouhir, S., Basso, P., Neves, D., Laubier, A., Salacha, R., Blevés, S., Faudry, E., Contreras-Martel, C. & Dessen, A. (2016).** Structural basis of lipid targeting and destruction by the Type V secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol*, 428(9 Pt A), 1790-1803, doi: 10.1016/j.jmb.2016.03.012.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S. & Ramphal, R. (2003).** A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 50(3), 809-824, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03740.x.
- 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, doi: 10.1126/science.280.5361.295.
- Davis, M. T. & Silbert, D. F. (1974).** Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta*, 373(2), 224-241, doi: 10.1016/0005-2736(74)90147-3.
- de Bentzmann, S., Giraud, C., Bernard, C. S., Calderon, V., Ewald, F., Plesiat, P., Nguyen, C., Grunwald, D., Attree, I., Jeannot, K., Fauvarque, M. O. & Bordi, C. (2012).** Unique biofilm signature, drug susceptibility and decreased virulence in *Drosophila* through the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system PprAB. *PLoS Pathog*, 8(11), e1003052, doi: 10.1371/journal.ppat.1003052.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2004).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(5), 1339-1344, doi: 10.1073/pnas.0307694100.
- Diaz-Perez, S. P., Solis, C. S., Lopez-Bucio, J. S., Valdez Alarcon, J. J., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H. & Campos-Garcia, J. (2022).** Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm-associated is dependent on the pyoverdine and pyocyanin siderophores by quorum sensing modulation. *Microb Ecol*, 86(1), 727-741, doi: 10.1007/s00248-022-02095-5.
- Dowhan, W. (1997).** Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*, 66,

199-232, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.199.

Drake, E. J. & Gulick, A. M. (2011). Structural characterization and high-throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis. *ACS Chem Biol*, 6(11), 1277-1286, doi: 10.1021/cb2002973.

Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E. & Briandet, R. (2016). The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Front Microbiol*, 7, 1673, doi: 10.3389/fmicb.2016.01673.

Ducret, V., Perron, K. & Valentini, M. (2022). Role of two-component system networks in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 1386, 371-395, doi: 10.1007/978-3-031-08491-1_14.

Dugaiczyk, A., Boyer, H. W. & Goodman, H. M. (1975). Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol*, 96(1), 171-184, doi: 10.1016/0022-2836(75)90189-8.

Dumas, Z., Ross-Gillespie, A. & Kummerli, R. (2013). Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. *Proc Biol Sci*, 280(1764), 20131055, doi: 10.1098/rspb.2013.1055.

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, doi: 10.1016/0003-2697(86)90207-1.

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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(6), 2583-2593, doi: 10.1007/s00253-018-8832-9.

Epand, R. F., Pollard, J. E., Wright, J. O., Savage, P. B. & Epand, R. M. (2010). Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9), 3708-3713, doi: 10.1128/AAC.00380-10.

Erdmann, J., Thoming, J. G., Pohl, S., Pich, A., Lenz, C. & Haussler, S. (2019). The core proteome of biofilm-grown clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Cells*, 8(10), 1129, doi: 10.3390/cells8101129.

Everett, M. J. & Davies, D. T. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discov Today*, 26(9), 2108-2123, doi: 10.1016/j.drudis.2021.02.026.

Fahy, E., Sud, M., Cotter, D. & Subramaniam, S. (2007). LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res*, 35, W606-612, doi: 10.1093/nar/gkm324.

Fair, R. J. & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*, 6, 25-64, doi: 10.4137/PMC.S14459.

Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J. Y., Gangloff, S., Schalk, I. J. & Geoffroy, V. A. (2014). Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environ Microbiol Rep*, 6(5), 459-467, doi: 10.1111/1758-2229.12146.

Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P. P., Galan, J. E., Flavell, R. A. & Alexopoulou, L. (2006). Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

103(33), 12487-12492, doi: 10.1073/pnas.0605200103.

Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. & Frank, D. W. (1997). ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol*, 25(3), 547-557, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4891851.x.

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, doi: 10.1128/MMBR.00082-15.

Francis, V. I., Stevenson, E. C. & Porter, S. L. (2017). Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 364(11), fnx104, doi: 10.1093/femsle/fnx104.

Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T. & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*, 2, 167, doi: 10.3389/fmicb.2011.00167.

Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol*, 192(14), 3553-3564, doi: 10.1128/JB.00363-10.

Fulcher, N. B., Holliday, P. M., Klem, E., Cann, M. J. & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol Microbiol*, 76(4), 889-904, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07135.x.

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, D261-269, doi: 10.1093/nar/gku1223.

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, doi: 10.1128/iai.61.4.1180-1184.1993.

Garcia, D., Orillard, E., Johnson, M. S. & Watts, K. J. (2017). Gas Sensing and Signaling in the PAS-Heme Domain of the *Pseudomonas aeruginosa* Aer2 Receptor. *J Bacteriol*, 199(18), JB.00003-00017, doi: 10.1128/JB.00003-17.

Garcia, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J. C., Si-Tahar, M., Bernard, F. X. & Bodet, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence*, 9(1), 1163-1175, doi: 10.1080/21505594.2018.1480830.

Gaynes, R., Edwards, J. R. & National Nosocomial Infections Surveillance, S. (2005). Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*, 41(6), 848-854, doi: 10.1086/432803.

Geiger, O., Sohlenkamp, C., Vera-Cruz, D., Medeot, D. B., Martinez-Aguilar, L., Sahonero-Canavesi, D. X., Weidner, S., Puhler, A. & Lopez-Lara, I. M. (2021). ExoS/ChvI two-component signal-transduction system activated in the absence of bacterial phosphatidylcholine. *Front Plant Sci*, 12, 678976, doi: 10.3389/fpls.2021.678976.

Giraud, C., Bernard, C. S., Calderon, V., Yang, L., Filloux, A., Molin, S., Fichant, G., Bordi, C.

- & de Bentzmann, S. (2011).** The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae. *Environ Microbiol*, 13(3), 666-683, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02372.x.
- Glatzova, D., Mavila, H., Saija, M. C., Chum, T., Cwiklik, L., Brdicka, T. & Cebecauer, M. (2021).** The role of prolines and glycine in the transmembrane domain of LAT. *FEBS J*, 288(13), 4039-4052, doi: 10.1111/febs.15713.
- Goedhart, J. & Luijsterburg, M. S. (2020).** VolcanoNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci Rep*, 10(1), 20560, doi: 10.1038/s41598-020-76603-3.
- Guilbaud, M., Bruzaud, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., Monnet, V., Herry, J. M., Chevalier, S. & Bellon-Fontaine, M. N. (2017).** Proteomic response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhering to solid surfaces. *Front Microbiol*, 8, 1465, doi: 10.3389/fmicb.2017.01465.
- Haiko, J. & Westerlund-Wikstrom, B. (2013).** The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*, 2(4), 1242-1267, doi: 10.3390/biology2041242.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108, doi: 10.1038/nrmicro821.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D. & Grant, G. D. (2016).** Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)*, 8(8), 236, doi: 10.3390/toxins8080236.
- Hancock, R. E. (1998).** Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*, 27 Suppl 1, S93-99, doi: 10.1086/514909.
- Hannauer, M., Schafer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G. L., Budzikiewicz, H. & Schalk, I. J. (2012).** Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Lett*, 586(1), 96-101, doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.004.
- Hartmann, R., Jeckel, H., Jelli, E., Singh, P. K., Vaidya, S., Bayer, M., Rode, D. K. H., Vidakovic, L., Diaz-Pascual, F., Fong, J. C. N., Dragos, A., Lamprecht, O., Thoming, J. G., Netter, N., Haussler, S., Nadell, C. D., Sourjik, V., Kovacs, A. T., Yildiz, F. H. & Drescher, K. (2021).** Quantitative image analysis of microbial communities with BiofilmQ. *Nat Microbiol*, 6(2), 151-156, doi: 10.1038/s41564-020-00817-4.
- Hauser, A. R. (2009).** The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, 7(9), 654-665, doi: 10.1038/nrmicro2199.
- Heitzer, M. (2019).** Komplementation und physiologische Charakterisierung einer Phospholipase-defizienten Mutante von *Pseudomonas aeruginosa*. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, Bachelorarbeit.
- Hengge, R. (2009).** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7(4), 263-273, doi: 10.1038/nrmicro2109.
- 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, doi: 10.1128/jb.172.11.6557-6567.1990.

Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res Microbiol*, 152(3-4), 205-210, doi: 10.1016/s0923-2508(01)01193-7.

Hohlneicher, U., Schafer, M., Fuchs, R. & Budzikiewicz, H. (2001). Ferribactins as the biosynthetic precursors of the *Pseudomonas* siderophores pyoverdins. *Z Naturforsch C J Biosci*, 56(3-4), 308-310, doi: 10.1515/znc-2001-3-423.

Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev*, 43(1), 73-102, doi: 10.1128/mr.43.1.73-102.1979.

Holthuis, J. C. & Menon, A. K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, 510(7503), 48-57, doi: 10.1038/nature13474.

Howell, H. A., Logan, L. K. & Hauser, A. R. (2013). Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *MBio*, 4(2), e00032-00013, doi: 10.1128/mBio.00032-13.

Hu, X., Zhao, J., DeGrado, W. F. & Binns, A. N. (2013). *Agrobacterium tumefaciens* recognizes its host environment using ChvE to bind diverse plant sugars as virulence signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), 678-683, doi: 10.1073/pnas.1215033110.

Imperi, F. & Visca, P. (2013). Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: a membrane-associated "siderosome". *FEBS Lett*, 587(21), 3387-3391, doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.039.

Irie, Y., Borlee, B. R., O'Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J. & Parsek, M. R. (2012). Self-produced

exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(50), 20632-20636, doi: 10.1073/pnas.1217993109.

Jaeger, K.-E. & Kovacic, F. (2014). Determination of lipolytic enzyme activities. *Methods Mol Biol*, 1149, 111-134, doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_12.

Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., Secor, P. R., Tseng, B. S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L. & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(36), 11353-11358, doi: 10.1073/pnas.1503058112.

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, doi: 10.1016/j.chom.2014.04.010.

Jones, C. J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L. K., Xu, B., Limoli, D. H., Harrison, J. J., Parsek, M. R., White, P. & Wozniak, D. J. (2014). ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*, 10(3), e1003984, doi: 10.1371/journal.ppat.1003984.

Kaminski, A., Gupta, K. H., Goldufsky, J. W., Lee, H. W., Gupta, V. & Shafikhani, S. H. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS induces intrinsic apoptosis in target host cells in a manner that is dependent on its GAP domain activity. *Sci Rep*, 8(1), 14047, doi: 10.1038/s41598-018-32491-2.

Kang, D., Kirienko, D. R., Webster, P., Fisher, A. L. & Kirienko, N. V. (2018). Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*,

translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence*, 9(1), 804-817, doi: 10.1080/21505594.2018.1449508.

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* beta-oxidation operon. *Microbiology (Reading)*, 154(Pt 6), 1584-1598, doi: 10.1099/mic.0.2008/018135-0.

Kaplan, J. & Ward, D. M. (2013). The essential nature of iron usage and regulation. *Curr Biol*, 23(15), R642-646, doi: 10.1016/j.cub.2013.05.033.

Kehl, K., Schallenberg, A., Szekat, C., Albert, C., Sib, E., Exner, M., Zacharias, N., Schreiber, C., Parcina, M. & Bierbaum, G. (2022). Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. *Sci Total Environ*, 806(Pt 4), 151339, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151339.

Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C. & Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem*, 268(10), 7503-7508, doi: 10.1016/S0021-9258(18)53203-8.

Kida, Y., Shimizu, T. & Kuwano, K. (2011). Cooperation between LepA and PlcH contributes to the *in vivo* virulence and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect Immun*, 79(1), 211-219, doi: 10.1128/IAI.01053-10.

Kim, H. E., Shitashiro, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H. & Kato, J. (2006). Identification and characterization of the chemotactic transducer in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for positive chemotaxis to trichloroethylene. *J Bacteriol*, 188(18), 6700-6702, doi: 10.1128/JB.00584-06.

King, J. D., Kocincova, D., Westman, E. L. & Lam, J. S. (2009). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun*, 15(5), 261-312, doi: 10.1177/1753425909106436.

Kintz, E. & Goldberg, J. B. (2008). Regulation of lipopolysaccharide O antigen expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol*, 3(2), 191-203, doi: 10.2217/17460913.3.2.191.

Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F. & Fritz, H. J. (1995). Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *EMBO J*, 14(16), 3895-3904, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00061.x.

Konings, A. F., Martin, L. W., Sharples, K. J., Roddam, L. F., Latham, R., Reid, D. W. & Lamont, I. L. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple pathways to acquire iron during chronic infection in cystic fibrosis lungs. *Infect Immun*, 81(8), 2697-2704, doi: 10.1128/IAI.00418-13.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(4), a010306, doi: 10.1101/cshperspect.a010306.

Kovacic, F. (2010). Novel phospholipases A of *Pseudomonas aeruginosa* biochemical characterisation and cellular localisation. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, Dissertation.

Kovacic, 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, doi: 10.1002/2211-5463.12061.

Kovacic, F., Granzin, J., Wilhelm, S., Kojic-Prodic, 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, doi: 10.1371/journal.pone.0069125.

Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. & Rooijackers, S. H. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol*, 188(1), 386-393, doi: 10.4049/jimmunol.1102162.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685, doi: 10.1038/227680a0.

Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crepin, S. & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(3), 461-473, doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x.

Lambraki, I. A., Cousins, M., Graells, T., Leger, A., Henriksson, P., Harbarth, S., Troell, M., Wernli, D., Sogaard Jorgensen, P., Desbois, A. P., Carson, C. A., Parmley, E. J. & Majowicz, S. E. (2022). Factors influencing antimicrobial resistance in the European food system and potential leverage points for intervention: a participatory, One Health study. *PLoS One*, 17(2), e0263914, doi: 10.1371/journal.pone.0263914.

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, doi: 10.1073/pnas.092016999.

Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P., Montanaro, M., Paoletti, S., Visca, P. & Ippolito, G. (2011). Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. *PLoS One*, 6(2), e17064, doi: 10.1371/journal.pone.0017064.

Leddon, S. A., Fettis, M. M., Abramo, K., Kelly, R., Oleksyn, D. & Miller, J. (2020). The CD28 transmembrane domain contains an essential dimerization motif. *Front Immunol*, 11, 1519, doi: 10.3389/fimmu.2020.01519.

Lee, J. & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6(1), 26-41, doi: 10.1007/s13238-014-0100-x.

Lee, Y., Song, S., Sheng, L., Zhu, L., Kim, J. S. & Wood, T. K. (2018). Substrate binding protein DppA1 of ABC transporter DppBCDF increases biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting Pf5 prophage lysis. *Front Microbiol*, 9, 30, doi: 10.3389/fmicb.2018.00030.

Lerouge, I. & Vanderleyden, J. (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev*, 26(1), 17-47, doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x.

Lewenza, S., Charron-Mazenod, L., Afroj, S. & van Tilburg Bernardes, E. (2017). Hyperbiofilm phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* defective for the PlcB and PlcN secreted phospholipases. *Can J Microbiol*, 63(9), 780-787, doi: 10.1139/cjm-2017-0244.

Li, Q., Mao, S., Wang, H. & Ye, X. (2022). The molecular architecture of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Mar Drugs*, 20(8), 488, doi: 10.3390/md20080488.

- Li, S., Lou, X., Xu, Y., Teng, X., Liu, R., Zhang, Q., Wu, W., Wang, Y. & Bartlam, M. (2019).** Structural basis for the recognition of MucA by MucB and AlgU in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J*, 286(24), 4982-4994, doi: 10.1111/febs.14995.
- Lin, T. Y. & Weibel, D. B. (2016).** Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(10), 4255-4267, doi: 10.1007/s00253-016-7468-x.
- Liu, Q., Yeo, W. S. & Bae, T. (2016).** The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)*, 7(10), 81, doi: 10.3390/genes7100081.
- Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C. & Bitter, W. (2006).** The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 188(5), 1882-1891, doi: 10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006.
- Lopez, D. & Koch, G. (2017).** Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Curr Opin Microbiol*, 36, 76-84, doi: 10.1016/j.mib.2017.02.001.
- Luttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K. & Gorke, B. (2009).** Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 72(4), 978-994, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06704.x.
- Marielle, B. & Sarrah, G. (2017).** Assessment of bacterial membrane fluidity by flow cytometry. *J Microbiol Methods*, 143, 50-57, doi: 10.1016/j.mimet.2017.10.005.
- 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(Pt 1), 305-315, doi: 10.1099/mic.0.023531-0.
- McGrath, S., Wade, D. S. & Pesci, E. C. (2004).** Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett*, 230(1), 27-34, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00849-8.
- 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, doi: 10.1128/JB.182.10.2702-2708.2000.
- McLaughlin, H. P., Caly, D. L., McCarthy, Y., Ryan, R. P. & Dow, J. M. (2012).** An orphan chemotaxis sensor regulates virulence and antibiotic tolerance in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 7(8), e42205, doi: 10.1371/journal.pone.0042205.
- McMahon, H. T. & Boucrot, E. (2015).** Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci*, 128(6), 1065-1070, doi: 10.1242/jcs.114454.
- McPhee, J. B., Lewenza, S. & Hancock, R. E. (2003).** Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 50(1), 205-217, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x.
- Mern, D. S., Ha, S. W., Khodaverdi, V., Gliese, N. & Gorisch, H. (2010).** A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators. *Microbiology*, 156(Pt 5), 1505-1516, doi: 10.1099/mic.0.032847-0.

- Miller, J. K., Badawy, H. T., Clemons, C., Kreider, K. L., Wilber, P., Milsted, A. & Young, G. (2012).** Development of the *Pseudomonas aeruginosa* mushroom morphology and cavity formation by iron-starvation: a mathematical modeling study. *J Theor Biol*, 308, 68-78, doi: 10.1016/j.jtbi.2012.05.029.
- Minandri, F., Imperi, F., Frangipani, E., Bonchi, C., Visaggio, D., Facchini, M., Pasquali, P., Bragonzi, A. & Visca, P. (2016).** Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. *Infect Immun*, 84(8), 2324-2335, doi: 10.1128/IAI.00098-16.
- Moore, D. T., Berger, B. W. & DeGrado, W. F. (2008).** Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure*, 16(7), 991-1001, doi: 10.1016/j.str.2008.05.007.
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C. D., Goldberg, J. B. & Bassler, B. L. (2017).** The RhIR *quorum-sensing* receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS Pathog*, 13(7), e1006504, doi: 10.1371/journal.ppat.1006504.
- Mulchandani, R., Wang, Y., Gilbert, M. & Van Boeckel, T. P. (2023).** Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. *PLOS Glob Public Health*, 3(2), e0001305, doi: 10.1371/journal.pgph.0001305.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273, doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Nigaud, Y., Cosette, P., Collet, A., Song, P. C., Vaudry, D., Vaudry, H., Junter, G. A. & Jouenne, T. (2010).** Biofilm-induced modifications in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1804(4), 957-966, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.008.
- O'Connor, J. R., Kuwada, N. J., Huangyutitham, V., Wiggins, P. A. & Harwood, C. S. (2012).** Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol Microbiol*, 86(3), 720-729, doi: 10.1111/mmi.12013.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 30(2), 295-304, doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
- Ochsner, U. A. & Vasil, M. L. (1996).** Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 4409-4414, doi: 10.1073/pnas.93.9.4409.
- Ohashi, Y. (2021).** Activation mechanisms of the VPS34 complexes. *Cells*, 10(11), 3124, doi: 10.3390/cells10113124.
- Orla-Jensen, S. (1921).** The main lines of the natural bacterial system. *J Bacteriol*, 6(3), 263-273, doi: 10.1128/jb.6.3.263-273.1921.
- 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, doi: 10.1128/jb.172.10.5915-5923.1990.
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A. & de Vries, R. P. (2016).** Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 237, 17-27, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007.

- Palleroni, N. J. (1993).** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *64*(3-4), 231-251, doi: 10.1007/BF00873084.
- Park, A. J., Murphy, K., Krieger, J. R., Brewer, D., Taylor, P., Habash, M. & Khursigara, C. M. (2014).** A temporal examination of the planktonic and biofilm proteome of whole cell *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 using quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, *13*(4), 1095-1105, doi: 10.1074/mcp.M113.033985.
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H. & Lee, J. O. (2009).** The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, *458*(7242), 1191-1195, doi: 10.1038/nature07830.
- Patel, H. M. & Walsh, C. T. (2001).** *In vitro* reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and *N*-methyltransferase activities. *Biochemistry*, *40*(30), 9023-9031, doi: 10.1021/bi010519n.
- 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, doi: 10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A. & Gitai, Z. (2015).** Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(24), 7563-7568, doi: 10.1073/pnas.1502025112.
- Petrova, O. E. & Sauer, K. (2009).** A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathog*, *5*(11), e1000668, doi: 10.1371/journal.ppat.1000668.
- Petrova, O. E. & Sauer, K. (2016).** Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol*, *30*, 67-78, doi: 10.1016/j.mib.2016.01.004.
- 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, doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.012.
- Rabin, S. D. & Hauser, A. R. (2003).** *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, a toxin transported by the type III secretion system, kills *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect Immun*, *71*(7), 4144-4150, doi: 10.1128/IAI.71.7.4144-4150.2003.
- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C. & Freire, D. M. (2011).** Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Bioresour Technol*, *102*(11), 6377-6384, doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.074.
- Rice, A. J., Park, A. & Pinkett, H. W. (2014).** Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *49*(5), 426-437, doi: 10.3109/10409238.2014.953626.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. & Foglino, M. (2000).** Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol*, *8*(11), 498-504, doi: 10.1016/s0966-842x(00)01833-3.
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W. & Hinton, J. C. (2012).** *Lag* phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J Bacteriol*, *194*(3), 686-701, doi: 10.1128/JB.06112-11.

- Rollet, C., Gal, L. & Guzzo, J. (2009).** Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 290(2), 135-142, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x.
- Romling, U. & Balsalobre, C. (2012).** Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*, 272(6), 541-561, doi: 10.1111/joim.12004.
- Ronnebaum, T. A. & Lamb, A. L. (2018).** Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. *Curr Opin Struct Biol*, 53, 1-11, doi: 10.1016/j.sbi.2018.01.015.
- Rowlett, V. W., Mallampalli, V. K. P. S., Karlstaedt, A., Dowhan, W., Taegtmeier, H., Margolin, W. & Vitrac, H. (2017).** Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. *J Bacteriol*, 199(13), e00849-00816, doi: 10.1128/JB.00849-16.
- Russ, W. P. & Engelman, D. M. (1999).** TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3), 863-868, doi: 10.1073/pnas.96.3.863.
- Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. A., Wai, S. N. & Mougous, J. D. (2013).** Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 496(7446), 508-512, doi: 10.1038/nature12074.
- Saint-Criq, V., Villeret, B., Bastaert, F., Kheir, S., Hatton, A., Cazes, A., Xing, Z., Sermet-Gaudelus, I., Garcia-Verdugo, I., Edelman, A. & Sallenave, J. M. (2018).** *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax*, 73(1), 49-61, doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210298.
- Sal-Man, N., Gerber, D., Bloch, I. & Shai, Y. (2007).** Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J Biol Chem*, 282(27), 19753-19761, doi: 10.1074/jbc.M610368200.
- Salacha, R., Kovacic, 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, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02174.x.
- Samatey, F. A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T. R., Thomas, D. R., Chen, J. Z., Derosier, D. J., Kitao, A. & Namba, K. (2004).** Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*, 431(7012), 1062-1068, doi: 10.1038/nature02997.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2006).** Transformation of *E. coli* by Electroporation. *CSH Protoc*, 2006(1), doi: 10.1101/pdb.prot3933.
- Sanger, F. & Coulson, A. R. (1975).** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94(3), 441-448, doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long,**

- R. M., Wiener-Kronish, J. & Sawa, T. (2003).** The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J*, 22(12), 2959-2969, doi: 10.1093/emboj/cdg290.
- 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), 1140-1154, doi: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3(6), 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- Schweizer, H. P. & Choi, K. H. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Arch Microbiol*, 193(3), 227-234, doi: 10.1007/s00203-010-0665-6.
- Sebastian, M., Smith, A. F., Gonzalez, J. M., Fredricks, H. F., Van Mooy, B., Koblizek, M., Brandsma, J., Koster, G., Mestre, M., Mostajir, B., Pitta, P., Postle, A. D., Sanchez, P., Gasol, J. M., Scanlan, D. J. & Chen, Y. (2016).** Lipid remodelling is a widespread strategy in marine heterotrophic bacteria upon phosphorus deficiency. *ISME J*, 10(4), 968-978, doi: 10.1038/ismej.2015.172.
- Seed, P. C., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1995).** Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol*, 177(3), 654-659, doi: 10.1128/jb.177.3.654-659.1995.
- Segura, A., Duque, E., Mosqueda, G., Ramos, J. L. & Junker, F. (1999).** Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ Microbiol*, 1(3), 191-198, doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00033.x.
- Seyedmohammad, S., Fuentealba, N. A., Marriott, R. A., Goetze, T. A., Edwardson, J. M., Barrera, N. P. & Venter, H. (2016).** Structural model of FeoB, the iron transporter from *Pseudomonas aeruginosa*, predicts a cysteine lined, GTP-gated pore. *Biosci Rep*, 36(2), e00322, doi: 10.1042/BSR20160046.
- Shevchenko, A. & Simons, K. (2010).** Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(8), 593-598, doi: 10.1038/nrm2934.
- Shigematsu, T., Fukushima, J., Oyama, M., Tsuda, M., Kawamoto, S. & Okuda, K. (2001).** Iron-mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, 45(8), 579-590, doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb01289.x.
- Shimizu, K. (2013).** Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on *Escherichia coli* metabolism. *ISRN Biochem*, 2013, 645983, doi: 10.1155/2013/645983.
- Shu, W. S. & Huang, L. N. (2022).** Microbial diversity in extreme environments. *Nat Rev Microbiol*, 20(4), 219-235, doi: 10.1038/s41579-021-00648-y.
- Siliakus, M. F., van der Oost, J. & Kengen, S. W. M. (2017).** Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 21(4), 651-670, doi: 10.1007/s00792-017-0939-x.
- Simon, R., Priefer, U. & Pöhler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Biotechnol*, 1, 784-791, doi: 10.1038/nbt1183-784.

- Simons, K. & Ikonen, E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572, doi: 10.1038/42408.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972).** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731, doi: 10.1126/science.175.4023.720.
- Skoczinski, P. (2016).** Single amino acid substitutions in lipase A affect its production and secretion by *Bacillus subtilis*. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, Dissertation.
- Slager, J. & Veening, J. W. (2016).** Hard-wired control of bacterial processes by chromosomal gene location. *Trends Microbiol*, 24(10), 788-800, doi: 10.1016/j.tim.2016.06.003.
- Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res*, 3(9), 2387-2398, doi: 10.1093/nar/3.9.2387.
- Sohlenkamp, C. & Geiger, O. (2016).** Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev*, 40(1), 133-159, doi: 10.1093/femsre/fuv008.
- Spencer, C. & Brown, H. A. (2015).** Biochemical characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase D. *Biochemistry*, 54(5), 1208-1218, doi: 10.1021/bi501291t.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. & Olson, M. V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964, doi: 10.1038/35023079.
- Strahl, H. & Errington, J. (2017).** Bacterial membranes: structure, domains, and function. *Annu Rev Microbiol*, 71, 519-538, doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095630.
- Strunk, C. H. (2020).** Biochemische Charakterisierung der Phospholipase PlaF aus *Pseudomonas aeruginosa* und ihres humanen Homologs ABHD6. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, Dissertation.
- Sultan, M., Arya, R. & Kim, K. K. (2021).** Roles of two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Int J Mol Sci*, 22(22), 12152, doi: 10.3390/ijms222212152.
- Szurmant, H., Bu, L., Brooks, C. L., 3rd & Hoch, J. A. (2008).** An essential sensor histidine kinase controlled by transmembrane helix interactions with its auxiliary proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15), 5891-5896, doi: 10.1073/pnas.0800247105.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N. & WHO. (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, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Takhar, H. K., Kemp, K., Kim, M., Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2013).** The platform protein is essential for type IV pilus

biogenesis. *J Biol Chem*, 288(14), 9721-9728, doi: 10.1074/jbc.M113.453506.

Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeno, A. & Ros, J. (2006). Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal Biochem*, 351(1), 149-151, doi: 10.1016/j.ab.2005.12.001.

Tanaka, K. J., Song, S., Mason, K. & Pinkett, H. W. (2018). Selective substrate uptake: the role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860(4), 868-877, doi: 10.1016/j.bbamem.2017.08.011.

Thi, M. T. T., Wibowo, D. & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci*, 21(22), 8671, doi: 10.3390/ijms21228671.

Thongbhubate, K., Nakafuji, Y., Matsuoka, R., Kakegawa, S. & Suzuki, H. (2021). Effect of spermidine on biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 203(10), e00652-00620, doi: 10.1128/JB.00652-20.

Toder, D. S., Ferrell, S. J., Nezezon, J. L., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1994). *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect Immun*, 62(4), 1320-1327, doi: 10.1128/iai.62.4.1320-1327.1994.

Toutain, C. M., Zegans, M. E. & O'Toole, G. A. (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187(2), 771-777, doi: 10.1128/JB.187.2.771-777.2005.

Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K. & Eberl, L. (2012). Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res*, 11(10), 4906-4915, doi: 10.1021/pr300395j.

Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K., Osvath, S. R., Carcamo-Oyarce, G., Gloag, E. S., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L. G., Cavaliere, R., Ahrens, C. H., Charles, I. G., Nomura, N., Eberl, L. & Whitchurch, C. B. (2016). Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun*, 7, 11220, doi: 10.1038/ncomms11220.

Turner, L., Ryu, W. S. & Berg, H. C. (2000). Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol*, 182(10), 2793-2801, doi: 10.1128/JB.182.10.2793-2801.2000.

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, doi: 10.1074/jbc.R115.711507.

Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A. & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Opin Microbiol*, 41, 15-20, doi: 10.1016/j.mib.2017.11.006.

Valentini, M., Laventie, B. J., Moscoso, J. A., Jenal, U. & Filloux, A. (2016). The diguanylate cyclase HsbD intersects with the HptB regulatory cascade to control *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and motility. *PLoS Genet*, 12(10), e1006354, doi: 10.1371/journal.pgen.1006354.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(2), 615-619, doi: 10.1073/pnas.76.2.615.

Vuppada, R. K., Hansen, C. R., Strickland, K. A. P., Kelly, K. M. & McCleary, W. R. (2018). Phosphate signaling through alternate conformations of the PstSCAB phosphate transporter. *BMC Microbiol*, 18(1), 8, doi: 10.1186/s12866-017-1126-z.

- Wagner, R. M., Kricks, L. & Lopez, D. (2017).** Functional membrane microdomains organize signaling networks in bacteria. *J Membr Biol*, 250(4), 367-378, doi: 10.1007/s00232-016-9923-0.
- Walsh, A. G., Matewish, M. J., Burrows, L. L., Monteiro, M. A., Perry, M. B. & Lam, J. S. (2000).** Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 35(4), 718-727, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01741.x.
- Wang, A. Y. & Cronan, J. E., Jr. (1994).** The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol Microbiol*, 11(6), 1009-1017, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00379.x.
- Wang, L., Fan, D., Chen, W. & Terentjev, E. M. (2015).** Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci Rep*, 5, 15159, doi: 10.1038/srep15159.
- Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. & Newman, D. K. (2011).** Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol*, 193(14), 3606-3617, doi: 10.1128/JB.00396-11.
- Weber, A., Kogl, S. A. & Jung, K. (2006).** Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(20), 7165-7175, doi: 10.1128/JB.00508-06.
- Weiler, A. J. (2021).** Physiologische und biochemische Charakterisierung einer neuen Phospholipase B aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, Dissertation.
- Weiler, A. J., Spitz, O., Gudzuhn, M., Schott-Verdugo, S. N., Kamel, M., Thiele, B., Streit, W. R., Kedrov, A., Schmitt, L., Gohlke, H. & Kovacic, F. (2022).** A phospholipase B from *Pseudomonas aeruginosa* with activity towards endogenous phospholipids affects biofilm assembly. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1867(4), 159101, doi: 10.1016/j.bbalip.2021.159101.
- Wilder, C. N., Diggle, S. P. & Schuster, M. (2011).** Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the *las*, *rhl* and *pqs* quorum-sensing systems. *ISME J*, 5(8), 1332-1343, doi: 10.1038/ismej.2011.13.
- Williams, B. J., Dehnbostel, J. & Blackwell, T. S. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*, 15(7), 1037-1056, doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x.
- 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, doi: 10.1128/jb.2.5.505-566.1917.
- 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, doi: 10.1093/nar/gkv1227.
- Withers, T. R., Yin, Y. & Yu, H. D. (2014).** Identification and characterization of a novel inhibitor of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis*, 70(2), 185-188, doi: 10.1111/2049-632X.12102.
- 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, doi: 10.1093/nar/17.9.3469.
- Xiao, G., He, J. & Rahme, L. G. (2006).** Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex *quorum-sensing* circuitry. *Microbiology (Reading)*, *152*(Pt 6), 1679-1686, doi: 10.1099/mic.0.28605-0.
- Xu, L., Venkataramani, P., Ding, Y., Liu, Y., Deng, Y., Yong, G. L., Xin, L., Ye, R., Zhang, L., Yang, L. & Liang, Z. X. (2016).** A cyclic di-GMP-binding adaptor protein interacts with histidine kinase to regulate two-component signaling. *J Biol Chem*, *291*(31), 16112-16123, doi: 10.1074/jbc.M116.730887.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1998).** ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13899-13904, doi: 10.1073/pnas.95.23.13899.
- Yan, Q., Rogan, C. J., Pang, Y. Y., Davis, E. W., 2nd & Anderson, J. C. (2020).** Ancient co-option of an amino acid ABC transporter locus in *Pseudomonas syringae* for host signal-dependent virulence gene regulation. *PLoS Pathog*, *16*(7), e1008680, doi: 10.1371/journal.ppat.1008680.
- Yang, A., Mottillo, E. P., Mladenovic-Lucas, L., Zhou, L. & Granneman, J. G. (2019).** Dynamic interactions of ABHD5 with PNPLA3 regulate triacylglycerol metabolism in brown adipocytes. *Nat Metab*, *1*(5), 560-569, doi: 10.1038/s42255-019-0066-3.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, *33*(1), 103-119, doi: 10.1016/0378-1119(85)90120-9.
- Yee, T. W. & Smith, D. W. (1990).** *Pseudomonas* chromosomal replication origins: a bacterial class distinct from *Escherichia coli*-type origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(4), 1278-1282, doi: 10.1073/pnas.87.4.1278.
- Yeo, W. S., Dyzenhaus, S., Torres, V. J., Brinsmade, S. R. & Bae, T. (2023).** Regulation of bacterial two-component systems by cardiolipin. *Infect Immun*, *91*(4), e0004623, doi: 10.1128/iai.00046-23.
- Yuk, H. G. & Marshall, D. L. (2004).** Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Appl Environ Microbiol*, *70*(6), 3500-3505, doi: 10.1128/AEM.70.6.3500-3505.2004.
- Zeng, Y. & Charkowski, A. O. (2021).** The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial phytopathogenesis. *Phytopathology*, *111*(4), 600-610, doi: 10.1094/PHYTO-06-20-0212-RVW.
- Zhang, L., Fritsch, M., Hammond, L., Landreville, R., Slatculescu, C., Colavita, A. & Mah, T. F. (2013).** Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS One*, *8*(4), e61625, doi: 10.1371/journal.pone.0061625.
- Zhang, Y. M. & Rock, C. O. (2008).** Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *6*(3), 222-233, doi: 10.1038/nrmicro1839.
- Zhu, K., Choi, K. H., Schweizer, H. P., Rock, C. O. & Zhang, Y. M. (2006).** Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol*

Microbiol, 60(2), 260-273, doi:
10.1111/j.1365-2958.2006.05088.x.

6 Anhang

6.1 Ergänzung zu Kapitel 3.1

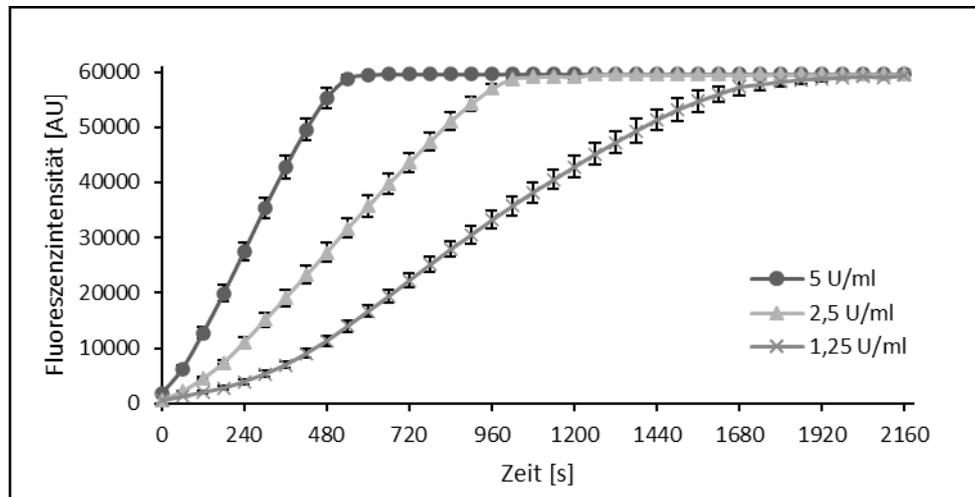


Abbildung 6.1: Positivkontrolle der Phospholipase A₁-Aktivität mit dem Enzym Lecitase Ultra.

Das Enzym *Lecitase® Ultra* des EnzChek® Phospholipase A₁ Assay Kits diente als Positivkontrolle der Phospholipase A₁-Aktivität. Für die Aktivitätsmessung wurden Stocklösungen von 10 U/ml, 5 U/ml und 2,5 U/ml hergestellt. Aus diesen Stocklösungen wurden jeweils 50 µl Enzym-Lösung mit 50 µl Substrat-Liposom-Mix in einer Vertiefung einer 96-MTP gemischt, sodass im experimentellen Ansatz eine Endkonzentration von 5 U/ml (Kreis), 2,5 U/ml (Dreieck) und 1,25 U/ml (Kreuz) erzielt wurde. Die Kontrollproben wurden unverzüglich bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei einer Wellenlänge von 515 nm in einem Tecan M1000Pro für 2 h dokumentiert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensitäten [AU] wurde gegen die Zeit in Sekunden [s] aufgetragen. Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten aus einer Dreifachbestimmung.

6.2 Ergänzung zu Kapitel 3.4

Tabelle 6.1: Alle signifikanten Proteine, die in *P. aeruginosa* Δ plaF hoch abundant waren

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	hohe Abundanz in Δ plaF
PA1877	BapD	probable secretion protein	31,7
PA4293	PprA	two-component sensor	18,7
PA4324	/	hypothetical protein	16,2
PA1876	BapC	probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	8,8
PA4651	CupE4	Pilin assembly chaperone	7,6
PA4413	FtsW	cell division protein	5,8
PA0180	CttP	chemotactic transducer for trichloroethylene	5,3
PA4303	TadZ	TadZ	5,1
PA0178	/	probable two-component sensor	4,6
PA1874	BapA	hypothetical protein	3,9
PA2165	GlgA	probable glycogen synthase	3,5
PA1041	/	probable outer membrane protein precursor	3,5
PA4684	/	hypothetical protein	3,5

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	hohe Abundanz in Δ plaF
PA0176	Aer2	aerotaxis transducer	3,4
PA4686	/	hypothetical protein	3,3
PA4925	/	conserved hypothetical protein	2,9
PA1524	XdhA	xanthine dehydrogenase	2,8
PA3622	RpoS	sigma factor	2,8
PA5220	/	hypothetical protein	2,7
PA2172	/	hypothetical protein	2,7
PA4112	/	probable sensor/response regulator hybrid	2,6
PA2737	/	conserved hypothetical protein	2,6
PA0865	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	2,6
PA4117	BphP	bacterial phytochrome, BphP	2,6
PA1732	/	conserved hypothetical protein	2,5
PA4781	/	cyclic di-GMP phosphodiesterase	2,5
PA4229	PchC	pyochelin biosynthetic protein	2,4
PA2367	Hcp3	Hcp3	2,4
PA4358	FeoB	FeoB	2,3
PA4171	/	probable protease	2,3
PA0996	PqsA	PqsA	2,3
PA0173	/	probable methylesterase	2,3
PA1099	FleR	two-component response regulator	2,2
PA4825	MgtA	Mg(2+) transport ATPase, P-type 2	2,2
PA0333	/	hypothetical protein	2,2
PA1636	KdpD	two-component sensor	2,2
PA1880	/	probable oxidoreductase	2,2
PA2920	/	probable chemotaxis transducer	2,2
PA2171	/	hypothetical protein	2,2
PA3668	/	conserved hypothetical protein	2,2
PA2151	/	conserved hypothetical protein	2,2
PA3340	/	hypothetical protein	2,1
PA1730	/	conserved hypothetical protein	2,1
PA5011	WaaC	heptosyltransferase I	2,1
PA0890	AotM	arginine/ornithine transport protein	2,1
PA0833	/	hypothetical protein	2,1
PA2512	AntA	anthranilate dioxygenase large subunit	2,1
PA4772	/	probable ferredoxin	2,1
PA0575	RmcA	redox regulator of c-di-GMP	2,1
PA4310	PctB	chemotactic transducer	2,0
PA2366	HsiC3	HsiC3	2,0
PA3465	/	conserved hypothetical protein	2,0
PA3533	GrxD	GrxD	2,0
PA2904	CobI	precorrin-2 methyltransferase	2,0
PA5368	PstC	membrane protein component of ABC phosphate transporter	2,0
PA2173	/	hypothetical protein	2,0
PA4635	/	conserved hypothetical protein	2,0

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	hohe Abundanz in Δ plaF
PA2164	/	probable glycosyl hydrolase	2,0
PA2620	ClpA	ATP-binding protease component	1,9
PA2153	GlgB	1,4-alpha-glucan branching enzyme	1,9
PA4513	PiuB	probable oxidoreductase	1,9
PA2147	KatE	catalase HPII	1,9
PA5418	SoxA	sarcosine oxidase alpha subunit	1,9
PA2654	TlpQ	TlpQ	1,9
PA4181	/	hypothetical protein	1,9
PA4296	PprB	two-component response regulator	1,9
PA1581	SdhC	succinate dehydrogenase (C subunit)	1,9
PA5231	YhiH	probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	1,9
PA0919	/	alanyl-phosphatidylglycerol hydrolase	1,9
PA0364	LaoA	LaoA	1,8
PA2161	/	hypothetical protein	1,8
PA5546	Cfa	conserved hypothetical protein	1,8
PA5558	AtpF	ATP synthase B chain	1,8
PA3631	/	conserved hypothetical protein	1,8
PA2194	HcnB	hydrogen cyanide synthase	1,8
PA3995	/	probable transcriptional regulator	1,8
PA2162	/	probable glycosyl hydrolase	1,8
PA2265	/	gluconate dehydrogenase	1,8
PA5210	HxrA	probable secretion pathway ATPase	1,8
PA2841	/	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	1,8
PA2236	PsIF	PsIF	1,8
PA0541	/	hypothetical protein	1,8
PA0132	BauA	Beta-alanine:pyruvate transaminase	1,8
PA2514	AntC	anthranilate dioxygenase reductase	1,8
PA5414	/	hypothetical protein	1,8
PA3708	WspA	probable chemotaxis transducer	1,7
PA0459	ClpC	probable ClpA/B protease ATP binding subunit	1,7
PA2163	/	hypothetical protein	1,7
PA3825	/	Cyclic-guanylate-specific phosphodiesterase	1,7
PA2618	/	hypothetical protein	1,7
PA2345	/	conserved hypothetical protein	1,7
PA4333	FumA	probable fumarase	1,7
PA4135	/	probable transcriptional regulator	1,7
PA4414	MurD	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	1,7
PA1120	TpbB	diguanylate cyclase	1,7
PA1408	/	hypothetical protein	1,7
PA4880	/	probable bacterioferritin	1,7
PA5172	ArcB	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	1,7
PA1429	/	probable cation-transporting P-type ATPase	1,7
PA4411	MurC	UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase	1,7
PA2771	Dcsbis	diguanylate cyclase with a self-blocked I-site	1,7
PA1293	/	hypothetical protein	1,7

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	hohe Abundanz in Δ plaf
PA1561	Aer	aerotaxis receptor	1,7
PA4408	FtsA	cell division protein	1,7
PA4115	/	conserved hypothetical protein	1,7
PA0455	DbpA	RNA helicase	1,7
PA1745	/	hypothetical protein	1,7
PA4003	PbpA	penicillin-binding protein 2	1,7
PA4130	nirA	probable sulfite or nitrite reductase	1,7
PA2939	PepB	probable aminopeptidase	1,7
PA4412	MurG	glycosyl transferase	1,6
PA3945	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA4953	MotB	chemotaxis protein	1,6
PA0861	RbDA	RbDA	1,6
PA4788	/	hypothetical protein	1,6
PA2787	Cpg2	carboxypeptidase G2 precursor	1,6
PA5560	AtpB	ATP synthase A chain	1,6
PA4417	MurE	amide ligase	1,6
PA2260	/	hypothetical protein	1,6
PA4397	PanE	ketopantoate reductase	1,6
PA1001	PhnA	anthranilate synthase component I	1,6
PA4943	HflX	probable GTP-binding protein	1,6
PA3604	ErdR	response regulator	1,6
PA4311	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA1689	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA4809	FdhE	FdhE protein	1,6
PA4655	HemH	ferrochelataase	1,6
PA4504	DppC	dipeptide ABC transporter permease	1,6
PA3103	XcpR	general secretion pathway protein E	1,6
PA2953	/	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	1,6
PA4776	PmrA	two-component regulator system response regulator	1,6
PA1174	NapA	periplasmic nitrate reductase protein	1,6
PA2716	/	probable FMN oxidoreductase	1,6
PA5171	ArcA	arginine deiminase	1,6
PA2443	SdaA	L-serine dehydratase	1,6
PA4624	CdrB	cyclic diguanylate-regulated TPS partner B	1,6
PA2231	PslA	PslA	1,6
PA0916	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA4190	PqsL	probable FAD-dependent monooxygenase	1,6
PA3739	/	probable sodium/hydrogen antiporter	1,6
PA4236	KatA	catalase	1,6
PA4285	RecC	exodeoxyribonuclease V gamma chain	1,6
PA5213	GcvP1	glycine cleavage system protein P1	1,5
PA3710	/	probable GMC-type oxidoreductase	1,5
PA3226	/	probable hydrolase	1,5
PA4644	/	hypothetical protein	1,5
PA0158	TriC	RND triclosan efflux transporter	1,5

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	hohe Abundanz in $\Delta plaF$
PA3704	WspE	probable chemotaxis sensor/effector fusion protein	1,5
PA2915	/	hypothetical protein	1,5
PA1634	KdpB	potassium-transporting ATPase, B chain	1,5
PA3996	Lis	lipoate synthase	1,5
PA3692	LptF	Lipotoxon F	1,5
PA0961	/	probable cold-shock protein	1,5
PA1003	MvfR	Transcriptional regulator MvfR	1,5
PA3934	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA4786	/	probable short-chain dehydrogenase	1,5
PA1562	AcnA	aconitate hydratase 1	1,5
PA0998	PqsC	PqsC	1,5
PA5274	Rnk	nucleoside diphosphate kinase regulator	1,5
PA3674	/	hypothetical protein	1,5
PA4114	BltD	lysine decarboxylase	1,5
PA5010	WaaG	UDP-glucose:(heptosyl) LPS alpha 1,3-glucosyltransferase	1,5
PA3723	YqjM	probable FMN oxidoreductase	1,5
PA2944	CobN	cobalamin biosynthetic protein	1,5
PA4420	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA3347	HsbA	HptB-dependent secretion and biofilm anti anti-sigma factor	1,5
PA2994	NqrF	Na ⁺ -translocating NADH:quinone oxidoreductase, subunit	1,5
PA0148	Add	adenine deaminase	1,5
PA5173	ArcC	carbamate kinase	1,5
PA5075	/	probable permease of ABC transporter	1,5
PA2290	Gcd	glucose dehydrogenase	1,5
PA0704	/	probable amidase	1,5
PA4312	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA1430	LasR	transcriptional regulator	1,5
PA4841	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA5474	/	probable metalloprotease	1,5
PA2969	PlsX	fatty acid biosynthesis protein	1,5
PA2583	/	probable sensor/response regulator hybrid	1,5
PA4972	/	hypothetical protein	1,5
PA5366	PstB	ATP-binding component of ABC phosphate transporter	1,5
PA1066	/	probable short-chain dehydrogenase	1,5
PA4958	FimW	FimW	1,5
PA4309	PctA	chemotactic transducer	1,5
PA3460	/	probable acetyltransferase	1,5
PA4231	PchA	salicylate biosynthesis isochorismate synthase	1,5
PA2112	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA2840	DeaD	probable ATP-dependent RNA helicase	1,5
PA4829	Lpd3	dihydrolipoamide dehydrogenase 3	1,5
PA3620	MutS	DNA mismatch repair protein	1,5
PA0853	/	probable oxidoreductase	1,5
PA0849	TrxB2	thioredoxin reductase 2	1,5

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	hohe Abundanz in $\Delta plaF$
PA4778	CueR	CueR	1,5
PA1584	SdhB	succinate dehydrogenase (B subunit)	1,5
PA4702	/	hypothetical protein	1,5
PA3855	/	hypothetical protein	1,5
PA2242	/	hypothetical protein	1,5
PA2572	/	probable two-component response regulator	1,5
PA3426	/	probable enoyl CoA-hydratase/isomerase	1,5
PA4267	RpsG	30S ribosomal protein S7	1,5
PA4633	/	probable chemotaxis transducer	1,5
PA1341	AatQ	AatQ	1,5

Tabelle 6.2: Alle signifikanten Proteine, die in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ niedrig abundant waren

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	niedrige Abundanz in $\Delta plaF$
PA2949	PlaF	esterase	14,1
PA2390	PvdT	PvdT	6,1
PA1200	/	conserved hypothetical protein	5,5
PA3734	/	hypothetical protein	5,4
PA4913	/	probable binding protein component of ABC transporter	4,4
PA2394	PvdN	PvdN	4,0
PA0763	MucA	anti-sigma factor	3,8
PA2300	ChiC	chitinase	3,6
PA2393	PvdM	putative dipeptidase	3,3
PA5150	/	probable short-chain dehydrogenase	3,3
PA2531	PtaA	probable aminotransferase	3,2
PA4468	SodM	superoxide dismutase	3,2
PA2389	PvdR	PvdR	3,1
PA2892	AtuG	GCCase, alpha-subunit (biotin-containing)	3,0
PA2384	/	hypothetical protein	2,9
PA3366	AmiE	aliphatic amidase	2,9
PA4625	CdrA	cyclic diguanylate-regulated TPS partner A	2,8
PA2392	PvdP	PvdP	2,8
PA3364	AmiC	aliphatic amidase expression-regulating protein	2,7
PA2395	PvdO	PvdO	2,7
PA3922	/	conserved hypothetical protein	2,6
PA4792	/	conserved hypothetical protein	2,6
PA2033	/	hypothetical protein	2,5
PA3866	/	Pyocin S4	2,5
PA4162	/	probable short-chain dehydrogenase	2,5
PA2385	PvdQ	3-oxo-C12-homoserine lactone acylase	2,4
PA4373	/	hypothetical protein	2,4

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	niedrige Abundanz in $\Delta plaF$
PA4470	FumC1	fumarate hydratase	2,4
PA4143	CyaB	probable toxin transporter	2,3
PA0263	Hcp	secreted protein	2,3
PA5096	/	probable binding protein component of ABC transporter	2,3
PA0807	AmpDh3	AmpDh3	2,3
PA2410	FpvF	FpvF	2,3
PA1946	RbsB	binding protein component precursor of ABC ribose transporter	2,3
PA3441	SsuF	probable molybdopterin-binding protein	2,2
PA5153	/	amino acid ABC transporter periplasmic binding protein	2,2
PA2396	PvdF	pyoverdine synthetase F	2,1
PA3224	/	hypothetical protein	2,1
PA3779	/	hypothetical protein	2,1
PA3578	/	conserved hypothetical protein	2,1
PA3785	/	conserved hypothetical protein	2,1
PA1667	HsiJ2	HsiJ2	2,0
PA0943	/	hypothetical protein	2,0
PA1894	/	hypothetical protein	2,0
PA5542	/	<i>Pseudomonas</i> imipenem beta-lactamase PIB-1	2,0
PA0661	/	conserved hypothetical protein	2,0
PA3569	MmsB	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2,0
PA2887	AtuB	putative dehydrogenase involved in catabolism of citronellol	2,0
PA3724	LasB	elastase	2,0
PA1773	CmaX	CmaX protein	2,0
PA4469	/	hypothetical protein	1,9
PA1188	/	hypothetical protein	1,9
PA4140	/	hypothetical protein	1,9
PA2398	FpvA	ferripyoverdine receptor	1,9
PA1572	/	conserved hypothetical protein	1,9
PA2918	/	probable short-chain dehydrogenase	1,9
PA3161	HimD	integration host factor beta subunit	1,9
PA3902	/	hypothetical protein	1,9
PA5454	Rmd	oxidoreductase Rmd	1,9
PA2397	PvdE	pyoverdine biosynthesis protein	1,9
PA5188	/	probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	1,9
PA3568	YmmS	probable acetyl-coa synthetase	1,9
PA5138	/	hypothetical protein	1,8
PA3079	/	hypothetical protein	1,8
PA1658	HsiC3	HsiC2	1,8
PA5523	/	probable aminotransferase	1,8
PA0283	Sbp	sulfate-binding protein precursor	1,8
PA5521	/	probable short-chain dehydrogenase	1,8
PA4205	/	hypothetical protein	1,8

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	niedrige Abundanz in $\Delta plaF$
PA5093	/	probable histidine/phenylalanine ammonia-lyase	1,8
PA2386	PvdA	L-ornithine N5-oxygenase	1,8
PA2575	/	hypothetical protein	1,7
PA5187	/	probable acyl-CoA dehydrogenase	1,7
PA4803	/	hypothetical protein	1,7
PA5371	/	conserved hypothetical protein	1,7
PA1234	/	hypothetical protein	1,7
PA2871	/	hypothetical protein	1,7
PA3234	YjcG	probable sodium:solute symporter	1,7
PA5115	/	conserved hypothetical protein	1,7
PA2204	/	probable binding protein component of ABC transporter	1,7
PA2886	AtuA	protein with apparent function in citronellol catabolism	1,7
PA2592	PotF5	probable periplasmic spermidine/putrescine-binding protein	1,7
PA0409	PilH	twitching motility protein	1,7
PA1665	Fha2	Fha2	1,7
PA2951	EtfA	electron transfer flavoprotein alpha-subunit	1,7
PA4206	MexH	probable RND efflux membrane fusion protein precursor	1,7
PA1252	DpkA	DpkA	1,7
PA3844	/	hypothetical protein	1,7
PA1074	BraC	branched-chain amino acid transport protein	1,7
PA0660	/	NAD(P)H:quinone reductase	1,7
PA2034	/	hypothetical protein	1,7
PA2532	Tpx	thiol peroxidase	1,6
PA3332	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA0852	CbpD	chitin-binding protein precursor	1,6
PA3925	/	probable acyl-CoA thiolase	1,6
PA1162	DapE	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	1,6
PA3795	/	probable oxidoreductase	1,6
PA4587	CcpR	cytochrome c551 peroxidase precursor	1,6
PA2448	/	hypothetical protein	1,6
PA1948	RbsC	membrane protein component of ABC ribose transporter	1,6
PA0487	ModR	probable molybdenum transport regulator	1,6
PA0871	PhhB	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	1,6
PA1597	/	hypothetical protein	1,6
PA1737	FadB	probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	1,6
PA4502	DppA4	probable binding protein component of ABC transporter	1,6
PA4375	MexW	RND multidrug efflux transporter	1,6
PA1292	/	probable 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	1,6
PA2413	PvdH	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase	1,6
PA2301	/	hypothetical protein	1,6
PA1618	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA4533	/	hypothetical protein	1,6
PA3439	FolX	d-erythro-7,8-dihydroneopterin triphosphate epimerase	1,6
PA1821	/	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	1,6

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	niedrige Abundanz in $\Delta plaF$
PA0423	PasP	PasP	1,6
PA3022	/	hypothetical protein	1,6
PA3440	/	conserved hypothetical protein	1,6
PA3450	LsfA	1-Cys peroxiredoxin	1,6
PA1556	CcoO2	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit	1,6
PA2399	PvdD	pyoverdine synthetase D	1,5
PA1579	/	hypothetical protein	1,5
PA4208	OpmD	probable outer membrane protein precursor	1,5
PA4687	HitA	ferric iron-binding periplasmic protein	1,5
PA0792	PrpD	propionate catabolic protein	1,5
PA3070	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA4217	PhzS	flavin-containing monooxygenase	1,5
PA4787	/	probable transcriptional regulator	1,5
PA4496	DppA1	probable binding protein component of ABC transporter	1,5
PA2667	MvaU	MvaU	1,5
PA2889	AtuD	citronellyl-CoA dehydrogenase, AtuD	1,5
PA1810	NppA2	NppA2	1,5
PA2302	AmbE	AmbE	1,5
PA0563	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA3127	/	hypothetical protein	1,5
PA4207	MexI	probable RND efflux transporter	1,5
PA0741	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA5018	MsrA	peptide methionine sulfoxide reductase	1,5
PA3392	NosZ	nitrous-oxide reductase precursor	1,5
PA3570	MmsA	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	1,5
PA3836	/	hypothetical protein	1,5
PA5252	YheS	probable ATP-binding component of ABC transporter	1,5
PA0019	Def	polypeptide deformylase	1,5
PA2303	AmbD	AmbD	1,5
PA3797	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA5545	/	conserved hypothetical protein	1,5
PA5348	/	probable DNA-binding protein	1,5
PA1494	MuiA	mucoidy inhibitor gene A	1,5
PA1493	CysP	sulfate-binding protein of ABC transporter	1,5
PA4053	RibE	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1,5
PA3583	GlpR	glycerol-3-phosphate regulon repressor	1,5
PA5163	RmlA	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	1,5
PA2328	/	hypothetical protein	1,5
PA3270	/	hypothetical protein	1,5
PA0300	SpuD	polyamine transport protein	1,5
PA5186	/	probable iron-containing alcohol dehydrogenase	1,5
PA1244	QslA	QslA	1,5
PA1023	/	probable short-chain dehydrogenase	1,5
PA3852	/	hypothetical protein	1,5
PA0301	SpuE	polyamine transport protein	1,5

PA-Nummer	Name	Produkt/Funktion	niedrige Abundanz in $\Delta plaF$
PA4473	/	hypothetical protein	1,5
PA0756	/	probable two-component response regulator	1,5
PA0296	Spul	Glutamylpolyamine synthetase	1,5
PA3475	PheC	cyclohexadienyl dehydratase precursor	1,5
PA1032	QuiP	QuiP	1,5
PA1772	MenG	probable methyltransferase	1,5
PA0962	Dps	DNA-binding protein from starved cells	1,5
PA2738	HimA	integration host factor, alpha subunit	1,5

6.3 Ergänzung zu Kapitel 3.4.2

Tabelle 6.3: Beeinträchtigte Proteine des regulatorischen Biofilm-Netzwerks in *P. aeruginosa* $\Delta plaF$

PA-Nummer	Name	Beschreibung	Lokalisierung	n-fache Änderung
PA1877	BapD	Biofilm-assoziiertes Protein D	ZM	+31,7
PA1876	BapC	Biofilm-assoziiertes Protein C	ZM	+8,8
PA4651	CupE4	Pilin-Assemblierung Chaperon	U	+7,6
PA1874	BapA	Biofilm-assoziiertes Protein A	U	+3,9
PA0763	MucA	Anti-Sigma Faktor	ZM	-3,8
PA4625	CdrA	c-di-GMP-regulierter TPS-Partner A	E	-2,8
PA2236	PslF	PslF	Z	+1,8
PA0861	RbdA	Regulator der Biofilmdispersion	ZM	+1,6
PA4624	CdrB	c-di-GMP-regulierter TPS-Partner B	ÄM	+1,6
PA2231	PslA	PslA	ZM	+1,6
PA3347	HsbA	Anti anti-Sigma-Faktor, HptB-abhängig	U	+1,5
PA1494	MuiA	Mukoid Inhibitor	ÄM/P	-1,5
PA2242	PslL	PslL	ZM	+1,5
PA0180	CttP	Chemotaxis Protein	ZM	+5,3
PA0176	Aer2	Aerotaxis Protein	Z	+3,4
PA0173	CheB2	Methylesterase	Z	+2,3
PA2920	/	putatives Chemotaxis Protein	ZM	+2,2
PA4310	PctB	Chemotaxis Protein	ZM	+2,0
PA2654	TlpQ	Chemotaxis Protein	ZM	+1,9
PA3708	WspA	Chemotaxis Protein	ZM/ÄM	+1,7
PA1561	Aer	Aerotaxis Rezeptor	ZM/ÄM	+1,7
PA4953	MotB	Chemotaxis Protein	ZM	+1,6
PA3704	WspE	Chemotaxis Sensor/Effektor	Z	+1,5
PA4309	PctA	Chemotaxis Protein	ZM	+1,5
PA4633	/	Chemotaxis Protein	ZM	+1,5
PA4293	PprA	Zweikomponentensystem (Sensor)	ZM	+18,7
PA0178	/	putatives Zweikomponentensystem (Sensor)	Z	+4,6
PA4112	/	putativer Sensor/Regulator Hybrid	Z/ZM	+2,6
PA1099	FleR	Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	+2,2

PA-Nummer	Name	Beschreibung	Lokalisierung	n-fache Änderung
PA1636	KdpD	Zweikomponentensystem (Sensor)	ZM	+2,2
PA4296	PprB	Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	+1,9
PA3604	ErdR	Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	+1,6
PA4776	PmrA	Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	+1,6
PA2583	/	putativer Sensor/Regulator Hybrid	ZM	+1,5
PA2572	/	putatives Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	+1,5
PA0756	/	putatives Zweikomponentensystem (Regulator)	Z	-1,5
PA4324	/	hypothetisches Protein mit PilZ-Domäne	U	+16,2
PA4781	/	c-di-GMP Phosphodiesterase	Z	+2,5
PA1120	TpbB	Diguanylatcyclase	ZM	+1,7
PA3825	/	c-di-GMP-spezifische Phosphodiesterase	ZM	+1,7

6.4 Ergänzung zu Kapitel 3.4.2.2

Tabelle 6.4: Liste der Proteine des PprAB-Netzwerks

Die Übersicht stellt die Proteine dar, die durch das PprAB-Zweikomponentensystem reguliert werden (de Bentzmann *et al.*, 2012). Die Annotationen sowie die Lokalisierung wurden aus der *Pseudomonas*-Datenbank übernommen (Winsor *et al.*, 2016).

PA-Nr:	Name	Beschreibung	Lokalisierung
PA0998	PqsC	PqsC	Z
PA0999	PqsD	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	Z
PA1000	PqsE	Quinolone signal response protein	Z
PA1001	PhnA	anthranilate synthase component I	Z
PA1002	PhnB	anthranilate synthase component II	Z
PA1213		hypothetical protein	U
PA1214		hypothetical protein	Z
PA1216		hypothetical protein	Z
PA1217		probable 2-isopropylmalate synthase	Z
PA1218		hypothetical protein	Z
PA1874	BapA	biofilm-associated protein A	U
PA1875	BapB	probable outer membrane protein precursor	ÄM
PA1876	BapC	probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	ZM
PA1877	BapD	probable secretion protein	ZM
PA1914	HvnA	conserved hypothetical protein	E
PA3662		hypothetical protein	U
PA4293	PprA	two-component sensor PprA	ZM
PA4294		hypothetical protein	ZM
PA4296	PprB	two-component response regulator, PprB	Z
PA4297	TadG	TadG	ZM
PA4298		hypothetical protein	U
PA4299	TadD	TadD	Z
PA4300	TadC	TadC	ZM
PA4301	TadB	TadB	ZM
PA4302	TadA	TadA ATPase	Z

PA-Nr:	Name	Beschreibung	Lokalisierung
PA4303	TadZ	TadZ	U
PA4304	RcpA	RcpA	U
PA4305	RcpC	RcpC	U
PA4306	Flp	Type IVb pilin, Flp	ZM
PA4648	CupE1	Pilin subunit CupE1	U
PA4649	CupE2	Pilin subunit CupE2	E
PA4650	CupE3	Pilin subunit CupE3	ZM
PA4651	CupE4	Pilin assembly chaperone CupE4	U
PA4652	CupE5	Fimbrial usher protein CupE5	ÄM
PA5287	AmtB	ammonium transporter AmtB	ZM

ZM: Zytoplasmamembran, P: Periplasma, ÄM: Äußere Membran, Z: Zytoplasma, U: Unbekannt

6.5 Ergänzung zu Kapitel 3.4.3

Tabelle 6.5: Liste der Transporter, die in *P. aeruginosa* Δ plaF beeinflusst wurden

PA-Nr:	Name	Beschreibung	Lokalisierung	n-fache Änderung
PA1876	BapC	ABC-Transporter, ATP-bindende Komponente	ZM	+8,8
PA4358	FeoB	Transporter mit GTP-Binde-Domäne	ZM	+2,3
PA4825	MgtA	ATPase, Magnesium-Transport, P-Typ 2	ZM/ÄM	+2,2
PA0890	AotM	ABC-Transporter, Transport von Arginin/Ornithin	ZM	+2,1
PA5368	PstC	ABC-Transporter, Transport von Phosphat	ZM	+2,0
PA5231		putativer ABC-Transporter, ATP-bindende-Komponente	ZM	+1,9
PA1429		putative ATPase, Kation-Transporter, P-Typ	ZM	+1,7
PA4504	DppC	ABC-Transporter, Dipeptid-Permease	ZM	+1,6
PA0158	TriC	RND-Triclosan-Efflux-Transporter	ZM	+1,5
PA1341	AatQ	ABC-Transporter, Transport von sauren AS	ZM	+1,5
PA5366	PstB	ABC-Transporter, Transport von Phosphat	ZM	+1,5
PA1634	KdpB	ATPase, Kalium-Transport, B-Kette	ZM	+1,5
PA5075		putativer ABC-Transporter, Permease	ZM	+1,5
PA4913		putativer ABC-Transporter, bindende Protein-Komponente	P	-4,4
PA4143		putativer Transporter, Transport von Toxin	ZM	-2,3
PA1946	RbsB	ABC-Transporter, Ribose-bindende Protein-Komponente	P	-2,3
PA5096		putativer ABC-Transporter, bindende Protein-Komponente	P	-2,3
PA5153		ABC-Transporter, Lys-, Arg-, His-bindende Protein-Komponente	P	-2,2
PA1773	CmaX	Transport von Metall-Ionen	ZM	-2,0
PA2397	PvdE	Transport von PVD-Vorläufer	ZM	-1,9

PA-Nr:	Name	Beschreibung	Lokalisierung	n-fache Änderung
PA1074	BraC	ABC-Transporter, Val-, Leu-, Ile-bindende Protein-Komponente	P/ÄM	-1,7
PA2204		putativer ABC-Transporter, bindende Protein-Komponente	P	-1,7
PA1948	RbsC	ABC-Transporter, Transport von Ribose	ZM	-1,6
PA4502	DppA 4	ABC-Transporter, bindende Protein-Komponente	P	-1,6
PA4375	Mex W	RND <i>Multidrug Efflux</i>	ZM	-1,6
PA1810	NppA 2	putativer ABC-Transporter, bindende Protein-Komponente	P	-1,5
PA4496	DppA 1	putativer ABC-Transporter, bindende Protein-Komponente	P/ZM	-1,5
PA4207	MexI	RND <i>Efflux</i>	ZM	-1,5
PA1493	CysP	ABC-Transporter, Sulfat-bindende Komponente	P/E	-1,5
PA0300	SpuD	Polyamin-Transport, Putrescin-bindendes Protein	P	-1,5
PA0301	SpuE	Polyamin-Transport, Spermidin-bindendes Protein	P/E	-1,5

ZM: Zytoplasmamembran, **P:** Periplasma, **ÄM:** Äußere Membran, **Z:** Zytoplasma, (+/-) hoch/niedrig abundant in *P. aeruginosa* Δ *plaF*

6.6 Ergänzung zu Kapitel 4.3

Die Biofilmproduktion unter dynamischen Bedingungen wurde mithilfe der *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) untersucht (Caliskan *et al.*, 2023). Im Unterschied zu statischen Bedingungen wurden die Zellen hierbei unter kontinuierlicher Nährstoffzufuhr kultiviert.

Für die Analyse des Biofilms unter dynamischen Bedingungen wurden folglich die Zeitpunkte 24 h, 72 h sowie 144 h näher betrachtet und untersucht. Neben einer optischen Einschätzung des Biofilms wurden außerdem die Parameter *Height* (Höhe des Biofilms), *MeanThickness* (mittlere Schichtdicke), *Roughness* (Rauigkeit, Unebenheiten) sowie *Dead/Live ratio* (Tot/Lebend-Verhältnis) mithilfe des BiofilmQ-Programms (Hartmann *et al.*, 2021) ermittelt, um die Physiologie des Biofilms quantitativ zu bewerten (Abbildung 6.2).

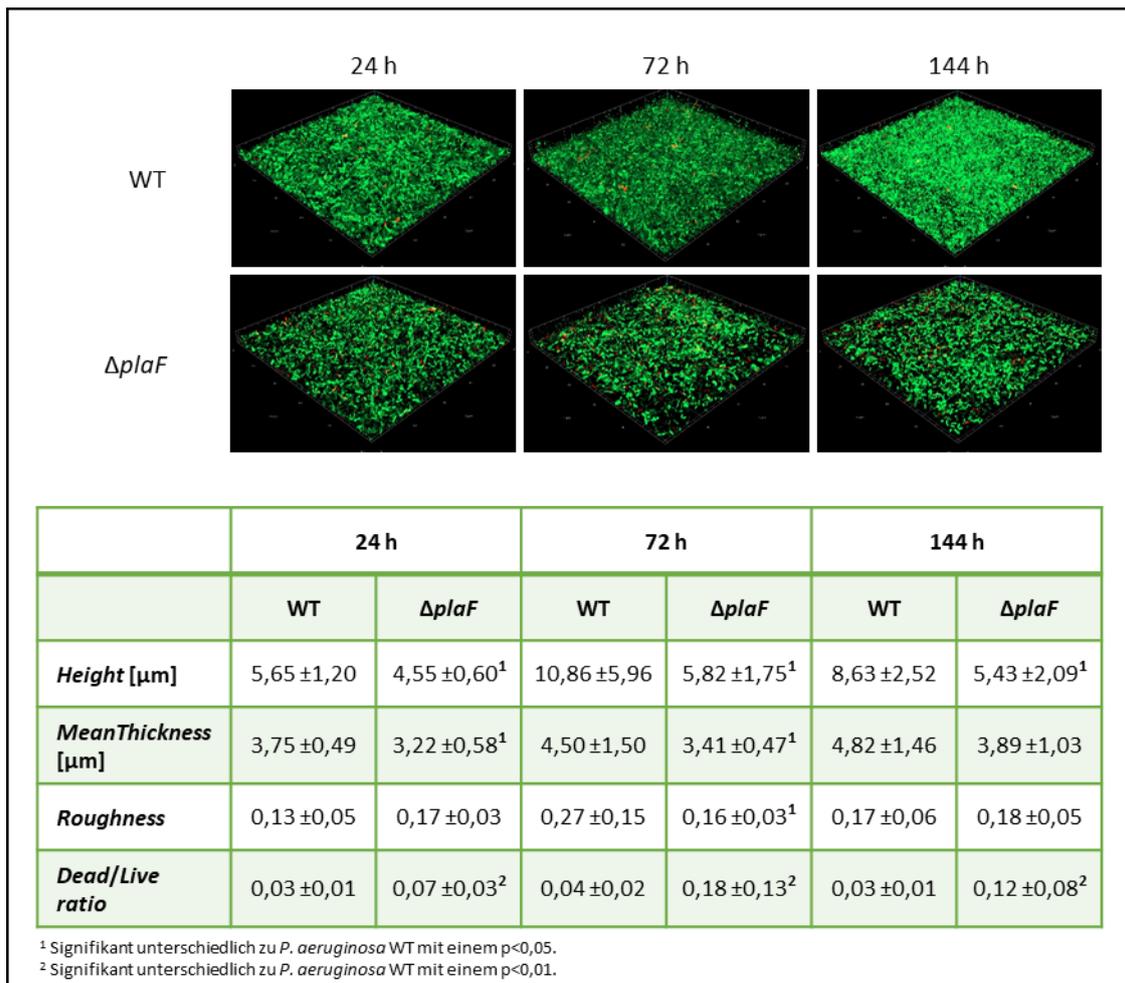


Abbildung 6.2: Phänotypische Analyse von *P. aeruginosa* $\Delta plaF$ zeigt Biofilmdefekt unter dynamischer Kultivierungsmethode.

P. aeruginosa-Zellen wurden mit 1:10 verdünntem LB-Medium auf eine OD_{580nm} 0,5 eingestellt und 300 μl in eine Durchflusskammer injiziert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Durchfluss entsprechend der Inkubationsdauer mit einer Rate von 50 $\mu l/min$ gestartet. Die Färbung erfolgte mit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* nach Herstellerangaben von *Thermo Fisher Scientific*. Die Bilder stellen je Zeitpunkt repräsentativ den Durchschnitt von insgesamt 8 verschiedenen Abbildungen aus 2 unabhängigen Experimenten dar. Der Biofilm wurde quantitativ mithilfe der Software BiofilmQ analysiert und ausgewertet. Die Biofilmanalyse wurde in Kooperation mit Prof. Dr. W. Streit & Dr. M. Gudzhun aus dem Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie der Universität Hamburg durchgeführt. Im Rahmen der Studie wurden verschiedene *P. aeruginosa* Deletionsstämme im Vergleich zum *P. aeruginosa* WT untersucht. Aus diesem Grund wurden bereits Aufnahmen der Biofilmarchitektur des *P. aeruginosa* Wildtyps auch in der Dissertation von Dr. A.J. Weiler sowie in der dazugehörigen Publikation veröffentlicht (Weiler, 2021, Weiler *et al.*, 2022). Die oben gezeigte Abbildung ist eine modifizierte Darstellung mit ermittelten Werten aus der BiofilmQ-Software zur quantitativen Bestimmung des Biofilms (Caliskan *et al.*, 2023).

6.7 Ergänzung zu Kapitel 4.1

Tabelle 6.6: Liste aller Wechselwirkungen innerhalb der PlaF-Dimer-Schnittstelle.

Source atoms			Target atoms			Distance (Å)
Leu	5A	CG	Val	9B	CG2	3.95
Leu	5A	CD1	Val	9B	CG2	4.49
Leu	8A	CG	Val	9B	CG1	3.87
Leu	8A	CD2	Val	9B	CG1	3.89
			Val	9B	CG2	4.43
Val	9A	CA	Ala	13B	CB	4.42
Val	9A	C	Ala	13B	CB	4.45
Val	9A	O	Ala	13B	CA	3.97
			Ala	13B	CB	3.66
Val	9A	CG1	Leu	12B	C	4.09
			Leu	12B	O	4.10
			Ala	13B	N	3.94
			Ala	13B	CA	3.80
			Ala	13B	CB	4.38
			Leu	12B	CB	4.41
			Ala	16B	CB	4.17
Val	9A	CG2	Val	9B	O	3.88
			Leu	12B	CB	4.33
			Val	9B	CA	4.45
			Val	9B	CG1	4.13
Leu	12A	C	Ala	13B	CB	4.41
Leu	12A	CB	Ala	13B	CB	3.76
Leu	12A	CD1	Ala	13B	CB	4.48
			Leu	10B	CD2	3.62
			Val	9B	CG1	3.84
Ala	13A	N	Ala	13B	CB	4.17
			Ala	13B	O	4.44 *
Ala	13A	CA	Gly	17B	CA	4.43
			Ala	13B	C	4.46
			Ala	13B	O	3.72
Ala	13A	C	Phe	21B	CE2	4.14
Ala	13A	O	Phe	21B	CD2	3.84
			Phe	21B	CE2	3.42
			Phe	21B	CZ	4.45
			Gly	17B	CA	4.24
Ala	13A	CB	Ala	16B	C	4.38
			Gly	17B	N	3.86
			Gly	17B	CA	4.02
			Ala	13B	C	4.38
			Ala	13B	O	3.51
			Ala	16B	CB	4.17
Val	14A	N	Phe	21B	CE2	4.27
Val	14A	CA	Phe	21B	CE2	3.66
			Phe	21B	CZ	4.06
Val	14A	C	Phe	21B	CE2	4.13
			Phe	21B	CZ	4.29
Val	14A	O	Phe	21B	CE2	3.78
			Phe	21B	CZ	3.63
Gly	17A	N	Phe	21B	CD2	4.27
			Phe	21B	CE2	4.07
Gly	17A	CA	Phe	21B	CG	3.77
			Phe	21B	CD2	3.54
			Phe	21B	CD1	3.97
			Phe	21B	CE2	3.52
			Phe	21B	CZ	3.75
			Phe	21B	CE1	3.96
Gly	17A	C	Phe	21B	CG	4.43
			Phe	21B	CD2	4.45

Source atoms			Target atoms			Distance (Å)
			Phe	21B	CD1	4.13
			Phe	21B	CE2	4.19
			Phe	21B	CZ	3.89
			Phe	21B	CE1	3.86
Gly	17A	O	Phe	21B	CD1	4.33
			Phe	21B	CE1	4.25
Val	18A	N	Phe	21B	CE2	4.29
			Phe	21B	CZ	3.78
			Phe	21B	CE1	4.00
Val	18A	CG2	Phe	21B	CZ	4.15
			Phe	21B	CE1	4.47
Phe	21A	CE1	Val	22B	CG2	4.38
Phe	21A	CZ	Val	22B	CA	4.23
			Val	22B	CB	4.42
			Thr	25B	OG1	3.95
			Val	22B	CG2	3.69
Phe	21A	CE2	Val	22B	CA	3.68
			Val	22B	CB	4.28
			Phe	21B	C	4.02
			Phe	21B	O	3.93
			Val	22B	N	3.93
			Thr	25B	CB	4.15
			Thr	25B	OG1	3.03
			Thr	25B	CG2	4.24
			Val	22B	CG2	3.75
Phe	21A	CD2	Phe	21B	C	4.23
			Phe	21B	O	4.28
			Val	22B	N	4.36
			Thr	25B	CB	4.44
			Thr	25B	OG1	3.69
			Thr	25B	CG2	4.08
			Val	22B	CG2	4.48
Val	22A	CG2	Phe	21B	CB	3.90
			Thr	25B	CG2	3.87
			Phe	21B	CD1	3.68
			Phe	21B	CE1	3.74
Thr	25A	CB	Thr	25B	CB	4.46
			Thr	25B	OG1	4.31
Thr	25A	OG1	Thr	25B	CB	3.88
			Thr	25B	OG1	4.16 *
			Thr	25B	CG2	4.43
Thr	25A	CG2	Thr	25B	CB	4.33
			Thr	25B	OG1	3.78
Ser	29A	O	Val	33B	CG2	3.97
Ser	29A	CA	Val	33B	CG2	4.26
Ser	29A	CB	Val	33B	CG2	4.27
			Thr	32B	CG2	3.75
			Ser	29B	CB	4.43
			Thr	32B	CB	4.13
Ser	29A	OG	Ser	29B	CA	3.64
			Ser	29B	CB	3.15
			Ser	29B	OG	3.55 *
			Ser	29B	C	4.29
			Ser	29B	O	4.09 *
			Thr	32B	CB	4.45
Ser	29A	CA	Val	33B	CG2	4.26
Ser	29A	CB	Val	33B	CG2	4.25
			Thr	32B	CG2	3.77
			Ser	29B	CB	4.40
			Thr	32B	CB	4.13
Ser	29A	OG	Thr	32B	CG2	3.52

Source atoms			Target atoms			Distance (Å)
			Thr	32B	CB	4.13
Thr	32A	CB	Val	33B	CG2	4.16
Thr	32A	CG2	Val	33B	CG1	4.05
			Val	33B	CG2	3.93
Val	33A	CB	Gly	36B	CA	4.45
Val	33A	CG1	Gly	36B	O	3.58
			Leu	37B	N	3.90
			Gly	36B	CA	3.66
			Gly	36B	C	3.46
Val	33A	CG2	Val	33B	C	4.18
			Val	33B	O	3.81
			Leu	37B	N	4.35
			Gly	36B	CA	3.95
			Gly	36B	C	4.32
			Thr	32B	C	4.47
			Val	33B	N	4.37
			Val	33B	CA	3.58
			Val	33B	CB	4.29
			Val	33B	CG1	4.38
			Val	33B	CG2	4.27
			Thr	32B	O	3.90
Val	33A	O	Leu	37B	CD2	4.16
Leu	37A	CG	Leu	37B	CD2	4.16
Leu	37A	CD1	Gly	36B	O	3.97
Leu	37A	CD2	Arg	83B	NH2	4.06
			Leu	37B	CD2	4.13
			Leu	37B	O	3.79
			Leu	37B	CA	4.26
			Leu	37B	C	4.44

*Wasserstoffbrückenbindungen

#Der *cut-off*-Wert beträgt <4.5 Å (einschließlich van-der-Waals-Wechselwirkung).

Die Tabelle gehört nicht zum Ergebnisteil der hier vorliegenden Dissertation und wurde aus der Veröffentlichung von Bleffert *et al.* (2022) unverändert entnommen. Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

Erklärung zu veröffentlichten Werken

Die dargestellten Daten und Ergebnisse aus Kapitel 3 dieser vorliegenden Arbeit des Doktoranden Muttalip Caliskan sind teilweise in den nachfolgenden Publikationen veröffentlicht:

Caliskan, M., Poschmann, G., Gudzuhn, M., Waldera-Lupa, D., Molitor, R., Strunk, C. H., Streit, W. R., Jaeger, K.-E., Stühler, K., Kovacic, F. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* responds to altered membrane phospholipid composition by adjusting the production of two-component systems, proteases and iron uptake proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1868(6), 159317, doi: 10.1016/j.bbalip.2023.159317.

Muttalip Caliskan:	Investigation, Validation, Writing
Gereon Poschmann:	Investigation, Validation, Writing
Mirja Gudzuhn:	Investigation, Validation, Writing
Daniel Waldera-Lupa:	Investigation, Validation, Writing
Rebecka Molitor:	Investigation, Validation, Writing
Christoph H. Strunk:	Investigation, Validation, Writing
Wolfgang R. Streit:	Resources, Project administration, Writing
Karl-Erich Jaeger:	Resources, Project administration, Funding acquisition, Writing
Kai Stühler:	Resources, Project administration, Funding acquisition, Writing
Filip Kovacic:	Conceptualization, Visualization, Supervision, Funding acquisition, Writing

Folgende modifizierte Abbildungen wurden in der oben genannten Publikation veröffentlicht:

Abbildung 3.5:	Modifiziert, Tabelle hinzugefügt
Abbildung 3.6:	A: Modifiziert, B: nicht veröffentlicht
Abbildung 3.8:	Modifiziert
Abbildung 3.9:	Modifiziert, c-di-GMP- und chemosensorische Proteine hinzugefügt
Abbildung 3.11:	Modifiziert, x- und y-Achse getauscht
Abbildung 3.14:	Modifiziert
Abbildung 3.16:	Modifiziert, A: Anordnung der Proteine geändert, B: Fotos hinzugefügt
Abbildung 4.1:	in Anlehnung erstellt
Abbildung 6.2:	Modifiziert, jeweils eine CLSM-Aufnahme pro Stamm pro Zeitpunkt aus dem Anhang der Veröffentlichung entnommen, Tabelle hinzugefügt

Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).

Bleffert, F., Granzin, J., Caliskan, M., Schott-Verdugo, S. N., Siebers, M., Thiele, B., Rahme, L., Felgner, S., Dörmann, P., Gohlke, H., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.-E., Kovacic, F. (2022). Structural, mechanistic, and physiological insights into phospholipase A-mediated membrane phospholipid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife*, 11, e72824, doi: 10.7554/eLife.72824.

Florian Bleffert:	Formal analysis, Investigation, Validation, Writing
Joachim Granzin:	Data curation, Formal analysis, Investigation, Validation, Writing
Muttalip Caliskan:	Formal analysis, Investigation, Writing
Stephan N. Schott-Verdugo:	Formal analysis, Investigation, Validation, Writing
Meike Siebers:	Formal analysis, Investigation, Validation, Writing
Björn Thiele:	Formal analysis, Investigation, Validation, Writing
Laurence Rahme:	Supervision, Validation, Writing
Sebastian Felgner:	Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing
Peter Dörmann:	Supervision, Validation, Writing
Holger Gohlke:	Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Validation, Writing
Renu Batra-Safferling:	Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing
Karl-Erich Jaeger:	Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing
Filip Kovacic:	Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing

Folgende modifizierte Abbildungen wurden in der oben genannten Publikation veröffentlicht:

Abbildung 3.1:	Modifiziert, Darstellung verändert, Aktivität von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta plaF::plaF_{S137A}$ hinzugefügt
Abbildung 3.2:	Farben der Wachstumskurven verändert, Wachstumsraten hinzugefügt

Die Publikation ist unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“ lizenziert (CC BY 4.0).