



Antje Berger (Autor)

Metabolische Netzwerkanalyse uropathogener *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6730>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	AKTUELLER STAND DER WISSENSCHAFT UND FORSCHUNG	7
2.1	HARNWEGSINFEKTION UND DESSEN ERREGER	7
2.2	BEDEUTUNG VON <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ALS KRANKHEITSERREGER	8
2.2.1	Resistenz von <i>P. aeruginosa</i>	9
2.2.2	Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i>	11
2.3	IMMUNSYSTEM	13
2.3.1	Makrophagen	13
2.3.2	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	15
2.4	SYSTEMBIOLOGIE	17
2.5	METABOLISCHE NETZWERKANALYSE	18
2.5.1	¹³ C-Metabolische Flussanalyse	18
2.5.2	Metabolische Flussanalyse von <i>Pseudomonas</i> -Spezies	21
2.5.3	Zentralstoffwechsel von <i>P. aeruginosa</i>	23
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	STÄMME UND STAMMHALTUNG	27
3.1.1	Klinische <i>P. aeruginosa</i> -Isolate	27
3.1.2	Weitere Mikroorganismen	27
3.1.3	Transposonmutanten	27
3.1.4	Makrophagen	29
3.2	CHEMIKALIEN	29
3.3	KULTURMEDIEN	29
3.3.1	Komplexmedium	29
3.3.2	Glucose-Minimalmedium	30
3.3.3	Komplettes RPMI-1640-Medium	31
3.4	KULTIVIERUNGSMETHODEN	31
3.4.1	Kultivierung in Deep-Well-Platten	31
3.4.2	Kultivierung in Schüttelkolben	32
3.5	ANALYTISCHE METHODEN	32
3.5.1	Bestimmung der Zellkonzentration	32
3.5.2	Bestimmung der Sauerstoffsättigung	33
3.5.3	Quantifizierung von C-Substraten und Produkten	33



3.6	BESTIMMUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN	35
3.6.1	Zellextraktgewinnung	35
3.6.2	Quantifizierung der Enzymaktivität	36
3.6.3	Phosphofruktokinase	36
3.6.4	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	37
3.6.5	Gluconat-6-Phosphatdehydrogenase	37
3.6.6	Malatenzym	37
3.6.7	Isocitratdehydrogenase	38
3.6.8	Isocitratlyase	38
3.7	METABOLISCHE FLUSSANALYSE	38
3.7.1	Analyse der Massenisotopomerenmarkierung von proteinogenen Aminosäuren ..	38
3.7.2	Metabolisches Reaktionsnetzwerk	39
3.7.3	Elementare Fluss-Moden-Analyse	40
3.7.4	Biomassebestimmung	41
3.8	STATISTISCHE ANALYSE	42
3.8.1	Hierarchische Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse	42
3.8.2	Bestimmung der Signifikanz - t-Test	43
3.9	BIOINFORMATISCHE ANALYSE	43
3.10	FLUSSKAPAZITÄT UND ENZYMAUSLASTUNG	44
3.11	OXIDATIVER STRESS	45
3.12	CYTOTOXIZITÄT	45
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
4.1	ETABLIERUNG DER KULTIVIERUNGSEXPERIMENTE	49
4.2	QUANTITATIVE PHYSIOLOGIE DER KLINISCHEN <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATE	52
4.3	STOFFWECHSELANALYSE DES REFERENZSTAMMS <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1	54
4.3.1	Entwicklung des Reaktionsnetzwerks	54
4.3.2	Metabolische Flussanalyse	56
4.3.3	Glucosekatabolismus	58
4.3.4	Pyruvatmetabolismus, Anaplerosis und TCA-Zyklus	59
4.4	METABOLISCHE ANALYSE VON KLINISCHEN ISOLATEN	61
4.4.1	Metabolischer Fingerprint	61
4.4.2	Metabolisches Flussverhalten von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten	63
4.4.3	Nischenspezifische Eigenschaften im Zentralstoffwechsel	68
4.5	POTENTIAL DES ZENTRALSTOFFWECHSELS	71



4.5.1	Wachstumsoptimierung von <i>P. aeruginosa</i>	71
4.5.2	Untersuchungen der NADPH-Gewinnung	73
4.5.3	Metabolische Adaptation von <i>P. aeruginosa</i>	75
4.5.4	<i>In vitro</i> -Aktivität der NADPH-produzierenden Enzyme.....	78
4.5.5	Kapazitäten des NADPH-Stoffwechsels	81
4.5.6	Einfluss der NADPH-Kapazität auf die oxidative Stresstoleranz	85
4.6	ISOCITRATDEHYDROGENASE ALS SCHLÜSSELENZYM	87
4.6.1	Validierung der Isocitratdehydrogenase mit Hilfe von Transposonmutanten.....	87
4.6.2	Infektionsstudien	93
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	97
6	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	101
6.1	ABKÜRZUNGEN	101
6.2	LATEINISCHE ZEICHEN.....	103
6.3	GRIECHISCHE ZEICHEN.....	103
6.4	INDIZES	104
7	REFERENZEN	105
8	ANHANG	121
8.1	WACHSTUMSCHARAKTERISTIKEN VON UROPATHOGENEN <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATEN	121
8.2	ÜBERPRÜFUNG DES METABOLISCH STATIONÄREN ZUSTANDS VON <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATEN.....	125
8.3	ÜBERPRÜFUNG DES ISOTOPISCH STATIONÄREN ZUSTANDS VON <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATEN.....	129
8.4	ÜBERPRÜFUNG DER ANPASSUNG DER METABOLISCHEN FLÜSSE VON <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATEN.....	131
8.5	METABOLISCHE FLUSSVERTEILUNG VON <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATEN.....	135
8.6	WACHSTUMSCHARAKTERISTIKA VON <i>P. AERUGINOSA</i> -TRANSPOSONMUTANTEN DER ISOCITRATDEHYDROGENASE	139
8.7	ÜBERPRÜFUNG DES ISOTOPISCH STATIONÄREN ZUSTANDS VON <i>P. AERUGINOSA</i> - TRANSPOSONMUTANTEN DER ISOCITRATDEHYDROGENASE.....	141
8.8	METABOLISCHE FLUSSVERTEILUNG VON <i>P. AERUGINOSA</i> -TRANSPOSONMUTANTEN DER ISOCITRATDEHYDROGENASE	142