



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
CAROLO-WILHELMINA
ZU BRAUNSCHWEIG

Metabolismus und Antibiotikaresistenz von
Pseudomonas aeruginosa
unter simulierten Respirationstraktbedingungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sabrina Thoma
aus Alfeld/Leine

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1	Aerober Energiemetabolismus	1
1.1.2	Anaerober Energiemetabolismus.....	2
1.1.2.1	Denitrifikation	2
1.1.2.2	Argininfermentation	5
1.1.2.3	Pyruvatfermentation	5
1.1.2.4	Regulation des anaeroben Metabolismus	6
1.1.3	<i>P. aeruginosa</i> als opportunistisches Pathogen	7
1.2	Mukoviszidose.....	8
1.3	Die Rolle von <i>P. aeruginosa</i> in der Mukoviszidose.....	10
1.3.1	Virulenz von <i>P. aeruginosa</i> in der Mukoviszidose-Lunge.....	12
1.3.2	Anpassung von <i>P. aeruginosa</i> in der Mukoviszidose-Lunge.....	13
1.3.3	Multiple Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i>	14
1.3.4	Therapie von <i>P. aeruginosa</i> -Infektionen.....	17
1.4	Artifizielles Sputum-Medium (ASM)	17
1.5	Ziele der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Instrumente, Chemikalien und Materialien	21
2.1.1	Instrumente	21
2.1.2	Chemikalien und Materialien	22
2.1.3	Puffer und Lösungen	23
2.2	Bakterienstämme, Plasmide und Primer.....	23
2.3	Medien und Medienzusätze	27
2.3.1	Medien.....	27
2.3.2	Medienzusätze	29
2.4	Mikrobiologische Techniken.....	30
2.4.1	Sterilisation.....	30
2.4.2	Bestimmung der Zelldichte	30
2.4.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	30
2.4.4	Wachstumsbedingungen.....	30
2.4.5	Glycerinkulturen.....	31

2.4.6	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)	31
2.4.7	Test der Antibiotikaresistenz von Koloniebiofilmen	31
2.4.8	Durchlässigkeitstest.....	32
2.4.9	Quantifizierung von Pyocyanin.....	32
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.5.1	Isolation und Restriktion genomischer DNA	33
2.5.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	33
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.5.4	Sequenzierung	34
2.5.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
2.5.6	Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	36
2.5.7	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.5.8	Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.5.9	Diparentales Mating mit <i>P. aeruginosa</i>	37
2.5.10	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	37
2.5.11	Konstruktion von Deletionsmutanten.....	38
2.5.11.1	Konstruktion einer <i>hemA</i> -Mutante in <i>E. coli</i> S17	38
2.5.11.2	Konstruktion von <i>P. aeruginosa</i> -Deletionsmutanten.....	41
2.5.12	Entfernen von Resistenzkassetten aus dem Genom	42
2.5.13	Komplementation und Identifikation einer Mutation durch Transfer einer Genbank in <i>P. aeruginosa</i>	43
2.5.14	Gezielte Komplementation eines Gens	44
2.6	Transkriptomanalysen mittels <i>P. aeruginosa</i> GeneChips®	44
2.6.1	Lösungen und Puffer	45
2.6.2	Präparation der RNA für die Transkriptomanalyse.....	47
2.6.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	48
2.6.4	Elektrophoretische Auftrennung der RNA.....	48
2.6.5	Aufbereitung der RNA für die GeneChip® Hybridisierung	48
2.6.6	Auswertungen der GeneChip® Hybridisierungen	50
2.7	Proteomanalyse mittels 2D Gelelektrophorese	50
2.7.1	Lösungen	51
2.7.2	Anzucht der Zellen	53
2.7.3	Ernten der Zellen.....	53
2.7.4	Proteinbestimmung mittels BCA-Test	54

2.7.5	Zellaufschluss	54
2.7.6	Proteinfällung	55
2.7.7	Proteinbestimmung mit dem PlusOne 2D Quant Kit	55
2.7.8	Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung	55
2.7.9	Isoelektrische Fokussierung	56
2.7.10	Vorbereitung der pH-Gradientenstreifen für die SDS-PAGE	56
2.7.11	Herstellung der Gele für die SDS-PAGE	56
2.7.12	SDS-PAGE	57
2.7.13	Fluoreszenzfärbung mit RuBPS	57
2.7.14	Auswertung der 2D Gele	58
2.7.15	Massenspektrometrie	58
2.7.16	Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF-Analyse	59
2.8	Metabolomanalyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie	60
2.8.1	Kultivierung der Zellen	60
2.8.2	Zellernte	61
2.8.3	Zellaufschluss und Vorbereitung für die Derivatisierung	61
2.8.4	Derivatisierung und Vermessung der Proben	61
3	Ergebnisse und Diskussion	63
3.1	Wachstumsverhalten in ASM	63
3.1.1	Wachstum im Flüssigmedium	63
3.1.2	Wachstum im Koloniebiofilm	66
3.2	Energiegewinnung in ASM	67
3.3	Wachstum von CF-Isolaten	70
3.4	Methioninauxotrophie in CF-Isolaten	72
3.4.1	Identifizierung methioninauxotropher CF-Isolate	73
3.4.2	Identifizierung von <i>metF</i> als verantwortliches Gen für die Methioninauxotrophie	74
3.4.3	<i>metF</i> und <i>quorum sensing</i>	77
3.5	Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i> in ASM	79
3.5.1	Bestimmung minimaler inhibitorischer Konzentrationen	79
3.5.2	Antibiotikaresistenz in Abhängigkeit von der Nitrat-Konzentrationen	80
3.5.3	Antibiotikaresistenz während der Stationärphase	82
3.5.4	Analysen zur Antibiotikaresistenz	84
3.5.4.1	Transkriptomanalyse	84

3.5.4.2	Proteomanalyse	91
3.5.4.3	Metabolomanalyse	93
3.5.4.4	Zusammenfassung.....	96
3.5.5	Faktoren für die Antibiotikaresistenz.....	99
3.5.5.1	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD	99
3.5.5.2	MexA der MexAB-OprM Effluxpumpe	99
3.5.5.3	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase SahH	100
3.5.5.4	OprD-Protein der äußeren Membran.....	101
3.5.5.5	Spermidin	102
3.5.6	Mutanten-Studien	103
3.5.6.1	Wachstum von Mutanten auf ASM-Agar	103
3.5.6.2	Antibiotikaresistenz von Mutanten während der Stationärphase	104
3.5.6.3	Antibiotikaresistenz von Mutanten in Abhängigkeit von der Nitrat- Konzentration	107
4	Zusammenfassung und Ausblick	109
4.1	Zusammenfassung.....	109
4.2	Ausblick	110
5	Literaturverzeichnis.....	111
6	Anhang	128
7	Danksagung	153