

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Bakterium <i>Caulobacter crescentus</i>	1
1.2	Nährstoffaufnahme bei Bakterien	2
1.2.1	Einfache Diffusion	3
1.2.2	Erleichterte Diffusion	4
1.2.3	Aktiver Transport.....	5
1.3	Energie-Transduktionskomplexe	5
1.4	TonB-abhängige Rezeptoren bei <i>C. crescentus</i>	9
1.5	Aufgabenstellung.....	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Medien	14
2.1.4	Medienzusätze	15
2.1.5	Lösungen und Puffer.....	16
2.1.5.1	Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	16
2.1.5.2	Lösungen für SDS-Page	17
2.1.5.3	Lösungen zur Isolierung der Gesamtmembranen.....	18
2.1.5.4	Lösungen zur Proteinaufreinigung für Ni-NTA-Spin- Säulen	18
2.1.5.5	Lösungen zur Proteinaufreinigung für Chitinbeads.....	19
2.1.6	Bakterienstämme	21
2.1.7	Klonierungsvektoren	22
2.1.8	Plasmide	23
2.1.9	Plasmidkonstruktionen.....	24
2.1.10	Synthetische Oligonukleotide.....	25
2.2	Methoden	33
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	33
2.2.1.1	Kulturbedingungen für <i>Caulobacter crescentus</i>	33
2.2.1.2	Konjugation.....	33
2.2.1.3	Wachstumstest	34
2.2.2	Molekularbiologische/-genetische Methoden.....	34
2.2.2.1	Isolierung chromosomaler DNA	34
2.2.2.2	Klonierungstechniken	34
2.2.2.3	Plasmidisolierung	35
2.2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.2.2.5	DNA-Sequenzierung	36

2.2.2.6	Überprüfung der <i>tonB</i> -Mutante HB2004	36
2.2.2.7	Chromosomale Knockout-Mutanten in <i>C. crescentus</i>	37
2.2.2.7.1	Die cc3508:: <i>Gm^R</i> -Mutante SL3508.....	37
2.2.2.7.2	Die Glucoamylase:: Ω -Mutante SL2282.....	38
2.2.2.7.3	Die Transporter:: Ω -Mutante SL2283	39
2.2.2.7.4	Die Regulator:: Ω -Mutante SL2284.....	41
2.2.2.7.5	Die <i>tonB2</i> :: Ω <i>tonB3</i> :: <i>Gm^R</i> -Doppelmutante SL8.....	42
2.2.2.7.6	Die <i>tonB1</i> :: Ω -Mutante SL2334a	42
2.2.2.7.7	Die <i>tonB1</i> :: <i>Gm^R</i> <i>tonB2</i> :: Ω -Mutante SL9	43
2.2.2.8	Punktmutagenese von Plasmid-DNA	44
2.2.2.9	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose	44
2.2.3	Proteintechniken	45
2.2.3.1	Proteinbestimmung	45
2.2.3.2	Überexpression von Proteinen	45
2.2.3.3	Isolierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i>	45
2.2.3.4	Aufreinigung von NagAHis ₆ über Ni-NTA-Säulen	46
2.2.3.5	Aufreinigung von NagAHis ₆ über Chitin Beads	47
2.2.3.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.2.3.7	Kanalmessung in „black lipid“ Membranen	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Suche nach einem zweiten TonB-Protein in <i>Caulobacter crescentus</i>	49
3.1.1	Überprüfung der <i>tonB2</i> -Mutante HB2004	50
3.1.2	Datenbankinformationen über CC2327	51
3.1.3	Identifizierung des <i>tonB3</i> -Gens in <i>C. crescentus</i> durch Sequenzvergleiche.....	52
3.1.4	Herstellung der Mutante <i>tonB3</i> :: <i>Gm^R</i> -Mutante SL3508.....	54
3.1.4.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose und ¹⁴ C- markiertem GlcNAc in SL3508	55
3.1.5	Herstellung der Doppelmutante <i>tonB2</i> :: Ω <i>tonB3</i> :: <i>Gm^R</i> -Mutante SL8	58
3.1.5.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose bzw. ¹⁴ C- markiertem GlcNAc in SL8	58
3.2	Ist ein TonB-Protein an der Maltodextrinaufnahme beteiligt?	60
3.2.1	Punktmutagenese in der TonB-Box von MalA.....	61
3.2.1.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose in HB2003pBB2287	61
3.3	Datenbankinformation über cc2334a.....	63
3.3.1	Herstellung der <i>tonB1</i> :: Ω -Mutante SL2334a.....	66
3.3.1.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose und ¹⁴ C- markiertem GlcNAc ..	66
3.3.1.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>tonB1</i> -Mutante SL2334a bezüglich der Maltodextrinaufnahme	68
3.3.2	Sequenzanalyse der TonB-Proteine.....	70
3.3.3	Herstellung der Doppelmutante <i>tonB1</i> :: <i>Gm^R</i> <i>tonB2</i> :: Ω -Mutante SL9	75
3.3.3.1	Transportmessungen mit radioaktivem ¹⁴ C-GlcNAc	75
3.4	Charakterisierung des Genclusters um MalA	76
3.4.1	Herstellung der Glucoamylase:: Ω -Mutante SL2282	79
3.4.1.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose	79

3.4.1.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>malS</i> -Mutante SL2282 bezüglich der Maltodextrinaufnahme	83
3.4.1.3	Komplementationsversuch von <i>E. coli</i> RD58 mit CCMalS.....	84
3.4.2	Herstellung der Transporter:: Ω -Mutante SL2283	89
3.4.2.1	Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose	89
3.4.3	Herstellung der Regulator:: Ω -Mutante SL2284	90
3.4.3.1	Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose	91
3.5	Erfolgt die Substrataufnahme über NagA energieabhängig?	92
3.5.1	Wachstumstest verschiedener mutmaßlicher <i>tonB</i> -Mutanten von <i>C. crescentus</i> in GlcNAc, (GlcNAc) ₃ und (GlcNAc) ₅	94
3.5.2	Komplementation einer <i>nagA</i> Mutante SE0446.....	96
3.5.2.1	Transportmessungen mit ^{14}C -markiertem GlcNAc.....	97
3.5.3	Aufreinigung von NagAHis ₆	98
3.5.4	Einzelkanalmessungen von NagA an künstlichen Membranen.....	100
3.5.4.1	Einzelkanal-Leitfähigkeit.....	100
3.5.4.2	Titrationmessungen	102
4	DISKUSSION.....	104
4.1	Maltose wird TonB-abhängig aufgenommen	105
4.2	Das <i>mal</i> -Gencluster	115
4.3	Anpassung von <i>C. crescentus</i> an sein nährstoffarmes Habitat	122
4.4	Hypothese zur Maltodextrinaufnahme.....	127
4.5	GlcNAc-Aufnahme über NagA.....	128
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	134
6	LITERATUR.....	136
7	ANHANG	153
8	ABKÜRZUNGEN.....	161