
Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Substrattransport bei Bakterien	1
1.2 Energie-Transduktionskomplexe	3
1.3 TonB-abhängige Rezeptoren	4
1.4 <i>Caulobacter crescentus</i> und seine TonB-abhängigen Rezeptoren	6
1.5 Aufgabenstellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Geräte und Chemikalien	9
2.1.2 Medien	11
2.1.3 Medienzusätze	12
2.1.4 Lösungen und Puffer	13
2.1.4.1 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	13
2.1.4.2 Lösungen für SDS-PAGE	13
2.1.4.3 Lösungen für Western Blots	14
2.1.4.4 Lösungen für Southern Blots	14
2.1.4.5 Lösungen zur Isolierung von Gesamtmembranen	15
2.1.4.6 Lösungen zur Proteinaufreinigung	16
2.1.4.7 Lösungen zur 2D-Gelelektrophorese	17
2.1.4.7.1 Lösungen für Silberfärbung	18
2.1.4.7.2 Lösungen für Coomassie-Färbung	18
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme	19
2.1.6 Klonierungsvektoren	19
2.1.7 Plasmide	20
2.1.8 Plasmidkonstruktionen	21
2.1.9 Synthetische Oligonukleotide	22
2.2 Methoden	25
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1.1 Kulturbedingungen von <i>C. crescentus</i>	25
2.2.1.2 Konjugation	25
2.2.1.3 Wachstumstests	25

2.2.2 DNA-Methoden	26
2.2.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA	26
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.2.4 Klonierungstechniken	27
2.2.2.5 Konstruktion chromosomaler Mutanten in <i>C. crescentus</i>	27
2.2.2.5.1 Die <i>malA::</i> -Mutante HB2003	28
2.2.2.5.2 Die <i>tonB::</i> -Mutante HB2003	29
2.2.2.5.3 Die <i>tonB:: exbBD1::Gm^R</i> -Doppelmutante HB2006	30
2.2.2.5.4 Die <i>exbBD1::Gm^R</i> -Mutante HB2007	30
2.2.2.5.5 Versuch der Konstruktion von <i>exbBD1::</i> bzw. <i>exbBD2::Gm^R</i> in JS1003	31
2.2.2.6 Southern Blot, Hybridisierung und Detektion	31
2.2.3 Proteintechniken	32
2.2.3.1 Isolierung der äußeren Membran von <i>C. crescentus</i>	32
2.2.3.2 Proteinbestimmung	33
2.2.3.3 Überexpression von Proteinen	33
2.2.3.4 Isolierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i>	33
2.2.3.5 Aufreinigung von MalAHis ₆	34
2.2.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.3.7 Western Blot	35
2.2.3.8 Immunologischer Nachweis	35
2.2.3.9 Kanalmessung in „black lipid“-Membranen	35
2.2.3.10 2-D-Gelelektrophorese	36
2.2.3.10.1 Rehydratisierung der IPG-Streifen	36
2.2.3.10.2 Probenvorbereitung für die Isoelektrische Fokussierung	36
2.2.3.10.3 Isoelektrische Fokussierung	37
2.2.3.10.4 Equilibrierung	37
2.2.3.10.5 2. Dimension (SDS-PAGE)	38
2.2.3.10.6 Färbung der Gele	38
2.2.3.10.6.1 Silberfärbung	38
2.2.3.10.6.2 Coomassie-Färbung	39
2.2.3.11 Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF)	39

3. Ergebnisse	40
3.1 Untersuchung des äußeren Membranproteinmusters von <i>Caulobacter crescentus</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Nährstoffangeboten	40
3.1.1 Eindimensionale SDS-PAGE der äußeren Membranproteine von <i>C. crescentus</i>	40
3.1.2 2-D-Gelelektrophorese der äußeren Membranproteine von <i>C. crescentus</i>	41
3.1.2.1 Optimierung der Bedingungen für die 2-D-Gelelektrophorese	41
3.1.2.2 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> nach Anzucht in verschiedenen Medien mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese	47
3.1.2.2.1 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> anhand von Silber-gefärbten 2-D-Gelen	47
3.1.2.2.2 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> anhand von Coomassie-gefärbten 2-D-Gelen	52
3.1.3 Identifizierung der Proteinspots durch Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF)	59
3.1.4 Datenbankinformationen über CC2287 (MalA)	61
3.2 Untersuchungen zur Funktion des äußeren Membranrezeptors CC2287 (MalA)	62
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der <i>malA::T</i> - Mutante HB2003 bzgl. Maltodextrinaufnahme	62
3.2.2 Kann MalA die Funktion von LamB in <i>E. coli</i> übernehmen?	63
3.2.2.1 Klonierung und Expression von <i>malA</i> in <i>E. coli</i>	64
3.2.2.2 Klonierung von <i>cc2237</i> und <i>cc2335-2336</i> in <i>E. coli</i>	65
3.2.2.3 Komplementationsversuch von <i>E. coli</i> KB419 mit MalA	65
3.2.2.3.1 Überprüfung der MalA-Expression in <i>E. coli</i> KB419	67
3.2.3 Kann Acarbose an MalA binden?	68
3.2.4 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme Energie-abhängig?	70
3.2.4.1 Herstellung der <i>tonB::T</i> -Mutante HB2004	70
3.2.4.2 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme TonB-abhängig?	71
3.2.4.3 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme ExbBD-abhängig?	72
3.2.4.4 Aufreinigung von MalA-His ₆	74
3.2.4.5 Einzelkanalmessungen von MalA an künstlichen Membranen	77
3.2.4.5.1 Einzelkanalmessungen von MalA-His ₆ nach SDS-Solubilisierung	77
3.2.4.5.2 Einzelkanalmessungen von MalA-His ₆ nach Harnstoff-Solubilisierung	82
3.2.4.5.3 Versuch der MalA-Isolierung aus <i>C. crescentus</i>	82

3.3 Untersuchungen zur Funktion der Proteine TonB und ExbBD aus <i>C. crescentus</i>	83
3.3.1 Komplementationsversuch einer <i>E. coli tonB</i> -Mutante mit TonB und ExbBD aus <i>C. crescentus</i>	83
3.3.2 Kann <i>C. crescentus</i> ohne TonB (CC2327) und ExbBD1 (CC2335-2336) unter Eisenmangel wachsen?	85
3.3.3 Erfolgt die Siderophoraufnahme bei <i>C. crescentus</i> TonB- bzw. ExbBD1-abhängig?	87
3.3.4 Sequenzanalyse zur Identifizierung homologer TonB-Proteine von <i>C. crescentus</i>	92
3.3.5 Identifizierung des Tol/PAL-Clusters in <i>C. crescentus</i> durch Sequenzvergleiche	92
4. Diskussion	94
4.1 Vergleich des Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> nach Anzucht in verschiedenen Medien	94
4.2 MalA hat die Funktion eines Maltodextrintransporters	97
4.3 Werden Maltodextrine über MalA Energie-abhängig aufgenommen?	101
4.4 Hinweise auf das Vorhandensein eines weiteren TonB-Proteins	108
4.5 Hypothese zur Funktion von MalA	109
5. Zusammenfassung	110
6. Literatur	111
7. Anhang	119
8. Abkürzungen	124