

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort.....	V
Profil des Lehrstuhls Biophysik der Universität Kassel	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Formelsymbole und -einheiten.....	XIII
Zusammenfassung.....	XV
Summary.....	XVI
Inhaltsverzeichnis.....	XVII
1. Einleitung.....	1
1.1 Biomembranen	1
1.2 Phospholipide	1
1.3 Membranproteine und ihr Sekretionsweg in Gram-negativen Bakterien.....	3
1.4 Der β -barrel assembly machinery (BAM)-Komplex	6
1.5 BamB: Struktur und Eigenschaften.....	8
1.6 Das Lipoprotein BamD	10
1.7 Outer membrane protein A (OmpA) als Modellprotein für Faltungsstudien	11
1.8 Wissenschaftlicher Hintergrund.....	13
1.8.1 Der kinetics of tertiary structure formation by electrophoresis (KTSE)-Assay	13
1.8.2 CD-Spektroskopie	13
1.8.3 Fluoreszenz-Spektroskopie	14
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Materialien und Methoden.....	17
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.1.1 Zielgerichtete Mutagenese nach QuikChange	17
2.1.2 Transformation der mutierten DNA in den <i>E. coli</i> -Stamm BL21-DE3.....	17
2.2 Reinigung von BamB aus <i>E. coli</i>	17
2.2.1 Expression und Extraktion.....	17
2.2.2 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	18
2.2.3 Entfernung von Imidazol mit Hilfe von Dialysemembranen.....	19
2.2.4 Konzentration des Proteins	19
2.3 Kinetische Analysen zur Faltung von OmpA	19

2.3.1 Herstellung von unilamellaren Vesikeln.....	19
2.3.2 KTSE-Assay	20
2.3.3 Sekundärstrukturanalysen mit CD-Spektroskopie	22
2.3.4 Lipid/Protein-Interaktionsanalysen mittels Fluoreszenz-Spektroskopie	22
3. Ergebnisse	25
3.1 Erfolgreiche Mutagenese von zwei BamB-Mutanten	25
3.2 Expression und Reinigung von BamB und BamD aus <i>E. coli</i>	26
3.3 Sekundärstrukturanalysen von BamB mittels CD-Spektroskopie	29
3.3.1 Hydrophile und hydrophobe Einflüsse auf die Faltung von wt-BamB.....	30
3.3.2 Analysen zur Sekundärstruktur der BamB-Mutanten G120C und S126C	33
3.4 Faltungsstudien und Membraninsertion von OmpA in An- und Abwesenheit von verschiedenen BAM-Komponenten.....	36
3.4.1 Effekte von BamB und BamD auf die Insertion von OmpA in Lipidvesikel.....	36
3.4.2 Ermittlung der BamB/OmpA Stöchiometrie	41
3.4.3 Kooperationsstudien von BamB, BamD und der periplasmatischen Domäne von BamA in SUVs	45
3.4.4 Einfluss von BamB und BamD auf die Aktivierungsenergie des Faltungsprozesses von OmpA.....	48
3.4.5 Untersuchungen zu elektrostatischen Einflüssen auf die Faltung von OmpA.....	57
3.5 Interaktionsanalysen von BamB mit der Lipidmembran	60
4. Diskussion	65
4.1 Die Formierung der Sekundärstruktur von BamB ist unabhängig von einer hydrophoben Umgebung.....	65
4.2 BamB und BamD erleichtern die Faltung und Insertion von OmpA in Lipidvesikel.....	66
4.3 <i>In vitro</i> -Studien lassen eine 1:1-Stöchiometrie von BamB und OmpA vermuten	67
4.4 Keine endgültige Aussage zu Kooperationen zwischen den BAM-Komponenten möglich.....	68
4.5 BamB und BamD reduzieren die Aktivierungsenergie der Faltung und Insertion von OmpA in DLPC:DLPE:DLPG (5:3:2).....	68
4.6 BamB inhibiert die Faltung und Insertion von OmpA in Gegenwart von negativ geladenen Lipiden	69
4.7 BamB interagiert primär mit negativ geladenen Lipiden.....	70
5. Referenzen.....	73
Danksagung.....	79

Einbau und Faltung von β -Fass Membranproteinen in
Bakterien

Funktion von BamB beim Einbau des
Außenmembranproteins A (OmpA) aus *Escherichia coli*
Gerlach, L.

2016, XVIII, 79 S. 26 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-12653-7