

# Inhaltsverzeichnis

Geleitwort.....	V
Profil des Lehrstuhls Biophysik der Universität Kassel .....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Formelsymbole und -einheiten.....	XIII
Zusammenfassung.....	XV
Summary .....	XVI
Inhaltsverzeichnis.....	XVII
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biomembranen .....	1
1.2 Phospholipide.....	1
1.3 Membranproteine und ihr Sekretionsweg in Gram-negativen Bakterien.....	3
1.4 Der $\beta$ -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
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>17</b>
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
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
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
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>65</b>
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
<b>5. Referenzen.....</b>	<b>73</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>79</b>