

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>                                          | <b>I</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                       | <b>VI</b> |
| <b>1. Einleitung</b>                                               | <b>1</b>  |
| 1.1 Stabilisierung von Makromolekülen                              | 1         |
| 1.2 Natürliche Umgebungen von Proteinen                            | 4         |
| 1.3 Künstliche Umgebungen von Proteinen                            | 5         |
| 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit                                   | 6         |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                    | <b>8</b>  |
| 2.1 Organismen und Plasmide                                        | 8         |
| 2.2 Verwendete Oligonukleotide                                     | 9         |
| 2.3 Nährmedien                                                     | 10        |
| 2.4 Zellanzucht                                                    | 12        |
| 2.4.1 Anzucht von <i>E. coli</i>                                   | 12        |
| 2.4.2 Stammkulturen                                                | 12        |
| 2.5 Bestimmung von Wachstumsparametern                             | 12        |
| 2.6 Herstellung zellfreier Extrakte                                | 13        |
| 2.6.1 Zellernte                                                    | 13        |
| 2.6.2 Zellaufschluss                                               | 13        |
| 2.7 Proteinbestimmung                                              | 14        |
| 2.8 Methoden für das Arbeiten mit DNA                              | 14        |
| 2.8.1 Behandlung von Geräten und Lösungen                          | 14        |
| 2.8.2 Präparation genomischer DNA                                  | 15        |
| 2.8.3 Präparation von Plasmid-DNA                                  | 16        |
| 2.8.3.1 Analytische Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>           | 16        |
| 2.8.3.2 Präparative Plasmidisolierung                              | 17        |
| 2.8.4 Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung von DNA      | 17        |
| 2.8.5 <i>In vitro</i> -Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR | 18        |
| 2.8.6 Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation                    | 20        |

|             |                                                                                                      |           |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.8.7       | Verdau von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen                                                       | 21        |
| 2.8.8       | Dephosphorylierung von Vektor-DNA                                                                    | 21        |
| 2.8.9       | Agarose-Gelelektrophorese                                                                            | 22        |
| 2.8.9.1     | Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese                                                | 23        |
| 2.8.9.2     | Isolierung von dsDNA aus präparativen Agarose-Gelen                                                  | 24        |
| 2.8.10      | Klonierung rekombinanter DNA in <i>E. coli</i>                                                       | 24        |
| 2.8.10.1    | Ligation von dsDNA-Fragmenten                                                                        | 24        |
| 2.8.10.2    | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen                                                       | 25        |
| 2.8.10.3    | Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen nach HANAHAN (1983)                                        | 26        |
| 2.8.10.4    | Kolonie-PCR-Screening                                                                                | 27        |
| 2.8.10.5    | Schnell-Screen von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Cracking)                                           | 27        |
| 2.8.10.6    | DNA-Sequenzierung                                                                                    | 28        |
| <b>2.9</b>  | <b>Anreicherung und Aufreinigung rekombinanter Proteine</b>                                          | <b>29</b> |
| 2.9.1       | Expression der rekombinanten Proteine                                                                | 30        |
| 2.9.2       | Aufreinigung der Proteine über Affinitätschromatographie                                             | 30        |
| 2.9.3       | Dialyse von Proteinen                                                                                | 31        |
| <b>2.10</b> | <b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970)</b>                                       | <b>32</b> |
| <b>2.11</b> | <b>COOMASSIE-Färbung von Proteinen</b>                                                               | <b>34</b> |
| <b>2.12</b> | <b>Kopplung von Proteinen an Liposomen</b>                                                           | <b>35</b> |
| 2.12.1      | Herstellung von Liposomen durch Ultraschall (BARINAGAREMENTERIA RAMIREZ et al., 2000; mod.)          | 35        |
| 2.12.2      | Kopplung der AmyA und GUK1 über Streptavidin oder <i>Strep</i> -Tactin (Linkerproteine) an Liposomen | 36        |
| <b>2.13</b> | <b>Elektronenmikroskopie</b>                                                                         | <b>37</b> |
| 2.13.1      | Elektronenmikroskopische Trägernetze                                                                 | 37        |
| 2.13.2      | Kohlefolien                                                                                          | 38        |
| 2.13.3      | Negativkontrastierung nach VALENTINE et al. (1968)                                                   | 38        |
| 2.13.4      | Elektronenmikroskopische Abbildungen                                                                 | 39        |
| 2.13.5      | Größenbestimmung von Liposomen                                                                       | 39        |
| <b>2.14</b> | <b>Enzymaktivitätstests</b>                                                                          | <b>40</b> |
| 2.14.1      | $\alpha$ -Amylase (AmyA) Enzymassay                                                                  | 40        |

|             |                                                                                  |           |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.14.2      | Optisch-enzymatischer Test der Guanylatkinase<br>(AGARWAL et al., 1978)          | 42        |
| <b>2.15</b> | <b>Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme</b>                                    | <b>44</b> |
| <b>3.</b>   | <b>Experimente und Ergebnisse</b>                                                | <b>47</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Herstellung der rekombinanten Plasmide</b>                                    | <b>47</b> |
| 3.1.1       | Klonierung der <i>amyA</i>                                                       | 48        |
| 3.1.1.1     | Ergebnis der Sequenzierung der <i>amyA</i>                                       | 50        |
| 3.1.2       | Klonierung der <i>guk1.1</i>                                                     | 53        |
| 3.1.2.1     | Ergebnis der Sequenzierung von<br>pJC20[ <i>StrepN</i> ] <i>guk1.1</i> [1.3]     | 56        |
| <b>3.2</b>  | <b>Expression und Aufreinigung der rekombinanten<br/>Proteine</b>                | <b>57</b> |
| 3.2.1       | Expression der AmyA                                                              | 57        |
| 3.2.2       | Aufreinigung der AmyA mittels Affinitätschromatographie                          | 58        |
| 3.2.3       | Expression der GUK1                                                              | 59        |
| 3.2.4       | Aufreinigung der GUK1 mittels Affinitätschromatographie                          | 60        |
| <b>3.3</b>  | <b>Aktivitätstests der rekombinanten Proteine</b>                                | <b>61</b> |
| 3.3.1       | Enzymaktivität der AmyA                                                          | 62        |
| 3.3.1.1     | Struktur der rekombinanten AmyA                                                  | 63        |
| 3.3.2       | Enzymaktivität der GUK1                                                          | 65        |
| <b>3.4</b>  | <b>Herstellung von Liposomen (DPPC bzw. DPPC/N-<br/>Biotinyl-Cap-PE)</b>         | <b>65</b> |
| <b>3.5</b>  | <b>Kopplungsexperimente mit der rekombinanten AmyA</b>                           | <b>66</b> |
| 3.5.1       | Experimente zur Kopplung der AmyA über Streptavidin an<br>DPPC-Liposomen         | 66        |
| 3.5.1.1     | Nachweis der Kopplung (AmyA/Streptavidin/DPPC)                                   | 67        |
| 3.5.1.2     | Aktivitätstests zur Kopplung AmyA/Streptavidin/DPPC                              | 69        |
| 3.5.1.3     | Einfluss von Harnstoff                                                           | 74        |
| 3.5.1.4     | Einfluss von Betain                                                              | 76        |
| 3.5.2       | Experimente zur Kopplung der AmyA über <i>Strep</i> -Tactin an<br>DPPC-Liposomen | 77        |

|            |                                                                             |            |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.5.2.1    | Nachweis der Kopplung (AmyA/ <i>Strep</i> -Tactin/DPPC)                     | 78         |
| 3.5.2.2    | Aktivitätstests zur Kopplung AmyA/ <i>Strep</i> -Tactin/DPPC                | 78         |
| 3.5.3      | Kopplung der AmyA über Streptavidin an DMPC-Liposomen                       | 80         |
| <b>3.6</b> | <b>Kopplungsexperimente mit der GUK1</b>                                    | <b>82</b>  |
| 3.6.1      | Kopplung der GUK1 über Streptavidin an DPPC-Liposomen                       | 83         |
| 3.6.1.1    | Nachweis der Kopplung (GUK1/Streptavidin/DPPC)                              | 83         |
| 3.6.1.2    | Aktivitätstests zur Kopplung GUK1/Streptavidin/DPPC                         | 84         |
| 3.6.2      | Kopplung der GUK1 über Streptavidin an DMPC-Liposomen                       | 86         |
| 3.6.3      | Vergleich DPPC und DMPC mit Streptavidin                                    | 87         |
| 3.6.4      | Kopplung der GUK1 über <i>Strep</i> -Tactin an DPPC-Liposomen               | 90         |
| 3.6.4.1    | Nachweis der Kopplung (GUK1/ <i>Strep</i> -Tactin/DPPC)                     | 90         |
| 3.6.4.2    | Aktivitätstests zur Kopplung GUK1/ <i>Strep</i> -Tactin/DPPC                | 91         |
| 3.6.5      | Kopplung der GUK1 über <i>Strep</i> -Tactin an DMPC-Liposomen               | 93         |
| 3.6.6      | Vergleich DPPC und DMPC mit <i>Strep</i> -Tactin                            | 95         |
| 3.6.7      | Einfluss von Harnstoff                                                      | 96         |
| 3.6.8      | Einfluss von Betain                                                         | 97         |
| <b>3.7</b> | <b>Kinetik der GUK1 im Vergleich</b>                                        | <b>99</b>  |
| <b>3.8</b> | <b>Stabilitätstests der rekombinanten Enzyme</b>                            | <b>99</b>  |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion</b>                                                           | <b>102</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Beschaffenheit des verwendeten Kopplungsmechanismus sowie der Matrix</b> | <b>102</b> |
| 4.1.1      | Aufreinigung der rekombinanten Enzyme AmyA und GUK1                         | 103        |
| 4.1.2      | Kopplungsmechanismus                                                        | 104        |
| 4.1.3      | Kopplungsmatrix                                                             | 105        |
| <b>4.2</b> | <b>AmyA-Struktur</b>                                                        | <b>107</b> |

|            |                                                                         |            |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.1      | Orientierung der AmyA (im AmyA-Linkermolekül-Komplex)<br>an Liposomen   | 111        |
| <b>4.3</b> | <b>Struktur und Orientierung der GUK1</b>                               | <b>113</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Kopplung und Aktivität der AmyA und GUK1</b>                         | <b>114</b> |
| 4.4.1      | Einfluss der Kopplung auf die Enzymaktivität der AmyA                   | 114        |
| 4.4.2      | Einfluss der Kopplung auf die Enzymaktivität der GUK1                   | 116        |
| 4.4.2.1    | Einfluss von Liposomenmembranen auf die Aktivität der<br>GUK1 und AmyA  | 117        |
| <b>4.5</b> | <b>Einfluss von Harnstoff</b>                                           | <b>122</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Einfluss von Betain</b>                                              | <b>126</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Einflüsse einer definierten chemisch-physikalischen<br/>Umgebung</b> | <b>129</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Lipidmembranen als Schalter</b>                                      | <b>130</b> |
| <b>5.</b>  | <b>Zusammenfassung</b>                                                  | <b>132</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Literatur</b>                                                        | <b>135</b> |