

# Die Wirkung der membranschützenden Dehydrine DH10 und Rab18

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Sandra Osthoff

aus Dortmund

Berlin, Februar 2012



Die Dissertation wurde angefertigt  
im Institut für Biologie, Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie  
unter Leitung von Herrn Prof. J.M. Schmitt  
im Zeitraum von August 2007 bis November 2011

1. Gutachter: Herr Prof. J. M. Schmitt, Freie Universität Berlin
2. Gutachter: Herr PD Dr. D. K. Hincha, Max-Plank-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm

Disputation am 17.02.2012



## Danksagung

»Wenn eine Idee nicht zuerst absurd erscheint, taugt sie nichts.«

Albert Einstein

Für die Hilfe bei der Umsetzung einer solchen Idee danke ich:

Herrn Prof. Jürgen Schmitt, der mir die Möglichkeit zur Promotion gab und mich stets forderte und förderte, um meine Ideen umsetzen und beweisen zu können,

Herrn Dr. Carsten Köhn für konstruktive Diskussionen und Hilfestellung bei der Lehre,

Frau Sigrid Kimura für die Hilfe bei der Erledigung der Formalitäten zu der Dissertation und für das Lesen des Manuskriptes,

Frau Hildegard Köth für die unzähligen Thylakoide und die Organisation des Labors, dies hat mir die Arbeit erleichtert,

und allen aus der Arbeitsgruppe für viele schöne Momente während der letzten vier Jahre.

Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Romeis und der Arbeitsgruppe Mutzel für die technische Unterstützung und viele anregende Diskussionen,

der Firma Knauer, die mir die Messung der Osmolalität mit verschiedenen Osmometern ermöglichte, um meine Ergebnisse verifizieren zu können, im besonderen Frau Schubert für die tatkräftige Hilfe am Dampfdruck-osmometer.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die Schaffung anderer Blickwinkel auf meine Arbeit und so mancher nötigen Ablenkung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützten, nicht nur während meiner Doktorarbeit, sondern bei der Umsetzung jeder meiner Ideen,

Danke.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Abstract	8
1. Einleitung	9
1.1. Gefrierschädigung bei Pflanzen	10
1.2. Zelluläre Anpassung der Pflanzen an Kälte	11
1.3. Die Dehydrine	11
1.4. Cryoprotectin (CPP)	14
1.5. Das Thylakoid-Testsystem	15
1.6. Aufgabenstellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Pflanzenmaterial	17
2.2. Bakterienstamm	17
2.3. Aufreinigung der Proteine	18
2.4. Bestimmung der Boyle van't Hoff-Relation	19
2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest	20
2.6. <i>E.coli</i> -Fermentation	20
2.7. Entsalzung der Proteine über Nap5-Säulen	22
2.8. Frostschutz, bestimmt über das Thylakoidvolumen	24
2.9. Gelchromatographie	24
2.10. Gelelektrophorese	25
2.11. Hill-Reaktion	27
2.12. Ionenanalyse	27
2.13. Messung der Leitfähigkeit von Lösungen	29
2.14. Messung der Osmolalität von Lösungen	30
2.15. Proteinbindung an Thylakoidmembranen	30
2.16. Ruthenium Rot-Färbung	31
2.17. Sedimentation	32
2.18. Statistik	33
2.19. Thylakoidisolation	34
2.20. Zyklische Photophosphorylierung	35
3. Ergebnis – Fermentation und Aufreinigung	36
3.1. Fermentation	36
3.2. Aufreinigung	37
3.3. Entsalzung über Gelfiltration mit NAP5-Säulen	39
3.4. Nachweis von Ammoniumsulfat-Resten	43
3.5. Fällung des hitzestabilen <i>E.coli</i> -Proteins	46
3.6. Lagerung	47
3.7. Aufgereinigte Proteinmengen	48
4. Ergebnis - Funktionsanalyse	50
4.1. Frostschutz	50
4.2. Bindung an Thylakoidmembranen	57
4.3. Boyle van't Hoff	59
4.4. Sedimentation	67

4.5.	Zyklische Photophosphorylierung	74
4.6.	Proteinverlust aus Thylakoiden durch hohe Salzkonzentrationen und einen Frier-Tau-Zyklus	81
4.7.	Gefrierpunktserniedrigung	83
4.8.	Interaktion mit Salz	87
4.9.	Messung des apparenten Molekulargewichts von DH10	93
5.	Diskussion - Fermentation und Aufreinigung	98
6.	Diskussion - Funktionsanalyse	101
6.1.	Frostschutz	102
6.2.	Boyle van't Hoff	105
6.3.	Zyklische Photophosphorylierung und Proteinverluste aus der Thylakoidmembran	107
6.4.	Sedimentation und Salzbindung	110
6.5.	Gefrierpunktserniedrigung und Molekulargewicht	115
6.6.	Zusammenfassung der Diskussion	121
7.	Ausblick	123
8.	Anhang	124
	Literaturnachweis:	124
	Verzeichnis der Fußnoten:	134
	Abbildungsverzeichnis:	135
	Diagrammverzeichnis:	135
	Formelverzeichnis:	136
	Tabellenverzeichnis:	136
	Abkürzungen:	137

## **Zusammenfassung**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fermentation und Aufreinigung zweier Dehydrine sowie ihrer Funktion.

Der Schwerpunkt lag in der Funktionsanalyse von DH10, auch als LTI29 oder ERD10 bezeichnet.

Dabei konnte die membranprotektive Funktion des Dehydrins DH10 am Beispiel des Schutzes von Thylakoidmembranen vor Gefrierschäden und Beschädigungen durch hohe Salinitäten nachgewiesen werden.

DH10 erzeugte das Phänomen der thermischen Hysterese, welches sich bei steigender Salzkonzentration verstärkte. Eindrucksvoll zu sehen war, dass DH10 das Ausfallen von Calciumsulfatkristallen verhinderte und deren Form veränderte.

Das Dehydrin Rab18 zeigte in Bezug auf den Salzschutz eine ähnliche Wirkung, wenn auch der Effekt geringer ausgeprägt war. Eine Frostschutzwirkung konnte nicht nachgewiesen werden.

## **Abstract**

This dissertation deals with the fermentation and purification of two dehydrins as well as with their functions. The focus is on analyzing the function of DH10, also known as LTI29 or ERD10.

It could be shown that the dehydrin DH10 is a membrane-protective protein. It protects thylakoid membranes against both, freezing damage and the influence of high salt concentrations. It could be demonstrated that DH10 avoids the precipitation of calcium sulfate crystals and changes their shape. Moreover, a thermal hysteresis, which is increased by high salt concentrations, could be shown.

For the dehydrin Rab18, a membrane protective function from high salt concentrations could be shown as well. The effect was less distinctive than with DH10. Rab18 showed no cryoprotective activity.



# 1. Einleitung

Pflanzen sind in ihrer Umwelt zahlreichen biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt.

Biotische Stressoren sind beispielsweise Fraß und Pflanzenpathogene.

Zu den abiotischen Belastungen zählen unter anderem Mangel oder Überschuss an Strahlung, Wasser oder Mineralstoffen, sowie zu hohe oder niedrige Temperaturen (Brunold, 1996).

Da die Pflanzen nicht in der Lage sind sich diesen feindlichen Bedingungen durch einen Ortswechsel zu entziehen, mussten sie während der Evolution Strategien entwickeln, mit denen sie überleben können (Grover *et. al.*, 2001).

Diese Mechanismen zu verstehen ist wichtig, um den wachsenden Nahrungsbedarf einer stetig wachsenden Weltbevölkerung auf immer kleineren Anbauflächen zu gewährleisten. Dass das Wetter trotz der ausgefeilten Technik immer noch für Ernteeinbußen sorgt, ist in einer Aufstellung der **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, im Folgenden FAO, ([www.fao.org](http://www.fao.org)) und des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz ([www.bmelv.de](http://www.bmelv.de)) in Diagramm 1 zu sehen. 2003 und 2007 waren starke wetterbedingte Ernteeinbußen zu verzeichnen. Auch 2010 wurde ein Rückgang der gesamten Getreideernte von 12,0 %, im Vergleich zum Vorjahr, den Wetterkapriolen zugeschrieben. Dazu kam noch einmal ein Rückgang um 3,9 % wegen verringerter Anbauflächen. Die Auswirkungen des zu nassen Sommers 2010 waren beim Weizen nicht so stark zu sehen, da dieser im Frühjahr geerntet wurde.

Bei Roggen, dessen Ernte später im Jahr stattfand, waren die Effekte dann stärker ausgeprägt (Bundesministerium für Ernährung, 2010)<sup>1</sup>.

Auch ganz aktuell sind Ernteeinbußen aufgrund der Wetterverhältnisse relevant: aufgrund der langen Frost- und Hagelperiode 2011 ist ein Rückgang von 12 % bei der Getreideernte zu vermelden. Bei Raps handelt es sich sogar um 34 % (www.bauernverband.de)<sup>2</sup>.

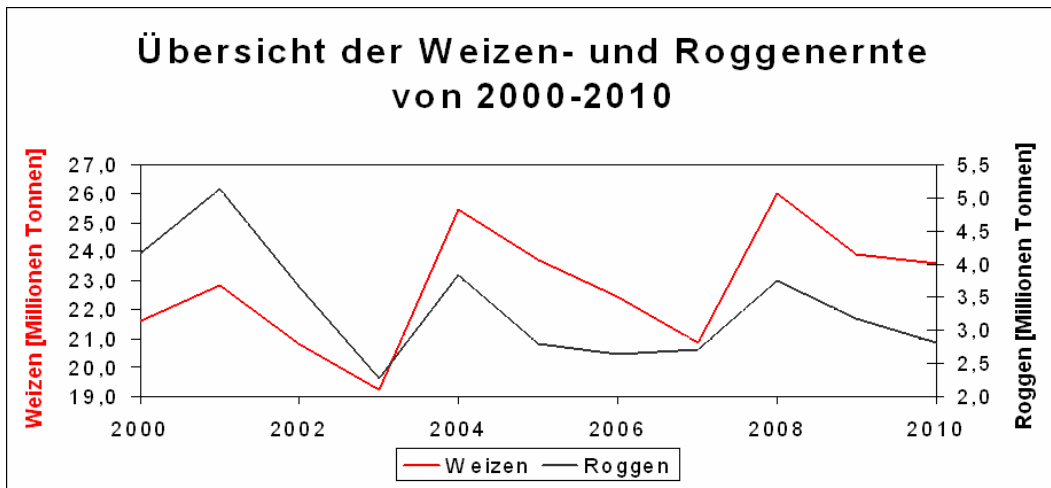


Diagramm 1: Übersicht der Weizen- und Roggenernte von 2000-2010

Dargestellt sind die Jahreserträge in Millionen Tonnen für Gesamtdeutschland. Die Daten für 2000-2008 stammen aus der Statistik der FAO, die Werte für 2009 und 2010 aus einem Bericht des BMELV von 2010.

Diese Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit den durch Frost ausgelösten Schäden.

## 1.1. Gefrierschädigung bei Pflanzen

Sinkt die Temperatur unter den Gefrierpunkt, beginnt das extrazelluläre Wasser zu gefrieren. Intrazellulär gefriert das Wasser vorerst nicht, da hier

<sup>1</sup> Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010, Trotz extremer Wetterlage nur geringe Ernteeinbußen in 2010. Standardbericht <http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Agrarmaerkte/Argrarmarkt-in-Zahlen/Ernte2010MengenPreise.html>.

<sup>2</sup> Getreideernte: Mageres Ergebnis für die Bauern <http://www.bauernverband.de/index.php?redid=152813&mid=434328>

eine hohe Konzentration an gelösten Substanzen vorliegt und die Nukleationsteilchen fehlen. Durch die Eisbildung im Apoplasten entsteht ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren. Wasser strömt aus der Zelle. Dadurch entsteht eine Substanzkonzentrierung in der Zelle und letztendlich eine Verformung der Zellwand. Sowohl die hohen Stoffkonzentrationen als auch die Verformung können die Pflanze schädigen (DeVries, 1984).

## **1.2. Zelluläre Anpassung der Pflanzen an Kälte**

Gefriertolerante Pflanzen realisieren die kürzere Sonneneinstrahlung im Herbst und die langsam absinkende Temperatur und bereiten sich auf die kalte Jahreszeit vor (Fowler *et al.*, 2001; Dhillon *et al.*, 2010).

Während der Anpassung an die niedrigeren Temperaturen verändern sich der Stoffwechsel und die Genexpression der Pflanze. Es werden vermehrt Kohlenhydrate eingelagert und auch die Konzentrationsverhältnisse der Kohlenhydrate innerhalb der Zellen verändert (Fujikawa *et al.*, 1999).

Es werden nun vermehrt Proteine exprimiert, die

- die Membran gegen osmotischen Stress abschirmen (Zhu *et al.*, 2007)
- die Selbstreparaturmechanismen begünstigen (Yamazaki *et al.*, 2008a)
- die CO<sub>2</sub>-Fixierung erhöhen (Kawamura und Uemura, 2003).

Es sind auch Proteine bekannt, die in der Lage sind, sich an entstehende Eiskristalle zu binden und damit die Bildung spitzer Eiskristallformationen zu verhindern (DeVries, 1984).

## **1.3. Die Dehydrine**

Da das Verständnis der Toleranzausbildung bei Pflanzen auch eine wirtschaftlich wichtige Rolle spielt, gibt es eine entsprechend hohe Anzahl an Forschungsprojekten.

In vielen dieser Arbeiten wurde nach Proteinen gesucht, die in die Anpassung an Kälte involviert sind. Immer wieder treten dabei die LEA (late embryogenesis abundant)-Proteine auf. Die Dehydrine zählen zu der zweiten Proteinklasse der LEA-Proteine. Wie der Name vermuten lässt, werden einige der Dehydrine während der Bildung von Samen verstärkt exprimiert. Allerdings werden auch in anderen Stresssituationen Dehydrine überexprimiert (Puhakainen *et al.*, 2004).

Es stellte sich heraus, dass die Dehydrine eine wichtige Rolle sowohl bei biotischem, als auch abiotischem Stress spielen (Grelet *et al.*, 2005; Brini *et al.*, 2011).

Sie alle besitzen hoch konservierte Elemente, nach denen sie einzelnen Gruppen zugeordnet werden können:

- das sehr lysinreiche K-Segment mit der vermuteten Funktion, amphiphatische  $\alpha$ -Helices zu bilden,
- das S-Segment, bestehend aus fünf bis sieben Serin-Resten, gefolgt von drei sauren Aminosäuren,
- das Y-Segment in Form eines Heptamers, N-terminal liegend und in bis zu 3 Kopien vorkommend,
- das  $\phi$ -Segment in weniger starker Konservierung, reich an Glycin und polaren Aminosäuren

(Alsheikh *et al.*, 2005; Rorat, 2006; Peng *et al.*, 2008; Nylander *et al.*, 2001).

Die meisten Dehydrine zeigen die strukturellen Eigenschaften von IDP's (intrinsically disordered Proteins). Hierbei handelt es sich um Proteine, deren Sekundärstruktur hauptsächlich aus einem random-coil besteht (Bokor *et al.*, 2005). Dies konnte für das Dehydrin DHN1 (Koag *et al.*, 2003) und auch für das DH10 (Mouillon *et al.*, 2006) gezeigt werden. Unter Stresssituationen entwickeln die Dehydrine dann eine andere Konformation (Kovacs, 2008).

Trotz der vielfältigen Forschung in den letzten Jahren, ist die Funktion der einzelnen Proteine noch immer unklar (Allagulova *et al.*, 2003; Popova *et al.*, 2011).

In *in-vitro*-Tests sind einzelne Eigenschaften bekannt. So wurde unter anderem beobachtet, dass einzelne Dehydrine

- an Phospholipide, Membrane oder Ionen binden (Koag *et al.*, 2003)
- die Aktivität von Enzymen schützen (Reyes *et al.*, 2008),
- als Chaperone fungieren (Kovacs, 2008; Kovacs *et al.*, 2008a),
- die irreversible Aggregation von anderen Proteinen verhindern (Goyal *et al.*, 2005; Veeranagamallaiah *et al.*, 2011),
- freie Radikale binden und Metallionen reduzieren (Hara *et al.*, 2005).

2007 kommen Tunnacliffe und Wise nach einem Vergleich bis dahin unveröffentlicher Untersuchungen zu dem Schluss, dass ein einzelnes Dehydrin nicht nur eine Funktion ausübt, sondern unter wechselnden Bedingungen wechselnde Funktionen haben kann (Tunnacliffe und Wise, 2007).

Eine besondere Herausforderung der funktionellen Charakterisierung von Dehydrinen ist die Deutung und Auswertung der *in-vivo*-Tests. Pflanzen verfügen über mannigfaltige Reaktionen als Antwort auf Stress, in die mehrere Proteine involviert sind. Wird das zu untersuchende Protein ausgeschaltet, kommt es zur Hochregulierung anderer Proteine und zur Abschwächung des knock-out-Effekts. Auch die Abschaltung einer oder mehrerer Proteingruppen hat sich als nicht praktikabel erwiesen, da der gemessene Effekt nicht eindeutig dem Funktionsverlust eines bestimmten Proteins zugeordnet werden kann (Lu *et al.*, 2007; Battaglia *et al.*, 2008).

Daher wurde in dieser Arbeit ein auf isolierten Thylakoiden basierendes *in-vitro*-Testsystem verwendet (siehe hierzu auch 1.5). Es zeichnet sich durch eine leichte Handhabung, eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Interpretierbarkeit der erhobenen Messdaten aus.

### 1.3.1 DH10 und Rab18

DH10, auch LTI29 oder ERD10 genannt, wird in jedem Gewebe der Pflanzen exprimiert. Unter Einfluss von Kälte, Hitze, Salz oder Abscisinsäure (ABA) konnte eine höhere Transkription beobachtet werden (Kiyosue *et al.*, 1994; Welin *et al.*, 1995).

DH10 ist ein Dehydrin des SK3-Types. Das heißt, dass es ein S-Segment und drei K-Segmente aufweist. Es ist 29,5 kDa groß und hat einen pI von 4,9.

Rab18 wird in Gegenwart von ABA überexprimiert und kommt hauptsächlich in Wurzeln vor. Es gehört der Gruppe der Y2SK2-Proteine an. Mit einem Molekulargewicht von 18,5 kDa ist es kleiner als DH10. Sein pI liegt bei 7,9. Auffallend ist der hohe Glycin-Gehalt von 33%.

Beide Dehydrine zeigen wegen ihres hydrophilen Charakters im SDS-Gel eine höhere apparente Molekularmasse auf. DH10 läuft bei 47 kDa anstelle von 29,5 kDa, Rab18 bei 25 kDa anstelle 18,5 kDa (Svensson *et al.*, 2000).

### 1.4. Cryoprotectin (CPP)

CPP wird in *Brassica oleracea* im Laufe der Winterhärtung exprimiert. Eine Sequenzanalyse zeigt, dass das CPP Bestandteile von drei Wax9 Proteinen aufweist (Hincha *et al.*, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass CPP an die Membran der Thylakoide bindet. Es reduziert zudem die Permeabilität der Thylakoidmembran. Daher wurde vermutet, dass CPP durch die Bindung an die Thylakoidmembran ihre Permeabilität herabsetzt und somit die Aufnahme von Osmotika während eines Frier-Tau-Zyklus reduziert. Dadurch wäre das Volumen geschützt (Sieg *et al.*, 1996).

Da dieses Protein eine Frostschutzwirkung zeigt, wurde es in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet.

## 1.5. Das Thylakoid-Testsystem

Das in dieser Arbeit verwendete *in-vitro*-Testsystem basiert auf Thylakoiden, die aus nicht frostgehärtetem Spinat isoliert wurden.

Thylakoide eignen sich besonders für die Erforschung von Frostschäden. Ihre Zusammensetzung und auch ihr Verhalten während eines Frier-Tau-Zyklusses sind genau bekannt.

Während des Frierens entsteht in der thylakoidhaltigen Lösung Eis, wodurch in dem nicht gefrorenen Restvolumen die gelösten Substanzen aufkonzentriert werden. Es entsteht ein osmotisches Gefälle, wodurch den Thylakoiden Wasser entzogen wird. Durch die Dehydration der Thylakoide verformt sich die Membran. Ein Membranbruch ist möglich. Zudem dringen zusätzlich Osmotika in die Thylakoide ein, die normalerweise nicht oder nur gering permeabel für die Thylakoidmembran sind.

Beim Auftauen nehmen die Thylakoide Wasser auf, um das nun gegenläufige osmotische Gefälle auszugleichen. Die Thylakoide schwellen an und können kollabieren.

Durch das Aufreißen der Membran wird Plastocyanin aus dem Lumen freigesetzt.

Erhöht man den osmotischen Wert der Thylakoidlösung durch Zugabe von beispielsweise Zucker, so wird das Thylakoidvolumen während eines Frier-Tau-Zyklusses bei gleicher Inkubationstemperatur geschützt.

Durch die erhöhte Stoffkonzentration sinkt der Gefrierpunkt im nicht gefrorenen Restvolumen stärker ab. Das bewirkt bei gleicher Inkubationstemperatur ein größeres nicht gefrorenes Restvolumen. Die Thylakoide erfahren eine geringere Volumenänderung während des Frier-Tau-Zyklusses.

Erhöht man hingegen den Salzgehalt der Ausgangslösung, so wird zwar auch das Volumen geschützt, jedoch werden membranständige Proteine durch die hohen Salzgehalte von der Membran herausgelöst (Hincha und Schmitt, 1985).

Beide Schäden, das Kollabieren der Thylakoide mit dem Verlust an Plastocyanin, sowie das Herauslösen membranständiger Proteine, inaktivieren die lichtgetriebene ATP-Synthese. Dies kann in der zyklischen Photophosphorylierung gemessen werden. Die Messung des Thylakoidvolumens und der zyklischen Photophosphorylierung sind einfache Methoden zur Ermittlung des Schadens. Dies ist neben der guten Manipulierbarkeit des Systems der große Vorteil gegenüber der Forschung *in-vivo* (DeVries, 1984; Battaglia *et al.*, 2008).

## **1.6. Aufgabenstellung**

Bekannt ist, dass DH10 bei Stress ausgelöst durch Kälte, Hitze und hohe Salinitäten vermehrt exprimiert wird (Nylander *et al.*, 2001).

Daher wurde eine Beteiligung des DH10 an der Frosthärtung von Pflanzen vermutet. Božović zeigte bereits, dass DH10 Thylakoide vor Schäden bei einem Frier-Tau-Zyklus schützt, wobei der Mechanismus dieser Schutzwirkung bislang ungeklärt ist (Božović, 2007).

Rab18 ist ABA induziert, dies weist ebenfalls auf eine Beteiligung bei Stressantworten hin. Die Funktion des Proteins ist ebenfalls noch nicht näher untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Mechanismen der Membranprotektion von DH10 und Rab18 zu liefern. Dabei sollten die Fermentation und die Aufreinigung optimiert werden. Der Schwerpunkt lag dabei in der Funktionsanalyse des DH10.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Pflanzenmaterial

Spinat: *Spinacia oleracea* cv. *Monnopa*

Anzucht in

a) Klimakammer:

Tag /Nachtzyklus: 8 h Licht (100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) und 20 °C

16 h Dunkelheit bei 15 °C

bei gleichbleibender Luftfeuchtigkeit von 60 %

b) Gewächshäuser der FU Berlin

c) Freilandzucht von Mai - September

Wirsingkohl: *Brassica oleracea* cv. *Grüfiwi*

Freilandzucht, nach Härtung (mindestens zwei Wochen unter 5 °C) geerntet und Blätter bei -20 °C gelagert

### 2.2. Bakterienstamm

E.coli M15[pREP4]

zweiter Vektor: pQE-60 der Firma Quiagen, verändert durch Svensson, neu benannt als pJTS1 (Svensson *et al.*, 2000)

Gene	Angaben NCBI	
Gen	Acc.no.	Referenz
LTI 29	P42759	(Kiyosue <i>et al.</i> , 1994)
Rab18	P30185	(Lang und Palva, 1992)

## **2.3. Aufreinigung der Proteine**

### **2.3.1 Aufreinigung von CPP**

Basierend auf Sieg *et al.*, 1996

1 kg Wirsingkohlblätter wurden in 800 ml Homogenisationspuffer (50 mM Tris, 2 % (w/v) Polyclar, 2 mM Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA), 300 µM Mercaptobenzothiazol, pH 7,8) homogenisiert. Grobe Fasern wurden mit einer Nylongaze (50 µm) und kleine Zelltrümmer durch Zentrifugation (23 000 g, 4 °C, 30 min) abgetrennt.

Der Überstand wurde 8 min bei 100 °C inkubiert, die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (23 000 g, 4 °C, 30 min).

Mit Essigsäure wurde der Überstand auf pH 4 gebracht und erneut die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (23 000 g, 4 °C, 30 min).

Im Anschluss wurden 30 g Polyamid-6-Matrix (Fa. Fluka, EC No. 2004693) zum Überstand gegeben und unter Rühren 20 min bei 4 °C inkubiert, die Polyamid-6-Matrix wurde abfiltriert. Das CPP wurde mit Ammoniumsulfat (60 % Sättigung) ausgefällt, sodass es dann bei 4 °C gelagert werden konnte.

### **2.3.2 Aufreinigung von DH10**

Die gewaschenen *E.coli*-Zellen aus 2.6 wurden in 30 ml Saccharoselösung (5 mM Saccharose mit 1 mM MnCl<sub>2</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub>) aufgenommen und in einen 100 ml Schüttelkolben gegeben.

Zum Aufschluss der Zellen wurden diese bei 0 °C 30 min mit 100 µg/ml Lysozym inkubiert und anschließend 15 min im Ultraschallbad der Bandelin electronic (Gerätetyp: RK 106 S, Leistung: P 100/200W, 35 kHz) bei voller Leistung aufgeschlossen.

Direkt nach dem Anschluss wurde eine Hitzefällung (10 min 100 °C) durchgeführt.

Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden die Zelltrümmer und die gefällten Fremdproteine 20 min bei 6000 g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde mit Salzsäure auf pH 2 gebracht. Das nun ausgefallene *E.coli*-Protein wurde bei 16000 g 5 min abzentrifugiert und das Pellet verworfen.

Nachdem der Überstand mit Natronlauge neutralisiert wurde, wurde die DH10-haltige Lösung in Fraktionen von 600 µl bei -20 °C gelagert.

### **2.3.3 Aufreinigung von Rab18**

Die Aufreinigung von Rab18 ist bis nach der Abtrennung der Zelltrümmer nach der Hitzefällung mit der Aufreinigung von DH10 identisch.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand einer Ammoniumsulfatfällung (30 % Sättigung) unterzogen.

Nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C wurden das *E.coli*-Protein durch Zentrifugation von 17 500 g, 4 °C, 10 min abgetrennt.

Der Rab18-haltige Überstand wurde in Fraktionen von 600 µl bei -20 °C gelagert.

## **2.4. Bestimmung der Boyle van't Hoff-Relation**

Es wurden Proteinlösungen mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen (5 bis 100 mM mit 1 mM MnCl<sub>2</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub>) hergestellt. Als Kontrolle dienten entsprechende Saccharoselösungen ohne Proteine.

Die Proteinlösungen wurden 1 zu 1 mit der Thylakoidlösung (1 mg/ml Chlorophyll, 5 mM NaCl) aus 2.19 gemischt und 2 h bei variabler Temperatur inkubiert (siehe 4.3 Bestimmung der Boyle van't Hoff).

Nach der Inkubation wurde dasselbe Volumen, wie das der Probelösung, einer 10 mM Magnesiumchloridlösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Hämatokritkapillaren der Firma Brand GMBH+CO KG befüllt und bei 12 000 min<sup>-1</sup> 15 min zentrifugiert (Haematokrit 20 der Firma

Hettich Zentrifugen). Das Thylakoidvolumen wurde mit dem Leitz Wetzlar Messokular bei neunfacher Vergrößerung bestimmt.

Die Osmolalitäten der eingesetzten Lösungen wurden bestimmt (siehe 2.14)

Zur Erstellung des Diagramms wurden die Thylakoidvolumen in  $\mu\text{l}/\text{mg}$  Chlorophyll gegen die reziproke Osmolalität aufgetragen.

## **2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest**

Nach Bradford, 1973

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Protein nach 5 min Inkubation im folgenden Testansatz bei 595 nm vermessen:

10  $\mu\text{l}$  Probe mit 790  $\mu\text{l}$  Bidest und 200  $\mu\text{l}$  Bradfordreagenz (Fa: Roth Art.Nr. K015.1)

Der Nullabgleich erfolgte mit 800  $\mu\text{l}$  Bidest und 200  $\mu\text{l}$  Bradfordreagenz.

Lag der Messwert für die Proteinprobe über 1 wurde die Proteinlösung verdünnt.

Die Eichgerade wurde mit BSA erstellt. Zuverlässige Messwerte lagen zwischen 0,1 und 1. Alle Proteinmengen in dieser Arbeit beziehen sich auf einen BSA-Standard.

## **2.6. *E.coli*-Fermentation**

Kulturmedium: LB-Medium (10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt ad. 1000 ml) mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin.

Der *E.coli*-Stamm wurde auf LB-Agar-Platten mit 15 g/l Agar bei 37 °C angezogen und bei 4 °C gelagert. Nach vier bis sechs Wochen wurden die Bakterien auf neue Platten übertragen.

### **2.6.1 Vorkultur**

Die Vorkultur wurde in einem 100 ml Schüttelkolben mit 20 ml Kulturmedium angesetzt. Die *E.coli*-Zellen wurden von der LB-Agar-Platte ins Medium übertragen und im Inkubationsschüttler Minitron der Firma INFORS Ag kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen waren: 37 °C bei 180 U/min für 4-5 h.

### **2.6.2 Impfkultur**

Mit 5 ml Vorkultur wurde die Impfkultur (200 ml Kulturmedium) angeimpft und bei 37 °C und 180 U/min im Inkubationsschüttler über Nacht kultiviert.

### **2.6.3 Hauptkultur**

Die Hauptkultur wurde im 10 L Fermenter 1 BCC der Firma Bio-Mag angesetzt. Hierzu wurden 6 L Kulturmedium mit 200 ml Impfkultur beimpft und bei 37 °C und 620 U/min fermentiert. Eine Kontrolle des Sauerstoffgehaltes war technisch bedingt nicht möglich. Das Medium erhitzte sich während der Fermentation auf 40 °C.

In regelmäßigen Abständen wurde mit einer sterilen 5 ml Pipette eine Probe entnommen und die Optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt.

Lag die OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 wurde die Proteinbildung durch Zugabe von 1 mM Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert.

Weitere 2 Stunden wurde fermentiert, bevor die Bakterienzellen geerntet wurden.

Die erhaltenen *E. coli*-Zellen wurden zweimal mit Saccharoselösung (5 mM Saccharose mit 1 mM MnCl<sub>2</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und anschließend bei -20 °C gelagert.

### **2.6.4 Kultivierung in Schüttelkolben**

Bei der Expression im Schüttelkolben wurde die Hauptkultur (400 ml Kulturmedium in einem 2 L-Schüttelkolben) mit 10 ml einer Übernacht-

kultur beimpft. Inkubiert wurde die Kultur bei 37 °C und 180 U/min im Inkubationsschüttler Minitron der Firma INFORS Ag.

## **2.7. Entsalzung der Proteine über Nap5-Säulen**

Bei der NAP5-Säule der Firma GE Healthcare handelt es sich um eine Saphadex™-G-25 DNA Grade Säule mit einem Bettvolumen von 0,5 ml.

### Vorbereitung der Säulen:

Die NAP5 Säulen wurden mit mindestens fünf Bettvolumen Elutionspuffer equilibriert.

### **2.7.1 CPP-Entsalzung**

#### Vorbereitung CPP-Lösung:

20 ml der CPP-Fällung wurde bei 7150 g, 4 °C, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 800 µl Probelösung aufgenommen. Die restlichen ungelösten Substanzen wurden bei 17 500 g, 2 min bei 4 °C abzentrifugiert.

#### Entsalzung:

Es werden für eine CPP-Probe zwei Säulen benötigt.

500 µl Überstand (Proteinlösung) wurden auf die erste Säule (spätere Bezeichnung Säule 1) aufgetragen und das Eluat verworfen.

Anschließend wurden 200 µl Elutionspuffer auf die Säule 1 gegeben und das Eluat wiederum verworfen.

300 µl Elutionspuffer wurden auf die Säule 1 aufgetragen und das Eluat (spätere Bezeichnung Eluat 1) aufgefangen.

Weitere 500 µl Elutionspuffer wurden auf die Säule 1 gegeben und das Eluat direkt auf die zweite Säule (spätere Bezeichnung Säule 2) aufgetragen.

Daraufhin wurden 200 µl Elutionspuffer auf die Säule 2 aufgetragen und das Eluat verworfen.

500 µl Elutionspuffer wurden auf die Säule 2 gegeben und das Eluat (spätere Bezeichnung Eluat 2) aufgefangen.

Die aufgefangenen Eluate 1 und 2 wurden vereinigt. Diese Proteinlösung wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

### **2.7.2 DH10-Entsalzung**

#### Entsalzung:

500 µl der DH10-Proteinlösung wurden auf die Säule aufgetragen und das Eluat verworfen.

200 µl Elutionspuffer wurden anschließend auf die Säule gegeben und das Eluat wiederum verworfen.

Es wurden 800 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen.

Diese Proteinlösung wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

### **2.7.3 Rab18-Entsalzung**

#### Entsalzung:

Je Ansatz werden zwei Säulen benötigt.

500 µl Überstand (Proteinlösung) wurden auf die erste Säule (spätere Bezeichnung Säule 1) aufgetragen und das Eluat verworfen.

Anschließend wurden 200 µl Elutionspuffer auf die Säule 1 gegeben und das Eluat wiederum verworfen.

400 µl Elutionspuffer wurden auf die Säule 1 aufgetragen und das Eluat (spätere Bezeichnung Eluat 1) aufgefangen.

Weitere 500 µl Elutionspuffer wurden auf die Säule 1 gegeben und das Eluat direkt auf die zweite Säule (spätere Bezeichnung Säule 2) aufgetragen.

Daraufhin wurden 200 µl Elutionspuffer auf die Säule 2 aufgetragen und das Eluat verworfen.

500 µl Elutionspuffer wurden auf die Säule 2 gegeben und das Eluat (spätere Bezeichnung Eluat 2) aufgefangen.

Die aufgefangenen Eluate 1 und 2 wurden vereinigt. Diese Proteinlösung wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

## **2.8. Frostschutz, bestimmt über das Thylakoidvolumen**

Nach Hinchha und Schmitt, 1988

### Durchführung:

Je Ansatz wurden gleiche Volumina Thylakoidlösung aus 2.19 und Proteinlösung aus 2.7 gemischt. Inkubiert wurden die Proben zwei Stunden bei 0 °C und -20 °C.

Nach dem Auftauen der eingefrorenen Proben wurden zu jedem Ansatz, auch den 0 °C-Ansätzen, das halbe Volumen 10 mM MgCl<sub>2</sub>, bezogen auf das Gesamtvolumen, dazugegeben und die Hämatokritkapillaren der Firma Brand GMBH+CO KG befüllt.

Anschließend wurden die Kapillaren bei 12 000 min<sup>-1</sup> 15 min zentrifugiert (Haematokrit 20 der Firma Hettich Zentrifugen)

Das Pellet wurde mit Hilfe des Leitz Wetzlar Messokulars bei neunfacher Vergrößerung abgemessen.

Das Pellet entsprach dem Thylakoidvolumen (TKV).

### Auswertung:

$$\text{Frostschutz [\%]} = \frac{\text{TKV(+Protein -20 °C)} - \text{TKV(Kontrolle -20 °C)}}{\text{TKV(Kontrolle 0 °C)} - \text{TKV(Kontrolle -20 °C)}} * 100$$

Formel 1: Frostschutz über das Thylakoidvolumen (TKV)

## **2.9. Gelchromatographie**

200 µg Probe wurden auf eine Fraktogel-TSK-HW50-Säule mit der Abmessung 80 cm x 1,5 cm aufgetragen. Das Elutionsmittel bestand aus



einer 50 mM Tris-Lösung bei pH 8. Je nach Versuch wurde dieser Lösung Calciumchlorid zugesetzt, bevor der pH-Wert eingestellt wurde. Eluiert wurde mit 20 ml/h. Der Schreiber lief mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/min. Detektiert wurde das Protein bei 278 nm. Bei der Chromatographie mit Fraktogel TSK HW50 handelte es sich um eine Größenausschlusschromatographie.

## 2.10. Gelelektrophorese

Nach Laemmli, 1970

Die im Folgenden angegebenen Volumen reichen für ein Gel (7 cm x 8 cm x 1 mm).

**Tabelle 1: Pipettierschema für ein Laemmli Gel**

	Trenngel 15 % Acrylamid	Sammelgel 6 % Acrylamid
Acrylamid:N,N-Methylen-biscacrylamid 37,5:1 (30 % in H <sub>2</sub> O)	2,5 ml	330 µl
Tris/SDS-Puffer (0,75 M Tris, 0,2 % SDS, pH 8,8)	2,5 ml	
Tris/SDS-Puffer (0,25 M Tris, 0,2 % SDS, pH 6,8)		1,76 ml
APS 10 %	25 µl	25 µl
TEMED (99 %, Firma Roth GmbH)	2,5 µl	2 µl

Die Proben wurden eins zu eins mit Proteinladepuffer gemischt. Dieser enthielt 16 ml Tris (1 M pH 6,8), 2 ml Glycerin, 20 ml SDS (20 %), 10 ml Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) (0,5 M pH 8,0), 0,4 M 1,4-Dithiothreitol (DTT), 100 mg Bromphenolblau.

Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 1 % SDS. Die Gelelektrophorese lief unter 15 mA.

### **2.10.1 Coomassie-Färbung**

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel in einer Coomassie-Lösung (45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie brilliant blue R250) mindestens eine Stunde gefärbt und anschließend mit einer Entfärbelösung (5 % Essigsäure, 45 % Methanol) bis zum gewünschten Ergebnis entfärbt.

### **2.10.2 Western-Blot**

Nach Towbin *et al.*, 1997

Zur Übertragung der Proteine auf Hybond-C Extra Nitrozellulose Membran wurde mit dem unter 2.10 gewonnenen Gel ein Elektrobild bei 0,1 A in einem Puffer (3,0 g/l Tris, 14,4 g/l Glycin mit 20 % Methanol) durchgeführt.

Der Transfer wurde nach Abschluss durch Färbung der Proteine mit Ponceau (0,2 % Ponceau mit 3 % TCA) überprüft. War der Transfer erfolgreich, so wurde die Membran in MPT (milk powder Tris)-Puffer (10,0 mM Tris pH 7,4; 1,5 M NaCl; 0,5 % Tween 20 mit 3 g/l Casein) dreimal für je 15 min gewaschen.

Anschließend wurde 1 h mit dem ersten Antikörper gegen das Dehydrin inkubiert. Der Antikörper wurde stark verdünnt eingesetzt. Die Verdünnung betrug 1:50 000. Es folgten drei Waschschriffe von 15 min mit dem MPT-Puffer. Der zweite Antikörper (goat anti-rabbit, IgG(H+L)-alkalischer Phosphatase konjugiert der Firma BioRad) wurde 30 min inkubiert. Der zweite Antikörper wurde 1:3000 verdünnt eingesetzt.

Nach wiederum drei Waschschriffen von 5 min mit MPT-Puffer wurde die Färbung in einem AP-Puffer [100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, pH 9,5 mit 66 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid und 33 µl p-Nitrotetrazoliumblauschlofid (NBT) 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid pro 20 ml] durchgeführt. Das BCIP und das NBT wurden direkt vor der Reaktion dem AP-Puffer zugesetzt.

## 2.11. Hill-Reaktion

Nach Schopfer, 1989

Die Thylakoide wurden wie unter 2.19 Thylakoidisolation beschrieben isoliert.

Für die Messung der Hill-Rate wurden die Thylakoide auf 30  $\mu\text{g/ml}$  Chlorophyll mit Hill-Reaktionspuffer (400 mM Saccharose, 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl bei pH 7,0) verdünnt.

Die Messung der Hillrate erfolgte in einer 1,5 ml Plastikkuvette. Nach Zugabe von 0,5 mg/ml Dichlorophenol-indophenol (DCPIP) wurde der Nullpunkt gemessen. Anschließend wurden die Proben mit 300  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$  bestrahlt und der Verlauf der Reaktion im Photometer bei 620 nm verfolgt. Als Referenz wurden Thylakoide mit 30  $\mu\text{g/ml}$  Chlorophyll verwendet.

## 2.12. Ionenanalyse

Alle folgenden Analyseverfahren basieren auf Jander und Blasius, 1995.

### 2.12.1 Calcium-Nachweis mit Ammoniumsulfat

Die Probelösung wurde mit einer 1 M Ammoniumsulfatlösung versetzt. Fiel ein weißer kristalliner Niederschlag aus, der die typischen Kalknadeln aufwies, so waren Calcium-Ionen in der Probe.

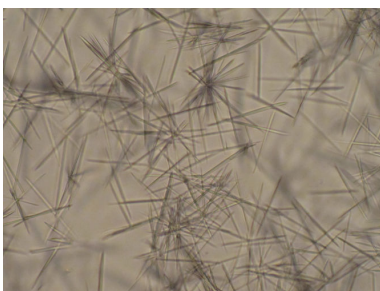
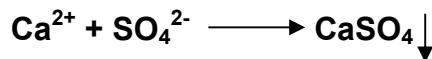


Abbildung 1: typische Kalknadeln

Das gleiche Verfahren konnte auch als Nachweis von Sulfat-Ionen angewendet werden, wenn eine calciumchloridhaltige Lösung hinzugegeben wurde.



#### **Formel 2: Summenformel der Calciumsulfat-Fällung**

Es war möglich, nicht nur die Anwesenheit von Sulfat zu zeigen, sondern auch einen quantitativen Nachweis zu liefern. Hierfür musste das Sulfat im Überschuss vorhanden sein. Eine vollständige Fällung war bei 80 °C gesichert.

#### Vorgehen bei 4.8.1 Analyse des Calciums in den verwendeten Proben:

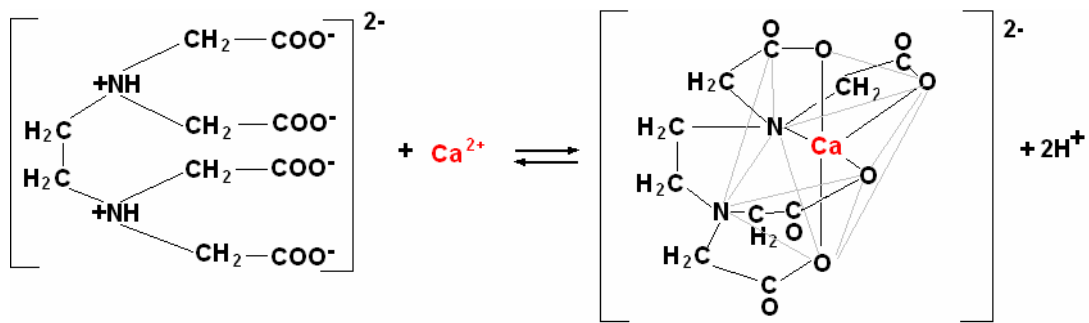
500 µl einer 400 mM Calciumchlorid-Lösung (mit und ohne Protein) wurden mit 500 µl 1M Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Niederschlag abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde getrocknet und gewogen. Nach der Analyse des Ammoniums sowie des Chlorids wurde die Probe auf 80 °C erhitzt. Durch das Erhitzen fällt Calciumsulfat quantitativ aus. Dies diente als Kontrolle der vollständigen Fällung bei Raumtemperatur.

Weiterhin wurde die Calciumsulfatfällung auf einem Objektträger mit insgesamt 20 µl durchgeführt und die entstandenen Kristalle mikroskopiert.

### **2.12.2 Calcium-Nachweis über EDTA-Komplexometrie**

Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) bildet mit zweifach positiven Ionen einen Komplex. Selektiv für Calcium-Ionen ist diese Reaktion bei pH 12.

Als Indikator diente Calconcarbonsäure (1 g Calconcarbonsäure mit 100 g NaCl verrieben), welche mit Calcium einen violettroten Farbstoff bildet. Wird dem Farbstoff das Calcium durch das EDTA entzogen, so ist Calconcarbonsäure blau.



**Formel 3: Schematische Darstellung der Bildung eines Calcium-EDTA-Komplexes**

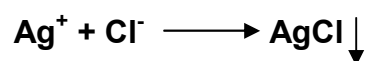
Arbeitsanweisung:

1 ml der Probe, eventuell verdünnt, wurde mit Bidest auf 5 ml aufgefüllt. Mit 200 µl 2 mol/l Salzsäure wurde der Ansatz angesäuert und danach 10 µl einer 10 mM Magnesiumchlorid hinzugegeben. Mit 800 µl einer 2 mol/l Natronlauge wurde die Probelösung auf pH 12 gebracht und auf 10 ml mit Bidest aufgefüllt. Abschließend wurde 20 mg Indikator hinzugegeben und mit einer 0,01 mol/l EDTA-Lösung titriert.

1 ml der EDTA-Maßlösung entspricht 0,01 mmol oder auch 0,4008 mg Calcium.

### 2.12.3 Chlorid-Nachweis über Silbernitrat

Die Probelösung wurde mit Salpetersäure angesäuert und mit 1M Silbernitrat versetzt. Fiel ein weißer, flockiger Niederschlag aus, so waren Chloridionen anwesend.



**Formel 4: Summenformel der Silberchlorid-Fällung**

### 2.13. Messung der Leitfähigkeit von Lösungen

Die Probelösungen wurden 1:20 verdünnt. Zur Messung der Leitfähigkeit wurde ein Konduktometer CG855 der Firma Schott verwendet.

## **2.14. Messung der Osmolalität von Lösungen**

### **2.14.1 Messung über den Gefrierpunkt**

Zur Messung der Osmolalität wurden ein Knauer Semi-Micro-Osmometer 29936 und das Euro Osmo 7400 verwendet.

Hierbei werden die Proben bis unter den Gefrierpunkt gekühlt. Ist dies geschehen, wurde die Eis-Kristallisation ausgelöst. Die Differenz des gemessenen Gefrierpunktes zu 0 °C wird als Osmolalität der Lösung umgerechnet und angegeben. (Knauer Handbuch Halb-Mikro-Osmometer-Typ Dig.L).

### **2.14.2 Messung über den Dampfdruck**

Zusätzlich wurde das Dampfdruckosmometer K-7000 der Firma Knauer verwendet.

Hierbei werden eine Kontrolle und die Probe auf aneinander gekoppelten Thermistoren aufgetragen und in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 60 °C inkubiert. Da Flüssigkeiten mit gelösten Teilchen einen geringeren Dampfdruck haben, versucht das System durch Kondensation am Probetropfen die Differenz auszugleichen. Der ansteigende Dampfdruck des Probetropfens führt zu einem Temperaturanstieg. Die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Thermistoren ist proportional zur Partikelanzahl der gelösten Moleküle. So können Konzentrationen bestimmt und als Osmolalität ausgegeben werden (Knauer Handbuch V7109,10/2007).

## **2.15. Proteinbindung an Thylakoidmembranen**

Nach Srór *et al.*, 2003

Die isolierten Thylakoide aus 2.19 wurden 1:1 mit der Proteinlösung gemischt und 5 min bei 17 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt. Das Pellet mit Waschlösung (2,5 mM Saccharose, 2,5 mM NaCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt.

Von jedem resuspendierten Pellet und jedem Überstand wurden eine 20 µl Probe genommen.

Diese Proben wurden auf zwei SDS-Gele aufgetragen. Eines wurde nach der Gelelektrophorese Coomassie gefärbt, eines für einen Western-Blot verwendet.

Der Versuch wurde ebenfalls durchgeführt mit:

150 mM Natriumchlorid-Lösung anstelle der 5 mM Natriumchlorid-Lösung,  
400 mM Saccharose, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl pH 7,0 anstelle der 5 mM Saccharoselösung

20 mM MES-Puffer pH 4,8 anstelle der 5 mM Saccharoselösung

5 mM Saccharoselösung ohne Manganchlorid und Calciumchlorid

## **2.16. Ruthenium Rot-Färbung**

Abgeändert nach Stressmann *et al.*, 2004

### **2.16.1 Vorbereitung**

Die Proteine wurden mittels Gelfiltration über Nap5-Säulen in einen Tris-EDTA Puffer (20 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7) umgepuffert. Um sicher zu gehen, dass die Probe ohne störende Ionen war, wurde jede Probe zweifach gelfiltriert. Das umpuffern geschieht nach der Vorschrift unter 2.7.2.

Die Proteine wurden anschließend mit Hilfe des Minifold S-SRC 60 D- Slot Blot (Firma Schleier & Schuell) auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Dabei wurde pro Slot eine Proteinmenge von 50 µg aufgetragen.

### **2.16.2 Färbung**

Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal 5 Minuten in Tris-EDTA Puffer gewaschen, anschließend mit Ruthenium-Rot in Puffer (100 µg/ml) 15 min inkubiert und ein weiteres Mal mit Ruthenium-Rot in Bidest (100 µg/ml) 15 min eingefärbt.

Der Blot wurde anschließend zweifach in Bidest gewaschen.

Der Farbzustand wurde festgehalten.

### **2.16.3 Entfärbung**

Variante 1 (nach Stressmann): Der Blot wurde zum Entfärben eine Minute in 100 mM Salzlösungen inkubiert. Entfärbte sich der Blot, interagierte das Salz mit dem Protein. Der Farbzustand wurde wiederum festgehalten und mit dem vor der Entfärbung verglichen.

Variante 2: Jeder einzelne Protein-Slot wurde in 500  $\mu$ l Salzlösung inkubiert. Die Salzlösung wurde bei 534 nm im Photometer vermessen. Interagiert das Protein mit dem Salz, so war das Ruthenium-Rot bei seinem Absorptionsmaximum im Überstand nachweisbar.

## **2.17. Sedimentation**

### **2.17.1 Sedimentation bei Raumtemperatur**

Es wurde eine Thylakoidlösung (0,1 mg/ml Chlorophyll, 5 mM NaCl) hergestellt und 1 zu 1 mit Proteinlösung aus 2.7 gemischt. Als Kontrolle wurde den Thylakoiden 5 mM Saccharoselösung mit oder ohne Manganchlorid und Calciumchlorid zugesetzt. Die Sedimentation wurde über die Messung der Extinktion bei 535 nm beobachtet. In den ersten 6 Stunden wurde alle 20 min gemessen, danach in einem Abstand von 1 h.

Veränderte sich der Wert nicht weiter, wurden die sedimentierten Thylakoide vorsichtig auf einen Objektträger überführt und mikroskopiert. An verschiedenen Stellen des Präparates wurde das mikroskopische Bild fotografiert und anschließend die Thylakoidaggregate unter Zuhilfenahme der Software ImageJ vermessen.

### **2.17.2 Sedimentation nach einem Frier-Tau-Zyklus**

Eine Mischung aus Probelösung (5 mM Saccharose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM MnCl, mit und ohne Protein) und Thylakoiden (1 mg/ml Chlorophyll) in 5 mM NaCl wurde 1:1 gemischt und zwei Stunden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.



Nach dem Auftauen wurden die Proben auf 0,05 mg/ml Chlorophyll mit einer Lösung aus 2,5 mM Saccharose, 2,5 mM NaCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub> verdünnt. Die Sedimentation wurde durch Messung der Optischen Dichte bei 535 nm verfolgt. Jede Probe wurde alle 10 min gemessen.

Nach der Aggregation wurden die sedimentierten Thylakoide vorsichtig auf einen Objektträger überführt und mikroskopiert. An verschiedenen Stellen des Präparates wurde das mikroskopische Bild fotografiert und anschließend die Thylakoidaggregate unter Zuhilfenahme der Software ImageJ vermessen.

## **2.18. Statistik**

Jeder einzelne Wert in einer Messreihe wurde durch mindestens dreifache Bestimmung ermittelt. Jede Messreihe wurde unter denselben Bedingungen mindestens fünfmal wiederholt.

Dadurch war es möglich, jeden Test einzeln, sowie die Testwiederholungen untereinander statistisch auszuwerten.

Aufgrund der dennoch geringen Anzahl der Wiederholungen wurden die statistischen Auswertungen in der Regel auf der Basis des Medians und der totalen Varianz durchgeführt (Zöfel, 2002).

Da die Thylakoide jeden Tag neu isoliert wurden, konnten die Versuche an unterschiedlichen Tagen nicht direkt miteinander verglichen werden. Die untersuchten Faktoren wurden zuerst zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt und dann die Verhältnisse statistisch ausgewertet.

Um Reihenmessungen statistisch besser auswerten zu können, wurden die Messwerte der Dreifachbestimmungen zuerst normalisiert, bevor der Median und die Varianzen bestimmt wurden (Köhler *et al.*, 2007).

Mögliche Änderungen werden in der weiteren Arbeit erwähnt.

## 2.19. Thylakoidisolation

Nach Hinch, 1984

50 g Spinat wurden in 100 ml Thylakoidisolationpuffer (240 mM Saccharose, 160 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 1 mM MnCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2 mM EDTA, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Tris, pH 7,8 frisch zugegeben 1,25 mM Ascorbat, und 3,3 mM Cystein) homogenisiert.

Die Zelltrümmer wurden mit einer Nylongaze (50 µm) entfernt und die Thylakoide durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 5 min) abgetrennt.

Das Pellet wurde in 5 mM NaCl-Lösung zweimal gewaschen (7200 g, 4 °C, 5 min) bevor es dann in 5 mM NaCl-Lösung aufgenommen wurde. Anschließend wurde der Chlorophyllgehalt bestimmt. Die Thylakoidlösung sollte einen Chlorophyllgehalt zwischen 1,2 und 0,85 mg/ml aufweisen.

### 2.19.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Durchführung:

10 µl der Thylakoidlösung wurden in 990 µl 80 % Aceton geben und zerstörte Thylakoidmembran abzentrifugiert (17 500 g, 4 °C, 2 min).

Aus dem Überstand wurde die Absorption bei 663 nm und 645 nm bestimmt und der Chlorophyllgehalt berechnet.

Berechnung des Chlorophyllgehalts:

$$\text{Chlorophyllgehalt [mg/ml]} = \frac{20,02 * \text{Messwert (645 nm)} + 8,2 * \text{Messwert (663 nm)}}{10}$$

**Formel 5: Chlorophyllgehalt von isolierten Thylakoiden**

## **2.20. Zyklische Photophosphorylierung**

Nach Hinchha und Schmitt, 1985

### **2.20.1 Vorbereitung und Reaktion**

Für die Messung der zyklischen Photophosphorylierung wurde die Thylakoidlösung auf 0,05 mg/ml Chlorophyll im Meßansatz durch Zugabe des Reaktionsmediums (50 mM KCl, 15 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM ADP, 0,03 mM PMS, pH 8,0) verdünnt.

Je Probe wurde ein Teil im Dunkeln und ein Teil unter Lichteinwirkung (1000  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 60 s inkubiert. Direkt danach wurden die Thylakoide abzentrifugiert (10 000 g, 4 °C, 5 min).

### **2.20.2 Phosphatbestimmung**

Zur Bestimmung der Photophosphorylierungsrate wurde der Phosphatgehalt der belichteten und der unbelichteten Proben nach (Bencini *et al.*, 1983) gemessen.

Die Probe wurde zu einem Teil mit zwei Teilen Meßlösung (100 mM Zinkacetat, 15 mM Ammoniumheptamolybdat, 1% (w/v) SDS, 20 mM Natriumacetat, pH 4,5) gemischt. Die Lösung wurde bei 350 nm vermessen. Die Farbreaktion ist bis zu einer Stunde stabil.

### **3. Ergebnis – Fermentation und Aufreinigung**

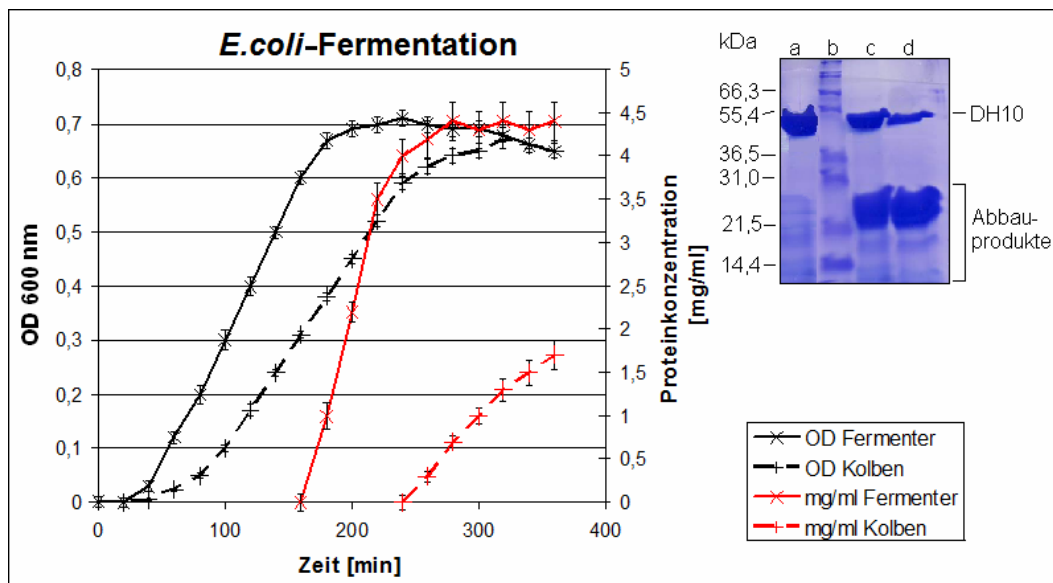
In diesem Kapitel wird beschrieben, welche Ergebnisse und Überlegungen zu der Vorgehensweise der Fermentation und Aufarbeitung von DH10 und Rab18 führten. Die resultierenden Arbeitsvorschriften sind im Kapitel Material und Methode angegeben.

#### **3.1. Fermentation**

Die ursprüngliche Vorschrift zur Fermentation der *E.coli*-Zellen und Expression der Zielproteine sah eine Kultivierung von je 400 ml in vier 2 L Kolben vor. Zur Erlangung einer höheren Proteinmenge wurde ein Scale-Up auf 6 L in einem Laborfermenter durchgeführt.

Um den Erfolg zu beurteilen, wurden während der Fermentation Proben genommen und die Zelldichte und der Proteingehalt bestimmt. In Diagramm 2 ist zu sehen, dass im Fermenter die Optische Dichte von 0,6 früher erreicht wird als in den Schüttelkolben. Da an diesem Punkt das IPTG zugesetzt wird, verkürzt sich die gesamte Fermentationszeit. Ebenso ist zu sehen, dass die erreichte Proteinkonzentration im Fermenter höher ist als in den Kolben. Betrachtet man das Gelbild, so fällt einem auf, dass das DH10 im Fermenter nach zwei Stunden wesentlich weniger abgebaut ist als nach drei Stunden. Im Schüttelkolben setzt der Abbau des Proteins schon in den ersten zwei Stunden ein.

Für die weiteren Proteinexpressionen wurde daher eine Fermentation im Fermenter von zwei Stunden nach Zugabe von IPTG durchgeführt.



**Diagramm 2: *E.coli*-Fermentation und DH10 Expression**

Zu sehen ist das Fortschreiten der Kultivierung in einem Fermenter und Schüttelkolben. Aufgetragen ist auf der linken y-Achse die Optische Dichte bei 600 nm, als Maß für die Zellzahl. Auf der rechten y-Achse ist die exprimierte Proteinkonzentration dargestellt. Auf der x-Achse ist die Kultivierungszeit zu sehen. Die Werte wurden durch dreifache Messung ermittelt und der Median mit seiner totalen Varianz dargestellt. Rechts im Diagramm ist ein SDS-Gelbild eingefügt. An Position a DH10 zwei Stunden nach IPTG-Zugabe im Fermenter, b Marker, c DH10 drei Stunden nach IPTG Zugabe im Fermenter und d DH10 zwei Stunden nach IPTG Zugabe im Schüttelkolben. Aufgetragen wurden jeweils 40 µg Protein.

## 3.2. Aufreinigung

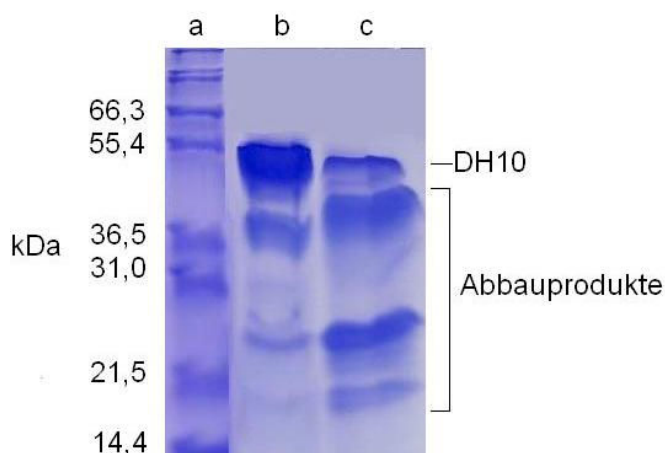
Durch das erhöhte Kultivierungsvolumen musste nun auch die Aufreinigung angepasst werden.

### 3.2.1 Zellaufschluss

Im ursprünglichen Protokoll stand, dass die nach der Kultivierung gewonnenen *E.coli*-Zellen in einem Volumen von 5 ml / 250 ml Kulturbrühe resuspendiert werden sollten. Dies machte bei 6 L Kulturbrühe 120 ml Aufschlussvolumen. Diese sollten nach Vorschrift 30 min mit Lysozym

inkubiert und anschließend in 5 ml Fraktionen mit Hilfe des Ultraschalltips aufgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob diese Prozedur beibehalten werden musste oder durch den Aufschluss im Ultraschallbad ersetzt werden konnte, wurden beide Aufschlussmethoden miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass der Aufschlussgrad der Zellen durch die Behandlung im Ultraschallbad nur unwesentlich geringer war als durch die Behandlung mit dem Ultraschalltip. Da nur ein kleines Volumen mit dem Ultraschalltip behandelt werden konnte, dauerte die Behandlung des gesamten Volumens länger als bei einer Behandlung des Gesamtvolumens im Ultraschallbad. Dies bewirkte eine höhere Abbaurate des Zielproteins. Dies ist in Abbildung 2 deutlich zu sehen.



**Abbildung 2: aufgereinigtes DH10 bei unterschiedlicher Aufschlussmethode**

**Position a Marker, b DH10-aufgeschlossen im Ultraschallbad und c DH10-aufgeschlossen mit dem Ultraschalltip. Aufgetragen wurden je 60 µg.**

Um die Degradation so gering wie möglich zu halten, wurde direkt nach dem Aufschluss eine Hitzefällung durchgeführt, ohne vorher die Zelltrümmer abzutrennen. Daher entstand nach der Hitzefällung eine hoch viskose Flüssigkeit.

Für die weitere Behandlung musste nun das Protein von den Zelltrümmern und den hitzegefällten Proteinen abgetrennt werden. Hierzu wurde

das Proteingemisch in Zentrifugenbecher überführt. Durch die hohe Viskosität der Flüssigkeit war es nicht möglich, die Lösung ohne Volumenverlust zu überführen. Da die Behandlung mit dem Ultraschalltip in mehreren Reaktionsgefäßen stattfinden musste, ging daher mehr Volumen verloren als bei dem einzelnen Gefäß aus dem Ultraschallbad.

Der geringere Zeitaufwand, die dadurch erreichte Reduktion der Abbauprodukte und der geringere Volumenverlust sind die Gründe dafür, dass im Weiteren der Zellaufschluss im Ultraschallbad durchgeführt wurde.

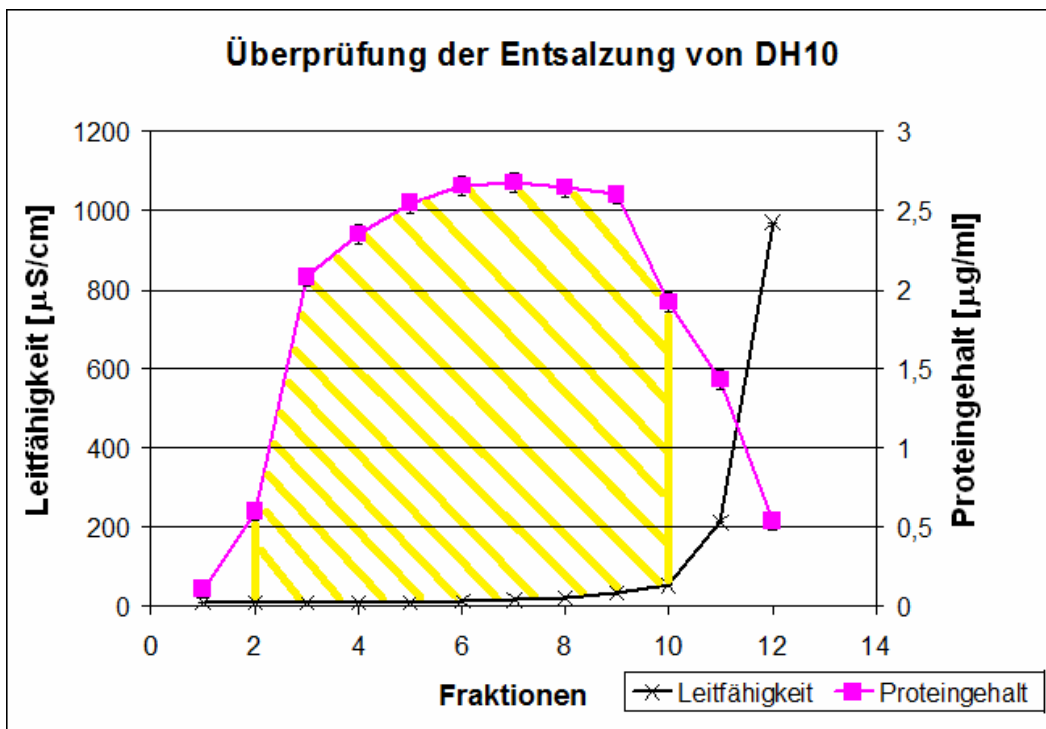
### **3.3. Entsalzung über Gelfiltration mit NAP5-Säulen**

Die ursprüngliche Aufreinigung beinhaltete eine Ammoniumsulfatfällung. Grundvoraussetzung der Funktionsanalyse war, das aufgereinigte Protein von störenden Salzen, wie dem Ammoniumsulfat, zu befreien. Hierzu erwies sich die Entsalzung über eine Gelfiltration als ein schneller und einfacher Weg. Um sicher zu gehen, dass die Entsalzung über die NAP5-Säule der Firma GE Healthcare ausreichte, wurde die Entsalzung in 100 µl Schritten kontrolliert. Hierzu wurden die Leitfähigkeit und der Proteingehalt bestimmt.

#### **3.3.1 Entsalzung von DH10**

Das Ergebnis für DH10 ist im Diagramm 3 dargestellt.

Die Leitfähigkeit ist ein Maß für das Vorhandensein von Salz. Man sieht deutlich, dass in den Fraktionen 2-10 der Grossteil der Proteine vorhanden ist. Die Leitfähigkeit in diesen Fraktionen war so niedrig, dass keine messbaren Konzentrationen an Ammoniumsulfat in den vereinigten Fraktionen vorzukommen schienen.



**Diagramm 3: Überprüfung der Entsalzung von DH10**

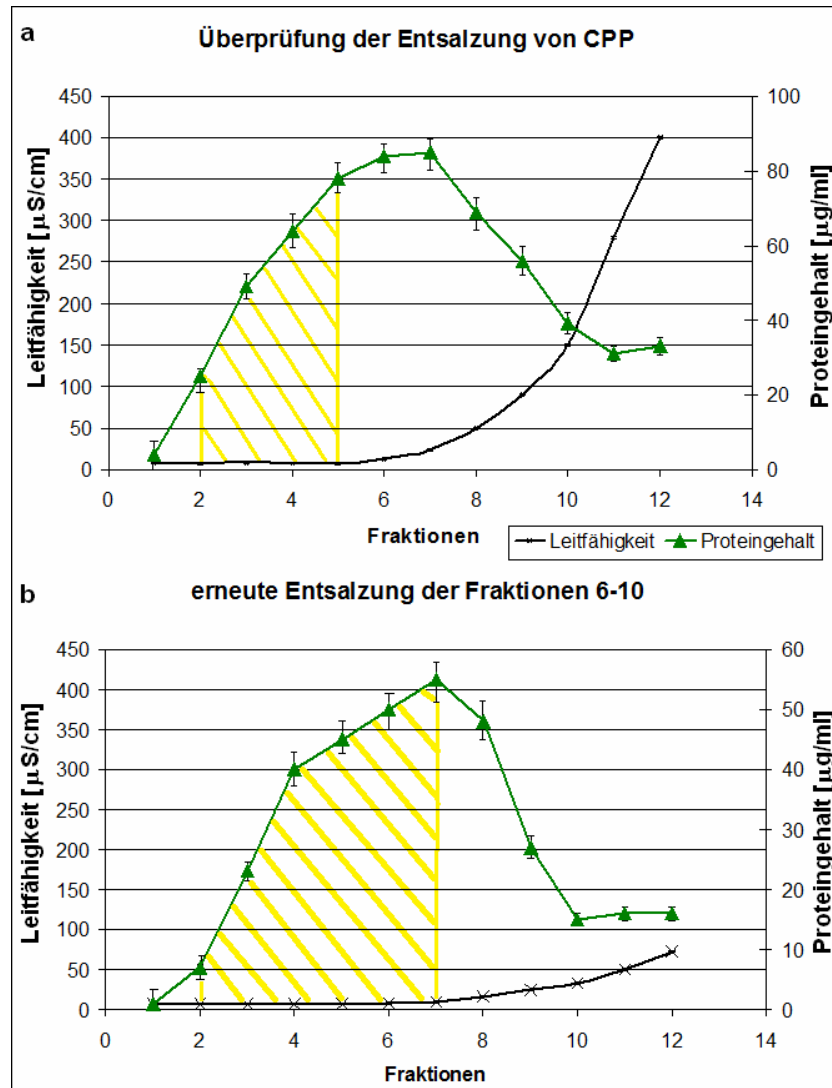
Aufgetragen sind auf der linken y-Achse die Leitfähigkeit, auf der rechten y-Achse der Proteingehalt über die Fraktionen. Nach dem Auftragen der Probe wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Eluat aufgefangen und die Leitfähigkeit und Proteinkonzentration bestimmt. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz. Gelb schraffiert sind die Fraktionen, welche für alle weiteren Versuche verwendet wurden.

### 3.3.2 Entsalzung von CPP

In Diagramm 4 a ist die Entsalzung von CPP über eine NAP5-Säule dargestellt. Man sieht, dass im Vergleich zu der Entsalzung von DH10 die Leitfähigkeit ab Fraktion 6 stark anstieg. Daher war es notwendig, die Probe ein zweites Mal zu entsalzen. Da bei jedem Entsalzungsschritt Proteine verloren gehen, ist es sinnvoll, die ersten Fraktionen (gelb schraffiert) nach dem ersten Entsalzungsschritt zu sammeln und nur die salzhaltigen Fraktionen sechs bis zehn erneut zu entsalzen. Die Ergebnisse der Fraktionen der zweiten Entsalzung sind in Diagramm 4 b dargestellt. Der Salzgehalt stieg nicht bis zur Fraktion 7, so dass die



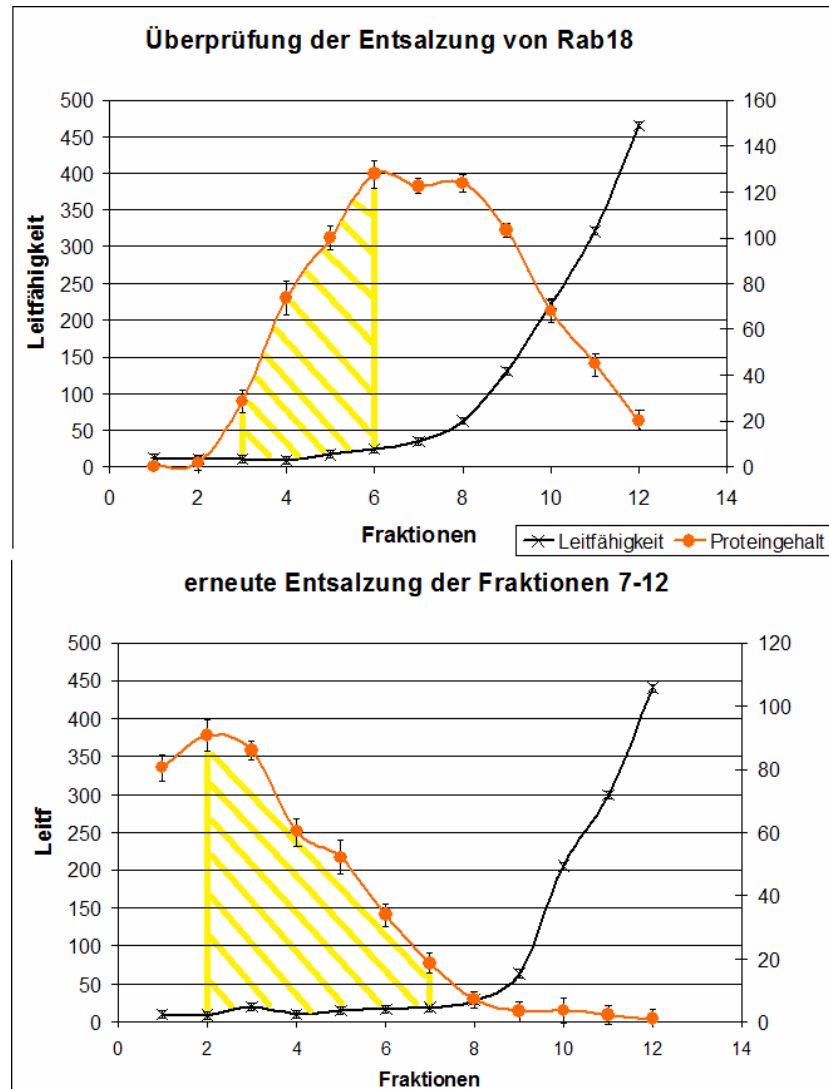
Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration (gelb schraffiert) aufgefangen und mit denen aus dem ersten Schritt vereinigt werden konnten.



**Diagramm 4: Überprüfung der Entsalzung von CPP**

Aufgetragen sind auf der linken y-Achse die Leitfähigkeit, auf der rechten y-Achse der Proteingehalt über die Fraktionen. Nach dem Auftragen der Probe wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Eluat als eine Fraktion aufgefangen, aus denen die Leitfähigkeit und Proteinkonzentration bestimmt wurden. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz. Im Diagrammteil a ist die Entsalzung der ursprünglichen CPP Probe zu sehen. In Teil b die erneute Entsalzung der Fraktionen 6-10 aus der ersten Entsalzung. Gelb schraffiert sind die Fraktionen, welche für alle weiteren Versuche verwendet wurden.

### 3.3.3 Entsalzung von Rab18



**Diagramm 5: Überprüfung der Entsalzung von Rab18**

Aufgetragen sind auf der linken y-Achse die Leitfähigkeit, auf der rechten y-Achse der Proteingehalt über die Fraktionen. Nach dem Auftragen der Probe wurden jeweils 100 µl Eluat als eine Fraktion aufgefangen und die Leitfähigkeit und Proteinkonzentration bestimmt. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz. Im Diagrammteil a ist die Entsalzung der ursprünglichen Rab18 Probe zu sehen. In Teil b die erneute Entsalzung der Fraktionen 7-12 aus der ersten Entsalzung. Gelb schraffiert sind die Fraktionen, welche für alle weiteren Versuche verwendet wurden.

In Diagramm 5 a ist die Entsalzung von Rab18 über eine NAP5-Säule dargestellt. Man sieht, dass die Leitfähigkeit schon ab Fraktion 5 anstieg. Daher war es auch hier notwendig, die Probe ein zweites Mal zu entsalzen. Die Ergebnisse der zweiten Entsalzung von den Fraktionen 7 bis 12 sind in Diagramm 5 b dargestellt. Der Salzgehalt stieg nicht bis zur Fraktion 8, so dass die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration (gelb schraffiert) aufgefangen und mit denen aus dem ersten Schritt vereinigt werden konnten.

### **3.4. Nachweis von Ammoniumsulfat-Resten**

Da die Ammoniumionen die Funktionsanalyse beeinflussen können, wurden nicht nur Tests zur Leitfähigkeit, sondern sicherheitshalber noch weitere Tests durchgeführt.

#### **3.4.1 Calciumsulfat-Fällung als Ammoniumsulfat-Nachweis**

Calcium-Ionen und Sulfat-Ionen bilden Calciumsulfat, welches schwer löslich ist und als weißer kristalliner Niederschlag ausfällt. Diese Reaktion ist sehr empfindlich und kann so auch geringe Mengen Sulfat detektieren.

Einfach entsalztes CPP und Rab18-Proben zeigten einen Niederschlag, so dass die Notwendigkeit des zweiten Entsalzungsschritts bestätigt wurde.

Einfach entsalztes DH10 sowie zweifach entsalztes CPP und Rab18 wiesen nach Zugabe von Calciumchloridlösung keine Niederschläge auf.

#### **3.4.2 Die Hillreaktion als Indiz für Ammoniumsulfat-Verunreinigungen**

Die Hillreaktion wird durch Ammonium-Ionen entkoppelt. Da dieses System sehr empfindlich reagiert, ist dieser Versuch ein gutes Verfahren für die Überprüfung auf Ammoniumsulfatreste.

Im Diagramm 6 sind die Ergebnisse der Überprüfung zu sehen. Überraschend war das Ergebnis von DH10, welches nach der Leitfähigkeit

und der Calciumsulfatfällung frei von messbarem Ammoniumsulfat sein sollte. Die Proben mit DH10 zeigten jedoch eine entkoppelte Reaktion. Zweifach entsalztes CPP und Rab18 hingegen entkoppelten die Hillreaktion nicht.

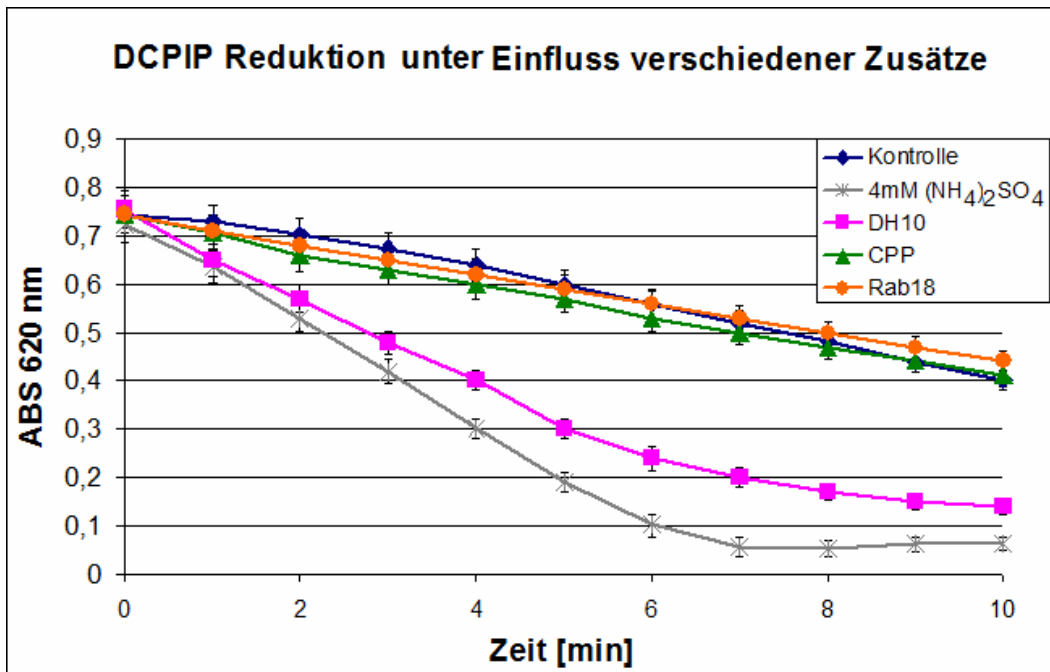


Diagramm 6: DCPIP Reduktion unter Einfluss verschiedener Zusätze

Dargestellt ist die Abnahme der Absorption bei 620 nm von DCPIP über die Zeit. Verursacht wurde die DCPIP-Reduktion durch die lichtabhängige Reaktion bei der Inkubation von Thylakoiden bei einer Lichtintensität von 300  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Proben: 0,5 mg/ml DH10, 0,3 mg/ml CPP, 0,4 mg/ml Rab18, 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Die Proteinkonzentration für CPP und DH10 wurde so gewählt, dass ein 20 % iger Schutz des Thylakoidvolumens bei einem Frier-Tau-Zyklus erreicht wurde. Da Rab18 keine Frostschutzwirkung zeigte, wurde eine mittlere Proteinkonzentration gewählt. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz.

Um zu testen, ob die Entkopplung durch das DH10 oder mögliches Ammoniumsulfat ausgelöst worden war, wurde der Versuch mit einfach und zweifach entsalztem DH10 sowie mit ungefälltem DH10 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Diagramm 7 dargestellt.

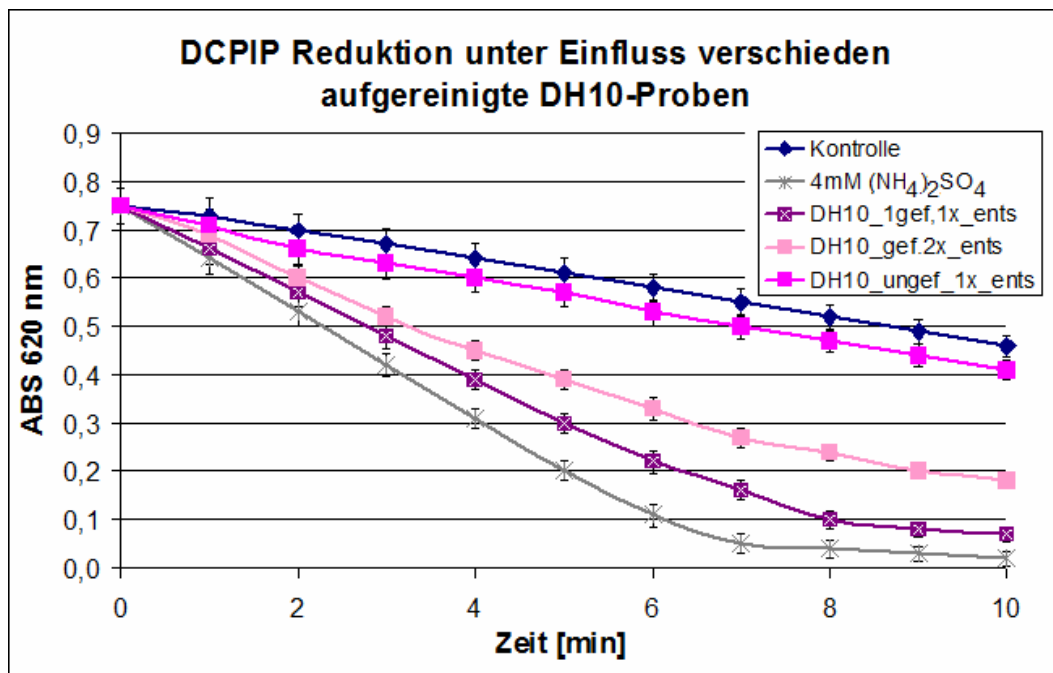


Diagramm 7: DCPIP Reduktion Einfluss verschieden aufgereinigter DH10-Proben

Dargestellt ist die Abnahme der Absorption bei 620 nm von DCPIP über die Zeit. Verursacht wurde die DCPIP-Reduktion durch die lichtabhängige Reaktion bei Inkubation von Thylakoiden bei einer Lichtintensität von  $300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Probenbezeichnungen: gef= Ammoniumsulfat gefällt, ungef= nicht Ammoniumsulfat gefällt, 1x\_ents= einmal entsalztes Probe, 2x\_ents= zweifach entsalztes Probe. Das DH10 wurde in einer Konzentration von  $0,5 \text{ mg}/\text{ml}$  eingesetzt, das Ammoniumsulfat mit einer Endkonzentration von  $5 \text{ mM}$ . Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz.

Auch nach einem weiteren Entsalzungsschritt zeigten die DH10-Proben eine entkoppelte Reaktion. Da die ungefällte Probe die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit aufwies wie die Kontrolle ohne Protein, konnte die Entkopplung auf Reste von Ammoniumsulfat zurück geführt werden. Eine Fällung von DH10 mit Ammoniumsulfat kam daher nicht in Frage, wenn man Nebeneffekte des Salzes ausschließen wollte. In 4.1.1 sind beispielsweise die Auswirkungen von Resten des Ammoniumsulfats auf das Thylakoidvolumen bei einem Frier-Tau-Zyklus dargestellt.

### 3.5. Fällung des hitzestabilen *E.coli*-Proteins

Nach der ursprünglichen Aufreinigung befand sich ein weiteres hitzestabiles Protein in den Proben. Dieses Protein lief im SDS-Gel auf der Höhe des DH10. Es zeigte sich, dass dieses Protein aus *E.coli* stammte, da es im M15-Stamm ohne den Vektor pJTS1 ebenfalls nachzuweisen war.

Eine Internetrecherche auf <http://www.uniprot.org> zeigte, dass *E.coli* hitzestabile Proteine besitzt, welche vermutlich als Chaperon fungieren und so *E.coli* vor Hitze- und Trockenstress schützen. Da dieses Protein mit Calcium reagierte und somit Seiteneffekte auf die Calcium-Testsysteme zeigte, musste es vor der Funktionsanalyse entfernt werden.

Da DH10 bei extremen pH-Werten stabil war, konnte das *E.coli*-Protein mit Salzsäure bei pH 2 gefällt werden. Diese extreme Fällung hatte sowohl auf das Erscheinungsbild der Banden von DH10 im SDS-Gel als auch auf die Frostschutzwirkung keine Auswirkung.

Rab18 war sensibler gegenüber pH-Werten als DH10. Daher fiel während einer Säurefällung bei pH 2 Rab18 mit aus. So war die Vorgehensweise wie bei DH10 keine Lösung.

Es war jedoch möglich, Rab18 von Ammoniumsulfat in einer zweistufigen Gelchromatografie abzutrennen. Daher war es auch möglich, sich die Ammoniumsulfatfällung zunutze zu machen, um das *E.coli*-Protein zu fällen. Vorversuche hatten gezeigt, dass das *E.coli*-Protein bereits bei einer 30 % gesättigten Ammoniumsulfatlösung ausfiel.

Zur Aufreinigung von Rab18 wurde nun eine Ammoniumsulfatfällung bei 30 % Sättigung durchgeführt und das hitzestabile Protein ausgefällt. Der Überstand mit dem Rab18 wurde bei -20 °C gelagert.

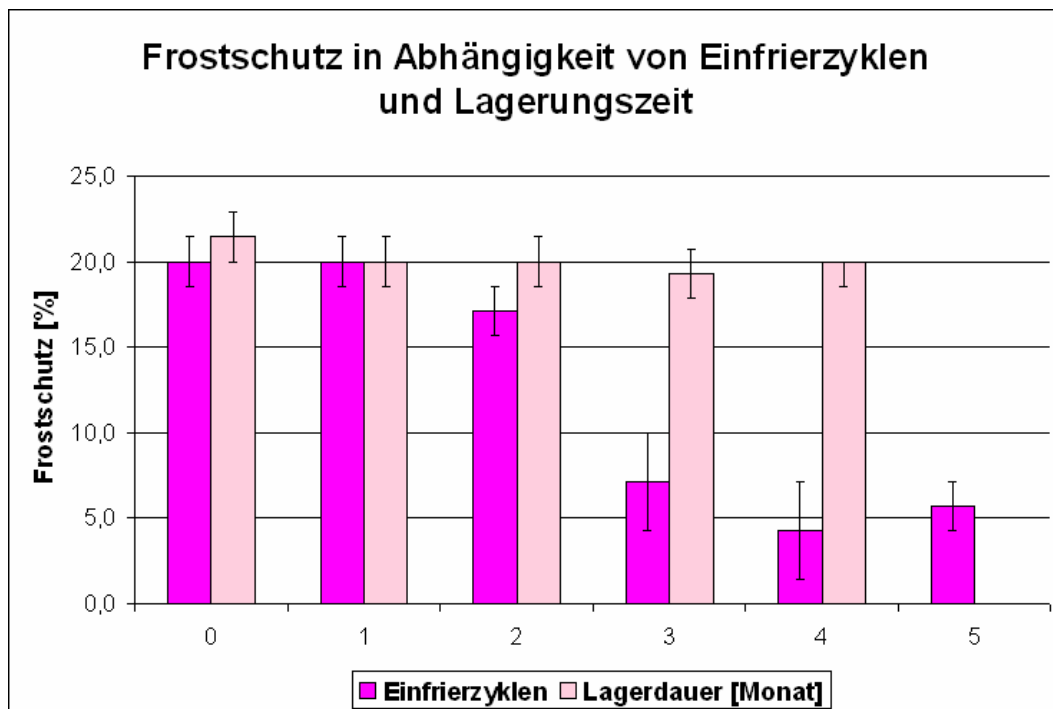
### 3.6. Lagerung

Wie unter 3.4.2 beschrieben, ist eine Behandlung des DH10 mit Ammoniumsulfatfällung ungünstig, da es nicht ausreichend abgetrennt werden kann. Dies beeinflusst die Funktionsanalyse, wie sich am Frostschutz und der Hillreaktion zeigt.

Die Ammoniumsulfatfällung diente nicht nur der Konzentrierung des Produktes, sondern auch der Lagerung. Es musste daher für beide Probleme eine Lösung gefunden werden. Da die Dehydrine als intrazelluläres Protein in *E.coli* exprimiert wurden, konnte eine Aufkonzentrierung durch ein geringeres Aufschlussvolumen (30 ml anstelle von 120 ml) erreicht werden.

Dehydrine waren stabil gegenüber extremen Temperaturen, daher wurde versucht, sie direkt in der Probelösung (5 mM Saccharose, 1 mM Manganchlorid, 1 mM Calciumchlorid) bei -20 °C einzufrieren und zu lagern. Als Kriterium für das Gelingen diente der Frostschutztest über das Thylakoidvolumen.

In Diagramm 8 ist der Effekt des Einfrierens und der Lagerdauer auf die Frostschutzaktivität von DH10 zu sehen. Man erkennt, dass die Zeitspanne, in der das Protein bei -20 °C lagert, im gemessenen Zeitraum keinen Einfluss auf die Aktivität hat. Jedoch ist ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, da hier die Aktivität des Proteins ab dem dritten Zyklus stark abnimmt.



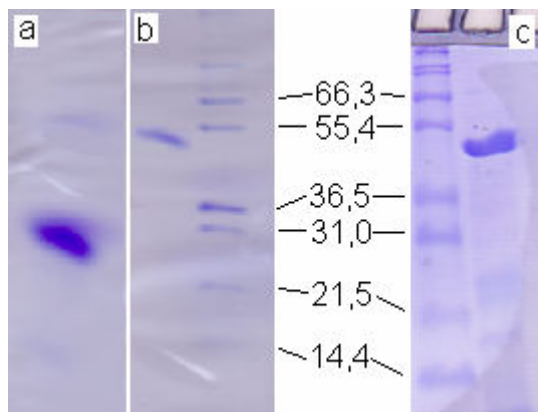
**Diagramm 8: Frostschutz in Abhängigkeit von Einfrierzyklen und Lagerungszeit**

Dargestellt ist der Frostschutz als Funktion des Thylakoidvolumens in Abhängigkeit der Einfrierzyklen und der Lagerzeit. Ein Einfrierzyklus besteht aus dem Einfrieren des Proteins bei -20 °C und dem Auftauen in einem Wasserbad bei Raumtemperatur. Als weiteres ist der Frostschutz über das Thylakoidvolumen nach unterschiedlicher Lagerungszeit dargestellt. Durch die Lagerung erfuh das Protein einen Einfrierzyklus. Zur Ermittlung des Frostschutzes wurde eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz.

### 3.7. Aufgereinigte Proteinmengen

In Abbildung 3 sind die aufgereinigten Proteine Rab18 und DH10 in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel dargestellt. Zusätzlich ist das hitzestabile *E.coli*-Protein aufgetragen. Da sich Rab18 wesentlich schlechter mit Coomassie einfärben lässt als DH10, wurde Rab18 zuerst aufkonzentriert und dann 120 µg auf das Gel aufgetragen.





**Abbildung 3: aufgereinigte Proteine**

**Aufgetragen sind a 120  $\mu$ g Rab18 b hitzestabiles *E.coli*-Protein und c 40  $\mu$ g DH10.**

Durchschnittlich konnte nach einer Fermentation im 10 L Laborfermenter bei 6 L Füllung und einem Aufschlussvolumen von 30 ml, 120 mg DH10 und 63 mg Rab18 aufgereinigt werden.

Aus 1 kg Wirsingkohl konnte durchschnittlich 48 mg CPP aufgereinigt werden.

## 4. Ergebnis - Funktionsanalyse

### 4.1. Frostschutz

#### 4.1.1 Frostschutz, bestimmt über das Thylakoidvolumen

Der physikalische Schaden an Thylakoidmembranen nach einem Frier-Tau-Zyklus kann durch den Volumenverlust der Thylakoide gemessen werden (Hincha, 1987; Hincha und Schmitt, 1988).

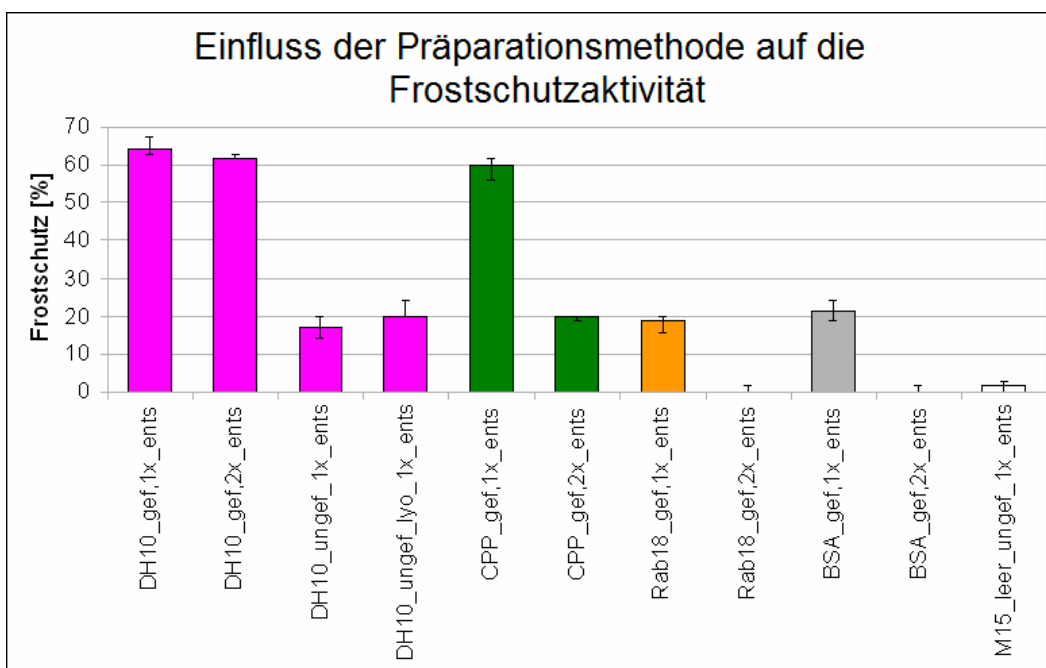


Diagramm 9: Einfluss der Präparationsmethode auf die Frostschutzaktivität

Dargestellt ist der Frostschutz in Prozent, welcher über das Thylakoidvolumen unter Einfluss folgender Proben bestimmt wurde: DH10 0,5 mg/ml, CPP 0,3 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml, BSA 0,5 mg/ml, M15\_leer= hitzestabiles Protein aus *E.coli*-Stamm M15 mit leerem Vektor. Inkubation: 2,5 mM Saccharose, 0,5 mM Manganchlorid, 0,5 mM Calciumchlorid, 2,5 mM Natriumchlorid, 2 h -20 °C. Die Proteine wurden in der maximal aufgereinigten Proteinkonzentration eingesetzt. Probenbezeichnungen: gef= Ammoniumsulfat gefällt, ungef= nicht Ammoniumsulfat gefällt 1x\_ents= einmal entsalzte Probe, 2x\_ents= zweifach entsalzte Probe. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

Wurden die Ergebnisse der DH10-Proben in Diagramm 9 verglichen, so fiel als Erstes der große Unterschied zwischen Ammoniumsulfat-gefälltem DH10 und nicht Ammoniumsulfat-gefälltem DH10 auf. Der erhöhte Frostschutz ist wahrscheinlich auf Reste an Ammoniumsulfat in der Proteinprobe zurückzuführen. Eine Entsalzung in zwei Schritten brachte jedoch keine Reduktion des Schutzeffektes.

Bei CPP und Rab18 konnte gezeigt werden, dass durch einfache Entsalzung nicht das ganze Ammoniumsulfat entfernt werden konnte (Diagramm 4 und Diagramm 5). Das verbleibende Ammoniumsulfat konnte mit Hilfe der Hillreaktion, durch Messung der Leitfähigkeit und durch Ausfällen als Calciumsulfat nachgewiesen werden. Siehe hierzu 3.4 Nachweis von Ammoniumsulfat-Resten.

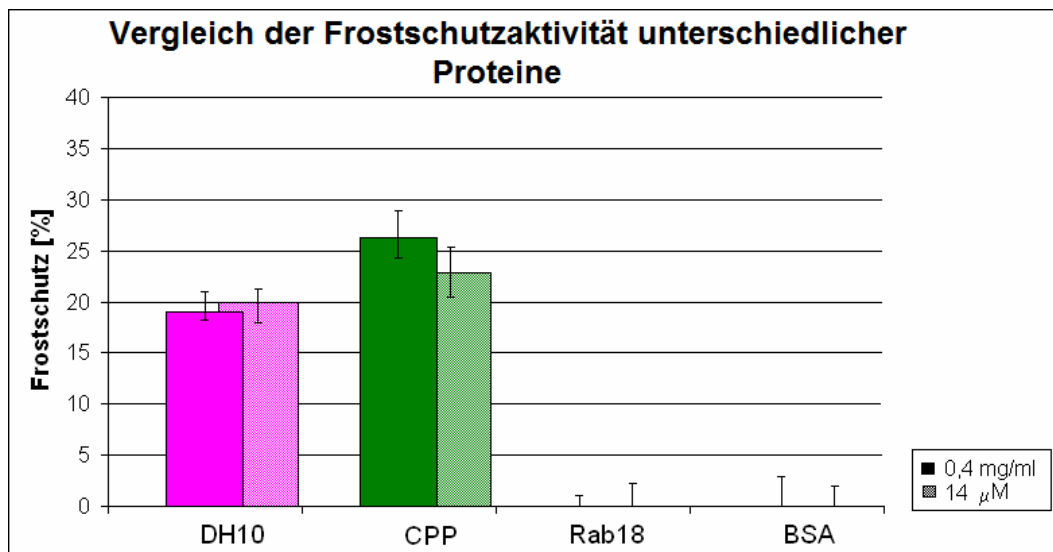
CPP zeigt einfach entsalzt 60 % Frostschutzwirkung, zweifach entsalzt lediglich 20 %.

Rab18 und BSA zeigten nach einer einfachen Entsalzung eine Frostschutzaktivität. Das zweifach entsalzte Rab18 zeigte jedoch keinen Frostschutz. Auch hier war der Effekt von Ammoniumsulfat zu sehen.

Die Probe M15\_leer zeigte keinen Frostschutz. Das nach der Hitzefällung und der Aufreinigung vorhandene, hitzestabile *E.coli*-Protein hatte keine Auswirkung auf den physikalischen Frostschutz.

In Diagramm 10 ist die Frostschutzwirkung der Proteine bei gleicher Konzentration dargestellt. Die Proteine wurden so vorbehandelt, dass keine messbare Ammoniumsulfatkonzentration in den Proben vorlag.

Dennoch erkennt man deutlich, dass die Proben mit DH10 und CPP eine Frostschutzwirkung aufzeigten. Betrachtet man die Konzentration in mg/ml, so zeigt CPP einen höheren Frostschutz als DH10. Vergleicht man die Stoffmenge an DH10 und CPP, sind die Wirkungen gleich. Jedoch ist zu beachten, dass 14  $\mu$ M DH10 einer Konzentration von 0,8 mg/ml entspricht, wogegen es bei CPP lediglich 0,2 mg/ml sind. Rab18 und BSA wiesen keinen Frostschutz auf.



**Diagramm 10: Vergleich der Frostschutzaktivität unterschiedlicher Proteine**

Dargestellt ist der Frostschutz in Prozent, welcher über das Thylakoidvolumen unter Einfluss folgender Proben bestimmt wurde: DH10, CPP, Rab18, BSA. Inkubation: 2,5 mM Saccharose, 0,5 mM Manganchlorid, 0,5 mM Calciumchlorid, 2,5 mM Natriumchlorid, 2h -20 °C. Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

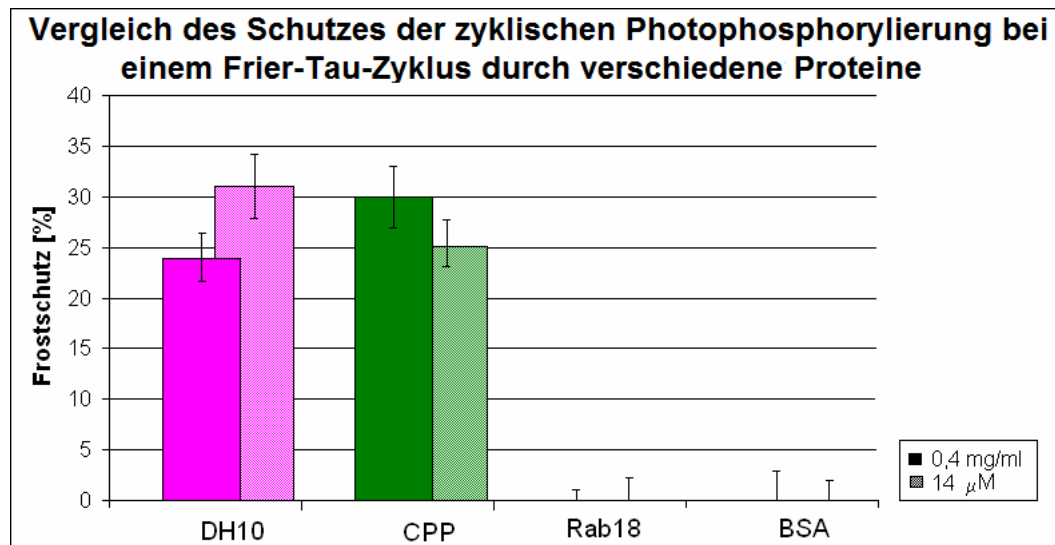
#### 4.1.2 Frostschutz, bestimmt über die zyklische Photophosphorylierung

Durch die Messung der zyklischen Photophosphorylierung nach einem Frier-Tau-Zyklus ließ sich eine Aussage über den Schutz der ATP-Synthese machen.

In Diagramm 11 ist zu sehen, dass sowohl DH10 als auch CPP die Thylakoide vor dem Verlust der Photosyntheseaktivität schützten.

Wobei CPP bei einer Konzentration 0,4 mg/ml die zyklische Photophosphorylierung besser schützte als DH10. Bei 14 µM schützte DH10 die Thylakoide besser als CPP. Jedoch war zu beachten, dass 14 µM DH10 einer Konzentration von 0,8 mg/ml entsprachen, wogegen es bei CPP lediglich 0,2 mg/ml waren. Wie beim Thylakoidvolumen schützte Rab18 auch hier nicht vor Gefrierschäden.

BSA zeigte keinen Schutz der zyklischen Photophosphorylierung.



**Diagramm 11: Vergleich des Schutzes der zyklischen Photophosphorylierung bei einem Frier-Tau-Zyklus durch verschiedene Proteine**

Dargestellt ist der Frostschutz in Prozent, bestimmt über die ATP-Bildung bei der zyklischen Photophosphorylierung unter Einfluss folgender Proben: DH10, CPP, Rab18 und BSA.

Inkubation: 2,5 mM Saccharose, 0,5 mM Manganchlorid, 0,5 mM Calciumchlorid, 2,5 mM Natriumchlorid, 2h -20 °C,

Jeder dargestellte Wert wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

### 4.1.3 Frostschutz des Thylakoidvolumens und der zyklischen Photophosphorylierung bei steigender Proteinkonzentration

DH10 erreichte den maximalen Schutz des Thylakoidvolumens bei 10 µM und der zyklischen Photophosphorylierung bei 14 µM. Dies ist in Diagramm 12 nachvollziehbar. CPP hingegen hatte seine maximale Wirksamkeit bei den zur Verfügung stehenden Proteinkonzentrationen noch nicht erreicht. Zudem fiel auf, dass CPP das Thylakoidvolumen und die zyklische Photophosphorylierung gleichermaßen schützte, während

DH10 die zyklische Photophosphorylierung besser schützte als das Thylakoidvolumen. CPP schützte das Thylakoidvolumen bei höherer Konzentration besser als DH10. Bei der zyklischen Photophosphorylierung schützte DH10 bei den gemessenen Konzentrationen besser als CPP.

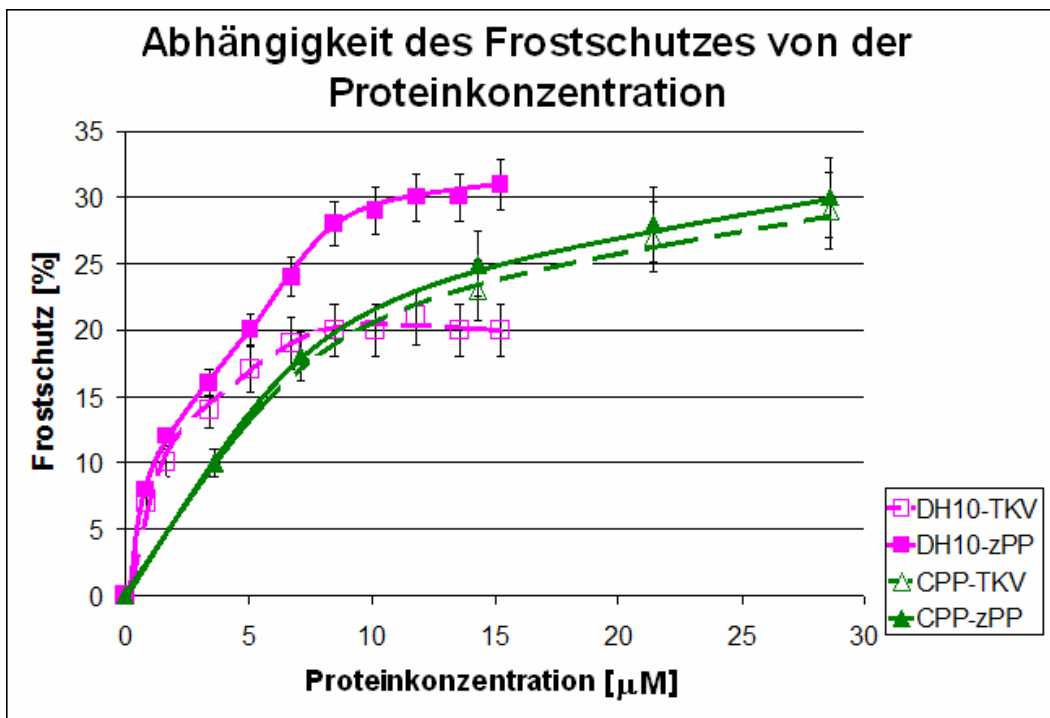


Diagramm 12: Abhängigkeit des Frostschutzes von der Proteinkonzentration

Aufgetragen ist der Frostschutz gegenüber der Proteinkonzentration. Verglichen wird der Frostschutz gemessen über das Thylakoidvolumen (TKV) und der ATP-Bildung während der zyklischen Photophosphorylierung (zPP) von CPP und DH10. Inkubation: 2,5 mM Saccharose, 0,5 mM Manganchlorid, 0,5 mM Calciumchlorid, 2,5 mM Natriumchlorid, 2h -20 °C.

Die dargestellten Werte wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

In Diagramm 13 sind der Frostschutz, gemessen über die zyklische Photophosphorylierung, und das Thylakoidvolumen aus Diagramm 12 gegenübergestellt. Es ist zu sehen, dass CPP und DH10 eine lineare

Abhängigkeit des Schutzes der zyklischen Photophosphorylierung von dem Thyklakoidvolumen zeigt.

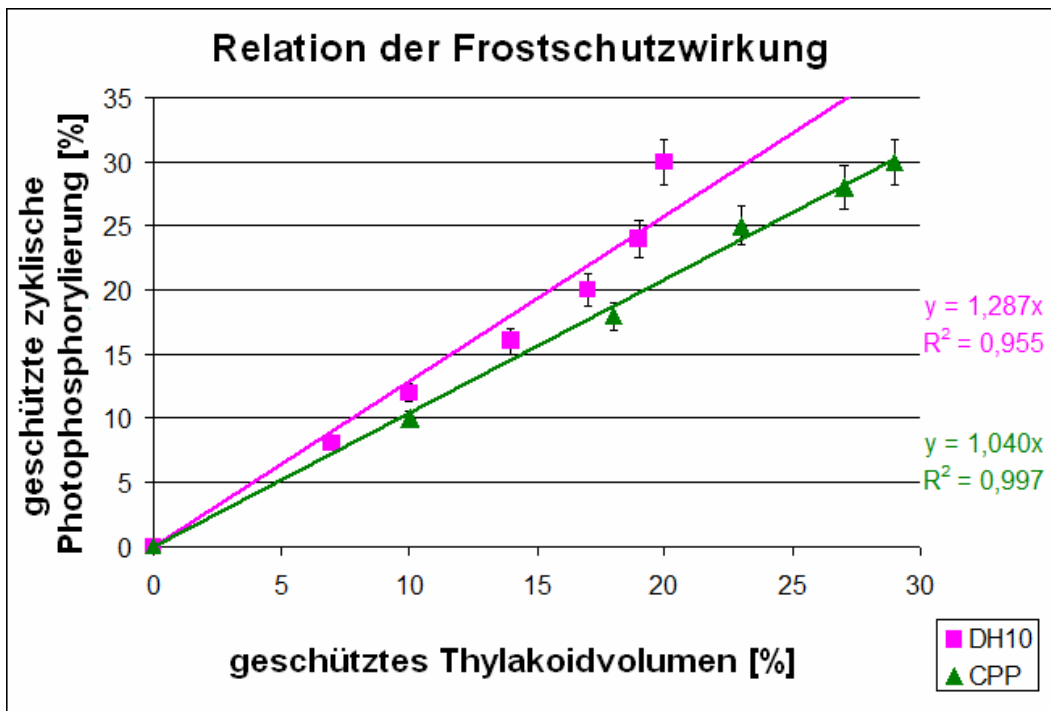


Diagramm 13: Relation der geschützten ATP-Synthese zu dem geschützten Thyklakoidvolumen

Dargestellt ist der prozentuale Frostschutz der ATP-Synthese gegenüber dem des geschützten Thyklakoidvolumens, welches über die Hämatokritkapillare gemessen wurde. Inkubation: 2,5 mM Saccharose, 0,5 mM Manganchlorid, 0,5 mM Calciumchlorid, 2,5 mM Natriumchlorid, 2h -20 °C, Proteinkonzentrationen zwischen 0 bis 30  $\mu$ M. Das Diagramm basiert auf den gemessenen Werten, die bereits in Diagramm 12 dargestellt wurden. Die Werte wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

#### 4.1.4 Frostschutz des Thylakoidvolumens und der zyklischen Photophosphorylierung bei steigender Saccharosekonzentration

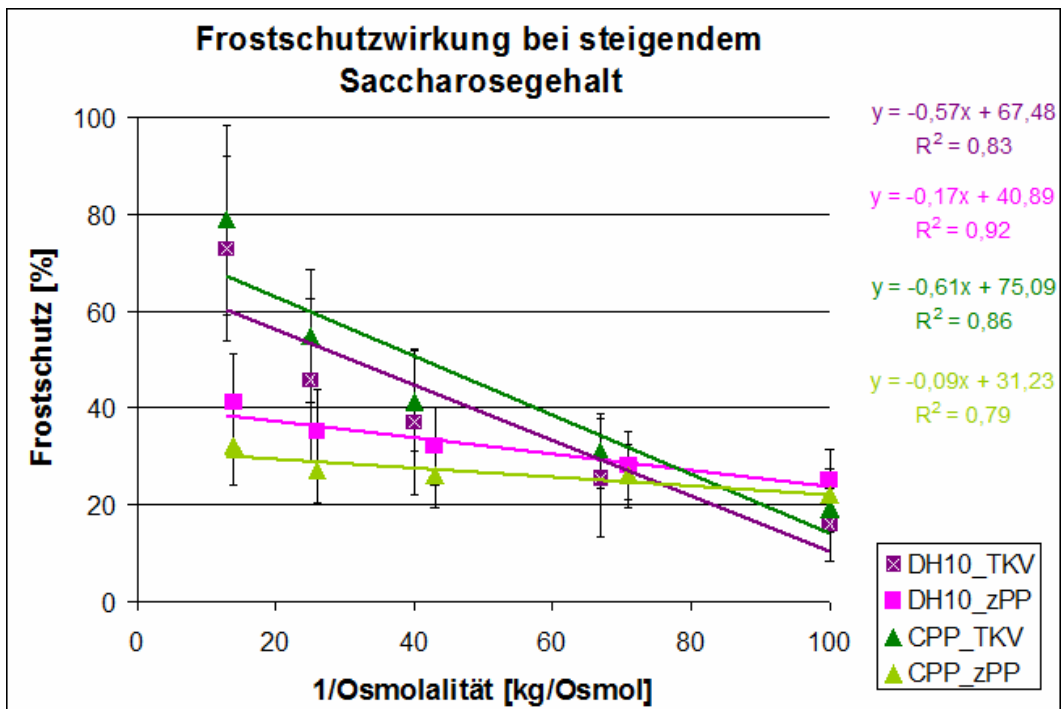


Diagramm 14: Frostschutz bei steigender Saccharosekonzentration

Dargestellt sind der Frostschutz gemessen über das Thylakoidvolumen (TKV) und der zyklischen Photophosphorylierung (zPP) bei steigender Saccharosekonzentration. Ermittelt wurden diese Werte aus den in Diagramm 15 und Diagramm 25 gezeigten Messwerten.

Inkubationsmedium: 2,5 mM Natriumchlorid, steigende Saccharosekonzentration. Untersuchte Proteine: DH10 0,5 mg/ml, CPP 0,3 mg/ml. Die eingesetzten Konzentrationen bewirkten einen 20 % iger Frostschutz des Thylakoidvolumens und eine 30 % iger Schutzwirkung der zyklischen Photophosphorylierung unter den Standardbedingungen für den Frostschutztest (4.1.1, 4.1.2).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das Thylakoidvolumen (4.3.1 Boyle van't Hoff bei -20 °C) und die zyklische Photophosphorylierung (4.5.1) bei steigender Saccharosekonzentration nach einem Frier-Tau-Zyklus und bei 0°C gemessen. Daraus ergeben sich das Diagramm 14, sowie die Diagramme 15 und 25. Die Diagramme 15 und 25 werden in



Abschnitt 4.3.1 und 4.5.1 besprochen. Zur Erstellung des Diagramm 14 wurde der Frostschutz für jede Saccharosekonzentration einzeln bestimmt. So ist der Frostschutzeffekt der Saccharose herausgerechnet und nur die Schutzwirkung der Proteine ermittelt. Bei der zyklischen Photophosphorylierung liegt der Frostschutz bei CPP und DH10 bei etwa 30 %.

Bei dem Schutz des Thylakoidvolumens jedoch stieg der Frostschutz mit steigender Saccharosekonzentration an, obwohl der kryoprotektive Effekt der Saccharose auf das Thylakoidvolumen bereits herausgerechnet wurde. Trotz des immer größer werdenden Fehlers waren die Frostschutzwerte der größten und der kleinsten Saccharosekonzentration signifikant unterschiedlich.

## **4.2. Bindung an Thylakoidmembranen**

Ein Teil der Frostschutzwirkung des CPP wurde auf seine Bindung an Thylakoide zurückgeführt (Sror *et al.*, 2003; Alsuleiman, 2011). Daher war die Bindung des DH10 und Rab18 an Thylakoidmembranen zu überprüfen.

Abbildung 4a und 4b zeigen eindeutig, dass DH10 nur in den Proben enthalten waren, denen es zugesetzt wurde und im Überstand der ersten Zentrifugation. Damit konnte gezeigt werden, dass DH10 nicht an die Membran von Thylakoiden bindet. Ein kleines Protein (roter Pfeil), scheint durch das zugesetzte Protein von den Thylakoiden gelöst zu werden. Jedoch konnte dies nicht bei jeder Wiederholung des Testes reproduziert werden. Oberhalb des DH10 geht durch jeden Zentrifugationsschritt ebenfalls ein Protein in den Überstand.

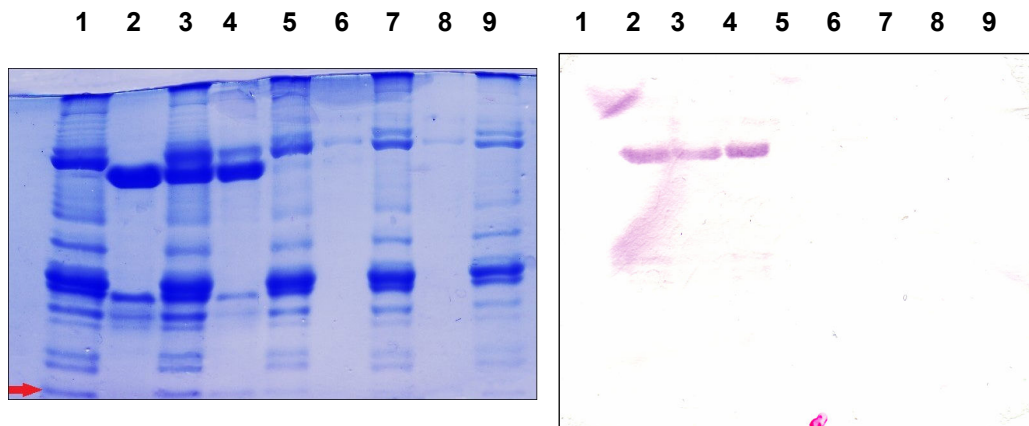


Abbildung 4a: Coomassie-gefärbtes Gel

4b: Western-Blot von DH10

Positionen: 1- Thylakoide 10  $\mu\text{g}$  Chlorophyll, 2- DH10 10  $\mu\text{g}$ , 3- Mischung aus Thylakoiden und DH10 je 10  $\mu\text{g}$ , 4- Überstand nach erster Zentrifugation, 5- Pellet nach erster Zentrifugation, 6- Überstand nach zweiter Zentrifugation, 7- Pellet nach zweiter Zentrifugation, 8- Überstand nach dritter Zentrifugation, 9- Pellet nach dritter Zentrifugation, roter Pfeil: unbekanntes Protein, welches verloren zu gehen scheint.

Versuchsbedingungen: Variante 1: Thylakoide in 5 mM Natriumchlorid, DH10 in 5 mM Saccharoselösung mit 1 mM Manganchlorid und 1 mM Calciumchlorid

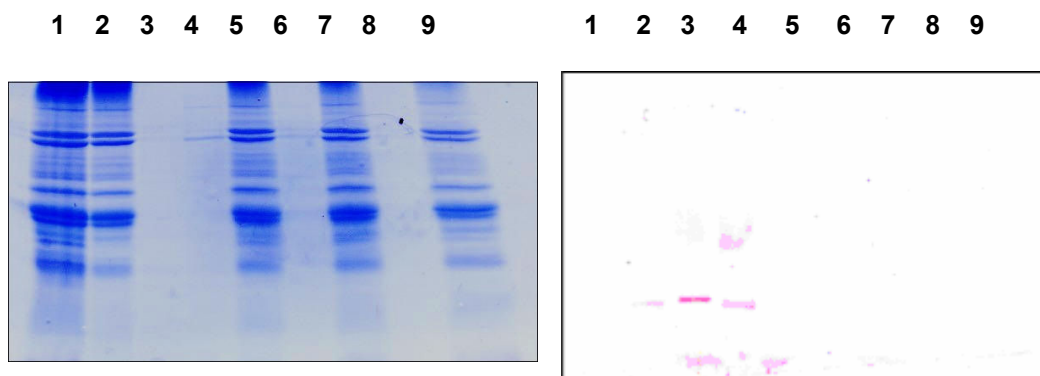
Variante 2: Thylakoide in 5 mM Natriumchlorid, DH10 in 5 mM Saccharoselösung ohne Manganchlorid und Calciumchlorid

Variante 3: Thylakoide in 150 mM Natriumchlorid, DH10 in 5 mM Saccharoselösung mit 1 mM Manganchlorid und 1 mM Calciumchlorid

Variante 4: Thylakoide in 15 mM Natriumchlorid, DH10 in 400 mM Saccharose, 20 mM Natriumdihydrogenphosphat bei pH 7,0 (entspricht dem Hill-Reaktions-Puffer)

Variante 5: Thylakoide in 5 mM Natriumchlorid, DH10 in 20 % MES pH 4,8 (pI DH10)  
Dargestellt ist das Ergebnis der ersten Variante, alle weiteren Varianten ergaben für DH10 dasselbe Bild. Lediglich bei der Variante mit Mes sind die einzelnen Banden nicht deutlich getrennt. Der Western-Blot ist jeweils eindeutig.

Auch im Falle von Rab18 ist eindeutig keine Bindung an Thylakoidmembranen nachweisbar, wie in Abbildung 5 zu sehen ist.



**Abbildung 5 a: Coomassie-gefärbtes Gel      5b: Western-Blot von Rab18**

**Positionen: 1- Thylakoide 10  $\mu$ g Chlorophyll , 2- Mischung aus Thylakoiden und Rab18 je 10  $\mu$ g, 3- Rab18 10  $\mu$ g, 4- Überstand nach erster Zentrifugation, 5- Pellet nach erster Zentrifugation, 6- Überstand nach zweiter Zentrifugation, 7- Pellet nach zweiter Zentrifugation, 8- Überstand nach dritter Zentrifugation, 9- Pellet nach dritter Zentrifugation**

**Versuchsbedingungen: Variante 1: Thylakoide in 5 mM Natriumchlorid, Rab18 in 5 mM Saccharoselösung mit 1 mM Manganchlorid und 1 mM Calciumchlorid**

**Variante 2: Thylakoide in 150 mM Natriumchlorid, Rab18 in 5 mM Saccharoselösung mit 1 mM Manganchlorid und 1 mM Calciumchlorid**

**Variante 3: Thylakoide in 15 mM Natriumchlorid, Rab18 in 400 mM Saccharose, 20 mM Natriumdihydrogenphosphat bei pH 7,0**

**Dargestellt ist das Ergebnis der ersten Variante, alle weiteren Varianten ergeben dasselbe Bild.**

### **4.3. Boyle van't Hoff**

Da die Thylakoidmembran eine semipermeable Membran ist, reagieren isolierte Thylakoide wie ideale Osmometer. Die Reaktion der Thylakoide auf langsam permeierende Substanzen unterliegt dem Boyle van't Hoff-Gesetz (Nobel, 1969; Prickett, 2008).

$$V = (R \cdot T \cdot n) / p + b$$

umgestellt auf die Form der linearen Regression,

$$(V - b) = (1/p) * (R \cdot T \cdot n)$$

**Formel 6: Boyle van't Hoff-Relation**

**V = Volumen der Vesikel, b = nicht-osmotische Volumen, p = osmotisches Potential der Lösung (Osmolalität), R = Gaskonstante, T = Temperatur, n = Anzahl der osmotisch aktiven Teilchen im Volumen**

Die Darstellung im Diagramm mit den Achsen  $y = (V-b)$  und  $x = (1/p)$  ergibt dann eine Gerade mit der Steigung  $(R \cdot T \cdot n)$ . Wird der Versuch bei gleichbleibendem Druck und konstanter Temperatur durchgeführt, so stellt die Steigung die Menge an osmotisch aktiven Teilchen im Innenraum der Thylakoide dar.

Es ist möglich, dass die Proteine die Permeabilität der Thylakoide beeinflussen und so die Thylakoide vor Frostschäden bewahren. Dies wurde für CPP bereits gezeigt (Hincha, 1987). Daher wurden Boyle van't Hoff-Plots angefertigt.

#### **4.3.1 Boyle van't Hoff bei -20 °C**

Die Thylakoide wurden in 2,5 mM Natriumchlorid und steigender Saccharosekonzentration für 2 h bei 0 °C und -20 °C inkubiert.

Nach dem Auftauen schloss sich direkt die Messung des Thylakoidvolumens an. Die Ergebnisse sind in Diagramm 15 dargestellt.

Es ist an der -20 °C Kontrolle zu sehen, dass die steigende Saccharosekonzentration (kleine reziproke Osmolalität) das Volumen der Thylakoide schützte. DH10 und CPP schützten zusätzlich die Thylakoide während eines Frier-Tau-Zyklus. Dies ist an den jeweils höheren Volumina zu erkennen. Proben mit Rab18 hingegen zeigen dasselbe Volumen wie die Kontrolle bei -20 °C.

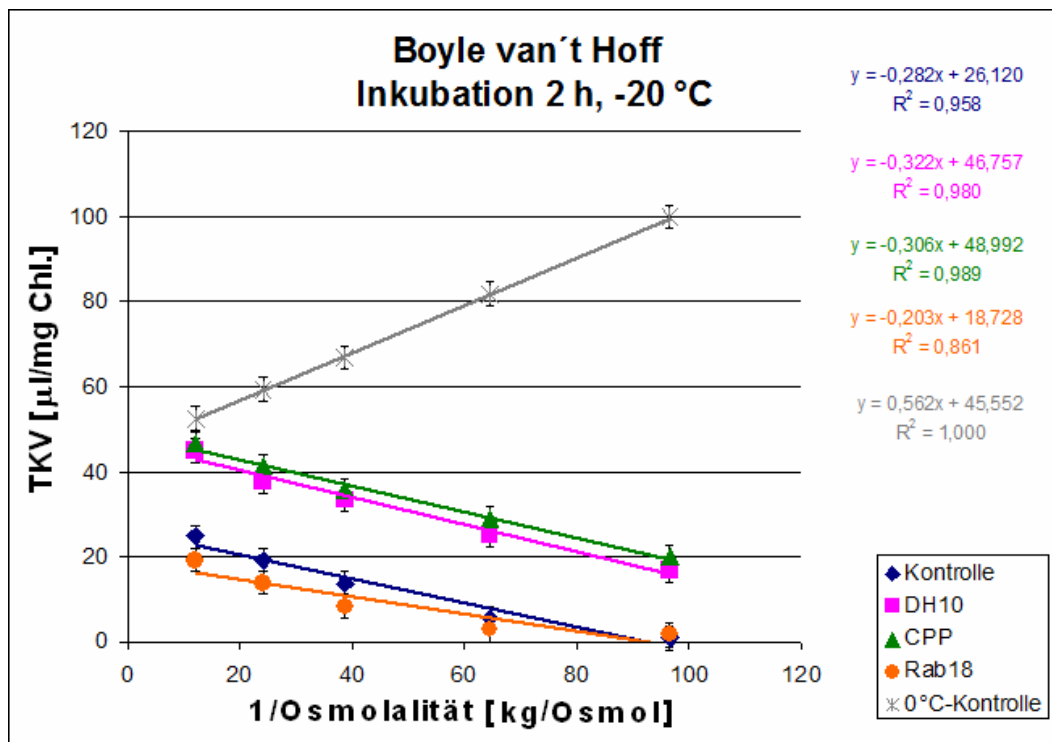


Diagramm 15: Boyle van't Hoff – Inkubation 2 h bei -20 °C

Aufgetragen wurde das Thylakoidvolumen (TKV) in  $\mu\text{l}$  pro mg Chlorophyll, gegen die reziproke Osmolalität der Inkubationslösung. Die Osmolalität wurde durch Erhöhung der Saccharosekonzentration verändert. Dargestellt ist neben der Kontrolle bei -20 °C und der Proteinproben bei -20 °C auch eine 0 °C - Kontrolle. Für diese Kontrolle wurden die Thylakoide ohne Proteine inkubiert. Inkubation: 2 h bei -20 °C (0 °C für die 0 °C-Kontrolle) in 2,5 mM Natriumchlorid und bei steigender Saccharosekonzentration. Nach dem Auftauen wurde das Thylakoidvolumen bestimmt.

Untersuchte Proteine: DH10 0,5 mg/ml, CPP 0,3 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein Frostschutz bei Standardbedingungen des Thylakoidvolumens, wie unter 4.1.1, von 20 % erreicht wurde. Da Rab18 keinen Frostschutz zeigte, wurde eine mittlere Konzentration gewählt. Die Werte wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz. Der erreichte Frostschutz ist in Diagramm 14 dargestellt.

Berechnet man nun aus den gemessenen Ergebnissen mit Hilfe der 0 °C-Kontrolle den Frostschutz bei den für den Frostschutz Standard Salz- und

Saccharosekonzentrationen, so ergibt sich für DH10 eine Frostschutzaktivität von 16 % +3,3 % -2,5 % und für CPP von 19 % +/- 2,5 %. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Kapitel 4.1.1 Frostschutz über das Thylakoidvolumen.

### 4.3.2 Boyle van't Hoff bei 0 °C

In Diagramm 16 sind die Steigungen als Maß für die Konzentration osmotisch aktiver Teilchen im Thylakoidlumen dargestellt.

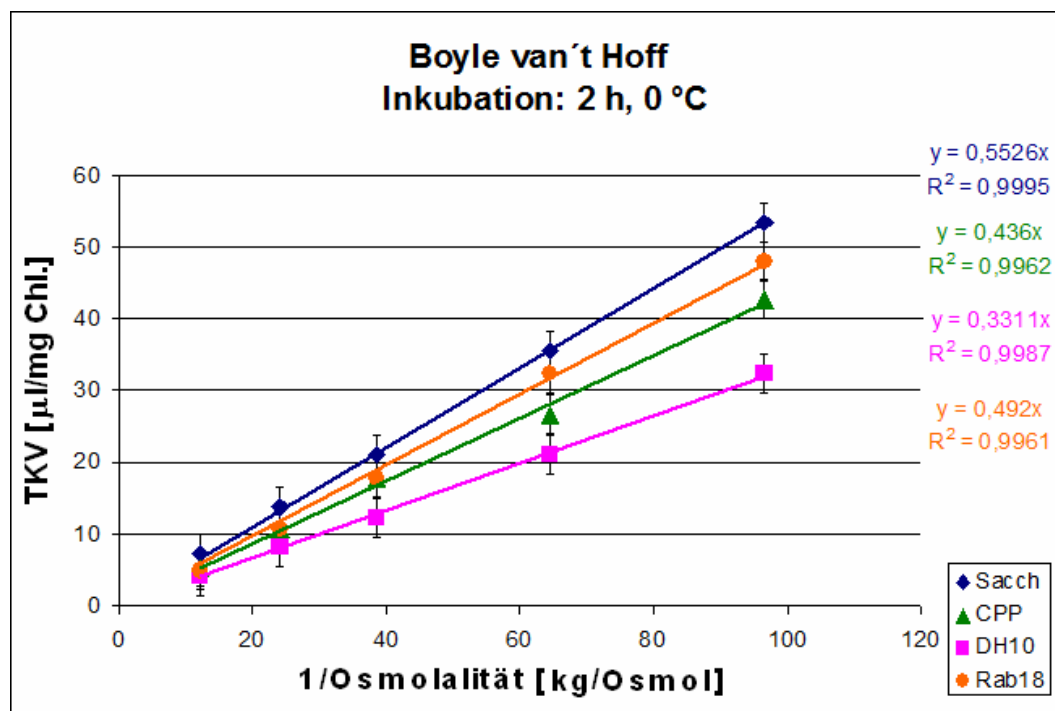


Diagramm 16: Boyle van't Hoff – Inkubation 2 h bei 0 °C

Aufgetragen ist das Thylakoidvolumen (TKV) in µl pro mg Chlorophyll, gegen die reziproke Osmolalität der Inkubationslösung. Das nicht-osmotische Volumen wurde aus der Darstellung genommen, um die unterschiedlichen Steigungen besser darstellen zu können. Die Osmolalität wurde durch Erhöhung der Saccharosekonzentration verändert. Untersucht wurden die Proteine DH10 0,5 mg/ml, CPP 0,3 mg/ml Rab18 0,4 mg/ml gegen eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein Frostschutz des Thylakoidvolumens von 20 % erreicht worden wäre. Da Rab18 keinen Frostschutz zeigte, wurde eine mittlere Konzentration gewählt. Inkubation: 2,5 mM Natriumchlorid, steigende Saccharosekonzentration, 2 h 0 °C. Die Werte wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

Der Vergleich zeigt keine signifikant unterschiedliche Steigung bei Rab18 im Vergleich zur Kontrolle, eine schwach signifikant geringere Steigung von CPP und eine eindeutig signifikant erniedrigte Steigung von DH10. Für die Berechnung der Signifikanz wurden die Steigungen der Proteinproben zur Steigung der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt und anschließend ein t-Test mit den Daten aller Versuchswiederholungen durchgeführt. Die prozentuale Erniedrigung lag für Rab18 bei 11 %, für CPP bei 21 % und für DH10 bei 40 %.

### **4.3.3 Boyle van't Hoff bei 18 °C**

Da die Aufnahme pro Zeit unter anderem von der Temperatur abhängig ist, wurde die Inkubationstemperatur erhöht.

Die in Diagramm 17 dargestellten Ergebnisse zeigen signifikant unterschiedliche Steigungen aller Proteine im Vergleich zur Kontrolle. Die prozentuale Erniedrigung der Steigung lag bei Rab18 um 14 %, bei CPP um 51 % und bei DH10 um 66 %.

Wurden die Ergebnisse des Boyle van't Hoff-Plots bei 0 °C und bei 18 °C verglichen, so waren die Unterschiede der Steigungen bei höheren Temperaturen eindeutiger und signifikant. Daher wurden für die Versuche zur Boyle van't Hoff-Kinetik eine Inkubation bei 18 °C gewählt. Bei höheren Temperaturen bestand die Gefahr, dass die Thylakoide während der Inkubationszeit kollabierten und eine Auswertung unmöglich geworden wäre.

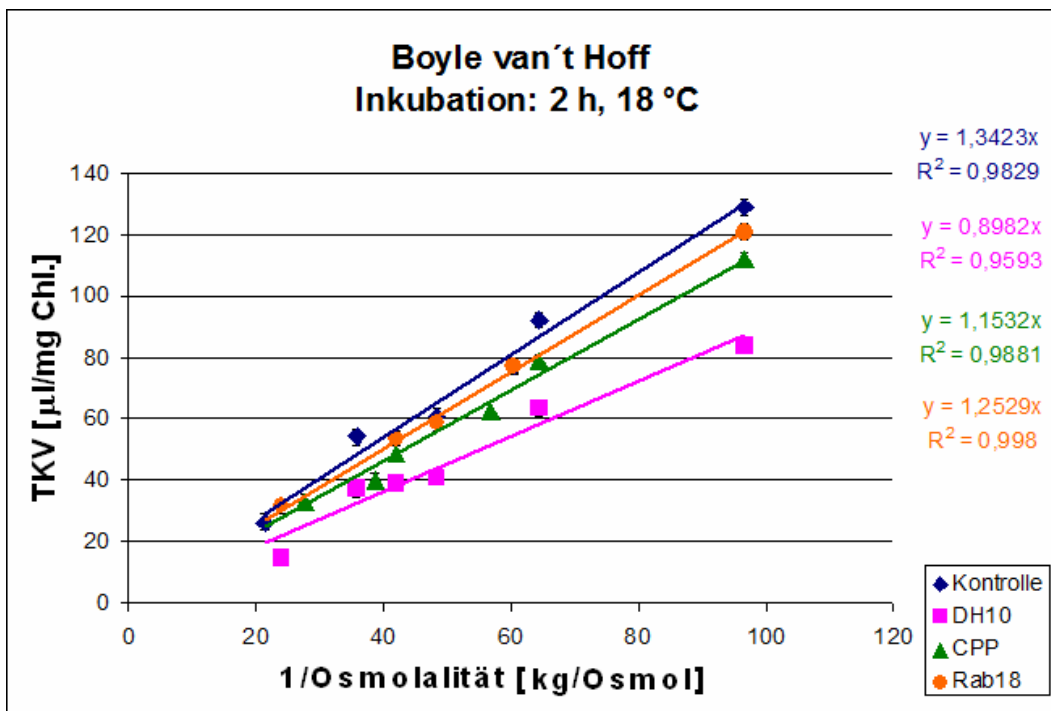


Diagramm 17: Boyle van't Hoff – Inkubation 2 h bei 18 °C

Aufgetragen wurde das Thylakoidvolumen (TKV) in  $\mu$ l pro mg Chlorophyll, gegen die reziproke Osmolalität der Inkubationslösung. Das nicht-osmotische Volumen wurde aus der Darstellung genommen, um die unterschiedlichen Steigungen besser darstellen zu können. Die Osmolalität wurde durch Erhöhung der Saccharosekonzentration verändert. Untersucht wurden die Proteine DH10 0,5 mg/ml, CPP 0,3 mg/ml Rab18 0,4 mg/ml gegen eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein Frostschutz des Thylakoidvolumens von 20 % erreicht worden wäre. Da Rab18 keinen Frostschutz zeigte, wurde eine mittlere Konzentration gewählt. Inkubation: 2,5 mM Natriumchlorid, steigende Saccharosekonzentration, 2 h 18 °C. Die Werte wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurde der Median und die totale Varianz. Die Fehlerbalken sind kleiner als die dargestellten Symbole.



#### 4.3.4 Boyle van't Hoff-Kinetik

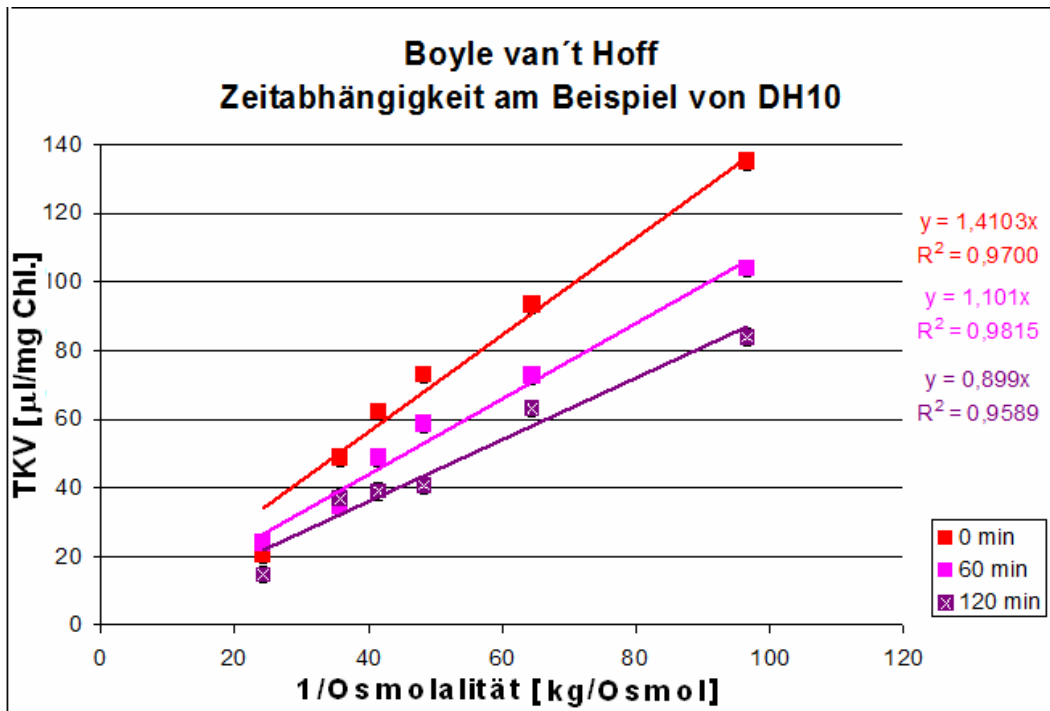


Diagramm 18: Zeitabhängigkeit des Boyle van't Hoff-Plots

Aufgetragen wurde das Thylakoidvolumen (TKV) in  $\mu\text{l}$  pro mg Chlorophyll, gegen die reziproke Osmolalität der Inkubationslösung. Das nicht-osmotische Volumen wurde aus der Darstellung genommen, um die unterschiedlichen Steigungen besser darstellen zu können. Die Osmolalität wurde durch Erhöhung der Saccharosekonzentration verändert. Es wurde eine DH10-Konzentration von 0,5 mg/ml für den Test eingesetzt. Dargestellt ist der Plot für DH10 nach einer Inkubation bei 18 °C und einer Zeit von 0 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz einer Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken sind kleiner als die dargestellten Symbole.

Man sieht eindeutig in Diagramm 18, dass während der Inkubation bei allen Messpunkten das Thylakoidvolumen nachlässt. Dies geschieht bei den geringeren Saccharosekonzentrationen im Medium (höhere reziproke Osmolalität) stärker als bei höheren. So entsteht auch die Abnahme der Steigung um 36 % über die ganze Inkubationszeit. Die Abnahme ist in Diagramm 19 auch für die mit CPP behandelten Thylakoide und die Kontrolle zu sehen. Die Änderung der Steigung von den Proben mit CPP

und den Kontrollthylakoiden waren gleich und fielen um etwa 20 %. Die Steigung der DH10-Proben hingegen fiel über die Inkubationszeit stärker ab.

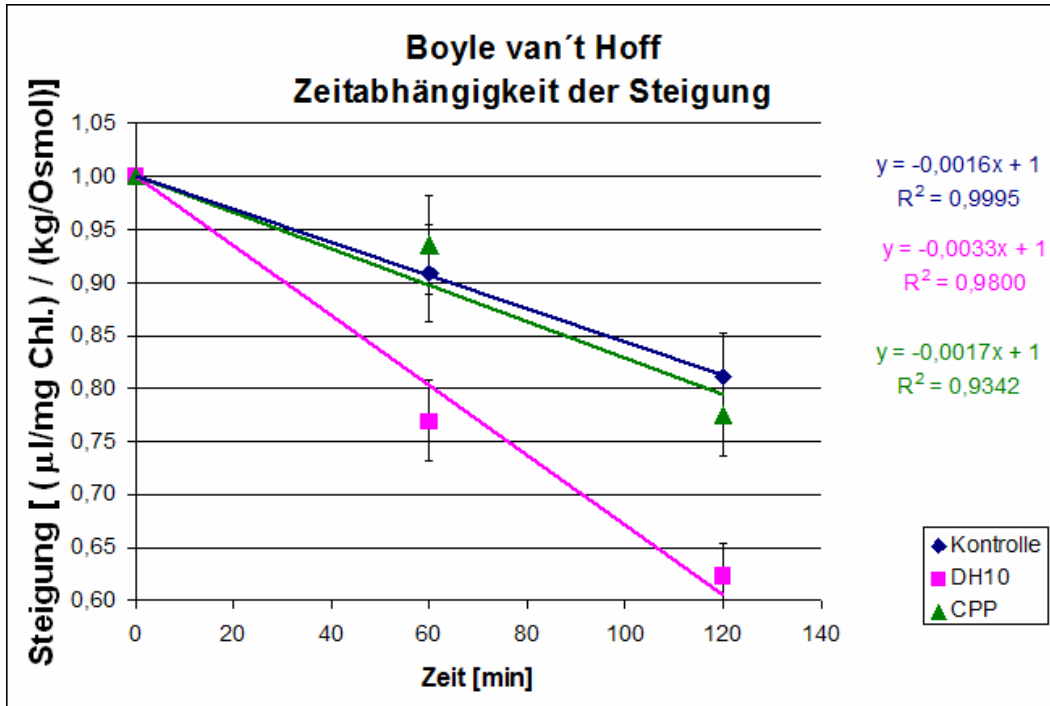


Diagramm 19: Zeitabhängigkeit der Steigung

Aufgetragen wurde die Änderung der Steigung gegenüber der Zeit. Die Änderung der Steigung ist als Relation zur Steigung zum Zeitpunkt 0 Minuten dargestellt. Untersucht sind die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein Frostschutz des Thylakoidvolumens von 20 % erreicht worden wäre. Inkubation: 2,5 mM Natriumchlorid, steigende Saccharosekonzentration, 0 min, 60 min und 120 min bei 18 °C. Die Werte wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden der Median und die totale Varianz.

Da das Volumen der Thylakoide linear von der Osmolalität abhängt, so kann festgestellt werden, dass die Thylakoide als ideale Osmometer fungieren. Über die Zeit verlieren sie jedoch innere Osmolyte.

#### 4.4. Sedimentation

In den vorangegangenen Versuchen zum Frostschutz und dem Boyle van't Hoff zeigte sich, dass die Thylakoide während der Inkubationszeit unterschiedlich schnell sedimentierten.

Basierend auf der Stoke'schen Gleichung setzt sich die Sedimentation von Teilchen wie folgt zusammen:

$$u_s = \frac{\Delta\rho * g * d_p^2}{18 \eta_{fl}}$$

**Formel 7: Sedimentationsgeschwindigkeit**

**$u_s$  = Sedimentationsgeschwindigkeit,  $\Delta\rho$  = Dichtedifferenz zwischen Medium und Partikel,  $g$  = Erdbeschleunigung,  $d_p$  = Partikeldurchmesser,  $\eta_{fl}$  = Viskosität des Mediums**

Da in der folgenden Versuchsanordnung die Dichte des Mediums und seine Viskosität gleich gehalten wurden, war die Sedimentationsgeschwindigkeit der Thylakoide ausschließlich von ihrer Größe und der Dichte der Aggregate abhängig.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass eine Thylakoidkonzentration während der Sedimentation von 50  $\mu\text{g/ml}$  optimal war. Höhere Thylakoidkonzentrationen bewirkten eine schnellere Sedimentationsgeschwindigkeit. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar.

Bei geringeren Thylakoidkonzentrationen waren die Ergebnisse zwar auch reproduzierbar, die Aggregationsphase war jedoch länger, wodurch die Versuchsdauer insgesamt verlängert wurde.

Die Erhöhung des Saccharosegehaltes hatte keine Auswirkung auf die Reproduzierbarkeit. Wurde die Saccharosekonzentration erhöht, so bewirkte dieses eine steigende Dichte und Viskosität der Lösung und eine Verlangsamung der Sedimentation. Daher wurden für diese Versuchs-

reihen folgende Bedingungen gewählt: 5 mM Saccharose und 5 mM Natriumchlorid.

#### **4.4.1 Sedimentation bei Raumtemperatur**

In Diagramm 20 ist die Sedimentation von Thylakoiden bei 20 °C und 1 g dargestellt. In den ersten fünf Stunden zeigte sich ein Anstieg der Optischen Dichte, ausgelöst durch die Bildung von Thylakoidaggregaten. Diese sedimentierten und die Optische Dichte sank ab. Je stärker der Graph in der Aggregationsphase anstieg, desto schneller sank er in der Sedimentationsphase.

Zu sehen ist, dass Thylakoide ohne Zugabe von Manganchlorid und Calciumchlorid nahezu gar nicht sedimentierten. Thylakoide, denen diese Salze zugesetzt sind, sedimentierten hingegen schneller.

Wurden nun CPP den Thylakoiden zugesetzt, so konnte in Proben ohne Salz dasselbe Verhalten wie bei der Kontrolle beobachtet werden. In Proben mit Salz nahm die Sedimentationsgeschwindigkeit deutlich zu.

Bei Proben mit DH10 fiel auf, dass unter der normalen Salzkonzentration von je 0,5 mM Manganchlorid und 0,5 mM Calciumchlorid nahezu keine Sedimentation zu beobachten war. Erst durch Ansteigen der Salzkonzentration war auch eine Erhöhung der Sedimentationsrate zu beobachten.

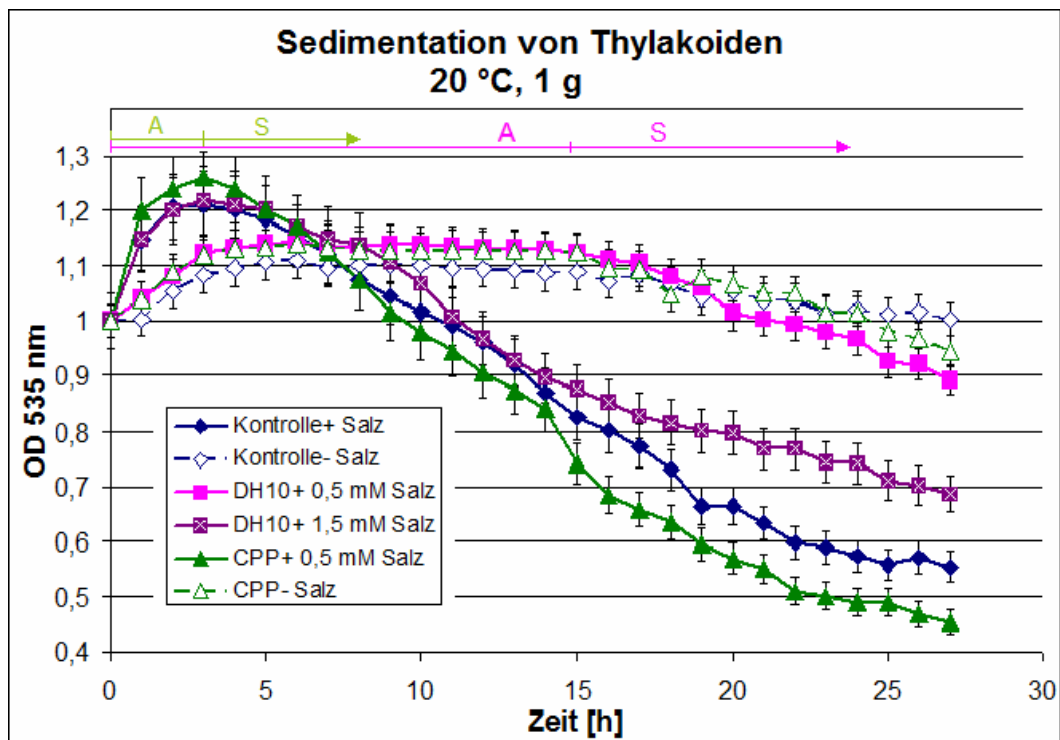


Diagramm 20: Sedimentation von Thylakoiden bei 20 °C und 1 g

Aufgetragen wurde die Optische Dichte bei 535 nm über die Zeit. Dargestellt sind die normalisierten Werte der Messungen. Eingetragen sind die Aggregationsphase A und Sedimentationsphase S für schnell sedimentierende Thylakoide mit  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$  (grün) und für kaum sedimentierende Thylakoide ohne  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$  (rosa).

Untersucht wurden die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 20%-iger Schutz des Thylakoidvolumens bei einem Frier-Tau-Zyklus gewährleistet wäre. Die Thylakoide hatten eine Konzentration von 0,05 mg/ml Chlorophyll. Probenbezeichnung: + Salz: Probe in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharoselösung mit angegebenen mM  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$ , - Salz: Probe in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharoselösung ohne  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$ .

Durch unterschiedlich gestartete Parallelansätze konnte eine Beobachtung über einen Zeitraum von 27 Stunden durchgeführt werden. Die Daten wurden zuerst auf eins normalisiert. Für jeden Datenpunkt wurden die Werte in einer Messreihe dreifach bestimmt. Durch die zeitlich unterschiedlichen Messreihen und die mehrfache Wiederholung des Versuches waren 30 Messungen pro Datenpunkt entstanden. Daher sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dargestellt.

Eindeutiger zu sehen ist dies in Diagramm 21: Sedimentationsgeschwindigkeit. Die Zugabe von BSA hat keine Auswirkungen auf die Sedimentationsgeschwindigkeit.

Nachdem die Sedimentationsgeschwindigkeit ermittelt wurde, wurden die Aggregatgrößen unter dem Mikroskop bestimmt. Die Ergebnisse sind in Diagramm 22 dargestellt.

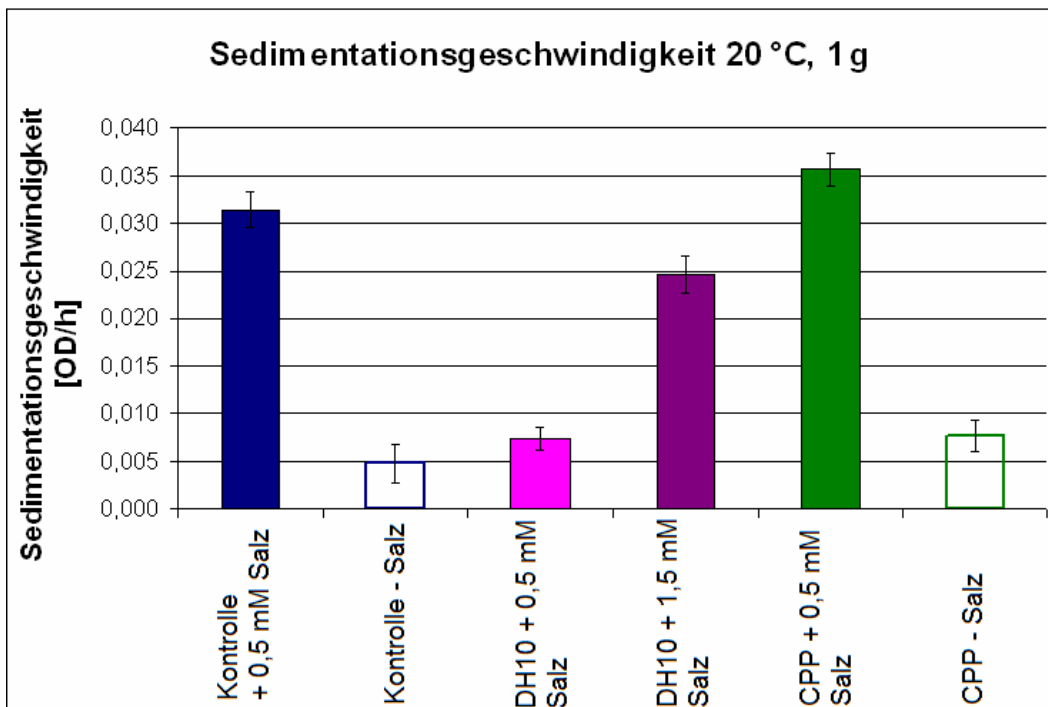


Diagramm 21: Sedimentationsgeschwindigkeit von Thylakoiden bei 20 °C, 1 g

Dargestellt ist die Sedimentationsgeschwindigkeit als Änderung der Optischen Dichte pro Stunde. Im Diagramm sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zehn Durchläufen dargestellt. Untersucht wurden die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 20 %-iger Schutz des Thylakoidvolumens bei einem Frier-Tau-Zyklus gewährleistet wäre. Die Thylakoide hatten eine Konzentration von 0,05 mg/ml Chlorophyll. Probenbezeichnung: + Salz : Probe in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharoselösung mit angegebenen mM  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$ , - Salz: Probe in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharoselösung ohne  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$

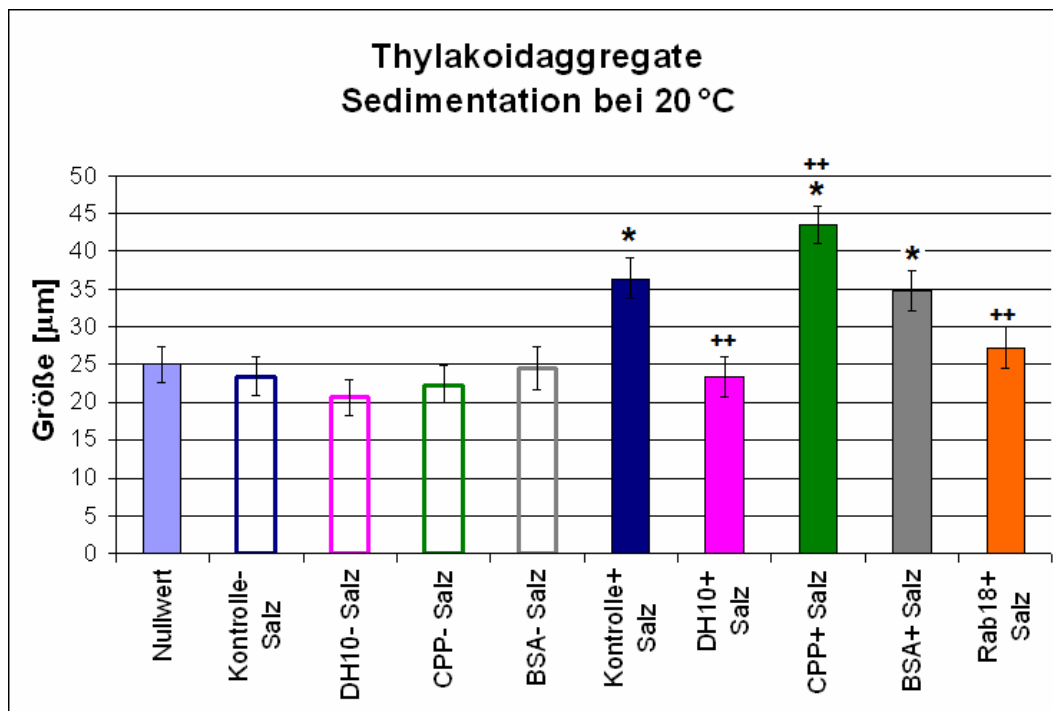


Diagramm 22: Thylakoidaggregate nach einer Sedimentation bei 20 °C, 1 g

Dargestellt ist der Mittelwert (n= 200) der Größen von Thylakoidaggregaten in µm und ihre Standardabweichung nach der Sedimentation. \* = signifikant zum Nullwert und der Kontrolle- Salz, \*\* = signifikant zur Kontrolle + Salz. Untersucht sind die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml, BSA 0,5 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 20 % iger Schutz des Thylakoidvolumens bei einem Frier-Tau-Zyklus gewährleistet wäre. Für Rab18 wurde die maximal erreichbare Konzentration gewählt, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. Die Negativkontrolle BSA erhielt die im Test maximale Proteinkonzentration. Die Thylakoide hatten eine Konzentration von 0,05 mg/ml Chlorophyll. Probenbezeichnung: + Salz: Probe in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharoselösung mit 0,5 mM MnCl<sub>2</sub> und 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, - Salz: Probe in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharoselösung ohne MnCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>

Hier bestätigte sich die Vermutung, dass sich Thylakoidaggregate von Proben ohne Manganchlorid und Calciumchlorid nicht unterscheiden. Bei Proben mit Mangan- und Calciumchlorid zeigte sich, dass die Aggregate mit CPP um 20 % größer waren als die der Kontrolle mit Salz. Rab18 zeigte 25 % kleinere Aggregate. Die Aggregate von DH10 waren sogar

36 % kleiner. BSA hatte, wie auch bei der Sedimentationsgeschwindigkeit, keine Auswirkung auf die Aggregatgröße.

#### 4.4.2 Sedimentation nach einem Frier-Tau-Zyklus

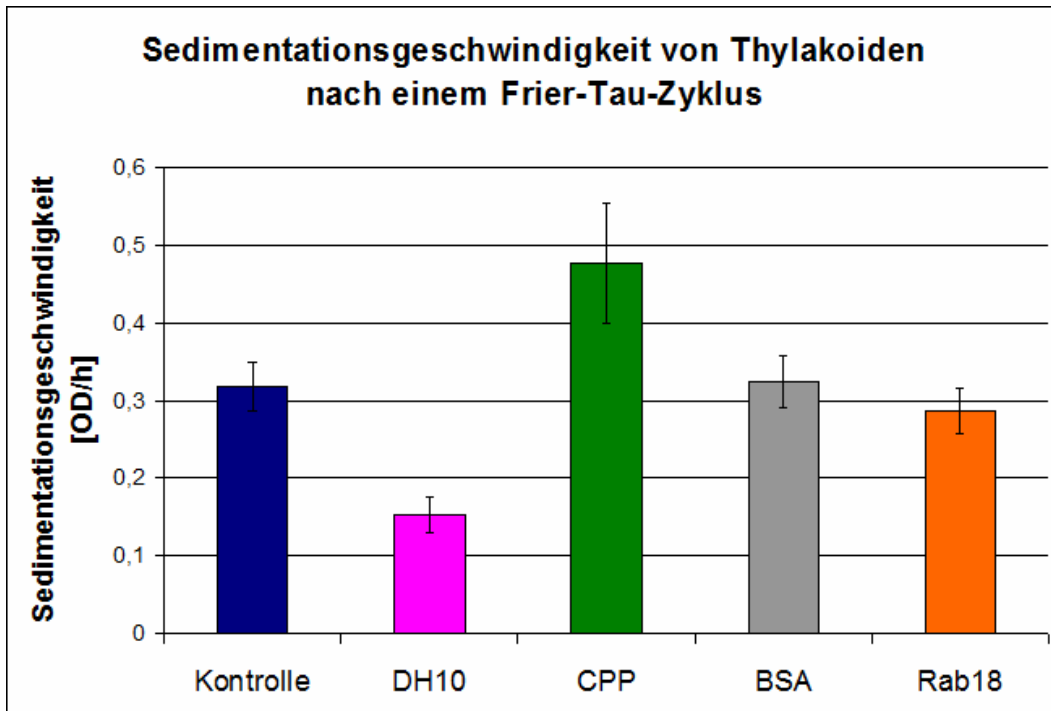


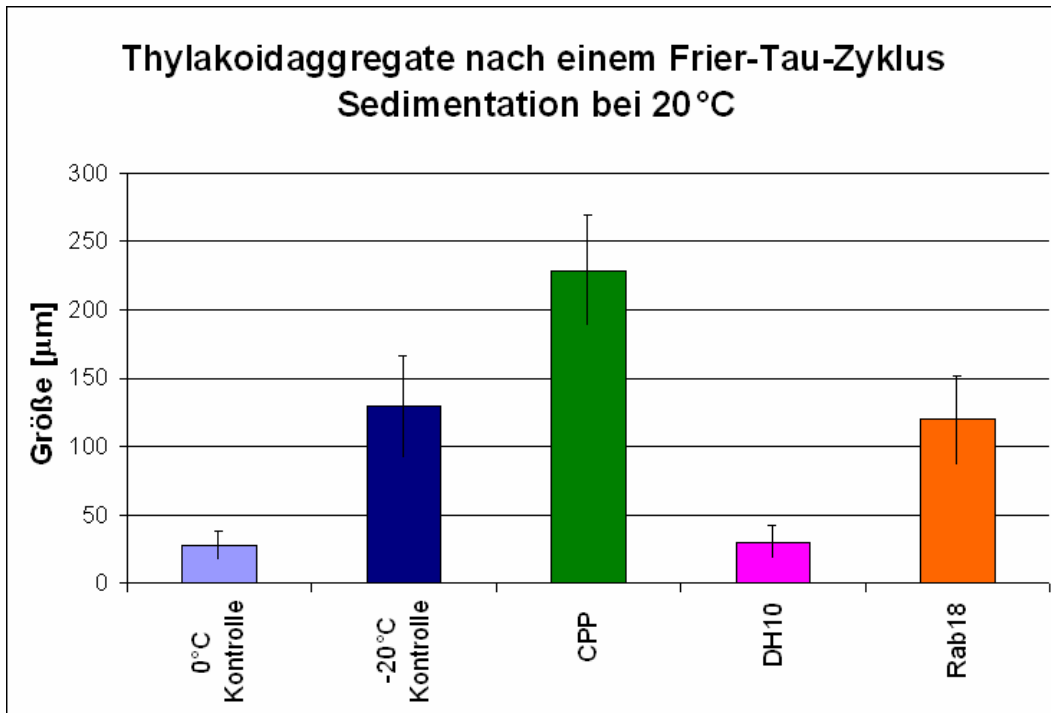
Diagramm 23: Sedimentationsgeschwindigkeit nach einem Frier-Tau-Zyklus

Dargestellt wurde die Sedimentationsgeschwindigkeit als Änderung der Optischen Dichte pro Stunde nach einem Frier-Tau-Zyklus bei 20 °C. Untersucht wurden CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml, BSA 0,5 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 20 %iger Schutz des Thylakoidvolumens bei einem Frier-Tau-Zyklus gewährleistet war. Für Rab18 wurde die maximal erreichbare Konzentration gewählt, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. Die Negativkontrolle BSA erhielt die im Test maximale Proteinkonzentration. Die Thylakoide hatten eine Konzentration von 0,05 mg/ml Chlorophyll. Im Diagramm sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zehn Durchläufen dargestellt.

Statistik: BSA und Rab18 sind im Vergleich zur Kontrolle gleich (0,26, 0,24). DH10 und CPP sind signifikant kleiner, beziehungsweise größer als die Kontrolle. Der t-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen DH10 und Rab18 von 0,044.



Nachdem die Thylakoide einem Frier-Tau-Zyklus unterlagen, wurde die Sedimentation erneut gemessen. Entgegen der Sedimentation bei 0 °C konnte hier keine Aggregationsphase festgestellt werden.



**Diagramm 24: Thylakoidaggregate nach einem Frier-Tau-Zyklus und Sedimentation bei 20 °C, 1 g**

Die Proben wurden für zwei Stunden bei -20 °C inkubiert und nach dem Auftauen bei 20 °C sedimentiert. Zusätzlich zur -20 °C Kontrolle wurde noch eine zweite Kontrolle bei 0 °C inkubiert. Die Thylakoide befanden sich in 2,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharose mit 0,5 mM Manganchlorid und 0,5 mM Calciumchlorid. Untersucht sind die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 20 %iger Schutz des Thylakoidvolumens bei einem Frier-Tau-Zyklus gewährleistet war. Für Rab18 wurde die maximal erreichbare Konzentration gewählt, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. Die Thylakoide hatten eine Konzentration von 0,05 mg/ml Chlorophyll.

Dargestellt ist der Mittelwert (n= 200) der Größen von Thylakoidaggregaten in µm und ihre Standardabweichung nach der Sedimentation.

Die aufgetauten Thylakoide gingen direkt in die Sedimentationsphase über. Daher wurde hier nur die Sedimentationsgeschwindigkeit dargestellt und nicht extra noch einmal die Sedimentationskurve.

In Diagramm 23 fällt als Erstes auf, dass Rab18 und BSA genauso schnell sedimentieren wie die Kontrolle. Thylakoide mit DH10 sind um 32 % langsamer, mit CPP um 82 % schneller als Thylakoide aus der Kontrolle.

Nach dem Frier-Tau-Zyklus zeigten Thylakoideaggregate mit CPP ein um 43 % größeres Volumen als die Kontrolle bei -20 °C. Proben mit DH10 hatten nahezu die gleiche Aggregatgröße wie bei der 0 °C Kontrolle. Rab18 zeigte keine Auswirkung auf die Bildung von Thylakoidaggregaten.

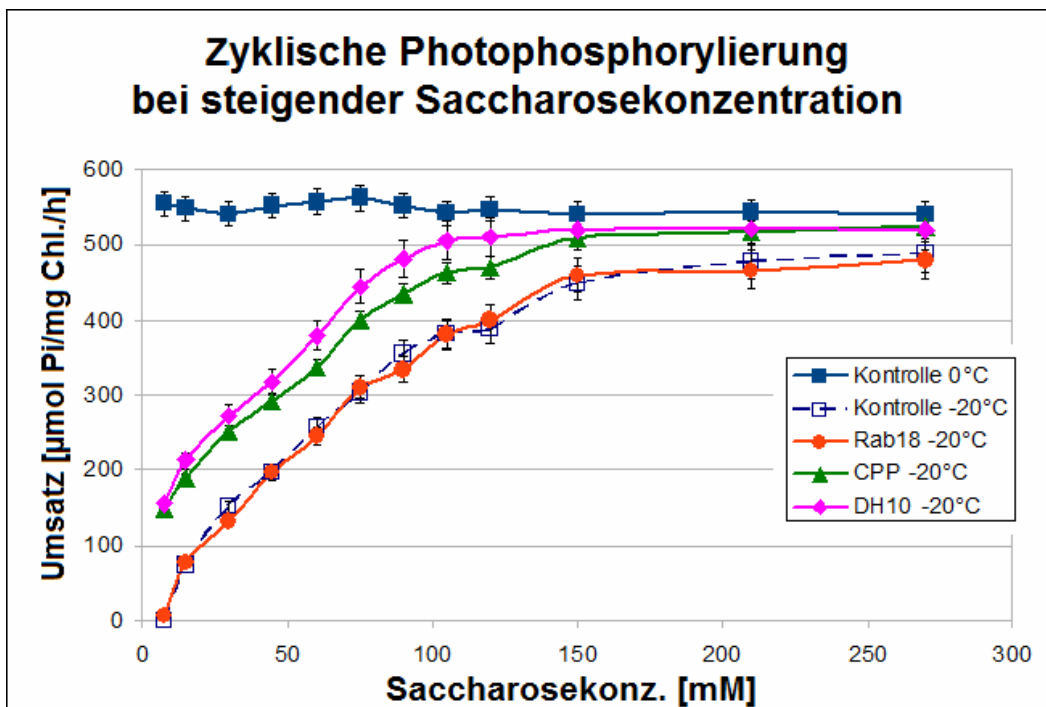
#### **4.5. Zyklische Photophosphorylierung**

Die Photosynthese ist für Pflanzen lebensnotwendig. So ist ihr Schutz unter Stresssituationen überlebenswichtig. Mit Hilfe der Messung der zyklischen Photophosphorylierung konnte der Schutz einer Teilreaktion der Photosynthese *in-vitro* bestimmt werden. Hierbei wurde der Verbrauch an freiem Phosphat durch Bildung von ATP aus ADP gemessen.

##### **4.5.1 Zyklische Photophosphorylierung bei steigender Saccharosekonzentration**

In Diagramm 25 ist die frostschtzende Wirkung der Saccharose auf die zyklische Photophosphorylierung zu sehen. Der maximale Schutz wurde für die Kontrolle zwischen 225 mOsmol/kg erreicht und betrug 85 %. Proben mit Rab18 verhielten sich statistisch identisch mit der Kontrolle.

Proben, denen zusätzlich CPP zugesetzt wurden, erreichten den maximalen Schutz schon bei 190 mOsmol/kg. Er lag, wie bei DH10 bei 94 %. DH10 erreichte diesen Schutz jedoch schon bei 140 mOsmol/kg.



**Diagramm 25: Zyklische Photophosphorylierung bei steigender Saccharosekonzentration**

Dargestellt ist der Umsatz an Phosphat in  $\mu\text{mol}$  pro Stunde und mg Chlorophyll in Abhängigkeit der Saccharosekonzentration.

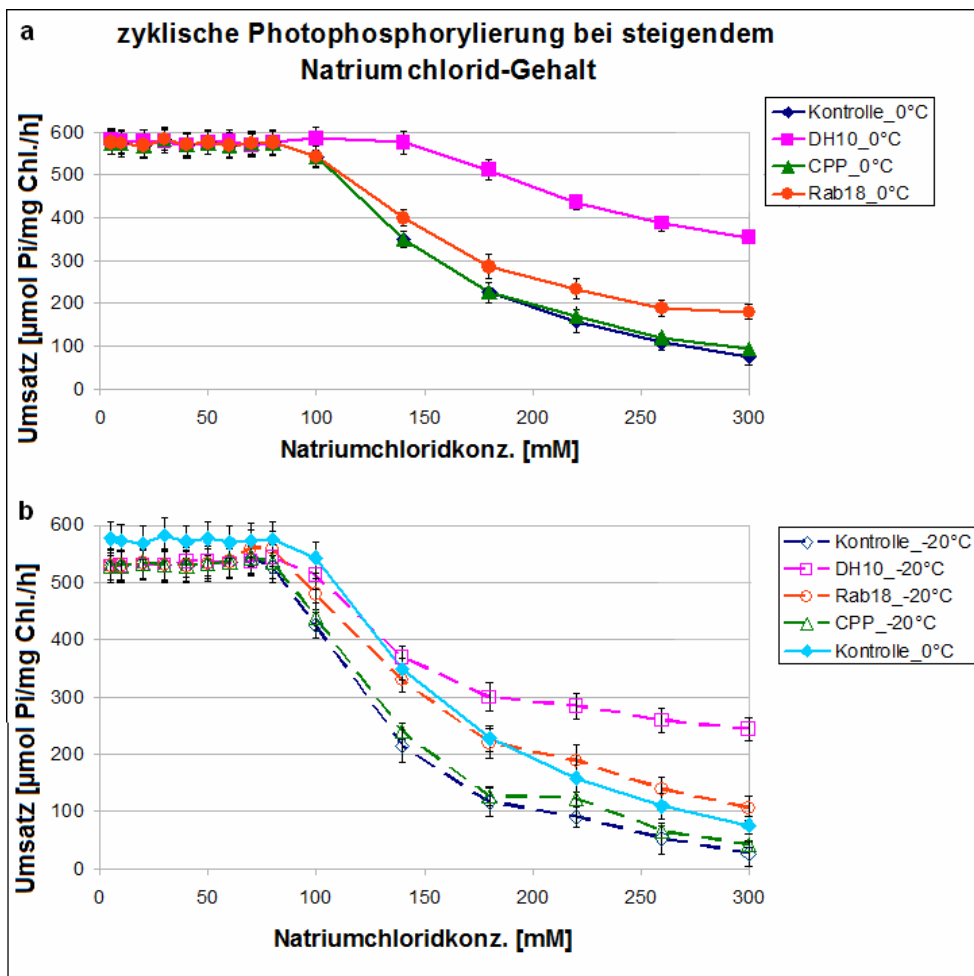
Untersucht wurden CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein bei 0 °C und -20 °C. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 30 %iger Schutz der zyklischen Photophosphorylierung bei einem Frier-Tau-Zyklus unter Standardbedingungen wie bei 4.1.2 gewährleistet wäre. Für Rab18 wurde eine mittlere Konzentration gewählt, da es keinen Frostschutz zeigte. Die Proben wurden in 5 mM NaCl mit 0,5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  und entsprechender Saccharose für zwei Stunden bei -20 °C inkubiert. Neben der -20 °C Kontrolle wurde noch eine zweite Kontrolle bei 0 °C inkubiert. Die Datenpunkte entstanden durch sechsfache Messungen und stellen den Mittelwert und die Standardabweichung dar.

#### 4.5.2 Zyklische Photophosphorylierung bei steigendem Salzgehalt

Wurde nun bei gleich bleibender Saccharosekonzentration und einer steigenden Salzkonzentration die zyklische Photophosphorylierung

betrachtet, so konnte der Schaden, den das Salz verursachte, untersucht werden. Durch die hohe Salinität werden die elektrostatischen Bindungen zwischen den Proteinen und den Lipiden der Membran herabgesetzt. Zusätzlich wird die Löslichkeit der Proteine in der Lösung erhöht, die die Thylakoide umgibt. Bei hohen Salzkonzentrationen wurden also membranständige Proteine aus der Thylakoidmembran gelöst und die Photosynthese-Reaktionskaskade unterbrochen (Hincha und Schmitt, 1985). Das Einfrieren der Proben erhöhte den Salzgehalt im nicht-gefrorenen Restvolumen und somit den chemischen Druck auf die Membran, was den Schaden wiederum verstärkte. Dies ist auch in der Abbildung 6 auf Seite 82 zu sehen. Die Auswirkung auf die zyklische Photophosphorylierung ist im Diagramm 26 zu sehen.

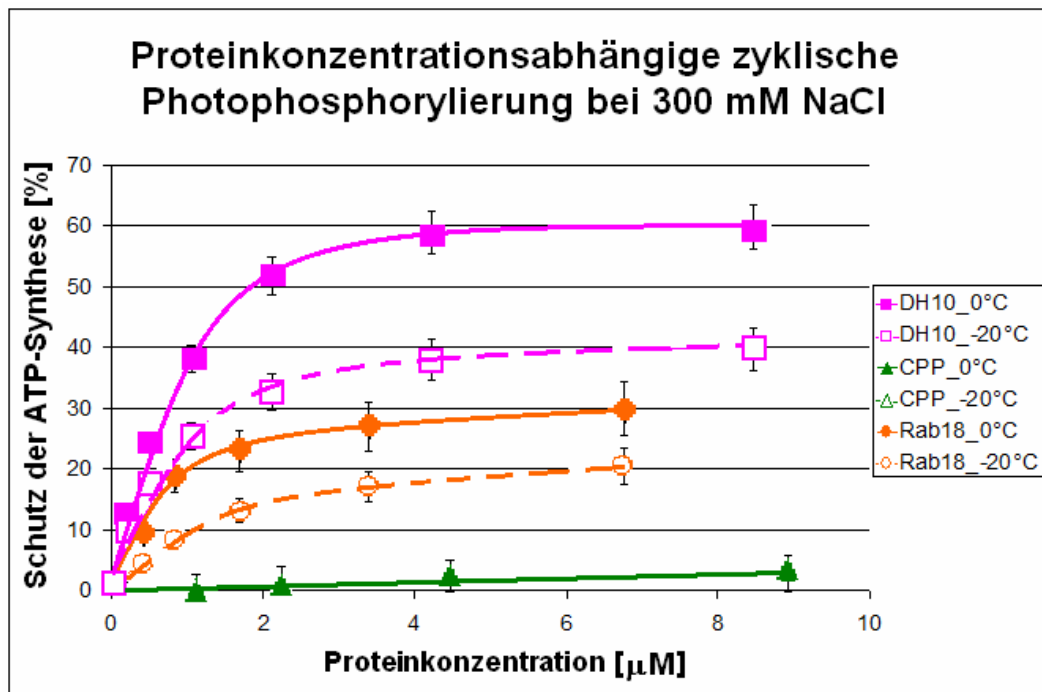
Deutlich ist hier der Unterschied der bei 0 °C (gefüllte Symbole) und der bei -20 °C (leere Symbole) inkubierten Proben zu erkennen. Bei einem Vergleich beider Kontrollen wird der Effekt des Frierens erkennbar. Dieser ist im Vergleich zum Schaden, der durch die hohe Salinität ausgelöst wurde, sehr gering. Die frostschtzende Wirkung des CPP ist durch einen starken Salzschtaden nicht mehr zu erkennen. Allerdings zeigt Rab18 eine Schutzwirkung gegenüber der hohen Salzkonzentration. Die -20 °C Proben lagen bei hohen Salzgehalten genauso hoch, wie die Kontrolle bei 0 °C. Die Werte von Rab18 bei 0 °C lagen deutlich höher. Am eindeutigsten war der Schutz für DH10. Selbst die -20 °C Proben waren bei hoher Salinität besser als die 0 °C-Kontrolle und die 0 °C DH10 Probe lag etwa fünf Mal höher.



**Diagramm 26: Zyklische Photophosphorylierung bei steigendem Natriumchloridgehalt**

Dargestellt ist der Umsatz an Phosphat in Abhängigkeit der Natriumchloridkonzentration. Untersucht wurden die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml und eine Kontrolle ohne Protein bei 0 °C bei -20 °C. Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 30 %iger Schutz der zyklischen Photophosphorylierung unter Standardbedingungen wie bei 4.1.2 gewährleistet wäre. Für Rab18 wurde eine mittlere Konzentration gewählt, da es keinen Frostschutz zeigte. Die Proben wurden in 200 mM Saccharose, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> und der angegebenen Menge Natriumchlorid für zwei Stunden bei -20 °C und 0 °C inkubiert. Die Datenpunkte waren durch sechsfache Messungen entstanden und stellten den Mittelwert und die Standardabweichung dar. Im Diagrammteil a sind die Proben dargestellt, die bei 0 °C inkubiert wurden, in Teil b die Proben der -20 °C-Inkubation.

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde eine Proteinkonzentrationsreihe bei hohem Salzgehalt vermessen. Die Ergebnisse sind in Diagramm 27 zu sehen.



**Diagramm 27: Proteinkonzentrationsabhängige zyklische Photophosphorylierung bei 300 mM Natriumchlorid**

Dargestellt ist der Schutz der ATP-Synthese während der zyklischen Photophosphorylierung unter Einfluss der Proteinkonzentration in µM. Inkubiert wurden die Thylakoide in 300 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharose mit 0,5 mM Manganchlorid und 0,5 mM Calciumchlorid. Als Referenz wurden Thylakoide in 5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Saccharose mit 0,5 mM Manganchlorid und 0,5 mM Calciumchlorid inkubiert.

Die Proben waren sowohl bei -20 °C als auch bei 0 °C für zwei Stunden inkubiert. Die Datenpunkte waren durch sechsfache Messungen entstanden und stellen den Mittelwert und die Standardabweichung dar.

Deutlich ist zu erkennen, dass CPP dem Salzscha den nichts entgegenzusetzen hatte. Rab18 hingegen zeigte sowohl bei gefrorenen als auch ungefrorenen Proben einen maximalen Schutz von etwa 20 % bei 0 °C und 15 % bei -20 °C. DH10 schützte ebenfalls deutlich vor den Salz-

schäden, wobei der Schutz bei Proben nach einem Frier-Tau-Zyklus geringer war. Der maximale Schutz ist bei 4  $\mu\text{M}$  erreicht. Dies war wesentlich früher als beim Schutz des Thylakoidvolumens (siehe Diagramm 12).

#### **4.5.3 Zyklische Photophosphorylierung in einem Puffersystem bei pH 8**

Bislang wurde die Inkubation der Proben ungepuffert durchgeführt. Erst für die zyklische Photophosphorylierung wurde ein Puffersystem eingesetzt. Nun wurden die Proben direkt in dem für die zyklische Photophosphorylierung benötigten Puffer inkubiert. Für die Inkubation wurden lediglich das Phosphat, das ADP und das PMS weggelassen und erst kurz vor der Messung der zyklischen Photophosphorylierungsreaktion zugesetzt.

Bei dieser Versuchsreihe wurde sowohl die Saccharosekonzentration als auch die Natriumchloridkonzentration erhöht, die Ergebnisse sind in Diagramm 28 dargestellt. Bei geringen Osmolalitäten lag der Schaden im Zerreißen der Membran (Hincha, 1985). Hier konnte wieder die Schutzwirkung durch die Saccharose und die beiden Proteine CPP und DH10 erkannt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus Diagramm 25 so ist der Schutzeffekt durch die Proteine etwas geringer ausgeprägt.

Bei hohen Osmolalitäten lagen die Salzeffekte vor, die bei Diagramm 26 besprochen wurden. Auch hier schützten die Proben mit DH10 am besten vor Salzschäden, danach die Proben mit Rab18.

CPP schützte bei hohen Osmolalitäten die Thylakoide nicht.

Ob die Inkubation in einem Puffersystem stattfand oder ungepuffert hatte also kaum Auswirkung auf das Ergebnis.

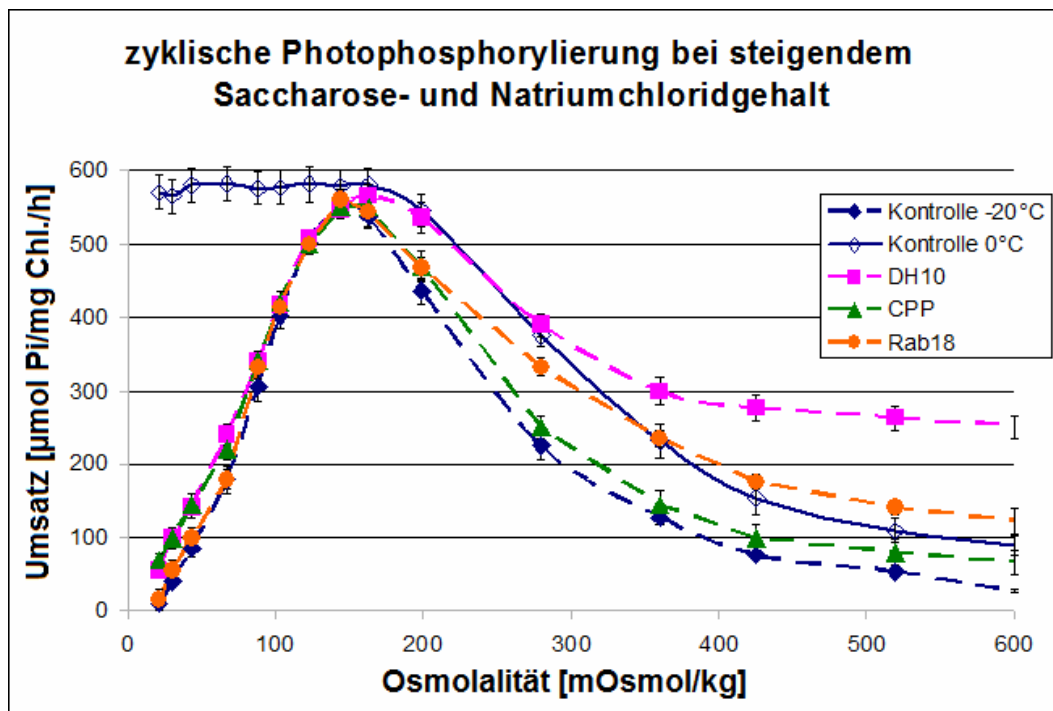


Diagramm 28: Zyklische Photophosphorylierung bei steigendem Saccharose- und Natriumchloridgehalt

Dargestellt ist der Umsatz an Phosphat in Abhängigkeit von der Osmolalität.

Die Erhöhung der Osmolalität wurde durch die Erhöhung der Saccharose- und der Natriumchlorid-Konzentration erreicht. Das Verhältnis Saccharose zu Natriumchlorid war dabei immer 1,5:1. Inkubiert wurde im Reaktionspuffer ohne  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ADP und PMS bei pH 8,0 für zwei Stunden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Zudem wurde eine weitere Kontrolle bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Untersucht wurden die Proteine CPP 0,3 mg/ml, DH10 0,5 mg/ml, Rab18 0,4 mg/ml sowie Kontrollen ohne Protein bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  und  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Die Proteinkonzentrationen für DH10 und CPP wurden so gewählt, dass ein 30 %iger Schutz der zyklischen Photophosphorylierung unter Standardbedingungen wie bei 4.1.2 gewährleistet wäre. Für Rab18 wurde eine Konzentration gewählt, bei der der maximale Salzschutz erreicht wurde. Die Datenpunkte entstanden durch sechsfache Messungen und stellen den Mittelwert und die Standardabweichung dar.



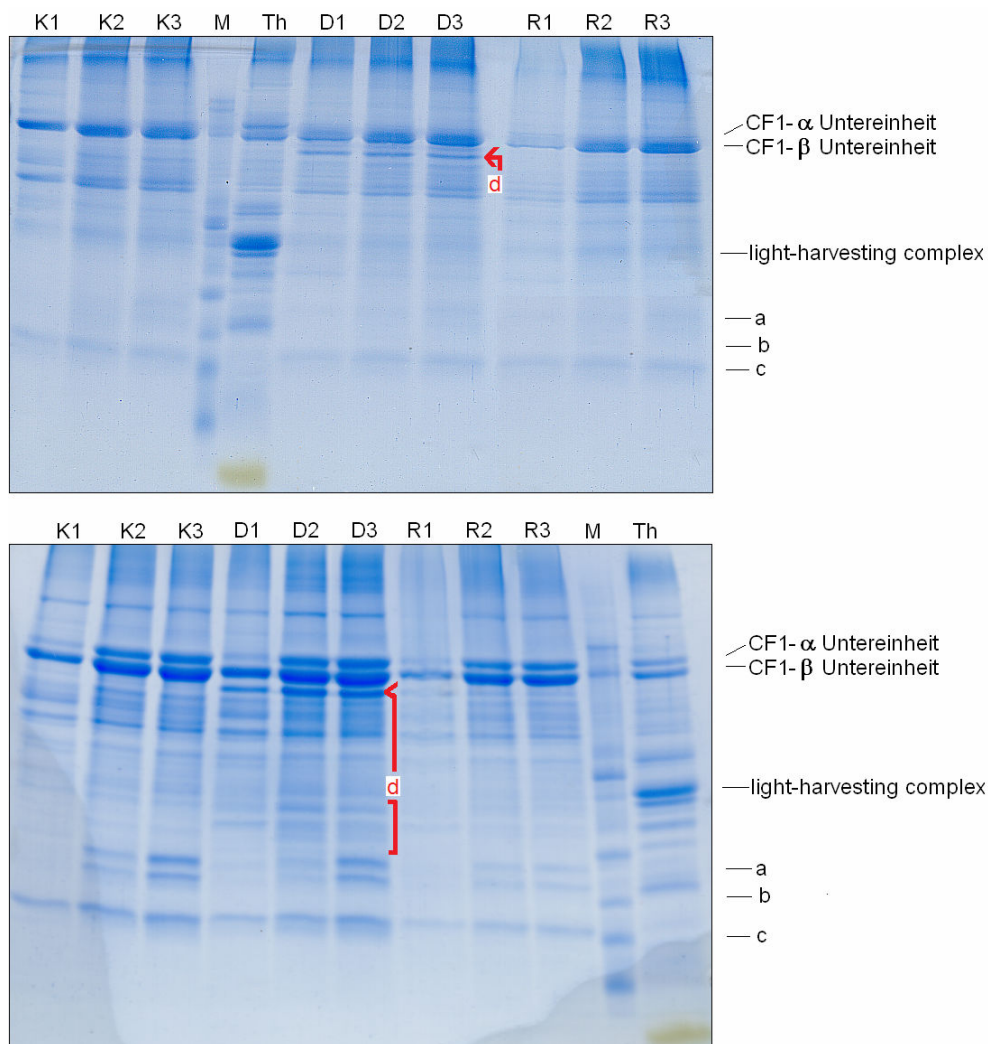
#### **4.6. Proteinverlust aus Thylakoiden durch hohe Salzkonzentrationen und einen Frier-Tau-Zyklus**

Die Erhöhung der Salinität bewirkte den Rückgang der ATP-Synthese während der zyklischen Photophosphorylierung (siehe 4.5.2).

Hincha zeigte, dass mit steigendem Salzgehalt immer mehr Proteine aus der Membran gelöst wurden (Hincha und Schmitt, 1985). Um zu testen, ob DH10 und Rab18 bei steigendem Salzgehalt vor Verlust der Proteine schützen, wurden die Proteine, die bei einer Inkubation mit unterschiedlichen Natriumgehalten verloren gingen, auf ein SDS-Gel aufgetragen. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse zu sehen. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration gingen mehr Proteine verloren.

Während bei geringen Salzkonzentrationen eher die größeren Proteine verloren gingen, gingen bei hohen Salzgehalten auch kleinere Proteine verloren. Dies konnte besonders an dem CF1-Faktor mit seinen großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sowie den kleineren Proteinen, die mit den Buchstaben a-c gekennzeichnet wurden, erkannt werden. Ein Frier-Tau-Zyklus verstärkte diesen Effekt noch einmal. Der light-harvesting-Komplex wurde unter keiner der Bedingungen aus den Thylakoiden gelöst.

D markiert Proteine, die nur in den Proben mit DH10 vorhanden sind. Aufgrund ihrer Lage, könnten es Reste des DH10 und seiner Abbauprodukte sein, die trotz des Waschschrilles im Pellet zurückgehalten wurden. Beim Vergleich der restlichen Banden der Kontrolle mit DH10, konnten keine weiteren Unterschiede gezeigt werden. Thylakoide, welche mit Rab18 behandelt wurden, scheinen weniger Proteine zu verlieren. Besonders deutlich ist das bei den Proben zu sehen, die einem Frier-Tau-Zyklus unterlegen waren. Es könnte jedoch auch sein, dass Rab18 das Ausfallen der Membranproteine während der Hitzefällung vor dem Ausfällen schützt und somit geringere Mengen im Gel zu sehen sind.



**Abbildung 6: Proteinverlust durch hohe Salzkonzentrationen und einen Frier-Tau-Zyklus**

Dargestellt sind Coomassie-gefärbte SDS-Gele. Oben 2 h inkubiert bei 0 °C, unten bei -20 °C.

Die Thylakoide wurden mit jeweils 0,4 mg/ml Protein bei 0 und -20 °C inkubiert. Die Kontrolle enthielt Saccharose mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurden die Thylakoide abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 99 °C 10 min inkubiert, um DH10 und Rab18 der Probe zu entziehen. Die hitzegefällten Proteine wurden nach einem Waschschrift (2,5 mM NaCl, 2,5 mM Saccharose, 0,5 mM Calciumchlorid, 0,5 mM Manganchlorid) in Ladepuffer resuspendiert. Aufgetragen wurden je 10 µl. Probenbezeichnung: K = Kontrolle, D = DH10, R = Rab18, 1 = mit 5 mM NaCl, 2 = 150 mM NaCl, 3 = 300 mM NaCl, M = Marker (kDa: 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 6,5), Th = Thylakoide

## 4.7. Gefrierpunktserniedrigung

Gemessen wurde der Gefrierpunkt mit einem Gefrierpunktsosmometer, wobei 1 Osmol/kg einem Gefrierpunkt von  $-1,858\text{ }^{\circ}\text{C}$  entspricht.

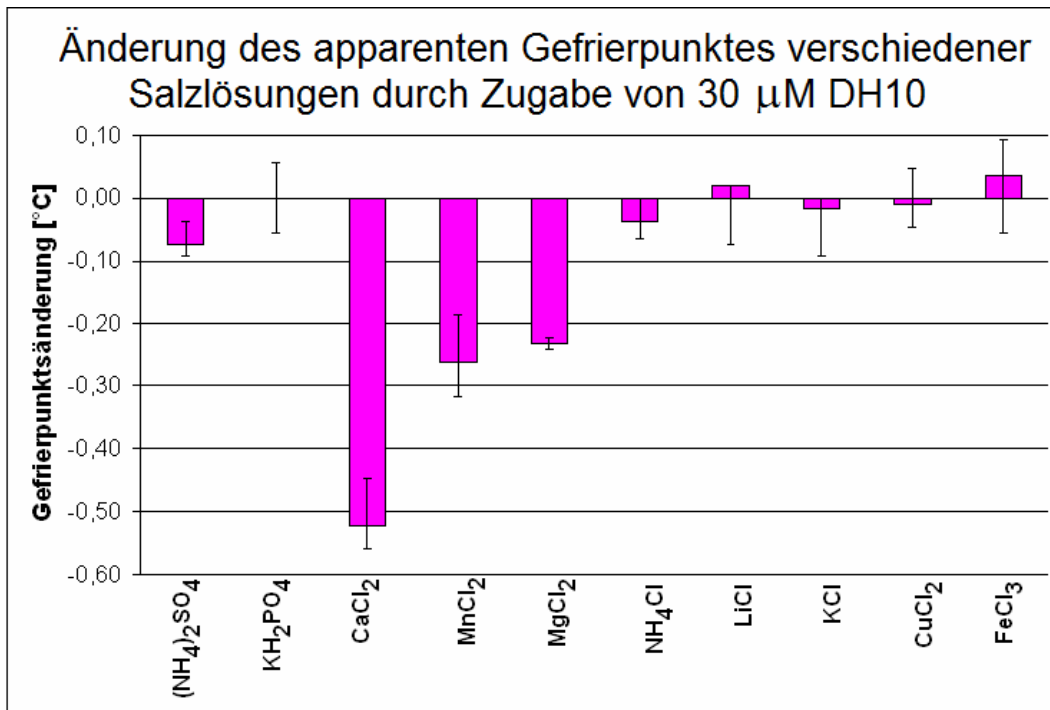
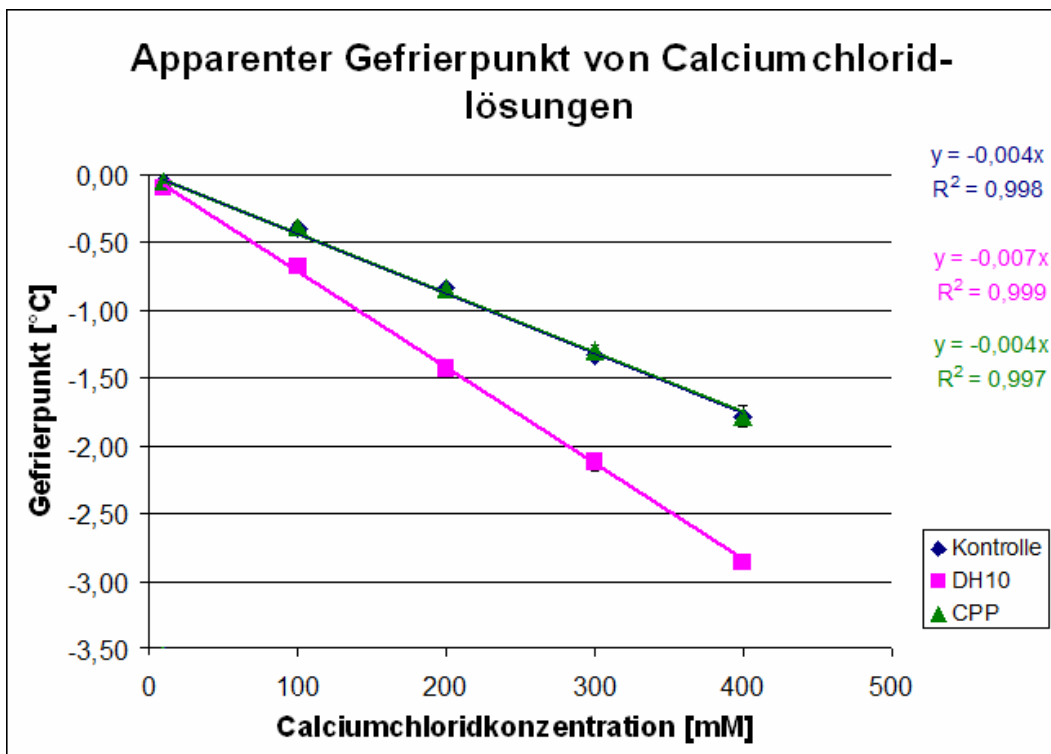


Diagramm 29: Änderung des apparenten Gefrierpunktes verschiedener Salzlösungen durch Zugabe von  $30\text{ }\mu\text{M}$  DH10

Dargestellt sind die Änderungen des Gefrierpunktes von  $400\text{ mM}$  Salzlösungen durch Zugabe von DH10. Die gezeigten Werte stellen den Median und die totale Varianz dar. Sie wurden durch dreifache Bestimmungen ermittelt.

Im Diagramm 29 sind die Änderungen der Gefrierpunkte von verschiedenen Salzlösungen dargestellt, ausgelöst durch die Zugabe von DH10. Man sieht eindeutig, dass bei verschiedenen Salzen verschiedene Gefrierpunktänderungen auftreten. Der größte Effekt zeigt sich bei Calciumchlorid, gefolgt von Mangan- und Magnesiumchlorid. Bei CPP und auch bei BSA ist dieser Effekt nicht zu beobachten.

Da bei Calciumchlorid der größte Effekt zu messen war, wurden die weiteren Versuche nur mit Calciumchlorid durchgeführt.

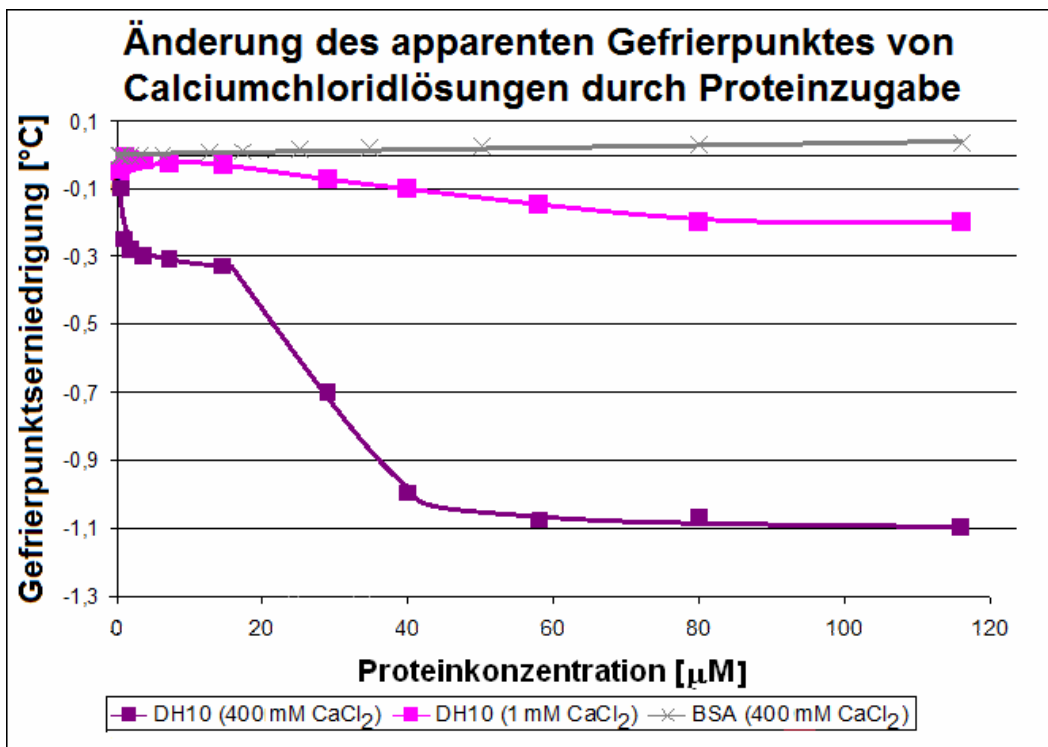


**Diagramm 30: Apparenter Gefrierpunkt von Calciumchloridlösung**

Dargestellt ist der Gefrierpunkt in Abhängigkeit von der Konzentration an Calciumchlorid mit und ohne DH10 und CPP. Gezeigt wird der Effekt der thermischen Hysterese durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Protein. Die Daten wurden durch dreifache Messungen am Halb-mikro-Osmometer 29936 der Firma Knauer erhoben. Sie stellen den Median und seine totale Varianz dar.

In Diagramm 30 ist der apparente Gefrierpunkt verschieden konzentrierter Calciumchlorid-Lösungen dargestellt. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  DH10 wurde der Gefrierpunkt um etwa 55 % herabgesetzt. Bei kleineren Konzentrationen lag der Prozentsatz etwas darunter, bei 400 mM Calciumchlorid etwas oberhalb.

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde die Gefrierpunktsenkung durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an BSA und DH10 gemessen.



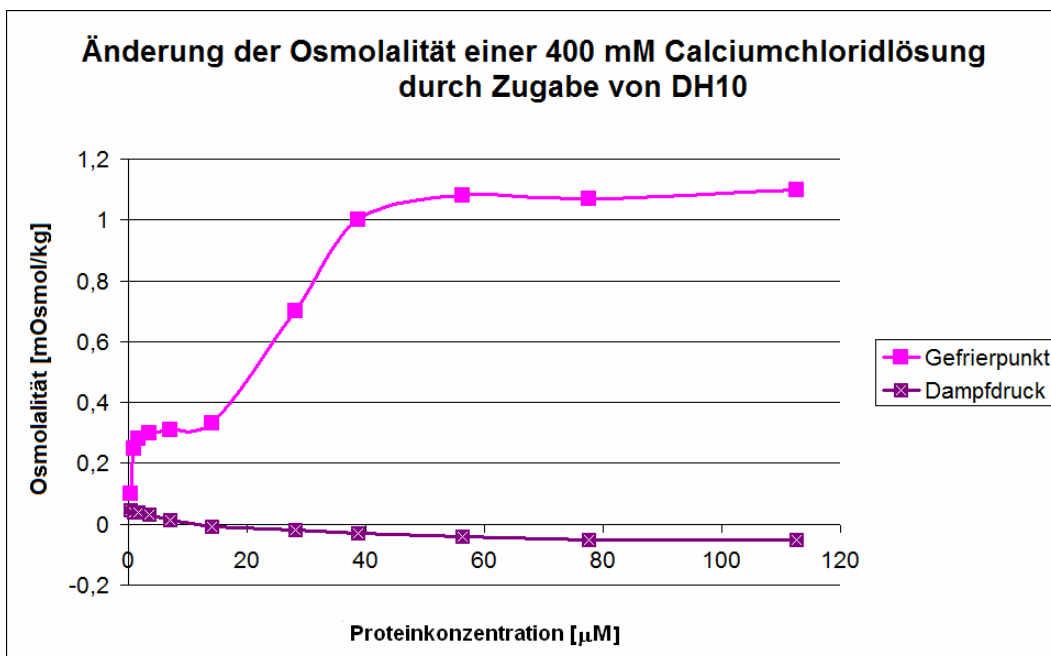
**Diagramm 31: Änderung des apparenten Gefrierpunktes von Calciumchloridlösung durch Proteinzugabe**

Gemessen wurde im Gefrierpunktsmometer Euro Osmo 7400 der Firma Knauer. Dargestellt ist die Änderung des Gefrierpunktes als Funktion der Proteinkonzentration. DH10 und BSA wurden sowohl in einer 5 mM Saccharoselösung mit 1 mM und mit 400 mM Calciumchlorid, BSA nur bei einer Salzkonzentration von 400 mM dargestellt, da hier kein signifikanter Unterschied zur 1 mM Probe bestand. Die Daten wurden durch dreifache Messungen erhoben und stellen den Median und seine totale Varianz dar.

Die Ergebnisse sind im Diagramm 31 zu sehen. Der Zusatz von BSA hatte auf den Gefrierpunkt, sowohl bei geringen als auch bei hohen Calciumchloridkonzentrationen, keine Auswirkung. Beim Zusatz von DH10 zu den Proben mit nur 1 mM Calciumchlorid war eine Änderung des apparenten Gefrierpunktes nach 15 µM DH10 zu sehen. Die maximale Gefrierpunktserniedrigung lag bei -0,2 °C. Bei hohen Calciumchloridkonzentrationen wurde der Effekt durch die Zugabe von DH10 stärker. Bereits durch die Zugabe von 0,9 µM war eine Gefrierpunktserniedrigung von 0,25 °C

erreicht. Bis zur Konzentration von 14  $\mu\text{M}$  sank der Gefrierpunkt lediglich um weitere 0,05  $^{\circ}\text{C}$ . Danach sank der Gefrierpunkt sprunghaft ab. Durch 56  $\mu\text{M}$  DH10 wurde der Gefrierpunkt um 1,08  $^{\circ}\text{C}$  erniedrigt und erreichte ein weiteres Plateau.

Da die Temperatur nicht direkt angegeben wurde, sondern indirekt über die Osmolalität, hätte die Erhöhung der Osmolalität durch den Protein-zusatz das Ergebnis beeinflussen können. Um dieses zu überprüfen, wurde die Osmolalität erneut mit einem Dampfdruckosmometer gemessen.



**Diagramm 32: Änderung der Osmolalität einer 400 mM Calciumchloridlösung durch Zugabe von DH10**

Gemessen wurde im Dampfdruckosmometer K-7000 und im Gefrierpunktsosmometer Euro Osmo 7400 der Firma Knauer. Dargestellt ist die Änderung des Gefrierpunktes als Funktion der Proteinkonzentration.

Die Daten wurden durch dreifache Messungen erhoben und stellen den Median und seine totale Varianz dar. Die Fehlerbalken sind kleiner als die dargestellten Symbole.

Wurde die Osmolalitätsänderung aus dem Dampfdruck-osmometer mit der aus dem Gefrierpunktsosmometer verglichen (Diagramm 32), so war die Änderung im Dampfdruckosmometer sehr gering und betrug maximal 0,05. Der geringe Unterschied der Osmolalität im Dampfdruckosmometer und die Tatsache dass der Effekt gegensätzlich zum Effekt im Gefrierpunktsosmometer war, ließ vermuten, dass es sich bei DH10 tatsächlich um ein Gefrierpunkts-erniedrigendes Protein handelt.

## **4.8. Interaktion mit Salz**

Um die Osmolalitätseffekte genauer zu untersuchen, wurden die Proben auf ihren Gehalt an Calcium hin untersucht. Hierbei war eine Anomalie aufgetreten, die in diesem Kapitel näher besprochen wird.

### **4.8.1 Analyse des Calciums in den verwendeten Proben**

Die Messung der Osmolalität der Lösungen ergab eine erhöhte Osmolalität bei Proben mit DH10 ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  (Tabelle 2). Daraus konnte eine Gefrierpunktserniedrigung errechnet werden, wie sie auch in Diagramm 31 gezeigt ist.

Dieser thermische Hysterese Effekt war bei den Proben mit BSA, CPP und Rab18 nicht zu erkennen. Bei der Leitfähigkeit der Lösungen war ein geringfügig erhöhtes Ergebnis bei den Proben mit DH10 und Rab18 zu sehen. Durch Zugabe der Proteine BSA und CPP wurden dieselben Leitfähigkeiten erzielt wie bei der Kontrolle.

Die Messung des Calciumgehaltes durch eine Titration mit EDTA zeigte, dass in den Proben jeweils die gleiche Menge an Calcium vorhanden war. Erstaunlich dagegen waren die Ergebnisse der Calciumsulfat-Fällung. Hier waren erheblich niedrigere Calcium-Mengen in Proben mit DH10 nachweisbar. Bei einer DH10-Konzentration von 14  $\mu\text{M}$  fiel der gemessene Calcium-Gehalt auf 11 mM. Erst bei einer Verdünnung des DH10 auf 1  $\mu\text{M}$  wurden die gleichen Mengen Calciumsulfat gefällt.

**Tabelle 2: Analyse einer 400 mM Calciumchloridlösung**

**Analysiert wurden 400 mM Calciumchlorid-Lösungen mit 5 mM Saccharose und 1 mM Manganchlorid. Die im Test verwendeten Proteine und die eingesetzten Mengen sind in der Tabelle angegeben. Die Kontrolle beinhaltet 5 mM Saccharose und 1 mM Manganchlorid und 400 mM Calciumchlorid.**

**Zuerst wurden die Leitfähigkeit und die Osmolalität gemessen. Aus der Osmolalität wurde die Gefrierpunkterniedrigung, bezogen auf die Kontrolle, berechnet. Der Calciumgehalt wurde über eine EDTA-Titration bestimmt. Zusätzlich wurde ein Teil der Lösung 1:1 mit Ammoniumsulfat versetzt, um die Menge an Calcium über die Fällung von Calciumsulfat zu bestimmen. Als Letztes wurde die Probe zur Analyse der Chlorid-Ionen mit Silbernitrat versetzt und Silberchlorid ausgefällt. Die Mengen an Calciumsulfat und Silberchlorid wurden gravimetrisch bestimmt. Eingetragen sind der Median und seine totalen Varianzen (grau) aus Dreifachbestimmungen.**

Probe	Osmolalität [mOsmol/kg]	Gefrierpunkts-erniedrigung [°C]	Leitfähigkeit [mS/cm]	CaSO <sub>4</sub> -Fällung [mM]	Ca-EDTA-Titration [mM]	AgCl-Fällung [mM]
DH10 14µM	1051 +/- 20	-0,23 +/- 0,04	0,76 +0,03 -0,01	11 +8 -5	399 +/- 8	40 +15 -20
DH10 7µM	1012 +20 -15	-0,15 +0,04 -0,03	0,78 +0,02 -0,04	83 +10 -8	398 +5 -10	62 +30 -25
DH10 3µM	1007 +10 -20	-0,14 +0,02 -0,04	0,75 +/-0,02	100 +15 -9	400 +8 -10	96 +20 - 35
DH10 2µM	987 +15 -20	-0,11 +0,03 -0,04	0,78 +0,01 -0,03	163 +20 -17	402 +4 -8	128 +40 -52
DH10 1µM	915 +10 -15	+0,03 +0,02 -0,03	0,70 +0,01 -0,03	217 +/-15	399 +5 -4	141 +60 -47
Kontrolle	929 +/-15	0 +/- 0,03	0,68 +0,00 -0,02	236 +20 -26	400 +5 -8	139 +55 -49
BSA 58µM	905 +25 -17	+0,02 +0,05 -0,03	0,69 +/-0,02	221 +/- 20	400 +/- 6	140 +50 -63
CPP 50µM	910 +15 -20	+0,01 +0,03 -0,04	0,69 +0,03 -0,02	211 +22 -18	402 +4 -8	137 +/- 55
Rab18 22µM	917 +/-20	0 +/- 0,04	0,74 +0,01 -0,00	190 +25 -15	397 +8 -10	120 +60 -39



Bei den Ergebnissen der Silberchlorid-Fällung war der hohe Fehler von bis zu 60 % auffällig. Dies zeigte, dass dieser Test als quantitative Analyse ungeeignet war.

Jedoch war auch hier derselbe Trend zu sehen wie bei Calciumchlorid. Bei den höheren Konzentrationen an DH10 fiel kaum Silberchlorid aus. Im folgenden Kapitel wird die Calciumsulfat-Fällung noch näher betrachtet.

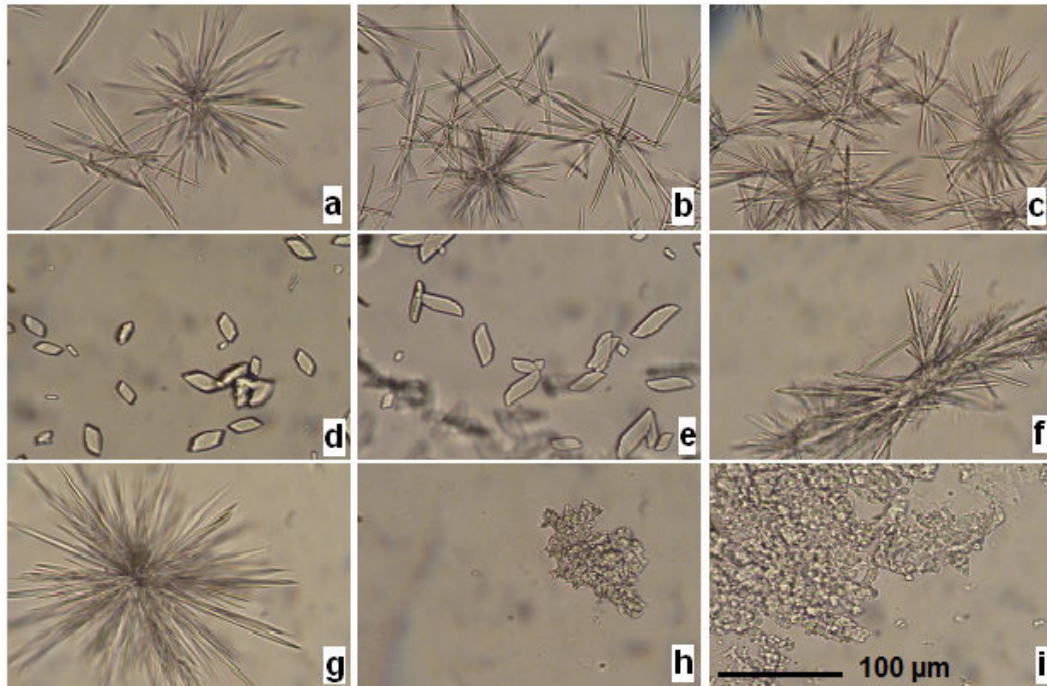
#### 4.8.1 Calciumsulfat-Fällung

Bei der Bildung von Calciumsulfat entstehen ganz typische Kristallstrukturen, die so genannten Kalknadeln. Da in den vorhergegangenen Versuchen mit Calciumsulfat und DH10 eine geringere Calciumsulfatmenge zu sehen war, wurde das Calcium im Beisein von verschiedenen Proteinen erneut mit Ammoniumsulfat als Calciumsulfat gefällt. Die entstandenen Kalknadeln wurden mikroskopiert. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 7 gezeigt.

Bild a zeigt die typischen Kalknadeln der Kontrolle. b zeigt die Calciumsulfat-Kristalle, die im Beisein von 14  $\mu\text{M}$  CPP gefällt wurden. Hier und auch in c, wo dem Calcium vor der Fällung 14  $\mu\text{M}$  Rab18 zugesetzt worden sind, waren die typischen Kalknadeln entstanden.

Die Proben d-g zeigen die Calciumsulfat-Kristalle, die sich im Beisein von unterschiedlichen Konzentrationen von DH10 gebildet hatten. Hier zeigte sich deutlich, dass bei 14  $\mu\text{M}$  und 7  $\mu\text{M}$  DH10 kleine Romboeder mit abgerundeten Ecken entstanden. Bei 2  $\mu\text{M}$  entstanden Kalknadeln mit abgerundeten Spitzen. Erst bei einer Proteinmenge von 1  $\mu\text{M}$  waren die typischen Kalknadeln zu sehen. Durch einen vollständigen tryptischen Verdau von DH10 war die Calciumsulfat-Anomalie nicht mehr zu sehen.

In Bild h ist das hitzestabile Protein aus *E.coli* zu sehen, welches von 400 mM Calcium ausgefällt wurde. Zum Vergleich dazu Bild i, Ammoniumsulfat gefälltes DH10.



**Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Calciumsulfat-Kristallen**

Alle Proben enthielten 5 mM Saccharose, 1 mM Manganchlorid und 400 mM Calciumchlorid mit und ohne Protein. Gefällt wurde das Calcium mit 400 mM Ammoniumsulfat. Zu sehen sind a) Kontrolle, b) mit 14 µM CPP, c) 14 µM Rab18, d) 14 µM DH10, e) 7 µM DH10, f) 2 µM DH10, g) 1 µM DH10, h) M15\_leer, i) DH10 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gefällt

#### 4.8.2 Ruthenium-Rot-Färbung

„Ruthenium-Rot bindet selektiv an den intramolekularen Raum zwischen den Carboxylgruppen“<sup>3</sup>. Je nach Protein ist die Bindungsstärke unterschiedlich. Das Ruthenium-Rot wird durch das an das Protein bindende Kation verdrängt. In Abbildung 8 sind die Scans der Proteinblots nach einem Waschschrift in den genannten Salzlösungen gezeigt. Natriumchlorid entfärbte die Proteine nicht. Calcium-, Magnesium- und Manganchlorid entfärbten sämtliche Proteine. Kaliumchlorid entfärbte nur DH10 und Rab18, Ammoniumchlorid nur DH10.

<sup>3</sup> AppliChem GmbH, Produktinformation 2011

In dem Diagramm 33 sind die Absorptionswerte des Ruthenium-Rot in den Entfärbelösungen nach der Entfärbung dargestellt.

	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	KCl	MgCl <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl
CPP						
DH10						
Rab18						
BSA						
OvA						

**Abbildung 8: Entfärbung von Ruthenium-Rot-gefärbten Proteinen**

Dargestellt sind die Dotblots nach einem Färbe- und Entfärbeschritt. Eingefärbt wurden 50 µg Protein. Entfärbt wurden die Proteine mit einer 100 mM Salzlösung der angegebenen Salze. Untersuchte Proteine: CPP, DH10, Rab18, BSA und Ovalbumin (OvA).

Anhand der Dotblots konnte gezeigt werden, dass die Proteine durch Natriumchlorid nicht entfärbt werden. Jedoch wurde der Hintergrund von Restfarbe entfärbt. Dies gab ein kleines Signal bei der Messung der Absorption.

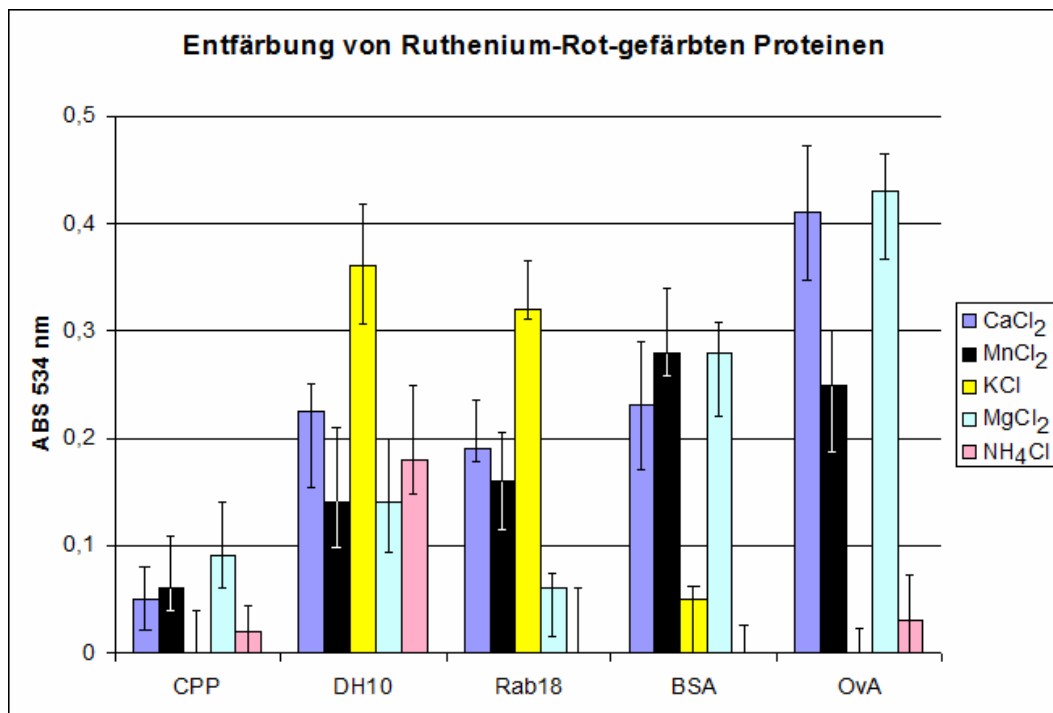
Alle untersuchten Proteine wurden durch Calcium-, Magnesium- und Manganchlorid entfärbt. Das DH10 wurde zudem auch durch Kaliumchlorid und Ammoniumchlorid entfärbt. Rab18 entfärbt sich zusätzlich bei Kaliumchlorid.

Die Stärke der Entfärbung eines Proteins durch ein bestimmtes Salz lässt sich leichter am Diagramm ablesen.

CPP wurde am besten von Magnesium-, gefolgt von Mangan- und Calciumchlorid entfärbt.

DH10 hatte die größte Bindungsaffinität zu Kalium, gefolgt von Calcium, Ammonium, Mangan und Magnesium.

Bei Rab18 war die Reihenfolge: Kalium, Calcium, Mangan, Magnesium und Ammonium.



**Diagramm 33: Entfärbung von Ruthenium-Rot-eingefärbten Proteinen**

Dargestellt ist die Absorption von Ruthenium-Rot in den Entfärbelösungen. Eingefärbt wurden 50 µg Protein. Entfärbt wurden die Proteine mit einer 100 mM Salzlösung der angegebenen Salze. Anschließend wurde die Absorption der Entfärbelösungen bei 534 nm vermessen. Untersuchte Proteine: CPP, DH10, Rab18, BSA und Ovalbumin (Ova). Aufgetragen sind der Median und seine totale Varianz einer Dreifachmessung.

Ein Vergleich der Entfärbung verschiedener Proteine, bezogen auf ein bestimmtes Salz, war nicht möglich. Die Proteine wurden unterschiedlich stark eingefärbt, so dass die Stärke des Absorptionssignals unterschiedlicher Proben nicht vergleichbar war.

Es waren DH10 und Rab18 am stärksten eingefärbt, BSA und Ovalbumin färbten sich erst etwas später und nicht ganz so intensiv. CPP ließ sich nur einfärben, wenn das Ruthenium-Rot im Puffer vorlag, BSA und Ovalbumin nur, wenn der Farbstoff in Wasser vorlag. Dies machte eine zweistufige Färbung, erst mit Ruthenium-Rot in Puffer und dann in Wasser nötig, um sowohl die Dehydrine als auch die Vergleichsproteine einzufärben.

Es konnte beobachtet werden, dass Proben mit DH10 nur schwer auf der Membran trockneten. Wo Proben mit den anderen Proteinen nach einer halben Stunde an Vakuum getrocknet waren, mussten für DH10 zwei Stunden angesetzt werden.

#### **4.9. Messung des apparenten Molekulargewichts von DH10**

Mit Hilfe der Gelfiltration und Vergleichsproteine mit bekanntem Molekulargewicht ist es möglich das Molekulargewicht eines Proteins zu bestimmen. Jedoch muss beachtet werden, dass die Sekundärstruktur die Elutionszeit beeinflusst. So erscheint ein von der Sequenz gleichgroßer Moleküle, welches eine stark gepackte Form aufweist kleiner als ein Protein, welches hauptsächlich als random-coil vorliegt.

In diesem Fall wurde ein Proteingemisch aus je 100 µg BSA (69 kDa), OvAlbumin (45 kDa), Trypsin-Inhibitor (22 kDa) und Myoglobin (17 kDa) verwendet.

Das apparente Molekulargewicht von DH10 ohne Salz lag bei 30 kDa. Laut Sequenz hat das DH10 ein Molekulargewicht von 29,5 kDa (Svensson, 2000). Das apparente Molekulargewicht von DH10, welches vor dem Auftragen in 900 mM Calciumchlorid inkubiert wurde, betrug 20 kDa. Da das Calcium zur gleichen Zeit detektiert werden konnte wie das Protein, ließ sich vermuten, dass das Calcium an das Protein gebunden hatte. Insgesamt wurde 890 µMol Calcium in den einzelnen Fraktionen detektiert. Bei einem durchschnittlichen Fehler von 5 % konnte demnach

das gesamte Calcium in Fraktionen nachgewiesen werden, in denen auch das Protein zu finden war.

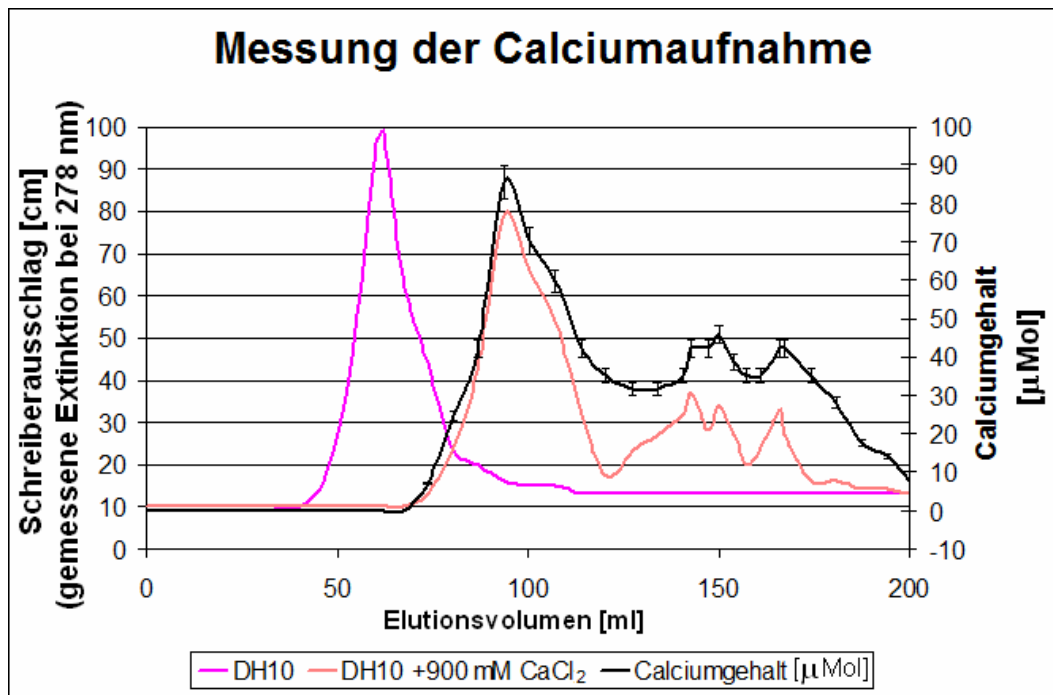


Diagramm 34: Messung des apparenten Molekulargewichts

Dargestellt ist der Verlauf der Gelchromatographie von DH10. Das Bett bestand aus Fraktogel TSK HW50 (80 cm x 1 cm), das Elutionsmittel war 50 mM Tris bei pH 8 (eingestellt mit HCl). Damit handelte es sich um eine Größenausschlusschromatographie. Aufgetragen wurden 200 µg Protein, einmal in 1 ml Wasser (DH10) und einmal in 1 ml 900 mM Calciumchlorid-Lösung (DH10+900 µMol CaCl<sub>2</sub>). Es wurden 6 ml Fraktionen gesammelt und als Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gelbild der einzelnen Fraktionen wies nur die Banden für DH10 und seine Abbauprodukte auf. Für den Durchgang mit Calciumchlorid wurde zusätzlich der Calciumgehalt in der Probe gemessen. Die Ergebnisse sind im Diagramm rot dargestellt.

Da das Protein das Calcium anscheinend gebunden hatte, wurde versucht, die Bindung näher zu betrachten. Hierzu wurde dem Laufmittel Calcium-chlorid zugesetzt um zu beobachten, ob und wie viel Calcium vom DH10 aufgenommen wurde. Das Ergebnis ist in Diagramm 35 dargestellt.

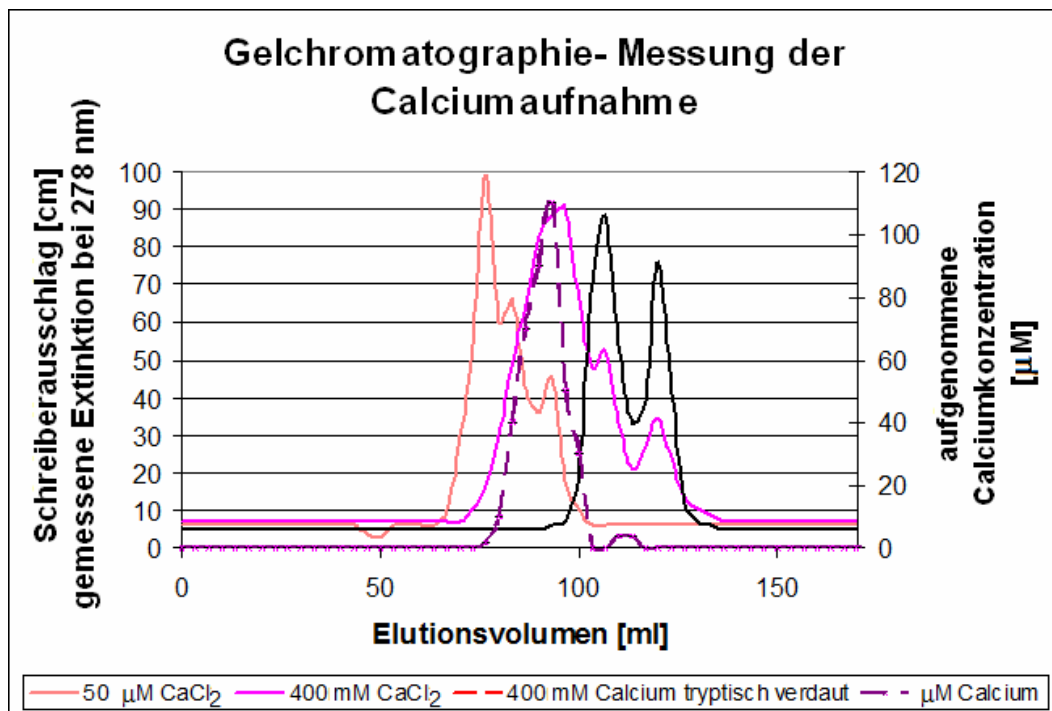


Diagramm 35: Gelchromatographie-Messung der Calciumaufnahme

Dargestellt ist der Verlauf der Gelchromatographie von DH10. Das Bett bestand aus Fraktogel TSK HW50 (80 cm x1 cm), das Elutionsmittel war 50 mM Tris bei pH 8 (eingestellt mit HCl), einmal mit 50 µM CaCl<sub>2</sub> (50 µM CaCl<sub>2</sub>), das andere Mal mit 400 mM CaCl<sub>2</sub> (400 mM CaCl<sub>2</sub>). Für die Durchläufe 50 µM CaCl<sub>2</sub> und 400 mM CaCl<sub>2</sub> wurden 200 µg Protein aufgetragen.

Für den Durchlauf 400 mM CaCl<sub>2</sub> tryptisch verdaut, wurde das DH10 zuerst mit Trypsin verdaut, so dass nur noch seine Abbau-Produkte vorhanden waren. Diese wurden dann mit 400 mM CaCl<sub>2</sub> im Elutionspuffer der Gelchromatographie unterzogen. Der Erfolg des Verdaus wurde vorab über ein SDS-Gel überprüft.

Es wurden je 6 ml Fraktionen gesammelt und der Calciumgehalt bestimmt. Dargestellt sind der Schreiberausschlag, welcher das Protein anzeigte und das durch das Protein zusätzlich eingetragene Calcium in den Fraktionen. Jeder Punkt repräsentiert den Median mit seiner totalen Varianz, ermittelt durch Dreifachbestimmungen.

Wurde der zusätzliche Eintrag an Calcium in den einzelnen Fraktionen betrachtet, so konnte erkannt werden, dass unter 50 µM Calciumchlorid im Laufmittel kein Calcium durch das Protein aufgenommen wurde. Bei

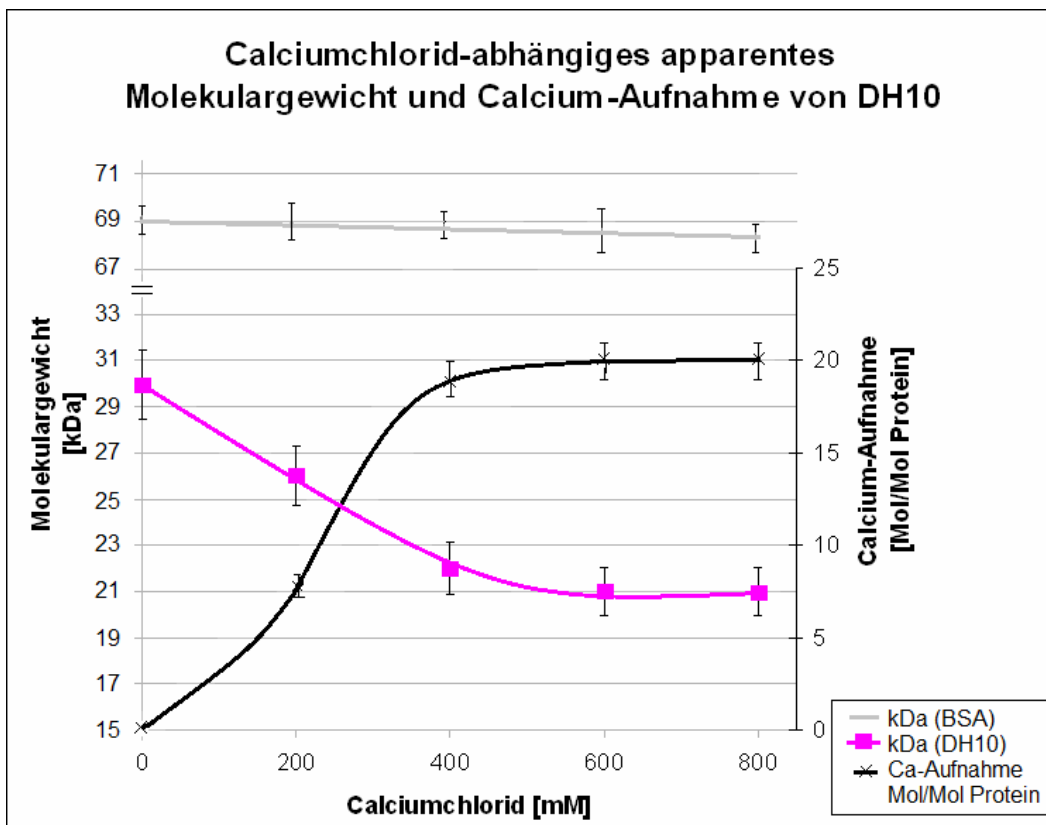
einem Calciumchloridgehalt von 400 mM im Laufmittel wurde Calcium vom Protein aufgenommen und ist als zusätzlich aufgenommenes Calcium im Diagramm 35 zu sehen. Zur Calciumaufnahme schienen nur das intakte Protein und nicht die Abbauprodukte in der Lage zu sein. Um dies zu kontrollieren, wurde zusätzlich eine Proteinprobe auf die Säule aufgetragen, welche zuvor mit Trypsin behandelt worden war. Eine Kontrolle auf dem SDS-Gel zeigte, dass kein intaktes Protein mehr vorhanden war. Durch das abgebaute Protein war bei einer Elution mit 400 mM Calciumchlorid keine Calciumaufnahme zu beobachten.

In Diagramm 34 sowie in Diagramm 35 ist zu sehen, dass das gemessene Molekulargewicht von DH10 von dem Calciumgehalt abzuhängen scheint. Je höher die Calciumchloridkonzentration, desto kleiner erscheint das Protein. Daher wurden weitere Gelchromatographien durchgeführt. Bei diesen Chromatographien wurden der Elutionslösung Calciumchlorid zugesetzt.

In Diagramm 36 ist die apparente Proteingröße und die Calciumaufnahme über die Calciumchloridkonzentrationen dargestellt.

Deutlich wird gezeigt, dass das Molekulargewicht absinkt, während die Calciumaufnahme steigt. Die Aufnahme von Calcium durch DH10 erreicht bei 20 Mol pro Mol DH10 das Maximum. Eine Erhöhung der Calciumkonzentration bewirkt keine weitere Aufnahme. So wird auch ein minimales Molekulargewicht von 20 kDa erreicht und kann auch durch weitere Erhöhung der Salzkonzentration nicht weiter verringert werden.





**Diagramm 36: Calciumchlorid-abhängiges apparentes Molekulargewicht und Calcium-Aufnahme von DH10**

Auf der linken y-Achse ist das Molekulargewicht von DH10 in kDa, auf der rechten y-Achse ist die Calciumaufnahme in Mol  $\text{Ca}^{2+}$  pro Mol Protein aufgetragen. Die x-Achse zeigt die zum Elutionsmittel (50 mM Tris, pH 8, eingestellt mit HCl) zugesetzte Calciumchloridkonzentration in mM. Die dargestellten Werte beziehen sich zum Teil auf die in Diagramm 34 und Diagramm 35 dargestellten Ergebnisse. Es wurden 200  $\mu\text{g}$  DH10 und BSA auf die Fraktogel TSK HW50-Säule (80 cm x 1 cm) aufgetragen. Dargestellt sind der Median und die Varianz einer Dreifachbestimmung.

## 5. Diskussion - Fermentation und Aufreinigung

Es gelang durch den Einsatz des 10 L Fermenters der Firma Bio-Mag das Fermentationsvolumen pro Durchlauf von 1,6 L auf 6 L zu erhöhen. Zudem war es möglich die Fermentationszeit zu verringern und dadurch den Abbau des Zielproteins zu reduzieren (Diagramm 2).

Nach Anpassung der Aufreinigung war es so möglich, aus 6 L Fermentationsvolumen durchschnittlich 120 mg DH10 in einer Endkonzentration von 4 mg/ml, sowie 63 mg Rab18 mit einer Endkonzentration 2,1 mg/ml aufzureinigen (Abbildung 3).

Die Aufreinigung musste nicht nur hinsichtlich des erhöhten Volumens angepasst werden, sondern auch hinsichtlich der Aufkonzentrierung und Lagerung.

Wie sich zeigte, konnte das Ammoniumsulfat nicht ausreichend vom DH10 abgetrennt werden, so dass es die Funktionsanalyse beeinflusste (Diagramm 6, Diagramm 7, Diagramm 9).

Mehrere Gründe könnten für den apparenten Frostschutz des Thylakoidvolumens durch das Ammoniumsulfat vorliegen:

Möglichkeit 1: das Ammoniumsulfat senkte den Gefrierpunkt, wodurch bei gleicher Inkubationstemperatur das nicht gefrorene Restvolumen in Proben mit Ammoniumsulfat größer ist als bei Proben ohne.

Die Thylakoide würden nicht so stark dehydriert und unterlägen einer geringeren Volumenänderung während des Frier-Tau-Zyklusses (Hincha und Schmitt, 1985).

Möglichkeit 2: durch das Ammoniumsulfat liegen andere Stackingeffekte vor, wodurch die Thylakoide während der Zentrifugation nicht so dicht gepackt werden wie in der Kontrolle. Dies würde zu einem höheren Volumen führen. Eine Frostschutzwirkung würde durch den Test angezeigt.

Möglichkeit 3: Das Ammonium liegt in wässriger Lösung sowohl als ungeladenes  $\text{NH}_3$  als auch als geladenes  $\text{NH}_4^+$  vor.  $\text{NH}_3$  ist anders als  $\text{NH}_4^+$  membrangängig (Taiz, L. und Zeiger, E., 2006). Erst einmal im Thylakoidlumen stellt sich wieder das pH abhängige Gleichgewicht ein. Nun befinden sich  $\text{NH}_4^+$ -Ionen im Lumen und können während des Tauens nicht das Thylakoid verlassen. So befinden sich mehr Osmotika im Lumen und die Thylakoide nehmen mehr Wasser auf. Dadurch vergrößert sich das Volumen der Thylakoide. Dies kann jedoch nur in einem geringen Maß geschehen, da sonst die Wasseraufnahme zu groß wäre und die Thylakoide platzen würden.

Inwieweit die genannten Möglichkeiten eine Rolle spielen und welchen Anteil des apparenten Schutzes sie ausmachen, wurde nicht näher untersucht. Genauso wie die Frage, ob diese Möglichkeiten die einzigen sind.

Eine Konzentrierung mittels Ammoniumsulfatfällung und eine anschließende Lagerung in gefällter Form bei 4 °C sind wegen der nicht näher untersuchten Seiteneffekte nicht möglich.

Daher wurde beschlossen, durch ein verringertes Aufschlussvolumen von 30 ml das intrazelluläre Zielprotein aufzukonzentrieren.

Nach der Entfernung des größten Teils der Fremdproteine durch eine Hitzefällung befand sich neben dem Zielprotein noch ein weiteres hitzestabiles Protein aus *E. coli* in der Proteinlösung (Abbildung 3).

Die Abtrennung dieses circa 50 kDa großen *E. coli*-Proteins stellte sich als schwierig heraus, da für jedes Dehydrin eine andere Methode zu wählen war.

Wie Diagramm 5 und Diagramm 9 zeigten, kann Rab18 ohne messbare Menge an Ammoniumsulfat entsalzt werden. Daher war für Rab18 eine 30 %ige Ammoniumsulfatfällung zur Abtrennung des *E. coli*-Proteins möglich. Während Rab18 in der Lösung blieb, fiel das *E. coli*-Protein aus und konnte so abgetrennt werden.

Bei DH10 war eine Säurefällung bei pH 2 die beste Alternative. Hier fiel ebenfalls das Fremdprotein aus, während das Zielprotein in der Lösung blieb.

Die Lagerung war direkt in der Aufreinigungslösung (5 mM Saccharose, 1 mM Calciumchlorid und 1 mM Manganchlorid) bei -20 °C ohne Zugabe weiterer Schutzstoffe wie Glycerin möglich. Unterlag das Protein nicht mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen, so blieb das Protein aktiv.

Dies konnte am Beispiel DH10 gezeigt werden (Diagramm 8).

## 6. Diskussion - Funktionsanalyse

In dieser Arbeit wurden zwei Arten von Schaden an den Thylakoiden untersucht. Der mechanische und der chemische Schaden.

Der mechanische Schaden bestand im Zerreißen der Thylakoid-membran während eines Frier-Tau-Zyklusses. Während des Frierens bildet sich Eis außerhalb der Thylakoide und konzentriert so die im Medium enthaltenen Substanzen auf. Dadurch entsteht ein osmotisches Gefälle, das Wasser aus den Thylakoiden zieht. Durch die Dehydrierung verformt sich die Thylakoidmembran. Mechanischer Druck wird auf die Thylakoide ausgeübt, welcher die Thylakoidmembran zum Brechen bringen kann.

Durch die Konzentrierung der Substanzen im nicht gefrorenen Restvolumen kommt es dazu, dass Osmotika von den Thylakoiden aufgenommen werden, die unter physiologischen Bedingungen nur schlecht oder gar nicht membrangängig sind. Das führt zu einer Erhöhung von osmotisch aktiven Teilchen im Lumen der Thylakoide. Taut nun das Wasser in der Umgebung des Thylakoids auf, werden die Substanzen außerhalb wieder verdünnt. Die unter den hochkonzentrierten Bedingungen der gefrorenen Probe in das Thylakoid eingeströmten Osmotika sind nun kaum noch, oder nicht mehr so schnell, membrangängig. So entsteht ein entgegengesetztes osmotisches Gefälle und Wasser strömt in das Thylakoid. Es ist möglich, dass so viel Wasser nachströmt, dass die Thylakoide platzen (Hincha und Schmitt, 1985).

Der mechanische Schaden kann durch die Messung des Thylakoidvolumens gezeigt werden, wie in dieser Arbeit oder durch den Nachweis von Plastocyanin außerhalb der Thylakoide (Hincha *et al.*, 1987). Dass tatsächlich die Thylakoide während eines Frier-Tau-Zyklusses ganzer Blätter mechanischen Schaden erleiden, konnte Hincha in seiner Dissertation zeigen (Hincha, 1987).

Der chemische Schaden besteht im Herauslösen membranständiger Proteine aus der Thylakoidmembran unter hoher Salinität. Durch die erhöhte Salzkonzentration wird die Dissoziation der Proteine und somit ihre Löslichkeit in wässrigen Medien erhöht. Die Proteine lösen sich aus der Membran. Darunter sind auch Proteine aus der Photosynthese-Reaktionskaskade. Daher sind die Thylakoide, die einen chemischen Schaden erleiden, nicht mehr zur Photosynthese befähigt. Daher konnte die zyklische Photophosphorylierung dazu genutzt werden, um eben diesen Schaden nachzuweisen.

Der chemische Schaden wurde bei Temperaturen sowohl oberhalb als auch unterhalb des Gefrierpunktes gemessen, wobei auch das Zerreißen der Thylakoide bei einem Frier-Tau-Zyklus und der damit einhergehende Verlust an Plastocyanin zum Rückgang der Photosyntheseaktivität führte.

Die Fähigkeit der Thylakoide zur Photosynthese wurde über die zyklische Photophosphorylierung, einer Teilreaktion der Photosynthese, *in-vitro* getestet (Hincha und Schmitt, 1988).

## **6.1. Frostschutz**

Da Dehydrine unter Stress wie Trockenheit, Kälte oder auch hoher Salinität vermehrt exprimiert werden (Tunnacliffe und Wise, 2007), war es nahe liegend, dass sie eine Rolle in der Toleranzentwicklung spielen.

DH10 wird bei Kälte und Salinitätsstress, Rab18 bei der Samenbildung vermehrt exprimiert (Nylander *et al.*, 2001).

Der Schutz des Thylakoidvolumens durch CPP (Sieg *et al.*, 1996) und durch DH10 (Božović, 2007) wurde bereits gezeigt.

Wahrscheinlich wurde der Frostschutz hoch angesetzt. In der Aufreinigung von CPP wurde bislang nur ein Entsalzungsschritt durchgeführt (Hincha und Schmitt, 1992; Sieg *et al.*, 1996; Hincha *et al.*, 2001; Srór *et al.*, 2003; Božović, 2007). Dies ist nicht ausreichend zur

vollständigen Entfernung des Ammoniumsulfates (Diagramm 4 bis Diagramm 7), was zu einem zu hohen Frostschutz führt (Diagramm 9).

Mögliche Gründe für die durch das Ammoniumsulfat ausgelöste apparente Frostschutzwirkung wurden bereits in Kapitel 5 diskutiert. Im Diagramm 9 sind die Auswirkungen des Ammoniumsulfates zu sehen. Hier wurde für einfach entsalztes CPP ein 40 % höherer Frostschutz gemessen, als bei zweifach entsalztem CPP. Betrachtet man die Entsalzung von CPP (Diagramm 4), so sieht man, dass eine Leitfähigkeit von etwa 350  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in den gesamten proteinhaltigen Fraktionen zwei bis zehn vorhanden war. Diese Fraktionen sind nach Angabe des Herstellers der Nap5 Säulen zu verwenden.

Bei DH10 war nach dem ersten Entsalzungsschritt bereits keine erhöhte Leitfähigkeit zu messen (Diagramm 3). Jedoch zeigte eine nicht mit Ammoniumsulfat gefällte DH10-Probe ebenfalls einen um 40 % verringerten Frostschutz. Auch ein zweiter Entsalzungsschritt brachte keine Verringerung des Frostschutzes (Diagramm 9). Dies war der erste Hinweis, dass DH10 eine andere Funktionsweise hat als das Vergleichsprotein CPP.

Nach einfacher Entsalzung zeigten die gesammelten Fraktionen zwei bis zehn für Rab18 eine Leitfähigkeit von 510  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Diagramm 5), Diese Menge an Ammoniumsulfat bewirkte einen Frostschutz von 20 %. Zweifach entsalztes Rab18, welches keine messbaren Ammoniumkonzentrationen mehr enthielt, wies keine Frostschutzwirkung auf. Dasselbe galt für BSA, das in dieser Arbeit als Negativkontrolle eingesetzte Protein.

Dies ließ vermuten, dass es kein rein kolligativer Effekt war, der den Frostschutz durch das Ammoniumsulfat erhöhte. Der verstärkende Effekt von Ammoniumsulfat auf kryoprotektive Proteine wie CPP und DH10 wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Für alle weiteren Versuche wurde lediglich darauf geachtet, dass kein messbares Ammoniumsulfat in der Probe zu finden war.

Betrachtet man Diagramm 14, so scheint es ebenfalls eine nicht durch additive Effekte zu erklärende, erhöhte kryoprotektive Wirkung der Proteine CPP und DH10 bei hohen Saccharosekonzentrationen zu geben. Der Schutz des Thylakoidvolumens steigt mit der Saccharosekonzentration von etwa 20 % auf 75 % an. Dieser mögliche Effekt konnte aufgrund des geringen Thylakoidvolumens bei hohen Osmolalitäten nicht näher untersucht und erklärt werden. Eines ist definitiv zu sagen: der erhöhte Frostschutz gilt nur für das Thylakoidvolumen, nicht aber für die zyklische Photophosphorylierung (Diagramm 14).

Es konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Proteine DH10 und CPP, bei nicht nachweisbaren Mengen von Ammoniumsulfat, eine kryoprotektive Wirkung auf Thylakoidmembranen während eines Frier-Tau-Zyklus haben. Dies wurde anhand des Thylakoidvolumens (Diagramm 9, Diagramm 10) und der zyklischen Photophosphorylierung (Diagramm 11) gezeigt. Dabei schützten DH10 und CPP das Thylakoidvolumen bei gleicher Stoffmengenkonzentration gleich gut. Die zyklische Photophosphorylierung wurde bei gleicher Stoffmengenkonzentration von DH10 etwas besser geschützt als von CPP. Beide Proteine schützten bei höheren Proteinkonzentrationen die zyklische Photophosphorylierung besser als das Thylakoidvolumen.

Rab18 zeigte jedoch keine kryoprotektiven Eigenschaften. Dies war zu vermuten, da es nicht durch Kälte induziert wird (Nylander *et al.*, 2001). Auch lies die Primärstruktur der Proteine dieses Ergebnis vermuten. Reyes stellte 2008 die Vermutung auf, dass für den Frostschutz eine Primärstruktur mit einem S- und drei K-Segmenten von Nöten ist (Reyes *et al.*, 2008). Demnach hat Rab18 als Y2SK2-Typ Dehydrin ein K-Segment zu wenig.



## 6.2. Boyle van't Hoff

Wenn bei einem Versuch die Temperatur und der Druck konstant gehalten werden, verhalten sich isolierte Thylakoide wie ideale Osmometer. Daher kann man anhand der Boyle van't Hoff-Relation mögliche Änderungen der Permeabilität von Thylakoidmembranen durch Veränderung der Steigung in den Diagrammen zeigen.

Hincha konnte in seiner Dissertation 1987 zeigen, dass ein Teil der Kryoprotektion von Thylakoiden in dem Herabsetzen der Membranpermeabilität liegt (Hincha, 1987). Später konnte er zeigen, dass CPP die Permeabilität von Thylakoidmembranen herabsetzt (Hincha, 2002). Daher wurden für die untersuchten Proteine Boyle van't Hoff-Plots erstellt, um die Permeabilität zu testen.

Um die Änderung der Permeabilität von Thylakoidmembranen bei einem Frier-Tau-Zyklus zu zeigen, fror Hincha die isolierten Thylakoide in verschiedenen konzentrierten Saccharoselösungen ein. Nach dem Auftauen bestimmte er das Thylakoidvolumen. Er fand heraus, dass in hochmolalen Lösungen das Thylakoidvolumen einer gefrorenen Probe höher ist als bei der 0 °C-Kontrolle. Erst bei gering molalen Lösungen sinkt das Volumen der -20 °C-Proben aufgrund des mechanischen Schadens nach einem Frier-Tau-Zyklus (Hincha, 1987). In dieser Arbeit konnten nur die Ergebnisse der niedermolalen Lösungen nachvollzogen werden, da das Thylakoidvolumen bei einer Konzentration größer als 100 mM Saccharose so gering war, dass Änderungen im Fehler verloren gingen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteine CPP und DH10 einen zusätzlichen Volumenschutz zu dem Schutz der Saccharose bei einem Frier-Tau-Zyklus gaben (Diagramm 14, Diagramm 15).

Božović hat in seiner Dissertation 2007 den gerade beschriebenen Versuch von Hincha unter anderem mit den Dehydrinen DH10 und Rab18 durchgeführt. Es war ihm möglich, auch Thylakoidvolumen in hochosmolalen Lösungen zu messen. Er konnte zeigen, dass das DH10 die Permeabilität bei einem Frier-Tau-Zyklus herabsetzt (Božović, 2007).

Vergleicht man jedoch den Volumenschutz durch das DH10 in niedermolalen Lösungen, so sieht man einen höheren Frostschutz als er in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Dies ist jedoch auf das vermutlich in der Probe vorhandene Ammoniumsulfat zurückzuführen. Božović hat zur Aufkonzentrierung der DH10-Proben eine Ammoniumsulfatfällung verwendet und auch nur eine einstufige Entsalzung der Proben. Inwieweit der nicht additive Effekt der hohen Saccharosekonzentrationen bei einem Frier-Tau-Zyklus unter Zugabe von DH10 auch das Ergebnis der Permeabilität beeinflusst, konnte nicht gezeigt werden (Diagramm 14). Es kann daher nicht nachvollzogen werden, ob die Änderung der Membranpermeabilität tatsächlich vorhanden ist oder nur durch unbekannte Seiteneffekte vorgespielt wurde.

Da es nicht möglich war, eine Aussage über die Änderung der Permeabilität von Thylakoidmembranen nach einem Frier-Tau-Zyklus zu machen, wurde versucht, die Permeabilitätsänderung oberhalb des Gefrierpunktes zu zeigen. Hierzu wurde der Boyle van't Hoff Plot für verschiedene Temperaturen durchgeführt. Bei Null Grad Celsius wurde nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden lediglich eine geringe Änderung der Steigung der untersuchten Proteine gefunden (Diagramm 16). Vergleichend dazu war die Änderung bei einer Inkubation von 18 °C für alle drei Proteine deutlich (Diagramm 17). Um eine Aussage über das Permeabilitätsverhalten der Thylakoidmembranen machen zu können, wurde die Messung der Kinetik für die Proteine CPP und DH10 sowie eine Kontrolle ohne Protein durchgeführt (Diagramm 19). Es zeigte sich, dass über die Versuchsdauer von zwei Stunden die Thylakoide an Volumen verloren. DH10 verlor im Gegensatz zu CPP stärker an Volumen als die Kontrolle. Dies bedeutet, dass DH10, nicht, wie vermutet, die Permeabilität der Thylakoidmembran herabsetzt, sondern sie heraufsetzte. Ob der Volumenverlust der gemessenen Thylakoide von der Kontrolle und den CPP-Proben auf eine Reduktion der Osmotika im Lumen und ein damit einhergehenden Wasserverlust zurückzuführen ist oder auf einen Schaden der Thylakoide bei den gewählten Inkubations-

bedingungen, konnte nicht geklärt werden. Eine einfache Methode, einen mechanischen Schaden während der Inkubation nachzuweisen, wäre der immunologische Nachweis von Plastocyanin gewesen. Dieser Nachweis war jedoch aus technischen Gründen nicht möglich.

### **6.3. Zyklische Photophosphorylierung und Proteinverluste aus der Thylakoidmembran**

Während es in den vorangegangenen Unterkapiteln der Diskussion zumeist um das Thylakoidvolumen ging, das durch Zusatz von Salz geschützt wird, geht es in diesem Kapitel um den chemischen Schaden der Thylakoide. Hier spielt Salz eine große Rolle, wobei es negative Auswirkungen hat. Durch hohe Salinität werden Proteine aus der Thylakoidmembran gelöst, da die Dissoziation und damit die Löslichkeit der Proteine heraufgesetzt werden. Dies wiederum unterbricht die Photosynthese-Kaskade. Der Verlust der Photosyntheseaktivität wurde über die Messung der ATP-Bildung während der zyklischen Photophosphorylierung gemessen.

Betrachten wir zuerst den reinen Frostschaden. Hier spielt neben dem Herauslösen der Membranproteine auch das Zerreißen der Thylakoide und die Freisetzung des Plastocyanins eine Rolle. Durch beides wird die zyklische Photophosphorylierung gestört. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl CPP als auch DH10 die zyklische Photophosphorylierung bei einem Frier-Tau-Zyklus schützen (Diagramm 11). Wird dem System nun ein Zucker, wie zum Beispiel Saccharose zugesetzt, so wird der Gefrierpunkt herabgesetzt. Vergleicht man das Frierverhalten einer zuckerhaltigen Lösung mit einer zuckerfreien Kontrolle bei gleicher Inkubationstemperatur, so wird in der zuckerhaltigen Lösung der Punkt bei höheren Temperaturen erreicht, bei der das nicht-gefrorene Restvolumen nicht weiter einfriert. Ist neben dem Zucker auch Salz in der Lösung, so ist die Endkonzentration der Salze im nicht-gefrorenen Restvolumen geringer und das Herauslösen der Membranproteine reduziert.

Zudem werden die Dehydrierung des Thylakoids und damit ein möglicher Bruch der Zellmembran reduziert. Dies zeigten bereits Volger (Volger *et al.*, 1978), Orthen und Popp (Orthen und Popp, 2000) sowie Hinch (Hinch *et al.*, 1984a; Hinch und Schmitt, 1985).

Wobei nicht jeder Zucker die gleiche Wirkung hat. So ist beispielsweise Glucose nicht so effektiv wie Saccharose (Santarius und Giersch, 1983). Aber auch organische Säuren (Santarius, 1971) und ATP selbst (Santarius, 1984) schützen die zyklische Photophosphorylierung. Wobei eine Kombination zweier Schutzstoffe zu einem erhöhten Effekt führen kann (Santarius, 1984), aber nicht zwingend muss (Orthen und Popp, 2000).

Der Schutz durch steigende Saccharosekonzentrationen auf die zyklische Photophosphorylierung konnte in dieser Arbeit nachvollzogen werden (Diagramm 25). Bei einer Saccharosekonzentration von 210 mM konnte der maximale Schutz bei einem Frier-Tau-Zyklus erreicht werden. Dies zeigte schon Hinch (Hinch *et al.*, 1984a). Es konnte zudem gezeigt werden, dass DH10 und CPP den kryoprotektiven Schutz der Saccharose verstärkten. Bei DH10 war der maximale Schutz nicht nur um 9 % höher, sondern auch schon bei 105 mM erreicht. Bei CPP lag der maximale Schutz ebenfalls um etwa 9% höher. Er wurde bei 150 mM erreicht (Diagramm 25).

Um den Salzscha den nach einem Frier-Tau-Zyklus gut untersuchen zu können, wurde dem Testsystem 200 mM Saccharose zugegeben und unterschiedliche Konzentrationen an Natriumchlorid. Ab einer Erhöhung der Osmolalität von 100 mOsmol/kg, durch die Zugabe von Natriumchlorid, zeigten sich erste Schäden. Der Verbrauch an Phosphat zur Bildung des ATP sank (Diagramm 26). Dies war bereits bekannt und daher nicht überraschend (Volger *et al.*, 1978; Santarius und Giersch, 1983; Hinch *et al.*, 1984a; Hinch und Schmitt, 1985; Orthen und Popp, 2000). Was jedoch die Zugabe der Proteine anging, war Überraschendes zu sehen. CPP, das einen Frostschutz unter geringen Natriumchlorid-

konzentrationen zeigte, büßte diesen Schutz bei hoher Salinität ein. Rab18, welches vorher keinen Frostschutz zeigte, schützte nun die Thylakoide bei hoher Natriumchloridkonzentration, auch bei einem Frier-Tau-Zyklus. Auch DH10 zeigte salinitive Schutzfunktionen bei 0 °C und bei einem Frier-Tau-Zyklus. Der salinitive Schutz der ATP-Synthese durch Rab18 lag bei 20 %, betrachtete man den Schutz nach einem Frier-Tau-Zyklus, lag der Schutz bei 0 °C bei etwa 30 %. DH10 schützte die ATP-Synthese bei einem Salzgehalt von 300 mM und einem Frier-Tau-Zyklus um etwa 40 %. Waren die Thylakoide lediglich der hohen Salinität ausgesetzt, so wurde die zyklische Photophosphorylierung sogar um 60% geschützt. Dies ist auch in Diagramm 27 zu sehen, welches die Schutzwirkung der Proteine bei 300 mM Natriumchlorid zeigt. Vergleicht man die Ergebnisse in diesem Diagramm mit denen aus Diagramm 12: Abhängigkeit des Frostschutzes von der Proteinkonzentration, so fällt auf, dass der maximale Salinitätsschutz nach einem Frier-Tau-Zyklus bereits bei vier µM DH10 erreicht wurde, während bei einer Salzkonzentration von fünf mM ein maximaler Schutz der zyklischen Photophosphorylierung erst bei 14 µM erreicht wurde.

Wurde zeitgleich die Saccharose- und die Natriumchloridkonzentration (1,5 zu 1) erhöht, so konnten nach einem Frier-Tau-Zyklus zwei Phasen gesehen werden (Diagramm 28). Als erstes stieg die zyklische Photophosphorylierung an. Dann, ab einer Osmolalität von 150 mOsmol/kg, nahm die zyklische Photophosphorylierung wieder ab. Man sah auch hier den Salinitäts-Schutz der Proteine DH10 und Rab18.

Hincha zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen Proteinverlust aus den Thylakoiden und dem Rückgang der zyklischen Photophosphorylierung (Hincha *et al.*, 1984a; Hincha und Schmitt, 1985). Daher wurde der Proteinverlust aus der Thylakoidmembran bei unterschiedlichen Salzgehalten und einer Inkubationstemperatur von 0 °C und -20 °C gezeigt (Abbildung 6).

Auch wenn dieser Versuch nur mit drei Salzkonzentrationen diesen Effekt eher exemplarisch zeigte, war gut zu sehen, dass die Erhöhung der Salinität einen vermehrten Proteinverlust zur Folge hatte. Auch der Frier-Tau-Zyklus bewirkt bei jeder Salzkonzentration eine Erhöhung der Anzahl herausgelöster Proteine. Durch die Zugabe des salinitiv-protectiven Proteins DH10 konnte keine Änderung des Löseverhaltens der Membranproteine gezeigt werden. Dies könnte jedoch an der Größe der Gele und der Färbung mit Coomassie liegen. Ein größeres Gel, in dem die Proteine deutlicher aufgetrennt werden, und eine empfindlichere Färbetechnik, wie beispielsweise die Silbernitratfärbung, könnten eventuell doch Unterschiede zeigen. Bei Rab18 zeigten sich geringere Bandenintensitäten. Dies kann bedeuten, dass entweder die Membranproteine vor dem Herauslösen aus der Membran oder vor der Denaturierung durch Hitze bei der Probenvorbereitung geschützt werden.

#### **6.4. Sedimentation und Salzbindung**

Während der Inkubationen zu den Versuchen des Frostschutzes und des Boyle van't Hoff-Plots konnte bei den ungefrorenen Proben eine Sedimentation der Thylakoide beobachtet werden. Es schien so, als ob die Thylakoide, je nachdem ob ein Protein zugesetzt wurde und welches, anders sedimentierten als die Kontrolle. Um dies genauer zu untersuchen wurden die Versuche zur Sedimentation (4.4) durchgeführt.

Es zeigte sich, dass eine Chlorophyllkonzentration von 50 µg/ml am besten für die Sedimentationsversuche geeignet war. Höhere Konzentrationen führten zwar zu einer Verkürzung des Versuches durch Reduktion der Aggregationsphase, es führte jedoch auch dazu, dass die Ergebnisse schlechter oder gar nicht reproduzierbar wurden.

Um die Sedimentation zu beobachten, wurden die Thylakoide in 5 mM Natriumchlorid, 5 mM Saccharose, mit und ohne 0,5 mM Mangan- und Calciumchlorid inkubiert und ihr Aggregations- und Sedimentationsverhalten über die Optische Dichte gemessen (Diagramm 20).

Es zeigte sich, dass Thylakoide mit Mangan- und Calciumchlorid Aggregate bildeten, was an einem starken Anstieg der Kurve und einer kleinen Aggregationsphase zu sehen war (Diagramm 20). Diese Aggregate sanken dann mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,03 OD/h (Diagramm 21.). Thylakoide ohne Mangan- und Calciumchlorid bildeten kaum Aggregate, was an der langen Aggregationsphase zu erkennen ist (Diagramm 20) und sedimentierten lediglich mit 0,005 OD/h (Diagramm 21).

Betrachtet man die Thylakoide, denen Calcium- und Manganchlorid sowie CPP hinzugesetzt wurden, so zeigt sich ein steilerer Anstieg der Kurve während der Aggregationsphase und eine schnellere Sedimentation in der Sedimentationsphase. Proben mit Calcium- und Manganchlorid sowie DH10 zeigten das Sedimentationsverhalten der Kontrolle ohne Calcium- und Manganchlorid. Erst die Erhöhung der Konzentration an Mangan- und Calciumchlorid führte zu einer Sedimentationsgeschwindigkeit die der der Kontrolle mit 1 mM Calcium- und Manganchlorid entsprach (Diagramm 20). Bei gleichbleibenden Bedingungen hängt die Sedimentationsgeschwindigkeit vom Volumen der sedimentierenden Partikel ab, hier also von den Thylakoidaggregaten. Im Diagramm 22 bestätigen sich die bereits beobachteten Geschwindigkeiten. Mit CPP inkubierte Thylakoide, welche am schnellsten sedimentierten, bildeten auch die größten Aggregate. DH10 und Rab18 bilden unter Einfluss von 0,5 mM Calcium- und Manganchlorid genauso große Thylakoidaggregate wie die Kontrollen ohne Salz.

Nach einem Frier-Tau-Zyklus waren die Unterschiede wesentlich deutlicher zu sehen (Diagramm 23, Diagramm 24). Mit CPP inkubierte Thylakoide bildeten Aggregate, die teilweise mit dem bloßen Auge zu sehen waren. Thylakoide, welchen DH10 zugesetzt wurde, bildeten nach einem Frier-Tau-Zyklus lediglich Aggregate wie die Kontrolle bei 0 °C. Thylakoide mit Rab18, welche sich bei Raumtemperatur noch so verhielten wie Thylakoide mit DH10, bildeten nach einem Frier-Tau-Zyklus

Aggregate wie die gefrorene Kontrolle. Dies wirkte sich auch auf die Sedimentationsgeschwindigkeit beschleunigend aus (Diagramm 23).

Wie aber sind die Unterschiede zu erklären?

Alsuleiman zeigte, dass Wax-Proteine, die eine kryoprotektive Eigenschaft besitzen, größere Thylakoidaggregate bildeten als die Kontrolle (Alsuleiman, 2011).

Der erste Gedanke, dass die Thylakoide, welche durch ein kryoprotektives Protein geschützt wurden, auch größere Aggregate bilden, ist nicht haltbar. DH10 zeigte kryoprotektive Eigenschaften, wie auch CPP, aber während Thylakoide mit CPP besonders große Aggregate bildeten, bildeten Thylakoide mit DH10 kleinere Aggregate als die Kontrollen.

Wieso bilden sich überhaupt Thylakoidaggregate?

Es ist bekannt, dass Thylakoide in Chloroplasten Grana (Thylakoid-stapel) bilden. Dazu benötigen sie jedoch Mangan und Calcium (Miller, 1979; Bassi *et al.*, 1985).

Hincha zeigte an künstlichen Lipidvesikeln, die in der Zusammensetzung den Thylakoiden nachempfunden wurden, dass sie calciumabhängige Aggregate bilden. Dies destabilisierte jedoch die Vesikel während eines Frier-Tau-Zyklus (Hincha, 2003).

Da Thylakoide mit DH10 keine Aggregate ausbildeten, scheint es so, als ob DH10 den Thylakoiden das Calcium vorenthielt und dadurch keine Aggregate gebildet werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass 1M DH10 20 M Calcium binden konnte (Diagramm 36). Die eingesetzte Menge von 15  $\mu$ M DH10 war folglich in der Lage, 300  $\mu$ M zu binden. Dies entsprach 60 % des unter Standardbedingungen mit 0,5 mM Calcium eingesetzten Calciums. Jedoch zeigte DH10 diese hohe Salzbindung in Versuchen ausschließlich mit Calciumchlorid und 5 mM Saccharose nur bei hohen Salzgehalten. Es scheint, als ob der Zusatz von Thylakoiden sich auf die Aktivität und somit auf die Calciumaufnahme auswirkt. Es



kann jedoch auch sein, dass der ausbleibende Stackingeffekt nicht nur mit der Bindung des Calciums an das DH10 zu erklären ist.

Thylakoide mit Rab18 zeigten, wie mit DH10, keine Aggregatbildung, mit der Einschränkung, dass nach einem Frier-Tau-Zyklus der Aggregationschutz aufgehoben war. Wenn jedoch das Verhindern der Aggregation ein Teil des Frostschutzmechanismus ist, ist die Frage, wieso dann Thylakoide mit CPP größere Aggregate bildeten. Eriksson beschrieb 2011 seinerseits für das kryoprotektive Dehydrin LTI30 eine erhöhte Aggregatbildung an künstlichen Lipiden und auch an isolierten Thylakoiden. Die Ergebnisse sind jedoch nicht vollständig vergleichbar, da die Thylakoidaggregation in einem Medium ohne Calciumchlorid durchgeführt wurde. Den Thylakoiden war Magnesiumchlorid zugesetzt worden. Zudem könnten auch Reste an Ammoniumsulfat das Ergebnis beeinflussen, da das LTI30 Ammoniumsulfat gefällt und nur einfach entsalzt wurde (Eriksson *et al.*, 2011).

Da ausgehend von den Ergebnissen der Sedimentation eine Calciumbindung an das Dehydrin vermutet wurde, wurde die Salzbindung der Proteine untersucht.

Hierzu wurde die Ruthenium-Rot-Färbung eingesetzt.

Meist dient Ruthenium-Rot als Alternative zu radioaktiv markiertem Calcium für Bindungsstudien (Charuk *et al.*, 1990). In dieser Arbeit wurde versucht, die durch Ruthenium-Rot gefärbten Proteine durch Zugabe von Salz wieder zu entfärben. Dies geschah nur, wenn die Salze mit dem Ruthenium-Rot um die Bindungsstelle konkurrierten. Stressmann konnte zeigen, dass dieses Verfahren für Calcium funktionierte (Stressmann *et al.*, 2004).

In Abbildung 8 und Diagramm 33 sind die Ergebnisse zu sehen. CPP band die Kationen Magnesium, Mangan und Calcium, wobei Magnesium die stärkste Bindung zu haben schien.

DH10 band Kalium am stärksten, gefolgt von Calcium, Mangan, Magnesium und Ammonium.

Rab18 band am besten mit Kalium, gefolgt von Calcium und Mangan. Zuletzt folgte dann noch Magnesium.

Aber ist es realistisch, dass Proteine so zahlreiche Kationen binden? Die Gruppe von Krüger untersuchte ein Ionen-Transport-Protein, welches Sequenzähnlichkeiten zu den Lea-Proteinen hat. Sie fanden eine Bindung von Kupfer, Zinn, Mangan und dreiwertigem Eisen (Krüger 2002).

Dass DH10 und Rab18 zumindest Calcium binden, wurde durch die Ergebnisse von Heyen bestätigt (Heyen *et al.*, 2002). Auch Alsheikh konnte 2005 die Bindung von Calcium an DH10 und Rab18 zeigen (Alsheikh *et al.*, 2003). Die Stärke, mit der die Dehydrine die Salze binden, scheint unter anderem phosphorylierungsabhängig zu sein (Heyen *et al.*, 2002; Alsheikh *et al.*, 2003).

Es bleibt noch die Frage offen, warum CPP größere Thylakoidaggregate bildet. Die Ergebnisse von Hinch 2003 zeigen eine Destabilisierung der Lipidvesikel unter Einfluss von Calcium und einem Frier-Tau-Zyklus (Hinch, 2003). Obwohl die Thylakoidmembran nicht nur aus Lipiden, sondern auch aus Proteinen besteht, die eventuell die Membranstabilität erhöhen, ist dennoch anzunehmen, dass eine vermehrte Aggregation während eines Frier-Tau-Zyklus schädlich ist. Eine Rekapitulation der Ergebnisse zeigt,

- dass CPP an Calcium bindet,
- dass CPP an Thylakoide bindet (unter Einfluss von Mangan- und Calciumchlorid) (Sror *et al.*, 2003)
- dass Calcium unter anderem an das Lipid Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) bindet (Hinch, 2003).

Wenn nun CPP an Calcium bindet und dieses wiederum an DGDG, so könnte dies eine mögliche Erklärung für die größeren Aggregate sein.

CPP würde so als sterische Barriere zwischen den einzelnen Thylakoiden wirken, welches wiederum die Membranfusion verringert. Diese Idee ist rein spekulativ und konnte nicht bewiesen werden.

## **6.5. Gefrierpunktserniedrigung und Molekulargewicht**

Nachdem die unterschiedliche Sedimentation näher untersucht worden war, wurde nun mehr Aufmerksamkeit einer weiteren Beobachtung gewidmet.

Zur Erstellung des Boyle van't Hof-Plots wurde die Osmolalität gemessen. Während die Kontrolle und die Proben mit CPP gleiche Werte aufzeigten, schienen die Werte für DH10 immer etwas oberhalb zu liegen.

Je höher die Osmolalität, desto größer war der Unterschied zwischen Proben mit DH10 und der Kontrolle.

Die Messung der Osmolalität wurde mit einem Gefrierpunktsosmometer durchgeführt. Diese Messung basierte auf der Messung des Gefrierpunktes der untersuchten Lösungen.

Es ist von einigen Proteinen bekannt, dass sie den Gefrierpunkt von Lösungen herabsetzen. Solche Proteine befinden sich unter anderem in Fischen, Insekten und Pflanzen (Crevel *et al.*, 2002).

Wisniewski beschrieb 1999 für das Dehydrin PCA60, dass es in der Lage ist, den Gefrierpunkt einer Lösung herabzusetzen (Wisniewski *et al.*, 1999).

Daher wurde ein möglicher gefrierpunktserniedrigender Effekt für DH10 näher untersucht.

Es konnte für das Protein DH10 ein salzabhängiger, thermischer Hysterese-Effekt gezeigt werden (Diagramm 29). Vergleicht man die Ergebnisse verschiedener Salze, so wurde für DH10 die größte Gefrierpunktserniedrigung bei Calciumchlorid beobachtet, gefolgt durch Mangan- und Magnesiumchlorid, anschließend Ammoniumsulfat. Die Reihenfolge der effektstärksten Salze der Gefrierpunktserniedrigung stimmt nicht mit

der Reihenfolge des Entfärbungseffektes aus dem Versuch mit Ruthenium-Rot überein (Diagramm 33). Kalium entfärbt das DH10 am stärksten, bewirkt jedoch keine Gefrierpunktserniedrigung. Jedoch sind die Effekte der einzelnen Salze auf das Ruthenium-Rot unbekannt. Ebenso ist unbekannt, ob und inwieweit man den Ergebnissen der Ruthenium-Rot-Entfärbung durch andere Salze als Calcium vertrauen kann, da der Versuch nur für Calcium beschrieben ist.

Da Calcium die größte gemessene Gefrierpunktserniedrigung und die zweithöchste Entfärbungsreaktion bei Ruthenium-Rot zeigte, wurde dieser Effekt genauer untersucht.

Es ist auch für einige der genau untersuchten Antifreeze-Proteine bekannt, dass ihr thermischer Hysterese-Effekt calciumabhängig ist (Ewart und Fletcher, 1993).

Es konnte gezeigt werden, dass unter den Standardbedingungen mit 0,5 mM Calciumchlorid bei steigendem Proteingehalt eine maximale Gefrierpunktserniedrigung von  $-0,2\text{ °C}$  erreicht wurde (Diagramm 31). Die eher geringe Absenkung des Gefrierpunktes schien typisch zu sein für pflanzliche Antifreeze-Proteine (Duman, 1994 ). Ein Vergleich eines Antifreeze-Proteins aus *Solanum dulcamara* (sthp-64), isoliert direkt aus der Pflanze und aus transgenen *E.coli* zeigte, dass das transgene Protein geringere Gefrierpunktserniedrigungen zeigt. Die gemessene Gefrierpunktserniedrigung lag bei 10 mg/ml für das aus Pflanzen isolierte Protein bei  $0,25\text{ °C}$ . Bei Protein, isoliert aus *E.coli*, lag die Gefrierpunktserniedrigung lediglich bei  $0,15\text{ °C}$  (Huang und Duman, 2002). Dies kann eine weitere Erklärung für die geringe Gefrierpunktserniedrigung des DH10 bei geringer Salinität sein.

Wenngleich auch die AFP der verschiedenen Spezies unterschiedlich stark den Gefrierpunkt herabsetzten, so war ihnen eines doch gleich: es trat bereits bei sehr geringen Proteinkonzentrationen von 3-25  $\mu\text{g}$  ein messbarer Effekt auf (Li *et al.*, 1991). Auch bei DH10 konnte in diesen geringen Proteinkonzentrationen schon ein Hysterese-Effekt bei 400 mM

Calciumchlorid deutlich gemessen werden (Tabelle 2, Diagramm 31). Die Maximale Gefrierpunktserniedrigung lag hier bei  $-1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Diagramm 31). Da die Gefrierpunktserniedrigung in dieser Arbeit über ein Gefrierpunktosmometer gemessen wurde, wurde der gleiche Versuch in einem Dampfdruckosmometer wiederholt. Bei dem Dampfdruckosmometer konnte zwar ein Protein-Effekt gemessen werden, dieser war jedoch bei BSA und DH10 sehr gering (Diagramm 32). Daraus war zu schließen, dass der bei DH10 gemessene Effekt aus der Gefrierpunktserniedrigung stammte und nicht ein Proteineffekt der Osmolalität war.

Um die Messungen der Gefrierpunktserniedrigung von Calciumchlorid-Lösungen zu verifizieren, wurde die Osmolalität, die Leitfähigkeit und der Gehalt der Calcium- und Chloridionen von einer  $400\text{ mM}$  Calciumchloridlösung mit und ohne Protein gemessen (Tabelle 2).

Es zeigte sich, dass der Gefrierpunkt mit steigender DH10-Konzentration immer weiter herabgesetzt wurde. Dadurch wurde die Osmolalitätsänderung mit steigender DH10-Konzentration erhöht. Weiterhin zeigte sich, dass die Fällung der Calciumionen mit Sulfationen durch Zugabe des DH10 verhindert wurde. Dies konnte auch bei der Silberchloridfällung gezeigt werden. Mit steigender DH10-Konzentration sank die Kristallmenge. Dass dies an den DH10 und nicht an der Calciumkonzentration lag, konnte die Ca-EDTA-Titration zeigen. In allen Proben befand sich dieselbe Konzentration an Calcium. Alle weiteren untersuchten Proteine zeigten keine Auswirkungen.

Um eine Idee zu erhalten, warum sich die Masse der ausgefallenen Salzkristalle veränderte, wurden diese mikroskopiert.

Es zeigte sich, dass DH10 die Kristallstruktur von Calciumsulfat verändert (Abbildung 7). Die typische, spitze Struktur der sogenannten Kalknadeln wurde durch Zugabe von DH10 zu kurzen abgeflachten Romboedern. Dieser Effekt konnte bis zu einer Proteinverdünnung von  $2\text{ }\mu\text{M}$  beobachtet werden. Jedoch waren hier schon längere Nadeln mit abgerundeten Ecken zu sehen.

Die 2  $\mu\text{M}$ -Grenze für die Änderung der Kristallstruktur findet sich auch in der thermischen Hysterese und der Calciumsulfatfällung wieder (Tabelle 2).

Wieso aber verhindert ein Protein die Bildung von Salzkristallen, in diesem Fall von Calciumsulfat und Silbernitrat?

Es ist von einigen humanen Proteinen bekannt, dass sie die Bildung von Calciumcarbonat-Kristallen verhindern, wie Lithostathin (Bertrand *et al.*, 1996) und Nephrocalcin (Mustafi und Nakagawa, 1996). Der Effekt des Lithostathin wurde jedoch stark diskutiert (De Reggi *et al.*, 1998). Was jedoch eindeutig für das Lithostathin nachgewiesen werden konnte, war die Bindung des Calciums an das Protein (Lee *et al.*, 2003).

Die Hemmung der Calciumcarbonatkristallebildung ist medizinisch eine gut nachvollziehbare wichtige Funktion, die der Gesundheit des Menschen zugute kommt. Warum aber ein solcher Effekt bei einer Pflanze zu beobachten war, blieb unklar.

Zippelius gibt eventuell eine Antwort. Er beschrieb 2002 in seiner Dissertation, dass es beim Einfrieren von proteinhaltigen Lösungen zu einem eutektischen Frieren kommen kann. Im nicht-gefrorenen Restvolumen wurden sämtliche Substanzen aufkonzentriert, so lange, bis der eutektische Punkt eines Salzes erreicht wurde. Dann fiel dieses aus, unabhängig von den sonstigen Substanzen im Restvolumen. Die Salzkristalle könnten dann Proteinstrukturen zerstören. Für Natriumchlorid lag der eutektische Punkt bei  $-21,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Zippelius, 2002). Zippelius arbeitete mit humanen Seren, nicht mit Pflanzen, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht gegeben ist.

Vielleicht gibt aber auch Yamazaki die Antwort: In der Veröffentlichung 2008 konnte gezeigt werden, dass durch einen Frier-Tau-Zyklus entstandene kleine Schäden an der Membran durch Membranfusion repariert werden konnten. Hierzu wurden jedoch freie Calcium-Ionen benötigt, um die Signalkaskade auszulösen, die den Reparatur-

mechanismus auslöste (Yamazaki *et al.*, 2008a). Wenn nun also DH10 das Ausfallen von freien Calcium-Ionen verhinderte, würde der Selbstreparaturmechanismus gestärkt werden. Jedoch hatte DH10 die Eigenschaft gezeigt, Thylakoidaggregation und damit die Membranfusion zu hemmen. Dies würde den Selbstreparaturmechanismus sterisch behindern.

Am wahrscheinlichsten erscheint mir daher die Idee eines Calcium-Puffer-Proteins.

In „Calcium and Plant Development“ erklärte Hepler die Notwendigkeit der Bildung solcher Proteine für Pflanzen. Im extrazellulären Raum von Pflanzen liegt die Konzentration an Calciumionen im millimolaren Bereich. Im Cytosol hingegen liegt Calcium nur noch in mikromolaren Konzentrationen vor. Es ist wichtig, dass Calcium in der Zelle reguliert wird, da eine Konzentration im Cytosol im millimolaren Bereich toxisch ist (Hepler und Wayne, 1985).

Calciumreservoirs innerhalb der Pflanzenzellen sind die Vakuolen und das Endoplasmatische Retikulum (Machlon, 1984; Conte *et al.*, 2007).

Werden unter Stress diese Strukturen zerstört und kommt es zu einem Austritt an Calcium, kann dies für die Zellen tödlich sein. Um Schaden bei einem plötzlichen Anstieg an Calcium zu verhindern, haben die Pflanzen sogenannte Calcium-Puffer-Proteine, wie Calreticulin, Calsequestin und Calnexin gebildet. Diese Proteine regulieren die Calciumkonzentration durch extrem effektive Bindung des Calciums. Die Proteine besitzen alle saure Regionen, an denen das Calcium bindet (Machlon, 1984; Conte *et al.*, 2007).

Heyen schrieb 2002 über das Protein VCaB45, ein Protein aus *Aquium graveolens*, das Sequenzähnlichkeit zu den Dehydrinen aufweist, dass es in der Lage ist, Calcium in größerer Menge zu binden. Es band pro Mol Protein 25 Mol Calcium (Heyen *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob eine solche Bindung von Calcium auch durch das DH10 möglich sei, und damit den geringeren Calciumsulfat-Niederschlag zu erklären, wurde versucht,

über eine Gelfiltrationssäule die Aufnahme von Calcium durch DH10 zu zeigen.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass 1M DH10 20 M Calcium aufnimmt (Diagramm 36). Dies geschah aber nur, wenn DH10 in einer Umgebung mit einer hohen Salzkonzentration inkubiert wurde. Zudem konnte gezeigt werden, dass nur das intakte Protein in der Lage war, so viel Calcium zu binden (Diagramm 35).

Calcium-Puffer-Proteine werden erst aktiv, wenn die Calciumkonzentration eine bestimmte Konzentration überschreitet (Michalak *et al.*, 1992).

DH10 band erst unter hoher Salinität Calcium. Dies ist ein weiteres Indiz, das die Idee des Calcium-Puffer-Proteins stützt.

Dass die apparente molekulare Masse, unter Einfluss von Calcium abnahm, ließ darauf schließen, dass möglicherweise das DH10 vom random-coil zu einer gepackten Struktur fand.

In vielen Arbeiten, wie beispielsweise bei Henzl und Davis, wurde beschrieben, dass Proteine erst unter Einfluss von Calcium ihre Tertiärstruktur entwickelten (Henzl *et al.*, 2008).

Kovacs zeigte 2008 für DH10 mit Hilfe einer CD-Spektralanalyse, dass DH10 seine Sekundärstruktur, unter Zugabe von bis zu 30 % Trifluoressigsäure, von einem random-coil zu einer  $\alpha$ -Helix-Struktur änderte.

Daher erscheint es mir sinnvoll, dass DH10, unter hohen Calciumchloridkonzentrationen, seine Sekundärstruktur von einem random-coil hin zu einer  $\alpha$ -Helix-Struktur ändert und so in der Lage ist, die hohe Calciumkonzentration abzupuffern.

Davis und Hew, die das AFGP-5 untersuchten, fanden heraus, dass die Struktur von hintereinander geschalteten Alphahelixen für die Funktionalität der thermischen Hysterese notwendig ist (Davies und Hew, 1990). Möglicherweise ist die Ausbildung der  $\alpha$ -Helix-Struktur bei DH10 unter hoher Salinität auch für den thermischen Hysterese-Effekt verantwortlich.



Dass die thermische Hysterese durch die Erhöhung der Calciumchloridkonzentration erhöht wurde (Diagramm 31) unterstützt diese Vermutung.

## **6.6. Zusammenfassung der Diskussion**

Zusammenfassend ist zu sagen, dass CPP die Thylakoidmembran vor Schaden bei einem Frier-Tau-Zyklus schützte. Es wird sowohl das Thylakoidvolumen als auch die ATP-Synthese geschützt (Kapitel 4.1). CPP bindet an die Thylakoidmembran und senkt die Permeabilität der Membran (Sieg *et al.*, 1996; Srór *et al.*, 2003). Zudem bindet CPP an Calcium, Magnesium und Mangan (Kapitel 4.8.2). Vor hohen Salzkonzentrationen schützt CPP jedoch nicht (4.5.2).

Rab18 schützt die Thylakoidmembran vor Salzschäden (Kapitel 4.5), nicht aber vor Schäden durch einen Frier-Tau-Zyklus (4.1). Für den Schutz der Membran ist eine Bindung nicht nötig. Der Schutzmechanismus von Rab18 ist ein anderer als bei DH10. Dies zeigt sich vor allem bei den Versuchen zur Calciumsulfatbildung. Zudem ist die Effektivität des Schutzes durch Rab18 geringer als die durch DH10.

Eine einheitliche Funktion der Dehydrine ist damit widerlegt.

DH10 zeigt eine Membranstabilisierung sowohl bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt (Kapitel 4.1), als auch bei hoher Salinität (Kapitel 4.5). Durch Zusatz von DH10 zu Salzlösungen zeigt sich eine thermische Hysterese (4.7). Crevel stellte die Hypothese auf, dass bei vielen Proteinen der Effekt der thermischen Hysterese nur ein Sekundäreffekt ist (Crevel *et al.*, 2002). Da der Hysterese-Effekt mit steigender Calciumchloridmenge zunimmt (Diagramm 31), ebenso wie die Bindung des Calciums an DH10 (Diagramm 36), lässt sich vermuten, dass die Gefrierpunktserniedrigung einhergeht mit dem Calcium-Puffer-Effekt. Durch die Änderung des apparenten Molekulargewichtes lässt sich schließen, dass DH10 seine Konformation ändert. Eventuell könnte sich eine  $\alpha$ -Helix-Struktur ausbilden. Die Idee, dass DH10 eine  $\alpha$ -Helix-Struktur ausbildet, wird durch Mouillons Vermutung, dass solche Strukturen von

Dehydrinen unter Stress gebildet werden, unterstützt (Mouillon *et al.*, 2006), ebenso von Kovacs CD-Spectralanalyse (Kovacs, 2008).

Die Ergebnisse der Arbeit veranlassen mich zu der Hypothese, dass DH10 unter Salzstress als Salz-Puffer-Protein fungiert. Zudem senkt DH10 bei hohen Salzkonzentrationen den Gefrierpunkt ab. Dies bewahrt die Thylakoide vor Frostschäden.

## 7. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DH10 die Kristallstruktur von Calciumsulfat verändert und den Gefrierpunkt von Lösungen herabsetzt, sowie Thylakoide vor Frostschäden schützt.

Ferner konnte für CPP eine Frostschutzaktivität und für Rab18 ein Salzschutz gezeigt werden.

Der genaue Mechanismus konnte nicht erklärt werden. Es bleibt also späteren Arbeiten offen zu klären, wie genau beispielsweise Rab18 vor Salzschäden schützt.

Erste Versuche mit dem Dehydrin ERD14, welches zu den Dehydrinen der Klasse SK2 zählt, weisen auf dieselbe Veränderung der Struktur von Calciumsulfatkristallen hin. Auch hier wären weitere Untersuchungsmöglichkeiten gegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass Ammoniumsulfat und hohe Saccharosekonzentrationen eine Verstärkung des kryoprotektiven Effektes von DH10 und CPP bewirken. Dieser Effekt ist nicht additiv. Eine genaue Untersuchung der Wirkung von Saccharose oder Ammoniumsulfat blieb offen.

## 8. Anhang

### Literaturnachweis:

Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., Vakhitov, V.A., 2003. The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)* 68, No. 9, 945-951.

Alsheikh, M.K., Heyen, B.J., Randall, S.K., 2003. Ion Binding Properties of the Dehydrin ERD14 Are Dependent upon Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 40882-40889.

Alsheikh, M.K., Svensson, J.T., Randall, S.K., 2005. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant, Cell and Environment* 28, 1114-1122.

Alsuleiman, M., 2011. Die wax9-Genfamilie: Klonierung, Expression und funktionale Charakterisierung von Lipidtransfer und Cryoprotektion. Manuskript Dissertation Freie Universität Berlin.

Bassi, R., Hinz, U., Barbato, R., 1985. The Role of the Light Harvesting Complex and Photosystem II in Thylakoid stacking in the *Chlorina-f2* Barley mutant. *Carlsberg Research Communications* 50, 347-367.

Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A.A., 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology* 148, 6-24.

Bencini, D.A., Wild, J.R., O'Donovan, G.A., 1983. Linear One-Step Assay for the Determination of Orthophosphate. *Anal. Biochem.* 132, 254-258.

Bertrand, J.A., Pignol, D., Bernard, J.P., Verdier, J.M., Dagorn, J.C., Fontecilla-Camps, J.C., 1996. Crystal structure of human lithostathine, the pancreatic inhibitor of stone formation. *The EMBO Journal* 15, 2678-2684.

Bokor, M., Csizmók, V., Kovács, D., Bánki, P., Friedrich, P., Tompa, P., Tompa, K., 2005. NMR Relaxation Studies on the Hydrate Layer of Intrinsically Unstructured Proteins. *Biophysical Journal* 88, 2030-2037.

Božović, V., 2007. Cryoprotective activity of four dehydrins expressed in *E.coli* and their influence on thylakoid membrane permeability in comparison to cryoprotectin. Freie Universität Berlin, Berlin, p. 109.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding., *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brini, F., Yamamoto, A., Jlaiel, L., Takeda, S., Hobo, T., Dinh, H.Q., Hattori, T., Masmoudi, K., Hanin, M., 2011. Pleiotropic Effects of the Wheat Dehydrin DHN-5 on Stress Responses in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* 52, 676-688.

Brunold, C., Rügsegger, A., Brändle, R. (Hrsg.), 1996, *Stress bei Pflanzen*, UTB für Wissenschaft, Verlag Paul Haupt

Charuk, J.H., Pirraglia, C.A., Reithmeier, R.A., 1990. Interaction of Ruthenium Red with Ca<sup>+</sup>-Binding Proteins. *Anal. Biochem.* 188, 123-132.

Conte, I.L., Keith, N., Gutiérrez-González, C., Parodi, A.J., Caramelo, J.J., 2007. The Interplay between Calcium and the in Vitro Lectin and Chaperone Activities of Calreticulin. *Biochemistry* 46, 4671-4680.

Crevel, R.W., Fedyk, J.K., Spurgeon, M.J., 2002. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. *Food and Chemical Toxicology* 40, 899-903.

Davies, P.L., Hew, C.L., 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. *The FASEB Journal* 4, 2460-2468.

De Reggi, M., Gharib, B., Patard, L., Stoven, V., 1998. Lithostathine, the Presumed Pancreatic Stone Inhibitor, Does Not Interact Specifically with Calcium Carbonate Crystals. *The Journal Of Biological Chemistry* 273, 4967-4971.

DeVries, A.L., 1984. Role of glycopeptides and peptides in inhibition of crystallization of water in polar fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 304, 575-588.

Dhillon, T., Pearce, S.P., Stockinger, E.J., Distelfeld, A., Li, C., Knox, A.K., Vashegyi, I., Vágújfalvi, A., Galiba, G., Dubcovsky, J., 2010. Regulation of Freezing Tolerance and Flowering in Temperate Cereals: The VRN-1 Connection. *Plant Physiology* 153, 1846–1858.

Duman, J.G., 1994 Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1206, 129-135.

Eriksson, S.K., Kutzer, M., Procek, J., Gröbner, G., Harryson, P., 2011. Tunable Membrane Binding of the Intrinsically Disordered Dehydrin Lti30, a Cold-Induced Plant Stress Protein. *The Plant Cell* 23, 2391-2404.

Ewart, K.V., Fletcher, G.L., 1993. Herring antifreeze protein: primary structure and evidence for a C-type lectin evolutionary origin. *Molecular marine biology and biotechnology* 2, 20-27.

Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoozi, S., Sarhan, F., 2001. Photoperiod and Temperature Interactions Regulate Low-Temperature-Induced Gene Expression in Barley. *Plant Physiology* 127, 1676–1681.

Fujikawa, S., Jitsuyama, Y., Kuroda, K., 1999. Determination of the Role of Cold Acclimation-Induced Diverse Changes in Plant Cells from the Viewpoint of Avoidance of Freezing Injury. *Journal of Plant Research* 112, 237-244.

Goyal, K., Walton, L.J., Tunnacliffe, A., 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical Journal* 388, 151-157.

Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.H., Grunwald, D., Macherel, D., 2005. Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying. *Plant Physiology* 137, 157–167.

Grover, A., Kapoor, A., Lakshmi, O.S., Agarwal, S., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, M., Dubey, H., 2001. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Current Science* 80, 206-216.

Hara, M., Fujinaga, M., Kuboi, T., 2005. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany* 56, 2695-2703.

Henzl, M.T., Davis, M.E., Tan, A., 2008. Divalent Ion Binding Properties of the Timothy Grass Allergen, Phl p 7. *Biochemistry* 47, 7846-7856.

Hepler, P.K., Wayne, R.O., 1985. Calcium and Plant Development. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 397-439.

Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K., 2002. The Calcium-Binding Activity of a Vacuole-Associated, Dehydrin-Like Protein Is Regulated by Phosphorylation. *Plant Physiology* 130, 675-687.

Hincha, D.K., 1984. Chemischer und mechanischer Schaden beim Gefrieren von Thylakoidmembranen in vitro. Diplomarbeit Universität Würzburg, 51.

Hincha, D.K., 1987. Die Rolle der Thylakoidmembranen bei Frostschäden und Frostresistenz von Blättern. Dissertation Universität Würzburg.

Hincha, D.K., Neukamm, B., Srór, H.A., Sieg, F., Weckwarth, W., Rückels, M., Lullien-Pellerin, V., Schröder, W., Schmitt, J.M., 2001. Cabbage Cryoprotectin Is a Member of the Nonspecific Plant Lipid Transfer Protein Gene Family. *Plant Physiology* 125, 835-846.

Hincha, D.K., Schmitt, J.M., 1985. Mechanical and chemical injury to thylakoid membranes during freezing in vitro. *Biochemica et Biophysica Acta* 812, 173-180.

Hincha, D., 2002. Cryoprotectin: a plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 357, 909-916.

Hincha, D.K., 2003. Effects of calcium-induced aggregation on the physical stability of liposomes containing plant glycolipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1611, 180- 186.

Hincha, D.K., Höfner, R., Schwab, K.B., Heber, U., Schmitt, J.M., 1987. Membrane Rupture Is the Common Cause of Damage to Chloroplast Membranes in Leaves Injured by Freezing or Excessive Wilting. *Plant Physiology* 83, 251-253.

Hincha, D.K., Schmidt, J.E., Heber, U., Schmitt, J.M., 1984a. Colligative and non-colligative freezing damage to thylakoid membranes. *Biochemica et Biophysica Acta* 769, 8-14.

Hincha, D.K., Schmitt, J.M., 1988. Mechanical freeze-thaw damage and frost hardening in leaves and isolated thylakoids from spinach. I. Mechanical freeze-thaw damage in an artificial stroma medium. *Plant, Cell and Environment* 11, 41-46.

Hincha, D.K., Schmitt, J.M., 1992. Cryoprotective Leaf Proteins: Assay Methods and Heat Stability. *Journal of Plant Physiology* 140, 236-240.



Huang, T., Duman, J.G., 2002. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Molecular Biology* 48, 339-350.

Jander, Blasius, 1995. Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum. S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig.

Kawamura, Y., Uemura, M., 2003. Mass spectroscopic approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *The Plant Journal* 36, 141-154.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1994. Characterization of Two cDNAs (ERD10 and ERD14) Corresponding to Genes That Respond Rapidly to Dehydration Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 35, 225-231.

Koag, M.C., Fenton, R.D., Wilkens, S., Close, T.J., 2003. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology* 131, 309-316.

Köhler, Schachtel, Voleske, 2007. Biostatistik. Springer, Heidelberg.

Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., Tompa, P., 2008. Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *Plant Physiology* 147, 381-390.

Kovacs, D., Agoston, B., Tompa, P., 2008a. Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signaling & Behavior* 3, 710-713.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lang, V., Palva, E.T., 1992. The expression of a rab-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant molecular biology* 20, 951-962.

Lee, B.I., Mustafi, D., Cho, W., Nakagawa, Y., 2003. Characterization of calcium binding properties of lithostathine. *Journal of biological inorganic chemistry* 8, 341-347.

Li, X., Trinh, K.Y., Hew, C.L., 1991. Expression and characterization of an active and thermally stable recombinant antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*, in *Escherichia coli*: improved expression by the modification of the secondary structure of the m-RNA. *Protein Engineering* 4, 995-1002.

Lu, P.L., Chen, N.Z., An, R., Su, Z., Qi, B.S., Ren, F., Chen, J., Wang, X.C., 2007. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 63, 289-305.

Machlon, A.E., 1984. Calcium fluxes at plasmalemma and tonoplast. *Plant Cell Environment* 7, 423-429.

Michalak, M., Miller, R., Burns, K., Opas, M., 1992. Calreticulin. *Biochemical Journal* 285, 681-692.

Miller, K.R., Cushman, R. A., 1979. A Chloroplast membrane lacking Photosystem II Thylakoid stacking in the Absence of the Photosystem II particle *Biochimica et Biophysica Acta* 546, 481-497.

Mouillon, J.M., Gustafsson, P., Harryson, P., 2006. Structural Investigation of Disordered Stress Proteins. Comparison of Full-Length Dehydrins with Isolated Peptides of Their Conserved Segments. *Plant Physiology* 141, 638-650.

Mustafi, D., Nakagawa, Y., 1996. Characterization of Ca<sup>2+</sup>-Binding Sites in the Kidney Stone Inhibitor Glycoprotein Nephrocalcin Using Vanadyl Ions: Different Metal Binding Properties in Strong and Weak Inhibitor Proteins Revealed by EPR and ENDOR. *Biochemistry* 35, 14703-14709.

Nobel, P.S., 1969. The Boyle-van't Hoff relation. *Journal of theoretical Biology* 23, 375-379.

Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B.V., 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 45, 263-279.

Orthen, B., Popp, M., 2000. Cyclitols as cryoprotectants for spinach and chickpea thylakoids. *Environmental and Experimental Botany* 44, 125-132.

Peng, Y., Reyes, J.L., Wei, H., Yang, Y., Karlson, D., Covarrubias, A.A., Krebs, S.L., Fessehaie, A., Arora, R., 2008. RcDhn5, a cold acclimation-responsive dehydrin from *Rhododendron catawbiense* rescues enzyme activity from dehydration effects in vitro and enhances freezing tolerance in RcDhn5-overexpressing *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum* 134, 583-597.

Popova, A.V., Hundertmark, M., Seckler, R., Hinch, D.K., 2011. Structural transitions in the intrinsically disordered plant dehydration stress protein LEA7 upon drying are modulated by the presence of membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1879-1887

Prickett, R.C., Elliott, J.A., Hakda, S., McGann, L. E., 2008. A non-ideal replacement for the Boyle van't Hoff equation. *Cryobiology* 57, 130-136.

Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., Palva, E.T., 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 54, 743-753.

Reyes, J.L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D.T., Covarrubias, A.A., 2008. Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell and Environment* 31, 1781-1790.

Rorat, T., 2006. Plant Dehydrins-Tissue Lokalisation, Structure and Funktion. Cellular & Molecular Biology Letters, 11, 536-556.

Santarius, K.A., 1971. The Effect of Freezing on Thylakoid Membranes in the Presence of Organic Acids. Plant Physiology 48, 156-162.

Santarius, K.A., Giersch, C., 1983. Cryopreservation of Spinach Chloroplast Membranes by Low-Molecular-Weight Carbohydrates II. Discrimination between Colligative and Noncolligative Protection. Cryobiology 20, 90-99

Santarius, K.A., 1984. Effective cryoprotection of thylakoid membranes by ATP. Planta 161, 555-561.

Schopfer, P., 1989, Experimentelle Pflanzenphysiologie, Band 2 Einführung in die Anwendungen, Springer-Verlag, Heidelberg.

Sieg, F., Schröder, W., Schmitt, J.M., Hinch, D.K., 1996. Purification and Characterization of a Cryoprotective Protein (Cryoprotectin) from the Leaves of Cold-Acclimated Cabbage. Plant Physiology 111, 215-221.

Sror, H.A., Tischendorf, G., Sieg, F., Schmitt, J.M., Hinch, D.K., 2003. Cryoprotectin protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. Cryobiology 47, 191-203.

Stressmann, M., Kitao, S., Griffith, M., Moresoli, C., Bravo, L.A., Marangoni, A.G., 2004. Calcium Interacts with Antifreeze Proteins and Chitinase from Cold-Acclimated Winter Rye. Plant Physiology 135, 364-376.

Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B., 2000. Purification of Recombinant Arabidopsis thaliana Dehydrins by Metal Ion Affinity Chromatography. Protein Expression and Purification 20, 169-178.

Taiz, L., Zeiger, E., 2006, Plant Physiology, Fourth Edition, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (9), 4350-4354

Tunnacliffe, A., Wise, M.J., 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94, 791-812.

Veeranagamallaiah, G., Prasanthi, J., Reddy, K.E., Pandurangaiah, M., Babu, O.S., Sudhakar, C., 2011. Group 1 and 2 LEA protein expression correlates with a decrease in water stress induced protein aggregation in horsegram during germination and seedling growth. *Journal of Plant Physiology* 168, 671-677.

Volger, H., Heber, U., Berzborn, R.J., 1978. Loss of Function of Biomembranes and Solubilization of Membrane Proteins during freezing. *Biochimica et Biophysica Acta* 511, 455-469.

Welin, B.V., Olson, A., Palva, E. T., 1995. Structure and organization of two closely related low-temperature-induced *dhn/lea/rab*-like genes in *Arabidopsis thaliana* L. *Heynh.* *Plant Molecular Biology* 29, 391-395.

Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.M., Griffith, M., 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*) *Physiologia Plantarum* 105, 600-608.

Yamazaki, T., Kawamura, Y., Minami, A., Uemura, M., 2008a. Calcium-Dependent Freezing Tolerance in *Arabidopsis* Involves Membrane Resealing via Synaptotagmin SYT1. *The Plant Cell* 20, 3389-3404.

Zhu, J., Dong, C.H., Zhu, J.K., 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 290-295.

Zippelius, R., 2002. Untersuchungen zum Einfrier- und Auftauverhalten pharmazeutischer Humanproteinlösungen im Großmaßstab. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München, 177.

Zöfel, P., 2002. Statistik verstehen. Addison-Wesley, München.

## **Verzeichnis der Fußnoten:**

- 1: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz , 2010, Trotz extremer Wetterlage nur geringe Ernteeinbußen in 2010. Standardbericht  
<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Agrarmarkte/Argrammarkt-in-Zahlen/Ernte2010MengenPreise.html>. (September 2011) 8
- 2: Getreideernte: Mageres Ergebnis für die Bauern  
<http://www.bauernverband.de/index.php?redid=152813&mid=434328>  
(September 2011) 8
- 3: AppliChem GmbH, Produktinformation 2011 88

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: typische Kalknadeln	27	
Abbildung 2: aufgereinigtes DH10 bei unterschiedlicher Aufschlussmethode	38	
Abbildung 3: aufgereinigte Proteine	49	
Abbildung 4a: Coomassie-gefärbtes Gel	4b: Western-Blot von DH10	58
Abbildung 5 a: Coomassie-gefärbtes Gel	5b: Western-Blot von Rab18	59
Abbildung 6: Proteinverlust durch hohe Salzkonzentrationen und einen Frier-Tau-Zyklus	82	
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Calciumsulfat-Kristallen	90	
Abbildung 8: Entfärbung von Ruthenium-Rot-gefärbten Proteinen	91	

## Diagrammverzeichnis:

Diagramm 1: Übersicht der Weizen- und Roggenernte von 2000-2010	10
Diagramm 2: <i>E. coli</i> -Fermentation und DH10 Expression	37
Diagramm 3: Überprüfung der Entsalzung von DH10	40
Diagramm 4: Überprüfung der Entsalzung von CPP	41
Diagramm 5: Überprüfung der Entsalzung von Rab18	42
Diagramm 6: DCPIP Reduktion unter Einfluss verschiedener Zusätze	44
Diagramm 7: DCPIP Reduktion Einfluss verschieden aufgereinigter DH10-Proben	45
Diagramm 8: Frostschutz in Abhängigkeit von Einfrierzyklen und Lagerungszeit	48
Diagramm 9: Einfluss der Präparationsmethode auf die Frostschutzaktivität	50
Diagramm 10: Vergleich der Frostschutzaktivität unterschiedlicher Proteine	52
Diagramm 11: Vergleich des Schutzes der zyklischen Photophosphorylierung bei einem Frier-Tau-Zyklus durch verschiedene Proteine	53
Diagramm 12: Abhängigkeit des Frostschutzes von der Proteinkonzentration	54
Diagramm 13: Relation der geschützten ATP-Synthese zu dem geschützten Thylakoidvolumen	55
Diagramm 14: Frostschutz bei steigender Saccharosekonzentration	56
Diagramm 15: Boyle van't Hoff – Inkubation 2 h bei -20 °C	61
Diagramm 16: Boyle van't Hoff – Inkubation 2 h bei 0 °C	62
Diagramm 17: Boyle van't Hoff – Inkubation 2 h bei 18 °C	64
Diagramm 18: Zeitabhängigkeit des Boyle van't Hoff-Blots	65
Diagramm 19: Zeitabhängigkeit der Steigung	66
Diagramm 20: Sedimentation von Thylakoiden bei 20 °C und 1 g	69

Diagramm 21: Sedimentationsgeschwindigkeit von Thylakoiden bei 20 °C, 1 g	70
Diagramm 22: Thylakoidaggregate nach einer Sedimentation bei 20 °C, 1 g	71
Diagramm 23: Sedimentationsgeschwindigkeit nach einem Frier-Tau-Zyklus	72
Diagramm 24: Thylakoidaggregate nach einem Frier-Tau-Zyklus und Sedimentation bei 20 °C, 1 g	73
Diagramm 25: Zyklische Photophosphorylierung bei steigender Saccharosekonzentration	75
Diagramm 26: Zyklische Photophosphorylierung bei steigendem Natriumchloridgehalt	77
Diagramm 27: Proteinkonzentrationsabhängige zyklische Photophosphorylierung bei 300 mM Natriumchlorid	78
Diagramm 28: Zyklische Photophosphorylierung bei steigendem Saccharose- und Natriumchloridgehalt	80
Diagramm 29: Änderung des apparenten Gefrierpunktes verschiedener Salzlösungen durch Zugabe von 30 µM DH10	83
Diagramm 30: Apparenter Gefrierpunkt von Calciumchloridlösung	84
Diagramm 31: Änderung des apparenten Gefrierpunktes von Calciumchloridlösung durch Proteinzugabe	85
Diagramm 32: Änderung der Osmolalität einer 400 mM Calciumchloridlösung durch Zugabe von DH10	86
Diagramm 33: Entfärbung von Ruthenium-Rot-eingefärbten Proteinen	92
Diagramm 34: Messung des apparenten Molekulargewichts	94
Diagramm 35: Gelchromatographie-Messung der Calciumaufnahme	95
Diagramm 36: Calciumchlorid-abhängiges apparentes Molekulargewicht und Calcium-Aufnahme von DH10	97

## Formelverzeichnis:

Formel 1: Frostschutz über das Thylakoidvolumen (TKV)	24
Formel 2: Summenformel der Calciumsulfat-Fällung	28
Formel 3: Schematische Darstellung der Bildung eines Calcium-EDTA-Komplexes	29
Formel 4: Summenformel der Silberchlorid-Fällung	29
Formel 5: Chlorophyllgehalt von isolierten Thylakoiden	34
Formel 6: Boyle van't Hoff-Relation	60
Formel 7: Sedimentationsgeschwindigkeit	67

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Pipettierschema für ein Laemmli Gel	25
Tabelle 2: Analyse einer 400 mM Calciumchloridlösung	88



## Abkürzungen:

Einheiten:

Volumen	L, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
Konzentrationen	mM	Millimolar
	$\mu$ M	Mikromolar
	mg/ml	Milligramm pro Milliliter
Massen	mg, $\mu$ g	Milligramm, Mikrogramm
Zeit	s, min, h	Sekunde, Minute, Stunde
Verhältnis	%	Prozent
Lichtintensität	$\mu$ E/m <sup>2</sup> /s	Mikroeinsteins pro Quadratmeter pro Sekunde
Länge	cm, $\mu$ m	Zentimeter, Mikrometer
Proteingröße	kDa	Kilo Dalton
Temperatur	°C	Grad Celsius
Osmolalität	mOsmol/kg	Milliosmol pro Kilogramm
Wellenlänge	nm	Nanometer
Proteine:	ABA	Abscisinsäure
	BSA	Rinderserum Albumin
	CF1	Chloroplast coupling factor 1
	CPP	cryoprotektives Protein
	DH10	Dehydrin namens DH10
	Rab18	Dehydrin namens Rab18
	OvA	Albumin aus Hühnerei

Chemikalien:	ADP	Adenosindiphosphat
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	ATP	Adenosintriphosphat
	BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
	DCPIP	Dichlorophenol-indophenol
	DTT	1,4-Dithiothreitol
	EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
	IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-
		thiogalactopyranosid
	NBT	p-Nitrotetrazoliumblausulfat
	PMS	Phenazinmethosulfat
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	TEMED	Tetramethylethylendiamin
	$\text{CaCl}_2$	Calciumchlorid
	KCl	Kaliumchlorid
	$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
	$\text{MnCl}_2$	Manganchlorid
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	Ammoniumchlorid
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$	Ammoniumsulfat
	Sonstiges:	ABS
Chl.		Chlorophyll
OD		Optische Dichte
TKV		Thylakoidvolumen
zPP		zyklische Photophosphorylierung

## **Bescheinigung**

gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007 des  
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne  
unerlaubte Hilfe angefertigt habe, dass ich meine Dissertation, im Falle  
der Ablehnung, nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes  
Examen verwenden werde.

08.11.2011

---

Datum

---

M.Sc. Sandra Osthoff