

**Funktionelle Charakterisierung von  
frühen Graviperzeptionsmechanismen in Pflanzen**

**Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von  
Jens Hauslage  
aus  
Bonn**

**Bonn 2008**

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. Markus Braun
2. Referentin: Prof. Dr. Dorothea Bartels

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.2008

Erscheinungsjahr 2008

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1. Der Gravitropismus	6
1.2. Das Modellsystem Chara-Rhizoid	10
1.3. Das Modellsystem Arabidopsis	14
1.4. Ziele der Arbeit	17
1.4.1. Frühe Mechanismen der Schwerkraftwahrnehmung in Höheren Pflanzen	17
1.4.2. DiBAC <sub>4</sub> (3)-Markierungen im Chara-Rhizoid	19
1.4.3. Gefrierfixierung im Parabelflug	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
2.1. Material	22
2.1.1. Pflanzenmaterial	22
2.1.2. EDV, elektronische und mechanische Komponenten	22
2.1.3. Software	22
2.1.4. Chemikalien	23
2.1.5. Laborgeräte	23
2.1.6. Optische Geräte	23
2.1.7. Fluoreszenzfarbstoffe	23
2.1.8. Lösungen und Medien	23
2.1.9. Konstruktion und Bau von Parabelflug-Experimenteinheiten	25
2.1.10. NIKON 80i Horizontal	31
2.2. Methoden	33
2.2.1. Der Parabelflug	33
2.2.2. Probenanzucht	36
2.2.3. Kontrollexperimente	38
2.2.4. Parabelflugexperimente	39
2.2.5. Fluoreszenzmarkierungen an Chara-Rhizoiden und Amaryllis-Pollenschläuchen	40
2.2.6. Carbocryonix-Anlage	41
2.2.7. RNA Extraktion	41
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
3.1. Boden- und Kontrollexperimente zur Charakterisierung des Gravirezeptors in Arabidopsis-Wurzeln	44
3.1.1. Kurze Hypergravitationsphasen haben keinen Einfluss auf die Gravireaktion von Arabidopsis-Wurzeln	44
3.1.2. Das kurzzeitige Entfernen der Statolithen vom Gravirezeptor verringert die Gravireaktion	45
3.1.3. Tabellarische Zusammenfassung aller Inversionsexperimente	48

3.1.4. Messung der Wachstumsgeschwindigkeiten von Arabidopsis-Wurzeln mit und ohne Latrunculin B-Vorbehandlung	49
3.1.5. Latrunculin B zerstört das Aktinsystem in den Statocyten von Arabidopsis-Wurzeln	51
3.1.6. Latrunculin B behandelte Arabidopsis-Wurzeln zeigen keine Hemmung in der Gravireaktion	53
<b>3.2. Charakterisierung des Gravirezeptors mit Parabelflugexperimenten</b>	<b>54</b>
3.2.1. 7. DLR Parabelflugkampagne	55
3.2.2. 42. ESA Parabelflugkampagne	56
3.2.3. 8. DLR Parabelflugkampagne	57
3.2.4. 9. DLR Parabelflugkampagne	59
3.2.5. Vergleich und Zusammenfassung aller Flugergebnisse der Parabelflugexperimente	61
3.2.6. Zusammenfassung der Parabelflugergebnisse	62
3.2.7. Vergleich aller Flugergebnisse der mit Latrunculin B behandelten Arabidopsis-Wurzeln	63
<b>3.3. Fluorimetrische Messungen mit DiBAC<sub>4</sub>(3) im Chara-Rhizoid</b>	<b>64</b>
3.3.1. Fluoreszenzgradient in Chara-Rhizoiden nach DiBAC <sub>4</sub> (3)-Markierung	64
3.3.2. DiBAC <sub>4</sub> (3)-Fluoreszenzgradient während des Wachstums	65
3.3.3. Verschwinden des DiBAC <sub>4</sub> (3)-Fluoreszenzgradient nach Latrunculin B-Behandlung	67
3.3.4. Einfluss von Gramicidin auf die DiBAC <sub>4</sub> (3)-Fluoreszenz im Chara-Rhizoid	68
3.3.5. Änderungen der DiBAC <sub>4</sub> (3)-Fluoreszenz im Chara-Rhizoid während der gravitropen Krümmung	70
3.3.6. Beeinflussung des Fluoreszenzgradienten durch Statolithen	74
3.3.7. Verfolgung fluoreszierender Partikel innerhalb der Subapikalzone	75
3.3.8. Amaryllis-Pollenschläuche	76
3.3.9. Zeitserien des Pollenschlauchwachstums	77
<b>3.4. Carbocryonix – Experimente</b>	<b>79</b>
3.4.1. Temperaturkontrollexperimente	79
3.4.2. Fixierungsqualität - RNA Bioanalyser Qualität der mRNA nach Einfrierfixierung in der Carbocryonix Anlage	80
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>83</b>
<b>4.1. Charakterisierung der Graviperzeption in Arabidopsis-Wurzeln</b>	<b>83</b>
4.1.1. Bodenkontrollexperimente	86
4.1.2. Parabelflugexperimente – Effekte kurzer Mikrogravitation auf die Graviperzeption	88
4.1.3. Analyse der Funktion von Aktin innerhalb der Statozyten während der Graviperzeption	90
<b>4.2. Membranpotentialmessungen im Chara-Rhizoid</b>	<b>93</b>
4.2.1. Depolarisierte Vesikel im Chara-Rhizoid treten nur in Verbindung mit intaktem Spitzenwachstum auf	95
4.2.2. DiBAC <sub>4</sub> (3)-Fluoreszenz in Pollenschläuchen	98

4.2.3. Depolarisierte Vesikel im Chara-Rhizoid – Ein Modell	100
<b>4.3. Carbocryonix - Gefrierfixierung während Parabelflügen</b>	<b>101</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>6. QUELLEN</b>	<b>106</b>
6.1. Literatur	106
6.2. Internet	113
<b>7. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>114</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Der Gravitropismus

Aufgrund ihrer vorwiegend sessilen Lebensweise sind Pflanzen besonders darauf angewiesen, sich an sich ändernde Umweltbedingungen anzupassen, um ihr Überleben zu sichern. Dabei ist die Orientierung der Pflanze und ihrer Organe im Raum von zentraler Bedeutung. Bewegungen sessiler Organismen, die sich an äußeren Reizen orientieren, werden als Tropismen bezeichnet. Beispiele sind Phototropismus (Ausrichtung nach Licht), Hydrotropismus (Ausrichtung nach Feuchtigkeit), Chemotropismus (Ausrichtung nach chemischen Gradienten). Als Gravitropismus bezeichnet man dementsprechend die Fähigkeit der Pflanzen, sich am Schwerkraftvektor zu orientieren. Die Fähigkeit der Schwerkraftwahrnehmung spielt bereits in der frühen Entwicklung der Pflanze eine wichtige Rolle (Sievers et al. 2002). Die primäre Ausrichtung von Spross- und Wurzelanlagen nach der Schwerkraft ist genetisch vorprogrammiert und erfolgt bei einem keimenden Samen bereits in der Erde. Wurzeln, die die Pflanze im Sediment festigen und mit Nährstoffen und Wasser versorgen, wachsen positiv gravitrop, d.h. in Richtung Erdmittelpunkt. Sprosse wachsen negativ gravitrop, d.h. nach oben, damit die Blätter das Sonnenlicht zur Photosynthese optimal nutzen können. Dabei spielt der Phototropismus, die Fähigkeit sich nach dem Licht zu richten, meist eine untergeordnete Rolle.

Die Erdschwerkraft ( $g$ ) ist der älteste und zudem einzig konstante Reiz, der über den gesamten Zeitraum der Evolution auf der Erde wirkte (Morey-Holton 2003). Andere Umwelteinflüsse wie Strahlung, Atmosphäre, Temperatur, Bodenstruktur usw. haben sich im Laufe der Erdzeitalter stark verändert. Die Erdanziehung wirkt mit einer durchschnittlichen Beschleunigung von  $9,81 \text{ m/s}^2$  auf alle Massen. Durch den ungleichmäßigen Aufbau der Erde und durch die erhöhte Zentrifugalkraft am Äquator kommt es zu Unregelmäßigkeiten im Gravitationsfeld der Erde. Diese geringen Unterschiede können jedoch bei der Betrachtung der Schwerkraftwahrnehmung bei Pflanzen vernachlässigt werden. Ohne den Gravitropismus der Pflanzen wäre die Entwicklung des Lebens, wie wir es heute kennen, nicht möglich gewesen.

Der Gravitropismus wird in mehrere Phasen eingeteilt (Salisbury 1993):

1. Suszeption: Bei der Suszeption werden Massen physikalisch bewegt, die Teil eines Perzeptionsapparates sind. Im Falle der Pflanzen sedimentieren schwere Partikel (Statolithen) in schwerkraftwahrnehmenden Zellen, den Statozyten, in der Richtung des  $g$ -Vektors. Kommt es zu einer Umorientierung der Pflanze, folgen die Statolithen der Änderung des  $g$ -Vektors und sedimentieren auf die physikalische Unterseite der Zellen.
2. Perzeption: Die Perzeption bezeichnet die Umwandlung des physikalischen Vorgangs (d.h. die Sedimentation der Statolithen) in ein für die Zelle verarbeitbares Signal. Die Umwandlung des physikalischen Reizes wird durch Rezeptoren vermittelt, die ein physiologisches Signal innerhalb der Zelle generieren.
3. Transmission: Als Transmission bezeichnet man die Weiterleitung des bei der Perzeption entstandenen Signals zum Ort der Reaktion. Bei den Wurzeln Höherer Pflanzen erfolgt die Übertragung des Signals von der Wurzelspitze zur Elongationszone der Wurzel, dem Ort des differenziellen Flankenwachstums. In einzelligen Systemen wie dem Chara-Rhizoid kommt es zu keiner interzellulären Transmission, da hier das Signal zellintern verarbeitet wird.
4. Gravireaktion: Die Gravireaktion ist die Antwort eines Pflanzenorgans auf die räumliche Lageänderung in Bezug zum Schwerkraftvektor und zeigt sich z.B. in der Krümmung von Wurzeln und Sprossen.

Die Statolithen Höherer Pflanzen sind mit Stärke gefüllte Amyloplasten, die in Richtung der Schwerkraft sedimentieren und so als Suszeptoren für den Schwerkraftvektor dienen. Statolithen kommen unter anderem in den Statozyten der Wurzelcolumella und der Stärkescheide im Spross vor. Der morphologische Aufbau der Statozyten ermöglicht den Statolithen eine große Bewegungsfreiheit, da der Kern oberhalb der Sedimentationszone aufgehängt ist und so nicht die Lageänderung der Statolithen behindert (Sievers et al. 2002).

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts begannen Wissenschaftler mit der Untersuchung des Gravitropismus. Haberland (1900) und Nêmec (1900) wiesen nach, dass die Suszeptoren für die Schwerkraftwahrnehmung die mit Stärke gefüllten Amyloplasten in den Zellen der Endodermis und der Wurzelspitze sind. Versuche mit starken, homogenen magnetischen Feldern, in denen die Statolithen als diamagnetische Partikel bewegt werden können, haben gezeigt, dass die reine Bewegung von Statolithen in den Statozyten für eine Krümmung der Wurzel ausreicht (Kuznetsov und Hasenstein 1996, 1997; Kuznetsov et al. 1999). Durch den Vergleich der gravitropen Reaktionen von

Wildtypen und Mutanten, die ein Defizit in der Stärkeproduktion aufweisen, konnte nachgewiesen werden, dass Pflanzen die weniger Stärke in den Amyloplasten einlagern eine deutlich langsamere gravitrope Reaktion zeigten (Kiss et al. 1996; MacCleery and Kiss 1999; Weise und Kiss 1999).

Im Gegensatz zu den gut untersuchten gravitropen Reaktionen (Tasaka et al. 1999; Boonsirichai et al. 2002; Masson et al. 2002), sind die Perzeptionsmechanismen der Wahrnehmung der Schwerkraftrichtung in Pflanzen jedoch weitgehend ungeklärt (Sack 1997; Boonsirichai et al. 2002; Sievers et al. 2002; Blancaflor et al. 2003; Braun und Limbach 2006). Die zellulären Vorgänge der Perzeption betreffend, werden zwei Hypothesen diskutiert -die Stärke-Statolithen-Theorie, die als Suszeptoren die Statolithen annimmt und die Zytoplasma-Druck-Theorie, die das gesamte Zytoplasma mit sämtlichen Organellen als Suszeptor betrachtet (Sack 1997; Staves et al. 1997). Einige Arabidopsis-Mutanten die keine Stärke in die Amyloplasten einlagern oder keine Endodermis besitzen reagieren nicht mehr auf gravitrope Reize (Tasaka et al. 1999). Die Experimente von Kuznetsov und Hasenstein (1996) mit magnetischen, hochgradienten Feldern weisen ebenfalls darauf hin, dass die Statolithen wesentlich am Gravitropismus beteiligt sind. Diese Befunde trugen dazu bei, dass die Stärke-Statolithen-Theorie heute allgemein anerkannt ist (Sievers et al. 2002).

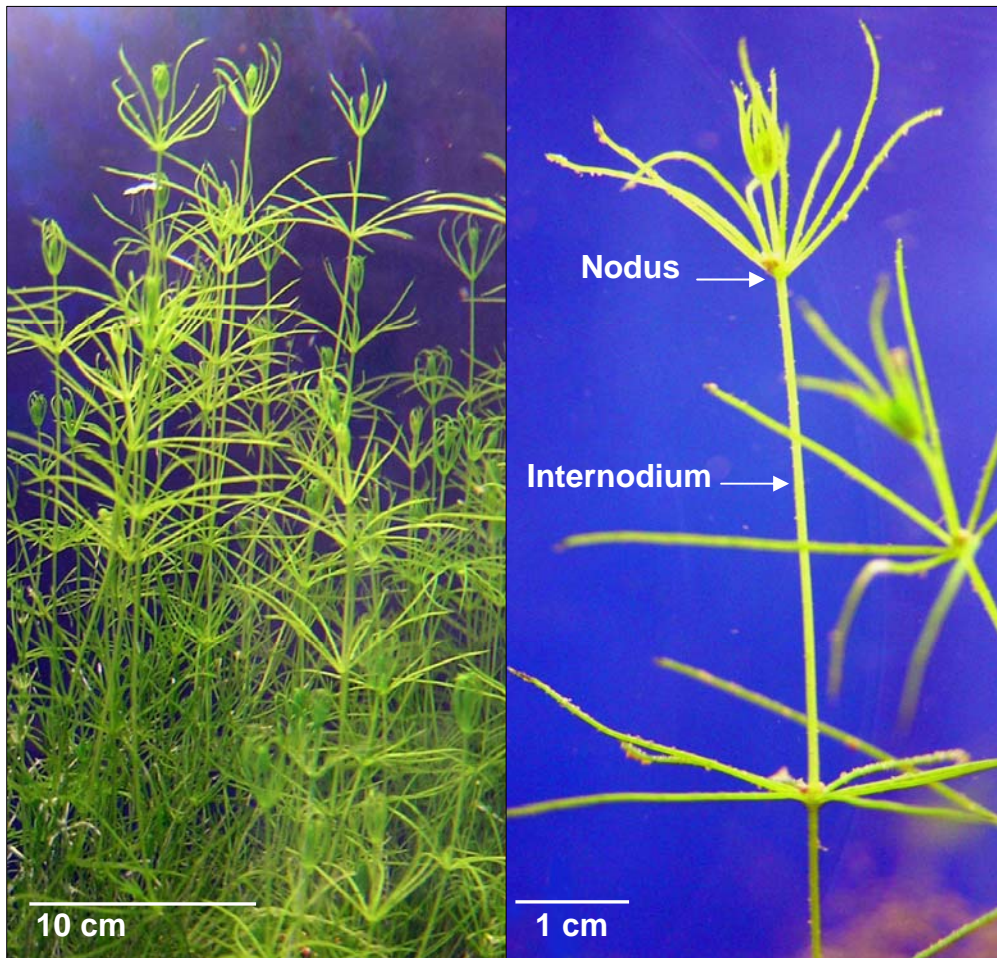
Das Rhizoid der Grünalge Chara ist für die Untersuchung des Gravitropismus in Pflanzen ein sehr geeignetes Modellsystem. Alle Prozesse des Gravitropismus von den ersten zellulären Prozessen der Schwerkraftwahrnehmung bis zur Krümmungsreaktion des Rhizoids laufen in einer Zelle ab und können sehr gut mikroskopisch untersucht werden. Die in Chara-Rhizoiden vorkommenden Statolithen sind mit Bariumsulfat gefüllte Vakuolen (Schröter et al. 1975). Die Notwendigkeit von Statolithen für den Gravitropismus in Chara-Rhizoiden wurde durch Versuche eindeutig belegt (Braun 2002). Dabei spielt das Aktinzytoskelett eine entscheidende Rolle bei der Graviperzeption der Rhizoide. Experimente in Mikrogravitation haben gezeigt, dass das Aktomyosinsystem die Statolithen entgegen der Schwerkraft nach oben anzieht (Volkman et al. 1991). Im wachsenden Rhizoid verrechnen sich akropetale und basipetale Actomyosinkräfte mit der Anziehung der Schwerkraft so, dass es zu einem dynamisch stabilen Gleichgewicht und einer Positionierung der Statolithen auf einer Höhe von ca. 20-50µm oberhalb des Apex kommt (Braun 2002). Auf der Erde sorgt das Aktomyosinsystem für eine Positionierung während der Sedimentation zum Ort der



Gravirezeptoren. Diese Gravirezeptoren sind in einem Gürtel von 5-45 µm vom Apex her im Rhizoid angeordnet (Braun und Sievers 1993; Braun und Limbach 2006). Zentrifugations- und Laserpinzettenexperimente haben gezeigt, dass nur in dieser Zone Statolithen durch direkten Kontakt eine gravitrope Reaktion auslösen werden kann (Braun 2002). Durch Experimente unter Mikrogravitationsbedingungen wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Rezeptorproteine in der Plasmamembran des Chara-Rhizoids nicht durch Druck –also durch das Gewicht der Statolithen- erfolgt, sondern "schwerelose" Statolithen allein durch den direkten Kontakt die Rezeptoren aktivieren (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Somit handelt es sich bei dem Gravirezeptor dieser niederen Pflanze um ein Rezeptorprotein, das durch direkte chemische oder elektrophysikalische Wechselwirkungen aktiviert wird, und keine mechanische Kraft zur Aktivierung benötigt, wie oft spekuliert wurde (Perbal und Driss-Ecole 2003; Perbal et al. 2005).

Der erste Teil meiner Arbeit erweitert die bereits am Chara-Rhizoid gewonnenen Erkenntnisse um eine Untersuchung der frühen Graviperzeptionsmechanismen in Höheren Pflanzen am Modellsystem Arabidopsis. Mittels Experimenten unter Mikrogravitationsbedingungen in Form von Parabelflugexperimenten mit Arabidopsis-Keimlingen konnte die Aktivierung des Gravirezeptors charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die Aufgabe des Aktinzytoskeletts während der Graviperzeption genauer analysiert werden. Als weiterführende Arbeit, die auf der Grundlage von Parabelflugexperimentergebnissen beruht, wurden die Membranpotentiale im Chara-Rhizoid mittels eines membranpotentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs (DiBAC<sub>4</sub>(3)) während des Wachstums und der gravitropen Krümmung untersucht. Diese Experimente wurden auch auf Pollenschläuche als weitere Vertreter spitzenzwachsender Zellen ausgedehnt. Darüber hinaus wurde ein Experimentmodul für Parabelflüge konzipiert und konstruiert, mit dessen Hilfe Proben während des Parabelflugs an Bord des A300-Zero-G innerhalb weniger Sekunden eingefroren werden können. Die Auswirkungen der verschiedenen Beschleunigungen des Parabelflugprofils auf das Genexpressionsmuster sowie auf Proteinmodifikationen von Pflanzen, wie z.B. von Arabidopsis-Keimlingen, kann so später im Labor untersucht werden. Auf diese Weise ist es möglich gezielt Komponenten des schwerkraftabhängigen Signalwegs zu identifizieren und deren Rolle bei der Ausrichtung der Pflanzenorgane nach der Schwerkraft zu bestimmen.

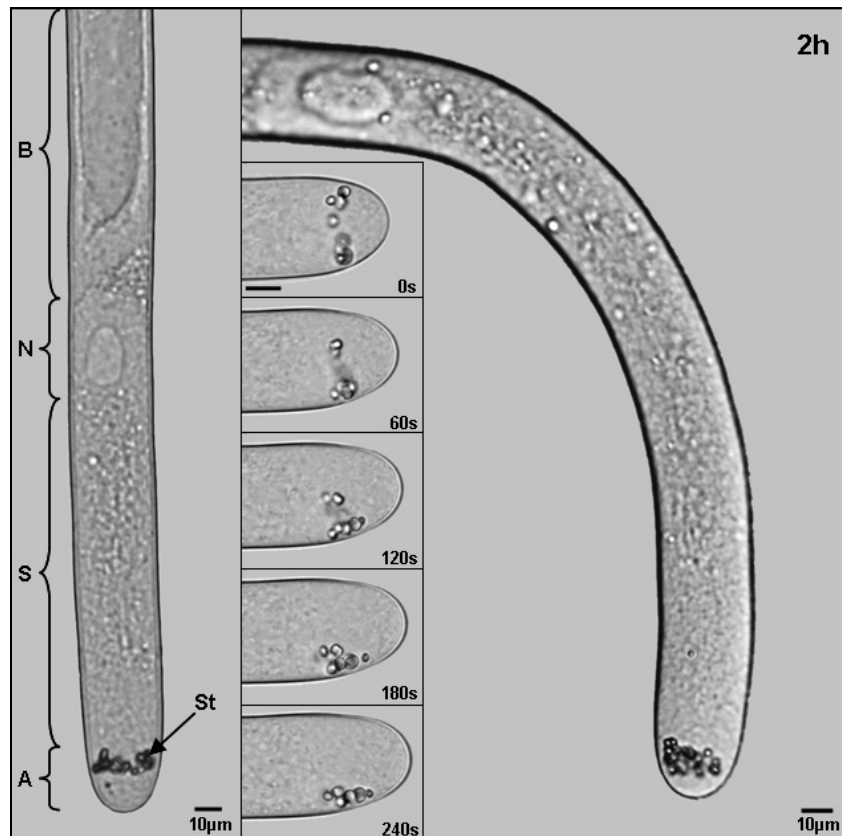
## 1.2. Das Modellsystem Chara-Rhizoid



**Abb. 1:** Die Armleuchteralge *Chara globularis* Thuill. Das linke Bild zeigt den gesamten Thallus in der natürlichen Umgebung eines stehenden Süßgewässers. Das rechte Bild zeigt den Aufbau des Thallus, der in Nodi und Internodialesegmente eingeteilt ist. Die Nodi sind der Ursprungsort der Rhizoide, die die Alge im Sediment verankern.

Die Grünalge *Chara globularis* Thuill. ist eine Armleuchteralge aus der Familie der *Charophyceae*, die sechs rezente Gattungen mit über 400 Arten umfasst. Spezies der Gattung *Chara* kommen weltweit mit Ausnahme der Polargebiete sowohl im Salz-, Brack- und Süßwasser vor. Der Großteil der Arten lebt im stehenden oligotrophen Süßwasser. *Chara globularis* gehört zu den Pionierpflanzen und besiedelt als eine der ersten Algen neu geschaffene stehende Gewässer. Der Algenthallus ist in Knoten (Nodi) aus Knotenzellen mit den daraus entspringenden Thallusarmen und langen Internodialzellen in abwechselnder Reihenfolge unterteilt (Siehe Abb. 1). Knotenzellen haben die Fähigkeit Rhizoide zur Befestigung des Thallus im Sediment sowie Protonemata zur Regeneration der Alge zu bilden. Rhizoide erfüllen keine

Wurzelfunktion hinsichtlich der Nährstoffaufnahme; sie dienen der Befestigung der Alge im Sediment. Wird eine Alge verschüttet, bildet sie in Dunkelheit Protonemata aus, die negativ gravitrop zurück zum Licht wachsen. Protonemata sind ebenfalls Einzelzellen und besitzen wie Chara-Rhizoide Statolithen zur Wahrnehmung der Schwerkraft. Trifft blauwelliges Licht auf ein Protonema, beginnt die Zellteilung sowie die Regeneration der gesamten Alge aus einer Protonema-Zelle (Hodick 1993).



**Abb. 2:** Das Chara-Rhizoid. Im linken Bild werden die Abschnitte gezeigt, in die das Chara-Rhizoid eingeteilt wird. Die Apikalzone (A) mit den Statolithen (St), die Subapikalzone (S), die Kernregion (N) und die Basalzone mit einer großen Vakuole, um die herum eine Plasmaströmung zur Versorgung der unteren Bereiche verläuft. Zudem erkennt man, dass die Statolithen nicht in die Zellspitze sinken, sondern auf einer Ebene ca. 15-30µm oberhalb des Apex gehalten werden. Die mittlere Bildserie zeigt die Sedimentation der Statolithen, nachdem ein Rhizoid um 90° gedreht wurde (Angabe der Zeit nach Horizontallage in Sekunden). Der Gravitationsvektor ist in allen Abbildungen zum unteren Bildrand ausgerichtet. Das rechte Bild zeigt ein Chara-Rhizoid 2h nach Horizontallage. Es hat sich in Bezug zum Schwerkraftvektor positiv gravitrop ausgerichtet. Die schwarzen Balken im oberen Bild entsprechen je 10µm.

Rhizoide sind Einzelzellen mit Spitzenwachstum, die eine Länge von mehreren Zentimetern und einem Durchmesser von 25-30µm erreichen. Das Spitzenwachstum von Zellen ist im Reich der Tiere, Pilze und Pflanzen weit verbreitet. Dabei handelt es sich um die lokale Expansion einer Zelle, die im Wachstum einer schlauchförmigen Zelle endet,

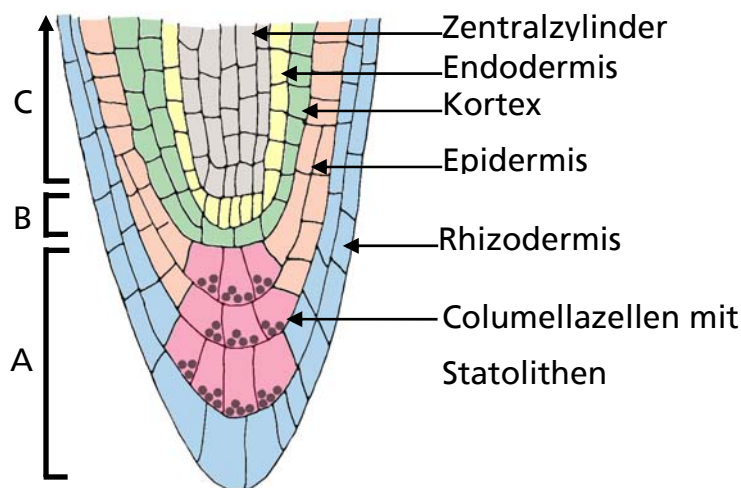
wie sie bei Pilzhyphen, Wurzelhaaren, Pollenschläuchen und Rhizoiden beobachtet werden kann (Garill et al. 1993; Wymer et al. 1997; Hepler 1997; Braun und Richter 1999). Diese Zellen weisen eine polarisierte Organisation des Zytoplasmas, der Organellen und des Zytoskeletts auf, welches maßgeblich für den Transport und den Einbau von Vesikeln im Apex und somit für das Spitzenwachstum verantwortlich ist (Sievers et al. 1996; Geitmann und Emmons 2000; Hepler et al. 2001; Limbach et al. 2008). Das Rhizoid wird in vier Abschnitte unterteilt. Die ca. 30µm lange Apikalzone befindet sich in der Zellspitze. In dieser Zone befindet sich der Spitzenkörper, der mit seiner hoch dynamischen und hoch organisierten Struktur das Spitzenwachstum reguliert (Braun und Limbach 2006). Etwa 10µm oberhalb des Spitzenkörpers befinden sich die mit Bariumsulfat gefüllten Statolithen, die jedoch auch Anteile an weiteren zweiwertigen Ionen wie Strontium und Calcium aufweisen (Sievers und Schmitz 1982). Die Statolithen sind von einer Vakuolenmembran umgeben (Kiss und Staehelin 1993; Wang-Cahill und Kiss 1995). Das Bariumsulfat in den Statolithen ist in eine Proteinmatrix eingelagert und besitzt eine Dichte von ca. 4,5g/cm<sup>3</sup> -ideale Voraussetzung für eine schnelle Sedimentation der Statolithen im Zytoplasma (Schröter et al. 1975). Wie Abb. 2 zu sehen ist, werden die Statolithen in einer Zone von 15-30µm oberhalb des Zellapex positioniert (Hejnowicz und Sievers 1981; Sievers et al. 1991; Braun und Sievers 1993; Braun 1996; Braun 2002). Dabei wirkt das Aktomyosinsystem als positionierende Kraft, welche die Statolithen immer zum Ort der Gravirezeptoren leitet (Sievers et. al. 1996; Braun 2002). Versuche mit aktindepolymerisierenden Substanzen wie Cytochalasin D oder Latrunculin B zeigten, dass ohne ein funktionelles Aktinsystem eine Positionierung der Statolithen und eine Gravireaktion nicht mehr stattfindet (Braun et al. 2002, 2004). Nur in der Zone 15-50µm oberhalb des Apex können Statolithen eine Gravireaktion durch Aktivierung von Rezeptorproteinen in der Plasmamembran auslösen (Braun 2002). Durch jede Auslenkung des Rhizoids aus seiner ursprünglichen Lage kann eine gravitrope Krümmung hervorgerufen werden. Nach der Sedimentation der Statolithen auf die untere Plasmamembran wird ein Gravirezeptor aktiviert. Dabei benötigt der Gravirezeptor keinen mechanischen Druck zur Aktivierung, sondern wird durch elektrische und/oder molekulare Interaktionen aktiviert (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Die Aktivierung des Rezeptors setzt eine spezifische Signalkaskade in der Zelle in Gang, die in der Folge zu einer Beeinflussung des Calciumgradienten in der Rhizoidspitze führt. Es werden weniger sekretorische Vesikel auf der Zellunterseite

eingebaut, so dass es zu einer Krümmung entgegen des Schwerkraftvektors durch differenzielles Flankenwachstum kommt (Braun und Limbach 2006). Nach ca. 2-4h hat sich das Rhizoid um 90° gekrümmt und wächst weiter positiv gravitrop in Richtung Erdmittelpunkt.

Das Chara-Rhizoid ist ein sehr geeigneter Modellorganismus zur Untersuchung aller Vorgänge des Gravitropismus in Niederen Pflanzen. Die transparente Eigenschaft der relativ großen Zelle lässt eine mikroskopische Beobachtung der zellulären Vorgänge des Gravitropismus leicht zu. Als eine der stammesgeschichtlich jüngsten Grünalgen wird Chara, welche als Vorläufer unserer heutigen Landpflanzen betrachtet wird, eine besondere Stellung bei der Untersuchung evolutionsbiologischer Entwicklungen in Bezug auf die Schwerkraftwahrnehmung zugesprochen (Braun und Limbach 2006).

### 1.3. Das Modellsystem Arabidopsis

*Arabidopsis thaliana* L., die Ackerschmalwand, gehört zur Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler). Arabidopsis ist in den letzten Jahren ein weit verbreitetes Modellsystem für Höhere Pflanzen geworden, welches insbesondere für molekularbiologische Untersuchungen genutzt wird. Das gesamte Genom ist sequenziert und es existieren zahlreiche Mutanten, so dass sich Arabidopsis auch zu einem geeigneten Modelorganismus für die Untersuchung der Schwerkraftwahrnehmung etabliert hat. Im Gegensatz zum Chara-Rhizoid handelt es sich bei der Arabidopsis-Wurzel allerdings um ein mehrzelliges Organ, in dem die Prozesse der schwerkraftabhängigen Signalkette an verschiedenen Orten stattfinden. Suszeption und Perzeption finden innerhalb der Columellazone statt. Die Transmission des spezifischen physiologischen Signals erfolgt von den Statozyten der Columellazone basalwärts zur Streckungszone der Wurzel.



**Abb. 3:** Eine schematische Abbildung einer Arabidopsis-Wurzel. Die Wurzelspitze kann in folgende Gewebe von innen nach außen eingeteilt werden: Der Zentralzylinder, die Endodermis, der Kortex, die Epidermis und die Rhizodermis. Die Columellazone (rot) umfasst die Schwerkraft wahrnehmenden Zellen (Statozyten), die sedimentierbare Statolithen (Amyloplasten) enthalten. Innerhalb der Wurzelspitze (A) findet demnach die Graviperzeption statt. Das Meristem im Bereich B bildet den Bereich der Zellteilung. Die Zone C entspricht der distalen Elongationszone, in der die eigentliche Gravireaktion stattfindet –die Krümmungsantwort durch differenzielles Zellwachstum.

Die Statozyten in der Columellazone beinhalten mit Stärke gefüllte Amyloplasten, welche bei einer Lageänderung der Wurzel sedimentieren. Dies deckt sich mit der Stärke-Statolithen-Theorie (Nêmec 1990; Haberland 1900). Bei Arabidopsis-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, Stärke in die Amyloplasten einzulagern, konnte auch

nach längerer Gravistimulation keine Krümmung der Wurzeln beobachtet werden (Caspar und Pickard 1989; Kiss et al. 1989; Kiss et al. 1996). Gleiche Effekte wurden auch durch die Zerstörung der Columellazellen erzielt (Blancaflor et al. 1998). Weiterhin zeigten Experimente mit starken magnetischen Feldern, dass durch eine exogen induzierte Verlagerung der diamagnetischen Statolithen eine Krümmung auch dann ausgelöst werden kann, wenn sich die Wurzel in vertikaler Richtung und somit zum Schwerkraftvektor hin ausgerichtet hat (Kuznetsov und Hasenstein 1996). Die Transmission des in den Columellazellen erzeugten Signals zu den Geweben innerhalb der Streckungszone ist gut untersucht (Tasaka et al. 1999; Masson et al. 2002; Blancaflor und Masson 2003; Ottensschläger et al. 2003; Perrin et al. 2005; Morita und Tasaka 2004). Die Sedimentation der Statolithen nach einer Lageänderung könnte eine Umverteilung oder eine Inhibierung und/oder eine Aktivierung von Ionenkanälen bewirken. Es werden Calciumkanäle vermutet, welche durch eine Änderung der zellinternen Calciumkonzentration Proteine hemmen oder aktivieren. Es konnte beobachtet werden, dass es bei der Gravireaktion zu schnellen Änderungen des pH-Werts innerhalb der Zellen kommt, die wahrscheinlich eine Änderungen in der Ionenkonzentration und/oder eine Änderung der Membranspannung auslösen (Scott und Allen 1999; Fasano et al. 2001). Durch die Wurzel fließt ein Auxinstrom, der das Wachstum der Wurzel reguliert. Er verläuft vom Zentralzylinder über die Columellazone und wird wieder lateral zu beiden Seiten der Endodermis in Richtung Spross transportiert. In der vertikal wachsenden Wurzel fließt dieser Strom symmetrisch zu allen Seiten der Wurzel. Eine Veränderung der Lage abweichend von der natürlichen Ausrichtung der Wurzel in Bezug auf den Schwerkraftvektor führt zur Sedimentation der Statolithen und zur Auslösung einer schwerkraftabhängigen Signalkaskade in den Statozyten der Wurzelspitze. Es kommt zu einer Umverteilung des Auxinstroms auf die physikalische Unterseite der Wurzel. Der asymmetrische Auxinfluss hat ein differenzielles Flankenwachstum der Wurzel zur Folge, welches die gravitrope Krümmung bedingt (Kimbrough et al. 2004; Palme et al. 2006). Die Verteilung des Auxinstroms wird sehr wahrscheinlich durch die Umlagerung von Auxintransportern (PIN- und AUX-Proteine) in den Statozyten der Columellazone hervorgerufen.

Die Columellazone spielt eine entscheidende Rolle bei der Schwerkraftwahrnehmung und der physiologischen Verarbeitung des Schwerkraftsignals in Wurzel. Obwohl bei den oben genannten Versuchen sowohl nach der Entfernung der Wurzelspitze als auch

bei stärkefreien Mutanten keine normale Wurzelkrümmung mehr zu beobachten war, konnten Anzeichen für die Wahrnehmung von Schwerkraft beobachtet werden (Caspar und Pickard 1989; Blancaflor et al. 1998). Diese lassen vermuten, dass auch noch weitere Zellen und/oder Gewebe oberhalb der Wurzelspitze in der Lage sind, Schwerkraft wahrzunehmen und auf eine Lageänderung der Wurzel zu reagieren. Experimente mit einem speziellen Rotationsgerät (ROTATO), welches in der Lage ist Wurzeln während der Krümmung vektoriell so nachzuführen, dass die Wurzelspitze immer vertikal ausgerichtet bleibt, haben gezeigt, dass die Krümmung, einmal ausgelöst, unter diesen Bedingungen fortgesetzt wird (Mullen et al. 2000; Wolverson et al. 2002). Dabei befinden sich die Wurzelspitze in vertikaler, die Streckungszone und der obere Teil der Wurzel in horizontaler Ausrichtung. Versuche mit Laser-Ablation oder stärkefreien Mutanten müssen somit sehr kritisch betrachtet werden, da es Anzeichen dafür gibt, dass neben dem Schwerkraft wahrnehmenden System der Statozyten in der Columellazone noch andere, zusätzlich graviperzipierende Zellen in der Streckungszone der Wurzeln existieren.

Ein anderes Prinzip der Schwerkraftwahrnehmung beinhaltet die Protoplasten-Theorie, welche als Suszeptor den gesamten Protoplasten der Zelle annimmt. Durch eine Lageänderung der Zellen kommt es zu einer Umverteilung des Drucks auf die Plasmamembran und somit zur Auslösung eines physiologischen Signals durch das Öffnen mechanosensitiver Kanäle (Edwards und Pickard 1987). Dieses Prinzip wird für die Internodialzellen von *Chara* angenommen, die ebenfalls in der Lage sind, Schwerkraft wahrzunehmen und auf eine Lageänderung zu reagieren, obwohl diese keine Statolithen enthalten (Staves 1997). Die Protoplasten-Theorie könnte somit ein ergänzendes System beschreiben.



## **1.4. Ziele der Arbeit**

### **1.4.1. Frühe Mechanismen der Schwerkraftwahrnehmung in Höheren Pflanzen**

#### **1.4.1.1. Charakterisierung des Gravirezeptors in Arabidopsis-Wurzeln**

Die Schwerkraft ist eine physikalische Kraft, die durch die Anziehung zweier Massen entsteht. Damit ein Organismus Schwerkraft wahrnehmen kann, muss dieser über frei bewegliche Suszeptoren verfügen, die durch die Schwerkraft angezogen werden können. Um in der Zelle ein eindeutiges Signal zu erzeugen, muss dieses vom Gesamtenergiebetrag oberhalb der Energie des thermischen Rauschens liegen. Das Spektrum der Brown'schen Molekularbewegung beinhaltet Energien bis  $2 \times 10^{-21}$  J (Markl 1982). Daher sind Körper, die kleiner als  $0,5 \mu\text{m}$  sind, als Suszeptoren ungeeignet, da hier zu kleine Energien frei werden, die die Zelle nicht als alleinstehendes Ereignis identifizieren kann. Zudem muss der Dichteunterschied zwischen Suszeptor und umgebenden Medium mindestens  $0,03 \text{g/cm}^3$  betragen, um durch Sedimentation genügend Energie für die Signalwahrnehmung frei werden zu lassen (Todd 1992). Amyloplasten in den Statozyten von Arabidopsis z.B. genügen diesen Anforderungen (Björkmann 1988).

Sedimentierende Statolithen in den Statozyten müssen mit einem Rezeptor interagieren, um die frei werdende Energie ihrer Sedimentation in ein physiologisches Signal umzuwandeln. Der Rezeptor muss dabei in einer Membran lokalisiert sein; ein freier Rezeptor würde den Anforderungen zur Verarbeitung eines Signals nicht erfüllen. Unterschiedliche Mechanismen der Gravirezeptoraktivierung sind hier denkbar. Kontaktrezeptoren werden allein durch die örtliche Nähe eines molekularen Partners aktiviert, Mechanorezeptoren hingegen benötigen zur Aktivierung einen physikalischen Druck oder Zug, der durch die Verlagerung der Statolithenmasse erzeugt wird. Kontaktrezeptoren können z.B. durch funktionelle Gruppen eines Proteins und deren Wechselwirkungen aktiviert werden. Dabei braucht keine physikalische Kraft zu wirken, sondern es kommt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die zum Freilegen z.B. eines aktiven Zentrums oder der Öffnung einer Pore führt. Auch Liganden können durch eine temporäre Bindung an ein Protein dessen Gestalt verändern und es in seiner Funktion beeinflussen. Die mit Liganden gekoppelten Ionenkanäle sind ein Beispiel

dafür. Außerdem gibt es Ionenkanäle, die sich durch elektrische Signale in ihrem Status verändern lassen (Alberts et al. 1995). Die Reizweiterleitung in *Dionea muscipula* ist ein bekanntes Beispiel für die Funktion von spannungsgesteuerten Ionenkanälen (Hodick und Sievers 1988).

Mechanorezeptoren besitzen funktionelle Einheiten, die sich durch mechanische Kräfte verformen lassen. Durch diese Verformung können z.B. Kanäle geöffnet werden, um Ionen passieren zu lassen. Dabei können sowohl Druck als auch Zug den Rezeptor aktivieren. Es ist vorstellbar, dass Zugkräfte durch Verbindungen mit dem Zytoskelett vermittelt werden, wenn der Rezeptor nicht über eine direkte Bindungsstelle am Rezeptor verfügt. Bis heute liegen jedoch nur widersprüchliche Ergebnisse zur Untersuchung der Gravirezeptoraktivierung vor (Sievers et al. 1991; Blancaflor 2002; Hou et al. 2004).

Das Hauptthema der vorliegenden Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung der Gravirezeptoraktivierung in Arabidopsis-Wurzeln als Vertreter der Höheren Pflanzen. Im Mittelpunkt steht die Fragestellung, ob zur Aktivierung der Gravirezeptoren in den Wurzelstatozyten physikalischer Druck notwendig ist, oder ob der Kontakt zwischen den sedimentierten Statolithen und dem Gravirezeptor hinreichend für die Aktivierung des Schwerkraftrezeptors ist. Zu diesem Zweck wurden Experimente unter normalen Schwerkraftbedingungen (Bodenkontrollen) sowie unter veränderten Schwerkraftbedingungen (Parabelflugexperimente) durchgeführt. In den kurzen Phasen der Mikrogravitation während eines Parabelflugs sind die Statolithen in den Statozyten schwerelos, liegen jedoch noch in direktem Kontakt zu den membrangebundenen Gravirezeptoren, so dass diese weiter aktiviert werden würde, wenn es sich um Kontakt aktivierte Rezeptoren handelt.

#### **1.4.1.2. Aufgabe des Aktinzytoskeletts bei der Aktivierung des Gravirezeptors**

In vielen älteren Publikationen geht man davon aus, dass es sich bei den Gravirezeptoren um mechanosensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle handelt, die durch den Druck auf das Aktinzytoskelett geöffnet werden. Zudem wird angenommen, dass Kanäle gleichzeitig durch Zugkräfte, die das Aktinzytoskelett vermittelt, aktiviert werden (Perbal und Driss-Ecole 2003). Diese Annahme wird jedoch durch Experimente widerlegt in denen Arabidopsis-Pflanzen trotz zerstörtem Aktinsystems eine, meist größere, Krümmung der Wurzelspitze nach gravitroper Reizung zeigen (Yamamoto und Kiss 2002; Hou et al. 2003). Nach der

Zerstörung des Aktinsystems sollte es zu keiner mechanischen Weiterleitung von Kräften über Aktinfilamente kommen, so dass eine gravitrope Antwort nicht mehr möglich ist. Welche genaue Rolle das Aktinzytoskelett bei der Graviperzeption in Höheren Pflanzen spielt ist bis heute jedoch unklar. Daher ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zur Aufklärung der Funktion des Aktinzytoskeletts bei der Schwerkraftwahrnehmung in den Wurzeln Höherer Pflanzen entscheidend beizutragen. Dafür wurde das Aktinsystem in Boden- und Parabelflugexperimenten mittels einer aktindepolymerisierende Substanz, Latrunculin B (Lat B), zerstört. Ist das Aktinzytoskelett zerstört, sollte keine bzw. eine schwächere Gravireaktion im Vergleich mit Kontrollproben zu beobachten sein, wenn davon ausgegangen wird, dass das Aktin eine essenzielle Rolle bei der Graviperzeption übernimmt. In Parabelflugexperimenten wurden die Gravireaktionen von Latrunculin B behandelten *Arabidopsis wassilewskija* Wurzeln gegen behandelte Kontrollproben verglichen, die auf einer 1g-Referenzzentrifuge geflogen wurden.

#### 1.4.2. DiBAC<sub>4</sub>(3)-Markierungen im Chara-Rhizoid

Das Membranpotential ist bei vielen Zelltypen bedeutend für physiologische Vorgänge, wie z.B. die Reizweiterleitung in Neuronen, die Signalerzeugung in sensorischen Zellen und bei Wachstumsprozessen im Pflanzenreich. Die klassische Methode zur Messung von Membranpotentialen besteht in der Verwendung von Mikroelektroden. Hierbei wird eine Glaskapillare in die Zelle eingestochen und das Spannungspotential gegenüber dem Außenmedium mit einem Differenzverstärker gemessen. Im Gegensatz zu dieser invasiven Membranpotentialmessung mittels Mikroelektroden stehen heute auch eine große Anzahl an Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung, die es ermöglichen, Membranpotentiale innerhalb von Zellen mit einem konfokalem Laser-Scanning Mikroskop zu untersuchen, ohne dabei die Zelle mechanisch zu verletzen. Es gibt drei Gruppen von Membranpotentialfarbstoffen: die Merocyanine, Cyanine und Oxonole. Der während dieser Arbeit verwendete Membranfarbstoff bis-(1,3-dibutylbarbiturat) trimethan oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)) gehört in die Familie der Oxonole. Diese Farbstoffgruppe besitzt die Eigenschaft, sich in die Plasma- sowie Vesikelmembranen einzulagern und abhängig von der Spannung über der Membran ihre optischen Eigenschaften zu verändern (Epps et al. 1994). Der Mechanismus beruht auf einer spannungsabhängigen Umverteilung des Farbstoffs in verschiedene Zellkompartimente (Epps et al. 1994). Die Emission des eingelagerten Farbstoffs ist umso größer, je kleiner das Potential über der

Membran ist. Das bedeutet, dass eine depolarisierte Zelle eine höhere Fluoreszenz zeigt als eine Zelle deren Ruhepotential nicht gestört ist. Gleiches gilt für lipophile Zellkompartimente wie Vesikel, die gegenüber dem Zytoplasma ein Potential aufbauen können. DiBAC<sub>4</sub>(3) besitzt ein großes Fluoreszenzintensitätsspektrum zur Messung der absoluten und relativen Änderung der Membranspannung.

Zu den Zielen dieser Arbeit gehört die umfassende Untersuchung der Membranpotentiale im Chara-Rhizoid während des Wachstums, der frühen Phasen der Graviperzeption und der gravitropen Krümmung, um weitere Erkenntnisse über die elektrischen Vorgänge zu gewinnen. Zudem wurden vergleichende Untersuchungen an *Amaryllis belladonna*-Pollenschläuchen als Vertreter weiterer spitzenwachsender Zellen durchgeführt.

### **1.4.3. Gefrierfixierung im Parabelflug**

Parabelflüge ermöglichen die Untersuchung früher Mechanismen der Schwerkraftwahrnehmung in pflanzlichen und tierischen Modellsystemen sowie humanen Zelllinien. Um die Einwirkungen der Mikrogravitationsphasen auf das eingesetzte Modellsystem, z.B. Arabidopsis, strukturell und molekularbiologisch zu untersuchen, müssen Proben im Parabelflug oder nach der letzten Parabel fixiert werden. Im Allgemeinen wird dazu eine chemische Fixierung eingesetzt. Die hierbei verwendeten Substanzen sind Glutaraldehyd und Formaldehyd. Der Nachteil von chemischen Fixierungen ist jedoch eine potentielle Artefaktbildung durch unkontrollierte Oxidation oder Reduktion von Signalmolekülen wie z.B. Phosphatgruppen funktioneller Proteine. Somit kann bei Proben, die mittels chemischer Fixierung behandelt wurden, nicht davon ausgegangen werden, dass Signalproteine unbeschadet bleiben. Eine Alternative zur chemischen ist die physikalische Fixierung durch das Einfrieren der Proben (z.B. in flüssigem Stickstoff). Für Experimente im Weltraum wurde eine entsprechende Anlage bereits genutzt (Ueda et al. 1999), jedoch unter Verwendung von gasförmigen Stickstoff. Im Airbus A-300 ZERO G ist der Umgang mit flüssigen Stickstoff nicht erlaubt, da er nicht in geschlossene Gefäße abgefüllt werden darf (Explosionsgefahr) und er durch seinen flüssigen Aggregatzustand schlecht in Mikrogravitation zu handhaben ist. Eine andere Möglichkeit bildet hier Trockeneis (Kohlensäureschnee), da es fest ist und sich leicht herstellen lässt. Trockeneis ist mit einer Temperatur von -79,5°C geeignet, biologische Proben schnell einzufrieren. Um

eine solche Trockeneisfixierung erstmals bei Parabelflügen durchführen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine komplette Gefrieranlage konstruiert. Ihre Funktionsweise wurde in Bodentests und in Parabelflügen überprüft und optimiert. Ziel war es, ein sicheres, transportables Gerät zu bauen, das auch von anderen Arbeitsgruppen zur Bearbeitung molekularbiologischer Fragestellungen genutzt werden kann. Während der 10. DLR Parabelflugkampagne im September 2007 wurden zum ersten Mal Arabidopsis-Keimlinge in der Carbocryonix Anlage fixiert mit dem Ziel entscheidende Signalkomponenten des Schwerkraft abhängigen Signalwegs zu identifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Pflanzenmaterial

Arabidopsis-Samen (*Arabidopsis thaliana* L. cv. wassiljewskia) wurden von Frau Prof. Dr. Dorothea Bartels (IMBIO, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

*Chara globularis* Thalli wurden aus einem Becken der Botanischen Gärten der Universität Bonn entnommen.

FADB-Arabidopsis-Samen (cv Col 0 background) wurden von Herrn Dr. Boris Voigt (IZMB, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

*Amaryllis belladonna* Pollen wurden käuflich in einem Blumenhandel erworben.

#### 2.1.2. EDV, elektronische und mechanische Komponenten

Analog devices, Norwood MA, USA ([www.analog.com](http://www.analog.com))

Conrad Elektronik, Hirschau, Deutschland ([www.conrad.de](http://www.conrad.de))

Elektronik Labor Universität Bonn/ IZMB (<http://izmb.de/>)

ELV, Leer, Deutschland ([www.elv.de](http://www.elv.de))

EPSON, Düsseldorf, Deutschland ([www.epson.de](http://www.epson.de))

Hygrosens, Löfflingen, Deutschland ([www.hygrosens.de](http://www.hygrosens.de))

IBM, Köln, Deutschland ([www.ibm.com](http://www.ibm.com))

Intel, Feldkirchen, Deutschland ([www.intel.de](http://www.intel.de))

Item, Solingen, Deutschland ([www.item.de](http://www.item.de))

Panasonic, Holzkirchen, Deutschland ([www.panasonic.de](http://www.panasonic.de))

Sony, Köln, Deutschland ([www.sony.de](http://www.sony.de))

Testo AG, Lenzkirch, Deutschland ([www.testo.de](http://www.testo.de))

#### 2.1.3. Software

GraphPad Prism 4, GraphPad Software, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))

ImageJ, National Institute of Health, USA open source Projekt  
(<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)

Microsoft Office 2003, Microsoft USA ([www.microsoft.com](http://www.microsoft.com))

NIKON Freeviewer, NIKON EZ-C 1, NIKON Japan ([www.nikon.com](http://www.nikon.com))

#### 2.1.4. Chemikalien

Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe, Deutschland ([www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de))

Invitrogen - Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland ([www.probes.com](http://www.probes.com))

Merck, Darmstadt, Deutschland ([www.merck.de](http://www.merck.de))

Quiagen, Hilden, Deutschland ([www.quiagen.com](http://www.quiagen.com))

Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com))

#### 2.1.5. Laborgeräte

Agilent Bioanalyser, Böblingen, Deutschland ([www.agilent.com](http://www.agilent.com))

Megafuge 1.0 R und Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland ([www.heraeus.de](http://www.heraeus.de))

Parafilm® M Pechiney, San Diego CA, USA ([www.parafilm.com](http://www.parafilm.com))

Petrischalen 60mm, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

(<http://greinerbioone.com>)

Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia NJ, USA ([www.scientificindustries.com](http://www.scientificindustries.com))

#### 2.1.6. Optische Geräte

Eclipse 80i Konfokalmikroskop, NIKON Düsseldorf, Deutschland ([www.nikon.com](http://www.nikon.com))

Sony Super Steady, Cyber Shot Kamera (5,1 MPixel) ([www.sony.de](http://www.sony.de))

#### 2.1.7. Fluoreszenzfarbstoffe

DiBAC<sub>4</sub>(3) Invitrogen - Molecular Probes; Best. Nr. B438 ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

#### 2.1.8. Lösungen und Medien

##### APW (artificial pond water)

Auf Basis von Aqua bidest.

KCl	7,45 mg/l	0,1 mM
-----	-----------	--------

NaCl	5,84 mg/l	0,1 mM
------	-----------	--------

CaCl <sub>2</sub>	14,7 mg/l	0,1 mM
-------------------	-----------	--------

pH 7,4

##### DiBAC<sub>4</sub>(3)-Vorratslösung

25mg DiBAC<sub>4</sub>(3) (MW = 516,64) in 4,838 ml DMSO 100%

Endkonzentration 10mM

**Forsberg-Medium (Forsberg 1965)**

Auf Basis von Aqua bidest.

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,08 g/l	0,339 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,10 g/l	0,406 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (als Natronwasserglas)	0,01 g/l	0,189 mM
KCl	0,03 g/l	0,402 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0,04 g/l	0,175 mM
Nitrilotriessigsäure = Titriplex 1	0,02 g/l	0,104 mM
TRIS/Base	0,5 g/l	4,13 mM
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,4 mg/l	1,48 µM
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 mg/l	0,35 µM
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,002 mg/l	8,4 nM
CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,004 mg/l	23,46 nM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,1 mg/l	0,41 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4 mg/l	6,47µM
pH 7,4		

**Pollenmedium (Vidali et al. 2001)**

Auf Basis von Aqua bidest.

MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	2,928 g/l	15 mM
BO <sub>3</sub> H	96 mg/l	1,6 mM
KCl	74,4 mg/l	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	11 mg/l	0,1 mM
Saccharose	70g/l	200mM
pH 5,5		



### **2.1.9. Konstruktion und Bau von Parabelflug-Experimenteinheiten**

Die Parabelflug-Experimenteinheiten Charabolix und Carbocryonix dienen der Bearbeitung von biologischen Fragestellungen während Parabelflügen und wurden im Rahmen dieser Arbeit konzipiert, konstruiert, gebaut und geprüft. Die mechanischen Strukturen und Plattformen wurden nach den Sicherheitsanforderungen für Experimente an Bord des Airbus A300 ZERO-G entworfen und gebaut. Es handelt sich hierbei um Experimentplattformen, die auf der Grundlage von Aluminiumprofilen in einer Rahmenstruktur angelegt sind. Zum Schutz vor Verletzungen im Flugbetrieb werden sämtliche Teile der Struktur mittels Schaumstoffrohren verpackt und mit Gewebepband verklebt. Beim Design der tragenden Strukturen wurde besonders auf die Belastung von  $9g$  in vertikaler Richtung geachtet, da diese Beschleunigung im Fall einer Notlandung auftreten kann. Alle Experimente an Bord des A300 ZERO-G, die mit dem Stromnetz verbunden sind, verfügen zudem über einen Notausschalter und eine Sicherungseinrichtung mit Fehlstromschutzschalter.

### 2.1.9.1. Charabolix

Die Experimentplattform Charabolix dient zur Untersuchung von Chara-Rhizoiden und Arabidopsis-Pflanzen während Parabelflügen.



**Abb. 4: Der Experimentaufbau Charabolix.** Zu sehen ist die siebte Revision der Anlage wie sie in der 10. DLR Parabelflugkampagne eingesetzt wurde. Auf einer 10mm Aluminium Bodenplatte wurde ein Profilkäfig mit zwei zusätzlichen Ebenen erstellt. Auf der oberen Plattform sind drei Laptops zur Datenaufzeichnung befestigt. Innerhalb der mittleren Ebene befinden sich 220V Stromverteiler mit Sicherheitseinrichtungen sowie zwei Probenkammern und ein digitales Videomikroskop. Auf der unteren Ebene stehen eine 1g Referenzzentrifuge mit Steuergerät, zwei Netzteile zur Niederstromversorgung sowie ein weiteres digitales Videomikroskop zur Verfügung.

Der Versuchsaufbau beinhaltet folgende funktionelle Komponenten:

#### **1g-Referenzzentrifuge (FUGOSTAT):**

Die Referenzzentrifuge wird mit einem Mikroprozessorsystem gesteuert und ist in der Lage, Beschleunigungen senkrecht zum Boden zu erfassen. Befindet sich die Zentrifuge in einem System mit verringerter Schwerkraft ( $<0,8g$ ) beginnt diese mit der Rotation zur Erzeugung von 1g auf einem definierten Radius. Die Richtung der künstlichen

Schwerkraft wird durch Gewichte eingehalten die sich unterhalb der Probencontainer befinden und sich jeweils zum Vektor der Zentrifugalbeschleunigung ausrichten. Somit werden alle bereits sedimentierten Körper innerhalb der Zentrifuge mit 1g auf ihre ursprüngliche Unterlage gedrückt und können in den Phasen der Mikrogravitation ihre Position nicht verlassen.

Auf der Rotationsplattform befinden sich drei Probencontainer zur Aufnahme von je 5 x 60mm Petrischalen.

### **Zwei Videomikroskopeinheiten mit Steuermodulen:**

Die Videomikroskopeinheiten können mittels eines Infrarotblitzsystems trotz der auftretenden Vibrationen scharfe mikroskopische Bilder während des Fluges aufnehmen. Eine CCD Kamera mit *Firewire* Schnittstelle liefert Bilder mit einer Auflösung von 1200 x 1024 Pixel. Ein elektronisches Heizungssystem mit integriertem Lüfter regelt die Temperatur auf 24°C ein. Die Mikroskopeinheiten kamen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz.

### **Inkubatoren:**

Die Inkubatoren sind jeweils mit einer Vorrichtung versehen, die es ermöglicht die Proben um 90° zu drehen. Zudem ist jeweils ein elektronisches Heizungssystem eingebaut, welches die Temperatur auf 24°C regelt.

### **Temperaturmesssystem mit acht Temperaturfühlern:**

Um ein genaues Bild der Temperatur innerhalb und außerhalb des Experiments zu bekommen, wurde ein Temperaturmesssystem der Firma Hygrosens installiert. Mittels seriell dekodierten Temperaturmessköpfen wurde an acht Punkten im Versuchsaufbau die Temperatur gemessen. Dabei wurden folgende Orte berücksichtigt: 1g-Referenzzentrifuge, Mikroskope, Inkubatoren, Aluminiumstruktur (untere, mittlere und obere Ebene). Die gewonnenen Temperaturwerte wurden in einer \*.csv Datei gespeichert und können mit jedem beliebigen Tabellenkalkulationsprogramm ausgewertet werden.

### **Laptops:**

Ein Laptop dient der Aufnahme der Beschleunigungsdaten und der Temperaturen. Die beiden anderen Laptops speichern die in den Mikroskopeinheiten aufgenommenen

Videos. Alle Laptops sind mit einem RJ-45 100MBit Netzwerk zur Daten- und Zeitsynchronisation über einen Netzwerkhub miteinander verbunden.

### **Sensor zur Aufnahme der Beschleunigungen in x- und y-Achse:**

Der Beschleunigungssensor ADXL202 der Firma Analog Devices detektiert Beschleunigungen von bis zu  $\pm 2g$  in zwei Richtungen. In der Rackintegration wird der Sensor zur Messung der Beschleunigungen in x- und y-Achse eingesetzt.

### **Stromversorgung und Sicherheitseinrichtungen:**

Als Sicherheitseinrichtungen wurden ein Notausschalter, eine Feinsicherung und ein Fehlerstromschutzschalter eingebaut.

Alle Kammern, die Proben beinhalten, wurden mit einer elektronisch geregelten Heizung auf  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  temperiert und zur Dämpfung gegen die während des Flugs auftretenden Vibrationen mit einer schwimmenden Befestigung gelagert. Es bestand somit kein direkter Kontakt zwischen der vibrierenden Experimentstruktur und den Probenkammern.

### 2.1.9.2. Carbocryonix

Der Experimentaufbau Carbocryonix dient dem Cryofixieren von biologischen Proben während Parabelflügen. Beim Einfriervorgang wird flüssiges Kohlendioxid in einer Druckkammer über den zu fixierenden Proben entspannt.



**Abb. 5:** Das Carbocryonix Rack im ungepolsterten Zustand. Auf einer Bodenplatte aus 10mm starkem Aluminium wurde eine Käfigstruktur aus 40x40mm ITEM Profilmaterial (siehe Anhang) mit einem zusätzlichen Zwischenboden aufgebaut. Im linken Teil sind zwei 10kg Kohlendioxid Steigrohrflaschen befestigt. Die rechte Seite beinhaltet zwei Gefrierkammern mit frontal angebrachten Manometern. Oberhalb der Struktur befinden sich eine Drucksammelbox, ein Thermometer zur Messung der Temperaturen in den Gefrierkammern sowie der erzeugten Abgase und ein Manometer zur Drucküberwachung.

Nach der Expansion des flüssigen Kohlendioxids kommt es zur Bildung von festem Trockeneisschnee, der mit einer Temperatur von  $-79,5^{\circ}\text{C}$  alle biologischen Vorgänge stoppt.

Der Experimentaufbau besteht aus folgenden Komponenten:

- Zwei Gefrierkammern zur Aufnahme der Proben
- Probenhalter für je 20 Petrischalen mit einem Durchmesser von 60mm
- Temperaturmesssystem mit Pt1000 Messfühlern
- Druckanlage mit redundanten Sicherheitsventilen
- Zwei Steigrohrflaschen mit jeweils 10kg flüssigem Kohlendioxid
- Aluminium Struktur zur Aufnahme aller Komponenten

Alle druckleitenden Anlagenteile wurden aus rostfreiem Edelstahl gefertigt. Die Druckanlage wurde von der Firma DEKRA auf deren Sicherheit getestet und mit einem Prüfsiegel versehen. Es wurde ein internationales Prüfungszertifikat für Druckanlagen nach AD2000 ausgestellt.

Im Innern der Druckkammern befinden sich Trockeneisdüsen, die für diese Anlage entwickelt wurden. Sie besitzen einen Wirkungsgrad von ca. 24%, was durch Messungen im Vorfeld bestimmt wurde. Durch diese Düsen wird flüssiges Kohlendioxid eingesprüht und durch die sofortige Entspannung (Joule-Thomson Effekt) zu Trockeneisschnee umgewandelt. Die folgende Abbildung zeigt einen Probenhalter nach dem Einfriervorgang.



**Abb. 6: Probenhalter nach dem Fixieren in einer Gefrierkammer. Das Bild zeigt den Probenhalter samt 60mm Petrischalen nach dem Übersprühen mit Trockeneisschnee. Deutlich zu erkennen ist, dass sich das Trockeneis um die eingesetzten Petrischalen absetzt und die Proben so schlagartig abgekühlt werden. Es können 20 Petrischalen á 60mm eingesetzt werden.**

Die Proben werden nach dem Einfriervorgang aus den Kammern entnommen und direkt extrahiert oder in flüssigem Stickstoff zur weiteren Lagerung aufbewahrt. Damit die Proben beim Einfriervorgang durch die Druckveränderungen nicht zerstört werden, wurden die Petrischalen vor dem Einsetzen in die Gefrierkammern mit einer glühenden Nadel punktiert.

#### **2.1.10. NIKON 80i Horizontal**

Bei der mikroskopischen Untersuchung gravisensitiver Organismen bedarf es spezieller Aufbauten, die es ermöglichen, Untersuchungen in der natürlichen Ausrichtung des Schwerkraftvektors durch zu führen. In Zusammenarbeit mit der Firma NIKON, Düsseldorf wurde ein *Laser-Scanning* Mikroskop modifiziert, um es in horizontaler Ausrichtung einsetzen zu können. Zusätzlich wurde ein drehbarer Kreuztisch installiert, der es ermöglicht, die eingesetzten Proben um bis zu 360° zu drehen.



**Abb. 7: NIKON Eclipse 80i "Horizontal" - Durch technische Modifikationen wurde es ermöglicht ein Laser-Scanning Mikroskop aus der Arbeitsposition um 90° zu drehen. Somit verläuft die optische Achse horizontal. Dies ermöglicht, gravisensitive Organismen in ihrer natürlichen Ausrichtung zu studieren. Ein drehbarer Objektisch ermöglicht es, die eingesetzten Organismen während der Beobachtung um bis zu 360° zu drehen.**

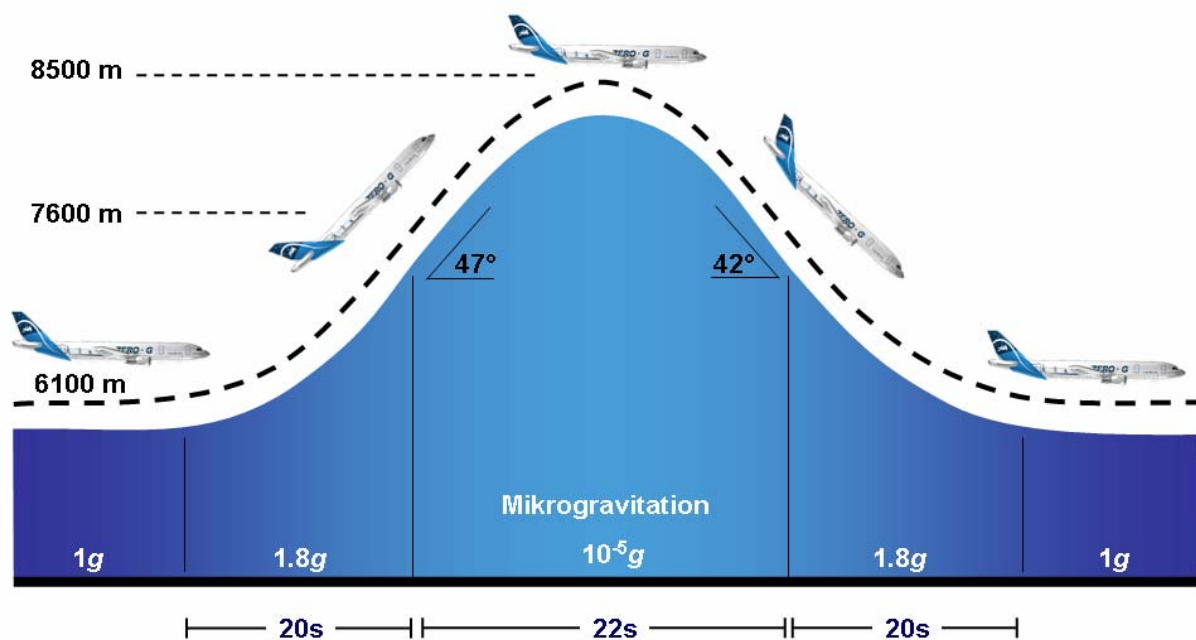
Das Mikroskop verfügt über drei Laser (zwei Feststoff- sowie ein Gas-Laser) mit den Wellenlängen 405nm, 488nm und 545nm. Zudem kann durch einen eingebauten Transmissionsdetektor ein simultanes Durchlichtbild zu einer konfokalen Aufnahme aufgenommen werden. Die Speicherung der Bilderdaten und die Einstellungen des Scansystems übernimmt ein Desktop Rechner welcher über RJ45 Netzwerk mit dem Mikroskopkontroller verbunden ist.



## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Der Parabelflug

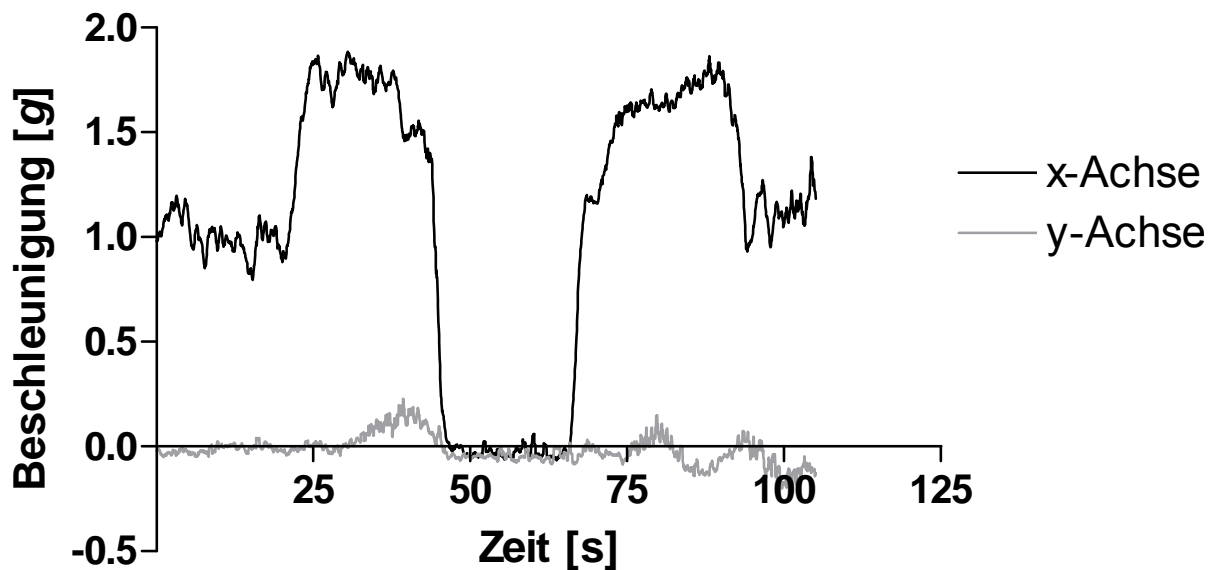
Für Versuche in Mikrogravitation, stehen verschiedene Experimentierplattformen mit unterschiedlichen Mikrogravitationszeiten zur Verfügung. Eine dieser Plattformen ist der Flugzeug-Parabelflug, bei dem pro Flugtag (in der Regel 31-mal) Mikrogravitationsphasen von 20-22s bei einer Mikrogravitationsqualität von ca.  $10^{-5}g$  erreicht werden.



**Abb. 8:** Schema eines Parabelmanövers. Die Flughöhe während des Horizontalflugs beträgt 6100 m. Nachdem der A300-ZERO G eine Höhe von 7600m erreicht hat werden die Triebwerke stark gedrosselt, so dass das Flugzeug in einen freien Fall übergeht. In dieser Phase ist das Flugzeug samt Inhalt schwerelos. Nach ca. 22s Mikrogravitation wird das Flugzeug in einem Fallwinkel von  $42^\circ$  mittels vollem Schub wieder abgefangen. Während der auf- und absteigenden Phase (*Transition*) treten Beschleunigungen von bis zu  $1,8g$  auf, die aufgrund einer kreisförmigen Beschleunigung erzeugt werden. Das gesamte Manöver dauert ca. 62s.

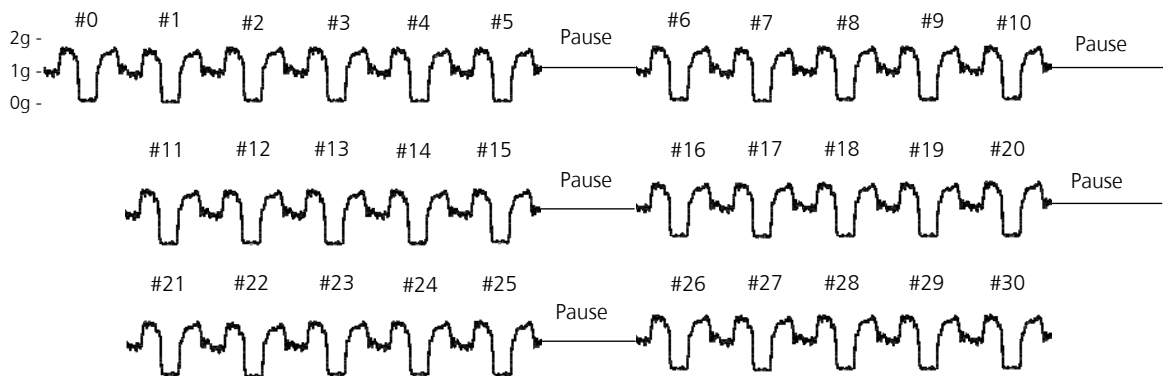
Die Gesamtheit der Mikrogravitationszeiten beträgt ca. 11,4min, was bei einer Experimentdauer von 2h einen prozentualen Anteil von ca. 10% Mikrogravitation entspricht. Hierbei beschreibt die Flugbahn des Flugzeugs eine Parabel, in deren Spitze sich das Flugzeug samt Inhalt im Zustand des freien Falls befindet. Im freien Fall wirken keinerlei Beschleunigungskräfte mehr auf einen Körper; er ist in diesem Zustand „schwerelos“. Für das Parabelflugmanöver wird der Airbus A300-ZERO G in einer Höhe von ca. 6100m mit maximalem Schub in einen Steigflug gebracht, wobei das Flugzeug

einen Anstiegswinkel von ca.  $47^\circ$  erreicht. In dieser Phase treten Beschleunigungen von bis zu  $1,8g$  auf. Der Beschleunigungsvektor steht dabei immer senkrecht zum Flugzeugboden, da eine kreisförmige Beschleunigungsbahn beschrieben wird. Nach ca. 1500m Höhengewinn werden die Triebwerke stark gedrosselt. Das Flugzeug geht in einen freien, parabolischen Fall über. Nun befindet sich das Flugzeug für ca. 22s in einem Zustand von Schwerelosigkeit (Mikrogravitation  $10^{-5}g$ ).



**Abb. 9 Beschleunigungswerte innerhalb der Flugzeugkammer während einer Parabel. Deutlich zu erkennen sind die beiden Phasen der Hypergravitation die während des Auf- und Absteigens des Airbus auftreten und Werte bis  $1,8g$  erreichen. Die x-Achse steht senkrecht zum Flugzeugboden, die y-Achse ist in Flugrichtung ausgerichtet.**

Die Spitze der Parabel liegt in einer Höhe von ca. 8500m. Dabei wird die Maschine in einer stabilen, parabolischen Fallbahn gehalten. Es wird darauf geachtet, dass auftretende Kräfte, die durch äußerliche Einflüsse wie Turbulenzen oder Windböen hervorgerufen werden, durch Gegenmanöver der Piloten kompensiert werden und nicht den freien Fall der Maschine stören. Wenn der Airbus einen Sturzwinkel von ca.  $42^\circ$  erreicht hat, wird der Schub wieder erhöht und die Piloten fangen die Maschine ab. In dieser Phase treten erneut Beschleunigungen von bis zu  $1,8g$  auf. Die Parabelmanöver dauern ca. 1min, und folgen in einem Abstand von ca. 3min. In einer Flugzeit von ca. 2h werden 31 Parabeln in 6 Blöcken zu je 5 Parabeln geflogen. Der erste Parabelblock besteht aus 5 regulären Parabeln mit einer zusätzlichen Testparabel. Zwischen den jeweiligen Blöcken finden kurze Pausen statt, in denen sich die Piloten abwechseln und Versuchsbedingungen verändert werden können.



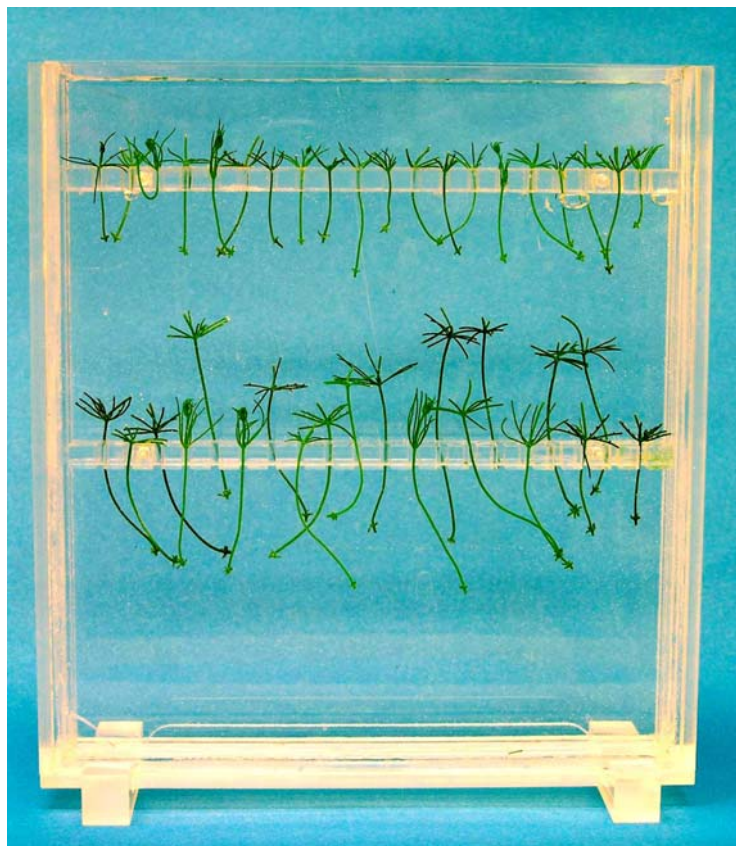
**Abb. 10: Parabelflugprofil mit Beschleunigungswerten – Der erste Parabelblock besteht aus einer Testparabel (#0) und 5 regulären Parabeln. Es werden 31 Parabel in einer Zeit von 2h geflogen. Je nach Experimentanforderungen können die Zeiten der Pausen oder das gesamte Profil variiert werden.**

Der Heimatflughafen des Airbus A300-ZERO G ist Bordeaux, in Frankreich, von dem aus Parabelflüge wetterbedingt über der Biskaya oder dem Mittelmeer stattfinden. Dabei variiert die Dauer der Gesamtflugzeit: Biskaya 3-3,5h; Mittelmeer 4-5h. Die Experimentdauer und die Anzahl der Parabeln werden dabei nicht verändert.

## 2.2.2. Probenanzucht

### 2.2.2.1. Anzucht von Chara-Rhizoiden

Aus dem Algenhallus wurden Segmente geschnitten, die aus jeweils zwei Knoten und einer Internodialzelle bestehen. Die Seitenäste des unteren Knotens wurden kurz abgeschnitten, um das Rhizoidwachstum zu induzieren (Buder 1961). Diese Thallusstücke wurden in Plexiglas®-Küvetten mit Forsberg-Medium eingesetzt, mit Parafilm® M verschlossen und unter 60W Glühlampenlicht (24h) 5-6 Tage bei RT angezogen, bis die Rhizoide eine Länge von ca. 3-5mm erreicht haben (Braun 1996).



**Abb. 11:** Küvette mit geschnittenen Chara Thalli in Forsbergmedium. Die Thallusstücke haben eine Länge von ca. 3-6cm. Die Küvette wird nach dem Bestücken und Befüllen mit Parafilm verschlossen und für 5 Tage mit 24h Glühlampenlicht bei RT inkubiert.

### 2.2.2.2. Sterilisation von Arabidopsis-Keimlingen

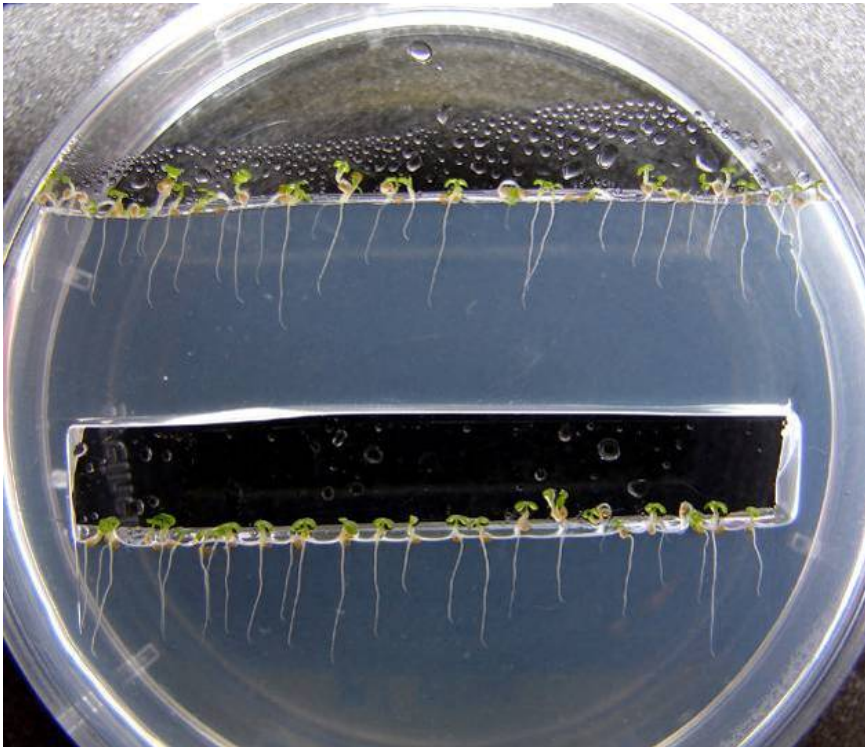
Zur Sterilisation wurden Arabidopsis-Samen nach folgendem Protokoll behandelt:

Waschen mit 70% Ethanol	3min
Sterilisation mit 10% Natriumhypochlorid Lösung	10min
Waschen mit sterilem Wasser, 5-mal	je 1min

Zwischen den Waschschritten wurde kurz abzentrifugiert.

### 2.2.2.3. Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen in Petrischalen

In 60mm Petrischalen wurde eine 3mm hohe Schicht Agar-agar (1% [w/v] in Aqua demin.) gegossen. Nach dem Erstarren des Agar-agars wurden mit einem sterilisiertem Skalpell Agar-Bereiche ausgeschnitten, so dass jeweils zwei Auflagekanten entstanden auf denen dann sterilisierte Arabidopsis-Samen aufgetragen wurden.



**Abb. 12:** 60mm Petrischale mit ca. 50h alten Arabidopsis-Keimlingen nach einem Parabelflug. Die Samen wurden in eine mit einem Skalpell geschnittenen Rinne zwischen Agar-Schicht und Petrischale positioniert. In der Abbildung schaut man auf die Bodenseite der Petrischale. Die Aufnahme wurde innerhalb der Probencontainer gemacht, die zur Kontrastverstärkung der Wurzeln über eine seitliche Beleuchtung verfügte.

Die fertig bestückten Petrischalen wurden mit Parafilm® M verschlossen und zur Stratifizierung (Anregung und Synchronisation der Keimung) bei 4°C für 48h im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden die Petrischalen 48h bei 24°C im Dauerlicht zur Keimung und zum Wachstum inkubiert.

### 2.2.2.4. Behandlung der Arabidopsis-Keimlinge mit Latrunculin B

Vier Tage alte Arabidopsis-Keimlinge wurden in den Petrischalen 1h mit 100nM, 500nM, 1µM und 5µM Latrunculin B je nach Versuchsbedingungen behandelt. Zum Befüllen der Petrischalen wurde mit einer glühenden Injektionsnadel ein Loch in die

Petrischale gestochen. Es wurde darauf geachtet, dass die Wurzeln während der Behandlung nicht in ihrer Ausrichtung gestört wurden. Nach der Einwirkzeit wurde die Lösung mittels einer Spritze wieder abgesaugt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde das Loch mit Parafilm® M wieder verschlossen.

#### **2.2.2.5. Anzucht von Amaryllis-Pollenschläuchen**

Pollen von *Amaryllis belladonna* wurden mit Pollenmedium für 5h in einer 40mm Petrischale bei RT inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Medium nur in einer 1mm dicken Schicht vorlag. Das Wachstum wurde zwischenzeitlich mikroskopisch überwacht. Kurz vor der Markierung mit DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden gekeimte Pollenschläuche mit einer Impföse von der Mediumoberfläche abgenommen und auf einen Objektträger überführt.

### **2.2.3. Kontrollexperimente**

#### **2.2.3.1. Inversionsexperimente – Arabidopsis-Wurzeln**

Um die Kinetik der Aktivierung/Deaktivierung des Graviperzeptionsmechanismus in Arabidopsis-Wurzeln zu bestimmen, wurden Inversionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden Wurzeln zunächst 10min 90° horizontal gelagert, um eine vollständige Sedimentation der Statolithen zu gewährleisten. Danach wurde mit den Inversionen begonnen, wobei die Wurzeln jeweils nach dem Parabelflugprofil 31-mal innerhalb von zwei Stunden aus ihrer horizontalen Lage (90°) um 180° gedreht wurden. Nach 5, 10 oder 20s (je nach Versuchsansatz) wurden die Wurzeln jeweils wieder in ihre Ausgangslage gedreht. Als Kontrollproben wurden Wurzeln für 2h in 90° Lage gedreht. Von Kontroll- und Inversionsprobe wurden die Krümmungswinkel der Wurzeln fotografiert. Die Krümmungswinkel wurden mit Hilfe von ImageJ vermessen und mit Excel und Graphpad Prism statistisch ausgewertet.

#### **2.2.3.2. Hyper g Experimente – Arabidopsis-Wurzeln**

Mit Zentrifugenexperimenten wurde der Einfluss der während des Parabelflugs auftretenden Beschleunigungen auf die Wurzelendkrümmung und somit der Einfluss auf die Gravireaktion untersucht. Arabidopsis-Wurzeln wurden innerhalb einer 1g-Referenzentrifuge nach dem Parabelflugprofil 62-mal für 20s mit 2g beschleunigt.

Somit konnte die „Pull-Up“ und „Pull-Out“ Phase des Parabelflugs simuliert werden, in denen Beschleunigungen von 1,8g auftraten.

Als Kontrollproben wurden Wurzeln innerhalb der Experimentzeit um 90° gedreht. Von Kontroll- und Zentrifugationsprobe wurden die Krümmungswinkel der Wurzeln nach dem Experiment fotografiert.

### **2.2.3.3. Wachstumsmessungen an unbehandelten und mit Latrunculin B behandelten Arabidopsis-Wurzeln**

Arabidopsis-Wurzeln wurden in 60mm Petrischalen in einem klimatisierten Inkubator (24°C, 12 Stunden Licht) angezogen und nach 35h mit einer Digitalkamera für ca. 50h lang in regelmäßigen Abständen abfotografiert. 48h alte Arabidopsis-Wurzeln wurden mit einer 1µM Lösung Latrunculin B behandelt und ebenfalls abfotografiert. Die Wurzellängen wurden mit ImageJ vermessen und mit GraphPad Prism verrechnet.

### **2.2.4. Parabelflugexperimente**

#### **2.2.4.1. Versuchsablauf Charabolix**

Flug- und Kontrollproben wurden 10min vor der ersten Parabel aus der unstimulierten Lage heraus um 90° gedreht. Die Kontrollproben befanden sich in der 1g-Referenzentrifuge. Die 1g-Referenzentrifuge verfügt über ein Mikrocontrollersystem mit digitalem Beschleunigungssensor, welches dafür sorgte, dass die Proben während der Mikrogravitationsphasen mit 1g in der ursprünglichen Richtung zentrifugiert wurden. Nach der letzten Parabel wurden die Krümmungswinkel aller Proben mit einer Digitalkamera fotografiert.

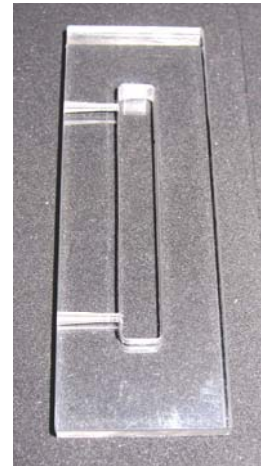
#### **2.2.4.2. Versuchsablauf Charabolix mit Latrunculin B behandelten Arabidopsis-Wurzeln**

Flug- und Kontrollproben wurden 2h vor dem Flug mit Latrunculin B-Lösungen (1µM und 5µM) für eine Stunde behandelt. Die Flug- und Kontrollproben wurden im Flug 10min vor der ersten Parabel aus der unstimulierten Lage heraus um 90° gedreht. Die Kontrollproben befanden sich dabei innerhalb der 1g-Referenzentrifuge. Nach der letzten Parabel wurden die Krümmungswinkel aller Wurzeln mit einer Digitalkamera fotografiert. Während des Flugs wurden sämtliche Beschleunigungsdaten und Temperaturen aufgenommen.

## 2.2.5. Fluoreszenzmarkierungen an Chara-Rhizoiden und Amaryllis-Pollenschläuchen

### 2.2.5.1. DiBAC<sub>4</sub>(3)-Behandlung – Chara-Rhizoid

Ein Knoten mit Chara-Rhizoiden wurde mit 330nM DiBAC<sub>4</sub>(3) in APW behandelt und in eine Objektträgerküvette überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Rhizoide während der gesamten Inkubationszeit in vertikaler Ausrichtung blieben. Die Objektträgerküvette diente der Aufbewahrung des Rhizoids im APW zur Beobachtung im horizontalen Mikroskop. Auf der Front der Objektträgerküvette wurde ein Deckglas mit Wachsvaseline aufgeklebt. Unter dem Knoten wurden geschnittene Objektträgerstreifen untergelegt, um die Rhizoide in der Fokusebene zu stabilisieren.



**Abb. 13: Objektträgerküvette** – In die Vertiefung der Objektträgerküvette wurde ein Chara-Thallus mit Rhizoiden eingesetzt und mit einem Deckglas und Wachsvaseline abgeschlossen und fixiert. Die Durchgänge auf der linken Seite der Küvette dienen dem Austausch von Medien und Färbelösungen und wurden während der Aufnahmen mittels Stopfen verschlossen. Die Größe der Küvette beträgt: Breite 26mm, Höhe 75mm.

### 2.2.5.2. DiBAC<sub>4</sub>(3)-Behandlung – Amaryllis-Pollenschlauch

Amaryllis-Pollenschläuche wurden aus dem Pollenmedium entnommen und in einen Tropfen mit 330nM DiBAC<sub>4</sub>(3) in Pollenmedium auf einem Objektträger überführt. Zum Abdeckeln wurde ein Deckglas mit einem dünnen Wachsvaselinrand versehen und ohne Druck auf die Pollenschläuche gelegt. Im Anschluss daran wurde mit der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung begonnen.

### 2.2.5.3. Latrunculin B-Behandlung von DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten Chara-Rhizoide

Chara-Rhizoide wurden in mit 300nM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Färbelösung in einer Objektträgerküvette inkubiert. Während der mikroskopischen Untersuchung wurde eine 330nM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Färbelösung mit 1µM Latrunculin B in die Objektträgerküvette gespritzt und bis zum Ende des Versuchs in dieser belassen.



## 2.2.6. Carbocryonix-Anlage

### 2.2.6.1. Temperaturmessungen

Es wurden zwei Messungen der Einfriergeschwindigkeit als auch zwei Messungen zur Langzeittemperaturstabilität durchgeführt.

Zur Messung der Einfriergeschwindigkeit wurde ein Thermoelement in direkter Nähe zu einer Arabidopsis-Wurzel in der Agar-Schicht positioniert. Durch den geringen Querschnitt konnte das Thermoelement durch die Flanschdichtung der Gefrierkammer nach außen geführt werden, ohne dabei die Dichtigkeit der Gefrierkammer zu beeinträchtigen. Während des Einfriervorgangs wurden die gemessenen Temperaturen protokolliert und mittels GraphPad Prism ausgewertet.

Die Langzeitmessungen wurden mit einem Datenlogger der Firma Testo durchgeführt. Durch die geringen Abmessungen des Datenloggers konnte dieser in der Gefrierkammer während des Einfriervorgangs belassen werden. Der Temperaturlogger wurde nach 2h wieder aus der Kammer entnommen. Die gewonnenen Daten wurden mit einer Infrarotschnittstelle ausgelesen und mittels GraphPad Prism ausgewertet.

### 2.2.6.2. Analyse der RNA Fixierung

Um die Qualität der in der Carbocryonix Anlage fixierten Proben zu prüfen, wurden Kontroll- und Vergleichsexperimente durchgeführt. Dabei wurden Arabidopsis-Keimlinge, die in 60mm Petrischalen angezogen wurden, in der Carbocryonix Anlage mit flüssigem Stickstoff und alternativ mit RNALater® fixiert. Danach wurde eine RNA Extraktion durchgeführt und die Konzentrationen der gewonnenen RNA mit einem Bioanalyzersystem der Firma Agilent qualitativ und quantitativ untersucht.

## 2.2.7. RNA Extraktion

Für die Extraktion der Gesamt RNA aus Arabidopsis-Keimlingen wurde das RNeasy® *Plant Mini Kit* der Firma Quiagen (Best. Nr. 74103) verwendet. Von jedem Fixierungsansatz wurden 100mg Pflanzenmaterial eingesetzt.

Die fixierten Proben wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

- RNeasy® Lysis Puffer (RLT) mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol mischen
- Waschpuffer (RPE) mit Ethanol (96-100% [v/v]) im Verhältnis 1:4 mischen
- 100mg Pflanzenmaterial mit 450 $\mu$ l RLT Puffer mischen und vortexen

- Das Lysat wurde in ein QIAshredder Zentrifugenröhrchen überführt und für 2min auf höchster Stufe zentrifugiert. Der Überstand wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5fachen Volumens Ethanol (96-100% [v/v]) vorsichtig durch Invertieren gemischt.
- Die gesamte Probe wurde in ein Zentrifugenfilterröhrchen überführt und 15s bei 10.000U/min zentrifugiert.
- 700µl RW1 Puffer wurden dem Zentrifugenfilterröhrchen hinzugegeben und für 15s bei 10.000U/min zentrifugiert.
- Das Zentrifugenfilterröhrchen wurde entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß (2ml) überführt der Durchfluss wurde verworfen.
- Dem Zentrifugenfilterröhrchen wurden 500µl RPE Puffer hinzugegeben und 2min für 10.000U/min zentrifugiert.
- Das Zentrifugenfilterröhrchen wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt und mit 50µl RNase freiem Wasser befüllt und für 1min und 10.000U/min zentrifugiert, um die RNA in Wasser aufzunehmen. Die Probe wurde bei -80°C gelagert.

### Agilent Bioanalyser 2100

Zur Untersuchung der RNA Qualität wurde das Bioanalyzersystem 2100 der Firma Agilent verwendet. Dabei können bis zu 12 Proben in einem Schritt fluorimetrisch untersucht werden. Das Gerät nutzt sowohl Elektrophorese als auch ein fluoreszenzspezifisches Messsystem zur Analyse der RNA. Zur Erzeugung eines Elektropherogramms der eingesetzten Proben werden diese elektrophoretisch durch ein Mikrokanalsystem auf den eingesetzten Chip geleitet und die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit gemessen. Dabei werden kleine Moleküle schneller, große hingegen langsamer durch das Kanalsystem geleitet und detektiert. Die mitgelieferte Software berechnet aus den gewonnen Laufzeiten und Fluoreszenzintensitäten der markierten Moleküle ein virtuelles Gel-Bild, welches mit anderen Elektrophoresegelelen verglichen werden kann. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- Reinigen und Gerätvorbereitung nach Agilent Protokoll
- Ein neuer Analyser Chip wird in die Priming Station eingeführt und 9µl des Gel-Farbstoff Mix wird in die mit einem schwarzen Punkt markierte Kammer "G" gegeben.

- Nach von Agilent angegeben Protokoll wurde der Gel-Farbstoff Mix in den Analyser Chip mittels spezielle Vorrichtung gepresst.
- In die übrigen Kammern "G" (graue Punkte) wurden jeweils mit 9µl Gel-Farbstoff Mix gefüllt.
- In alle Probenkammern sowie der Kammer für die Molekularleiter wurden je 5µl Nano Marker eingefüllt.
- Die RNA Proben und die Molekularleiter wurden vor dem Einsatz im Analyser Chip bei 70°C für 2min denaturiert.
- Es wurden je 1µl RNA Probe bzw. Molekularleiter in die entsprechenden Kammern pipettiert.
- Der Chip wurde für 1min bei 240U/min gevortext.

### **3. Ergebnisse**

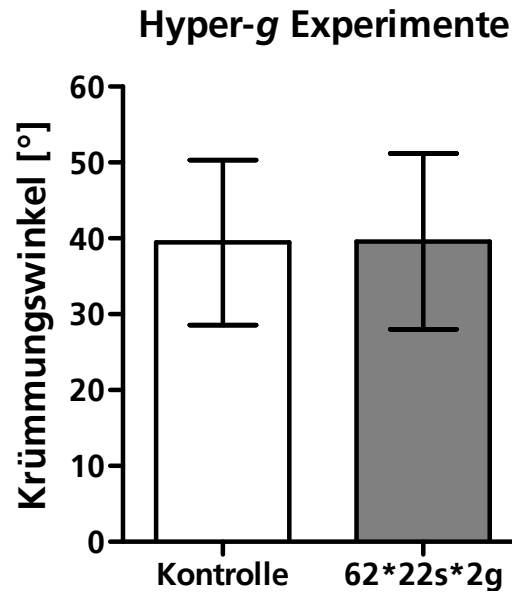
#### **3.1. Boden- und Kontrollexperimente zur Charakterisierung des Gravirezeptors in Arabidopsis-Wurzeln**

Die Boden- und Kontrollexperimente dienten zur Überprüfung, ob die Rahmenbedingungen des Parabelflugs negative Auswirkungen auf die Graviperzeption und Reaktion der Arabidopsis-Wurzeln haben. Zunächst wurde experimentell die Zeit bestimmt, die zur Deaktivierung des Gravirezeptors benötigt wird, wenn die Statolithen durch Invertieren der Wurzel von den Rezeptoren entfernt werden, dass die Zeiten von 20-22s Schwerelosigkeit ausreichen, um einen möglichen Mechanorezeptor zu deaktivieren.

Ein weiterer Kontrollversuch sollte klären, in wie weit die Phasen der Hypergravitation (62 mal 1,8g) in einem Parabelflugprofil die Gravireaktion beeinflusst. Zudem wurden Experimente unternommen, die sowohl das Ausmaß der Zerstörung des Aktinsystems als auch das Wachstumsverhalten der Wurzeln nach Latrunculin B-Behandlung untersucht.

##### **3.1.1. Kurze Hypergravitationsphasen haben keinen Einfluss auf die Gravireaktion von Arabidopsis-Wurzeln**

Die Hyper-g Versuche mit Arabidopsis-Wurzeln sollten den Einfluss der erhöhten Schwerkraft auf die Graviperzeption klären, die während des Parabelflugprofils auftraten. Dabei wurden die Phasen der Hypergravitation mit Hilfe einer programmierbaren Zentrifuge simuliert. Arabidopsis-Wurzeln wurden entsprechend dem Parabelflugprofil 62mal für 20s mit 2g im Laufe einer 2stündigen 90°-Stimulation zentrifugiert. Der resultierende Beschleunigungsvektor entsprach der Sedimentationsrichtung der Statolithen. Als Kontrollen dienten Proben, die zur selben Zeit zu gleichen Bedingungen für 2h bei 90° Horizontallage kontinuierlich bei 1g stimuliert wurden. Am Ende des Experiments wurden die Krümmungswinkel digital fotografiert, ausgemessen und miteinander verglichen. Als statistischer Test auf Signifikanz wurde ein zweiseitiger t-Test angewendet.

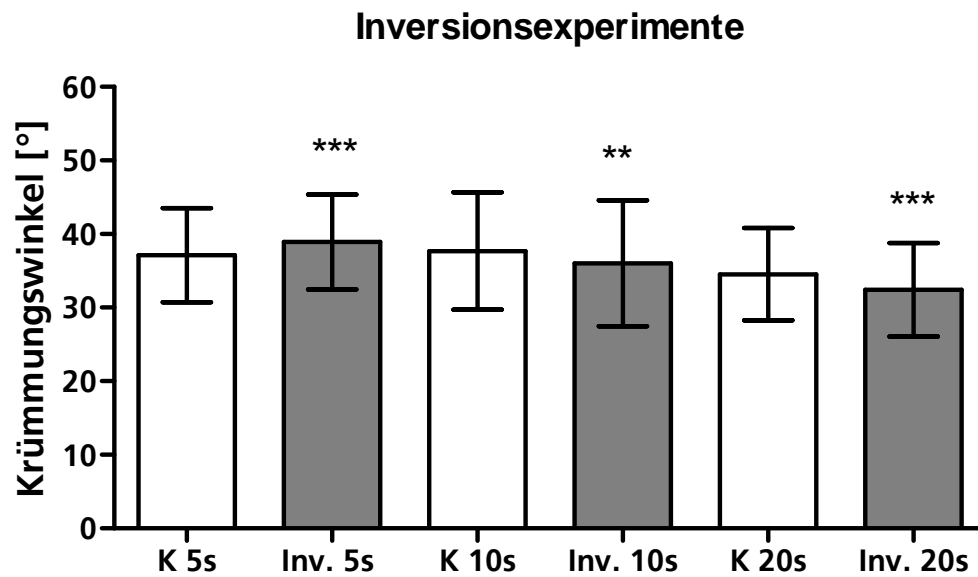


**Abb. 14: Hyper-g Experimente.** Krümmungswinkel von Arabidopsis-Wurzeln, die für 2h horizontal gelegt wurden (Kontrolle) und Wurzeln, die zusätzlich, nach dem Parabelflugprofil, 62mal Hypergravitationsphasen von 2g für jeweils 22s erfahren haben (62\*22s\*2g) dem Parabelflugprofil entsprechend. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Wurzelkrümmung gefunden werden ( $n=2495$ ;  $P=0,751$ ).

Bei den Hyper-g Experimenten zeigte sich keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der Krümmungswinkel 2h nach Beginn der Gravistimulation. Die Anzahl der eingesetzten Proben war mit einer Anzahl von  $n=2495$  sehr hoch.

### 3.1.2. Das kurzzeitige Entfernen der Statolithen vom Gravirezeptor verringert die Gravireaktion

Die Inversionsexperimente dienten zur Ermittlung der Zeit, die benötigt wird, um die Graviperzeption durch Entfernen der Statolithen vom Gravirezeptor zu unterbrechen. Eine Unterbrechung der Graviperzeption äußert sich in einer geringeren Wurzelkrümmung und wurde als Maß für die Gravirezeptoraktivierung verwendet. Im Experiment wurden die Wurzeln für jeweils 5s, 10s bzw. 20s nach dem Parabelflugprofil 31 mal um 180° aus der horizontalen Lage invertiert und nach 2h die Krümmungswinkel gemessen.



**Abb. 15: Inversionsexperimente.** In der Grafik sind die Ergebnisse der Inversionsexperimente mit den Inversionszeiten 5s, 10s und 20s dargestellt. Die weißen Balken zeigen die jeweiligen Kontrollproben der Inversionsexperimente (K). Bei einer Inversionszeit von 5s zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Wurzelkrümmung ( $n_{5s}=1719$ ;  $P_{5s}=<0,0001$ ). Ab einer Inversionszeit von 10s ist eine deutliche Reduktion der Wurzelkrümmung zu beobachten ( $n_{10s}=1619$ ;  $P_{10s}=<0,01$ ;  $n_{22s}=1582$ ;  $P_{22s}=<0,0001$ ).

Inversionszeiten von 5s resultieren in einer leichten Erhöhung der Krümmungswinkel. Inversionszeiten von 10s und 20s resultieren in signifikant kleineren Krümmungswinkeln der Inversionsproben im Vergleich zu den Kontrollen.

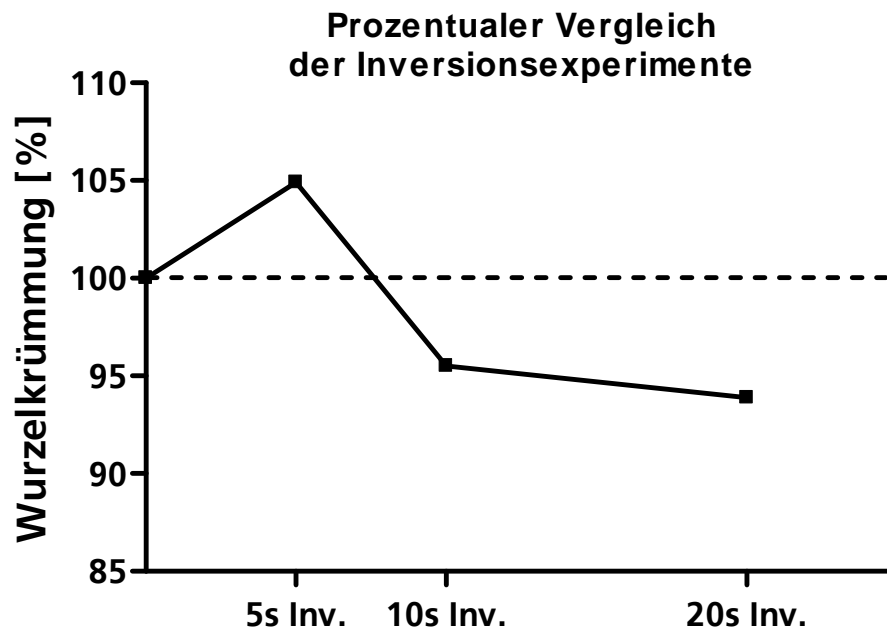


Abb. 16: Prozentuale Darstellung der Reduktion des Krümmungswinkels nach Inversionen. Bei einer Inversionszeit von 5s steigt der Mittelwert der Krümmungswinkel leicht an. Nach 10s Inversionszeit ist eine deutliche Verringerung des Krümmungswinkels zu beobachten, welcher mit einer Inversionszeit von 20s noch kleiner ausfällt.

### 3.1.3. Tabellarische Zusammenfassung aller Inversionsexperimente

In der folgenden Tabelle werden alle Inversionsexperimente einzeln aufgelistet. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die finalen Krümmungswinkel und deren prozentualen Abweichung von den Krümmungswinkeln der Kontrollproben.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Inversionsexperimente – Aufgelistet sind die mittleren Krümmungswinkel, die Varianzen und die Probenanzahl pro Experiment in Klammern. Die prozentuale Abweichung des mittleren Krümmungswinkels der Inversionsproben wird in der letzten Spalte dargestellt. (\*) zeigt an, ob es sich um signifikante Abweichungen handelt.**

Inversionszeit	Kontrolle	Inversionsprobe	Abweichung
[s]	[°] (n)	[°] (n)	[%]
5	33.03 ± 5.41 (159)	37.58 ± 7.03 (180)	+13.80*
5	36.86 ± 5.50 (147)	38.23 ± 5.54 (144)	+3.72*
5	40.71 ± 5.52 (168)	43.08 ± 5.76 (178)	+5.82*
5	39.26 ± 6.23 (204)	38.37 ± 6.71 (218)	-2.39
5	34.47 ± 5.86 (133)	37.59 ± 5.20 (188)	+9.05*
10	44.14 ± 10.06 (36)	33.60 ± 9.15 (38)	-23.87*
10	25.39 ± 4.41 (23)	24.02 ± 6.31 (42)	-5.39
10	40.10 ± 11.17 (58)	34.79 ± 9.99 (84)	-13.26*
10	41.97 ± 8.15 (122)	40.42 ± 8.38 (120)	-3.69
10	47.96 ± 8.80 (74)	43.13 ± 8.33 (69)	-10.07*
10	35.45 ± 5.87 (311)	33.14 ± 6.74 (378)	-6.51*
10	38.14 ± 6.66 (199)	42.05 ± 5.29 (208)	+10.26*
20	42.36 ± 6.20 (33)	35.44 ± 9.45 (36)	-16.33*
20	37.59 ± 5.71 (71)	34.15 ± 6.48 (59)	-9.15*
20	49.33 ± 8.70 (61)	45.09 ± 7.52 (57)	-8.60*
20	48.77 ± 8.85 (64)	45.54 ± 8.60 (76)	-6.62*
20	39.87 ± 7.08 (52)	34.41 ± 7.77 (51)	-13.68*
20	39.86 ± 7.64 (74)	36.84 ± 8.32 (32)	-7.58
20	42.12 ± 6.40 (41)	41.88 ± 7.32 (64)	-0.59
20	33.49 ± 5.69 (55)	31.68 ± 5.08 (25)	-5.41
20	36.43 ± 5.34 (81)	33.16 ± 5.03 (70)	-8.99*
20	32.43 ± 5.00 (93)	28.36 ± 7.36 (95)	-12.56*
20	31.41 ± 6.26 (132)	28.92 ± 5.75 (120)	-7.94*
20	34.34 ± 6.20 (184)	33.48 ± 5.86 (343)	-2.52
20	37.21 ± 5.95 (207)	34.79 ± 5.80 (177)	-6.52*



### 3.1.4. Messung der Wachstumsgeschwindigkeiten von Arabidopsis-Wurzeln mit und ohne Latrunculin B-Vorbehandlung

Zur Untersuchung des Einflusses der Aktin-depolarisierenden Droge Latrunculin B auf das Wachstumsverhalten von Arabidopsis-Wurzelkeimlingen wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von unbehandelten und mit Latrunculin B behandelten Arabidopsis-Wurzeln über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt. Im Folgenden ist die Wachstumsgeschwindigkeit von jeweils 4 unbehandelten und behandelten Wurzeln aufgetragen. Es wurde auf eine Verrechnung zum arithmetischen Mittel verzichtet, um die Varianz der Wachstumsgeschwindigkeiten zu verdeutlichen.

#### 3.1.4.1. Wachstumsgeschwindigkeit unbehandelter Arabidopsis-Wurzeln als Kontrolle

Das folgende Diagramm zeigt die Wachstumsgeschwindigkeiten von fünf unbehandelten Arabidopsis-Wurzeln.

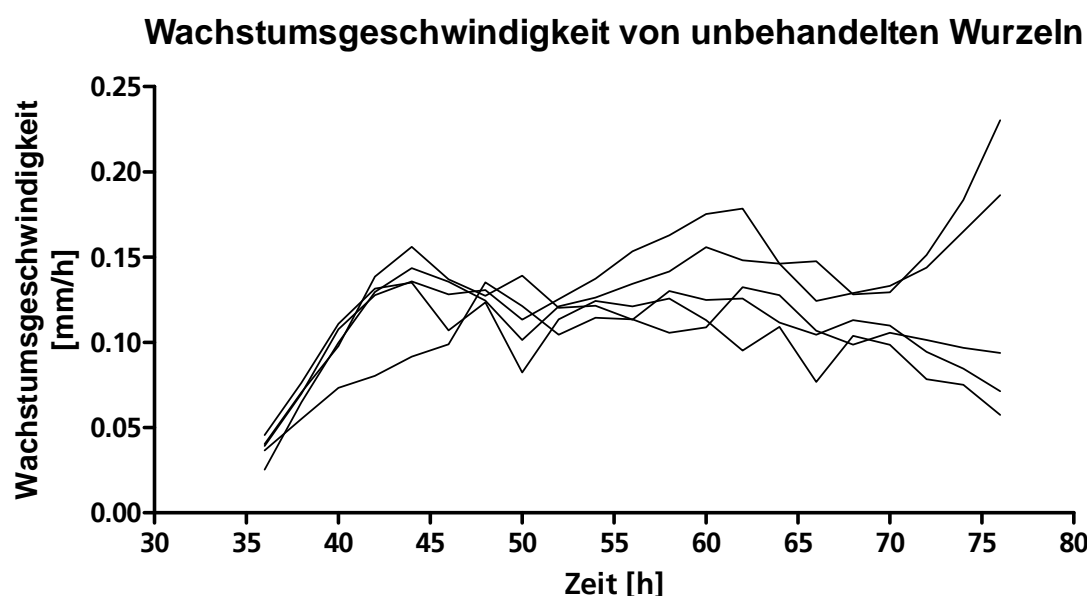


Abb. 17: Wachstumsgeschwindigkeit bei unbehandelten Arabidopsis-Wurzeln. Es kommt nach ca. 45h zum Einstellen der Wachstumsgeschwindigkeit, welche sich auf einen durchschnittlichen Wert von ca. 0,12mm/h einstellt. Die Zeitangabe bezieht sich auf die Zeit nach Wässerung der Samen.

Im dargestellten Diagramm wird deutlich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit einen durchschnittlichen Wert von 0,12mm/h nach ca. 45h erreicht hat.

### 3.1.4.2. Latrunculin B verringert das Wachstum von Arabidopsis-Wurzeln, stoppt es jedoch nicht

Im folgenden Diagramm wird die Wachstumsgeschwindigkeit von Latrunculin B ( $1\mu\text{M}$ ) behandelten Wurzeln dargestellt.

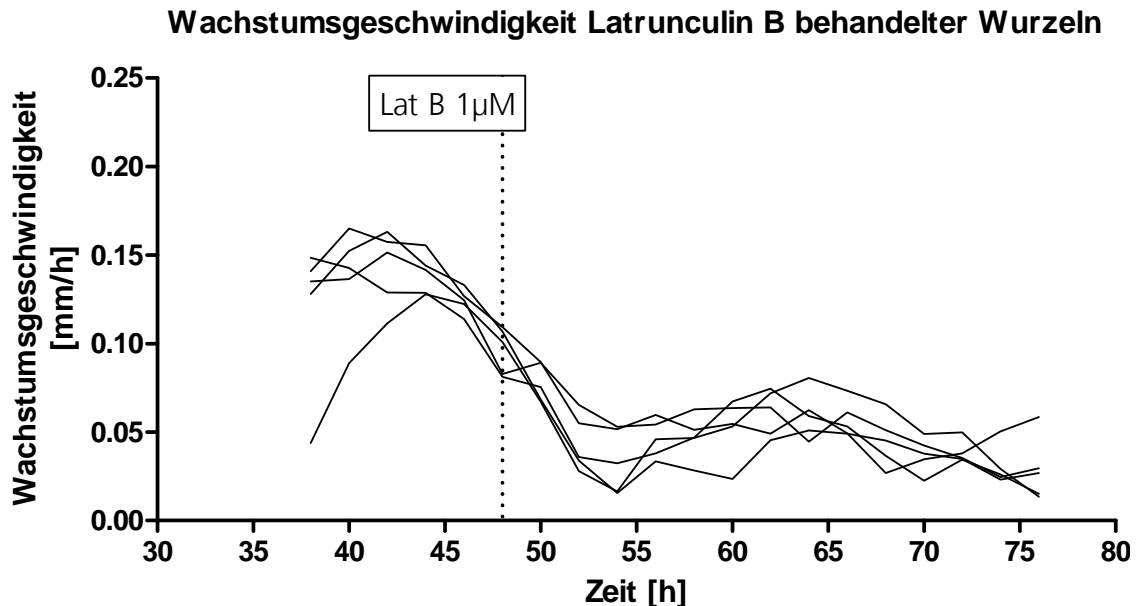


Abb. 18: Wachstumsgeschwindigkeit bei Lat B behandelten Wurzeln. Die gestrichelte Linie zeigt den Zeitpunkt der Latrunculin B-Behandlung ( $1\mu\text{M}$  nach 48h). Nach der Behandlung mit Latrunculin B kommt es zu einem Einbruch der Wachstumsgeschwindigkeit, nicht jedoch zu einem Wachstumsstopp. Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit stellt sich bei ca.  $0,05\text{mm/h}$  ein.

Deutlich zu sehen ist ein Einbruch der Wachstumsgeschwindigkeit nach der Behandlung der 2 Tage alten Arabidopsis-Wurzelkeimlinge mit Latrunculin B. Das Wachstum wird nicht gestoppt. Nach der Behandlung mit Latrunculin B fällt die Wachstumsgeschwindigkeit von  $0,15\text{mm/h}$  auf etwa ein Drittel der ursprünglichen Geschwindigkeit ab (ca.  $0,05\text{mm/h}$ ).

### **3.1.5. Latrunculin B zerstört das Aktinsystem in den Statocysten von Arabidopsis-Wurzeln**

Um die Wirkung von Latrunculin B auf das Aktinzytoskelett der Columellazellen auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Aktins in den Arabidopsis-Wurzelzellen gemacht. Die von dem Wildtyp *Arabidopsis Columbia 0* abgeleitete GFP-Mutante FADB (*f-actin binding domain*) wurde für diese mikroskopischen Untersuchungen verwendet (Sheahan et al. 2004). Dabei wird die Eigenschaft der Arabidopsis-FADB-Mutante genutzt, welche an der F-Aktinbindestelle ein GFP Molekül expremiert. Mit einer Fluoreszenzanregung von 405nm ist es so möglich, dass Aktinsystem und seine Filamente in den Columellazellen sichtbar zu machen.

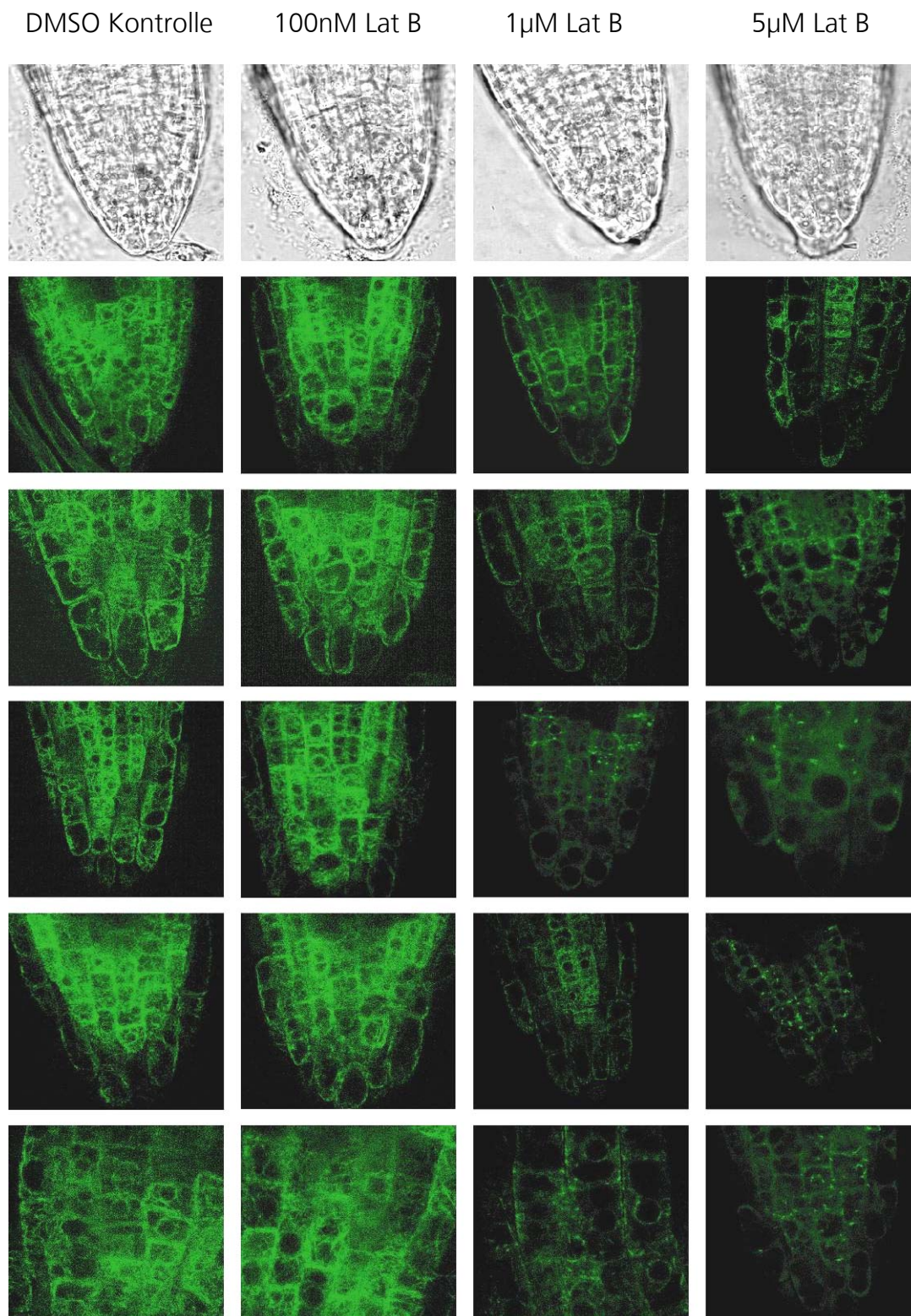


Abb. 19: Mit Latrunculin B behandelte FABD Arabidopsis-Wurzeln (2 Tage alte Keimlinge). Zur Kontrolle dienen gleichaltrige FABD Arabidopsis-Keimlinge, die mit DMSO (in der Endkonzentration als Lösungsmittel) behandelt wurden (erste Spalte). Die oberste Zeile zeigt jeweils ein Durchlichtbild einer behandelten Wurzel. Die Zeilen 2-4 zeigen die Wurzelspitze der behandelten Wurzeln (1h Behandlung). In der letzten Zeile ist je ein vergrößerter Ausschnitt der Columellazone dargestellt. Man kann deutlich sehen, dass mit zunehmender Konzentration von Latrunculin B das Aktinsystem stärker geschädigt wird. Nach einer Behandlung mit 5 $\mu$ M Latrunculin B sind nur noch Flecken zu erkennen.

Die mikroskopische Untersuchung des Aktinsystems der mit Latrunculin B behandelten FABD Arabidopsis-Wurzeln zeigt deutlich, dass es mit der Erhöhung der verwendeten Latrunculin B-Konzentration zu einer immer stärkeren Zerstörung des Aktinsystems in den Columellazellen der Wurzeln kommt. Die Zerstörung des Aktinsystems ist bei den mit 100nM Latrunculin B behandelten Wurzeln im Vergleich zu den DMSO Kontrollproben noch nicht zu erkennen. Die mit 1µM und 5µM Latrunculin B behandelten Proben zeigen jedoch schwere Schäden des Aktinzytoskeletts im Vergleich zu den DMSO Kontrollen. In den Columellazelle sind nur noch Flecken zu erkennen.

### 3.1.6. Latrunculin B behandelte Arabidopsis-Wurzeln zeigen keine Hemmung in der Gravireaktion

Um den Einfluss der Aktin-depolymerisierenden Droge Latrunculin B auf die Gravireaktion zu untersuchen, wurden Krümmungsexperimente mit Latrunculin B behandelten Arabidopsis-Wurzeln durchgeführt.

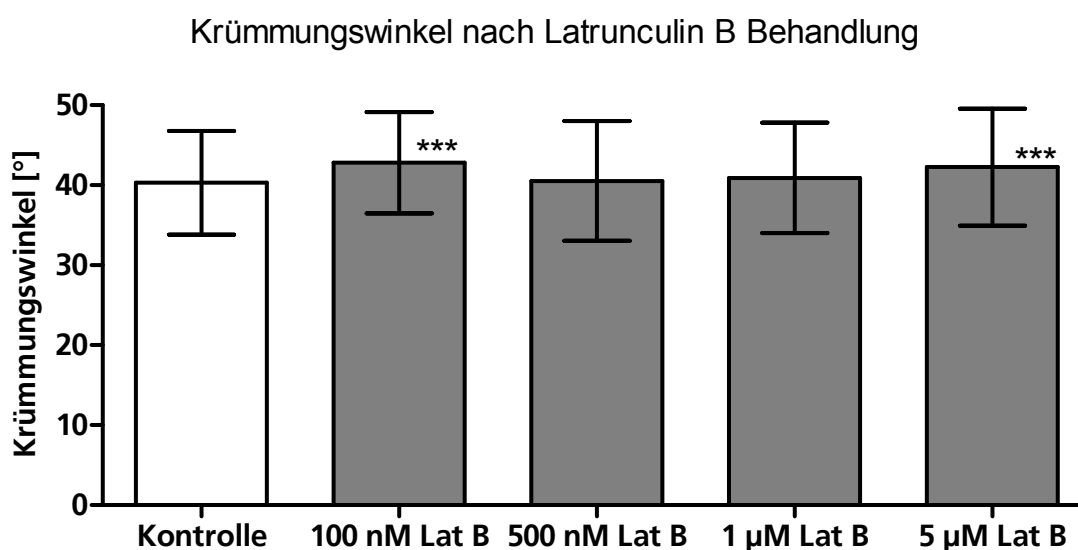


Abb. 20: Vergleich der finalen Krümmungswinkel Latrunculin B behandelte Arabidopsis-Wurzeln im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben. Alle Proben wurden nach einer einstündigen Behandlung mit Latrunculin B für 2h um 90° horizontal stimuliert. Die Kontrollprobe wurde nur mit dem Lösungsmittel DMSO in entsprechender Endkonzentration behandelt. Die Krümmungswinkel der Wurzeln, die mit 100nM und 5µM Latrunculin B behandelt wurden, sind signifikant größer als die der Kontrolle. Die Versuchsansätze mit 500nM und 1µM zeigen dagegen keinen signifikanten Unterschied in der Endkrümmung (t-Test; zweiseitig, ungepaart  $P_{100\text{nM}} < 0,0001$ ,  $n=403$ ;  $P_{500\text{nM}} = 0,61$ ,  $n=469$ ;  $P_{1\mu\text{M}} = 0,179$ ,  $n=463$ ;  $P_{5\mu\text{M}} < 0,0001$ ,  $n=530$ ).

Bei den Konzentrationen 100nM und 5µM Latrunculin B wurden signifikant größere Krümmungswinkel im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die Endkrümmung der mit

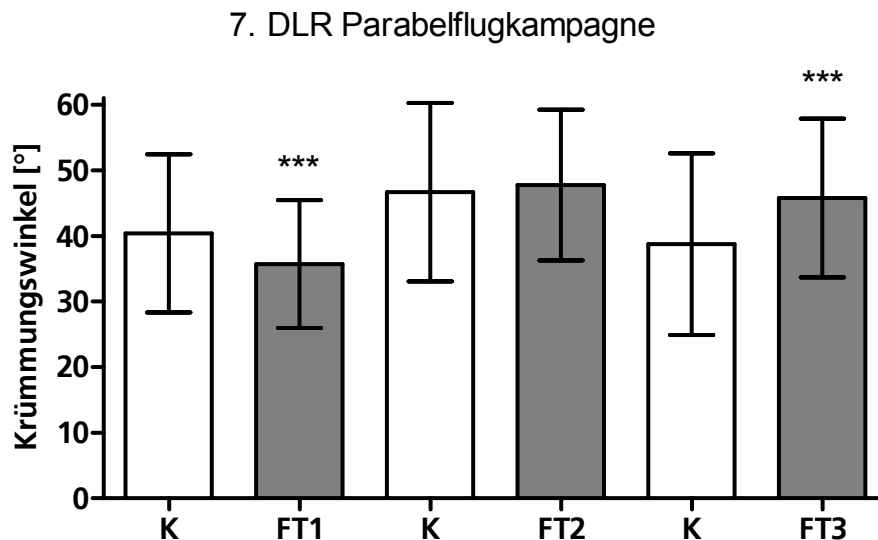
100nM Latrunculin B behandelten Proben wich allerdings nur um ca.  $2,5^\circ$ , die der  $5\mu\text{M}$  nur um ca.  $2,8^\circ$  von den Kontrollwerten ab. Bei den mit 500nM und  $1\mu\text{M}$  Latrunculin B behandelten Proben, konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Die Anzahl der ausgemessenen Wurzeln betrug  $n=1865$ .

### **3.2. Charakterisierung des Gravirezeptors mit Parabelflugexperimenten**

Das Parabelflugprofil ist besonders gut geeignet, um den Gravirezeptor in Pflanzen zu charakterisieren, da in den Phasen der Schwerelosigkeit die Statolithen zwar auf dem Gravirezeptor sedimentiert bleiben, diese jedoch für ca. 22s schwerelos sind. Folglich würde ein Mechanorezeptor durch "schwerelose" Statolithen nicht mehr aktiviert werden und es würde zu einer geringeren Gravireaktion kommen. Im Folgenden sind die Experimente aufgeführt, die an Bord des Airbus A300-ZERO G während der 7. – 9. DLR und der 42. ESA Parabelflugkampagne durchgeführt worden sind. Die finalen Krümmungswinkel der Kontrollproben, die in der  $1g$ -Referenzzentrifuge sowohl die normale Erdschwerkraft als auch die erhöhten Beschleunigungen von bis zu  $1,8g$  der Ein- und Austrittsphasen der Parabeln, nicht aber die der Mikrogravitation erfahren haben, wurden jeweils mit den Krümmungswinkeln der Flugproben verglichen, die den 31 Mikrogravitationsphasen ausgesetzt waren. Im Anschluss an die Auflistung der Einzelkampagnen ist eine Zusammenfassung der statistischen Werte sowie der prozentual dargestellten Krümmungswinkel gezeigt.

### 3.2.1. 7. DLR Parabelflugkampagne

Im Folgenden sind die Krümmungswinkel der Flugproben im Vergleich zu den Krümmungswinkeln der Kontrollproben dargestellt.

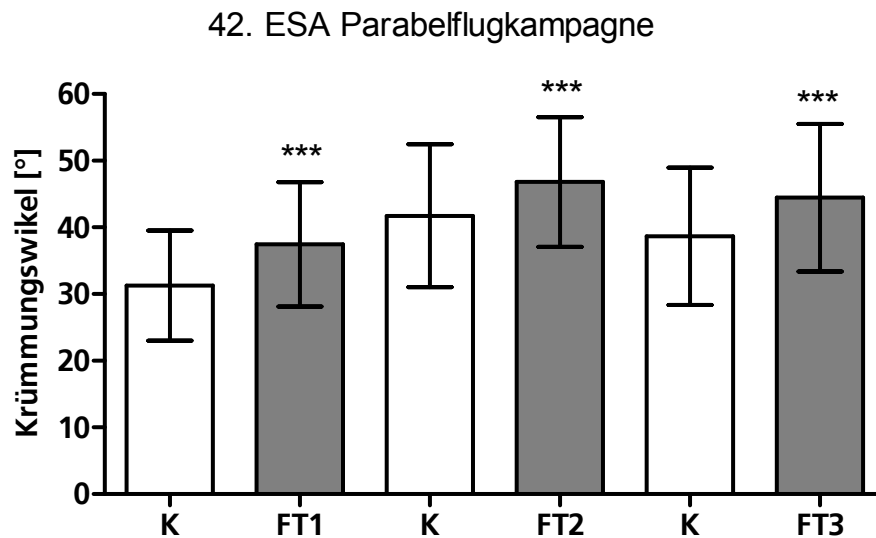


**Abb. 21:** Zusammenfassung der Ergebnisse der 7. DLR Parabelflugkampagne. Die Flugproben des ersten Flugtags zeigen eine signifikant kleinere Wurzelkrümmung ( $n_{FT1}=1049$ ;  $P_{FT1}<0,0001$ ), die des zweiten und dritten Flugtags eine Erhöhung der Wurzelkrümmung, wobei nur die Proben des dritten Flugtags eine Signifikanz aufweisen ( $n_{FT2}=1106$ ;  $P_{FT2}=0,1539$ ;  $n_{FT3}=818$ ;  $P_{FT3}<0,0001$ ).

Die Ergebnisse des ersten Flugtags zeigen signifikant geringere Krümmungswinkel der Flugproben verglichen mit Kontrollproben. Die Flugproben des Flugtags 2 weisen größere, die des Flugtags 3 signifikant größere Krümmungswinkel im Vergleich zu den entsprechenden Referenzproben auf.

### 3.2.2. 42. ESA Parabelflugkampagne

Das nachfolgende Diagramm zeigt die Krümmungswinkel der Flugproben im Vergleich zu den Krümmungswinkeln der Kontrollproben, die während der 42. ESA Parabelflugkampagne gewonnen wurden.



**Abb. 22:** Zusammenfassung der Ergebnisse der 42. ESA Parabelflugkampagne. Alle Flugtage zeigen deutliche Erhöhungen des Krümmungswinkels der Flugproben gegenüber den Kontrollen ( $n_{FT1}=379$ ;  $P_{FT1}<0,0001$ ;  $n_{FT2}=684$ ;  $P_{FT2}<0,0001$ ;  $n_{FT3}=688$ ;  $P_{FT3}<0,0001$ ).

Die Ergebnisse der 42. ESA Parabelflugkampagne zeigen, dass alle Krümmungswinkel der Flugproben signifikant größer ausfallen als die Krümmungswinkel der Kontrollproben.



### 3.2.3. 8. DLR Parabelflugkampagne

Nachfolgend sind die Ergebnisse der 8. DLR Parabelflugkampagne dargestellt. Es werden die durchschnittlichen Krümmungswinkel der Flugproben mit den Krümmungswinkeln der Kontrollen verglichen. Die 8. DLR Parabelflugkampagne bestand aus fünf Flugtagen, wobei an den letzten beiden Tagen nur 11 Parabeln geflogen wurden.

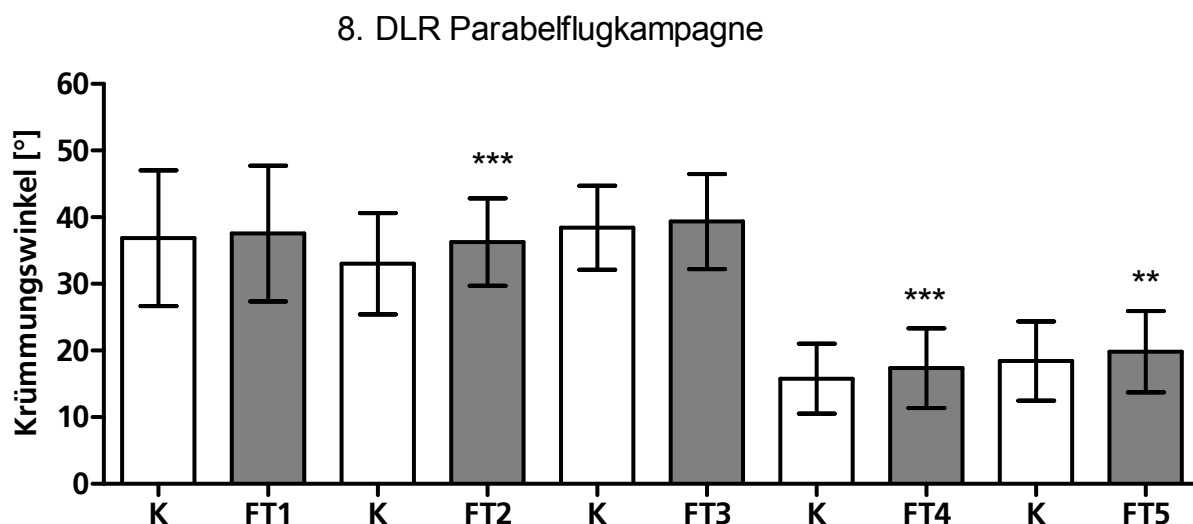
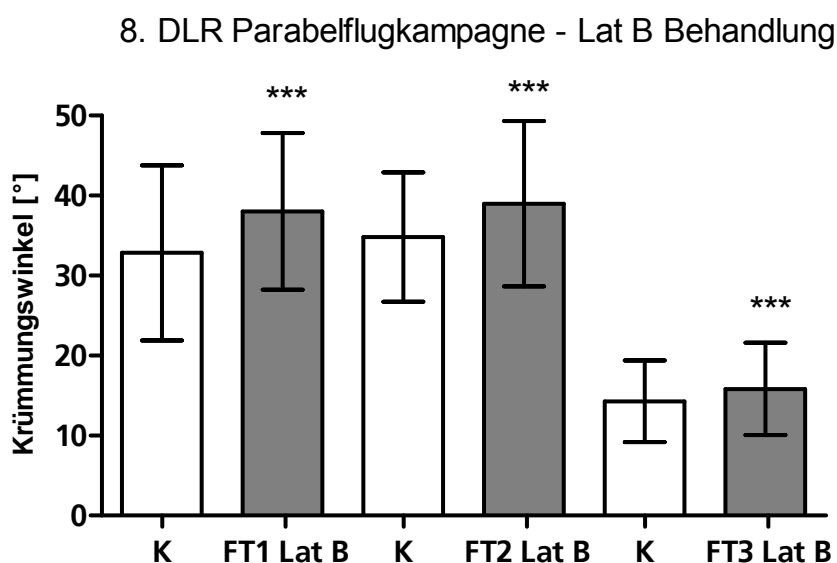


Abb. 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der 8. DLR Parabelflugkampagne. Die 8. DLR Parabelflugkampagne bestand aus fünf Flugtagen. Während den Flugtage FT4 und FT5 wurden nur 11 Parabel mit einer durchschnittlichen Gesamtzeit von 55 min geflogen. Der durchschnittliche Anteil der Mikrogravitation betrug hier 7,37%. Die Krümmungswinkel aller Flugproben fallen nicht kleiner als die der Kontrollproben aus. Signifikante Erhöhungen konnten bei den Flugtagen FT2, FT4 und FT5 gemessen werden ( $n_{FT2}=595$ ;  $P_{FT2}<0,0001$ ;  $n_{FT4}=789$ ;  $P_{FT4}<0,0001$ ;  $n_{FT5}=775$ ;  $P_{FT5}=0,0014$ ). Die Flugtage FT1 und FT2 zeigen eine nicht signifikante Erhöhung im durchschnittlichen Krümmungswinkel ( $n_{FT1}=1109$ ;  $P_{FT1}=0,2559$ ;  $n_{FT3}=694$ ;  $P_{FT3}=0,073$ ).

Die Ergebnisse der 8. DLR Parabelflugkampagne zeigten an allen regulären Flugtagen (FT1-FT3) einen erhöhten Krümmungswinkel der Flugproben gegenüber den Kontrollproben. Die Krümmungswinkel der Flugproben vom zweiten Flugtag weisen eine signifikant größere Krümmung auf. Die Krümmungswinkel der Flugproben, die während der zusätzlichen Flugtage (FT4-FT5) gemessen wurden, zeigen ebenfalls eine signifikante Erhöhung.

### 3.2.3.1. 8. DLR Parabelflugkampagne - Latrunculin B behandelte Wurzeln

Im folgenden Diagramm werden die Krümmungswinkel der mit Latrunculin B behandelten Wurzeln, die während der 8. DLR Parabelflugkampagne gewonnen wurden, gezeigt. Es werden jeweils die durchschnittlichen Krümmungswinkel der behandelten Flugproben gegen die Krümmungswinkel der ebenfalls mit Latrunculin B behandelten Kontrollproben dargestellt, die aber nicht den Mikrogravitationsphasen ausgesetzt waren (Kontrolle in der 1g-Referenzzentrifuge).

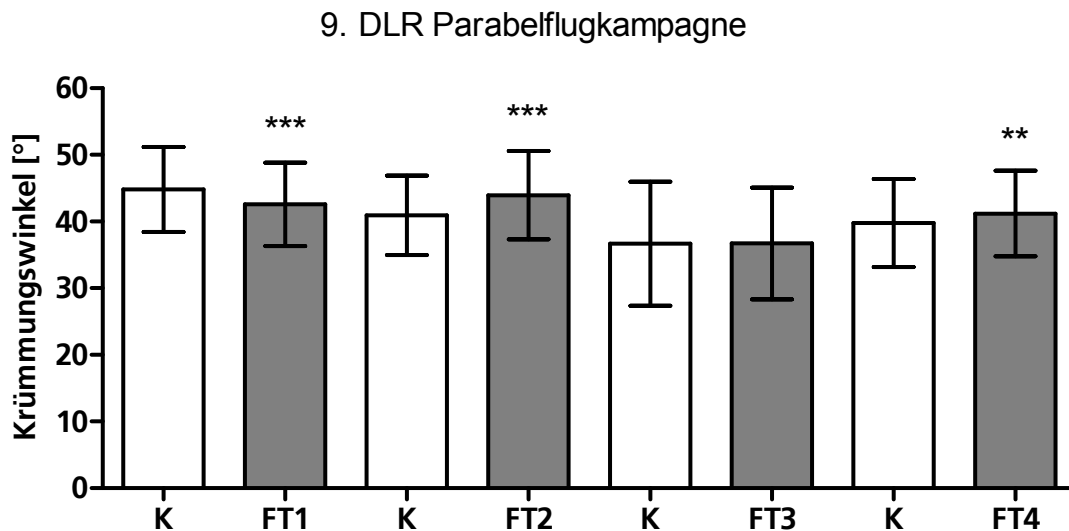


**Abb. 24:** Zusammenfassung der Ergebnisse der mit Latrunculin B behandelten Wurzeln (1h Behandlung mit 1 $\mu$ M Latrunculin B an FT1 und FT2, 1h Behandlung mit 5 $\mu$ M Latrunculin B an FT3). An allen drei Flugtagen konnte eine signifikant größere Krümmung der Flugproben gegenüber den Kontrollen gemessen werden ( $n_{FT1}=887$ ,  $P_{FT1}<0,0001$ ;  $n_{FT2}=424$ ,  $P_{FT2}<0,0001$ ;  $n_{FT3}=736$ ,  $P_{FT3}<0,0001$ ).

Die Ergebnisse der Latrunculin B behandelten Wurzeln, die während der 8. DLR Parabelflugkampagne gewonnen wurden, zeigen an allen drei Flugtagen signifikant größere Krümmungen der behandelten Proben gegenüber den Kontrollproben.

### 3.2.4. 9. DLR Parabelflugkampagne

Im nachstehenden Diagramm werden die während der vier Flugtage der 9. DLR Parabelflugkampagne gewonnenen Ergebnisse, d.h. die durchschnittlichen Krümmungswinkel von Flug- und Kontrollproben, gezeigt.

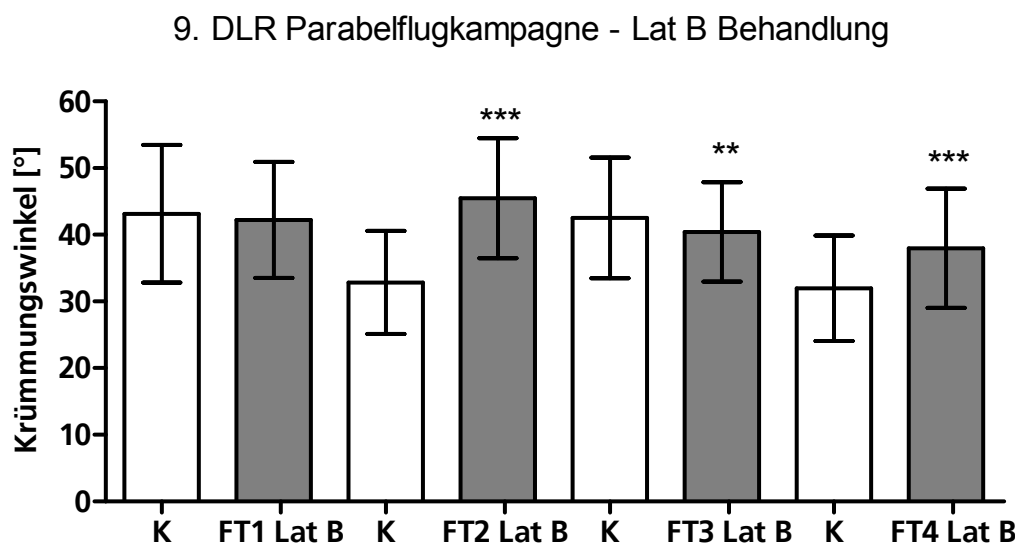


**Abb. 25:** Zusammenfassung der Ergebnisse der 9. DLR Parabelflugkampagne. Die 9. DLR Parabelflugkampagne bestand aus vier ungekürzten Flugtagen mit jeweils 31 Parabeln. Mit Ausnahme der Ergebnisse des ersten Flugtags (FT1) ( $n_{FT1}=937$ ;  $P_{FT1}<0,0001$ ) weisen die Flugproben der Flugtage 2 bis 4 (FT2 – FT4) keine signifikant kleineren Krümmungswinkel im Vergleich zu den entsprechenden Referenzkontrollen auf ( $n_{FT2}=889$ ;  $P_{FT2}<0,0001$ ;  $n_{FT3}=882$ ;  $P_{FT3}=0,9645$ ;  $n_{FT4}=794$ ;  $P_{FT4}<0,0025$ ).

Die Ergebnisse der 9. DLR Parabelflugkampagne zeigen bis auf den ersten Flugtag keine Verringerung der gravitropen Wurzelkrümmung von den Flugproben verglichen mit denen der Kontrollproben.

### 3.2.4.1. 9. DLR Parabelflugkampagne - Latrunculin B behandelte Wurzeln

Im folgenden Diagramm sind die Daten der mit Latrunculin B behandelten Wurzeln dargestellt, die während der 9. DLR Parabelflugkampagne gewonnen wurden. Es werden die finalen Wurzelkrümmungen der Flugproben mit den Krümmungswinkeln der Kontrollproben verglichen. Beide Versuchsgruppen (Kontrollproben und Flugproben) wurden eine Stunde vor Experimentbeginn mit  $1\mu\text{M}$  Latrunculin B behandelt.

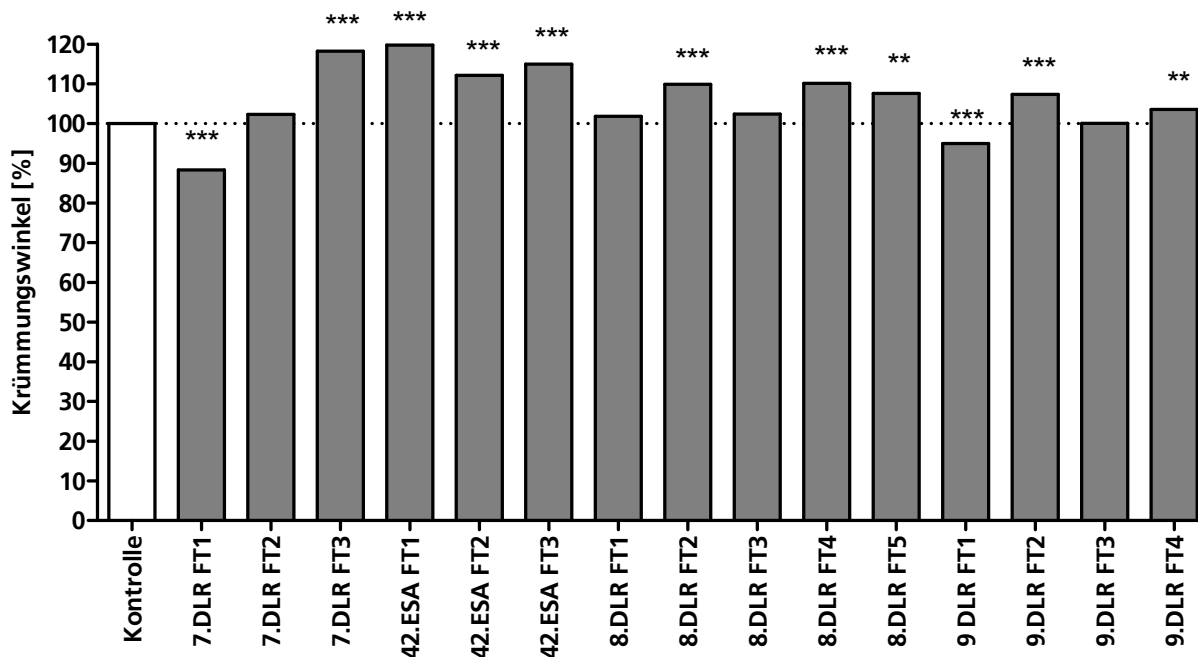


**Abb. 26:** 9. DLR Parabelflugkampagne: Die Flugproben der Flugtage 2 (FT2) und 4 (FT4) weisen signifikant größere, die Flugproben der Flugtage 1 (FT1) und 3 (FT3) zeigen kleinere Krümmungswinkel im Vergleich zur entsprechenden Kontrollprobe auf ( $n_{\text{FT1}}=757$ ,  $P_{\text{FT1}}=0,1815$ ;  $n_{\text{FT2}}=695$ ,  $P_{\text{FT2}}<0,0001$ ;  $n_{\text{FT3}}=533$ ,  $P_{\text{FT3}}=0,0035$ ;  $n_{\text{FT4}}=393$ ,  $P_{\text{FT4}}<0,0001$ ).

Die Ergebnisse der Latrunculin B behandelten Wurzeln zeigen während des ersten und dritten Flugtags kleinere Krümmungswinkel. Die Flugtage FT2 und FT4 zeigen größere Krümmungswinkel der Flugproben gegenüber den Kontrollproben.

### 3.2.5. Vergleich und Zusammenfassung aller Flugergebnisse der Parabelflugexperimente

Im Folgenden werden die mittleren finalen Krümmungswinkel der Flugproben prozentual mit den entsprechenden Kontrollproben verglichen. Dabei ist der mittlere Krümmungswinkel der Kontrollproben als 100% angegeben.



**Abb. 27: Prozentualer Vergleich der Krümmungswinkel der Flugproben mit denen der Kontrollproben. Die Kontrolle in der 1g-Referenzzentrifuge, die die normale Erdschwerkraft und die Hypergravitations-Phasen (1,8g) der Parabeln erfahren haben, nicht aber der Mikrogravitation ausgesetzt waren, wurden jeweils auf 100% gesetzt. Mit Ausnahme der Daten von 2 Flugtagen (7.DLR FT1, 9.DLR FT1) weisen alle Flugproben vergleichbare bzw. größere finale Krümmungswinkel im Vergleich zur Kontrolle auf.**

Es ist zu erkennen, dass die Krümmungswinkel der Flugproben im Mittel größer ausfallen als die der Kontrollproben, die in der 1g-Referenzzentrifuge geflogen wurden. Nur am FT1 der 7.DLR und am FT1 der 9. DLR Parabelflugkampagne wurden signifikant kleinere Krümmungen gemessen. Die übrigen Experimente zeigen eine gleiche bzw. größere Endkrümmung der Wurzeln verglichen mit den Kontrollproben.

### 3.2.6. Zusammenfassung der Parabelflugergebnisse

In der folgenden Tabelle sind die Experimentbedingungen und die gewonnenen statistischen Daten aller Parabelflugexperimente zusammenfassend dargestellt.

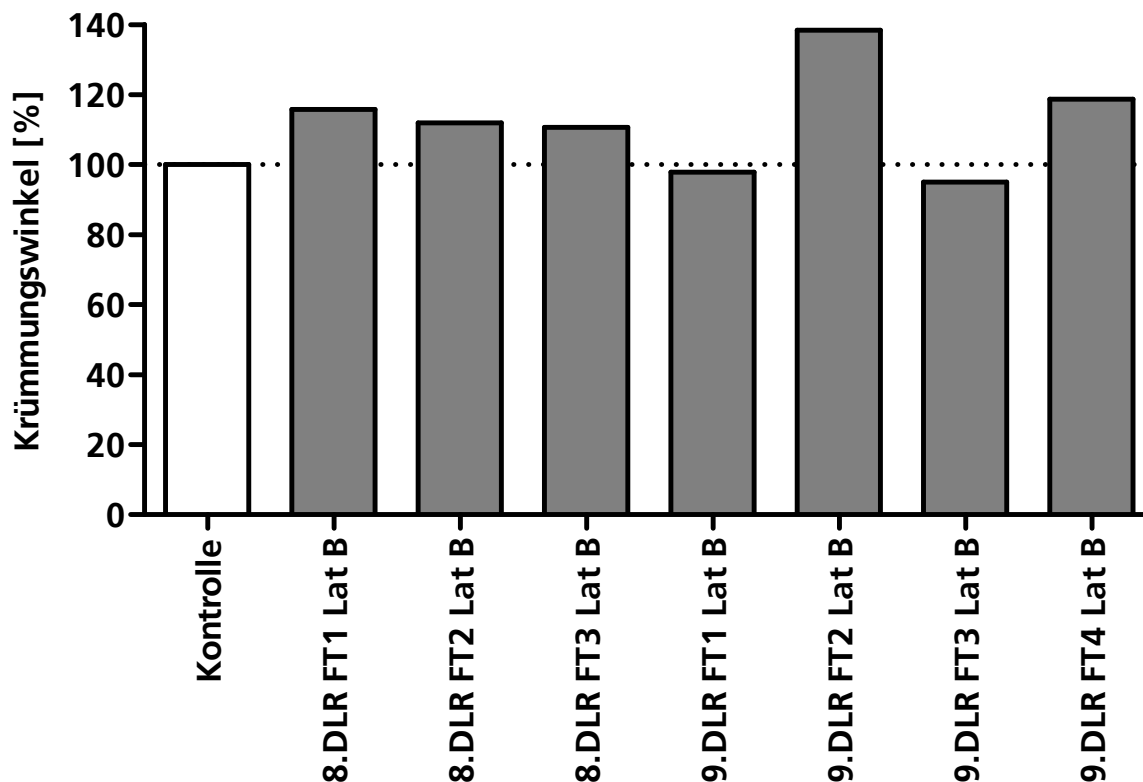
**Tabelle 2: Zusammenstellung aller statistischen Werte und experimentellen Merkmale der Parabelflugexperimente. Die Daten basieren auf einer statistischen Analyse mittels eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests. Gezeigt werden die Experimentdauer, die Mikrogravitationszeit in Prozent, der P-Wert zur Ermittlung der Signifikanz, Mittelwert mit Standardabweichung sowie die Differenz der Mittelwerte.**

Analysierte Daten	7.DLR PFK	7.DLR PFK	7.DLR PFK	42.ESA PFK	42.ESA PFK	42.ESA PFK	8. DLR PFK
Flugtag	FT1	FT2	FT3	FT1	FT2	FT3	FT1
Experimentdauer [min]	125	123	124	130	131	135	126
Mikrogravitationszeit [%]	9.09	9.24	9.17	8.74	8.68	8.42	9.02
P Wert	P<0.0001	0,1539	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,2559
MW $\pm$ SEM der Kontrolle	40.41 $\pm$ 0.5207 N=535	46.68 $\pm$ 0.5662 N=576	38.74 $\pm$ 0.6315 N=482	31.27 $\pm$ 0.5991 N=189	41.73 $\pm$ 0.5401 N=394	38.68 $\pm$ 0.7203 N=205	36.86 $\pm$ 0.4112 N=611
MW $\pm$ SEM der Flugprobe	35.71 $\pm$ 0.4307 N=514	47.76 $\pm$ 0.4997 N=530	45.80 $\pm$ 0.6599 N=336	37.45 $\pm$ 0.6770 N=190	46.80 $\pm$ 0.5664 N=294	44.47 $\pm$ 0.5971 N=344	37.55 $\pm$ 0.4566 N=498
Diff. Mittelwerte	4.699 $\pm$ 0.6758	-1.077 $\pm$ 0.7552	-7.063 $\pm$ 0.9358	-6.183 $\pm$ 0.9043	-5.072 $\pm$ 0.7940	-5.788 $\pm$ 0.9527	-0.6983 $\pm$ 0.6143

Analysierte Daten	8. DLR PFK	8. DLR PFK	8. DLR PFK	8. DLR PFK	9.DLR PFK	9.DLR PFK	9.DLR PFK	9.DLR PFK
Flugtag	FT2	FT3	FT4	FT5	FT1	FT2	FT3	FT4
Experimentdauer [min]	151	141	51	59	136	125	144	122
Mikrogravitationszeit [%]	7.53	8.06	7.91	6.84	8.36	9.09	7.89	9.32
P Wert	P<0.0001	0,0735	P<0.0001	0,0014	P<0.0001	P<0.0001	0,9645	0,0025
MW $\pm$ SEM der Kontrolle	33.03 $\pm$ 0.4162 N=332	38.44 $\pm$ 0.3492 N=327	15.77 $\pm$ 0.2695 N=382	18.42 $\pm$ 0.2951 N=408	44.81 $\pm$ 0.3036 N=442	40.93 $\pm$ 0.2742 N=470	36.68 $\pm$ 0.4356 N=456	39.78 $\pm$ 0.3198 N=428
MW $\pm$ SEM der Flugprobe	36.30 $\pm$ 0.4038 N=263	39.36 $\pm$ 0.3725 N=367	17.37 $\pm$ 0.2959 N=407	19.82 $\pm$ 0.3193 N=367	42.57 $\pm$ 0.2800 N=495	43.94 $\pm$ 0.3239 N=419	36.71 $\pm$ 0.4052 N=426	41.19 $\pm$ 0.3358 N=366
Diff. Mittelwerte	-3.268 $\pm$ 0.5898	-0.9218 $\pm$ 0.5142	-1.594 $\pm$ 0.4018	-1.395 $\pm$ 0.4342	2.236 $\pm$ 0.4124	-3.005 $\pm$ 0.4217	-0.02655 $\pm$ 0.5971	-1.411 $\pm$ 0.4648

### 3.2.7. Vergleich aller Flugergebnisse der mit Latrunculin B behandelten Arabidopsis-Wurzeln

In der folgenden Abbildung werden die Endkrümmungswinkel prozentual mit denen der Kontrollproben verglichen. Dabei werden die jeweiligen Krümmungswinkel der Kontrollproben als 100% definiert.



**Abb. 28:** Prozentualer Vergleich der gemessenen Krümmungswinkel der mit Latrunculin B behandelten Wurzeln. Es werden die Krümmungswinkel prozentual miteinander verglichen, wobei die jeweilige Kontrolle auf 100% gesetzt wird. Deutlich zu sehen ist, dass die Krümmungswinkel aller Flugproben, bis auf den 1. und 3. Flugtag der 9. DLR Parabelflugkampagne, größer als die Kontrollen ausfallen. Sowohl die Kontrollen als auch die Flugproben wurden mit 1 $\mu$ M Latrunculin B behandelt.

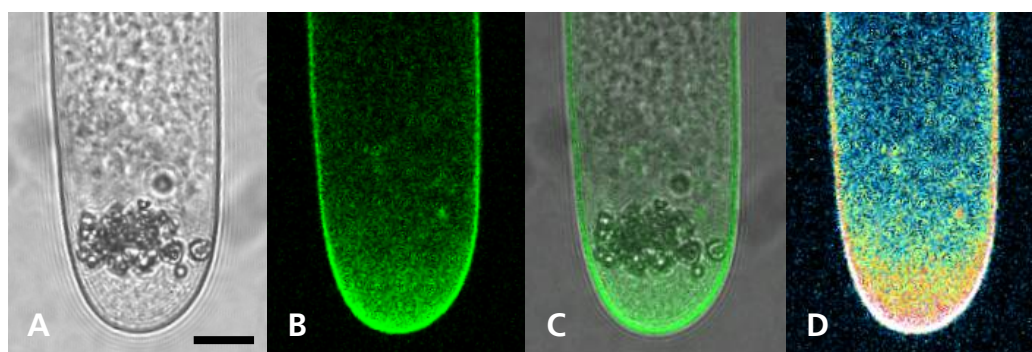
Der prozentuale Vergleich aller Latrunculin B-Experimente zeigt, dass vorwiegend größere Krümmungen bei den Flugproben gemessen wurden. Während des Flugtags FT1 und FT3 der 9. DLR Parabelflugkampagne zeigten sich geringfügig kleinere Krümmungswinkel. Sowohl die Kontrollproben als auch die Flugproben wurden eine Stunde vor Experimentbeginn mit 1 $\mu$ M Latrunculin B behandelt. Eine Ausnahme bildet hier der FT3 der 8. DLR Parabelflugkampagne, hier wurden die Arabidopsis-Wurzeln mit 5 $\mu$ M Latrunculin B behandelt.

### 3.3. Fluorimetrische Messungen mit DiBAC<sub>4</sub>(3) im Chara-Rhizoid

Im Folgenden werden die Ergebnisse der fluorimetrischen Elektropotentialmessungen im Chara-Rhizoid und Amaryllis-Pollenschlauch gezeigt. Alle Proben, wenn nicht anders beschrieben, wurden mit 330nM DiBAC<sub>4</sub>(3) behandelt.

#### 3.3.1. Fluoreszenzgradient in Chara-Rhizoiden nach DiBAC<sub>4</sub>(3)-Markierung

Direkt nach der Markierung der Rhizoide mit DiBAC<sub>4</sub>(3) erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Dargestellt werden das Durchlichtbild, das konfokale Fluoreszenzbild (Anregung: 488nm) sowie ein Mischbild aus einer Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme sowie ein Falschfarbenbild des Rhizoids.



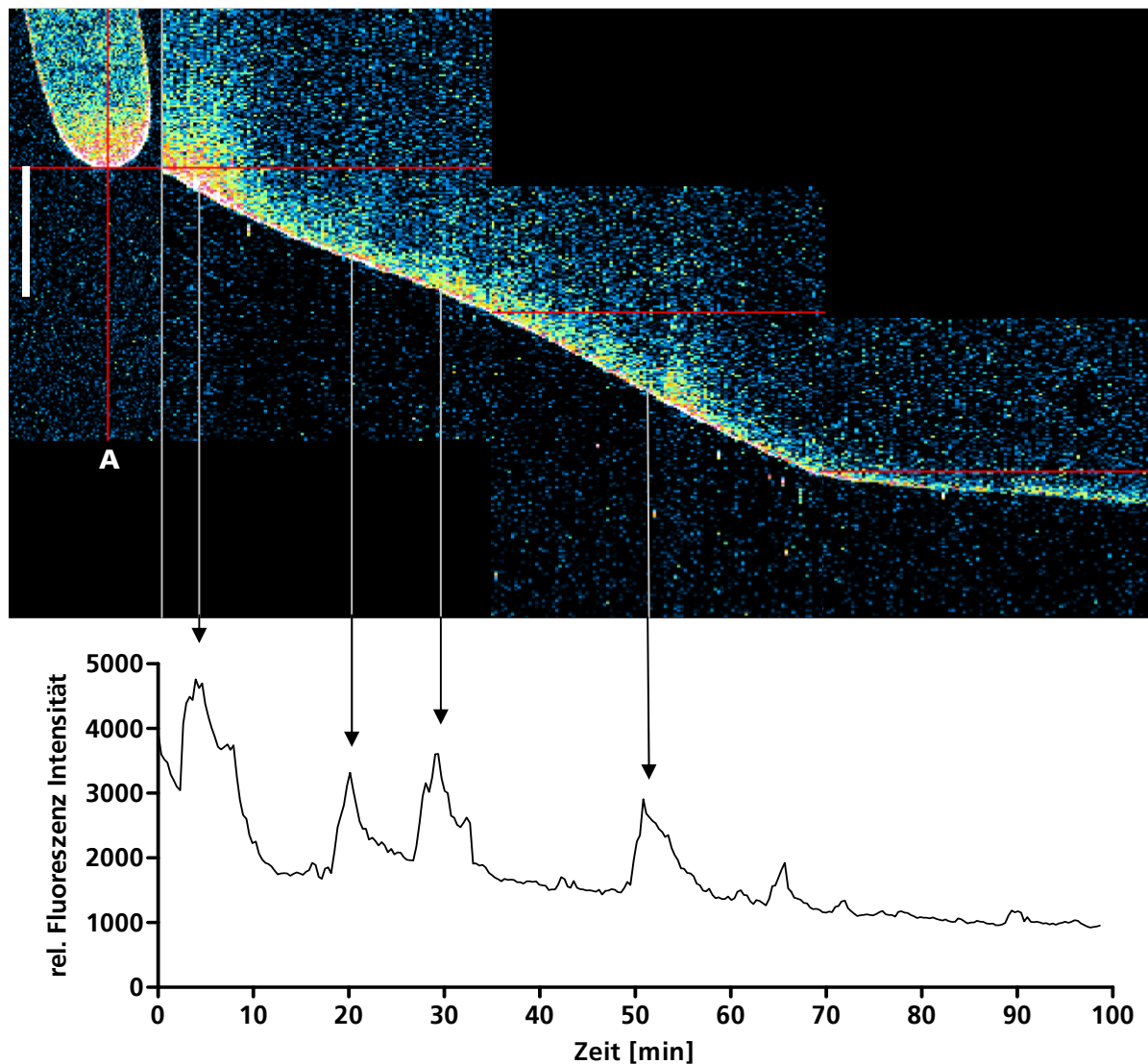
**Abb. 29: Fluoreszenzgradient in Chara-Rhizoiden nach DiBAC<sub>4</sub>(3)-Behandlung.** In Bild (A) ist ein Durchlichtbild eines mit DiBAC<sub>4</sub>(3) behandelten Rhizoids gezeigt. Deutlich zu erkennen sind die Statolithen, die in einem horizontalen Band oberhalb des Spitzenkörpers angeordnet sind. Bild (B) zeigt die Fluoreszenz, welche direkt nach der Behandlung beobachtet werden konnte. Bild (C) ist ein Mischbild, in dem die Hellfeldaufnahme und das Fluoreszenzsignal übereinander gelagert wurden. Die Abbildung (D) ist eine Falschfarbendarstellung, um den Helligkeitsgradienten des Fluoreszenzsignals besser sichtbar zu machen. Der schwarze Balken entspricht 10µm.

Nach der Behandlung von Chara-Rhizoiden mit DiBAC<sub>4</sub>(3) wurde stets ein Fluoreszenzgradient in der Spitze beobachtet. Der Gradient mit einem Fluoreszenzmaximum am Apex des Rhizoids verläuft in Richtung Subapikalzone und reicht bis zur Statolithenzone. Bei genauerer Betrachtung sieht man, dass die Fluoreszenz nicht homogen, sondern granulär und diffus erscheint. Die Fluoreszenz ist dabei an Partikel gebunden. Ein homogener Gradient, der sich über die gesamte Zelle erstreckt und gleichmäßig in der Fluoreszenzintensität ist, konnte in Chara-Rhizoiden in keinem DiBAC<sub>4</sub>(3)-Versuch beobachtet werden.



### 3.3.2. DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradient während des Wachstums

Um das Wachstum unter dem Einfluss von DiBAC<sub>4</sub>(3) zu untersuchen, wurden Wachstumskontrollen an Chara-Rhizoiden unternommen. In der folgenden Abbildung wurde die Fluoreszenzintensität des Rhizoids gegen seine Wachstumsgeschwindigkeit aufgetragen. Die orthogonale Ansicht entstand aus der Aneinanderlagerung der median gemessenen Fluoreszenzintensitäten innerhalb des Rhizoids. Dem Bild können Wachstumsgeschwindigkeit über den Verlauf der Wachstumsfront und die räumliche Ausdehnung der Fluoreszenzintensität über den orthogonalen Schnitt entnommen werden. Unter die orthogonale Ansicht wurde ein Graph eingefügt, der die Gesamtfluoreszenzintensität des Rhizoids im Verlauf des Wachstums in relativen Werten anzeigt.



**Abb. 30: Orthogonale Ansicht des Längenzuwachs und der Fluoreszenzintensität während des Wachstums des Rhizoids unter DiBAC<sub>4</sub>(3). Auf der linken Seite sieht man das Rhizoid in der Ausgangslage. Auf der rechten Seite wurden die orthogonalen Querschnitte, die durch die Linie A gehen, in zeitlicher Reihenfolge von links nach rechts aufgetragen. (Die horizontalen roten Striche geben an, ab welchem Zeitpunkt eine neue Zeitserie gestartet wurde.) Der Graph unter der Wachstumsanalyse zeigt die Fluoreszenzintensität des gesamten Rhizoids während des Wachstums. (Die Zeitachse wurde im angefügten Graph dargestellt.) Das Rhizoid zeigt für etwa eine Stunde ein normales Wachstumsverhalten mit Wachstumsgeschwindigkeiten um 80  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Nach dieser Zeit kommt es zu einer drastischen Verlangsamung des Wachstums. Während des Versuchs konnten Unregelmäßigkeiten in der Fluoreszenz gemessen werden, die im Graph als Intensitätsspitzen gezeigt sind. Ein regelmäßiger Anstieg der Fluoreszenz konnte dabei nicht beobachtet werden. Die starke Fluoreszenz am Anfang des Versuchs wird durch die Färbung mit DiBAC<sub>4</sub>(3) hervorgerufen und stellt sich nach ca. 10 min auf einen stabilen Wert ein. Der weiße Balken entspricht 40 $\mu\text{m}$ .**

Die Wachstumsanalyse zeigt, dass das Rhizoid für ca. eine Stunde ein normales Wachstum mit ca. 80 $\mu\text{m}/\text{h}$  aufweist, welches nach 70min zum Erliegen kommt.

Während der Wachstumsmessung konnten Erhöhungen in der Fluoreszenz des gesamten Rhizoids gemessen werden, welche jedoch nicht regelmäßig auftraten. Am Beginn des Experiments ist eine stärkere Fluoreszenz zu beobachten, die nach ca. 10min abfällt. Die Fluoreszenzintensität stellt sich danach auf einen relativen Wert von 1800-2000 ein. Die Intensitätsmessung der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz zeigt mehrfach Anstiege der Fluoreszenzintensität mit einer Dauer von ca. 5 min. Ein direkter Zusammenhang mit der Wachstumsgeschwindigkeit kann nicht hergestellt werden.

### 3.3.3. Verschwinden des DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradient nach Latrunculin B-Behandlung

Um die Wirkung einer Aktindepolymerisation auf den Fluoreszenzgradienten zu untersuchen, wurden Rhizoide mit Latrunculin B behandelt, mit DiBAC<sub>4</sub>(3) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im folgenden Bild ist die Wachstumsfront eines Rhizoids orthogonal gegen die Zeit aufgetragen. Um die Form des Fluoreszenzgradienten deutlich zu machen, wurde eine Zeitserie hinzugefügt.

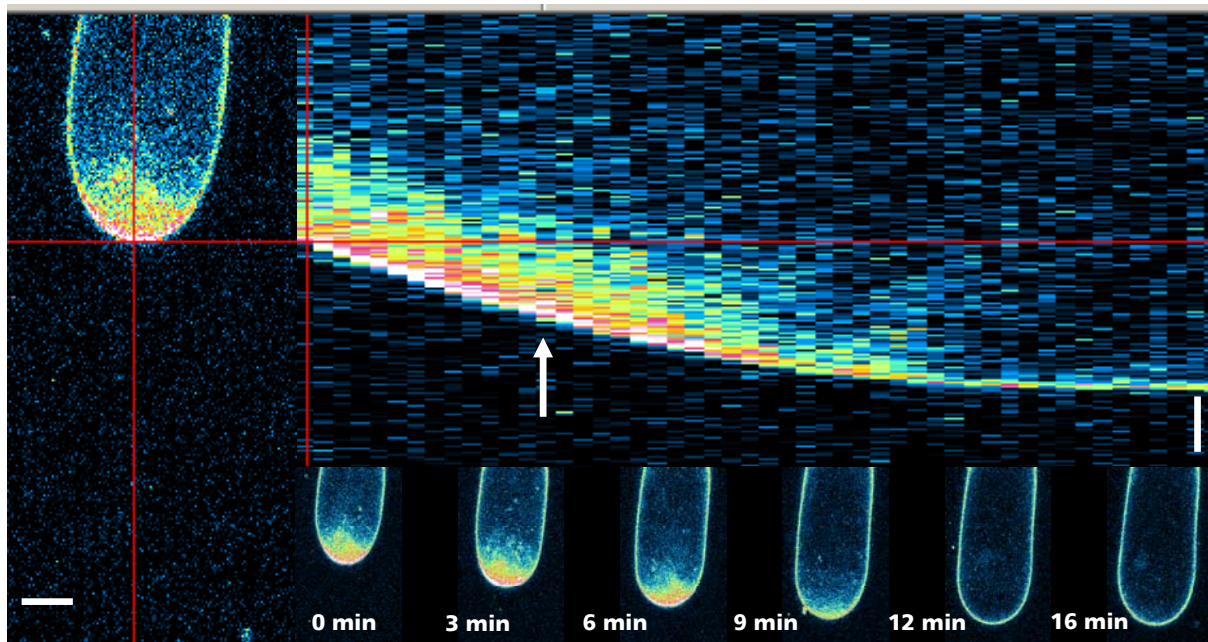
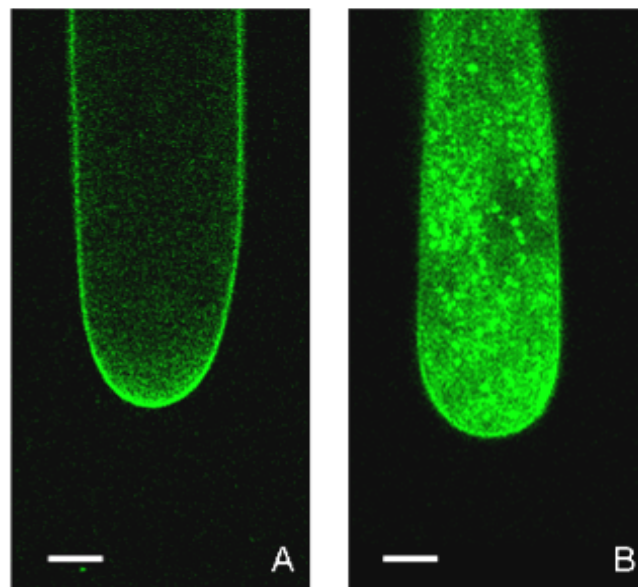


Abb. 31: Einfluss von Latrunculin B auf den Fluoreszenzgradienten in Chara-Rhizoiden. Auf der linken Seite ist ein Falschfarbenbild des Rhizoids gezeigt. Der vertikale rote Strich durch das Rhizoid zeigt an, durch welche Ebene die orthogonale Ansicht erzeugt wurde. Auf der rechten Seite sind die Fluoreszenzintensitäten in einem Abstand von 20s aufgereiht worden. Der weiße Pfeil gibt den Zeitpunkt der Latrunculin B-Behandlung an. Die Bilderserie zeigt das Rhizoid im Querschnitt. Die weißen Balken entsprechen 10 $\mu$ m. Deutlich zu erkennen ist, dass nach ca. 4min nach Zugabe von 1 $\mu$ M Latrunculin B das Wachstum stoppt und der Fluoreszenzgradient verschwindet. Es ist nur noch eine Fluoreszenz innerhalb der Plasmamembran zu sehen.

Die Behandlung mit  $1\mu\text{M}$  Latrunculin B führt nach ca. 4 min zu einem Wachstumstop des Rhizoids. Zudem konnte beobachtet werden, dass der Fluoreszenzgradient mit dem Stoppen des Wachstums verschwindet und nur noch innerhalb der Plasmamembran eine Fluoreszenz zu beobachten ist.

### 3.3.4. Einfluss von Gramicidin auf die DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz im Chara-Rhizoid

Um die Eigenschaft des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) in einem vollständig depolarisierten Rhizoid zu untersuchen, wurden Chara-Rhizoide mit Gramicidin permeabilisiert und im direkten Anschluss daran fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gramicidin besitzt die Eigenschaft, sich in die Plasmamembran einzulagern und diese durch Porenbildung durchlässig zu machen, es kommt zum vollständigen Austausch der Ionen und somit zu einer Depolarisierung der Zelle. Im Folgenden werden die Aufnahmen eines unbehandelten und eines mit Gramicidin behandelten Rhizoids gezeigt.



**Abb. 32** Funktioneller Test des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) an Chara-Rhizoiden. Beide Zellen wurden mit  $330\text{nM}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbt. Das Bild (A) zeigt eine normal wachsende intakte Zelle. Deutlich zu sehen ist ein Fluoreszenzgradient von der Apikalzone in Richtung Subapikalzone. Die Plasmamembran ist ebenfalls angefärbt. Das Bild (B) zeigt eine mit  $1\mu\text{M}$  Gramicidin behandelte Zelle. Es ist eine starke ungleichmäßige Fluoreszenz im Cytoplasma der gesamten Zelle zu beobachten. Die weißen Balken in den Bildern entsprechen  $10\mu\text{m}$ .

Die Behandlung mit Gramicidin, einem Plasmamembran permeabilisierenden Antibiotikum, sollte die Funktion von DiBAC<sub>4</sub>(3) als membranpotentialsensitiven Farbstoff testen. Die vollständige Depolarisation des mit Gramicidin behandelten und

mit DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbten Rhizoids zeigt sich in einer starken, granulären Fluoreszenz. Deutlich zu sehen ist auch eine Abstumpfung des Apex durch den Wachstumsstopp des mit Gramacidin behandelten Rhizoids.

### 3.3.5. Änderungen der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz im Chara-Rhizoid während der gravitropen Krümmung

Die folgenden fluoreszenzmikroskopischen Zeitserien zeigen Chara-Rhizoide, welche mit DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbt worden sind und gravitrop in 90° Horizontallage gereizt wurden. Ziel dieser Experimente war es, die Dynamik und das Verhalten der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz und damit eventuell auftretenden Membranpotentialänderungen während der gravitropen Krümmung zu untersuchen.

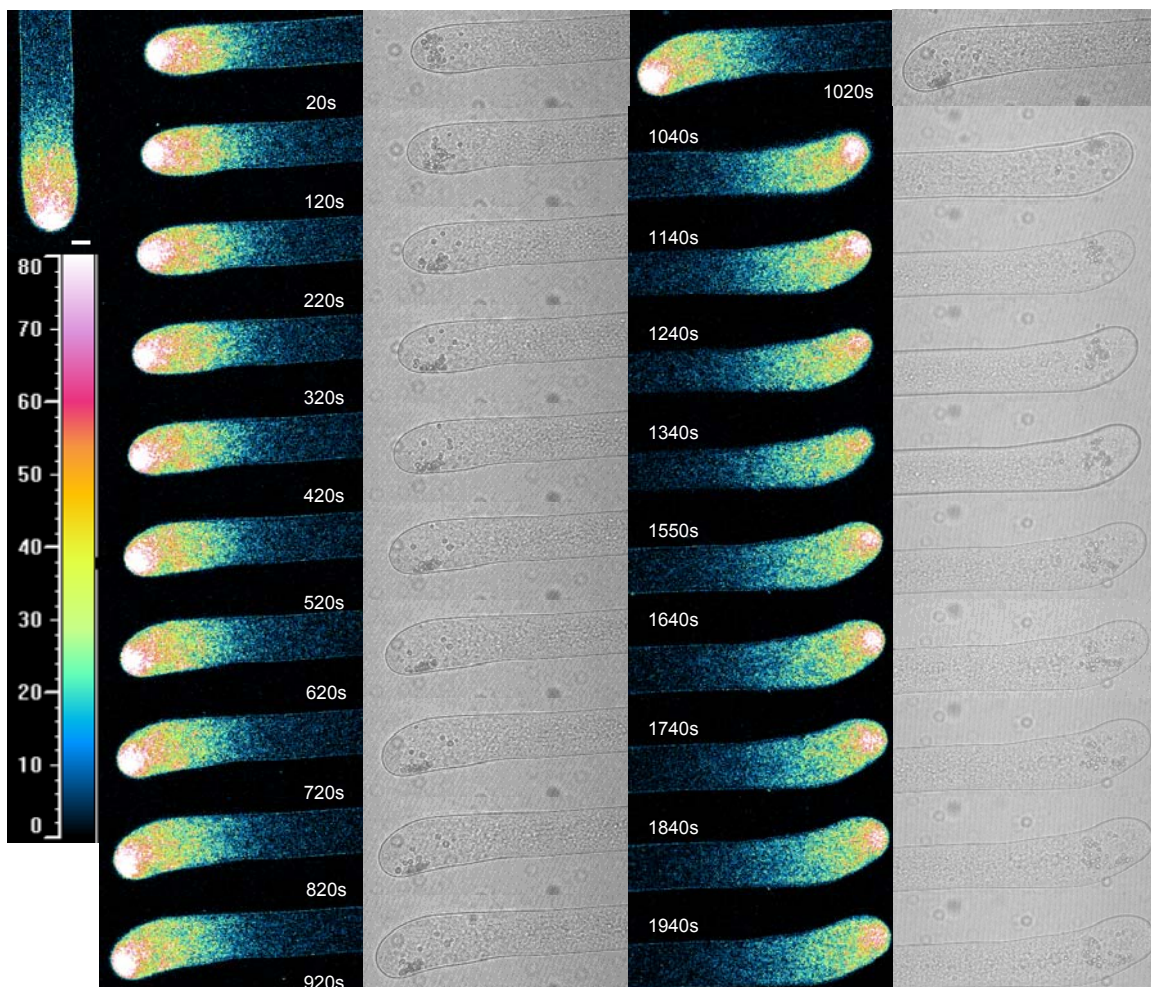
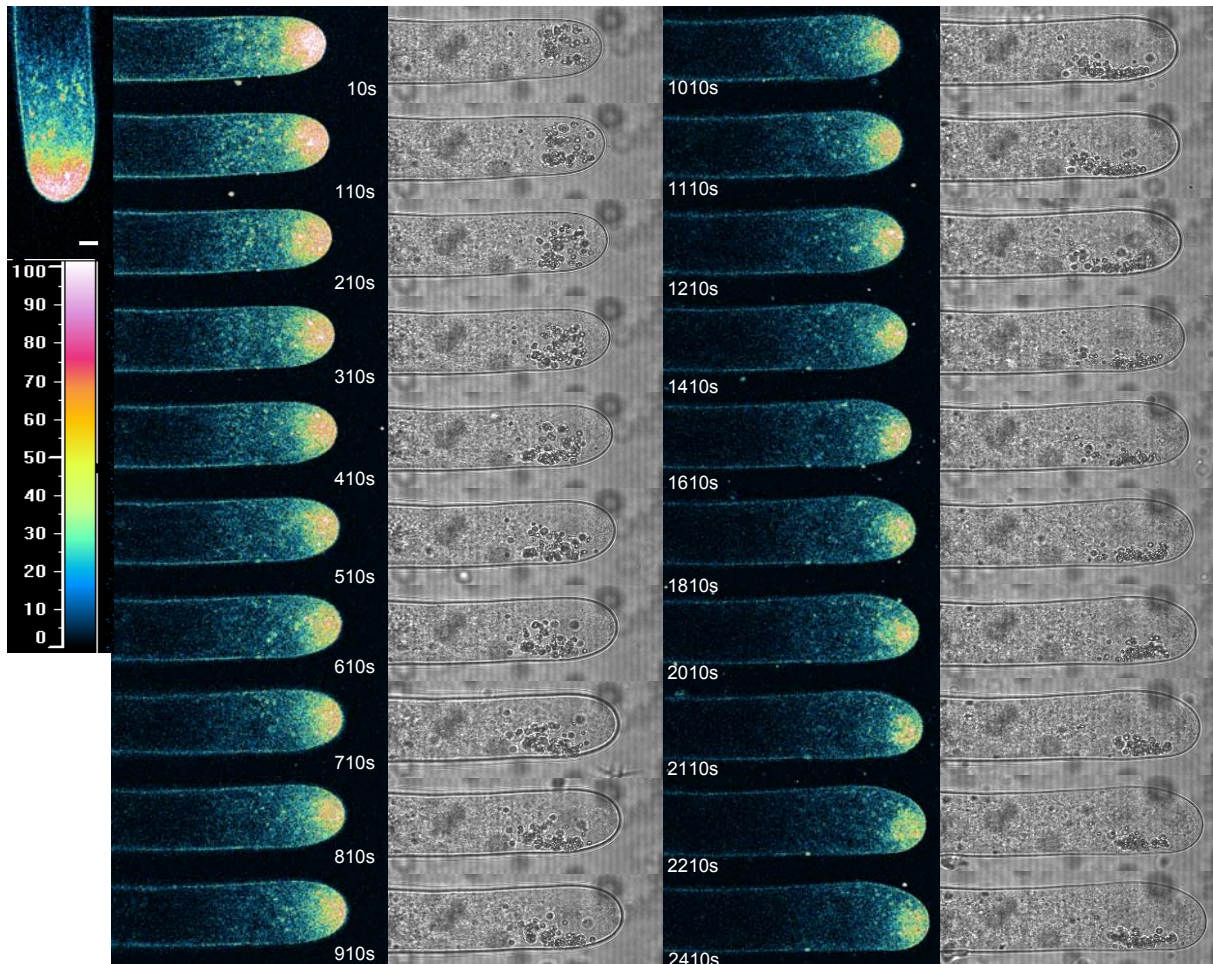


Abb. 33: Zeitserie eines mit DiBAC<sub>4</sub>(3) behandelten Rhizoids. Die Falschfarbenbilder und die dazugehörigen Durchlichtbilder sind in einer Zeitserie zusammengefasst. Auf der linken Seite ist das Rhizoid in der Ausgangsposition gezeigt. Bei diesem Versuch wurde das Rhizoid nach 1020s um 180° gedreht. Die Sekundenangaben beziehen sich auf die Zeit nach Horizontallage bzw. nach 180°-Drehung des Rhizoids. Der weiße Balken entspricht 10µm. Deutlich zu erkennen ist ein Fluoreszenzgradient vom Apex der Zelle bis ca. 100µm in Richtung Subapikalzone. Zudem kann ein stark fluoreszierendes Zentrum (Falschfarbe Weiß) beobachtet werden, welches eine Ausdehnung von ca. 10µm besitzt und sich in Wachstumsrichtung mitbewegt (Siehe Bilder 520s – 920s). Während der Bildaufnahmen bei 1240s bis 1550s konnte die konfokale Ebene nicht gehalten werden und musste manuell nachgestellt werden. Bei dieser manuellen

**Nachfokussierung ist zu erkennen, dass das Zentrum des Fluoreszenzgradienten eine kugelförmige Gestalt hat, die zum Rand des Rhizoids hin im Durchmesser kleiner und in der Intensität schwächer erscheint.**

Die Bilder der Zeitserie zeigen, dass das Zentrum des Fluoreszenzgradienten der Krümmung und der Zone des stärksten Wachstums folgt. In den Bildern 1240s bis 1550s ist zu erkennen, dass das Zentrum der Fluoreszenz eine sphärische Ausdehnung besitzt, da es zum Rand hin im Durchmesser kleiner und schwächer erscheint. Nach einer Umorientierung um  $180^\circ$  ist zu beobachten, wie das Zentrum auf die physikalische Unterseite wandert und sich wieder mit dem Ort des maximalen Wachstums deckt (1840s).

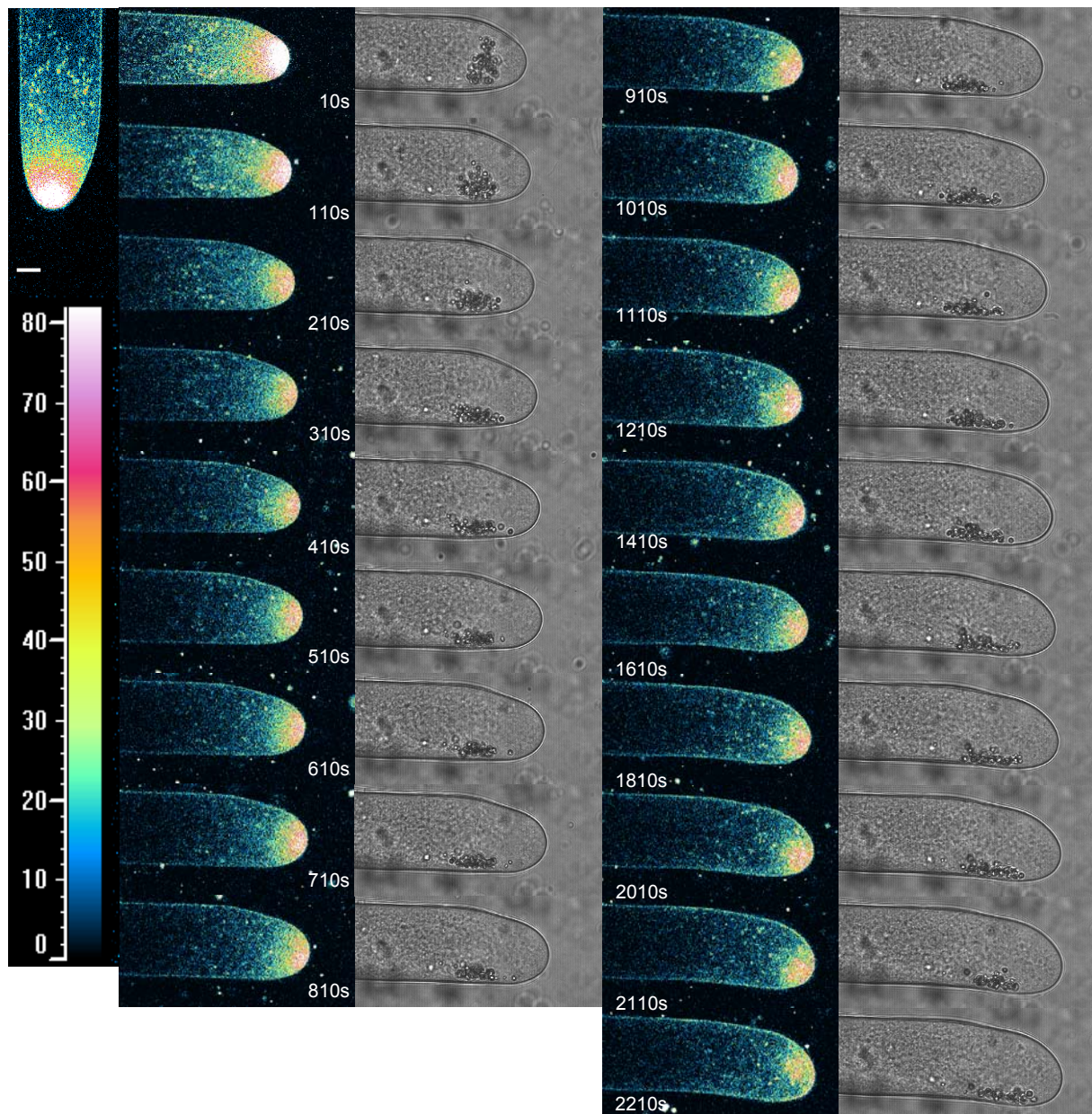
In den folgenden zwei Zeitserien wurden die Versuche ohne eine Umorientierung um  $180^\circ$  wiederholt. Es wird wie in der ersten Zeitserie eine Fluoreszenzaufnahme mit einem Durchlichtbild kombiniert.



**Abb. 34:** Zeitserie eines mit  $\text{DiBAC}_4(3)$  behandelten Chara-Rhizoids. Deutlich zu erkennen ist ein Fluoreszenzgradient vom Apex der Zelle bis ca.  $50\mu\text{m}$  in Richtung Subapikalzone. In den Bildern 2110s bis 2410s ist gut zu erkennen, wie sich das Fluoreszenzmaximum des  $\text{DiBAC}_4(3)$ -Fluoreszenzgradientens auf die physikalische Unterseite der Zelle verlagert. Die Sekundenangaben beziehen sich auf die Zeit nach Horizontallage des Rhizoids. Der weiße Balken entspricht  $10\mu\text{m}$ .

Auch in dieser Zeitserie ist zu erkennen, dass sich der Fluoreszenzgradient samt hellem Zentrum im Verlauf der gravitropen Krümmung in Richtung des sich nach unten verlagernden Wachstumszentrums verschiebt. Die Bilder 2110s bis 2410s zeigen deutlich wie sich der Gradient unter dem Einfluss der Statolithen verlagert.



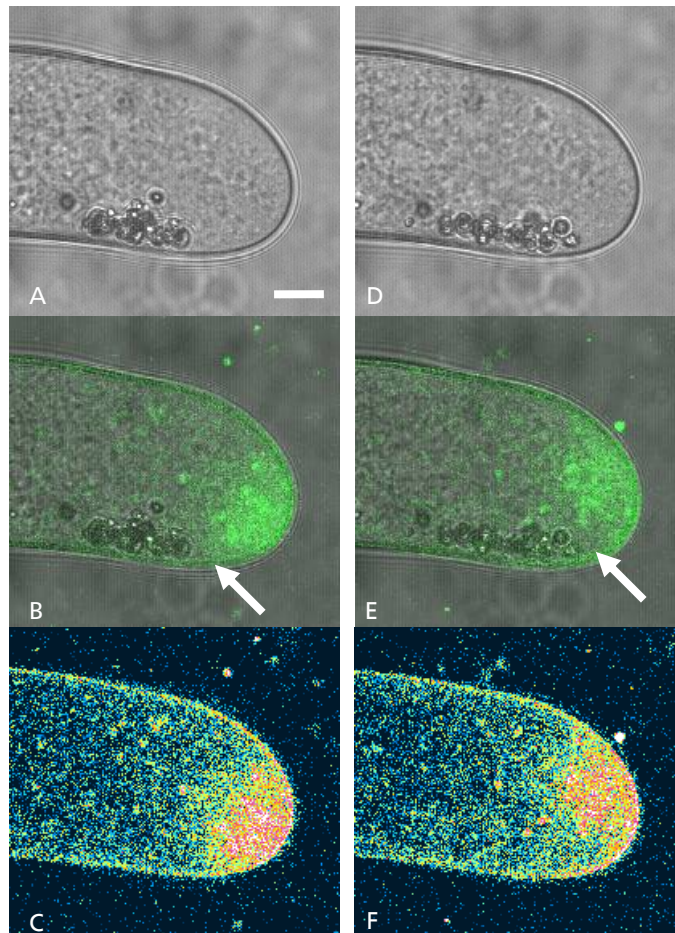


**Abb. 35:** Falschfarbenzeitserie eines mit  $\text{DiBAC}_4(3)$  behandelten Chara-Rhizoids. Die Sekundenangaben beziehen sich auf die Zeit nach Horizontallage des Rhizoids. Die Bilder zum Zeitpunkt 2110s und 2210s zeigen deutlich, dass die Statolithen einen Einfluss auf den Fluoreszenzgradienten besitzen. Die sich zum Apex hin bewegendes Statolithen lassen einen deutlichen Einfluss auf die  $\text{DiBAC}_4(3)$ -Fluoreszenz erkennen. Der weiße Balken entspricht  $10\mu\text{m}$ .

Die Zeitserie zeigt in den Bildern zum Zeitpunkt 2110s und 2210s wie Statolithen, welche zum Apex hin verschoben werden, den Fluoreszenzgradienten auf die Oberseite des Apex verschieben. In der nächsten Abbildung sind diese Bilder vergrößert dargestellt.

### 3.3.6. Beeinflussung des Fluoreszenzgradienten durch Statolithen

Es ist zu erkennen, dass die Statolithen einen Einfluss auf die Fluoreszenz haben. In den Bildern zum Zeitpunkt 2110s und 2210s wird jeweils ein Durchlicht-, ein Misch- und ein Falschfarbenbild gezeigt.

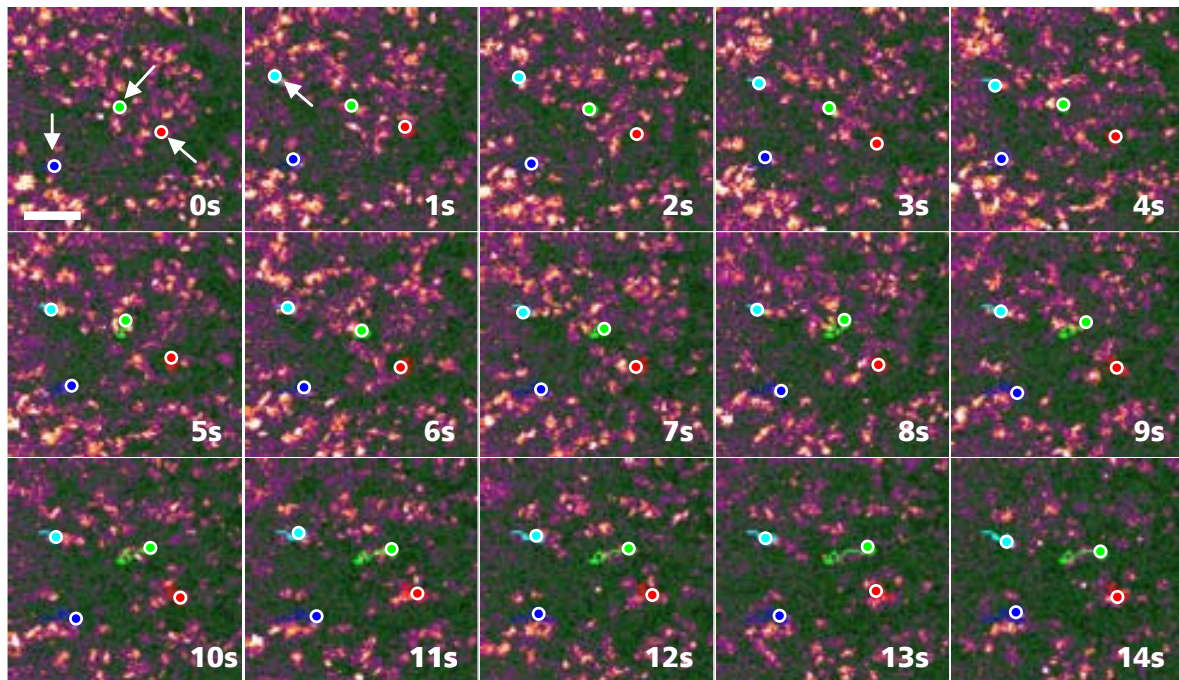


**Abb. 36:** Beeinflussung des DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradienten durch Statolithen. Die Bilder A-C wurden in einem zeitlichen Abstand von 200s zu den Bildern D-F aufgenommen. Die Bilder A+D sind Hellfeldaufnahmen, die Bilder B+E sind Kombinationen aus Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahme und die Bilder C+F zeigen eine Falschfarbendarstellung des Fluoreszenzgradienten. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Fluoreszenzgradient und der Statolithenkomplex durch eine Zone schwacher Fluoreszenz getrennt sind (weiße Pfeile). Der Transport der Statolithen in Richtung Apex verschiebt diesen Gradienten in Richtung obere Flanke (E+F). Die Bilder wurden 35 min nach der Zugabe von DiBAC<sub>4</sub>(3) aufgenommen. Der weiße Balken in Bild A entspricht einer Länge von 10µm.

In den Bildern ist deutlich zu erkennen, dass die Statolithen einen Einfluss auf die Fluoreszenz im Apex haben. Werden die Statolithen zur Zellspitze hin bewegt, weicht der Fluoreszenzgradient zur Oberseite des Rhizoids aus. Dabei kann eine Zone sehr schwacher Fluoreszenz zwischen Statolithenkomplex und Fluoreszenz beobachtet werden.

### 3.3.7. Verfolgung fluoreszierender Partikel innerhalb der Subapikalzone

Fluoreszierende Partikel aus der Subapikalzone wurden mittels eines manuellen Tracking Programms, welches als Softwareerweiterung zu ImageJ zur Verfügung steht, verfolgt.

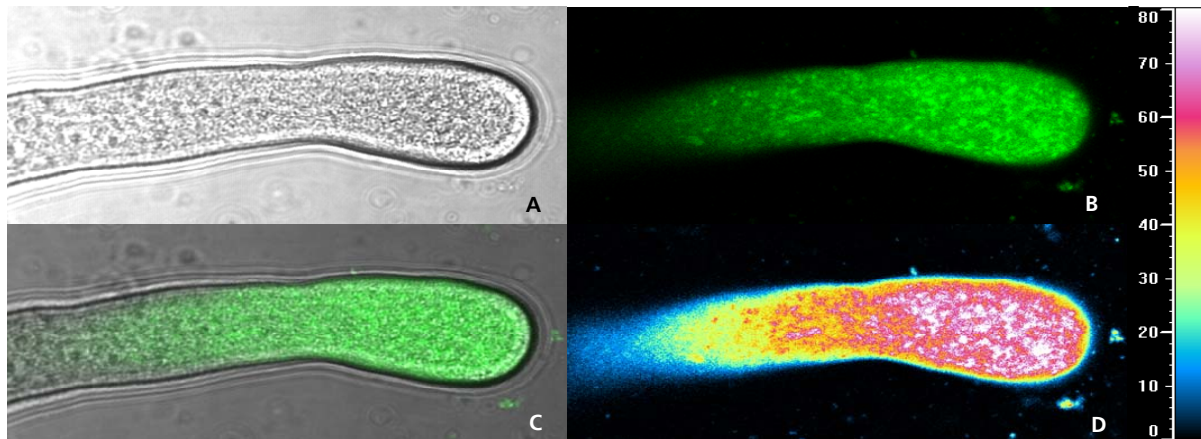


**Abb. 37: Falschfarbendarstellung der Partikelverfolgung.** Die Zeitserie zeigt einen Ausschnitt aus der mittleren Subapikalzone ca.  $80\mu\text{m}$  oberhalb des Zellapex (Wachstumsrichtung des Rhizoids in dieser Darstellung nach links). Die Einzelbilder sind jeweils in einem Abstand von 1s aufgenommen worden. Vier Partikel wurden manuell verfolgt. Es konnten zusammenhängende Spuren der fluoreszierenden Partikel visualisiert werden. Die Größe der Partikel entspricht ca.  $100\text{-}200\text{nm}$ . Der weiße Balken im ersten Bild entspricht einer Länge von  $1\mu\text{m}$ .

Die Partikelverfolgung zeigt deutlich, dass die beobachtete Fluoreszenz aus einzelnen Partikeln zusammensetzt wird. Die gemessene Größe dieser Partikel beträgt ca.  $100\text{-}200\text{nm}$  und entspricht somit der Größe von sekretorischen Vesikeln. Die Geschwindigkeit der Vesikel beträgt ca.  $30\text{-}50\text{nm/s}$ .

### 3.3.8. Amaryllis-Pollenschläuche

Zum Vergleich mit anderen spitzenwachsenden Systemen wurden Amaryllis-Pollenschläuche mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert und mikroskopisch untersucht. In der nachfolgenden Abbildung wird ein Pollenschlauch gezeigt, der mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert wurde.

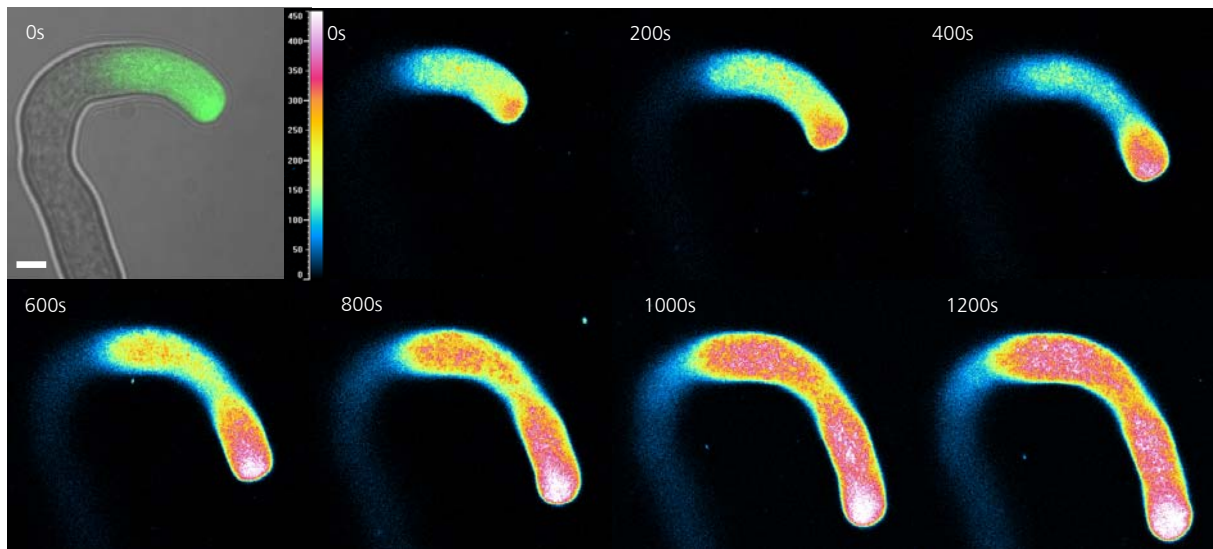


**Abb. 38:** Pollenschläuche von *Amaryllis belladonna* - DiBAC<sub>4</sub>(3) behandelt. Das Bild A zeigt einen 4h alten Pollenschlauch im Durchlichtbild. Das Fluoreszenzbild B zeigt die von DiBAC<sub>4</sub>(3) erzeugte Fluoreszenz, welches im Bild C mit dem Durchlichtbild hinterlegt wurde. Die Intensität der Fluoreszenz wird besonders gut sichtbar in Bild D, einem Falschfarbenbild mit relativen Fluoreszenzintensitäten. Die DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz in Pollenschläuchen ist granulär. Der Fluoreszenzgradient besitzt sein Fluoreszenzmaximum in der Wachstumszone des Apex und verläuft von dort basalwärts entlang der Pollenschlauchzelle.

Bei den Aufnahmen des mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten Pollenschlauchs kann ein Fluoreszenzgradient innerhalb der Pollenschlauchspitze beobachtet werden. Der Gradient besitzt eine Ausdehnung von ca. 200µm, wobei der gesamte Pollenschlauch eine Fluoreszenz aufweist. Die Abgrenzung des Gradienten ist nicht so stark ausgeprägt, wie es im Chara-Rhizoid zu beobachten ist. Jedoch ist das Maximum der Fluoreszenz auch hier im Pollenschlauch Apex lokalisiert werden.

### 3.3.9. Zeitserien des Pollenschlauchwachstums

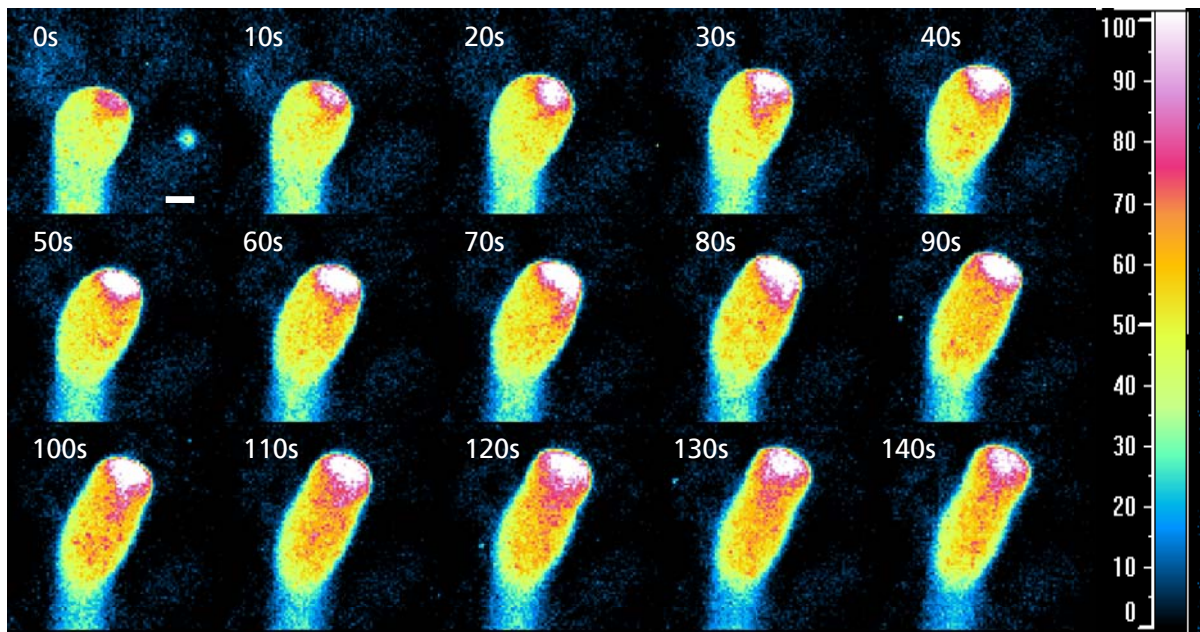
In der folgenden Abbildung wird die Zeitserie eines wachsenden und mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten Amaryllis-Pollenschlauchs in Falschfarben gezeigt.



**Abb. 39:** Zeitserie eines mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten Amaryllis-Pollenschlauchs. Links oben in der Abbildung ist ein Mischbild des Pollenschlauchs zum Zeitpunkt 0s dargestellt. Die folgenden Bilder wurden in einem zeitlichen Abstand von 200s aufgenommen und als Falschfarbenbild konvertiert. Es ist zu erkennen, dass das Maximum des Fluoreszenzgradienten im Apex der Zelle liegt. Im Gegensatz zum Chara-Rhizoid besitzt der Pollenschlauch auch im basalen Teil eine starke Fluoreszenz. Der weiße Balken entspricht 10µm.

Die Zeitserie des Pollenschlauchwachstums zeigt ein helles Fluoreszenzzentrum in der Spitze des Pollenschlauchs. Anders als beim Chara-Rhizoid kann hier über die gesamte Länge des Pollenschlauchs eine Fluoreszenz beobachtet werden, die jedoch im Apex ihr Maximum besitzt.

In der folgenden Abbildung wird eine Zeitserie eines wachsenden Pollenschlauchs vergrößert dargestellt, um die Veränderung der Fluoreszenz während des Wachstums besser zu verdeutlichen.



**Abb. 40:** Vergrößerte Aufnahme des Pollenschlauchwachstums unter  $\text{DiBAC}_4(3)$ . In der Abbildung ist der Apex eines wachsenden und mit  $\text{DiBAC}_4(3)$  markierten Pollenschlauchs vergrößert mit Falschfarben dargestellt. Die Zeitabstände zwischen den Bildern sind in Sekunden in jedem Bild angegeben. Es ist zu erkennen, dass Vesikel, wenn sie in Richtung Apex transportiert werden, an Fluoreszenzintensität zunehmen. Im Apex bildet sich ein Fluoreszenzgradient, der sich in der Ausdehnung leicht verändert. Wieder ist ein stark fluoreszierendes Zentrum in der Spitze des Pollenschlauchs zu beobachten. Der weiße Balken im ersten Bild entspricht  $6\mu\text{m}$ .

In der gezeigten Bilderserie kann man beobachten, wie Partikel, wenn sie in Richtung Apex transportiert werden, an Helligkeit zunehmen. Die Bilder zum Zeitpunkt 40s-70s zeigen eine Ansammlung von Partikeln, die auf der rechten Seite im Pollenschlauch zum Apex transportiert werden. Dabei sieht man, wie die Fluoreszenzintensität der Vesikel mit geringer werdendem Abstand zum Apex zunimmt. Die Fluoreszenzintensität der Vesikel nimmt zu nachdem diese in den Apex transportiert worden sind.

### 3.4. Carbocryonix – Experimente

Die Carbocryonix-Gefrieranlage dient der Gefrierfixierung von biologischen Proben zur molekularbiologischen Untersuchung relevanter Signalwege des Gravitropismus. Die Anlage wurde speziell für den Einsatz im Parabelflug entwickelt und gebaut. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kontrolleexperimente gezeigt.

#### 3.4.1. Temperaturkontrollexperimente

Die folgenden Ergebnisse zeigen den Temperaturverlauf nach Öffnen der Kohlendioxidflaschen in den Gefrierseinheiten der Carbocryonix-Anlage. Es wurden sowohl Thermoelemente als auch Temperaturdatenlogger zur Messung eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war die Kammer von außen nicht isoliert. Zur Messung der Einfriergeschwindigkeit wurde ein Thermoelement direkt neben eine Probe, eine Arabidopsis-Wurzel auf ein mit Agar-Agar getränktes Filterpapier in einer Petrischale, gelegt. Die Langzeitmessung wurde mit einem Temperaturlogger in der Gefrierkammer aufgenommen.

##### 3.4.1.1. Einfriergeschwindigkeit

Um die Abkühlgeschwindigkeit in den Gefrierkammern zu testen, wurden zwei Gefrierexperimente durchgeführt. Im folgenden Diagramm sind die verrechneten Mittelwerte von zwei Messungen dargestellt.

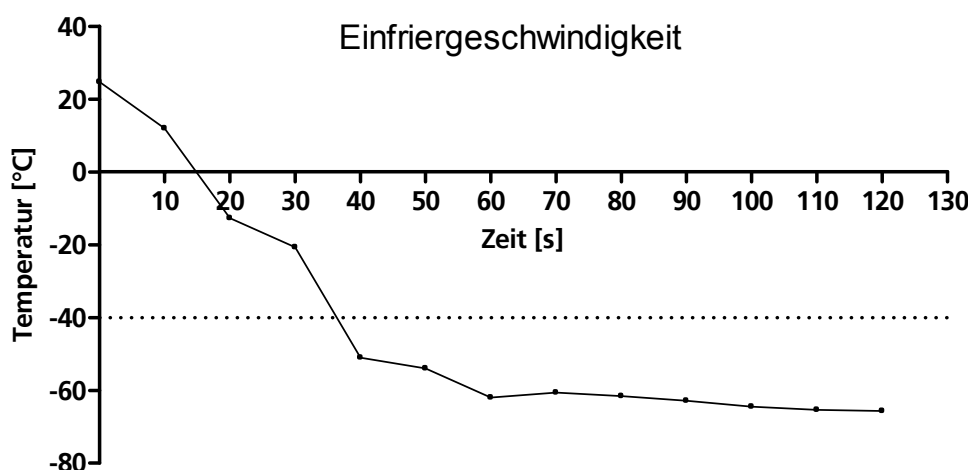
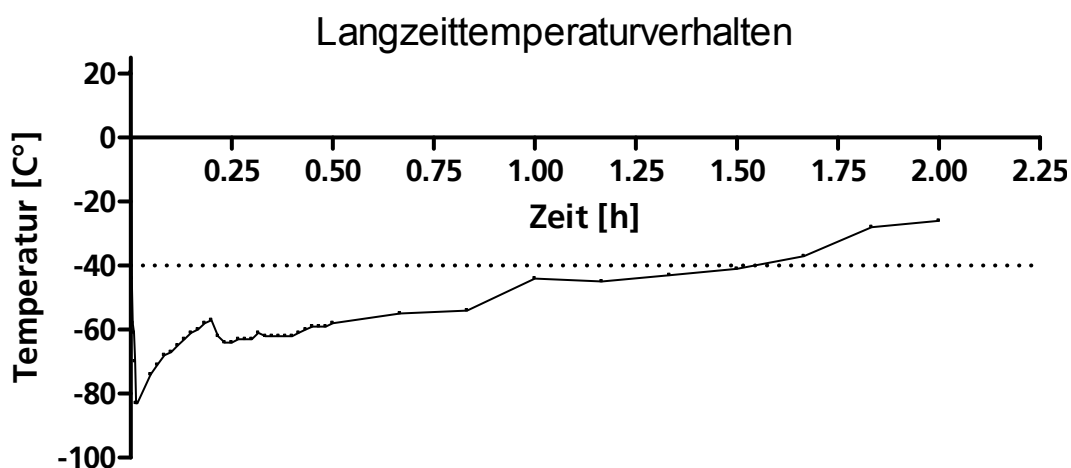


Abb. 41: Temperaturverlauf nach Beginn der Trockeneisproduktion. Nach ca. 30s wird eine Temperatur von ca. -20°C erreicht. Nach 60s stellt sich eine Temperatur von ca. -60°C ein.

Das Diagramm zeigt, dass die Temperatur an der Probe nach ca. 35s unter  $-40^{\circ}\text{C}$  sinkt. Nach ca. 1min ist die Tiefsttemperatur von  $-60^{\circ}\text{C}$  erreicht.

### 3.4.1.2. Langzeittemperaturverhalten

Damit genauere Aussagen über die Temperaturstabilität in den Gefrierkammern gemacht werden können, wurden zwei Langzeitexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Temperaturlogger in die Gefrierkammer gelegt und die Kammer mit Kohlendioxidschnee geflutet. Im Folgenden sind die Mittelwerte von zwei Experimenten aufgetragen.



**Abb. 42:** Langzeitversuch zur Ermittlung des Temperaturverlaufs in den Gefrierkammern über 2h. Es ist deutlich zu sehen, dass die Temperatur für ca. 1,5h unterhalb von  $-40^{\circ}\text{C}$  gehalten wird.

Die Langzeitmessungen haben gezeigt, dass die fixierten Proben bis zu 1,5h bei einer gemessenen Temperatur von unter  $-40^{\circ}\text{C}$  in den Gefrierkammern verbleiben können.

### 3.4.2. Fixierungsqualität - RNA Bioanalyser Qualität der mRNA nach Einfrierfixierung in der Carbocryonix Anlage

Um die Qualität der cryofixierten und im Anschluss extrahierten RNA zu prüfen, wurden Kontrollexperimente mit dem Agilent Bioanalyser System unternommen, die im Folgenden aufgeführt sind.

#### 3.4.2.1. Unbehandelte Wurzeln – Vergleich

Um die Qualität der eingefrorenen Proben bezüglich der RNA Fixierung zu testen, wurden Vergleiche zwischen verschiedenen Fixierungsmethoden unternommen. Es



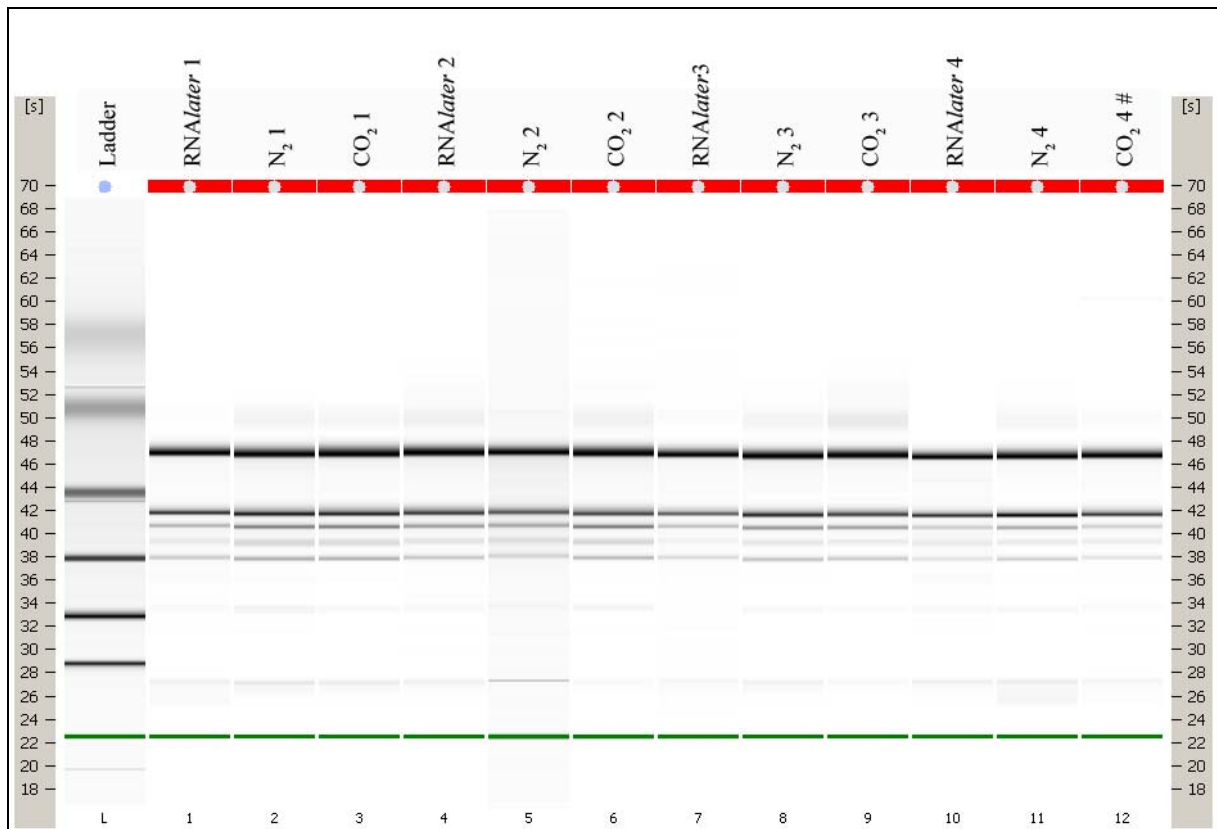
wurden vier Tage alte Arabidopsis-Pflanzen mittels flüssigen Stickstoffs, RNALater® und der Carbocryonix-Anlage fixiert. Aus den fixierten Proben wurde die Gesamt-RNA extrahiert und im Bioanalyser System der Firma Agilent auf seine Qualität hin untersucht. Als Beurteilungskriterien wurden die RNA- Konzentration [ng/µl], das RNA-Areal sowie das Verhältnis von 18s zu 28s RNA angegeben. Der RIN Wert (RNA Integrity Number) konnte nicht angegeben werden.

**Tabelle 3: Vergleich der Fixierungsmethoden – Es werden die Ergebnisse von vier Versuchsdurchläufen mit der Angabe der RNA-Konzentration, des RNA-Areals und des Verhältnis von 28S zu 18S rRNA angegeben. Es werden die Fixierungen RNALater®, flüssiger Stickstoff (N<sub>2</sub>) und die Fixierung mit Kohlendioxidschnee (CO<sub>2</sub>) verglichen. \* Die Probe der 2. N<sub>2</sub> Fixierung unterlag einem Verlust an Pflanzenmaterial während des Mörserns.**

<b>Experiment 1</b>	<b>RNALater®</b>	<b>N<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>
<b>RNA Konzentration [ng/µl]</b>	173,91	633,25	450,6
<b>RNA Areal</b>	438,72	1593,87	1134,2
<b>rRNA Verhältnis (28S/18S)</b>	1,86	1,66	1,74
<b>Experiment 2</b>	<b>RNALater®</b>	<b>N<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>
<b>RNA Konzentration [ng/µl]</b>	185,6	46,46 *	100,01
<b>RNA Areal</b>	467,07	116,94	251,72
<b>rRNA Verhältnis (28S/18S)</b>	1,79	1,93	2,01
<b>Experiment 3</b>	<b>RNALater®</b>	<b>N<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>
<b>RNA Konzentration [ng/µl]</b>	83,13	484,9	220,97
<b>RNA Areal</b>	209,23	1220,51	556,16
<b>rRNA Verhältnis (28S/18S)</b>	2,15	1,69	1,91
<b>Experiment 4</b>	<b>RNALater®</b>	<b>N<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub> (box)</b>
<b>RNA Konzentration [ng/µl]</b>	257,17	223,17	146
<b>RNA Areal</b>	647,29	561,71	367,37
<b>rRNA Verhältnis (28S/18S)</b>	1,69	1,55	1,82

Die Konzentrationswerte der RNALater®-Fixierung reichen von 83,13 bis 257,17ng/µl. Die der N<sub>2</sub> Fixierung von 46,46 bis 633,25ng/µl und die der Kohlendioxidschnee-Fixierung von 146 bis 450,6ng/µl. Es können keine gravierenden Unterschiede im RNA-Areal beobachtet werden. Das Verhältnis von 28S zu 18S RNA bewegt sich bei den Proben, die mit CO<sub>2</sub> fixiert wurden, um den Wert 2. Die Verhältniswerte der rRNA zeigen sowohl bei den Proben, die mit RNALater®, als auch bei denen, die mit flüssigem Stickstoff fixiert wurden, keine signifikanten Unterschiede.

Im folgenden Gel-Bild werden die Banden dargestellt, die mittels des Bioanalysers gewonnen wurden. Dargestellt werden ein Größenmarker und die Extraktionsbanden der verschiedenen Versuchansätze der RNAlater®, fl. Stickstoff- und Kohlendioxid-Fixierungen.



**Abb. 43: Agilent RNA Gel der Fixierungsvergleiche –** Das dargestellte Gel zeigt die extrahierte RNA aus den beschriebenen Fixierungsversuchen (RNAlater®, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>). (L) Größenmarker. Die Banden 1, 4, 7 und 10 entsprechen der Fixierung mit RNAlater®, die Banden 2, 5, 8, und 11 zeigen die Ergebnisse der N<sub>2</sub>-Fixierung, die Banden 3, 6, 9, und 12 die Ergebnisse der in der Carbocryonix Anlage fixierten Proben. Deutlich zu erkennen sind jeweils zwei starke Banden bei ca. 42 und 47 Svedberg, die die Banden der 28S und 18S rRNA repräsentieren. Die Qualität der extrahierten RNA ist vergleichbar; keine der Proben zeigt eine Degradation der RNA.

Die im oberen Gel-Bild dargestellten Bandenmuster zeigen keine Anzeichen für eine Degradation der RNA nach der Fixierung und Extraktion. Die Qualität der extrahierten RNA aus den Fixierungsversuchen mit dem chemischen Fixans RNAlater®, mit flüssigem Stickstoff bzw. mit Trockeneisschnee ist von ähnlich guter Qualität.

## 4. Diskussion

### 4.1. Charakterisierung der Graviperzeption in Arabidopsis-Wurzeln

In den letzten Jahren konnten detaillierte Erkenntnisse über den interzellulären und molekularen Signalverlauf bei der gravitropen Reaktion von Wurzeln und Sprossen Höherer Pflanzen gewonnen werden (Palme et al. 2006). Es ist nachgewiesen worden, dass das Wachstumshormon Auxin eine entscheidende Rolle bei der Gravireaktion von Pflanzenorganen spielt. In unstimulierten Wurzeln verläuft ein symmetrischer Auxinstrom von der Columellazone in der Spitze der Wurzel über die lateralen Zellgewebe zur basalen Streckungszone der Wurzel (Ottenschläger et al. 2003). Erfährt die Wurzel eine Lageveränderung abweichend von ihrer natürlichen Orientierung, erfolgt eine Verschiebung des Auxingradienten auf die physikalische Unterseite der Wurzel, wo durch höhere Auxinkonzentrationen das Zellwachstum und die Zellstreckung gehemmt werden. Ein differenzielles Flankenwachstum der Elongationszone führt schließlich zur Krümmung der Wurzel (Ottenschläger et al. 2003). Dabei wurde gezeigt, dass der interzelluläre Transport des Auxins durch plasmamembrangebundene Proteine, die PIN-Proteine erfolgt. Bis heute konnten verschiedene Gene der PIN-Proteinfamilie identifiziert werden (Blilou et al. 2005; Friml et al. 2002; Palme et al. 2006). Im Gegensatz zu den Vorgängen der Signaltransmission und der gravitropen Reaktion sind die frühen Mechanismen des Gravitropismus - Suszeption und Perzeption – in den schwerkraftwahrnehmenden Zellen Höherer Pflanzen bis heute wenig verstanden. Diese Arbeit sollte deshalb die Mechanismen der frühen Schwerkraftwahrnehmung in den Wurzelstatozyten Höherer Pflanzen weiter aufklären und charakterisieren. Als Modellsystem für Experimente unter normalen Schwerkraftbedingungen als auch in Mikrogravitation wurde *Arabidopsis thaliana* verwendet. In Weiterführung der von Limbach et al. (2005) gewonnenen Resultate an Chara sollte insbesondere analysiert werden, ob mechanische Kräfte Einfluss auf die Aktivierung des Gravirezeptors bei Arabidopsis-Wurzelstatozyten haben und welche Funktion das Aktinzytoskelett bei der Perzeption hat. Die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch die Behandlung der Wurzeln mit Latrunculin B sollte zur Aufklärung der Rolle des Aktinzytoskeletts während der Perzeption beitragen.

Es wird angenommen, dass das Aktinsystem innerhalb der Statocyten zur Übertragung von Druck und Zugkräften auf die Gravirezeptoren dient (Sievers et al. 1989). Dabei erzeugen die sedimentierenden Statolithen mechanische Kräfte, die durch das Aktinsystem auf mechanosensitive Kanäle (SACs – *stretch activated channels*) übertragen werden sollen (Perbal und Driss-Ecole 2003).

Im Gegensatz zum von Perbal und Driss-Ecole (2003) vermuteten Mechanorezeptor in den Columellazellen könnten auch elektro-chemische Wechselwirkungen auf den Oberflächen von Statolithen und membrangebundenen Rezeptormolekülen eine gravitrope Reaktion auslösen (Alberts et al. 1995; Limbach et al. 2005).

Im Chara-Rhizoiden wurden Statolithen nachgewiesen, welche durch Sedimentation auf spezielle Plasmamembranbereiche eine gravitrope Krümmung auslösen (Sievers et al. 1991; Sievers et al. 1996; Braun 1997, 2002; Braun und Limbach 2006). Experimente unter 1g Bedingungen und in Mikrogravitation haben gezeigt, dass das Aktinzytoskelett bei der Suszeption und der Perzeption der Schwerkraft eine entscheidende Rolle spielt, indem es die Positionierung und die Sedimentation der Statolithen kontrolliert (Sievers et al. 1996; Braun et al. 2004; Braun und Limbach 2006). Die Statolithen werden durch ein Gleichgewicht zweier Kräfte auf der Höhe eines bestimmten Plasmamembranbereichs gehalten, in dem sich die Schwerkraftrezeptoren befinden (ca. 10-40µm hinter dem Apex). Die Schwerkraft in Richtung der Zellspitze bei natürlicher Ausrichtung der Rhizoide wirkt dabei den Aktomyosinkräften der Zelle vektoriell entgegen, so dass sich die Statolithen in einer dynamisch stabilen Position immer auf Höhe der Gravirezeptoren befinden. Wird das Rhizoid stimuliert und die Sedimentation der Statolithen entlang des Schwerkraftvektors eingeleitet, sorgen Aktomyosinkräfte für einen aktiven Transport der Statolithen zur Zone der Gravirezeptoren. Nur in dieser Zone können Statolithen eine gravitrope Reaktion auslösen, was Zentrifugenversuche und Versuche mit einer Laser-Pinzette bestätigt haben (Braun 2002; Braun et al. 2004; Braun und Limbach 2006). Somit sorgt das Aktinzytoskelett für eine kontrollierte Positionierung der Statolithen bei der Wahrnehmung der Schwerkraft.

Experimente an Kressewurzeln in Höhenforschungsraketen und an Linsenkeimlingen im Space Shuttle haben ähnlich wie im Chara-Rhizoid auch in Höheren Pflanzen Interaktionen zwischen dem Aktinzytoskelett und den Statolithen gezeigt (Volkman et al. 1991; Driss-Ecole et al. 2000; Blancaflor 2002). Dabei ist beobachtet worden, wie der

Statolithenkomplex bereits innerhalb sechsminütiger Mikrogravitation nach oben, entgegen dem ursprünglichen Gravitationsvektor, angehoben wurde. Diese Experimente haben verdeutlicht, dass die Statolithen in beiden Fällen durch Aktomyosinkräfte transportiert und positioniert werden (Volkman 1991). Linsenkeimlinge, die in Mikrogravitation kultiviert wurden, zeigen eine größere Verteilung von Statolithen in Wurzelstatozyten. Bei diesen Pflanzen konnte zudem eine stärkere Gravireaktion beobachtet werden verglichen mit Pflanzen, die unter 1g angezogen wurden. Es wird angenommen, dass durch eine größere Verteilung von Statolithen mehr Interaktionen zwischen dem Aktinzytoskelett und den sedimentierenden Statolithen stattfindet und somit ein stärkeres Perzeptionssignal ausgelöst wird. Diese Beobachtungen unter Mikrogravitationsbedingungen führten zu der Annahme, dass das Aktinzytoskelett auch in den schwerkraftwahrnehmenden Zellen Höherer Pflanzen als potenzielle Überträger von Druck- oder Zugkräften eine entscheidende Rolle bei der Schwerkraftsuszeption und -perzeption haben könnte - eine Annahme, die bis heute vielfach in der Literatur nachzulesen ist (Perbal und Driss-Ecole 2003). Dabei wird vermutet, dass durch die Sedimentation der Statolithen auf das Aktinnetzwerk Zugkräfte entstehen. Diese Kräfte könnten durch das Aktin auf mechanosensitive Kanäle (stretch activated channels = SACs) weitergeleitet werden, die man im ER oder der Plasmamembran vermutet (Sievers et al. 1991; Yoder et al. 2001; Perbal und Driss-Ecole 2003). Versuche, bei denen aktindepolymerisierende Substanzen verwendet wurden, haben gezeigt, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts in den Statozyten die Gravireaktion von Wurzeln verstärken kann (Hou et al. 2003, 2004; Blancaflor et al. 2003). Diese Experimente widersprechen den Hypothesen, dass das Aktin eine notwendige Aufgabe bei der Graviperzeption in Höheren Pflanzen übernimmt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Parabelflug- und Bodenexperimente mit Arabidopsis-Wurzeln, deren Aktinzytoskelett mittels Latrunculin B zerstört wurde, die Aufgabe des Aktins während der Graviperzeption genauer untersucht werden.

In früheren Parabelflugexperimenten mit Chara-Rhizoiden konnte bereits aufgeklärt werden, dass alleine der Kontakt zwischen sedimentierten "schwerelosen" Statolithen und der Plasmamembran ausreichend ist für die Aktivierung der Gravirezeptoren. Druck, vermittelt über das Gewicht der Statolithen, ist für die Aktivierung der Rezeptoren nicht notwendig (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Die Versuche der vorangegangenen Arbeit (Hauslage 2005) mit Chara-Rhizoiden wurden nun in der vorliegenden Arbeit auf

Arabidopsis-Wurzeln angepasst und weiter ausgedehnt und lieferten in gleicher Weise stichhaltige Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung der frühen Graviperzeptionsmechanismen in Höheren Pflanzen. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass es sich bei den Gravirezeptoren in den Wurzelstatozyten Höherer Pflanzen ebenfalls um Kontaktrezeptoren handelt, die nicht, wie häufig in der Literatur postuliert, durch Druck- und Zugkräfte – vermittelt über das Aktinsystem – aktiviert werden.

#### 4.1.1. Bodenkontrollexperimente

Die Ergebnisse, die während der Bodenkontrollexperimente gewonnen wurden, weisen *Arabidopsis thaliana* (cv. wassilewskija) als gut geeignet zur Untersuchung in Parabelflügen aus. Die Inversionsexperimente zeigten deutlich, dass eine Inversionszeit von 10s und damit ein kurzes Entfernen der Statolithen vom Gravirezeptor ausreichte, um eine signifikante Reduzierung der gravitropen Krümmung verglichen mit den nicht invertierten Kontrollproben zu erhalten. Es konnten keine Verringerung der gravitropen Wurzelkrümmung bei einer Inversionszeit von 5s beobachtet werden. Die 22s andauernden Mikrogravitationsphasen des Parabelflugprofils reichen demnach aus, um einen Mechanorezeptor durch das fehlende Gewicht der Statolithen zu deaktivieren und so eine reduzierte Wurzelkrümmung hervorzurufen, da in dieser Zeit ein Mechanorezeptorsystem durch "schwere lose" Statolithen, welche keinen Druck mehr ausüben können, deaktiviert würde. Chara-Rhizoide zeigten den gleichen Effekt in Inversionsexperimenten. Auch bei Chara-Rhizoiden kam es bei einer Inversionszeit von 10s zu einer signifikant kleineren Krümmung (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Videomikroskopische Analysen der Statolithen in Chara-Rhizoiden zeigten, dass sich die Statolithen bereits nach 3s vollständig von der Plasmamembran entfernt haben (Limbach et al. 2005). Eine mikroskopische Beobachtung der Statolithenbewegungen und – sedimentationen in lebenden Arabidopsis-Wurzelstatozyten war aufgrund der Vielzelligkeit des Wurzelorgans nicht möglich. Aus den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchungen von Chara-Rhizoiden kann lediglich geschlossen werden, dass sich die Statolithen innerhalb der Statozyten vermutlich ähnlich verhalten, indem sie bei der Inversion nach kürzester Zeit bereits den Kontakt zum Gravirezeptor verlieren. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Inversionsexperimente an Arabidopsis-

Wurzeln untermauert. Die vorliegenden Ergebnisse der Inversionsexperimente demonstrieren, dass die kurzen 22s andauernden Mikrogravitationsphasen, die im Parabelflug 31 mal in 2h auftreten, ausreichend lang sind, um einen sichtbaren Einfluss auf Suszeption und Perzeption bei Arabidopsis-Wurzelstatozyten zu haben. Im Fall eines Kontaktrezeptorsystems sollten die Mikrogravitationsphasen einen deutlichen Einfluss auf die Wurzelkrümmung haben, der sich in einer verringerten Wurzelkrümmung zeigen sollte, da ein Mechanorezeptorsystem durch "schwerelose" Statolithen deaktiviert werden sollte. Durch den Vergleich der Krümmungswinkel von Flugproben und Referenzproben, die keine Mikrogravitation erfahren, können demnach Rückschlüsse auf die Statolithen-Gravirezeptor-Interaktionen gezogen werden, die durch die kurzen Mikrogravitationsphasen möglicherweise beeinflusst werden.

Mittels Hypergravitationsversuche, die auf einer Zentrifuge durchgeführt worden sind, wurde der Einfluss der erhöhten Beschleunigungen, wie sie im Parabelflug auftreten, auf die Graviperzeption untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass ein erhöhtes Gewicht der Statolithen nicht zu einer stärkeren oder schwächeren Gravireaktion in Arabidopsis-Wurzeln führt. Sowohl die Zentrifugation der Wurzeln nach dem Parabelflugprofil (62x2g für je 22s in 2h) als auch die Langzeitversuche mit kontinuierlichen Beschleunigungen von 2g, 3g und 4g für eine Dauer von 2h wiesen keine Veränderungen in der Stärke der Gravireaktion auf. Diese Beobachtungen bestätigen, dass die kurzen Phasen der Hypergravitation des Parabelflugprofils keinen Einfluss auf die Gravireaktion und somit auf die Wurzelkrümmung bei Arabidopsis-Wurzeln haben. Auch beim Chara-Rhizoid konnte in früheren Arbeiten kein Einfluss der Hypergravitationsphasen des Parabelflugprofils nachgewiesen werden (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Somit können die 1,8g Phasen während der Ein- und Ausgangsphase vernachlässigt werden.

Die Ergebnisse der Inversions- und Hypergravitationsversuche lassen nun folgende Schlüsse zu. Die Unterbrechung des Kontakts zwischen Statolith und Gravirezeptor während der durchgeführten Inversionsexperimente führt zu einer verringerten finalen Wurzelkrümmung. Die Erhöhung des Drucks der Statolithen innerhalb der Hyper-g Phasen hat keinen Einfluss auf die Wurzelendkrümmung. Diese Beobachtungen im Rahmen der Bodenexperimente lassen bereits vermuten, dass es sich bei dem

Gravirezeptor in Arabidopsis-Wurzelstatozyten vermutlich nicht um einen Mechanorezeptor handelt, der durch Druck, vermittelt durch das Gewicht der sedimentierten Statolithen, aktiviert wird.

Insbesondere die Inversionsexperimente, bei denen die Aufhebung des Kontakts zwischen Statolithen und Zellmembran durch Wegsedimentieren der Statolithen zu einer Unterbrechung der Graviperzeption führt, lassen vermuten, dass es sich bei dem schwerkraftwahrnehmenden Mechanismus in den Statozyten Höherer Pflanzen möglicherweise auch um einen Kontaktmechanismus, ähnlich dem bei Chara-Rhizoiden nachgewiesenen, handelt. Während der Parabelflüge befinden sich die Statolithen immer in direktem Kontakt zum Gravirezeptor, sind jedoch 31-mal für 22s schwerelos und sind so nicht in der Lage, mechanischen Druck auf den Gravirezeptor auszuüben. Handelt es sich bei dem Gravirezeptor Höherer Pflanzen um einen mechanisch aktivierten Rezeptor, sollte die Krümmungsreaktion deutlich geringer ausfallen als die der Kontrollproben.

#### **4.1.2. Parabelflugexperimente – Effekte kurzer Mikrogravitation auf die Graviperzeption**

Die statistischen Analysen der Parabelflugexperimente beruhen auf einer großen Anzahl ausgemessener Wurzeln und sichern so deren Aussagekraft. Die Flugproben aller Parabelflugexperimente zeigen bis auf zwei Ausnahmen (2 von insgesamt 15 Experimenten) gleichgroße bzw. leicht größere Krümmungswinkel im Vergleich zu den Kontrollproben der 1g-Referenzentrifuge. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass während der Phasen kurzer Mikrogravitation der Gravirezeptor aktiviert bleibt und nicht, wie im Falle eines Mechanosensors, deaktiviert wird. Die "schwerelosen" Statolithen sind in der Lage, den Gravirezeptor in Arabidopsis-Wurzeln zu aktivieren. Mechanischer Druck, vermittelt über das Gewicht der Statolithen, ist für die Aktivierung dennoch nicht notwendig – eine Erkenntnis, die bereits bei Chara-Rhizoiden gewonnen wurde. Die "schwerelosen", aber sedimentierten Statolithen in Chara sind ebenfalls in der Lage, während der Mikrogravitationsphasen eine Gravireaktion auszulösen (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Zur optischen Kontrolle des Kontakts von Statolithen und Gravirezeptor in lebenden Arabidopsis-Statozytenzellen wurden mikroskopische Untersuchungen unternommen, die zur Zeit noch keine klaren Ergebnisse mit den zur Verfügung stehenden Techniken liefern konnten. Mikroskopische Aufnahmen des



transparenten Chara-Rhizoids zeigten keine Verlagerung der Statolithen oder ein Abwandern von der unteren Plasmamembran während der kurzen Mikrogravitationsphasen im Parabelflug (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Es kann daher angenommen werden, dass auch die sedimentierten Statolithen in Höheren Pflanzen den Kontakt zur unteren Zellflanke in den kurzen Mikrogravitationszeiten von 22s nicht verlieren.

Die Ergebnisse, die in den Parabelflugexperimenten gewonnen wurden, ergänzen sich mit denen der im Vorfeld durchgeführten Bodenkontrollexperimente. Experimente mit erhöhter Schwerkraft (2g, 3g und 4g für 2h) zeigten dagegen keine Veränderungen in der Gravireaktion und der Endkrümmung der Wurzeln. In den Parabelflugexperimenten waren die auf die Gravirezeptoren sedimentierten Statolithen auch während der kurzen Mikrogravitationsphasen in der Lage, die Gravirezeptoren zu aktivieren. Die Ergebnisse der Boden- und Flugexperimente sind deutliche Belege dafür, dass es sich beim Gravirezeptor in Arabidopsis-Wurzeln nicht um ein Mechanorezeptorsystem handelt, sondern höchstwahrscheinlich um ein chemisch/elektrisch aktiviertes Perzeptionsystem. Die gewonnenen Einsichten in die Graviperzeptionsmechanismen von Arabidopsis-Wurzeln stehen im Gegensatz zu den in der Vergangenheit häufig postulierten zug-/druckaktivierten Gravirezeptoren in den Statozyten Höherer Pflanzen (Perbal et al. 2004; Sievers et al. 1991; Sack 1997; Baluska und Hasenstein 1997). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen jedoch, dass "schwere lose" Statolithen in der Lage sind, den Gravirezeptor nur durch den Kontakt zu aktivieren und sind deutliche Belege dafür, dass es sich bei dem Gravirezeptor nicht um einen mechanisch aktivierten Rezeptor handelt. Die vorliegenden Ergebnisse sind damit auch widersprüchlich zu der Annahme, dass das Aktinzytoskelett als mechanischer Überträger der durch die Sedimentation der Statolithen auftretenden Kräfte dienen könnte (Yoder et al. 2001; Perbal und Driss-Ecole 2003; Perbal et al. 2004). Betrachtet man zusätzlich die Dynamik des Aktinzytoskeletts in lebenden Zellen, welches durch einen schnellen Auf- und Abbau von Filamenten gekennzeichnet ist, ist es unwahrscheinlich, von einem direkten Aktivierungsmechanismus auszugehen. Dabei wird der Gravirezeptor durch den direkten Kontakt zum Statolithen aktiviert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass elektrische und/oder chemische Wechselwirkungen

die entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Gravirezeptoren in den Wurzelstatozyten Höheren Pflanzen spielen.

#### **4.1.3. Analyse der Funktion von Aktin innerhalb der Statozyten während der Graviperzeption**

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Untersuchung des Graviperzeptionsmechanismus in Höheren Pflanzen besonderes Augenmerk auf die Aufgabe des Aktins innerhalb der Statozyten gelegt. Experimente in der Vergangenheit – unter 1g Bedingungen und in Mikrogravitation – beschrieben Wechselwirkungen der Statolithen mit dem Aktinzytoskelett während der Suzeption (Wendt et al. 1987; Sievers et al. 1991; Volkmann et al. 1991; Driss-Ecole et al. 2000; Yoder et al. 2001; Blancaflor 2002; Perbal und Driss-Ecole 2003). Bereits frühere Experimente zeigten eine Aktin abhängige Positionierung von Statolithen, ER-Cisternen und weiteren Organellen in den Statozyten von Kressewurzeln nach einer Zentrifugation von 100-2000g für 20min (Wendt et al. 1987). Die Zentrifugation von Statozyten hat eine dichteabhängige Umverteilung der Zellorganellen zur Folge, welche nach der Zentrifugation durch das Aktinzytoskelett wieder in die ursprüngliche, polare Anordnung gebracht wird. Wird das Aktinzytoskelett durch eine depolymerisierende Droge (z.B. Cytochalasin D oder Latrunculin B) zerstört, kommt es nach der Zentrifugation nicht mehr zu einer Reorganisation des Zellaufbaus (Sievers et al. 1991). Dies verdeutlicht, dass das Aktinzytoskelett für die Positionierung der Statolithen verantwortlich ist. Versuche in Höhenforschungsraketen haben gezeigt, dass in Mikrogravitation die Statolithen in den Wurzelstatozyten von Kresse durch das Aktinzytoskelett entgegen der ursprünglich wirkenden Erdschwerkraft angehoben werden. Diese Experimente bestätigen eine direkte Interaktion zwischen den Statolithen und dem Aktinzytoskelett (Volkmann et al. 1991). Versuche unter 1g-Bedingungen haben zudem verdeutlicht, dass die Position der Statolithen durch zwei Kräfte in einem Gleichgewicht gehalten wird. Es wirkt dabei die Schwerkraft gegen die entgegengesetzt gerichtete Kraft des Aktinzytoskeletts, welche die Statolithen aktiv anhebt und positioniert.

Durch die Behandlung von Kressewurzeln mit Cytochalasin D konnte eine dreifach schnellere Sinkgeschwindigkeit der Statolithen während Inversionsversuchen im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Statozyten beobachtet werden (Sievers et al. 1989). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Aktinzytoskelett bei der Sedimentation mit den

Statolithen in Wechselwirkung steht. Linsenwurzeln weisen nach der Kultivierung in Mikrogravitation im Vergleich zu den Bodenkontrollen eine größere Verteilung kleinerer Statolithen auf und zeigen eine höhere Empfindlichkeit in der Gravireaktion der Wurzeln (Driss-Ecole et al. 2000; Blancaflor 2002). Diese Beobachtungen wurden durch das vermehrte Auftreten von Wechselwirkungen zwischen der erhöhten Statolithenanzahl und dem Aktinzytoskelett während der Sedimentation erklärt. Diese Befunde (Sievers et al. 1989, 1991; Volkmann et al. 1991; Driss-Ecole et al. 2000; Blancaflor 2002) zeigen zwar deutlich, dass das Aktinzytoskelett bei der Suszeption eine Rolle in Höheren Pflanzen spielt, jedoch blieb bis dato ungeklärt, inwieweit das Aktinzytoskelett für die eigentliche Schwerkraftwahrnehmung, die Perzeption, notwendig ist.

Um die Rolle des Aktins aufzuklären, wurden in verschiedenen Forschungsgruppen Experimente mit Latrunculin B durchgeführt (Blancaflor 2002; Yamamoto und Kiss 2002; Yamamoto et al. 2002; Hou et al. 2003, 2004). Die Ergebnisse dieser Gruppen sind jedoch widersprüchlich, da die Zerstörung des Aktinzytoskeletts unterschiedliche Effekte auf die gravitrope Krümmung von Wurzeln hatte. In einigen Experimenten konnte eine Verstärkung der Gravireaktion festgestellt werden (Blancaflor 2002; Hou et al. 2003, 2004), in anderen blieb die gravitrope Krümmung scheinbar unbeeinflusst (Yamamoto und Kiss 2002; Yamamoto et al. 2002). Würde das Aktinzytoskelett eine essentielle Aufgabe bei der Graviperzeption übernehmen, sollte bei einem zerstörten Aktinzytoskelett keine Gravireaktion mehr zu beobachten sein. Zudem können durch ein zerstörtes Aktinfilamentsystem keine Druck- und/oder Zugkräfte mehr an mechanosensitive Gravirezeptoren zur Auslösung eines physiologischen Signals übertragen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Arabidopsiswurzeln mit verschiedenen Konzentrationen Latrunculin B behandelt und für 2h horizontal stimuliert. Verglichen wurden diese Proben mit unbehandelten Wurzeln, die ebenfalls für 2h horizontal stimuliert wurden. Die mit verschiedenen Konzentrationen (100nM – 5µM) behandelten Wurzeln zeigten keine kleineren Endkrümmungswinkel verglichen mit den Kontrollproben.

Die dargestellten Wachstumsanalysen haben bei behandelten Wurzeln (5 $\mu$ M) demonstriert, dass zwar das Wachstum gebremst wird, es aber nicht zum Stillstand kommt. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass das Aktinzytoskelett beim Einsatz von Latrunculin B mit zunehmender Konzentration stärker geschädigt wird. Dabei wirkt eine Konzentration von 5 $\mu$ M Latrunculin B derart auf das Aktinzytoskelett, dass nur noch fleckenartige Aktinaggregationen beobachtet wurden. Trotz dieser vollständigen Zerstörung des Aktinzytoskeletts in den Wurzelstatozyten konnte keine Verringerung der gravitropen Krümmung beobachtet werden. Die behandelten Wurzeln zeigten sogar eine leicht erhöhte Krümmungsreaktion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben. Diese Erkenntnisse zeugen dafür, dass das Aktinzytoskelett zwar während der Gravisuszeption und -perzeption in Höheren Pflanzen beteiligt ist, es aber keine essentielle Funktion bei den frühen Prozessen der Schwerkraftwahrnehmung innehat.

Mais-Wurzeln, welche nach der Behandlung mit Latrunculin B 10min gravistimuliert und danach für 15h auf einem Klinostaten klinorotiert worden waren (Erzeugung funktioneller Mikrogravitation), zeigten eine Fortsetzung der Gravireaktion. Dabei erreichten alle behandelten Wurzeln einen Krümmungswinkel von  $\geq 90^\circ$  (Hou et al. 2003). Es wird vermutet, dass eine Umverteilung der PIN Proteine durch das zerstörte Aktinzytoskelett nicht mehr stattfinden kann und somit die Gravireaktion beibehalten wird. Auch in diesem Experiment wurde die Graviperzeption durch die Behandlung mit Latrunculin B nicht gehemmt.

Es erscheint möglich, dass Aktinfilamente in den Statozyten Höherer Pflanzen eine regulatorische Aufgabe haben, indem sie die Intensität und/oder die Dauer des durch die sedimentierten Statolithen ausgelösten Signals regulieren (Hou et al. 2003, 2004). Die leicht verstärkten Krümmungsreaktionen der mit Latrunculin B behandelten und gravistimulierten Wurzeln, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, deuten ebenso wie frühere Arbeiten (Hou et al. 2003, 2004) auf eine Feinregulation der gravitropen Reaktion durch das Aktinzytoskelett hin. Die Beweglichkeit von Statolithen wird möglicherweise durch assoziierte Motorproteine (Myosine) und das Aktinfilamentnetzwerk moduliert. Sedimentierte Statolithen liegen nicht statisch auf den mit Gravirezeptoren besetzten Membranen, sondern führen fortwährend kleine Bewegungen aus und aktivieren dadurch ständig die Rezeptoren, d.h. sie verursachen

ein getriggertes Signal. Somit ist ein Statolith in der Lage mehrfach einen oder mehrere Gravirezeptoren während der Gravistimulation zu aktivieren. Die Dynamik der Rezeptoraktivierung während der Perzeption ist demnach abhängig von der Feinregulation durch das umgebende Aktin.

In den Statozyten einer mit Latrunculin B behandelten Wurzel findet keine Regulation der Graviperzeption durch das Aktinzytoskelett statt. Wird das Aktinzytoskelett zerstört, kommt es nicht mehr zu einer dynamischen Regulation der Statolithenposition. Die Statolithen liegen unbeweglich auf denselben Gravirezeptoren und aktivieren diese kontinuierlich. Die Fähigkeit, sowohl die Intensität als auch die Dauer der Gravireaktion zu regulieren, ist durch die Zerstörung des Aktins und die damit verbundene Reduzierung der Statolithenbeweglichkeit beeinträchtigt (Hou et al. 2003, 2004).

Die Ergebnisse, die während der durchgeführten Parabelflugkampagnen gewonnen wurden, unterstützen die Hypothese, dass es sich beim Perzeptionsmechanismus in Höheren Pflanzen um einen sehr dynamischen und fein regulierten Mechanismus handelt. Die unerwartet größeren Krümmungswinkel der Latrunculin B behandelten Flugproben (im Durchschnitt ca. 8%) im Vergleich zu den Latrunculin B behandelten 1g-Referenzproben könnten in dem Einfluss der wechselnden Beschleunigungen auf den äußerst sensiblen Perzeptionsmechanismus der Wurzeln begründet liegen. Die unterschiedlichen Beschleunigungen des Parabelflugs – insbesondere die wechselnden Übergänge zwischen den 2g-Phasen und den Mikrogravitationsphasen – könnten die Beweglichkeit der Statolithen bei den Flugproben erhöht und somit die Gravireaktion verstärkt haben.

Die Ergebnisse der Bodenkontroll- und der Parabelflugexperimente der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Aktinfilamente in den Wurzelstatozyten Höherer Pflanzen hoch dynamische und sehr sensible Statolithen–Rezeptor-Interaktionen ermöglichen, was außerdem ermöglicht unvorteilhafte Antworten auf transiente Reize zu vermeiden.

## **4.2. Membranpotentialmessungen im Chara-Rhizoid**

Parabelflugexperimente haben deutliche Hinweise darauf geliefert, dass es sich bei dem Gravirezeptor in Chara-Rhizoiden und auch wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, auch in Höheren Pflanzen, um einen Rezeptor handelt, der durch direkten Kontakt zu den

Statolithen aktiviert wird – vermutlich durch molekulare oder elektrochemische Wechselwirkungen (Hauslage 2005; Limbach et al. 2005). Um zusätzlich weitere Erkenntnisse über den Aktivierungsmechanismus zu erlangen, wurden fluorimetrische Messungen mittels DiBAC<sub>4</sub>(3), einem membranpotentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoff, im Chara-Rhizoid durchgeführt. Ziel der Versuche war es, die lokalen Membranpotentialverhältnisse im Apex der Chara-Rhizoide während des Wachstums, der Graviperzeption und der gravitropen Krümmung zu erfassen und dabei die spezifischen Veränderungen der Membranspannungen im Verlauf der gravitropen Reaktion zu untersuchen. Mittels DiBAC<sub>4</sub>(3) werden Potentialänderungen über Plasma- und Vesikelmembranen durch eine lineare Veränderung der Fluoreszenzintensität angezeigt (Epps et al. 1993). Je geringer das Potential über einer Membran ist, desto stärker ist die vom Farbstoff ausgehende Fluoreszenz. Dabei lagert sich der Farbstoff vorwiegend in lipophile Bereiche der Zelle ein. Die Veränderung der Fluoreszenz wird durch eine spannungsabhängige Umverteilung des Farbstoffs in verschiedene Zellkompartimente hervorgerufen (Epps et al. 1993).

Der Farbstoff wurde bereits an verschiedenen Zelltypen zur Messung des Membranpotentials eingesetzt, als Beispiele sind hier Endothelialzellen, Fibroblasten und Krebszellen aus Mäusen (C127) zu nennen (Dall'Asta et al. 1997). Es handelt sich somit um eine validierte Methode zur Messung von Membranpotentialen und intrazellulären Spannungsverhältnissen (Epps et al. 1993; Dall'Asta et al. 1997; Zochowski et al. 2000). Die Methode der fluorimetrischen Potentialmessung mittels DiBAC<sub>4</sub>(3) hat im Gegensatz zur Methode mit Mikroelektroden und Messverstärkern den Vorteil, dass man während der Spannungsmessung die Ausdehnung von Potentialen in der Zelle sichtbar machen kann.

Im Vorfeld der hier beschriebenen Experimente wurden funktionelle Versuche mit verschiedenen membranpotentialsensitiven Farbstoffen aus der Oxonol-Familie gemacht, welche zeigten, dass DiBAC<sub>4</sub>(3) durch seine verhältnismäßig geringe Phototoxizität und seine stabile Fluoreszenz für die oben beschriebene Fragestellung am besten geeignet ist. Wie einleitend erwähnt, ist das Chara-Rhizoid ein gut untersuchter Modellorganismus in Bezug auf den Gravitropismus und das Spitzenwachstum (Braun und Limbach 2006). Über die elektrischen Verhältnisse während des Wachstums, Schwerkraftwahrnehmung und der gravitropen Reaktion ist jedoch bisher wenig bekannt.

#### 4.2.1. Depolarisierte Vesikel im Chara-Rhizoid treten nur in Verbindung mit intaktem Spitzenwachstum auf

Der Spitzenkörper ist essentiell für das Spitzenwachstum im Chara-Rhizoid (Braun et al. 2004). Dieses organisierende Zentrum besteht aus einem ER-Aggregat sowie einer großen Anzahl sekretorischer Vesikel (Bartnik und Sievers 1988; Braun und Limbach 2006). Zudem befindet sich im Zentrum des Spitzenkörpers eine große Anzahl feiner Aktinfilamente (Braun und Wasteneys 1998). Der Spitzenkörper lokalisiert sich dabei im Zentrum des Spitzenwachstums, welches auch den Ort des bevorzugten Vesikeleinbaus beschreibt (Hejnowicz et al. 1977; Sievers et al. 1979; Braun 1996b; Braun und Limbach 2006). In allen Zellen wird Zellwandmaterial von sekretorischen Vesikeln bereitgestellt, die über das Aktomyosinsystem zum Apex transportiert werden, dort mit der Plasmamembran fusionieren und die Zellwand strukturell erweitern (Braun 1996a, Geitmann und Emons 2000; Hepler et al. 2001; Limbach et al. 2008).

Im Zentrum des Spitzenkörpers in Chara-Rhizoiden wurden aktinbindende Proteine immunologisch nachgewiesen, welche regulatorische Aufgaben bei der Organisation des Spitzenkörpers und des daraus entspringenden Aktinzytoskeletts übernehmen (Braun 2001; Braun et al. 2004). Es wurde beobachtet, dass die Vesikel, nachdem sie vom Spitzenkörper zur Plasmamembran transportiert wurden, sich wieder in Richtung Spitzenkörper zurück bewegten (*shuttle like movement*) (Bartnik et al. 1990). Es wird vermutet, dass das Aktinsystem für einen kontrollierten Einbau von sekretorischen, Zellwandmaterial transportierenden Vesikeln sorgt. Ähnliche Beobachtungen wurden in Wurzelhaaren und Pollenschläuchen gemacht (Campanoni und Blatt 2006).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Chara-Rhizoids nach Cryofixierung haben gezeigt, dass in der Apikalzone zwei Arten von sekretorischen Vesikeln sowie Mikrovesikel auftreten, die sehr wahrscheinlich für die Bereitstellung von Zellwandmaterial verantwortlich sind (Limbach et al. 2008). Im Apex von Rhizoiden wurde ein steiler Gradient von freiem zytoplasmatischem Calcium nachgewiesen, der für die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der apikalen Plasmamembran und den Einbau von Zellwandmaterial verantwortlich ist (Braun und Richter 1999; Braun et al. 2004). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich der Calciumgradient während der gravitropen Krümmung nicht verlagert wie es beim Chara-Protonema der Fall ist, sondern dass der Calciumgradient mit seinem Maximum in der äußersten sich nach unten neigenden Zellspitze, während der gravitropen

Krümmung, erhalten bleibt. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass ein Wachstumsstopp mit dem Verschwinden des Calciumgradienten einhergeht (Braun und Richter 1999). In Pollenschläuchen und Wurzelhaaren wurde ebenfalls ein Calciumgradient nachgewiesen, der wie im Chara-Rhizoid notwendige Voraussetzung für das Spitzenwachstum der Zellen ist (Malhó et al. 1995; Pierson et al. 1996; Hepler et al. 2001). In Pollenschläuchen führt die Bindung des zellinternen freien Calciums durch einen Calciumchelator (BAPTA) zu einem direkten Wachstumsstopp (Pierson et al. 1994). Diese Befunde verdeutlichen, dass der Calciumgradient in spitzenwachsenden Zellen wie Pollenschläuchen entscheidend für das Wachstum und die Exozytose sekretorischer Vesikel ist (Felle und Hepler 1997; Taylor und Hepler 1997; Wymer et al. 1997). Fest steht, dass Calcium für die Prozesse der Exozytose und Vesikelfusion als Regulator benötigt wird (Steer 1989; Roy et al. 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im wachsenden Rhizoid ein Gradient von DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz im Apex beobachtet, der eine Ausdehnung von ca. 10-15µm hat und dessen Fluoreszenzintensitätsmaximum sich ca. 5-10µm hinter der Zellspitze befindet. Der Gradient erschien entweder halbmondförmig oder in Form eines Gradienten mit hellem Zentrum (Fluoreszenzkomplex). Das Maximum des Fluoreszenzkomplexes ist deckungsgleich mit der Position des Spitzenkörpers und dem ER-Aggregat, welches für Chara-Rhizoide charakteristisch ist (Braun und Limbach 2006, Limbach et al. 2008). Wachstumsuntersuchungen haben gezeigt, dass der Gradient während des Wachstums immer im Apex erhalten bleibt und keine Verlagerung stattfindet. Während des Wachstums konnten arhythmische Erhöhungen der Fluoreszenz im gesamten Rhizoid beobachtet werden, welche wahrscheinlich auf Unregelmäßigkeiten beim Wachstumsprozess zurückzuführen sind. Es wurden keine Regelmäßigkeiten im Anstieg und Abfall der Fluoreszenz beobachtet, wie sie zum Beispiel beim pulsatorischen Wachstum von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren auftreten (Messerli und Robinson 1997; Hepler et al. 2001; Holdaway-Clarke et al. 2003). Ca. 1h nach der Behandlung mit DiBAC<sub>4</sub>(3) kam es zu einem Wachstumstopp – vermutlich als Folge der Phototoxizität des Farbstoffs unter den Bedingungen der schnell wiederholten Zeitrafferaufnahmen und der einhergehenden Laser-Bestrahlung.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem beobachteten DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradienten und dem Rhizoidwachstum zu überprüfen, wurden Rhizoide mit 100nM Latrunculin B behandelt, welches das Zytoskelett reversibel depolymerisiert und



das Wachstum stoppt. Mit dem Wachstumsstopp des Rhizoids verschwand auch der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradient. Nur noch eine schwache Fluoreszenz in der Plasmamembran war zu erkennen – zurückzuführen auf die lipophilen Eigenschaft des Farbstoffs, die zu einer unspezifischen Einlagerung in die Plasmamembran führt.

Kontrollversuche zeigten, dass es in Rhizoiden nach einer Behandlung mit Gramicidin, einem Antibiotikum, welches die Zellwand permeabilisiert, zu einer drastischen Erhöhung der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz kommt, da die Behandlung in einem Ausgleich der Ionenverhältnisse resultiert und die Zelle hierdurch vollständig depolarisiert wird.

Auffällig ist, dass die beobachtete Fluoreszenz granulär und nicht homogen verteilt ist, wie es zum Beispiel beim Calciumgradienten in Rhizoiden beobachtet wurde (Braun und Richter 1999). Die genauere Analyse ergab, dass die Fluoreszenz von Zellpartikeln ausgeht, die durch ihre Größe, Verteilung und Bewegung als Vesikel identifiziert wurden. Zur genauen Untersuchung fluoreszierender Partikel wurde eine Einzelbildverfolgung mit manuellem *Tracking* vorgenommen. Die beobachtete Bewegung der Partikel stimmt mit der im Chara-Rhizoid charakterisierten Vesikeln überein, die bereits von Bartnik et al. (1990) beschrieben wurden. Die Beobachtungen der aktuellen Arbeit sowie vorangegangener Experimente deuten darauf hin, dass es sich hier um fluoreszierende Vesikel handelt, die gegenüber dem Zytoplasma depolarisiert sind.

Die Form und Ausdehnung des Fluoreszenzgradienten ist nahezu deckungsgleich mit dem Calciumgradient (Braun und Richter 1999). Auch die Position des DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradienten während der gravitropen Krümmung gleicht der des Calciumgradienten, der von Braun und Richter (1999) in Chara-Rhizoiden beobachtet wurde.

Die Untersuchungen des DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzgradienten während der gravitropen Krümmung ergaben, dass sich das Zentrum des Fluoreszenzgradienten immer im Apex des Rhizoids befindet und sich nicht lateral verschiebt, so wie sich auch die Ausrichtung des Calciumgradienten und die Lage des Spitzenkörpers in sich gravitrop krümmenden Rhizoiden nicht verändert (Braun und Richter 1999; Braun 2001).

Die sedimentierten Statolithen haben offensichtlich einen Einfluss auf die Fluoreszenz der Vesikel während der gravitropen Krümmung. In der unmittelbaren Umgebung der Statolithen zeigen die Vesikel eine schwächere Fluoreszenzintensität; bzw. die Fluoreszenz der Vesikel ist vollständig verschwunden. Zwischen Statolithen, die in

Richtung Apex transportiert werden, wurde oft ein schwächer fluoreszierender Bereich von ca. 10µm zwischen Statolithen und Fluoreszenzkomplex beobachtet. Die Bewegung des Fluoreszenzkomplex und der Statolithen zeigen einen Zusammenhang. Bewegen sich die Statolithen in Richtung Apex, weicht der Fluoreszenzkomplex in Richtung Apex aus. Werden die Statolithen wieder basalwärts transportiert folgt auch der Fluoreszenzkomplex basalwärts. Dabei ist immer wie oben beschrieben eine Zone schwächerer Fluoreszenz zwischen Statolithen und Fluoreszenzkomplex zu beobachten. Vorangegangene Experimente von Braun und Richter (1999) deuteten bereits darauf hin, dass im Rhizoid die Sedimentation der Statolithen zu einer lokalen Hemmung des Calciumeinstroms auf der physikalischen Unterseite führt (Braun und Limbach 2006). Diese Verarmung an freiem Calcium, wahrscheinlich hervorgerufen durch die Deaktivierung von Calciumkanälen, führt zu einer lokal verminderten Exozytoserate sekretorischer Vesikel und somit zur Krümmung des Rhizoids durch ein differenzielles Flankenwachstum (Sievers et al. 1979; Braun 2001; Braun und Limbach 2006).

Die Beobachtungen dieser Arbeit und die Ergebnisse vorangegangener Experimente lassen die Vermutung zu, dass der Calciumgradient in Chara-Rhizoiden einen Einfluss auf das Membranpotential sekretorischer Vesikel hat. Zudem treten depolarisierte Vesikel nur während des Wachstums des Rhizoids auf, was darauf hindeutet, dass die Depolarisation der sekretorischen Vesikel möglicherweise Voraussetzung für die Fusion mit der Plasmamembran ist.

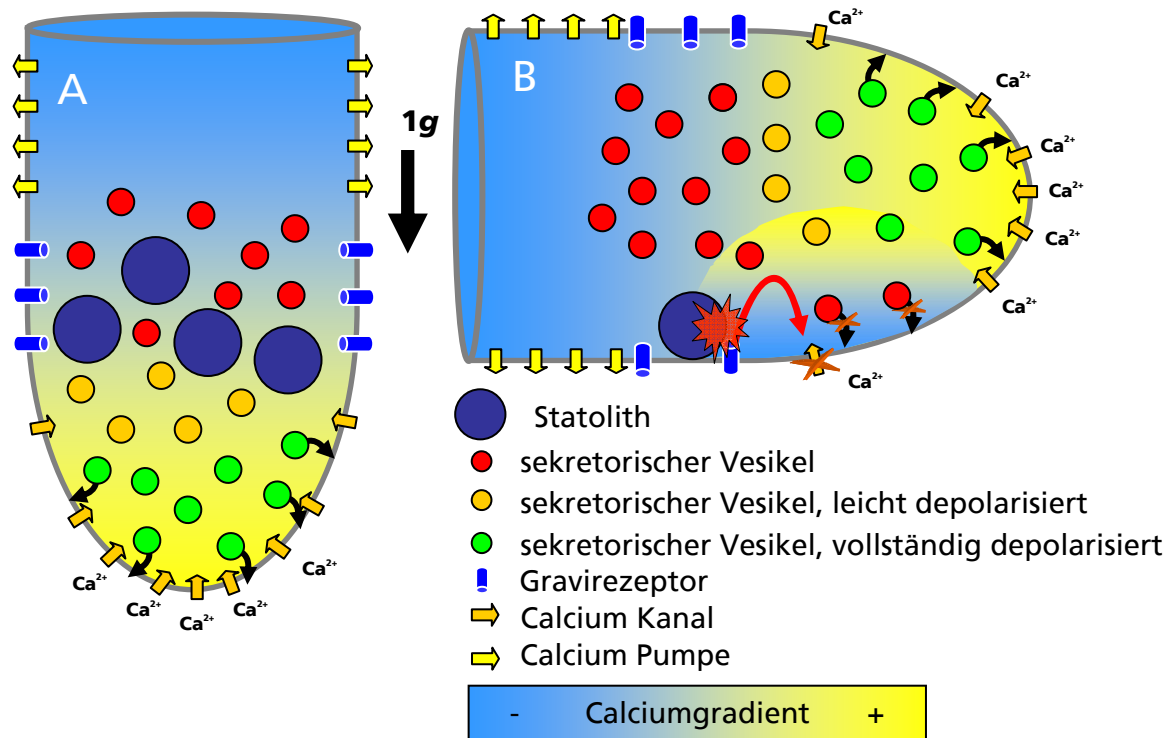
#### **4.2.2. DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenz in Pollenschläuchen**

Zur Erweiterung der am Rhizoid gewonnenen Erkenntnisse wurde ein weiteres spitzenwachsendes System in die Untersuchungen mit einbezogen. Es wurden Amaryllis-Pollenschläuche mit DiBAC<sub>4</sub>(3) in vivo angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es ist nachgewiesen, dass im Apex von Pollenschläuchen wie im Chara-Rhizoid, ein Calciumgradient durch den Einstrom von Calciumionen entsteht, der entscheidend ist für die Exozytose sekretorischer Vesikel (Jaffe et al. 1977; Steer 1989; Messerli und Robinson 1997; Roy et al. 1999; Hepler et al. 2001). Anders als im Rhizoid kann in diesem System ein oszillatorisches Wachstum und ebenso ein oszillierender Calciumgradient beobachtet werden, die jedoch zeitlich um einige Sekunden versetzt sind (Pierson et al. 1996; Wymer et al. 1997; Holdaway-Clarke et al. 1997; Messerli et

al. 1999; Hepler et al. 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Pollenschläuchen ein DiBAC<sub>4</sub>(3)-Gradient beobachtet. Der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Gradient in Pollenschläuchen zieht sich durch den gesamten Pollenschlauch, wobei sich das Maximum des Fluoreszenzgradienten etwa 2-5µm hinter dem Apex befindet. Während der Wachstumsbeobachtungen war zu erkennen, dass es sich bei den Zellpartikel, die zur Zellspitze hin transportiert werden, höchstwahrscheinlich um sekretorische Vesikel handelt, die umso stärker fluoreszieren je geringer ihr Abstand zum Apex wird. Eine oszillatorische Veränderung des Gradienten konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden. Somit konnte auch in Amaryllis-Pollenschläuchen eine Population von depolarisierten Vesikeln nachgewiesen werden.

### 4.2.3. Depolarisierte Vesikel im Chara-Rhizoid – Ein Modell

Im folgenden Modell werden der Einfluss des Calciumgradienten bzw. die Auswirkungen der lokalen Calciumverarmung während der gravitropen Krümmungsreaktion auf den Status der Vesikelpotentiale im ungereizten bzw. im gravitrimulierten Chara-Rhizoid dargestellt.



**Abb. 44:** Modell zur Erläuterung der beobachteten Potentialvorgänge in sekretorischen Vesikeln im Apex eines Chara-Rhizoids. Im linken Teil A ist ein unstimuliertes Rhizoid dargestellt. Die Lage der Calciumkanäle im Apex des Rhizoids ermöglicht den Aufbau eines Calciumgradienten, der für die Fusion der sekretorischen Vesikel in der Zellspitze benötigt wird (Braun und Limbach 2006). Die Depolarisation der Vesikel nimmt in Richtung Apex hin zu. Nach horizontaler Umlagerung des Rhizoids sedimentieren Statolithen auf die physikalische Unterseite und aktivieren dort Gravirezeptoren (Teil B). Durch die Aktivierung der Gravirezeptoren kommt es zu einer lokalen Hemmung der benachbarten Calciumkanäle und somit zu einer lokalen Verarmung von cytoplasmatischem freiem Calciums. Dies hat zur Folge, dass sekretorische Vesikel in diesem Bereich ihren elektrischen Status nicht ändern und polarisiert bleiben. Der Einbau von neuem Zellwandmaterial wird auf der unteren Zellflanke lokal gehemmt, während die Vesikel, die sich im Bereich der oberen Flankenseite des Rhizoids befinden, depolarisieren und mit der Plasmamembran fusionieren. Die Folge ist ein asymmetrisches Flankenwachstum, welches die Krümmung der Zelle nach unten verursacht.

### 4.3. Carbocryonix - Gefrierfixierung während Parabelflügen

Ein weiterer Teil meiner Arbeit hatte zum Ziel, eine Schockgefrieranlage zu konstruieren und zu testen, welche im Parabelflug zur schnellen Fixierung von biologischen Proben eingesetzt werden kann. Der Parabelflug ist eine geeignete Experimentplattform, um biologische Prozesse unter Mikrogravitationsbedingungen zu untersuchen. Immer wichtiger werden die Analysen der schnellen Reaktionen, die auf das Fehlen der Schwerkraft bzw. auf die erhöhte Schwerkraft während des Flugs reagieren. Die Analyse der schwerkraftabhängigen Genexpression bzw. der Proteinmodifikationen einzelner Moleküle ist eine vielversprechende Methode, um den Einfluss verschiedener Beschleunigungen sowie Mikrogravitation auf zelluläre Prozesse zu untersuchen und entscheidende Komponenten der schwerkraftabhängigen Signalwege in tierischen und pflanzlichen Zellen zu identifizieren. Voraussetzung für diese molekularbiologischen Analysen ist die schnelle und zuverlässige Fixierung des biologischen Materials.

Bis dato wurden biologische Proben im Parabelflug meist chemisch mittels RNALater® fixiert oder es kam festes Trockeneis in Blockform (0,5-1kg Blöcke) zum Einsatz, welches dann die Proben innerhalb einer isolierten Kammer langsam einfroren. Die Verwendung von flüssigem Stickstoff ist im Airbus A300-ZERO G nicht zugelassen. Flüssiger Stickstoff darf aufgrund der bestehenden Explosionsgefahr nicht in einem geschlossenen Behälter transportiert werden. Außerdem ist die Handhabung unter Mikrogravitation aufgrund des flüssigen Aggregatzustands des Stickstoffs kaum oder nur mit einem unverhältnismäßig hohen technischen Aufwand möglich.

Die chemische Fixierung ist in der Handhabung einfach, da es sich meist um kleine Volumina handelt, die leicht in geschlossenen Flüssigkeitssystemen eingesetzt werden können. Somit kann die chemische Fixierung genutzt werden, um Expressionsmuster auf Grundlage der gesamten RNA zu untersuchen. Ein großer Nachteil der chemischen Fixierung ist jedoch die Zerstörung von Molekülmodifikationen, wie z.B. Phosphatresten an funktionellen Gruppen von Proteinen, die eine Signalfunktion besitzen. Es sind jedoch besonders diese Molekülverbindungen, die bei schnellen Signalübertragungen und regulatorischen Mechanismen in der Zelle von entscheidender Bedeutung sind.

Trockeneis in Blockform hat den Vorteil, dass es sich um einen festen, kalten Körper handelt, der im Gegensatz zu Wassereis eine wesentlich tiefere Temperatur besitzt (-79,5°C) und beim Abkühlen keine Rückstände wie Wasser hinterlässt. Als fester Körper

ist er zudem auch in Mikrogravitation gut zu handhaben. Die Nachteile von Trockeneisblöcken liegen jedoch in der verhältnismäßig langsamen Einfriergeschwindigkeit, denn eine zu fixierende Probe muss in direkten Kontakt mit dem Trockeneis gebracht werden. Bei dem Kontakt zwischen Trockeneisblock und Probe kommt es durch die Sublimation des Trockeneises zur Bildung eines Gasspalts, der isolierend wirkt. Zudem geht von der Sublimierung des Trockeneises die Gefahr aus, durch einen zu hohen Anteil an gasförmigem Kohlendioxid Wissenschaftler zu gefährden, da Kohlendioxid in der Atemluft bereits ab 5% [v/v] erstickend wirkt.

Die Carbocryonix Anlage bietet eine Alternative physikalische Fixierungsmethode im Parabelflug. Es handelt sich bei der Anlage um ein geschlossenes System, welches kein Kohlendioxid in die Flugzeugkabine entlässt. Durch die direkte Entspannung von flüssigem Kohlendioxid, entsteht in den Probenkammern ein Trockeneisschnee, der durch seine kleine Korngröße sehr gute Kühleigenschaften besitzt. Die Trockeneiskristalle lagern sich besser an die eingebrachten Proben und schockgefrieren diese innerhalb von Sekunden. Der Einsatz von Gasflaschen mit flüssigem Kohlendioxid hebt das Problem der Kühlung und der Lagerung von bereits hergestelltem Trockeneis auf, da das Trockeneis erst kurz vor der Verwendung in der Carbocryonix Anlage produziert wird. Im Gegensatz zur chemischen Methode bleiben bei der Fixierung durch Schockgefrierung sämtliche Proteinmodifikationen der Zellen erhalten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontrollexperimente bestätigen außerdem, dass die Fixierung durch die Carbocryonix-Anlage mit den herkömmlichen Labormethoden der Stickstoff- bzw. chemischen Fixierung vergleichbar sind, was die Qualität der anschließend extrahierten RNA aus den Proben anbelangt. Die Einfriertests zeigen, dass innerhalb von 35s eine Temperatur von weniger als  $-40^{\circ}\text{C}$  direkt an der Probe erreicht wird. Die Langzeittemperaturmessung belegt, dass die Anlage Temperaturen unter  $-40^{\circ}\text{C}$  auch über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde in den Gefrierkammern gehalten wird. Somit bleiben die Proben in der Zeit zwischen der Fixierung nach der letzten Parabel und der Landung des Airbus A300-ZERO G (in der Regel ca. 0,5h) sicher fixiert. Die Kontrollexperimente zur Messung des Langzeittemperaturverlaufs innerhalb der Gefrierkammern zeigten deutlich, dass eine Lagerung der Proben in  $-40^{\circ}\text{C}$  auch bis zu einer Stunde nach dem Experiment möglich ist. Bei der Konstruktion der Anlage wurde vor allem auf die Sicherheit des Drucksystems Wert gelegt. Ein wichtiges Merkmal des Drucksystems sind doppelte und somit redundante

Sicherheitsventilsysteme – zwei serielle Ventile in der zuführenden Leitungen, in denen flüssiges Kohlendioxid in die Probenkammern geleitet wird, sowie zwei parallele Überdruckventile, die das gasförmige Kohlendioxid während der Herstellung von Trockeneis und dem Kühlprozess aus dem Flugzeug über einen Druckschlauch ableiten. Somit ist sichergestellt, dass im Falle einer Fehlfunktion eines zu- oder abführenden Ventils ein zweites Ventil für die ordnungsgemäße Funktion des gesamten Systems sorgt. Alle sicherheitstechnisch relevanten Merkmale der Anlage, die Konstruktion der Druckkörper sowie des Drucksystems wurden von der unabhängigen Prüfungsgesellschaft DEKRA getestet und mit einem internationalen Prüfzeugnis für Druckgeräte nach der Druckgeräteverordnung AD-2000 belegt.

Bei der Entwicklung der Gefrierkammern wurde darauf geachtet, dass ein Probenhaltersystem entwickelt wird, welches den Einsatz von verschiedenen Probengefäßen wie zum Beispiel 60mm und 100mm Petrischalen zulässt. Somit können verschiedene Kultivierungssysteme für biologische Proben eingesetzt werden.

Die Carbocryonix-Anlage wurde bereits erfolgreich während der 10. und 12. DLR Parabelflugkampagne eingesetzt. Während der 12. DLR Parabelflugkampagne nutzte Prof. Klaus Palme aus Freiburg in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gravitationsbiologie Bonn die Anlage zur Untersuchung der molekularbiologischen Vorgänge in Arabidopsis Pflanzen während der verschiedenen Beschleunigungsphasen. Mit der Carbocryonix-Anlage existiert erstmals eine effektive Methode biologische Proben im Parabelflug zur Aufklärung proteinchemischer Fragestellungen zu fixieren.

## 5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der sehr frühen Prozesse der Schwerkraftwahrnehmung in den Wurzelstatozyten Höherer Pflanzen. Es existierten bis dato zahlreiche Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen den sedimentierenden Statolithen und den Aktinfilamenten der Statozyten während der Gravisuszeption. Im Rahmen der hier vorgestellten Bodenkontroll- und Parabelflugexperimente ist es nun erstmalig gelungen, die Rolle des Aktinzytoskeletts während der Graviperzeption in Wurzeln näher zu charakterisieren. Ein intaktes Aktinnetzwerk in den schwerkraftwahrnehmenden Wurzelzellen ist keine notwendige Voraussetzung für die ersten Prozesse der Schwerkraftwahrnehmung. Die vollständige Zerstörung von Aktin mittels Latrunculin B resultiert nicht in einer verringerten Krümmungsreaktion der behandelten Wurzeln, sondern im Gegenteil in einem erhöhten Krümmungswinkel verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Die Parabelflugexperimente lieferten entscheidende Hinweise dafür, dass das Aktinzytoskelett in den Wurzelstatozyten wichtige Aufgaben bei der Regulation der hochdynamischen Mechanismen der Graviperzeption übernimmt. Die Beweglichkeit der Statolithen und damit die Sensibilität des Wahrnehmungsapparates wird durch das Aktomyosinsystem kontrolliert, wodurch die Intensität und/oder die Dauer des an einem Gravirezeptor ausgelösten Signals reguliert wird. Das Prinzip dieses Schwerkraftwahrnehmungssystem ist dadurch hoch dynamisch und sehr sensitiv. Gleichzeitig wird eine von der Pflanze unerwünschte Reaktion auf transiente Reize vermieden. Für die Auslösung eines schwerkraftinduzierten Signals in den Statozyten Höherer Pflanzen ist der Kontakt zwischen den sedimentierten Statolithen und den Schwerkraftrezeptoren ausreichend. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass die Aufhebung des Kontakts zwischen Statolithen und Zellmembran durch Wegsedimentieren der Statolithen zu einer Unterbrechung der Graviperzeption führt. In Hyper-g-Experimenten, in denen ein erhöhter Druck auf die Schwerkraftrezeptoren durch ein erhöhtes Gewicht der sedimentierten Statolithen wirkt, bleibt die gravitrope Krümmung unbeeinflusst. Es ist demnach sehr wahrscheinlich dass direkte elektrische oder chemoelektrische Wechselwirkungen zwischen Statolithenoberfläche und Schwerkraftrezeptor für die Auslösung einer schwerkraftspezifischen Signalkaskade ausschlaggebend sind. Dementsprechend sind "schwerelose" Statolithen, die auf den



Rezeptoren aufliegen, in der Lage, die gravitrope Wurzelkrümmung auszulösen – wie in Parabelflugexperimenten deutlich gezeigt wurde.

Darüber hinaus haben Untersuchungen am Modellsystem der Niederen Pflanzen, dem Chara-Rhizoid, ebenfalls zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Prozesse der schwerkraftabhängigen Krümmungsreaktion geführt. Untersuchungen der Membranpotentialverhältnisse in Chara-Rhizoiden geben erstmals Hinweise darauf, dass der Calciumgradient in spitzenwachsenden Zellen einen Einfluss auf den Depolarisationsgrad von sekretorischen Vesikeln hat, die durch ihre Fusion mit der apikalen Membran das Spitzenwachstum der Zelle ermöglichen. Auch wenn die genaue Funktion der Depolarisation von Vesikel noch nicht verstanden ist, gibt es doch deutliche Hinweise auf eine Population depolarisierter Vesikel, die direkt mit dem Spitzenwachstum verknüpft sind. Auch wurde eine lokal begrenzte Hyperpolarisation der Vesikel am Ort der Sedimentation von Statolithen auf der Plasmamembran beobachtet. Es sind weitere fluoreszenzmikroskopische Experimente mit Mehrfachmarkierungen nötig, um diese Beobachtungen zu untermauern. Dabei muss sowohl besonderes Augenmerk auf die Verteilung des zellinternen, freien Calciums gelegt werden, als auch auf die Aufnahme des Farbstoffs über endozytotische Wege. Durch die Entwicklung des NIKON Eclipse 80i "Horizontal" ist es möglich bis zu drei Fluoreszenzmarkierungen (z.B. Membranpotential, Calcium und ER) simultan in vivo während der gravitropen Krümmung einzusetzen, um weitere Erkenntnisse über die Dynamik und das Verhalten der beteiligten Zellkompartimente zu gewinnen.

Der letzte Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Planung, Konstruktion und den Bau einer neuen Parabelflugexperimenteinheit (Carbocryonix). Diese ermöglicht erstmals die Fixierung von biologischen Proben während Parabelflugexperimenten mittels Schockgefrierung. Die Anlage wurde bereits zwei Mal während der 10. und 12. DLR Parabelflugkampagne erfolgreich von der Arbeitsgruppe Gravitationsbiologie der Universität Bonn und der Arbeitsgruppe von Prof. Palme, Universität Freiburg eingesetzt. Die Qualität des mit dieser Experimenteinheit fixierten Materials ermöglicht im Anschluss an die eigentlichen Parabelflugexperimente molekularbiologische Analysen und verspricht zur Aufklärung einiger molekular- und zellbiologischer Fragestellungen bezüglich der Schwerkraftwahrnehmung in pflanzlichen und tierischen Systemen beizutragen.

## 6. Quellen

### 6.1. Literatur

**Alberts B**, Bray B, Lewis J, Raff M, Roberts K und Watson J (1995) Molekularbiologie der Zelle. VCH, Weinheim

**Baluska F und Hasenstein K** (1997) Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. *Planta* 203: 177-182.

**Bartnik E**, Hejnowicz Z und Sievers A (1990) Shuttle-like movements of Golgi vesicles in the tip of growing *Chara* rhizoids. *Protoplasma* 159: 1-8.

**Bartnik E und Sievers A** (1988) In-vivo observations of a spherical aggregate of endoplasmicreticulum and of Golgi vesicles in the tip of fast-growing *Chara* rhizoids. *Planta* 176: 1-9.

**Bjorkman T** (1988) Perception of gravity by plants. *Adv Bot Res* 15: 1-41.

**Blancaflor E** (2002) The cytoskeleton and gravitropism in higher plants. *J Plant Growth Regul* 21: 120-136.

**Blancaflor E**, Fasano J und Gilroy S (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiology* 116: 213-222.

**Blancaflor E und Masson P** (2003) Plant Gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiology* 133: 1677-1690.

**Blilou I**, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heldstra R, Alda M, Palme K und Scheres B (2005) The PIN Auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39-44.

**Boonsirichai K**, Guan C, Chen R und Masson PH (2002) Root Gravitropism: An experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu. Rev. Plant Biology* 53: 421-447.

**Braun M** (1996) Anomalous gravitropic response of *Chara* rhizoids during enhanced accelerations. *Planta* 199: 443-450.

**Braun M** (1996) Immunolocalization of myosin in rhizoids of *Chara globularis Thuill.* *Protoplasma* 191: 1-8.

**Braun M** (2002) Gravity perception requires statoliths settled on specific plasma membrane areas in Characean rhizoids and protonemata. *Protoplasma* 219: 150-159.

- Braun M**, Buchen B und Sievers A (2002) Actomyosin-mediated statolith positioning in gravisensing plant cells studied in microgravity. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 137-145.
- Braun M**, Buchen B und Sievers A (2004) Actin-cytoskeletal control of gravity sensing and gravity-oriented tip growth. *Gravitational and Space Biology Bulletin* 17: 39-44.
- Braun M**, Hauslage J, Czogalla A und Limbach C (2004) Tip-localized actin polymerisation and remodelling, reflected by the localisation of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in Characean rhizoids. *Planta* 219: 379-388.
- Braun M und Limbach C** (2006) Rhizoids and protonemata of Characean algae: model cells for research on polarized growth and plant gravity sensing. *Protoplasma* 229: 133-142.
- Braun M und Richter P** (1999) Relocalization of the calcium gradient and a dihydropyridine receptor is involved in upward bending by bulging of Chara protonemata, but not in downward bending by bowing of Chara rhizoids. *Planta* 209: 414-423.
- Braun M und Sievers A** (1993) Centrifugation causes adaptation of microfilaments: studies on the transport of statoliths in gravity sensing Chara rhizoids. *Protoplasma* 174: 50-61.
- Braun M und Wasteneys GO** (1998) Distribution and dynamics of the cytoskeleton in graviresponding protonemata and rhizoids of Characean algae: exclusion of microtubules and a convergence of Actin filaments in the apex suggest an actin-mediated gravitropism. *Planta* 205: 39-50.
- Buder J** (1961) Der Geotropismus der Characeenrhizoide. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 74: 14-23.
- Campanoni P und Blatt M** (2007) Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *Journal of Experimental Biology* 58: 65-74.
- Caspar T und Pickard B** (1989) Gravitropism in a starchless mutant of Arabidopsis: implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* 177: 185-197.
- Dall'Asta V**, Gatti R, Orlandini G, Rossi P, Rotoli B, Sala R, Bussolati O und Gazzola G (1997) Membrane potential changes visualized in complete growth media trough confocal Laser Scanning Microscopy of bis-Oxonol-Loaded Cells. *Exp. Cell. Research* 231: 260-268.

**Driss-Ecole D**, Jeune B, Prouteau M, Julianus P und Perbal G (2000) Lentil root statoliths reach a stable state in microgravity. *Planta* 211: 396-405.

**Epps D**, Wolfe M und Groppi V (1994) Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonole (Dibac<sub>4</sub>(3)) in model systems and cells. *Chemistry and Physics of Lipids* 69: 137-150.

**Fasano J**, Swanson S, Blancaflor E, Dowd P, Kao T und Gilroy S (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. *The Plant Cell* 13: 907-921.

**Felle H und Hepler P** (1997) The cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca<sup>2+</sup>-selective microelectrode tests and Fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiology* 114: 39-45.

**Forsberg C** (1965) Nutritional studies of *Chara* in axenic cultures. *Physiol Plant* 18: 275-290.

**Friml J**, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K und Palme K (2002) Lateral relocalisation of Auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415: 806-809.

**Garill A**, Jackson S, Lew R und Heath I (1992) Ion channel activity and tip growth: tip-localized stretch-activated channels generate an essential Ca<sup>2+</sup> gradient in the oomycete *Saprolegnia ferax*. *European J. of Cell Biology* 60: 358-365.

**Geitmann A und Emons A** (2000) The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. *Journal of Microscopy* 198: 218-245.

**Haberland G** (1900) Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 18: 261-272.

**Hauslage J** (2005) Funktionelle Charakterisierung der Gravirezeptoraktivierung in *Chara*-Rhizoiden. Diplomarbeit, IMBIO, Universität Bonn, Deutschland.

**Hejnowicz Z**, Heinemann B und Sievers A (1977) Tip growth: patterns of growth rate and stress in the *Chara* rhizoid. *Z Pflanzenphysiol* 81: 409-424.

**Hejnowicz Z und Sievers A** (1981) Regulation of the position of statoliths in *Chara* rhizoids. *Protoplasma* 108: 117-137.

**Hepler P** (1997) Tip Growth in pollen tubes: Calcium leads the way. *Trends in Plant Sci.* 2: 79-80.

**Hepler P**, Vidali L und Cheung A (2001) Polarized Cell Growth in Higher Plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17: 159-187.

- Hodick D** (1993) The protonema of *Chara fragilis* Desv.: regenerative formation, photomorphogenesis, and gravitropism. *Bot. Acta* 163: 388-393.
- Holdaway-Clarke TL**, Weddle NM, Kim S, Robi A, Parris C, Kunkel JG und Hepler PK (2003) Effect of extra cellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *J Exp Bot* 54: 65-72.
- Hou G**, Kramer VL, Wang Y, Chen R, Perbal G, Gilroy S und Blancaflor EB (2004) The promotion of gravitropism in *Arabidopsis* roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *The Plant Journal* 39: 113-125.
- Hou G**, Mohamalawari D und Blancaflor E (2003) Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap Actin cytoskeleton. *Plant Physiology* 131: 1360-1373.
- Jaffe L** (1977) Electrical controls of development. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6: 445-476.
- Kimbrough J**, Salinas-Mondragon R, Boss W und Brown C (2004) The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiology* 136: 2790-2805.
- Kiss J**, Wright J und Caspar T (1996) Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 97: 237-244.
- Kiss JZ und Sack FD** (1989) Reduced gravitropic sensitivity in roots of a starch-deficient mutant of *Nicotiana glauca*. *Planta* 180: 123-30.
- Kiss JZ und Staehelin LA** (1993) Structural polarity in the *Chara* rhizoid: a reevaluation. *American Journal of Botany* 80: 273-282.
- Kuznetsov O und Hasenstein K** (1996) Magnetophoretic induction of root curvature. *Planta* 198: 87-94.
- Kuznetsov O und Hasenstein K** (1997) Magnetophoretic induction of curvature in coleoptiles and hypocotyls. *J Exp Bot* 48: 1951-1957.
- Kuznetsov O**, Schwuchow J, Sack F und Hasenstein K (1999) Curvature induced by amyloplast magnetophoresis in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. *Plant Physiology* 119: 645-650.
- Limbach C**, Hauslage J, Schäfer C und Braun M (2005) How to activate a plant gravireceptor. Early mechanisms of gravity sensing studied in Characean rhizoids during parabolic flights. *Plant Physiology* 139: 1030-1040.

- Limbach C**, Staehelin L, Sievers A und Braun M (2008) Electron tomographic characterization of a vacuolar reticulum and of six vesicle types that occupy different cytoplasmic domains in the apex of tip-growing *Chara* rhizoids. *Planta* 227: 1101-1114.
- MacCleery S und Kiss J** (1999) Plastid sedimentation kinetics in roots of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120: 183-192.
- Malhó R**, Read N, Trewavas A und Pais M (1995) Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *The Plant Cell* 7: 1173-1184.
- Masson PH**, Tasaka M, Morita MT, Guan C, Chen R und Boonsirichai K (2002) *Arabidopsis thaliana*: A model for the study of root and shoot gravitropism. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists.
- Messerli M**, Danuser G und Robinson K (1999) Pulsatile influxes of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *J Cell Sci.* 112: 1497-1509.
- Messerli M und Robinson K** (1997) Tip localized Ca<sup>2+</sup> pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J. Cell Science* 110: 1269-1278.
- Morey-Holton E** (2003) The impact of gravity on life. In: Rothschild, Evolution planet earth. Elsevier 143-159.
- Morita M und Tasaka M** (2004) Gravity sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 712-718.
- Mullen J**, Ishikawa H und Evans M (2000) Kinetics of constant gravitropic responses in *Arabidopsis* roots using a feedback system. *Plant Physiology* 123: 665-670.
- Némec B** (1900) Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. *Ber Dtsch Bot Ges* 18: 241-245.
- Ottenschläger I**, Wolff P, Wolverson C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M und Palme K (2003) Gravity-regulated differential Auxin transport from columella to lateral root cap cells. *PNAS* 100: 2987-2991.
- Palme K**, Dovzhenko A und Ditengou F (2006) Auxin transport and gravitational research: perspectives. *Protoplasma* 229: 175-181.
- Perbal G und Driss-Ecole D** (2003) Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends in Plant Science* 8: 498-504.
- Perbal G**, Lefrance A, Jeune B und Driss-Ecole D (2004) Mechanotransduction in root gravity sensing cells. *Plant Physiology* 120: 303-311.

- Perrin R**, Young L, Murthy N, Harrison B, Wang Y, Will J und Masson P (2005) Gravity signal transduction in primary roots. *Annals of Botany* 96: 737-743.
- Pierson ES**, Derksen J und Traas J (1986) Organization of microfilaments and microtubules in pollen tubes grown in vitro or in vivo in various angiosperms. *Eur J. Cell Biol.* 41: 14-18.
- Pierson ES**, Miller D, Callaham D, Shipley A, Rivers A, Cresti M und Hepler P (1994) Pollen tube growth is coupled to the extra cellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BABTA-buffers and hypertonic media. *Plant Cell* 6: 1815-1828.
- Pierson ES**, Miller D, Callaham D, van Aken J, Hackett G und Hepler P (1996) Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Developmental Biology* 174: 160-173.
- Roy S**, Holdaway-Clarke T, Hackett G, Kunkel J, Lord E und Hepler P (1999) Uncoupling secretion and tip growth in lily pollen tubes: evidence for the role of calcium in exocytosis. *The Plant Journal* 19: 379-386.
- Sack FD** (1997) Plastids and gravitropic sensing. *Planta* 203: S63-8.
- Salisbury F** (1993) Gravitropism, changing ideas. *Horticult. Rev.* 15: 233-278.
- Schröter K**, Läuchli A und Sievers A (1975) Mikroanalytische Identifikation von Bariumsulfat-Kristallen in den Statolithen der Rhizoide von *Chara fragilis*, Desv. *Planta* 122: 213-225.
- Scott A und Allen N** (1999) Changes in cytosolic pH within Arabidopsis root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiology* 121: 1291-1298.
- Sheahan B**, Staiger C, Rose J und McCurdy W (2004) A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of Arabidopsis fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Physiol Plant* 136.
- Sievers A**, Braun M und Monshausen G (2002) The root cap: structure and function. In: Waisel Y, Amram E, Kafkafi U *Plant Roots - The hidden half*. Marcel Dekker, New York, Basel 33-47.
- Sievers A**, Buchen B und Hodick D (1996) Gravity sensing in tip-growing cells. *Trends in Plant Science* 1: 273-279.

- Sievers A**, Buchen B, Volkmann D und Hejnowicz Z (1991) Role of the cytoskeleton in gravity perception. The cytoskeletal basis of plant growth and form; Academic Press Limited.
- Sievers A**, Heinemann B und Rodriguez-Garcia MI (1979) Proof of the subapical differential growth of the flanks in the Chara rhizoid during graviresponse. J Plant Physiol 91: 435-42.
- Sievers A**, Kruse S, Kuo-Huang L und Wendt M (1989) Statoliths and microfilaments in plant cells. Planta 179: 257-278.
- Sievers A** und Schmitz M (1982) Röntgen-Mikroanalyse von Barium, Schwefel und Strontium in Statolithen-Kompartimenten von Chara-Rhizoiden. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 95: 353-360.
- Staves M**, Wayne R und Leopold A (1997) Cytocalasin D does not inhibit gravitropism in roots. Am. J. Bot. 84: 1530-1535.
- Steer M** (1989) Calcium control of pollen tube tip growth. Biol. Bull. 176: 18-20.
- Tasaka M**, Kato T und Fukaki H (1999) The endodermis and shoot gravitropism. Trends in Plant Science 4: 103-107.
- Taylor L** und Hepler P (1997) Pollen germination and tube growth. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 461-491.
- Todd P** (1992) Physical effects on the cell level under altered gravity conditions. Advanced Space Research 12: 43-49.
- Ueda J**, Myamoto K, Yuda T, Hoshino T, Fujii S, Mukai C, Kamigaichi S, Aizawa I, Yoshizaki I, Shimazu T und Fukui K (1999) Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 Space Experiment. J Plant Res 112: 487-492.
- Vidali L**, McKenna S und Hepler P (2001) Actin polymerisation is essential for pollen tube growth. Molecular Biology of the Cell 12: 2534-2545.
- Volkmann D**, Buchen B, Hejnowicz Z, Tewinkel M und Sievers A (1991) Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitational field during parabolic flights of rockets. Planta 185: 151-163.
- Wang-Cahill F und Kiss JZ** (1995) The statolith compartment in Chara rhizoids contains carbohydrate and protein. American Journal of Botany 82: 220-229.
- Weise SE und Kiss JZ** (1999) Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of Arabidopsis. Int J Plant Sci 160: 521-7.



- Wendt M**, Kuo-Huang L und Sievers A (1987) Gravitropic bending of cress roots without contact between amyloplasts and complexes of endoplasmatic reticulum. *Planta* 172: 321-329.
- Whymer C**, Bibikova T und Gilroy S (1997) Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 12: 427-439.
- Wolverton C**, Mullen J, Ishikawa H und Evans M (2002) Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. *Planta* 215: 153-157.
- Yamamoto K und Kiss J** (2002) Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 128: 669-681.
- Yamamoto K**, Pyke KA und Kiss JZ (2002) Reduced gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls, but not roots, of *Arabidopsis* mutants with large plastids. *Physiol Plant* 114: 627-636.
- Yoder TL**, Zheng H, Todd P und Staehelin LA (2001) Amyloplast sedimentation dynamics in Maize columella cells support a new model for the gravity-sensing apparatus of roots. *Plant Physiology* 125: 1045-1060.
- Zochowski M**, Wachowiak M, Falk C, Cohen L, Lam Y, Antic S und Zecevic D (2000) Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes. *Biol. Bull.* 198: 1-21.

## 6.2. Internet

National Center for Biotechnology NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ImageJ Image Processing and Analysis in Java <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

---

## 7. Abkürzungen

A	Ampere
a	Beschleunigung
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AUX	Pflanzlicher Auxin-Influxtransporter
AV	Analog Video
Baud	Bits per second; Datenübertragungsrate
°C	Grad Celsius
*.csv	Dateiformat mit Kommatrennung
dB	Dezibel
Da	Dalton
DIN	Deutsche Industrie Norm
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
ESA	European Space Agency
ESTEC	European Space and Technology Center
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F	Kraft
FBAS	Videobildformat
FT	Flugtag
FUGOSTAT	Referenzzentrifuge des Parabelflug-Racks
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gb	Gigabyte
Hz	Hertz
h	Stunde
M	Mol
<i>m</i>	Masse
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHz	Megahertz

---

min	Minute
ml	Milliliter
MPixel	Mega Pixel
<i>n</i>	Anzahl
I <sup>2</sup> C	Industrielle Schnittstelle zu seriellen Übertragung von Daten
IMBIO	Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
IML-2	International Microgravity Laboratory 2
IZMB	Institut für Zellbiologie und Molekulare Botanik
Inv.	Inversion
ISS	International Space Station
J	Joule
k	Kilo
l	Liter
Lat B	Latrunculin B
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPEG	Komprimierungsformat für multimediale Daten
NIZEMI	Niedergeschwindigkeitszentrifugenmikroskop
<i>P</i>	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate Buffered Saline Puffer
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PIN	Pflanzlicher Auxin-Effluxtransporter
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>s</i>	Strecke
SAC	Stretch Activated Ca <sup>2+</sup> channels
U/min	Umdrehungen pro Minute
USB 2.0	Universal Serial Bus, Standard 2.0
V	Volt
[v/v]	Volumenprozent
<i>W</i>	Arbeit
W	Watt
[w/v]	Gewichtsprozent

---

$\mu g$	Mikrogravitation
z.B.	zum Beispiel
$\emptyset$	Arithmetisches Mittel
#	Nummer

