

**1. SCHLUSSBERICHT 14.11.07**

**1.1. Projektleiter: Galland, Paul; Professor Dr.**

Fachbereich Biologie  
Philipps-Universität  
Karl-von-Frisch Str. 8  
D-35032 Marburg  
Tel. 06421-282 2061/2  
Fax: 06421-282 2057  
galland@staff.uni-marburg.de

**1.2. Co-Experimentator: Schmidt, Werner, Prof. Dr. (Apl. Prof. Uni Konstanz)**

Fakultät für Biologie  
Universität Konstanz  
Raiffeisen Str. 2  
D-78465 Konstanz  
Tel/Fax: 07531-44150  
w.2.schmidt@surfeu.de

**1.3. Thema: Untersuchungen schneller gravitroper Primärreaktionen von Pilzen und Höheren Pflanzen bei verschiedenen Beschleunigungsreizen**

**1.4. Förderkennzeichen:** DLR/BMBF 50WB0425

**1.5. Laufzeit:** 01. April 2004 – 30. Juni 2007

**1.6. Berichtszeitraum:** 01. April 2004 – 30. Juni 2007

**1.7. Zusammenfassung**

Für die Charakterisierung schneller gravitropischer Primärreaktionen haben wir schnelle in-vivo Spektroskopie auf die Gravirezeption von *Phycomyces*-Sporangiophoren und Gräserkoleoptilen angewandt. In erdgebundenen Experimenten, bei Parabelflügen und in Fallturmexperimenten konnten wir nachweisen, dass graviinduzierte Absorptionsänderungen instantan auftreten und bereits bei etwa  $2 \times 10^{-2} \times g$  ausgelöst werden (Schmidt und Galland, 2004; Schmidt 2006).

Für den Pilz *Phycomyces blakesleeanus* wurden Lipidglobuli als neuartige Gravisuszeptoren identifiziert, die auftriebsgesteuert sind und sich somit grundlegend von den sedimentationsgetriebenen Gravisuszeptoren von Pflanzen unterscheiden. Die Bewegung der Lipidglobuli und ihre Allokation innerhalb der Sporangioaphore wird durch ein dichtes Actinskelett kontrolliert. Wir konnten nachweisen, dass neben diesen endogenen Faktoren auch die exogenen Faktoren Licht, Calcium und die magnetische Flussdichte des geomagnetischen Feldes ganz wesentlich die Gravirezeption beeinflussen.

## Resultate aus der zweiten Förderperiode

### 1 Konstruktion von Instrumenten

Unter Anleitung von Prof. Schmidt wurden durch unsere Werkstatt am Fachbereich Biologie die Messgeräte der ersten Förderperiode weiter verbessert. (i) ein RSS (rapid-scan spectrometer) zur in-vivo Messung von Reflexionsspektren (Absorptionsspektren) biologischer Materialien in erdgebundenen und Parabelflugexperimenten; (ii) ein MDWS (micro-dual-wavelength spectrometer) zur Messung von GIACs in erdgebundenen sowie in Parabelflug-Experimenten, (iii) eine weitere Version des MDWS, das für den Fallturm in Bremen gebaut wurde. Die Geräte sind voll automatisiert und unter Kontrolle spezieller Software. Die Weiterentwicklung der Geräte beinhaltete z.B. Temperaturkontrolle durch Peltier-Elemente und die Vergrößerung des Spektralbereichs bis in das Nahe-Infrarot (Schmidt 2004b,c; Schmidt 2007b,c). Die Geräte wurden auf Parabelflügen in den Jahren 2004 bis 2006 erfolgreich eingesetzt.

### 2 GIAC-Messungen mit dem MDWS: *Phycomyces* und *Avena*

In erdgebundenen Experimenten (Humanzentrifuge der DLR Köln-Porz) und bei Parabelflügen treten bei *Phycomyces* und *Avena*-Koleoptilen instantane GIACs auf, wenn sich das Schwerfeld ändert. Den 1.8-g Phasen der Flugparabel entspricht eine Abnahme und den 0-g Phasen eine deutliche Zunahme der relativen Absorption bei 460 nm. Diese GIACs treten im Wildtyp von *Phycomyces* ohne Verzögerung auf (zeitliches Auflösungsvermögen des MDWS = 20 ms). Die Gravitropismusmutante A909 *madJ* zeigt dagegen während der Parabelflüge und auf der Humanzentrifuge (bis 6.5 x g) keine GIACs (Schmidt and Galland, 2004; Schmidt 2006). Diese Beobachtung zeigt, daß die GIACs spezifisch für die gravitropische Transduktionskette sind. Bei Parabelflügen zeigten auch *Avena*-Koleoptilen ähnliche GIACs (unveröffentlicht). Die Tatsache, daß die GIACs quasi instantan auftreten, spricht dafür, daß sie frühe Primärreaktionen der Graviperzeption darstellen. Die GIACs treten selbst deutlich früher als elektrische Signale auf, die in Pflanzen mit der Graviperzeption assoziiert sind (Monshausen and Sievers, 2002; Weisenseel and Meyer, 1997). Die GIACs müssen also innerhalb der gravitropischen Transduktionskette deutlich vor den Ereignissen liegen, die für die Mobilisierung von Ionentransport und elektrischen Signalen verantwortlich sind.

### 3 Schwellenwerte für Gravitropismus und GIACs

In einer Klinostatzentrifuge wurden die gravitropischen Schwellenwerte für *Phycomyces* bestimmt (Galland et al., 2004). Die Wildtypen von *Phycomyces* zeigen einen Schwellenwert von etwa  $3 \times 10^{-2} \times g$ , während eine Mutante ohne oktaedrische Proteinkristalle einen erhöhten Schwellenwert von etwa  $10^{-1} \times g$  besitzt. Koleoptilen von *Avena* zeigen einen deutlich niedrigeren Schwellenwert von etwa  $10^{-3} \times g$  (Galland, unveröffentlicht). Die potentielle Energie, die durch die Verlagerung der Graviszeptoren erzeugt wird – Kristalle und Lipidglobuli – ist hoch genug, um die Schwellenwerte zu erklären (Grolig et al., 2004).

Der absolute Schwellenwert für die Auslösung von GIACs während einer Flugparabel liegt ebenfalls bei etwa  $3 \times 10^{-2} \times g$  (Schmidt and Galland, 2004). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Schwellenwert für die GIACs durchaus niedriger als  $3 \times 10^{-2} \times g$  sein könnte, weil die Mikrogravitation im Airbus A300 ZERO-G bei  $0 \pm 3 \times 10^{-2} \times g$  liegt (Schmidt and Galland, 2004). Für eine genauere Bestimmung des wahren Schwellenwertes

der GIACs haben wir im Frühjahr 2006 Fallturmexperimente durchgeführt, bei denen sich sehr viel niedrigere  $g$ -Werte erreichen lassen ( $10^{-6} \times g$ ) (s.u.).

#### 4 Wachstum bei Hypergravitation

Bei Parabelflügen wird während der 31 Flugparabeln die Wachstumsrate der *Phycomyces* Sporangiohoren transient um etwa 50% reduziert. Nach Beendigung der Flugparabeln steigt die Wachstumsrate wieder auf den Normalwert. Eine ähnliche Wachstumsverzögerung zeigten Sporangiohoren auch auf der Humanzentrifuge bei Hypergravitation. Man darf daher aus diesem Ergebnis schliessen, dass die Wachstumsverzögerungen im Flugzeug auf die Phasen der Hypergravitation zurückzuführen sind.

#### 5 Vibrationsmessungen bei Parabelflügen

Um abschätzen zu können, in welchem Ausmaß unsere Experimente durch störende Vibrationen des Airbus gestört werden könnten, haben wir während einiger Flugparabeln Powerspektren der allgegenwärtigen Vibrationen gemessen. Auch während der 0- $g$  Phase einer Flugparabel waren noch deutlich Vibrationen zu erkennen. In einem free-floating Experiment, das im Oktober 2002 durchgeführt wurde, waren dagegen praktisch alle Vibrationen verschwunden. Die theoretischen und praktischen Implikationen der allgegenwärtigen Vibrationen auf den Gravitropismus wurden in einer Publikation von Prof. Schmidt (2004a) näher analysiert.

#### 6 Rolle der apikalen Lipidglobuli im Gravitropismus

Junge Sporangiohoren von *Phycomyces* besitzen ein apikales Aggregat von Lipidglobuli, die wahrscheinlich als Graviszeptoren (Bojentyt) fungieren (Schimek et al., 1999) und auch bei der Licht-Wachstumsreaktion eine Rolle spielen (Ogorodnikova et al., 2002). Zur Zeit existieren leider noch keine Mutanten ohne Lipidglobuli. Wir haben aber entdeckt, daß dieses Aggregat fehlt, wenn Sporangiohoren in Kälte (5°C) aufgezogen wurden; mit dem Verlust der Lipidglobuli geht ein Verlust des Gravitropismus einher (Grolig et al., 2004).

Wir haben die Lipidglobuli fluorometrisch und mit MALDI-TOF näher analysiert. Die Fluoreszenzeigenschaften deuten auf das Vorhandensein von Flavinen und NAD(P)H<sub>2</sub>; das gelbe Massenzentrum der Globuli ist  $\beta$ -Carotin (Ogorodnikova et al., 2002). Die Lipidglobuli sind (an der Oberfläche) mit etwa 30 Proteinen assoziiert, von denen wir einige mit MALDI-TOF identifiziert haben. Zu den identifizierten Proteinen gehören: Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$ , Actin, heat-shock Protein HSP-100, Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase, ein Schlüsselenzym für die Biosynthese von Triglyceriden, (Kofaktor NADH<sub>2</sub>), Phytoendesaturase (*carB*-Gen; enthält FAD) and Lycopincyclase (*carR* gene) (Seeger, Nyalwide, Galland, unveröffentlicht). Das Vorliegen von HSP-100 könnte sehr bedeutsam sein, weil es sich Actin vernetzen kann.

#### 7 Rolle des Actinskeletts

Die apikalen Lipidglobuli von Stadium 1 Sporangiohoren sind in ein massives Actinskelett eingebettet, das wir durch Konfokalmikroskopie eingehend studiert haben (Grolig et al., 2006, 2007). Innerhalb des Actinkörpers gibt es einen hyalinen Bereich, in dem sich die Lipidglobuli befinden. Sie sind nie in Ruhe sondern in ständiger Bewegung. Die Bewegungsanalyse ergab, dass die Geschwindigkeitsprofile der Globuli deutlich von den Partikelgeschwindigkeiten in den kortikalen Bereichen unterhalb der Wachstumszone unterscheiden (Grolig et al., 2006, 2007).

## 8 Interaktion von Licht und Gravitropismus, Rotlichtrezeptor

Werden horizontale Sporangiothoren bilateral bestrahlt (tonische Bestrahlung), so kann die gravitropische Krümmung verstärkt werden. Wichtig war der Befund, dass Rotlicht (> 600 nm), das phototropisch ineffektiv ist, den Gravitropismus verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass es einen entsprechenden Rotlichtrezeptor geben muss (Galland et al., 2007). Amerikanische und spanische Arbeitsgruppen haben die Photorezeptoren von *Phycomyces* als flavinhaltige Rezeptoren vom Typ „white collar“ identifiziert (Idnurm et al. 2006). Unsere noch unveröffentlichten Studien zeigen, dass die white-collar-Rezeptoren von *Phycomyces* ein rotlichtabsorbierendes Intermediat besitzen, das für Photoreversibilität im Blau-Rotbereich verantwortlich ist (Seger, Galland, 2007 unveröffentlicht).

## 9 Der Effekt von $\text{Ca}^{2+}$ auf Wachstum und Gravitropismus

Submers wachsende Sporangiothoren zeigen normalen Gravitropismus, der sich im Wildtyp durch exogenes  $\text{Ca}^{2+}$  nur moderat stimulieren lässt (Galland et al., 2007). Interessanterweise ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation aber substantiell verstärkt, wenn die vakuolären Proteinkristalle fehlen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Kristalle an der Verrechnung interner und externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt sind, höchstwahrscheinlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung.

## 10 Fallturmexperimente (Mai 2006)

Die in Parabelflügen gemessenen GIACs von *Phycomyces*-Sporangiothoren (siehe oben) wurden auch am Fallturm in Bremen beobachtet (unveröffentlicht). Wegen technischer Schwierigkeiten mit dem  $g$ -Sensor der Fallkapsel (es bleibt unklar, wieviel  $g$  während der Mikrosekunde des Abwurfs auftreten) sollen diese Experimente später zur Publikationsreife gebracht werden.

## 11 TEXUS Flug

Der ursprünglich für die zweite Förderperiode geplante TEXUS-Flug wurde nicht durchgeführt. Nach Bewertung der Ergebnisse, die aus Parabelflug-Experimenten von 2002 – 2006 gewonnen wurden, sind wir zu der Überzeugung gelangt, dass ein TEXUS-Flug besser konzipiert werden könnte, wenn Resultate aus vorher durchgeführten Fallturmexperimenten mit idealen Mikrogravitationsbedingungen vorlägen. Von den Fallturmexperimenten haben wir gelernt, dass die beim Auslösen der Fallkapsel auftretende Hypergravitation Probleme macht. Da Hypergravitation auch beim Raketenstart auftritt, wollen wir dieses Problem zunächst durch Pilotexperimente am Fallturm in den Griff bekommen. Das für die dritte Förderperiode vorgeschlagene TEXUS-Experiment soll 2009 durchgeführt werden. Die Geräte werden momentan (November 2009) in Trauen gebaut.

## 12 Der Einfluss magnetischer Felder auf den Gravitropismus

Diese Studien wurden zur Vorbereitung der dritten Förderperiode (Beginn Juli 2007) durchgeführt. Momentan haben wir den Gravitropismus von *Phycomyces*-Sporangiothoren in einem limitierten Bereich von 38 bis 400  $\mu\text{T}$  durchgeführt. Wir fanden, dass sowohl der Wildtyp als auch die Gravimutante A909*madJ* mit steigender magnetischer Flussdichte um bis zu 30% gesteigert wird. Wir haben auf dem DLR-Parabelflug im November 2006 die magnetischen Flussdichten während der Flugparabeln gemessen und gefunden, dass sich die magnetische Flussdichte um bis zu 40% ändern kann. Die Änderung ist von der Flugrichtung

abhängig und ist maximal bei Nord-Süd-Richtung. Wir haben auf der Basis von real-timePCR damit begonnen, die Genexpression von 10 Genen (Tubulin, Actin, heatshock Proteine hspA und hsp90, DNA-Photolyase, carB, madA, wcoA, und die Endonukleasen ago und dcr) als Funktion der magnetischen Flussdichte, der Lichtbedingungen und des Schwerereizes zu messen. Wir finden, dass alle drei Reize bei der Genexpression eine Rolle spielen.

## Veröffentlichungen der zweiten Förderperiode 2004 - 2007

- Galland P, H Finger, Y Wallacher (2004) Gravitropism in *Phycomyces*: threshold determination on a clinostat centrifuge. *J. Plant Phys.* **161**, 733-739.
- Galland P, V. Fries, F Grolig, W Schmidt (2007) Gravireception in *Phycomyces blakeslee-  
anus*. *Adv. Space Res.* **39**, 1134-1139
- Grolig F, H Herkenrath, T Pumm, A Gross, P Galland (2004) Gravity susception by buoyancy: floating lipid globules in sporangiophores of *Phycomyces*. *Planta* **218**, 658-667.
- Grolig F, M Döring, P Galland (2006) Gravisusception by buoyancy: a mechanism ubiquitous among fungi? *Protoplasma* **229**, 117-123.
- Schmidt W, P Galland (2004) Optospectroscopic detection of primary reactions associated with the graviperception of *Phycomyces*: effects of micro- and hypergravity. *Plant Physiol.* **135**, 183-92.
- Schmidt W (2004a) Quickly changing acceleration forces (QCAFs): vibration analysis on the A300 ZERO-G. *Microgravity Sci. Technol.* **15**, 42-48.
- Schmidt W (2006a) Gravity-induced absorption changes (GIACs) in *Phycomyces blakesleeanus* during parabolic flights: A spectral approach. *Protoplasma* **229**, 125-131.

## Technical papers

- Schmidt W (2004b) A high performance micro-dual-wavelength spectrophotometer (MDWS). *J. Biochem. Biophys. Methods* **58**, 15-24.
- Schmidt W (2004c) A mini-rapid-scan-spectrophotometer. *J. Bioch. Biophys. Methods* **58**, 125-137.
- Schmidt W (2007b) Advanced micro dual wavelength spectrophotometer (MDWS) for measuring minute optical changes in the millisecond time range. *Microgravity Sci. Technol.* **19**, 11-15.
- Schmidt W (2007c) Array-spectrophotometers for measuring gravity-induced absorption changes (GIACs) during parabolic flights on the AIRBUS-300-ZERO-G. *Microgr. Sci. Tech.* **19**, 16-21.

## Reviews

- Corrochano L. M. and P. Galland (2006) Photomorphogenesis and Gravitropism in Fungi. In: *The Mycota I, Growth, Differentiation and Sexuality*. (Eds. U. Kues, R. Fischer). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 231-257.
- Galland, P. and A. Pazur (2005) Magnetoreception in Plants. *J. Plant Res.* **118**, 371-389.
- Pazur, A., C. Schimek and P. Galland (2007) Magnetoreception in microorganisms and fungi. *Centr. Eur. J. Biol.* **2**, 597-659.

## In preparation

- Grolig F, J Moch, A Schneider, P Galland (2007) Actin-based short and long range organelle movements in the stage-1 sporangiophore of *Phycomyces blakesleeanus*. *Planta* to be submitted
- Schmidt W, P Galland (2007) Hysteresis analysis: a novel method for analyzing primary physiological sensory transduction. *Plant Physiol.* In Vorbereitung