

## **Schlussbericht zu Projekt 50 BW 0010**

### **Reaktionen des zellulären Membran- und Ionen-Transportes in Pflanzenzellen auf Schwerkraftänderungen**

Projektleiter des Vorhabens (Principal Investigator)      **Prof. Dr. Günther F.E. Scherer**  
Institut f. Zierpflanzenbau, Baumschule u. Pflanzenzüchtung  
AG Spez. Ertragsphysiologie  
Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover  
Tel.: ..49-511-762-3153  
Fax.: ..49-511-762-2654  
e-mail: scherer@mbox.zier.uni-hannover.de

#### **I. Aufgabenstellung**

##### **(A) Endocytose**

Zum Zeitpunkt der Antragstellung (2000) war die Hauptaufgabe, die Versuchsbedingungen zur Endocytose-Messung in Tabak-Pollenschläuchen in Verbindung mit dem genauen Flugverlauf zu erarbeiten, da der Flug bereits Mai 2001 erfolgen sollte. Es lagen noch keine konkreten Erfahrungswerte für diese Adaptation vor. Ferner sollten im Projektzeitraum die notwendige Hintergrundforschung im Bodenlabor (Hamburg) betrieben werden, die zur wissenschaftlichen Einordnung erforderlich sind.

##### **(B) Exocytose**

In der Antragsplanung wurden zunächst Forschungsarbeiten zur Exocytose vorgeschlagen. Diese konnten jedoch in der kurzen Zeit bis zum TEXUS 39 – Flugexperiment nicht adaptiert werden. Dieser Experimentteil wurde im Verlauf des Projektes zugunsten der Vorbereitung des Shuttle-Fluges für das WAICO-Projekt aufgegeben.

##### **(C) Vorbereitungen des Flugexperimentes WAICO**

Dieser Projektteil umfasste die genaue Optimierung der Bedingungen für Wurzelwachstumsversuche („Waving und Coiling“), die Adaptation an die Flug-Hardware und den vorgegebenen zeitlichen Rahmen des Flugexperimentes, und vor allem die Isolierung einer gravitrop geschädigten Arabidopsis-Mutante, die für das Flugexperiment benötigt wird.

##### **(D) Vorbereitungen des Flugexperimentes SALTO**

In diesem Projektteil sollte in Vorbereitung auf ein Flugexperiment die Halotoleranz von pflanzlichem Kallus (Möhre) in geänderter Schwerkraft getestet werden. Da Klinostat-Versuche wegen der großen Objektgröße nicht sinnvoll waren, wurde Halotoleranz in 10 g und 1 g verglichen, woraus sich überraschende neuartige Ergebnisse ergaben. Das Projekt wurde wegen Aufgabe der Entwicklung der Hardware SIMPEX nur als Bodenexperimente zuende geführt.

## **2. Voraussetzungen für das Vorhaben**

Grundvoraussetzung waren die Labors Scherer (Hannover) und Quader (Hamburg), die zusammen für die ausstehenden Untersuchungen fast komplett ausgerüstet waren. Lediglich eine kleine Tischzentrifuge wurde für den Projektteil (SALTO) angeschafft.

## **3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Hamburger Labor mit PD Dr. H. Quader war im Projekt als Vertragspartner ausgewiesen und überwachte alle Arbeiten mit Tabakpollenschläuchen. Das dazugehörige TEXUS9-Experiment wurde mit Personal aus Hamburg und Hannover durchgeführt. Die anderen Projektteile wurden in Hannover durchgeführt. Der Arbeitsplan wurde zwischenzeitlich an die neue Aufgabenstellung adaptiert (Aufgabe Exocytose/ Neuer Projektteil WAICO).

## **4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zur Zeit der Antragstellung**

Die technische Durchführung des TEXUS39 Experiments wurde mit einem weitgehend fertig konstruierten Modul der Firma OHB betrieben, in dem eine motorgetriebene Einheit aus Dreierspitzen automatische Fixierungen vornahm. Das Halotoleranz-Projekt sollte in der SIMPLEX-Hardware durchgeführt werden (Astrium, Friedrichshafen), deren Entwicklung jedoch nicht weiter geführt wurde. Die Hardware für das Flugexperiment WAICO wurde während des Projektzeitraumes weiter entwickelt und zwar parallel EMCS (Astrium) und BIOLAB (OHB). WAICO wurde erst vor kurzem (Februar 2004) für BIOLAB zugeteilt.

Das Hauptaugenmerk des Antrages waren Reaktion in Pflanzen(zellen) auf Schwerkraft, die nicht zu spezifischen Richtungsänderungen führen. Diese „µg-spezifischen“ Reaktionen auf Schwerkraftänderungen sind wenig erforscht bei Pflanzen, da es wenig Konzepte und funktionierende Systeme gibt, an denen solche Reaktionen gemessen werden. Das theoretische Gerüst bietet das Modell des Cytoskeletts von Ingber (1999). Arbeiten über diese Thematik werden vom Labor Prof. Hampp (Tübingen) durchgeführt (Martzivanou u. Hampp 2003).

Die postulierten Änderungen in den Parametern Endocytose und Halotoleranz in Abhängigkeit von g-Wert waren zum Zeitpunkt der Antragstellung nur inkomplett bekannt. Sie erwiesen sich jedoch zum Zeitpunkt des jetzigen Berichts sehr gut und weitgehend bestätigt, lediglich ein Experiment zur Halotoleranz in Schwerelosigkeit fehlt aus begrifflichen Gründen (fehlende Flugmöglichkeit) noch.

Dokumentationsdienste und Fachliteratur: Einschlägige Fachzeitschriften, Internet-Zugänge zu Literaturdiensten.

## **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.**

Das Klinostat-Experiment zur Endocytose sowie ein 10g-Experiment mit einer niedertourigen Zentrifuge wurde im MUSC (DLR-Köln) durchgeführt. Ansonsten erfolgte das notwendige Zuarbeiten zur Entwicklung der oben unter 4. genannten Hardware mit OHB und Astrium. „Intern“ erfolgte die Zusammenarbeit mit dem Hamburger Labor ( PD Dr. H. Quader).

## Teil II. Ergebnisse

### II.1. Endocytose

#### II.1.1. Vorbereitungen des Flugexperimentes

##### II.1.1.1. Adaptation des Wachstumstests an die TEXUS-Hardware

Unter den Wachstumsbedingungen des sog. PTG-Tests (Pollen Tube Growth-Test) nehmen Tabakpollenschläuche in einer bestimmten Zone kurz hinter der Spitze das fluoreszenzmarkierte Lipid bis-Bodipy FLC<sub>11</sub>PC' auf, d.h. in diesem System gibt es einen lokal begrenzten Bereich, in dem die Endocytose erfolgt. Das künstliche Lipid wird offenbar relativ rasch in die Plasmamembran eingebaut und durch Endocytose von Membranvesikeln zu intrazellulären Membranen transportiert und in diese dann durch Vesikelverschmelzung eingebaut. Die transportierten Vesikel benützen das Cytoskelett als richtungsgebende Leitstrukturen, indem sie über Myosine und Kinesine an Aktinfilamente binden. Da das Cytoskelett als einer der wichtigen „Sensoren“ für Schwerkraft gilt, ist diese Betrachtungsweise und die Untersuchung der Interaktion Cytoskelett-Vesikel für das Projekt bedeutsam.

Wegen der Kürze der zur Verfügung stehenden Vorbereitungsphase wurden erst einmal folgende Punkte experimentell getestet:

1. Wachstum des Versuchsmaterials (Tabak-Pollenschläuche, Petersilien-Zellkultur) nach Überführung in die Modulspritzen (2 h Vorkeimung der Pollen in Glasflaschen);
2. Einfluss herabgesetzter Temperaturen (12°C) auf das Wachstum der Pollenschläuche, um bei einer Startverzögerung keine erneute Vorkeimphase einleiten zu müssen;
3. Versuche zur Optimierung des Fixiervorgangs;
4. Suche nach gegebenenfalls besser geeigneten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Lipiden.

Zu 1.:

Schwierigkeit: Zunächst keimten die Pollen (5 mg/ml Medium) weder in den Polypropylenspritzen (PP-Spritzen), noch wuchsen sie in ihnen. Dabei wurde, wie im TEXUS-Experiment vorgesehen, ein Gesamtvolumen von 2 ml bei 250 µl Pollensuspension als Bedingung gewählt. Auch nach Vorkeimung in anderen Gefäßen (Glas-, Kunststoffflaschen) und dem Umfüllen in die Spritzen stagnierte das Wachstum relativ schnell.

Für diese Versuche wurde das in Hamburg entwickelte Testverfahren (Pollen Tube Growth-Test: PTG-Test) benutzt, das das Wachstum dadurch mißt, dass ein Farbstoff an die Zellulose der Zellwand bindet, der anschließend abgewaschen und im Photometer quantifiziert werden kann. Da das Wachstum des Pollenschlauches vorwiegend durch Sekretion der Zellwandbestandteile und Endocytose und Recycling der Membran erfolgt, ist dieser Wachstumstest gleichzeitig ein indirekter, aber relevanter Test für die Endocytose.

Es konnte ausgeschlossen werden, dass lösliche Bestandteile (z. B. Weichmacher) in den Spritzenkomponenten (Polypropylenmantel, Gummistopfen der Kolbenstange) dafür verantwortlich sind. Waschen der PP-Spritzen mit heißer Seifenlauge gefolgt von mehrmaligem Spülen mit Ethanol und Wasser führten nicht zu verbessertem Wachstum. Auch Extrakte geschredderter PP-Spritzen bzw. Gummistopfen zeigten keine signifikante toxische Wirkung. Ebenfalls konnte ausgeschlossen werden, dass essentielle Bestandteile des Mediums für das

Pollenwachstum durch die PP-Spritzen gebunden werden. Erste Tests zu der Frage, ob womöglich das Luftvolumen, d.h. der zur Verfügung stehende Sauerstoff, in den PP-Spritzen nicht ausreichend ist, ergaben keinen Unterschiede hinsichtlich des Pollenschlauch-Wachstums, wenn die Pollensuspension (250  $\mu$ l) in eine PP-Spritze mit 20 ml, 2 ml oder 1 ml Gesamtvolumen überführt wurde. In allen Fällen war das Wachstum stark reduziert und nahe null. In Glasspritzen (20 ml bzw. 1 ml Gesamtvolumen) verhielt es sich ebenso. Einbringen eines Papierstreifens (0,3 bis 0,6 cm breit) führte zu einem deutlich verbessertem Wachstum, das der Wachstumsgeschwindigkeit in einem 2 ml-Glasgefäß (Rotilabo) vergleichbar war. Optimales Wachstum wurde erreicht, wenn 250  $\mu$ l Pollensuspension und ein 0,3 cm breiter Papierstreifen in einem 2ml-Gefäß eingesetzt wurden. Erheblich reduziertes Wachstum zeigten schon 350  $\mu$ l, eine totale Hemmung trat bei 500  $\mu$ l Pollensuspension auf. Zusätzliche Sättigung der Pollensuspension mit Sauerstoff vor dem Überführen in die PP-Spritzen führt zu keiner Wachstumsverbesserung.

Zu 2.:

Pollenschläuche wachsen bei der für sie optimalen Wachstumstemperatur von 25-27°C ca. fünf bis sieben Stunden lang, dann gehen die endogenen Energievorräte zuende. Von der Befüllung der Spritzen bis zum Start der TEXUS-Rakete können bei Startverzögerungen jedoch leicht deutlich längere Zeiten erreicht werden. Es war daher notwendig, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem die Haltbarkeit der Pollenschläuche, die mit der Befüllung im Medium grundsätzlich zu wachsen beginnen, erhöht wurde.

Dabei stellte es sich heraus, dass eine (nicht zu starke) Kühlung der Pollenschläuche dieses Problem löste. Pollenschläuche, die bei 27°C vorkultiviert wurden, stellen bei 12°C ihr Wachstum ein und starten auch nach einer 3-4 stündigen Inkubation bei 12°C relativ schnell wieder eine erneute Wachstumsphase (Abb. 1). Wachstums-Kinetiken zeigen, dass die Pollenschläuche ca. 30 min benötigen, um wieder eine normale Wachstumsrate zu erreichen. Da die Umgebungstemperatur der Rakete vor dem Start bei 12-14°C liegt, reicht es aus, dass während dieser Phase der Lagerung der Spritzen in der Rakete die Umgebungstemperatur ohne Heizen beibehalten wird, um die Pollenschläuche über mehrere Stunden aktiv zu erhalten.

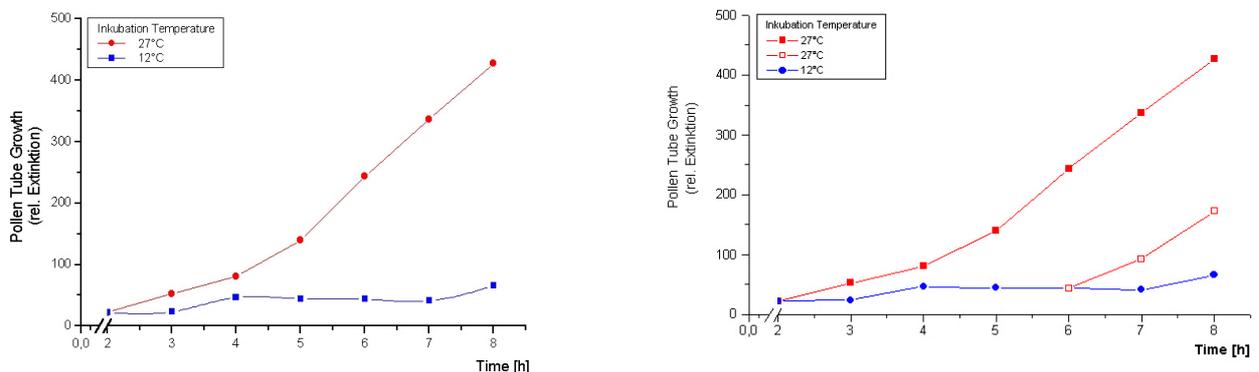


Abb. 3. Wachstumsgeschwindigkeiten von Tabakpollen nach Kältebehandlungen. (A linke Seite) Vergleich von Polenwachstum bei zwei verschiedene Temperaturen; 12°C = voraussichtliche Temperatur beim Befüllen der Rakete für TEXUS; 27°C 0 Wachstumstemperatur beim Aufwärmen und während des Flugs. (B rechte Seite) Vergleich des Wachstumsgeschwindigkeit nach Aufwärmen der Probe. Die Probe, die wiederaufgewärmt wurde nach einer 6h Kühlphase wächst genauso schnell wie die stets bei optimal gehaltene Probe. Die 6h ergeben die maximal zulässige Vorstart-Phase für dieses Experiment.

Zu 3.:

Allgemein werden Zellen am schonendsten durch Aldehyde (Paraform- bzw. Glutaraldehyd) fixiert. Glutaraldehyd kann nicht eingesetzt werden, da es zu einer zu starken Vernetzung und somit zu einer erhöhten Eigenfluoreszenz der zu untersuchenden Zellen führt.

Getestet wurden folgende Substanzen:

*Paraformaldehyd* (1 %): Fixiert die Zellen relativ langsam und fördert oftmals unspezifische Membrandurchlässigkeit für kleine Moleküle.

*NEM* (0,07 mM, N-Ethylmaleimid): Blockiert intrazellulären Transport und somit sowohl Sekretion (Pollenwachstum) und Endocytose, wirkt relativ langsam.

*Lanthanchlorid* ( ): Die nicht von einem Rezeptor abhängige Endocytose kommt bei einer Wachstumshemmung schnell zum Stillstand. Das Spitzenwachstum der Pollen hängt von der Aufnahme von  $Ca^{2+}$  an der Spitze ab. Hierbei spielen  $Ca^{2+}$ -Kanäle eine wichtige Rolle, die z. B. durch Lanthan blockiert werden können. Lanthan wirkt am schnellsten, führt allerdings zum Platzen der Pollenschläuche, so dass es als die Fixierung unterstützende Maßnahme nicht geeignet war.

*2,4-D* (künstliches Auxin, ): Diese Substanz blockiert Sekretion relativ langsam, ist also auch ungeeignet als die Fixierung unterstützende Substanz.

*Paraformaldehyd* (2-4% PFA): Eine Erhöhung der PFA-Konzentration führte zu einem wesentlich schnelleren Stopp des Wachstums. Es wurde eine Versuchsserie zur Fluorochromaufnahme gestartet, wobei die Pollenschläuche durch erhöhte PFA-Konzentrationen (4-8%) fixiert wurden. Konzentrationen >5% lösten osmotische Probleme aus, d.h. 4% PFA wurde als Fixierung gewählt.

Zu 4.:

Neben bis-Bodipy FLC<sub>11</sub>PC wurden noch andere fluoreszenzmarkierte Lipide auf ihre Eignung getestet.

FM 4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-diethylamino)-phenyl)-hexatrienyl)pyridinium dibromid): Diese Lipid wurde zur Demonstration der Endocytose in Hefe eingesetzt. Es ist für unsere Versuche nicht geeignet, da es an Cellulose bindet und der Großteil der Pollenschläuche bereits nach 3-4 min platzt.

NBD C<sub>6</sub>-HPC (2-(6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine): Ähnliche Ergebnisse wie mit bis-Bodipy FLC<sub>11</sub>PC – doch weniger eindeutig.

### **II.1.1.2. Probenhaltbarkeit von Pollenschläuchen und Zellkulturzellen nach Fixierung**

Die Test zur Haltbarkeit von Proben mussten durchgeführt werden, da Transport der Proben und Auswertung mittels CLM einige Tage dauert, während deren die Haltbarkeit gewährleistet sein musste.