

**Analyse der Zellsortierung und Zellbewegung von  
*Dictyostelium discoideum* mittels konfokaler 4D-  
Mikroskopie**

**Dissertation  
der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

vorgelegt von

Timo Zimmermann

23. Mai 2000

**1. Gutachter:** PD Dr. Florian Siegert

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Rainer Uhl

**Mündliche Prüfung:** 25. Juli 2000

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, daß die Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist.

München, den 22. Mai 2000

**Timo Zimmermann**

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

Zimmermann T, Siegert F. 1998. Simultaneous detection of two GFP spectral mutants during in vivo confocal microscopy of migrating Dictyostelium cells. *BioTechniques*. 24:458-461.

Zimmermann T, Siegert F. 1998 4D confocal microscopy of Dictyostelium discoideum morphogenesis and its presentation on the Internet. *Dev Genes Evol*. 208:411-420.

Zimmermann T, Lee SS, Eichinger L, Schleicher M, Siegert F. In vivo localization of a severin GFP- fusion protein in Dictyostelium amoebae during endocytosis, cell motility and development. *Cell Motil Cytoskel*. (eingereicht)

**CD-Supplement**

Ergänzend ist dieser Arbeit eine CD mit Animationssequenzen der hier gezeigten Messungen beigelegt, auf die hiermit verwiesen sei.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Oktober 1996 bis Dezember 1999 an der Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Biologie, Zoologisches Institut, unter der Anleitung von PD Dr. Florian Siegert angefertigt.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1. KONFOKALE MIKROSKOPIE UND BILDVERARBEITUNG	5
1.2. GRÜN FLUORESZIERENDES PROTEIN (GFP)	7
1.3. <i>Dictyostelium discoideum</i>	9
1.3.1. <i>Systematische Stellung</i>	10
1.3.2. <i>Lebensweise und Entwicklung</i>	11
1.4. ARTSPEZIFISCHE SORTIERUNG UND ENTWICKLUNG	15
1.5. DAS ZYTOSKELETT VON <i>D. DISCOIDEUM</i>	17
1.6. FRAGESTELLUNGEN	18
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
2.1. EXPERIMENTELLER TEIL	20
2.1.1. <i>Flüssige Medien</i>	20
2.1.2. <i>Platten</i>	21
2.1.3. <i>Verwendete GFP-Varianten</i>	22
2.1.4. <i>Verwendete Zellen</i>	23
2.1.5. <i>Zellkultur</i>	24
2.1.6. <i>Mikroskop-Systeme</i>	26
2.1.7. <i>Slug-Versuche</i>	27
2.1.8. <i>Artenmischexperimente</i>	28
2.1.9. <i>Severin-GFP Messungen</i>	29
2.2. BILDVERARBEITUNG UND AUSWERTUNG	31
2.2.1. <i>xyt-Sequenzen</i>	32
2.2.2. <i>Darstellung von 4D-Datensätzen</i>	33
2.2.3. <i>Zellverfolgung</i>	35
2.2.4. <i>Auswertungsroutinen</i>	36
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
3.1. SIMULTANE DETEKTION ZWEIER SPEKTRALER GFP-VARIANTEN	37
3.1.1. <i>Detektion in Konfokalmikroskopen mit Glasfiltern</i>	37
3.1.2. <i>Detektion in Konfokalmikroskopen mit spektraler Filtertechnik</i>	41
3.2. <i>IN VIVO</i> ZELLSORTIERUNG ZWEIER PRESTALK-ZELLPOPULATIONEN IN SLUGS	42
3.2.1. <i>Verteilung der GFP-Reporter in Slugs</i>	43
3.2.1.1. <i>S65T-GFP unter dem ecmA Promotor</i>	43
3.2.1.2. <i>W2/W7-GFP unter dem pst0 Promotor</i>	43
3.2.2. <i>Zurückfallen von Zellen aus dem Prestalk-Bereich</i>	44
3.2.3. <i>Bildung von neuen Spitzen</i>	47
3.2.3.1. <i>pstA-GFP-markierte Zellen</i>	47
3.2.3.2. <i>pst0-GFP-markierte Zellen</i>	50
3.2.3.3. <i>4D-Zellverfolgung einzelner pst0-GFP-Zellen</i>	53
3.2.3.4. <i>Dynamik der pst0-GFP Expression in Slugs</i>	57
3.2.4. <i>Mischungen von GFP-Varianten in Slugs</i>	58
3.2.4.1. <i>pstA-GFP- und pst0-GFP-Zellen während der Spitzenbildung</i>	58
3.2.4.2. <i>Labile und stabile GFP-Varianten</i>	58

3.3. ARTSPEZIFISCHE ZELLSORTIERUNG WÄHREND DER ENTWICKLUNG	59
3.3.1. <i>D. discoideum</i> und <i>D. mucoroides</i>	59
3.3.1.1. Beginn der Entwicklung	59
3.3.1.2. Aggregation	60
3.3.1.3. Mounds	65
3.3.1.4. Zusammenfassung	70
3.3.2. <i>D. discoideum</i> und <i>Polysphondylium pallidum/violaceum</i>	70
3.4. INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG EINES SEVERIN GFP-FUSIONSPROTEINS	73
3.4.1. GFP-Kontrolle und Ratio-Bilder Severin-GFP/TRITC-Dextran	73
3.4.2. Endozytose	75
3.4.2.1. Makropinozytose	75
3.4.2.2. Phagozytose	76
3.4.3. Zellbewegung	77
3.4.3.1. Ungerichtete Zellbewegung	77
3.4.3.2. Chemotaxis	79
3.4.3.3. Gerichtete Bewegung	82
3.4.4. Zell-Zell Kontakte	83
3.4.5. Zellen in Aggregationsströmen	84
3.4.6. Severin-GFP während der Zellteilung	87
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>89</b>
4.1. SIMULTANE DETEKTION VON GFP-VARIANTEN	89
4.2. <i>IN VIVO</i> ZELLSORTIERUNG ZWEIER PRESTALK-ZELLPOPULATIONEN IN SLUGS	90
4.2.1. Verteilung der GFP-Reporter in Slugs	90
4.2.2. Zurückfallen von Prestalk-Zellen in den Prespore-Bereich	91
4.2.3. Neubildung von Spitzen	92
4.2.4. Mischungen von GFP-Varianten in Slugs	96
4.3. ARTSPEZIFISCHE ZELLSORTIERUNG WÄHREND DER ENTWICKLUNG	97
4.3.1. <i>D. discoideum</i> und <i>D. mucoroides</i>	97
4.3.2. <i>D. discoideum</i> und <i>Polysphondylium pallidum/violaceum</i>	99
4.3.3. Mechanismen der artspezifischen Zellsortierung	100
4.3.4. Vergleich mit innerartlichen Sortierungsvorgängen	100
4.4. INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG EINES SEVERIN GFP-FUSIONSPROTEINS	102
4.4.1. Endozytose	103
4.4.2. Vegetative Zellen	103
4.4.3. Frühe Aggregation und Chemotaxis	104
4.4.4. Aggregationsströme	105
4.4.5. Severin-GFP während der Zellteilung	107
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>108</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>118</b>
<b>DANK</b>	<b>119</b>

## Zusammenfassung

Methoden der multidimensionalen konfokalen Mikroskopie wurden für die *in vivo* Beobachtung dynamischer Prozesse in der Amöbe *Dictyostelium discoideum* verwendet. Um diese Vorgänge sichtbar zu machen, wurde Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) als Reporter von Genexpression und als Fusionsprotein eingesetzt. Mit Hilfe von 4D-Mikroskopie und Mehrkanal-Detektion konnten dabei *in vivo* die Zellsortierung in vielzelligen Aggregaten und die intrazelluläre Lokalisierung des Zytoskelett-Proteins Severin visualisiert und analysiert werden.

Es wurde eine Methode entwickelt, spektral unterschiedliche GFP-Varianten im Konfokalmikroskop simultan zu detektieren und verlässlich zu trennen. Aufgrund der Anregungswellenlänge und der Verwendung nur eines Aufnahmevorgangs zur Erfassung beider GFP-Varianten eignet sich dieser Ansatz zur schonenden Beobachtung lebender Zellen auch über längere Zeiträume. Diese Eigenschaften ermöglichen darüber hinaus die Verwendung dieser Konfiguration bei den wiederholten Aufnahmen einer 4D-Messung.

In *D. discoideum*-Slugs wurde die Lokalisierung von Prestalk-Zellen (pstA- und pst0-Zellen) während der Migration und der Spitzenneubildung mit GFP als Reporter für spezifische Genexpression untersucht. In migrierenden Slugs fallen Prestalk-Zellen aus dem pstA-Bereich der Spitze in den Prespore-Bereich zurück. Dieses Zurückfallen in der zentralen Längsachse läßt sich durch die Organisation der Spitzenregion durch cAMP-Spiralwellen mit einem Zentrum in der Längsachse erklären. Prestalk-Zellen gelangen über diesen Weg aus der Spitze in den Prespore-Bereich. An der Neubildung von Spitzen im Prespore-Bereich sind ehemalige Prestalk-Zellen gemeinsam mit den Anterior-like-Zellen des Prespore-Bereichs maßgeblich beteiligt. Diese Zelltypen bewegen sich an die Slugoberseite und bilden dort rotierende Zentren, aus denen sich neue Spitzen bilden. Das Verhalten dieser Zellgruppen und die 4D-Trajektorien einzelner Zellen deuten auf eine Organisation dieser Zentren durch cAMP-Signale. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß es innerhalb dieser Zellen Gruppen gibt, die zu unterschiedlichen Zeiten in neue Spitzen rekrutiert werden. PstA-Zellen sind in neuen Spitzen wieder im vordersten Bereich lokalisiert, obwohl sie aus dem Prespore-Bereich kommen, während pst0-Zellen im gesamten Prestalk-Bereich zu finden sind.

Artspezifische Zellsortierungsprozesse gemeinsam vorkommender *Dictyostelium*-Arten wurden mittels der Markierung von Zellen der beteiligten Arten untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Sortierung von *D. discoideum*/*D. mucoroides*-Mischungen schon in den

Aggregationsströmen anfängt und im Mound abgeschlossen wird. Die Trennung erfolgt über Unterschiede in der Zelladhäsion. Erheblich beschleunigt wird dieser Sortierungsvorgang durch die gerichtete chemotaktische Bewegung beider Arten auf dieselben Signale, die bei den sich in den Zellströmen schneller bewegendenden *D. mucoroides*-Zellen zu einer Anreicherung im Moundzentrum führt. Somit sind *in vivo* zwei Faktoren gemeinsam für die artspezifische Sortierung von *D. discoideum* und *D. mucoroides* verantwortlich. In Mischungen von *D. discoideum* und *Polysphondylium spec.* geschieht die Aussortierung über die Nutzung unterschiedlicher Botenstoffe für die Chemotaxis, so daß die Arten getrennt aggregieren. Es konnte gezeigt werden, daß diese getrennte Aggregation sehr spezifisch ist und es dennoch zu einer Interaktion zwischen *D. discoideum* und fortgeschrittenen *Polysphondylium*-Aggregaten kommt, da in *Polysphondylium* in späten Aggregationsphasen cAMP für die interzelluläre Kommunikation verwendet wird. In dieser Phase wird von *Polysphondylium* sowohl cAMP als auch Glorin sekretiert.

Severin ist ein mit Gelsolin verwandtes 40 kDa Protein, das F-Aktin-Filamente fragmentiert und an das (+)-Ende des entstehenden Fragments bindet. Mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins wurde die intrazelluläre Lokalisierung dieses Proteins *in vivo* während einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten untersucht. Severin ist in den aktiven Bereichen des F-Aktin Zellkortex angereichert. Obwohl die Morphologie von *D. discoideum*-Zellen in den verschiedenen Phasen der Entwicklung sehr unterschiedlich ist, ist die Lokalisierung von Severin in allen Stadien primär von der Bildung neuer Zellfortsätze trennbar. Die Anreicherung von Severin ist hingegen mit der Bewegung der Zelle in diese neu gebildeten Fortsätze assoziiert. Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von cAMP-Signalen auf das Zytoskelett einzelner Zellen in Aggregationsströmen ausführlich dargestellt.



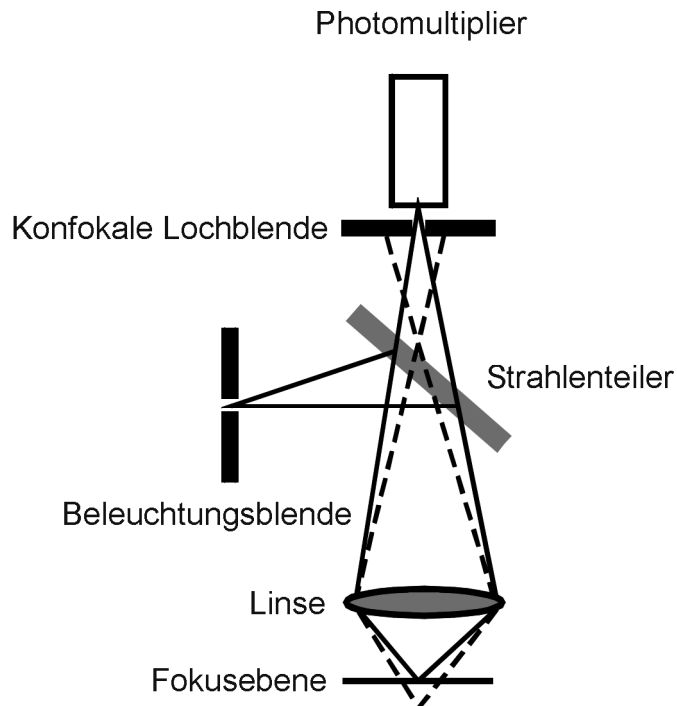
# 1. Einleitung

Innerhalb der Naturwissenschaften ist die Zellbiologie seit langem eines der innovativsten und produktivsten Gebiete. Dies liegt zu großen Teilen an dem immer breiter werdenden Spektrum neuer Methoden und Ansätze, die die Bearbeitung von bis dahin nicht zugänglichen Fragestellungen ermöglichen. Die Fähigkeit zur Manipulation zellulärer Eigenschaften auf der Ebene der Gene, z.B. durch Deletionen oder das Einbringen von Reportern für Genaktivität, erzeugt eine Vielfalt an Mutanten, die anhand ihrer Phänotypen Rückschlüsse auf komplexe Funktionszusammenhänge zulassen. Die Analyse zellulärer Funktionen kann auf vielfältige Weise stattfinden, biochemische und molekularbiologische Ansätze sind hierbei ein wichtiges Instrument. Die Dynamik lebendiger Prozesse erschließt sich *in vitro* jedoch nur unvollständig. In der letzten Zeit hat sich aus diesem Grund die *in vivo* Mikroskopie als eine wertvolle Ergänzung etabliert. Mit ihr können Abläufe in ihrer zeitlichen und, durch immer neue Entwicklungen in der multidimensionalen Mikroskopie, auch in ihrer räumlichen Komponente ausgewertet werden.

## 1.1. Konfokale Mikroskopie und Bildverarbeitung

Obwohl der erste Prototyp eines Konfokalmikroskops von Marvin Minsky schon in den 50er Jahren entwickelt wurde (Inoué, 1995; Lichtman, 1994), hat sich die konfokale Mikroskopie erst im letzten Jahrzehnt als Technik weit verbreitet. Das bis dahin in vielen Anwendungen schon ausgereizte Feld der Lichtmikroskopie wurde durch diese Entwicklung neu belebt und die Möglichkeit, hochauflösende, dreidimensionale Darstellungen von mikroskopischen Strukturen zu erzeugen, hat besonders im Bereich der Zellbiologie zu neuen Einsichten geführt.

Der Vorteil der Konfokalmikroskopie (für Einführungen in diese Technik sei auf Shotton (1993) und Inoué (1995) hingewiesen) gegenüber einem Mikroskop mit Weitfeldanregung liegt in der Fähigkeit, einen sehr engen Fokus in der z-Achse zu erzeugen und dabei die über- und unterhalb der Fokusebene liegenden Strukturen zu verwerfen. Dies geschieht durch ein Abrastern des Bildbereichs mit einer Punktlichtquelle, meistens einem Laser, und der Detektion der Information in diesem Punkt durch eine Lochblende, die Informationen über und unter der Fokusebene nicht zum Detektor durchläßt (Abb. 1). Auf diese Weise kann ein Objekt durch eine Serie von optischen Schnitten entlang der z-Achse als dreidimensionale

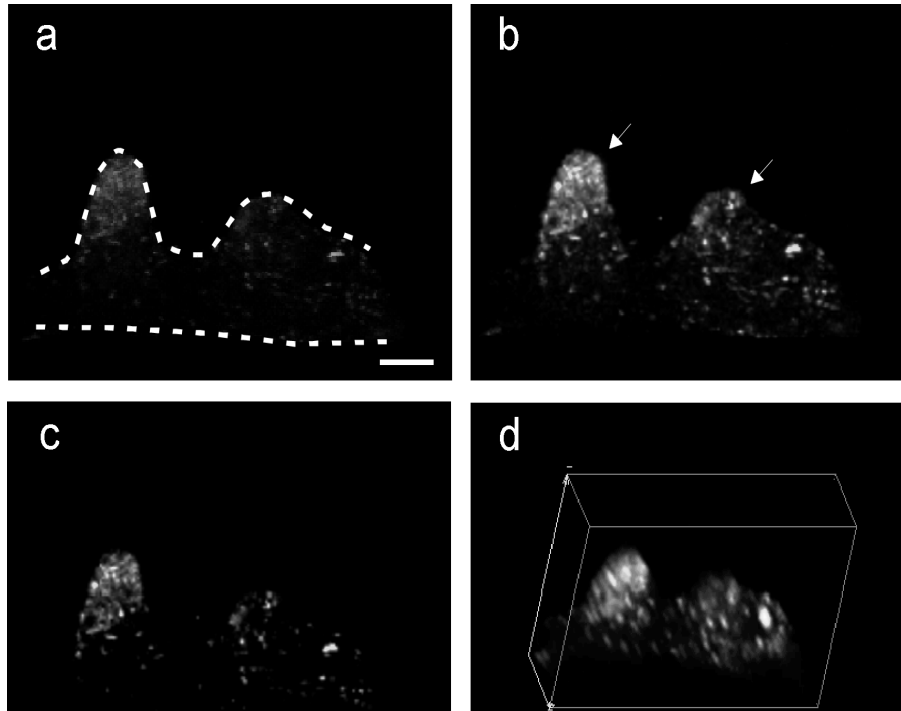


**Abb. 1)** Schematischer Aufbau eines Konfokalmikroskops (nach Sheppard, 1994).

Struktur erfaßt werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß die maximale Auflösung des Mikroskops durch die Punktabbildung mit einer Lochblende leicht erhöht wird, da ein Punkt mit diesem System um den Faktor 1.4 schärfer dargestellt wird (Sheppard, 1994).

Die mit einem Konfokalmikroskop erhaltenen Bildserien werden erst mit Hilfe von Computerbildverarbeitung darstell- und auswertbar (Chen et al., 1995; Van der Voort und Smeudlers, 1993; White, 1995). Dies ist wahrscheinlich ein Grund, warum diese Technik erst in den letzten Jahren eine weite Verbreitung gefunden hat. So kann z.B. der gesamte Bildstapel einer z-Serie als Projektionsbild in einer Ebene abgebildet werden. Hierfür gibt es verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Ergebnissen (Sheppard, 1994; Wilson, 1993). In Abb. 2 sind verschiedene Abbildungsmöglichkeiten dargestellt. Ebenso lassen sich räumlich gedrehte Ansichten eines Objekts berechnen. Eine Struktur kann mit einer die Bildtiefe repräsentierenden Farbkodierung oder als 3D-Bild dargestellt werden, um auch die dritte Dimension der Daten abzubilden (Boyde, 1993; White, 1995).

*In vivo* 4D-Mikroskopie ist die sequentielle Aufnahme von 3D-Bildstapeln in festgelegten Abschnitten (Abb. 3, Terasaki und Dailey, 1995). Auf diese Weise wird die Zeitachse den x-, y- und z-Achsen als vierte Dimension hinzugefügt und es können dreidimensionale Prozesse über die Zeit verfolgt werden. Dieselben Darstellungsformen, mit denen einzelne 3D-Bildstapel abgebildet werden können, können auch für 4D-Datensätze verwendet werden. 4D-

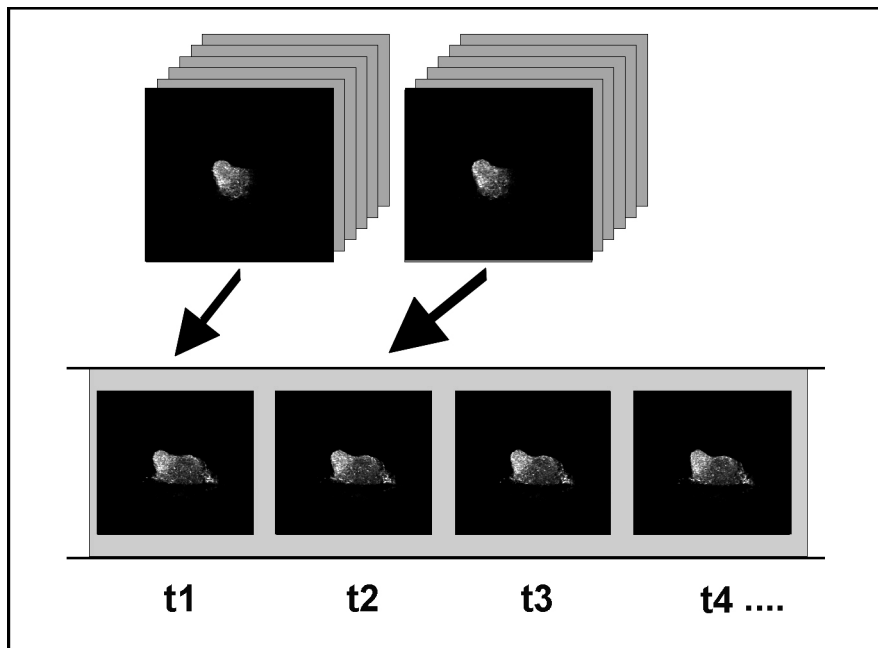


**Abb. 2)** Unterschiedliche Darstellungsmöglichkeiten desselben 3D-Datensatzes eines *Dictyostelium discoideum*-Slugs mit GFP-markierten pst0-Zellen. Maßstab: 100 $\mu$ m. a: Extended Focus Darstellung. Gestrichelte Linien: Umriß b: Projektion der Bildpunkte mit der maximalen Helligkeit. Pfeile: Neugebildete Spitzen c: Maximale Helligkeitsprojektion kombiniert mit einer leichten Tiefengewichtung entlang der z-Achse. d: Maximale Helligkeitsprojektion, der Datensatz ist um  $-36^\circ$  entlang der x-Achse und um  $20^\circ$  entlang der y-Achse gedreht.

Mikroskopie ist dabei noch abhängiger von Bildverarbeitung als 3D-Mikroskopie. Das Datenvolumen ist durch die höhere Zahl an Meßzeitpunkten um ein Vielfaches erhöht. In einem ersten Schritt wird die große Menge an Einzelbildern in zusammenhängende 3D-Bildstapel unterteilt, diese werden einheitlich weiterverarbeitet und dargestellt. In den in dieser Form unterteilten Datensätzen können dann, wie in anderen Zeitserien, Veränderungen, Geschwindigkeit und periodisches Verhalten untersucht werden.

## 1.2. Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)

Seit seiner Einführung als Werkzeug in der Zellbiologie (Chalfie et al., 1994) hat sich das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* als ein wertvoller Fluoreszenzmarker herausgestellt, der dazu benutzt werden kann, Genexpression nachzuweisen und intrazelluläre Lokalisierungen mit Hilfe von Fusionsproteinen zu visualisieren (Cubitt et al., 1995; Prasher, 1995). Der große Nutzen eines Markers, der in lebende Zellen eingebracht und dort exprimiert werden kann, führte auch zu Bestrebungen,



**Abb. 3)** Schematische Darstellung der 4D-Mikroskopie

die Eigenschaften von Wildtyp-GFP durch Mutationen zu verbessern, die zu veränderten spektralen Eigenschaften bzw. zu einer höheren Fluoreszenzintensität führen (Heim et al., 1994; Heim und Tsien, 1996). Unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors ist GFP ein wertvoller Reporter, um Interaktionen zwischen Genen und ihre Regulation zu untersuchen. Die Aktivität von Genen kann auf diese Weise in lebenden Zellen verfolgt werden. GFP-Reporterkonstrukte ermöglichen auch die Beobachtung dynamischer Prozesse wie gerichteter Zellbewegung während der Entwicklung mit sehr hoher Auflösung (Amsterdam et al., 1996; Hodgkinson, 1995; Plautz et al., 1996).

Wildtyp-GFP besitzt einige Nachteile, die durch die Schaffung von GFP-Mutanten beseitigt werden konnten (Cubitt et al., 1995; Delagrave et al., 1995). Das Anregungsmaximum von Wildtyp-GFP liegt bei 395 nm. Licht dieser Anregungswellenlänge führt jedoch zu Ausbleichung und zu lichtbedingten Schäden, die es für die Beobachtung von lebenden Zellen ungeeignet machen. Des weiteren benötigt Wildtyp-GFP mehr als drei Stunden, um durch Autooxidation fluoreszenzfähig zu werden (Heim et al., 1994), was seine Eignung zum Nachweis von spezifischer Genexpression mindert. Eine mutierte Form des GFP, die in den langwelligen Bereich verschobene Form S65T, hat demgegenüber mehrere Vorteile (Heim und Tsien, 1996): (I) das Absorptionsmaximum bei 489 nm verursacht weniger Ausbleichung und Schädigung; (II) es hat eine um das vierfache höhere Oxidationsrate und (III) das Anregungsmaximum ist sehr geeignet für die Anregung mit einem Argon bzw. Argon/Krypton Laser bei 488 nm. Heim und Tsien (1996) haben weitere GFP-Mutanten mit

im Vergleich zum Wildtyp-GFP langwelligerer Anregung und kurzwelligeren Emissionswellenlängen hergestellt. Mit diesen GFP-Mutanten können in einem einzelnen Präparat bis zu drei GFP-Formen unterschieden werden, sowohl frei im Zytosol vorliegende, als auch Fusionsproteine.

Die bisher für die Detektion verschiedener GFP-Varianten beschriebenen Methoden ermöglichen zwar die Untersuchung von Interaktionen in Zellverbänden und innerhalb einzelner Zellen, sie weisen jedoch auch zwei Nachteile auf. Die separate Detektion spektral unterscheidbarer GFP-Varianten geschieht durch den Wechsel von Filtern, eine simultane Detektion ist dadurch nicht möglich (Yang et al., 1996). Wird dieser Ansatz in der 3D-Mikroskopie verwendet, so muß jeder GFP-Kanal separat aufgenommen werden, was die Beobachtung von schnellen Prozessen beschränkt und dazu führen kann, daß die Lokalisierungen der verschiedenen GFP-Varianten zeitlich gegeneinander verschoben sind. Darüber hinaus erzeugen zwei separate Bildaufnahmen mehr Schädigung durch das Anregungslicht, was bei der Beobachtung lebender Zellen beachtet werden muß. Die simultane Erfassung einer GFP-Mutante mit einem ins Blaue verschobenen Emissionspeak und von Wildtyp-GFP ist mit UV-Anregung möglich (Rizzuto et al., 1996). Die spektral getrennten Emissionsmaxima erlauben eine simultane Detektion, aber die UV-Anregung führt zu Photo-Isomerisierung, Lichtschäden und einem hohen Hintergrundsignal (Cubitt et al., 1995; Rizzuto et al., 1996), da UV-Anregung in vielen Präparaten Autofluoreszenz erzeugt. Die Nachteile dieser GFP-Varianten zeigen sich noch deutlicher in der Beobachtung dreidimensionaler Prozesse über die Zeit in lebenden Organismen. Zwei-Photonen Anregung (die Anregung eines kurzwelligeren Fluorochroms durch zwei Photonen mit höherer Wellenlänge) kann dazu benutzt werden, einige der durch die hochenergetische UV-Anregung entstehenden Nachteile abzuschwächen oder sogar völlig zu umgehen (Denk et al., 1995), die dafür nötige Technologie ist aber in biologischen Laboratorien noch nicht genug verbreitet. Mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, mit der simultan zwei GFP-Mutanten mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften unterschieden werden können, ohne daß dafür UV-Anregung nötig ist.

### **1.3. *Dictyostelium discoideum***

Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* hat sich als ein für eine Vielzahl von biologischen Fragestellungen geeignetes Modellsystem etabliert, da sie Überschaubarkeit und

Komplexität vorteilhaft verbindet. Als sehr mobiler Einzeller kann *Dictyostelium* zur Untersuchung von Aspekten der Zellbewegung und des Zytoskeletts verwendet werden (Eichinger et al., 1999, Noegel und Schleicher, 2000), die Rückschlüsse auf die Vorgänge in sich ähnlich bewegendenden Zellen höherer Organismen zulassen. Das Verhalten von *D. discoideum* wird durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst. Die Fähigkeit zur Wahrnehmung dieser Parameter wird in Untersuchungen z.B. der Chemo- (van Haastert, 1997) und der Phototaxis (Miura und Siegert, 2000) genutzt. Während der komplexen vielzelligen Entwicklung finden Differenzierungsvorgänge und morphogenetische Prozesse statt, die zum allgemeinen Verständnis dieser Vorgänge beitragen können (Early, 1999; Weijer, 1999). Die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation über weite Distanzen und die dadurch zustande kommende spatio-temporale Musterbildung (Bretschneider et al., 1997; Siegert und Weijer, 1997) ist ein weiteres Untersuchungsgebiet, das diesen Organismus für die Wissenschaft interessant macht. *D. discoideum* ist im Labor leicht kultivierbar und ist aufgrund seines haploiden Genoms ein Untersuchungsobjekt, in dem mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden leicht Gene ausgeschaltet bzw. eingefügt werden können.

Die neuen Methoden der Computermikroskopie und Bildverarbeitung und die molekularbiologischen GFP-Techniken können bei der Untersuchung von *D. discoideum* miteinander kombiniert werden, um ein besseres Verständnis sowohl von interzellulären Wechselwirkungen, als auch von intrazellulären Abläufen auf der Ebene des Zytoskeletts zu gewinnen.

### **1.3.1. Systematische Stellung**

Die genaue systematische Stellung der *Dictyostelium*-Arten ist schwer festzulegen. Olive (Olive, 1975) ordnet sie den Protisten (Klasse Eumycetozoa) zu. Nach Raper (Raper, 1984) gehört *D. discoideum* mit ca. 50 weiteren Arten hingegen zur Unterklasse der Dictyostelidae, die zu der Klasse der Acrasiomyceten in den Myxomycota zugeordnet werden und in das Reich der Fungi gehören. Diese Einteilungen sind inzwischen von neueren Untersuchungen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in Frage gestellt worden, so daß es nicht mehr haltbar ist, *Dictyostelium* den Pilzen zuzuordnen (Kessin, 1997). Auch mit diesen Ansätzen ist die genaue verwandtschaftliche Stellung zu den Gruppen der Pflanzen, Pilze und Tiere nicht eindeutig festlegbar, und je nach verwendeter Methode steht *D. discoideum* entweder außerhalb der Spitzengruppe der Vielzeller, hat sich erst nach den Pflanzen von den Tieren

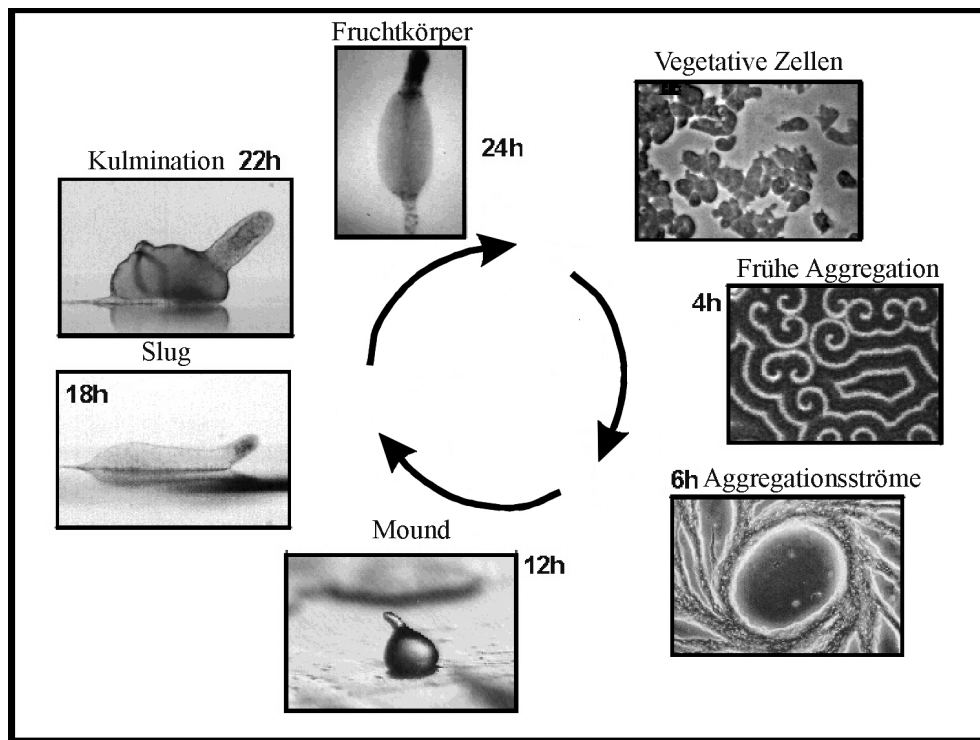


Abb. 4) Der Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (nach Siegert, verändert)

und Pilzen getrennt, oder steht den Tieren näher als die Pilze (Baldauf und Doolittle, 1997; Kessin, 1997).

### 1.3.2. Lebensweise und Entwicklung

*D. discoideum* ist ein im Boden lebender Einzeller, der sich phagozytotisch von Bakterien ernährt und sich vegetativ durch Zellteilung fortpflanzt. Er unterscheidet sich jedoch von anderen Einzellern durch einen komplexen Entwicklungszyklus mit vielzelligen Stadien, der durch Nahrungsmangel ausgelöst wird. Im Verlauf der Entwicklung differenzieren die Zellen in unterschiedliche Zelltypen und bilden einen Fruchtkörper mit Sporen. Während von anderen Einzellern gebildete Dauerformen vor Ort liegen bleiben und von einer lokalen Verbesserung der Umweltbedingungen abhängig sind, erhöht die Bildung eines vielzelligen in die Höhe wachsenden Fruchtkörpers die Chancen der Verbreitung der Sporen in entfernt liegende Gebiete mit besseren Lebensbedingungen.

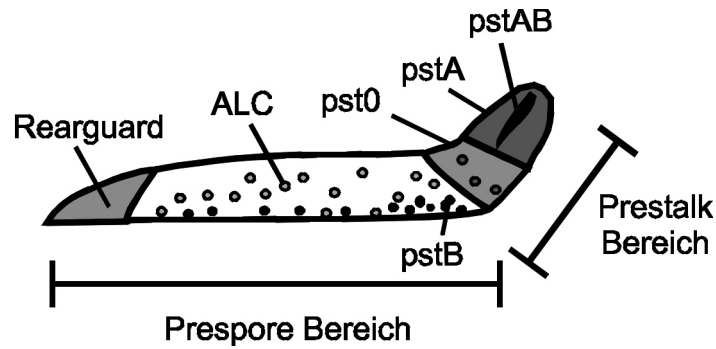
In Abb. 4 ist der Entwicklungszyklus von *D. discoideum* dargestellt. Das Erschöpfen der Nahrungsquelle beendet die vegetative Phase der Zellen und initiiert ein einzigartiges Entwicklungsprogramm. Innerhalb weniger Stunden beginnen sich aus den einzelnen Zellen vielzellige Aggregate zu bilden. Hierbei bilden sich in großen Aggregationsfeldern mit Hilfe

eines chemotaktischen Botenstoffs Zentren, in denen sich die Zellen zu Tausenden sammeln. Bei dem Botenstoff handelt es sich um extrazelluläres zyklisches Adenosin 3'5'-Monophosphat (cAMP, Konijn et al., 1968; Konijn et al., 1967) und die Zellen verhalten sich wie ein exzitierbares Medium (Palsson und Cox, 1997). Bei Stimulation mit cAMP sekretieren Zellen selbst cAMP, so daß es zu einer Signalweiterleitung und -verstärkung kommt. Eine an die Stimulation anschließende Refraktärperiode führt dazu, daß cAMP-Signale in *Dictyostelium*-Aggregationsfeldern oszillierend verbreitet werden und es zu periodischem Verhalten der aggregierenden Zellen kommt. Hierbei bilden sich in den Aggregationsfeldern geregelte Muster in Form von konzentrischen Ringen und Spiralwellen, die bei niedriger Auflösung im Mikroskop sichtbar gemacht werden können (Alcantara und Monk, 1974; Gross et al., 1976; Siegert und Weijer, 1989). Liegen die Amöben in den Aggregationsfeldern anfangs noch als Einzelzellen vor, so bilden sich mit fortschreitender Entwicklung vielzellige, zu den Zentren ziehende Zellströme, die immer kompakter werden.

Aus den in Strömen in das Zentrum wandernden Zellen entstehen kompakte Zellhaufen („mounds“), in denen sich die bis dahin identischen Zellen in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren beginnen, die in der weiteren Entwicklung zum Fruchtkörper unterschiedliche Rollen und Schicksale haben. Im Mound teilen sich die Zellen in eine Population auf, die das verbreitbare Dauerstadium, die Sporen, bilden wird und in eine zweite Population, aus der der Stiel des Fruchtkörpers entstehen wird. Bei den Zellen handelt es sich um Vorläufer der Zelltypen des Fruchtkörpers, weswegen die Zellen als „prespore“- und „prestalk“-Zellen bezeichnet werden. In der weiteren Entwicklung kommt es im Mound zu einer zelltypspezifischen Sortierung, bei der die Prestalk-Zellen sich in einer auf dem Mound gebildeten Spitze sammeln (Early et al., 1995). Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß offenbar auch das Mound-Stadium durch periodische cAMP Wellen organisiert wird (Rietdorf et al., 1996; Siegert und Weijer, 1995). Es gibt jedoch auch abweichende Modelle, die eine Rolle für cAMP-Oszillationen nur in der frühen Aggregation postulieren und die im Mound stattfindende Zellsortierung über differentielle Zelladhäsion erklären (Nicol et al., 1999).

Die im Mound stattfindenden morphogenetischen Zellbewegungen führen je nach Umweltbedingungen entweder direkt zur Bildung eines Fruchtkörpers oder es wird ein vielzelliges Migrationsstadium gebildet („slug“), das aus bis zu  $10^5$  Zellen bestehen kann. Slugs besitzen eine deutlich erkennbare Verteilung von Zelltypen entlang der anterioposterioren Längsachse. Am vorderen Ende befindet sich eine Spitze, die die Bewegung der Zellen im Slug kontrolliert und die Bewegungsrichtung des Slugs festlegt. Sie

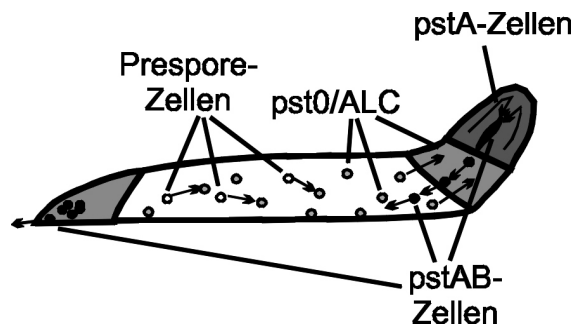




**Abb. 5)** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bereiche eines Slugs (nach Williams, 1997).

stellt somit ein Organisationszentrum dar. Slugs sind photo- und thermotaktisch, auch diese Eigenschaften werden von der Spitze kontrolliert (Fisher, 1997). In den vorderen 20% des Slugs befinden sich die Prestalk-Zellen, während die hinteren 80% aus den Prespore-Zellen bestehen. Die Zellen im Prestalk-Bereich können anhand ihrer Eigenschaften noch weiter unterteilt werden (Jermyn et al., 1989). Im vordersten Bereich der Spitze befinden sich Zellen, bei denen die Expression eines extrazellulären Matrixproteins (ecmA) von einem anderen Element in der Promotor-Region reguliert wird als bei den dahinter befindlichen Prestalk-Zellen (Early et al., 1993). Die vordere Population wird als pstA-Zellen, die dahinter liegende als pst0-Zellen bezeichnet. Es wurde gezeigt, daß pstA-Zellen empfindlicher auf cAMP reagieren als pst0-Zellen (Early et al., 1995) und es wird angenommen daß dieser Unterschied dazu beiträgt, daß diese Zellen in der Spitze lokalisiert sind (Williams, 1997). Im Inneren des vorderen Spitzenbereichs befindet sich eine Gruppe von Zellen, die zu ecmA ein weiteres extrazelluläres Matrixprotein (ecmB) exprimiert. Diese Zellen wurden anfangs als pstB-Zellen bezeichnet (Jermyn et al., 1989; Sternfeld, 1992), inzwischen jedoch als pstAB-Zellen (Gaskell et al., 1992). Zellen dieser Population wandern im Slug nach hinten und werden in die Schleimspur abgegeben (Sternfeld, 1992). Die Färbung mit Vitalfarbstoffen zeigt, daß im Prespore-Bereich ca. 10% der Zellen ähnliche Eigenschaften wie Prestalk-Zellen besitzen. Diese werden als Anterior-like-Zellen (ALCs) bezeichnet (Sternfeld und David, 1981; Sternfeld und David, 1982). In einem großen Teil von ihnen findet die ecmA Expression über das gleiche Element des Promotors statt wie bei pst0-Zellen (Early et al., 1993). Als weitere Gruppe liegen im Prespore-Bereich pstB-Zellen vor, die eine wichtige Funktion bei der Bildung des Fruchtkörpers haben (Jermyn et al., 1996). Abb. 5 zeigt die Verteilung der verschiedenen Zelltypen im Slug.

Das Mengenverhältnis von Prestalk- zu Prespore-Zellen ist in Slugs genau geregelt (Mohanty und Firtel, 1999, Kay, 1997) und wird auch nach Störungen, z.B. durch Entfernung des



**Abb. 6)** Möglicher Differenzierungsweg von Zellen innerhalb eines Slugs (nach Abe et al., 1994).

Prestalk-Bereichs, schnell neu eingestellt. Dies geschieht durch Umdifferenzierung der noch vorhandenen Zellen (Raper, 1940). Genauere Untersuchungen der verschiedenen im Slug vorkommenden Zelltypen haben gezeigt, daß sich aus Prespore-Zellen ALCs, aus ALCs pst0-Zellen und aus pst0-Zellen pstA-Zellen bilden können (Abe et al., 1994). Die Differenzierung kann auch in der anderen Richtung ablaufen, wenn zuwenig Prespore-Zellen vorhanden sind. Da aus migrierenden Slugs pstAB-Zellen in die Schleimspur verloren gehen (Sternfeld, 1992), die durch pstA-Zellen ersetzt werden, müssen diese Zelltypen kontinuierlich aus den anderen Zellen nachgebildet werden, um ein konstantes Zelltypverhältnis aufrechtzuerhalten. In Slugs kommt es deswegen zu der in Abb. 6 gezeigten Differenzierungsreihenfolge.

Slugs sind in der Lage, verschiedene Umweltbedingungen zu detektieren und sich dementsprechend an eine für die Bildung des Fruchtkörpers geeignete Stelle zu bewegen (Fisher, 1997). Dort kommt es dann zur Kulmination, wobei sich aus den Prestalk-Zellen nun der Stiel des Fruchtkörpers bildet und die Prespore-Zellen am Stiel in die Höhe wandern und zu Sporen werden. Die Stielzellen sterben bei diesem Prozeß ab. Auch diese Phase der Entwicklung ist ein durch sehr komplexe morphogenetische Bewegungen der einzelnen Zelltypen gekennzeichneter Vorgang (Dormann et al., 1996; Jermyn et al., 1996).

Der Verlauf der vielzelligen Entwicklung ist für verschiedene *Dictyostelium*-Spezies unterschiedlich. Es ist hierbei ein für Untersuchungen der Interaktion zwischen Zellen interessanter Aspekt, daß im selben Gebiet vorkommende *Dictyostelium*-Arten in der Lage sind, separate vielzellige Aggregate zu bilden.

#### 1.4. Artspezifische Sortierung und Entwicklung

Obwohl verschiedene Spezies von Acrasiomyceten in ihrer natürlichen Umgebung gemeinsam vorkommen (Bonner, 1983) zeigt es sich, daß es mit Einsetzen der Entwicklung zu einer eindeutigen Trennung der Spezies und zur Bildung von, nur aus Zellen einer Art bestehenden, Fruchtkörpern kommt. Hierfür sind zwei abhängig von den beteiligten Arten unterschiedliche Trennungsmechanismen beschrieben worden. Mischungen verschiedener *Dictyostelium*-Spezies (*D. discoideum*/*D. mucoroides*/*D. purpureum*) bilden gemeinsame Mounds, aus denen sich dann in einem zweiten Schritt artspezifische Slugs bzw. Fruchtkörper bilden (Raper und Thom, 1941). Mischungen von *D. discoideum*, *D. mucoroides* oder *D. purpureum* mit *Polysphondylium violaceum* (Bonner, 1983; Raper und Thom, 1941) bzw. *P. pallidum* (Gerlich, 1997) bilden hingegen unbeeinflusst voneinander separate Mounds mit sich teilweise überkreuzenden Aggregationsströmen.

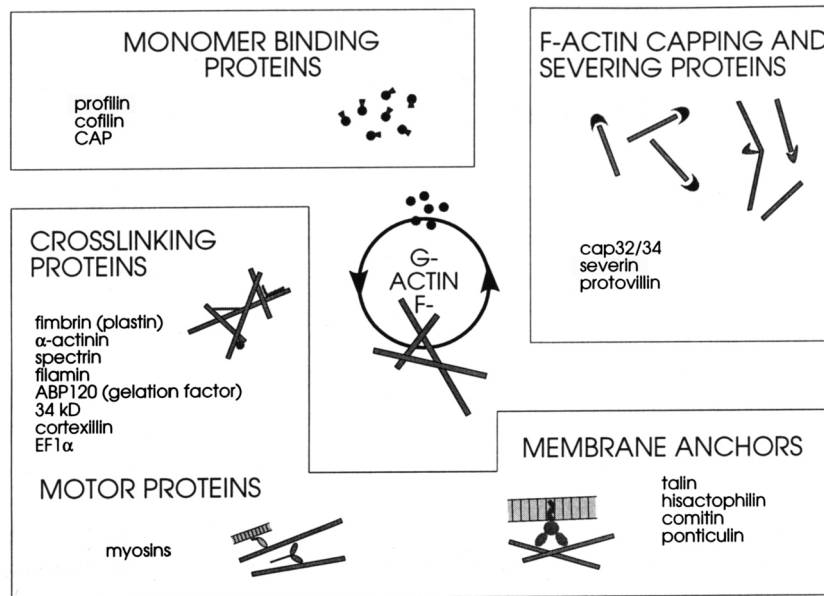
Damit lassen sich zwei unterschiedliche Strategien zur artspezifischen Zellsortierung erkennen:

- Die anfänglich gemeinsame Aggregation von *D. discoideum* und *D. mucoroides* läßt auf große Ähnlichkeiten in den Aggregationssystemen beider Arten schließen, die Artentrennung erfolgt in einem zweiten Schritt erst im Stadium der Vielzelligkeit. Beide Arten benutzen cAMP als Signalmolekül (Konijn et al., 1968; Konijn et al., 1967) und zeigen ein ähnliches Aggregationsverhalten (Schaap und Wang, 1984). Entsprechend der für embryonales Gewebe entwickelten differentiellen Zelladhäsionshypothese (Steinberg, 1970) wurden Unterschiede in den Zelladhäsionseigenschaften der Arten untersucht und gezeigt, daß durch sie eine Sortierung stattfinden kann (bedingt bei Nicol und Garrod, 1978; deutlicher bei Sternfeld, 1979). Auch gibt es offensichtlich artspezifische Adhäsionsmoleküle, die zu einer Sortierung führen (Bozzaro und Ponte, 1995; McDonough et al., 1980, Springer und Barondes, 1978).
- Für die frühe artspezifische Sortierung von *Dictyostelium*- und *Polysphondylium*-Spezies sind unterschiedliche chemotaktische Aggregationssysteme dieser Arten verantwortlich. Während *D. discoideum* extrazelluläres cAMP als Chemoattraktant benutzt, sind die frühen Aggregationsstadien bei *Polysphondylium violaceum* durch das Dipeptid Glorin als Botenstoff organisiert (Shimomura et al., 1982). Auch *P. pallidum* reagiert chemotaktisch auf Glorin (Shimomura et al., 1982; Wurster et al., 1976; Gerlich, 1997), wobei die genaue chemische Zusammensetzung des *P. pallidum*-Signalmoleküls noch nicht geklärt ist und es auch einen Hinweis auf Unterschiede in den Aggregationssystemen von

*P. violaceum* und *P. pallidum* gibt (Hagiwara, 1992). Innerhalb der Unterklasse der Dictyostelidae sind außer cAMP und Glorin weitere in der Aggregation verwendete Signalmoleküle nachgewiesen und untersucht worden, darunter ein Folsäure-Derivat für *D. minutum* (de Wit und Konijn, 1983) und ein Pterin-Derivat für *D. lacteum* (van Haastert et al., 1982). Auf der Basis von Artenmischexperimenten werden noch weitere Botenstoffe für andere *Dictyostelium*-Arten vermutet (Konijn, 1975).

Anders als unter Laborbedingungen mit isolierten Stämmen ist die artspezifische Sortierung eine für die vielzellige Entwicklung von *Dictyostelium* in natürlicher Umgebung essentielle Eigenschaft, die aufgrund des gemeinsamen Vorkommens vieler Arten zu spezialisierten Lösungen geführt hat. Dieses aktive Aussortieren nah verwandter Arten ist ein interessantes Modell, um allgemeine Aufschlüsse über die an der Zellsortierung und Fremderkennung beteiligten Mechanismen zu gewinnen, die auch in der Embryonalentwicklung vielzelliger Organismen eine wichtige Rolle spielen.

Die frühen Beobachtungen des Verhaltens von Artenmischungen (Raper und Thom, 1941) sind eher deskriptiv und sagen nicht allzu viel über die daran beteiligten Mechanismen aus, auch wenn die verschiedenen Formen der Sortierung klar gezeigt wurden. Bisher durchgeführte quantifizierende Untersuchungen zur Zellsortierung benutzten Zellaggregate in geschüttelten Suspensionen (Bozzaro und Gerisch, 1978; Bozzaro und Ponte, 1995; Gerisch et al., 1980; Nicol und Garrod, 1978; Sternfeld, 1979). Die mit diesem Ansatz gewonnenen Ergebnisse legen eine Rolle der differentiellen Zelladhäsion nahe, auch wenn chemotaktische Interaktionen nicht ausgeschlossen werden können (Barondes et al., 1982; Nicol und Garrod, 1978). Es ist jedoch fraglich, ob bei diesen in-vitro Beobachtungen alle bei der Aggregation auf einem festen Substrat wirkenden Faktoren einbezogen werden. Nur in einer Untersuchung wurde die Segregation auf Substrat beobachtet, jedoch über die Beteiligung der Adhäsion hinaus nicht weiter analysiert (Springer und Barondes, 1978). Moderne Methoden der *in vivo* Mikroskopie und Bildverarbeitung wurden bisher nicht auf die Fragestellung der Zellsortierung in Artmischungen angewendet. Mit Hilfe von konfokaler *in vivo* Mehrkanalmikroskopie ist es nun möglich, in derselben Messung einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen der verschiedenen Spezies getrennt zu verfolgen und gleichzeitig das Gesamtverhalten der vielzelligen Aggregate darzustellen. Um beide beschriebene Formen artspezifischer Sortierung genauer analysieren zu können wurden auf diese Weise Mischungen von *D. discoideum* mit *D. mucoroides* bzw. mit *P. pallidum* untersucht.



**Abb. 7)** Überblick einiger der mit dem Aktin-Zytoskelett von *D. discoideum* assoziierten Proteine und ihrer Funktionen (aus Noegel et al., 1997).

### 1.5. Das Zytoskelett von *D. discoideum*

Unter dem Mikroskop erscheint eine einzelne *Dictyostelium*-Zelle nur auf den ersten Blick bewegungslos. Das Zytoskelett einer Zelle ist ein sich fortwährend veränderndes dynamisches System, das neue Ausstülpungen formt, andere zurückzieht und die Form der Zelle ändert. Es besteht aus den Mikrotubuli und dem Aktin-Zytoskelett. Beide Komponenten übernehmen in der Zelle wichtige Funktionen und sie sind in ihren Funktionen, z.B. bei der Endozytose (Aubry et al., 1997), eng miteinander vernetzt. Hier soll jedoch nur eine kurze Einführung in das Aktin-Zytoskelett gegeben werden. Eine Übersicht ist in Noegel et al. (1997) gegeben. Die Vielfalt der zellulären Aktivitäten, an denen Aktin beteiligt ist, bedarf der Interaktion zwischen vielen Aktin-assoziierten Proteinen mit spezifischen Funktionen, die die Bindung von Aktin-Monomeren, die Quervernetzung und Fragmentierung von F-Aktin, Bindung an freie Enden, Membranverankerung und Motorfunktionen einschließen.

In Abb. 7 ist eine Übersicht einiger in *D. discoideum* vorhandener Aktin-assoziiierter Proteine und ihrer Funktionen gegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Zytoskelett-Protein Severin untersucht. Severin ist ein 40 kDa großes F-Aktin fragmentierendes Protein, das in *D. discoideum* vorkommt. Bei Aktivierung durch mikromolare Erhöhungen der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration bindet es an Aktin-

Filamente, spaltet sie und deckt darauf das neu entstandene (+)-Ende des Filaments ab (Brown et al., 1982; Giffard et al., 1984). Severin gehört zu einer Familie von Proteinen, die mit dem menschlichen Gelsolin (Kwiatkowski, 1999) verwandt sind und in vielen Organismen gefunden werden können. Seine *in vitro* Eigenschaften sind genau untersucht (Brown et al., 1982; Giffard et al., 1984; Yamamoto et al., 1982) und es wurde gezeigt, daß Severin ausgeprägte F-Aktin-Fragmentierungseigenschaften besitzt. In einer immunohistochemischen Untersuchung wurde gezeigt, daß Severin im Endoplasma und im Zellkortex vorkommt (Brock und Pardee, 1988). Seine Lokalisierung deutet auf eine mögliche Rolle in der Restrukturierung des F-Aktin Zytoskeletts, die zu den biochemischen Eigenschaften des Proteins passen würde. Zellen ohne Severin zeigen keine besonders großen Unterschiede zum Wildtyp (André et al., 1989), ein Befund, der auch bei anderen Zytoskelett-Proteinen mit ausgeprägten *in vitro* Eigenschaften beobachtet wurde (Rivero et al., 1996a; Schleicher et al., 1988) und auf eine teilweise funktionelle Redundanz von Zytoskelett-Proteinen deutet (Witke et al., 1992). Das Ziel der Untersuchung ist es, die *in vivo* Verteilung von Severin in *D. discoideum* mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins zu charakterisieren, um Einsichten in die Dynamik von Aktin fragmentierenden Proteinen während unterschiedlicher zellulärer Prozesse zu gewinnen. Die Beobachtung GFP-markierter Proteine in lebenden Zellen während zellulärer Prozesse wie Pseudopodienbildung mit Hilfe von Zeitserienaufnahmen ergänzt die „Standbilder“, die durch die Färbung fixierter Zellen gewonnen wurden und erlaubt dadurch neue Einsichten in die Funktion des Zytoskeletts. Durch die *in vivo* Untersuchung von Severin kann die Verteilung eines Aktin fragmentierenden Proteins in ein- und vor allem auch in vielzelligen Stadien zu den schon existierenden Untersuchungen von Zytoskelett-Proteinen beigetragen werden.

## 1.6. Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden der konfokalen 4D-Mikroskopie und Bildverarbeitung zu etablieren, mit dem Einsatz von GFP-Konstrukten zu verbinden und in *Dictyostelium* zur *in vivo* Beobachtung von Prozessen auf inter- sowie auf intrazellulärer Ebene zu verwenden.

In einem ersten Schritt sollte hierfür eine Methode entwickelt werden, die die simultane Detektion mehrerer Fluoreszenzkanäle im Konfokalmikroskop mit der Verwendung spektral veränderter GFP-Varianten kombiniert. Mit diesem Ansatz sollte das Verhalten verschiedener spezifisch markierter Zelltypen gleichzeitig *in vivo* verfolgt werden können. Es war dabei

wichtig, eine Konfiguration zu finden, die lebende Zellen während der Beobachtung nicht schädigt und die in der Lage ist, GFP-Varianten auch bei schnellen Vorgängen verlässlich in ihrer Position zueinander zu lokalisieren. Diese Faktoren waren von Bedeutung, um die Methode auch in der 4D-Mikroskopie zur Anwendung bringen zu können.

Die Mehrkanal-Detektion von GFP-Varianten und 4D-Mikroskopie sollten in einem zweiten Schritt zur Analyse der Zellsortierung in den vielzelligen Stadien der *Dictyostelium*-Entwicklung verwendet werden. Mit Hilfe der *in vivo* Mikroskopie sollten dabei die vielfältigen, mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden erhaltenen Befunde durch die Beobachtung der Sortierungsvorgänge im lebenden Objekt ergänzt und erweitert werden.

Hierfür wurde das Verhalten zweier Typen von Prestalk-Zellen, pstA- und pst0-Zellen, in migrierenden Slugs und während der Neubildung von Spitzen im Prespore-Bereich untersucht. Zur spezifischen Markierung dieser Zelltypen wurden in dieser Arbeitsgruppe vorhandene GFP-Reporterkonstrukte mit unterschiedlichen GFP-Varianten verwendet. Als zweites Beispiel für komplexe Zellsortierungsvorgänge wurde das Verhalten verschiedener *Dictyostelium*-Arten während der gemeinsamen Entwicklung mit Hilfe artspezifisch markierter Zellen untersucht.

Zellsortierung erfolgt über gerichtete Zellbewegung. Somit spielt das Aktin-Zytoskelett bei diesem Vorgang eine essentielle Rolle. Zum besseren Verständnis der Abläufe im Zytoskelett von *D. discoideum* sollte die Lokalisierung eines Aktin-assoziierten Proteins, Severin, mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins *in vivo* analysiert werden. Die bei der Untersuchung ganzer Zellaggregate verwendeten Mikroskopie-Methoden wurden dabei auch auf intrazellulärer Ebene eingesetzt. Zellen wurden während unterschiedlicher Aktivitäten und in verschiedenen Phasen des Entwicklungszyklus beobachtet. Hierbei sollten die erweiterten Möglichkeiten der 4D-Mikroskopie vor allem bei der Untersuchung einzelner Zellen in vielzelligen Aggregaten eingebracht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Experimenteller Teil

Sterile Medien für die Zellkultur wurden bei 120°C autoklaviert.

#### 2.1.1. Flüssige Medien

##### HL5-Medium:

1,43% Bacto Pepton (Oxoid)  
0,715% Hefeextrakt (Oxoid)  
1,7% Glucose  
0,065% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,048% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in Wasser (deionisiert, Millipore)

##### KK<sub>2</sub>-Puffer:

10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
eingestellt auf pH 6,8

##### Elektroporationspuffer mit TRITC-Dextran:

50 mM Saccharose  
10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
eingestellt auf pH 6,1  
+ 2,5 mg/ml TRITC-Dextran (Sigma)



## 2.1.2. Platten

### SB-Agarplatten (Sussman Broth) (für *D. discoideum* und *D. mucoroides*):

0,5 % Bacto Pepton (Difco)  
0,05% Bacto Hefeextrakt (Difco)  
1,5% Agar (Difco)  
0,5% Glucose  
0,23%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,13%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
in Wasser (deionisiert, Millipore)

### GYP-Agarplatten (für *Polysphondylium spec.*):

0,1% D-Glucose, wasserfrei (Merck)  
0,2% Bacto Pepton (Oxoid)  
0,42%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,51%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,025% Bacto Hefeextrakt (Oxoid)  
2,5% Agar (Difco)  
in Wasser (deionisiert, Millipore)

### KK<sub>2</sub>-Agarplatten:

1% Agar (Difco) in KK<sub>2</sub>-Puffer  
Petrischale (9 cm): 10 ml  
Petrischale (6 cm): 5 ml

### Wasser-Agarplatten:

1% Agar (Difco) in Wasser (deionisiert, Millipore)  
Petrischale (9 cm): 10 ml  
Petrischale (6 cm): 5 ml

### Koffein-Agarplatten:

1% Agar (Difco) in Wasser (deionisiert, Millipore)

Zu 45 ml Wasseragar wurden nach Erhitzung 5 ml aus einer 50 mM Koffein-Stammlösung (Koffein: Serva) zugegeben => 5 mM Koffein-Agar.

Petrischale (9 cm): 10 ml

Petrischale (6 cm): 5 ml

### **2.1.3. Verwendete GFP-Varianten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei GFP-Varianten mit im Vergleich zum Wildtyp-GFP veränderten spektralen Eigenschaften verwendet, S65T (Heim et al., 1995), W2 und W7 (Heim und Tsien, 1996).

**Tabelle 1)** Exzitations und Emissionseigenschaften der GFP-Varianten W2, W7 und S65T (nach Heim und Tsien, 1996)

Clone	Mutations	Excitation max (nm)	Emission max (nm)	Extinction coefficient (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Quantum yield
W2	Y66W I123V Y145H H148R M153T V163A N212K	432 (453)	480	10 000 (9 600)	0.72
W7	Y66W N146I M153T V163A N212K	433 (453)	475 (501)	18 000 (17 100)	0.67
S65T	S65T	489	511	39 200	0.66

Bei den GFP-Varianten W2 und W7 handelt es sich um eine Gabe von Roger Tsien (San Diego).

#### 2.1.4. Verwendete Zellen

- Axenischer *D. discoideum* Wildtyp-Stamm AX2 (Ashworth und Watts, 1970)

##### Simultane Detektion von GFP-Varianten und Zellsortierung von Prestalk-Zellen:

- AX2 transformiert mit der W2-GFP-Mutante unter dem Aktin 15 Promotor im pB15 Expressionsvektor (Manstein et al., 1995).
- AX2 transformiert mit der S65T-GFP-Mutante unter dem Aktin 15 Promotor im pB15 Expressionsvektor.
- AX2 transformiert mit der S65T-GFP-Mutante unter der Kontrolle des *ecmA* Promotors (63, Jermyn et al., 1989) im pB15 Expressionsvektor.
- AX2 transformiert mit der W2-GFP-Mutante unter der Kontrolle des *pst0*-Elements des *ecmA* Promotors (Early et al., 1993) im pB15 Expressionsvektor.
- AX2 transformiert mit der W7 GFP-Mutante unter der Kontrolle des *pst0*-Elements des *ecmA* Promotors im pB15 Expressionsvektor.

##### Severin GFP-Fusionsprotein Experimente:

- AX2 mit einem Severin GFP-Fusionsprotein unter dem Aktin 15 Promotor im pDEXRH Expressionsvektor (Faix et al., 1992). Verwendet wurde die GFP-Variante S65T
- HG1132 (André et al., 1989), eine AX2-Transformante ohne Severin, mit demselben Severin GFP-Fusionsprotein.

##### Artenmischexperimente:

- *Dictyostelium mucoroides*
- *Polysphondylium violaceum*
- *Polysphondylium pallidum*

Die pB15-, *ecmA*- und *pst0*-Transformanten wurden von Artur Schwartz hergestellt, die Severin-GFP Transformanten wurden mir freundlicherweise von Ludwig Eichinger (München) zur Verfügung gestellt.

Alle hier aufgeführten *D. discoideum*-Transformanten wurden durch Zugabe von Geneticin (G418, Sigma) positiv selektiert. Den pB15-, *ecmA*- und *pst0*-Transformanten wurde 20 µg/ml, den Severin GFP Transformanten 10 µg/ml im HL5-Medium zugegeben.

## **2.1.5. Zellkultur**

### AX2 und AX2-Transformanten

AX2-Sporen aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Kühlschrank wurden in mit HL5-Medium gefüllte Petrischalen und in 100 ml Zellkulturkolben gegeben (jeweils 10 ml Medium). Die Zellen im Kolben wurden bei  $22^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttler bei 150 rpm inkubiert (Sussman, 1987), während die Schalen in der Sterilbank verwahrt wurden. Nach dem Hochwachsen der Zellen in der Schüttelkultur wurden die Zellen in 50 ml HL-5 Medium in 100 ml Kulturkolben weitergehalten, wobei vermieden wurde, daß sie über eine Dichte von  $5\text{-}6 \times 10^6$  Zellen/ml wuchsen und in die stationäre Phase übergingen. Die Zellen wurden gleichzeitig in Petrischalen gehalten, wobei vermieden wurde, daß die Schalen konfluent wurden. Dazu wurden 2x pro Woche die meisten Zellen von den Schalen abgewaschen, bzw. einige Zellen in eine frische Petrischale überführt. Alle drei Wochen wurde eine neue Kultur angesetzt.

Den AX2-Transformanten wurde zur positiven Selektion, wie oben angegeben, G418 beigefügt.

Zur Verwendung in Experimenten wurden Zellen aus in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Schüttelkulturen entnommen. Die Zellsuspension wurde 3 Minuten bei 2600 rpm (Hettich Universalzentrifuge K2S) zentrifugiert und das Pellet 2x in  $\text{KK}_2$ -Puffer gewaschen und zentrifugiert.

### Severin-GFP Zellen:

Von den Severin-GFP Zellen wurden Aliquots vegetativer Zellen aus axenischer Kultur genommen, herunterzentrifugiert, in Cryo-Tubes (Nunc) mit 720  $\mu\text{l}$  Pferdeserum und 80  $\mu\text{l}$  Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) aufgenommen und im  $-80^{\circ}\text{C}$  Kühlschrank aufbewahrt. Mit diesen wurde alle vier Wochen eine neue Kultur durch Einbringen in eine Petrischale mit 10 ml HL5 Medium und 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 angesetzt.

### *Klebsiella aerogenes*:

*Klebsiella*-Bakterien wurden auf einer SB-Platte ausgestrichen, bei  $22^{\circ}\text{C}$  inkubiert und ca. alle 10 Tage auf eine neue SB-Platte überimpft.

### *D. mucoroides*:

*Klebsiella* Bakterien wurden auf einer SB-Platte ausgestrichen, und einige Körner Kieselgel mit *D. mucoroides*-Sporen aufgebracht. Innerhalb einer Woche bildeten sich um diese Körner Freßränder und etwas später Fruchtkörper, von denen Sporen abgenommen werden konnten.

Für die weitere Kultur wurden diese Sporen als Strich auf eine SB-Platte mit verteilten *Klebsiella* Bakterien aufgebracht (Strichplatte). Vom Strich aus bildet sich in beide Richtungen ein expandierender Freßrand und es kommt zur Bildung von Fruchtkörpern.

Für Artenmischexperimente wurden Wachstumsplatten angelegt. *D. mucoroides*-Sporen von mehreren Fruchtkörpern wurden auf SB Agarplatten mit *Klebsiella*-Bakterien gleichmäßig ausgestrichen und bei 22°C inkubiert. Innerhalb von 24 Stunden bildet sich ein Bakterienrasen, der sich nach 36 Stunden lichtet. Die Zellen werden zu diesem Zeitpunkt durch Abschaben mit einem Objektträger geerntet.

Die so erhaltene Zell/Bakterien-Mischung wurde in KK<sub>2</sub>-Puffer suspendiert und 3 Minuten bei 2600 rpm (Hettich Universalzentrifuge K2S) zentrifugiert. Das Pellet wurde in KK<sub>2</sub>-Puffer gewaschen (2-3x) und zentrifugiert, bis der Überstand klar war und die Zellen von den Bakterien getrennt waren. Zu diesem Zeitpunkt wurden Zellen für die Cell Tracker Färbung abgenommen (siehe unten), die restlichen Zellen wurden für die Dauer der Färbung in KK<sub>2</sub>-Puffer geschüttelt.

### *Polysphondylium spec.*:

*P. violaceum*- und *P. pallidum*-Sporen wurden aus -80°C Glycerinkulturen genommen und in einem Strich auf GYP-Platten mit verteilten *Klebsiella* Bakterien aufgebracht. Innerhalb einer Woche bildete sich vom Strich aus in beide Richtungen ein Freßrand und ein paar Tage später Fruchtkörper, von denen Sporen für weitere Strich- und Wachstumsplatten entnommen werden konnten. GYP-Wachstumsplatten für Artenmischexperimente wurden entsprechend der für *D. mucoroides* beschriebenen Methode angefertigt und geerntet.

## 2.1.6. Mikroskop-Systeme

### Konfokale Mikroskopie:

Leica True Confocal Scanner (TCS) NT mit integriertem HeNe Laser und 180 mW Argon Laser (Omnichrome)

Leica True Confocal Scanner (TCS) SP mit integriertem HeNe Laser und 180 mW Argon Laser (Omnichrome, bzw. nach Austausch Uniphase)

Verfügbare Laserlinien: 457 nm (Ar), 488 nm (Ar), 514 (Ar), 633 (HeNe)

Steuersoftware Leica TCS NT Versionen 1.2.125 – 1.6.569 auf einem 133 MHz Pentium PC mit 128 MB RAM

Das Konfokalsystem ist an ein Leica DM IRBE Mikroskop angeschlossen (inverses Mikroskop)

Verwendete Objektive:

- PL FLUOTAR 10x/0.30
- HC PL APO 10x/0.40 IMM
- PL FLUOTAR 20x/0.50
- HCX APO L 40x/0.80 W Wasserimmersionsobjektiv m. großem Arbeitsabstand
- HCX APO L 63x/0.90 W Wasserimmersionsobjektiv m. großem Arbeitsabstand
- PL APO 63x/1.20 W CORR Wasserimmersionsobjektiv m. Deckglaskorrektur

### Fluoreszenz-Mikroskopie:

Zeiss-Axiovert 100 TV mit S65T-GFP-Filtersatz (Omega)

Verwendetes Objektiv: Plan NEOFLUAR 10x/0.30

Fluoreszenz-Kamera: Hamamatsu C4880 Cooled CCD Kamera angeschlossen an einen 350 MHz PentiumII PC mit 128 MB RAM und IC-PCI Framegrabber (Imaging Technology). Steuersoftware: HiPic 5.0 (Hamamatsu)

### 2.1.7. Slug-Versuche

Ansatz: Für Slugs wurden Zellen aus in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Schüttelkulturen entnommen. Die Zellsuspension wurde 3 Minuten bei 2600 rpm (Hettich Universalzentrifuge K2S) zentrifugiert, das Pellet in 1 ml  $\text{KK}_2$ -Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Pellet wurde in  $\text{KK}_2$ -Puffer gewaschen (2x), ca. vier Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415C) und das so entstandene Pellet im doppelten Volumen Wasser (deionisiert) aufgenommen. 20  $\mu\text{l}$  Tropfen dieser Suspension wurden auf Wasser-Agarplatten aufgebracht. Überschüssige Flüssigkeit in den Tropfen wurde unter dem Luftzug einer Sterilbank verdunsten gelassen (5-10 min). Die Platten wurden unter einseitigem Lichteinfall (in Schachteln mit einem Schlitz) für mindestens 16 Stunden bei 18 bzw. 22°C inkubiert. Die aus diesen Zelltropfen entstandenen Slugs wanderten teilweise für mehrere Tage. Es wurden Slugs verschiedenen Alters, hauptsächlich 24 h und 48h alt, verwendet.

Mikroskopische Beobachtung: Um den Slug wurde ein Dichtungsring (Innendurchmesser: 7mm, Dicke: 1,5 mm) gelegt und dieser mit Siliconöl AR 20 (Wacker Chemie) gefüllt. Durch die hohe Sauerstofflöslichkeit dieses Öls wurde eine Sauerstoffunterversorgung des Slugs vermieden und gleichzeitig die Lichtbrechung an der Slugoberfläche reduziert. Nach Überdeckung mit einer sauerstoffdurchlässigen Folie (Acla, Dicke 0,1 mm, Allied Chemical) konnten die Petrischalen umgedreht werden und am inversen Mikroskop Aufnahmen von Slugs durch die Folie und das Silikonöl hindurch gemacht werden, ohne daß das Öl ausläuft.

Koffein-Versuche: Für die Induktion von neuen Spitzen im Prespore-Bereich wurden migrierende Slugs auf Wasser-Agarplatten mit 5 mM Koffein transferiert. Dazu wurde die zugeschnittene Spitze eines Zahnstochers unter die Schleimhülle am hinteren Ende des Slugs geschoben und der Slug an der Schleimhülle vom Agar abgehoben. Der an der Zahnstocherspitze hängende Slug wurde daraufhin vorsichtig auf dem Koffeinagar abgelegt. Zur Beobachtung wurde der Slug wie oben beschrieben mit Siliconöl überschichtet. Für die Aufnahmen von Slugs in Seitenansicht wurde der Bereich, auf dem der Slug abgelegt wurde, nach ca. 10 min als Block aus dem Agar ausgeschnitten und herausgehoben. Der so erhaltene Agarblock wurde nun seitlich auf der Koffein-Agaroberfläche einer weiteren Petrischale abgelegt und zur Beobachtung mit Siliconöl überschichtet.

### 2.1.8. Artenmischexperimente

#### Celltracker-Färbung:

Für die Färbung wurden Zellen von *D. mucoroides*- und *Polysphondylium spec.*-Wachstumsplatten verwendet.

Von nach der in Abschnitt 2.1.5 beschriebenen Methode geernteten Zellen wurden  $5 \times 10^6$  in  $\text{KK}_2$ -Puffer gewaschene Zellen in 0,1 ml  $\text{KK}_2$ -Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, das 1  $\mu\text{l}$  10 mM 5-Chloromethylfluoreszin-Diazetat (Cell Tracker Green, Molecular Probes) in DMSO enthält. Die Zellen wurden unter ständigem Schütteln für ca. 20 min mit dem Farbstoff inkubiert. In dieser Zeit kommt es zu einem Farbumschlag, bei dem die farblose Zellsuspension eine gelbgrüne Färbung erhält. Die Zellen wurden dann für vier Sekunden bei 14000 rpm pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5415C) und zweimal mit  $\text{KK}_2$ -Puffer gewaschen.

#### Mischungen *D. discoideum*/*D. mucoroides*:

Nach der Cell Tracker Färbung von *D. mucoroides* wurde eine Mischung von 5-10% gefärbter *D. mucoroides*-Zellen in ungefärbten Zellen in  $\text{KK}_2$ -Puffer hergestellt. Ebenso wurden ungefärbten *D. discoideum*-AX2-Zellen 5-10% konstitutiv W2-GFP exprimierende Zellen (pB15) beigegeben, nachdem diese aus Schüttelkulturen entnommen und wie oben beschrieben gewaschen worden waren. Diese *D. mucoroides*- und *D. discoideum*-Zellsuspensionen wurden anschließend auf die gleiche Dichte ( $2 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ /ml) gebracht und in den Verhältnissen 1:1 bzw. 1:10 gemischt und auf 1%  $\text{KK}_2$ -Puffer-Agarplatten absetzen gelassen.

Zur Untersuchung der artspezifischen Zellkontakte wurden 1-10% markierte Zellen der einen Art in eine ungefärbte Zellsuspension der anderen Art eingebracht und auf 1%  $\text{KK}_2$ -Puffer-Agarplatten gegeben. Bei diesen Versuchen waren somit alle Zellen einer Art fluoreszenzmarkiert.



### Mischungen *D. discoideum*/Polysphondylium spec.:

Mit diesen Ansätzen wurde ähnlich wie mit den *D. discoideum*/*D. mucoroides*-Mischungen verfahren, wobei das *D. discoideum*/Polysphondylium Mischungsverhältnis auf 1:3 eingestellt wurde, um Aggregationsströme beider Arten zu induzieren.

### **2.1.9. Severin-GFP Messungen**

#### Einzelzellmessungen:

In Schüttelkultur gehaltene Zellen wurden abzentrifugiert, in  $\text{KK}_2$ -Puffer aufgenommen und, um Autofluoreszenz durch das Nährmedium zu beseitigen, erst nach 3 Stunden in  $\text{KK}_2$ -Puffer beobachtet. Die Zellen wurden auf ein Deckglas aufgebracht und setzten sich dort ab. Sie wurden teilweise mit einem dünnen Stück Agar überdeckt und mit einem 63x Wasserimmersionsobjektiv durch das Deckglas beobachtet. Für die Beobachtungen von Zellteilungen wurden die Zellen in hydrophile petriPerm Schalen (In Vitro Systems) gegeben, auf denen es zu einer sehr guten Anheftung kam.

#### Ratio-Messungen S65T/TRITC-Dextran:

Die Spezifität der Lokalisierung des Severin GFP-Fusionsproteins wurde in Ratio-Messungen gegen einen gleichmäßig im Zytoplasma verteilten, weiteren Fluoreszenz-Marker getestet. Dafür wurde TRITC-Dextran verwendet. Elektroporation: Severin-GFP Zellen aus einer exponentiell wachsenden Schüttelkultur wurden mit  $\text{KK}_2$ -Puffer gewaschen und in  $\text{KK}_2$ -Puffer in einer Dichte von  $5 \times 10^7$ /ml aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen mit der Eppendorf-Zentrifuge pelletiert und in 0,5 ml Elektroporationspuffer mit TRITC-Dextran in einer Zelldichte von  $10^8$ /ml aufgenommen. Anschließend wurde diese Mischung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser (BioRad) bei 1kV, 3 $\mu$ F und einer Zeitkonstante von 0.5-1  $\mu$ s durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale in Tropfen von ca 100  $\mu$ l aufgeteilt und nach 10 Minuten wurden den Tropfen 2  $\mu$ l 50mM  $\text{CaCl}_2$ / $\text{MgCl}_2$  zugegeben. Nach 15 Minuten wurden die Zellen in  $\text{KK}_2$ -Puffer aufgenommen.

Severin-GFP (S65T) wurde bei 488 nm angeregt und zwischen 520 und 550 nm detektiert. Simultan wurde TRITC bei 514 nm angeregt und mit einem Langpaßfilter ab 580 nm gemessen.

### Chemotaxis-Versuche:

#### a) cAMP-Stimulation mit Mikropipetten:

Glaskapillaren aus Borsilikat (World Precision Instruments) wurden an einem Ende mit einem Mikroelektroden-Ziehgerät (Modell 753, Campden Instruments) zu Spitzen ausgezogen, die unter dem Mikroskop so abgebrochen wurden, daß Öffnungen mit 1-2  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser entstanden. Die so hergestellten Mikropipetten wurden mit cAMP (Serva) in einer Endkonzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M in  $\text{H}_2\text{O}$  beladen. Durch Kapillarkräfte wurde die cAMP-Lösung bis in die Spitze gezogen und durch Anlegen von Druck mit einer 5 ml Spritze wurden Luftblasen aus der Spitze gedrückt.

Für die Stimulation mit cAMP-Mikropipetten (Gerisch und Keller, 1981) wurden Zellen aus einer Schüttelkultur mit  $\text{KK}_2$ -Puffer gewaschen (2x) und in  $\text{KK}_2$ -Puffer auf einem Deckglas aufgebracht. Nach 6 Stunden wurde die Mikropipette mit einem Mikromanipulator in der Nähe von aggregationskompetenten Zellen plaziert und das Verhalten wurde mit einem 63x Wasserimmersionsobjektiv invers durch das Deckglas beobachtet. Der cAMP-Gradient bildete sich hierbei durch Diffusion aus der Pipettenspitze in das Medium.

#### b) Endogene cAMP-Signale in Aggregationsfeldern:

1 ml Aliquots einer Zellsuspension in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden auf mit einer dünnen Schicht von 1%  $\text{KK}_2$ -gepuffertem Agar bedeckten Deckgläsern aufgebracht. Um die Entwicklung einzuleiten, wurden die Deckgläser 6 Stunden in einer feuchten Kammer aufbewahrt, bevor sie mit dem 40x L Objektiv (großer Arbeitsabstand) beobachtet wurden. Für hochauflösende Messungen endogener Signale wurden dünne Agarschichten mit sich entwickelnden Zellen invertiert und auf einem Deckglas abgelegt. Dies entspricht einer leichten Übersichtung mit Agar. Diese Behandlung behindert nicht die frühe Aggregation und ermöglicht die Beobachtung mit dem hochauflösenden 1.3 NA 63x Wasserimmersionsobjektiv.

### Vielzellige Stadien:

Für die Beobachtung von Aggregationsströmen wurden 1-5% Severin-GFP exprimierende Zellen mit ungefärbten AX2 Zellen gemischt. Die Zellen wurden auf  $\text{KK}_2$ -Pufferagarplatten in Dichten zwischen  $8\text{-}10 \times 10^6$  Zellen/ml aufgebracht und aggregieren gelassen. Nachdem sich Ströme geformt hatten, wurden Bereiche der Platte vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt, invertiert und mit einem 63x Wasserimmersionsobjektiv beobachtet. Messungen von auf diese Weise abgedeckten Strömen wurden nur für 30-40 Minuten durchgeführt um zu vermeiden, daß Zellen unter Sauerstoffmangel beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden auch Aggregationsströme ohne Abdeckung von unten durch den Agar mit dem 40x L Objektiv beobachtet. Diese Messungen zeigen, daß sich die Ströme unter dem Deckglas normal verhalten, zumindest während des Beobachtungszeitraums. Für die Auswertung wurden nur Messungen verwendet, in denen sich längliche Zellen gleichmäßig im Aggregationsstrom bewegen.

## **2.2. Bildverarbeitung und Auswertung**

Für eine ausführliche Diskussion der angewendeten Methoden sei auf Zimmermann und Siegert (1998a) verwiesen.

### Folgende Programme kamen in der Auswertung zur Anwendung:

- Interactive Data Language 4.0.1 - 5.0 (IDL, Research Systems Inc.) für die Bearbeitung und Auswertung der konfokalen Datensätze.
- Igor Pro 3.13 (WaveMetrics Inc.) zur Erstellung von Graphen und Plots aus den mit IDL ermittelten Datensätzen (z. B. Zellgeschwindigkeit).
- Scion Image Beta 3b (Scion Corp.) für einfache Manipulationen und die Sichtung von konfokalen Daten.
- Die in der Arbeit verwendeten Abbildungstafeln wurden mit Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc.) und Corel Draw 6.0 (Corel Corporation) erstellt.
- Für Animationssequenzen der Zeitserien und 4D-Messungen (AVI und Quicktime) wurde Adobe Premiere 5.0 (Adobe Systems Inc.) verwendet.

IDL 4.0.1 wurde auf einer AIX/IBM RS 6000 Workstation, IDL 5.0 und alle anderen Programme auf einem 350 MHz PentiumII PC mit 256 MB RAM verwendet.

Konfokale Datensätze werden von der TCS NT Steuersoftware als Sequenzen numerierter 8 Bit TIFF-Dateien in eigene Verzeichnisse abgelegt. Bei Mehrkanalmessungen sind die Kanäle separat numeriert (c01f0001.tif, c02f0001.tif, c03f0001.tif). 4D-Messungen werden als komplette Sequenz von Einzelbildern abgespeichert, ohne daß es zu einer Unterteilung in einzelne 3D-Datenstapel kommt, d.h. eine 4D-Messung mit z.B. 100 Meßzeitpunkten und jeweils 10 optischen Schnitten pro 3D-Bildstapel wird als von 0001 bis 1000 numerierte Sequenz abgelegt.

Für die Bearbeitung und Analyse von konfokalen Mehrkanal-Messungen und v.a. für 4D-Messungen waren keine fertigen Programme vorhanden. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit mit IDL erstellt. Hierbei war es vor allem nötig, Routinen für die sequentielle Bearbeitung von Zeitserien (xyt und 4D) zu schaffen.

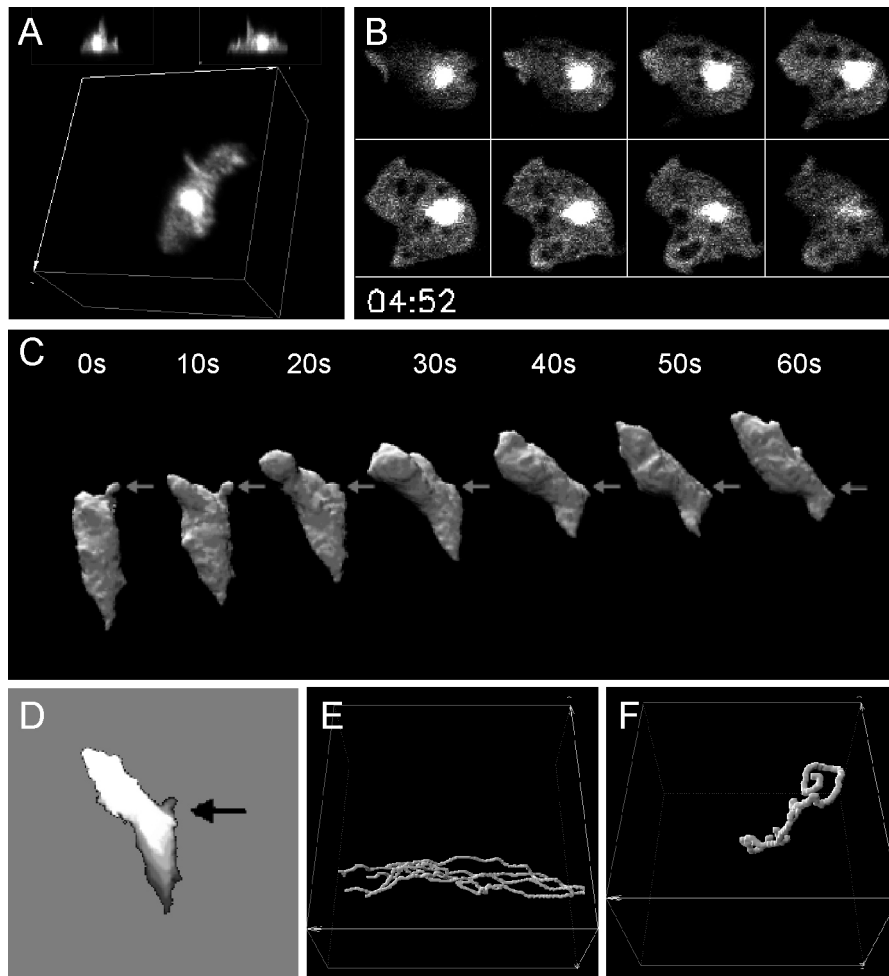
### **2.2.1. xyt-Sequenzen**

Für die spektrale Trennung entsprechend der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Methode wurde für jeden Zeitpunkt eine Subtraktion der Fluoreszenzkanäle vorgenommen. Das Subtraktionsbild wurde in den Rot-, das zur Subtraktion verwendete Bild in den Grünkanal einer 24 Bit RGB TIFF-Datei (Rot-Grün-Blau) gelegt. Darüber hinaus konnten optional der Transmissionskanal als Graustufenbild (durch gleichmäßige Repräsentation im R-, G- und B-Kanal) mit den roten und grünen Fluoreszenz-Bilddaten kombiniert und die Meßzeitpunkte eingeblendet werden (Abb. 8).

Ratio-Messungen S65T/TRITC:

Das Verhältnis S65T/TRITC wurde durch Division des Wertes für den S65T-Kanal durch den Wert des TRITC Kanals an jeder Pixelposition erhalten. Den so erhaltenen Ratio-Werten wurden für die Darstellung linear Einträge aus einer Falschfarbenskala zugewiesen (bei Ratio-Bildern als vertikaler Balken am rechten Bildrand dargestellt). Die Technik der Ratio-Messung wird detaillierter in Inoué und Spring (1997) dargestellt. Wegen der starken Variation in den Intensitäten der Kanäle in den einzelnen Experimenten (unterschiedliche GFP-Expressionseffizienz in Zellen, Elektroporation) wurde die Farbskalazuweisung für jede Messung angepaßt um eine gute Unterscheidung zu gewährleisten. Eine vergleichende





**Abb. 9)** Illustrierende Beispiele von in dieser Arbeit verwendeten Methoden. A: Gleichzeitige Projektion mehrerer Perspektiven einer 4D-Messung. B: Gleichzeitige Darstellung mehrerer Schnittebenen einer 4D-Messung. C: Isosurface Darstellung einer GFP-markierten Zelle in einem vielzelligen Aggregat. D: Repräsentation der Bewegung der Zelle in C. E, F: 4D-Zellverfolgungen. E: Zellen im Prespore-Bereich eines migrierenden Slugs. F: Prestalk-Zelle während der Spitzenbildung.

Ein bestehendes IDL-Programm (slicer.pro) zur Visualisierung von 3D-Datensätzen wurde so umgeschrieben, daß 4D-Datensätze in jeder gewünschten Orientierung und Darstellungsform (z.B. Projektionen, Isosurface-Darstellung) abgespeichert werden konnten (Abb. 9C,E, F). Ein Überblick über die hier erwähnten Visualisierungsmöglichkeiten ist in Chen et al. (1995) gegeben. Für Darstellungen wie Abb. 9E, F wurden mit Igor Pro Datenpunkte in den 4D-Zelltrajektorien interpoliert um eine kontinuierliche Darstellung der Zellbahnen zwischen den Meßzeitpunkten zu ermöglichen. Interpolationen wurden jedoch nie zur Auswertung verwendet.

Sowohl für xyt- als auch für 4D-Sequenzen wurden Möglichkeiten geschaffen Bewegungsabläufe durch Summierung der Bildinformation mehrerer Zeitpunkte darzustellen

(Abb. 9D). Optional konnten Fehlfarben zur zeitlichen Kodierung verwendet werden. Bei 4D-Messungen konnte die Summierung auch im dreidimensionalen Datenfeld stattfinden.

Mit Adobe Premiere wurden mit IDL erhaltene Bildserien in AVI-Animationssequenzen umgewandelt.

### **2.2.3. Zellverfolgung**

Es wurden Routinen zur manuellen Verfolgung von fluoreszenzmarkierten Zellen in Konfokaldatensätzen erstellt. Mit diesen Programmen konnten u.a. die Fluoreszenz-Intensitäten in Unterbereichen bzw. in der gesamten Zelle verfolgt und der Zellmittelpunkt (Zentroid) berechnet werden.

Zur 4D-Verfolgung von Zellen wurden zwei verschiedene Ansätze implementiert:

Zellen wurden im Projektionsbild in ihrer x/y-Position markiert und die z-Position durch Mittelung eines 3x3 Meßbereichs und den Vergleich dieser Werte entlang der z-Achse ermittelt. Diese Methode funktioniert zuverlässig bei Messungen mit einem guten Verhältnis von Signal zu Hintergrund und wenn es zu keinen Überlappungen von Zellen entlang der z-Achse kommt (Abb. 9E, F).

In Fällen, in denen die automatische Ermittlung der z-Position unzuverlässig war konnte die z-Position mit einem anderen Programm auch manuell durch Fokussieren im 3D-Bildstapel ermittelt werden. Dies ist umständlicher und war meistens nicht nötig.

In diesem Zusammenhang sei auf eine Besonderheit der Darstellung der Geschwindigkeiten von 4D-Zelltrajektorien in Abb. 22-24 hingewiesen: Der Zeitabstand zwischen einzelnen 3D-Bildstapeln beträgt eine Minute. Zellen in Slugs zeigen periodische Geschwindigkeitsschwankungen mit einer Periodenlänge von ca. drei Minuten (Siegert und Weijer, 1992). Diese Änderungen werden mit den 60 Sekunden Intervallen der 4D-Messungen erfaßt, da diese noch unter der Hälfte der gemessenen Priodenlänge liegen ( $\approx$ Nyquist-Frequenz). Es kommt auf diese Weise jedoch zu starken Schwankungen zwischen den einzelnen Punkten der Messung, Änderungen im Zellverhalten sind somit schwer erkennbar. Um das Einsetzen von gerichteter Bewegung und entwicklungsbedingte Geschwindigkeitsänderungen deutlicher darzustellen, wurden in Abb. 22-24 die Zellgeschwindigkeiten durch die Ermittlung der bis zum übernächsten Zeitpunkt (2 min) zurückgelegten Strecke festgelegt. Dadurch sind die Schwankungen zwischen einzelnen

Zeitpunkten abgeschwächt, ohne die Zahl an Meßpunkten zu reduzieren, bzw. mehrere Zeitpunkte zu mitteln.

#### **2.2.4. Auswertungsroutinen**

Die durch Verfolgung einzelner Zellen erhaltenen Datensätze konnten auf verschiedene Parameter untersucht werden, z.B. Geschwindigkeit, Abstand zwischen zwei Punkten, Abstand zum Ursprung und Richtungsänderung.

Für die Untersuchung von Datensätzen auf periodische Ereignisse wurde ein Programm mit graphischer Benutzeroberfläche entworfen, mit dem interaktiv Parameter für die Fourierfilterung festgelegt und Autokorrelationen durchgeführt werden konnten (entsprechend Siegert und Weijer, 1991).

Die Anfertigung von Time-Space-Plots (Siegert und Weijer, 1989) ist eine wichtige Methode zur Untersuchung periodischer Ereignisse in der *in vivo* Mikroskopie. Dabei werden die Intensitätswerte eines ausgewählten Bildbereichs durch Mittelung auf eine Zeile reduziert. Dies wird nacheinander mit allen Bildern einer Zeitserie (bzw. mit einem Teil davon) durchgeführt und die so erhaltenen Linien, von denen jede einen Zeitpunkt der Messung repräsentiert, werden als Zeilen eines Bildes kombiniert. Die y-Achse des so entstandenen Bildes repräsentiert den zeitlichen Verlauf der Messung (time) während die x-Achse den ausgewählten Bildbereich repräsentiert (space). Periodische Ereignisse können in einem solchen Time-space-Plot durch senkrechtes Auslesen der Grauwertänderungen der Bildzeilen ( $\approx$  Zeitachse) analysiert werden. Für die konfokalen Datensätze wurden mit IDL Time-Space-Plot Routinen erstellt.



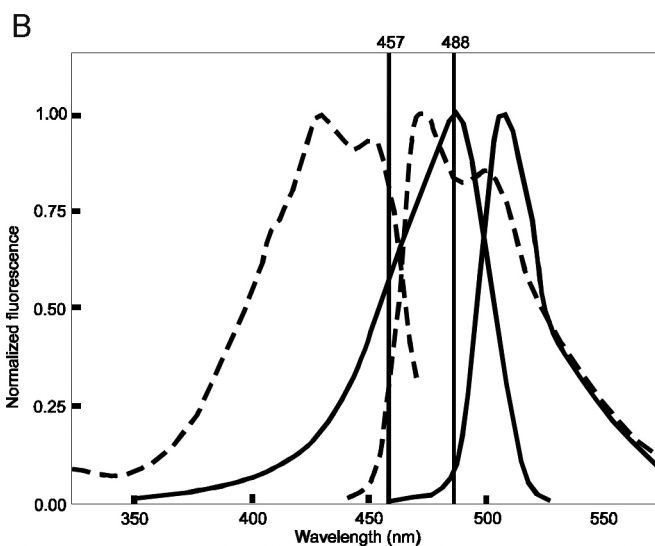
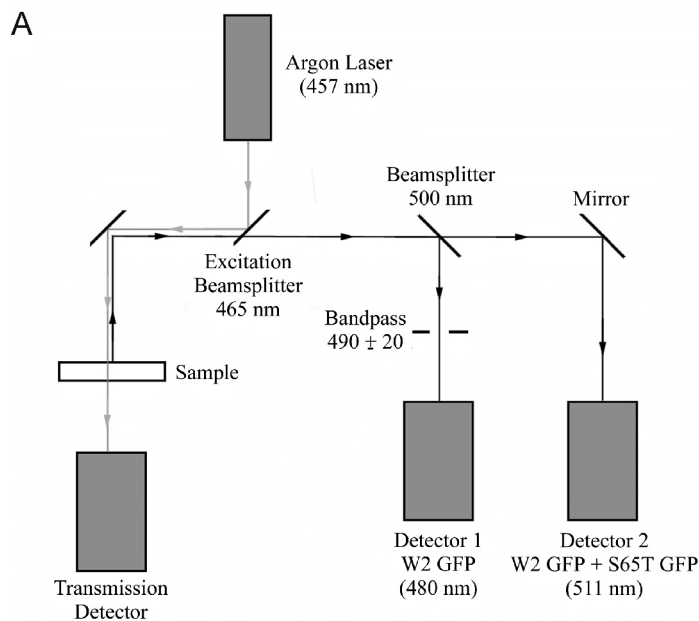
## 3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil und die Diskussion sind in jeweils vier Themenbereiche gegliedert. Im ersten ist die Entwicklung einer in den beiden darauf folgenden Abschnitten verwendeten Methode beschrieben. Der zweite und dritte Abschnitt behandelt Zellsortierungsprozesse innerhalb einer Art und zwischen verschiedenen *Dictyostelium*-Spezies. Die in den beiden vorhergehenden Abschnitten vertieften Methoden der *in vivo* Mikroskopie werden im letzten Teil zur Analyse eines Zytoskelett-Proteins auf intrazellulärer Ebene angewandt.

### 3.1. Simultane Detektion zweier spektraler GFP-Varianten

#### 3.1.1. Detektion in Konfokalmikroskopen mit Glasfiltern

Durch die Konfiguration des Konfokalmikroskops entsprechend dem Schema in Abb. 10A ist es möglich simultan die in ihren spektralen Eigenschaften veränderten GFP-Mutanten W2 und S65T anzuregen (Abb. 11A-D). Zur Anregung wird die 457 nm Laserlinie des Argon Lasers verwendet. Diese ist für die Anregung von W2 gut geeignet, das Anregungsmaxima bei 433 und 453 nm hat, regt dafür aber S65T, das sein Anregungsmaximum bei 489 nm hat (Heim und Tsien, 1996, Abb. 10B und Tabelle 1 in Abschnitt 2.1.3), nur wenig an. Da sich das Anregungsspektrum von S65T und das Emissionsspektrum von W2 überschneiden, kann die Argon Laserlinie bei 488 nm nicht für die Anregung von S65T verwendet werden, ohne daß die Detektion der W2-Fluoreszenz gestört wird. S65T kann jedoch bei 457 nm ausreichend angeregt werden, so daß die simultane Anregung von W2 und S65T mit dieser Wellenlänge möglich ist. Das mit 457 nm Anregung generierte Fluoreszenzsignal passiert den 465 nm Strahlenteiler und wird durch einen weiteren Strahlenteiler in Wellenlängenteile unter und über 500 nm aufgeteilt. Die Emissionsmaxima der beiden GFP Mutanten liegen weit genug auseinander um das W2-Signal eindeutig mit einem darauf abgestimmten Bandpaßfilter zu identifizieren. Der Anteil der Emission über 500 nm setzt sich aus der Fluoreszenz beider GFP-Mutanten zusammen, so daß diese in diesem Bereich des Spektrums nicht eindeutig getrennt werden können. Es befindet sich jedoch das vollständige S65T-Signal darin. Durch den Vergleich des kurz- und des langwelligen Bereichs können daher die beiden GFP-Mutanten auf die folgende Weise eindeutig identifiziert werden: Ein Fluoreszenzsignal in beiden Kanälen kennzeichnet W2 exprimierende Zellen (Abb. 11A, B), während Zellen,

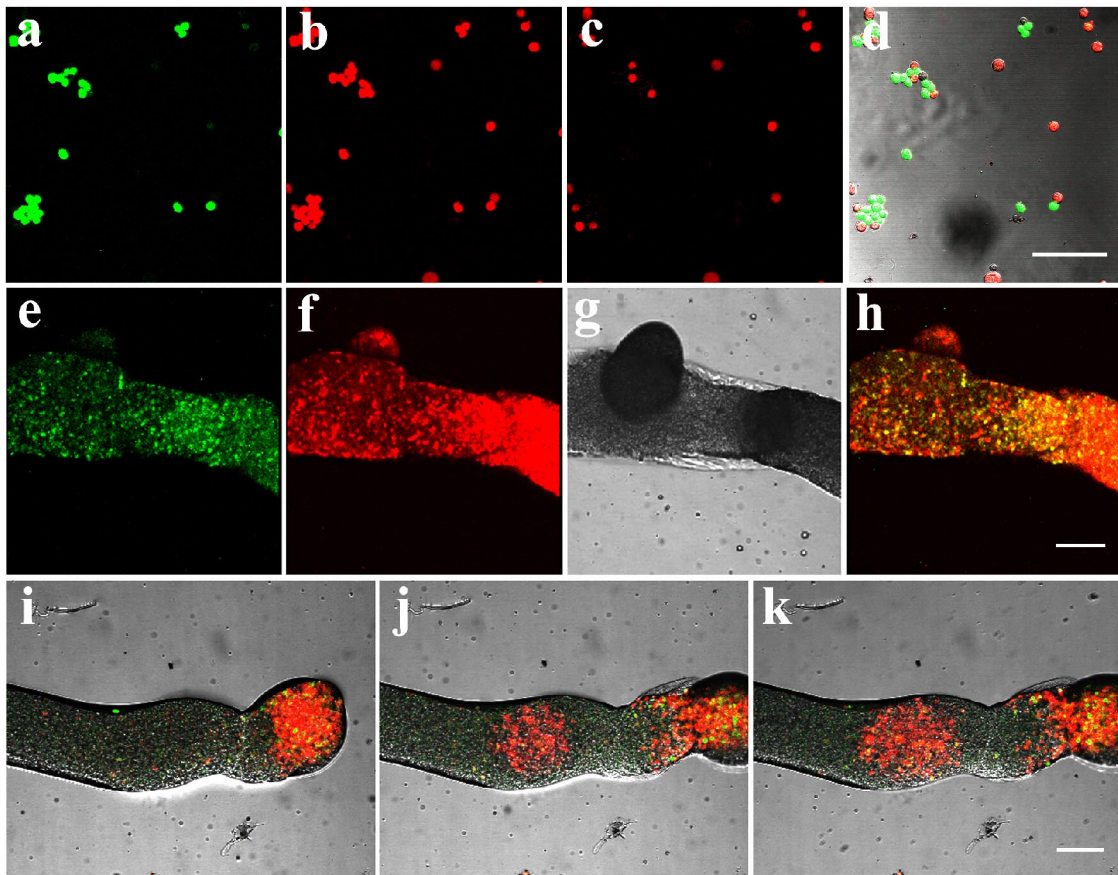


**Abb. 10)** A: Schema der Konfiguration des Konfokalmikroskops. Das Leica TCS NT System ist bis auf einen 465 nm Strahlenteiler mit den Standardfiltersätzen ausgestattet.

B: Anregungs- und Emissionsspektren für W7 (gestrichelt) und S65T (durchgezogen). Die y-Achse stellt hierbei die normalisierte Fluoreszenz der beiden GFP-Varianten dar und repräsentiert nicht das Intensitätsverhältnis der beiden GFP-Varianten zueinander.

die nur im Kanal mit der Fluoreszenz über 500 nm erscheinen, als S65T exprimierende Zellen identifiziert werden können (Abb. 11B). Da die Empfindlichkeit der Detektionskanäle des Konfokalmikroskops unabhängig voneinander eingestellt werden kann, sind die in Abb. 11A, B dargestellten Signale keine direkten Repräsentationen der jeweiligen Fluoreszenzsignale, die der Wahrnehmung mit dem bloßen Auge entsprechen würden. Um zwei spektral unterschiedliche GFP-Varianten in einer gemischten Präparation zu unterscheiden ist es wichtig, die Detektionskanäle mit Proben, die jeweils nur eine GFP-Mutante enthalten, zu eichen, bevor simultan gemessen wird.

- Zuerst wird dabei der W2-spezifische Detektionskanal mit einer Probe, die S65T exprimierende Zellen enthält, so eingestellt, daß nichts vom S65T-Signal in diesem Kanal sichtbar ist.



**Abb. 11)** Mischungen von *D. discoideum*-Zellen, die entweder W2- oder S65T-GFP exprimieren. a-d: Mischung von Zellen die entweder W2 oder S65T unter der Kontrolle des Aktin 15 Promotors exprimieren. a: W2-Fluoreszenz in Grün. b: W2- und S65T-Fluoreszenz in Rot. c: Subtraktionsbild (b-a). d: Kombination von a, c und einem Transmissionsbild. Maßstab: 50µm. e-h: Projektionsbilder eines 3D-Bildstapels eines *D. discoideum*-Slugs aus einer Mischung von pst0-W2 und pstA-S65T-Zellen. e: W2-Fluoreszenz. f: W2- und S65T-Fluoreszenz. g: Transmissionsbild (einzelner optischer Schnitt, kein Projektionsbild). h: Kombination von e und f in den Rot- und Grünkanälen eines RGB Bildes. W2-markierte Zellen erscheinen gelb (grün+rot), S65T-Zellen rot. Maßstab: 100µm. i-k: Zeitserie (xyt) eines *D. discoideum*-Slugs, Zusammensetzung wie für e-h beschrieben. Bilder wurden alle zwei Minuten aufgenommen. W2: Grün, S65T: Rot. i: 0 min. j: 84 min. k: 168 min. Maßstab: 100µm

- Als nächstes wird der zweite Detektionskanal mit einer Probe, die nur W2 exprimierende Zellen enthält, so eingestellt, daß die Intensität für diese GFP-Mutante in beiden Kanälen gleich ist. Führt man diese beiden Schritte durch, können in Proben, die sowohl W2 als auch S65T enthalten, beide GFP-Mutanten einfach durch die Kombination der beiden Detektionskanäle in einem Bild identifiziert werden.

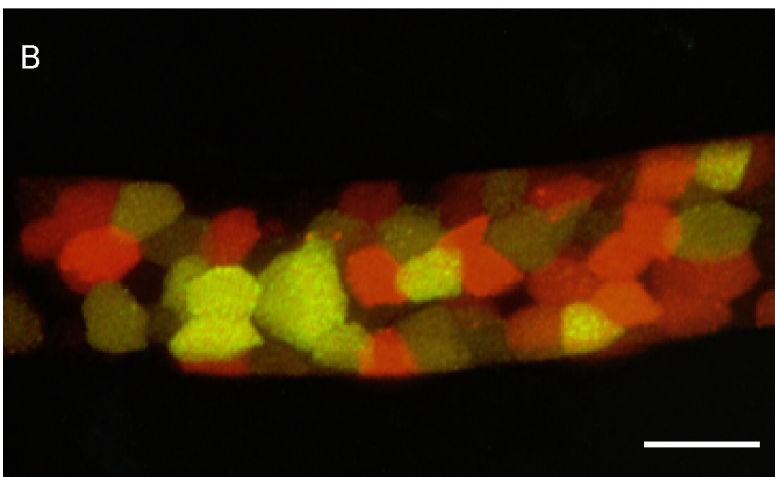
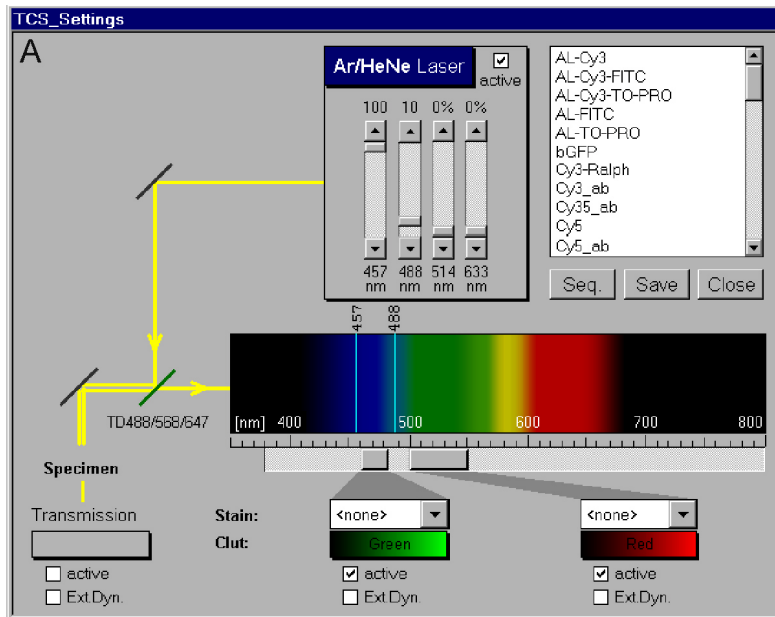
Die Kanäle können schon während der Aufnahme mit der Mikroskop-Software als Kombinationsbild dargestellt werden (Abb. 11H). Die Signale in beiden Kanälen sollten so eingestellt werden, daß die gemessenen Intensitäten im erfassbaren Bereich (Graustufen 0-255) liegen und es nicht zu einer Überstrahlung durch Werte über 255 kommt. Diese würden

zu falschen Werten bei einer Subtraktion der Bilder führen. Nach Beendigung der Messung können die Bilder mit Programmen wie Adobe Photoshop (Paddock et al., 1997) weiterbearbeitet werden. Durch die Subtraktion des W2-Kanals vom W2- und S65T-Kanal (z.B. mit der Kanalberechnungsfunktion von Photoshop) ist es möglich, die S65T exprimierenden Zellen separat darzustellen (Abb. 11C). Durch das Zusammenfügen der nur W2 (Kanal < 500 nm) bzw. S65T (Subtraktionsbild von Kanal 2) exprimierenden Zellen in zwei Farbkanäle eines RGB-Bilds erhält man ein Bild, in dem beide Zelltypen klar unterschieden werden können. Das Transmissionsbild kann darüber hinaus Zellen ohne GFP darstellen (Abb. 11D, H-K). Die simultane Darstellung einer weiteren GFP-Variante, W7, zusammen mit S65T ist mit derselben Methode möglich. W7 hat jedoch ein Emissions-Nebenmaximum bei 501 nm, so daß ein größerer Fluoreszenzanteil am Signal über 500 nm vorliegt. Das bringt einen Nachteil mit sich, da unter Verwendung der oben beschriebenen Kalibrierung die Empfindlichkeit für den zweiten Kanal reduziert werden sollte, um eine gleiche Intensität von W2 bzw. W7 GFP in beiden Kanälen zu erreichen. Damit wird zwangsläufig auch das ohnehin nicht optimal angeregte S65T-Fluoreszenzsignal reduziert.

Zur Demonstration der Detektierbarkeit der GFP-Varianten in vielzelligen Präparaten werden im Folgenden zwei Beispiele gezeigt. Für die genaue Besprechung der Inhalte dieser Abbildungen sei auf Abschnitt 3.2.3 der Arbeit verwiesen.

Abb. 11E und F zeigen die zelltypspezifische Expression von W2 und S65T in *Dictyostelium*-Slugs. W2-GFP wurde in pst0-Zellen, S65T in pstA-Zellen exprimiert. Zur Untersuchung von Zellsortierungsprozessen und zelltypspezifischer Bewegung während der Spitzenbildung wurden wandernde Slugs auf Wasseragar mit 5 mM Koffein transferiert. Dies führt zur Neubildung mehrerer Spitzen entlang der Längsachse des Slugs. Abb. 11E, F, H zeigen Projektionsbilder eines 3D-Scans eines aus einer Mischung von pst0-W2- und pstA-S65T-Zellen bestehenden *D. discoideum*-Slugs. Eine neue Spitze formt sich zwei Stunden nach Umsetzung des Slugs auf Koffeinagar (Abb. 11H). Ein Vergleich zwischen Abb. 11E und F, zeigt, daß sich pstA-Zellen spezifisch im obersten Teil der neugebildeten Spitze ansammeln. Abb. 11H zeigt die Kombination der Abb. 11E und F.

In Abb. 11I bis K ist die Bildung einer neuen Spitze in einem Slug als Zeitserie (xyt) dargestellt. Die Bilder wurden dabei im Abstand von 2 Minuten über einen Zeitraum von über 2,5 Stunden aufgenommen. Unter diesen Aufnahmebedingungen war weder eine Ausbleichung noch eine Schädigung der Zellen zu beobachten. Das Zellverhalten erscheint im Vergleich mit unter anderen Bedingungen aufgenommenen Zeitserien normal und die

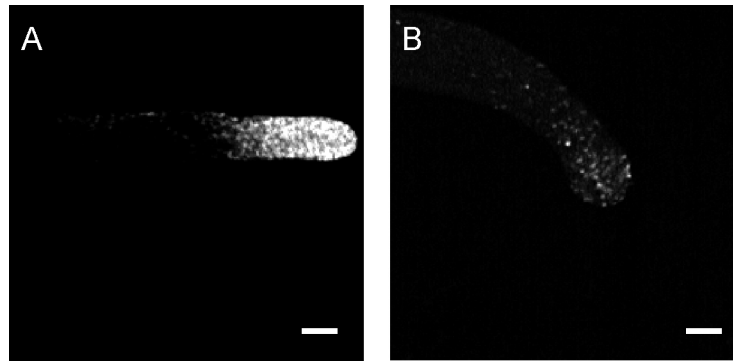


**Abb. 12)** A: Schema der Konfiguration eines spektralen Konfokalmikroskops für die simultane Detektion von W7 und S65T. B: Aufnahme mit der in A dargestellten Konfiguration. Stiel eines *D. discoideum*-Fruchtkörpers mit pst0-W2- und pstA-S65T-Zellen. Die Zellen mit den verschiedenen GFP-Varianten sind gleichmäßig im Stiel verteilt. Maßstab: 20  $\mu$ m

Spitzenbildung verläuft genauso wie in Kontrollen, die nicht mit Laserlicht angeregt wurden. Zu Beginn des Experiments sind GFP exprimierende Zellen nur in der ursprünglichen Spitze lokalisiert, die schon vor dem Transfer auf den Koffeinagar existierte. Nach 30 Minuten beginnt sich eine neue Spitze links von der ursprünglichen Spitze zu bilden, wie an der runden Ansammlung fluoreszierender Zellen zu erkennen ist. Anfangs sind hauptsächlich pstA-Zellen an der Spitzenbildung beteiligt (Abb. 11J), später sind auch einige pst0-Zellen in der neuen Spitze zu sehen (Abb. 11K).

### 3.1.2. Detektion in Konfokalmikroskopen mit spektraler Filtertechnik

Durch die Entwicklung der Leica TCS SP Technologie können stufenlos sehr eng definierte Detektionsfenster mit steilen Flanken erstellt werden. Bei mit dieser Technik ausgestatteten Mikroskopen ist eine Erweiterung der beschriebenen Technik für die simultane Detektion

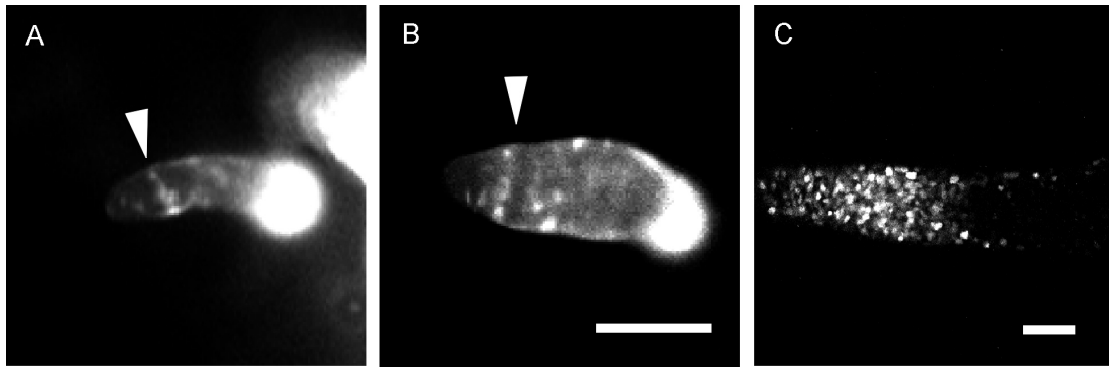


**Abb. 13)** Ca. 24 Stunden alte *pstA*-GFP Slugs. (A: 100% transformierte Zellen, B: 5%) Die Spitzenregion ist spezifisch markiert, während im Prespore-Bereich kaum markierte Zellen sind. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

möglich (Abb. 12A). Durch die Erstellung eines sehr engen Bandpaßfilters im Bereich zwischen 465 und 485 nm kann das Fluoreszenzsignal von W2-GFP detektiert werden. Auf diese Weise kann S65T-GFP mit der 488 nm Laserlinie angeregt und mit einem Bandpaßfilter zwischen 500 und 550 nm detektiert werden. Diese Konfiguration hat den Vorteil, daß das bei 457 nm nicht optimal angeregte S65T-GFP besser angeregt wird. Durch die separate Regulierbarkeit der Anregung der beiden GFP-Varianten und dem stärkeren S65T-Signal ist bei diesem Ansatz eine deutliche Trennung der GFP-Varianten auch ohne die beschriebene Subtraktion der beiden Kanäle gewährleistet. Abb. 12B demonstriert dies für *pstA*-S65T und *pst0*-W2-Zellen im Stiel eines Fruchtkörpers. Je nach Empfindlichkeit des Präparats sollte bei *in vivo* Messungen jedoch überlegt werden, ob zwei Laserlinien zur Anregung verwendet werden müssen, da auch mit diesem Gerät die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Darstellung unter Verwendung nur der 457 nm Laserlinie umgesetzt werden kann.

### **3.2. *In vivo* Zellsortierung zweier Prestalk-Zellpopulationen in Slugs**

Der Anteil der verschiedenen Zelltypen und ihre Verteilung im Slug ist genau geregelt und wird nach Störungen neu eingestellt (Mohanty und Firtel, 1999). Das räumliche Verteilungsmuster der Zelltypen entsteht durch Zellsortierungsprozesse, die den bei der Embryonalentwicklung stattfindenden Vorgängen ähnlich sind. Die Untersuchung der an der Zellsortierung in Slugs beteiligten Faktoren könnte sich also auch als nützlich für das Verständnis ähnlicher Vorgänge in anderen vielzelligen Organismen erweisen. Ein Vorteil von *Dictyostelium* ist dabei, daß sich Slugs aufgrund ihrer Größe und ihrer Transparenz zur *in vivo* Beobachtung unter dem Mikroskop eignen.



**Abb. 14)** Slugs aus *pst0*-GFP-Zellen. A,B: Kleine Slugs im First-Finger-Stadium, ca. 20h alt. *Pst0*-GFP-markierte Zellen sind im Halsbereich lokalisiert (Pfeilspitzen), nicht jedoch in der Spitze. Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop. C: Projektionsbild eines migrierenden Slugs (ca. 35h). Die Aufteilung zwischen Hals- und Spitzenbereich ist bei den *pst0*-GFP-Zellen nicht mehr deutlich erkennbar. Maßstab B, C: 100  $\mu$ m

Mit Hilfe zelltyp-spezifischer GFP-Konstrukte wurden die *pstA*- und *pst0*-Zellen des Prestalk-Bereichs *in vivo* beobachtet, verfolgt und analysiert. Ihr Bewegungsverhalten wurde sowohl in wandernden Slugs als auch bei der Neubildung von Spitzen nach der Störung der Slugorganisation beobachtet.

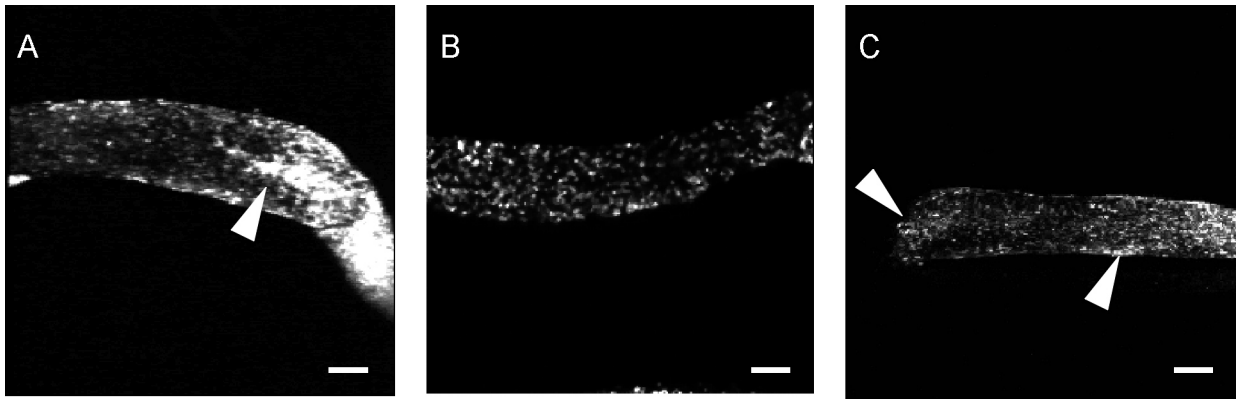
### 3.2.1. Verteilung der GFP-Reporter in Slugs

#### 3.2.1.1. S65T-GFP unter dem *ecmA* Promotor

Unter dem *ecmA*-Promotor exprimiertes S65T-GFP (*pstA*-GFP) markiert Zellen im anterioren Bereich der Slugspitze (Abb. 13). Während in neu gebildeten Slugs markierte Zellen nur in der Spitze lokalisiert sind, befinden sich mit zunehmendem Alter der Slugs immer mehr *pstA*-GFP-markierte Zellen im Prespore-Bereich (Abb. 15).

#### 3.2.1.2. W2/W7-GFP unter dem *pst0* Promotor

Unter dem *pst0*-Element des *ecmA* Promotors exprimiertes W2- bzw. W7-GFP (*pst0*-GFP) ist in Slugs im Prestalk-Bereich lokalisiert und auch einzelne Zellen in der Prespore Zone sind markiert. Im „First-Finger“-Stadium neugebildeter Slugs, bevor der Slug zu wandern beginnt, liegt *pst0*-GFP im hinteren Bereich der Prestalk-Zone, nicht jedoch im vorderen Spitzenbereich vor (Abb. 14A, B). In migrierenden Slugs befinden sich viele *pst0*-GFP-Zellen auch im vorderen Prestalk-Bereich, so daß die beiden Abschnitte der Prestalk-Zone nicht



**Abb. 15)** 48 Stunden alte *pstA*-GFP Slugs. Maßstab: 100  $\mu$ m. A: *xy*-Schnitt im mittleren Bereich eines Slugs (Aufsicht). Im Prespore-Bereich sind viele markierte Zellen vorhanden. In der Längsachse ist im hinteren Prestalk- und vorderen Prespore-Bereich eine *pstA*-GFP enthaltende Zellgruppe lokalisiert (Pfeilspitze). B: Projektionsbild des Prespore-Bereichs eines Slugs (Aufsicht). Die im Prespore-Bereich verteilten *pstA*-GFP-Zellen sind deutlich erkennbar. Rechts: anterior. C: Projektionsbild des Prespore-Bereichs eines Slugs (seitl. Ansicht). Pfeilspitzen: Zellgruppen an der Slugunterseite und am Hinterende.

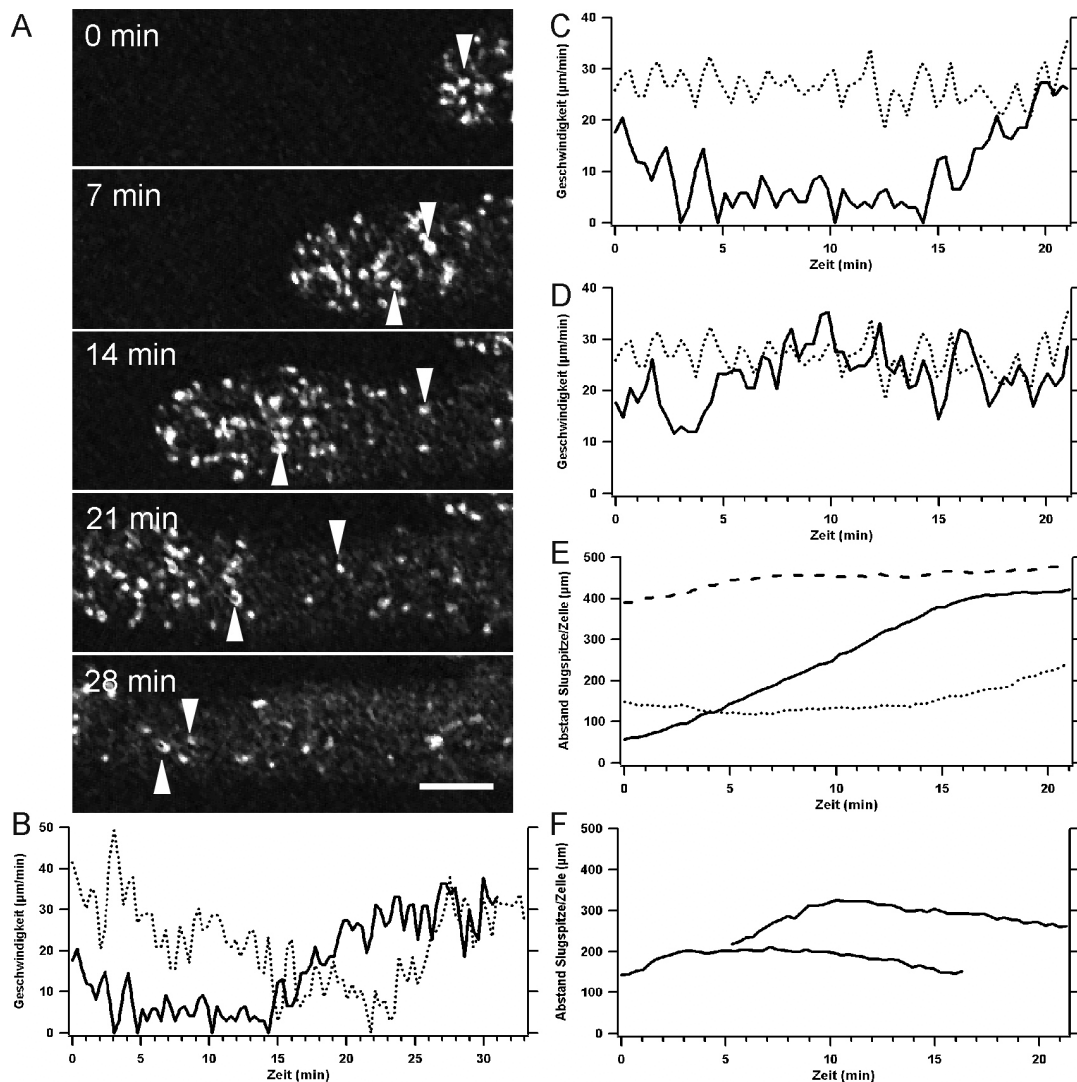
mehr unterschieden werden können (Abb. 14C). Wie auch bei *pstA*-GFP nimmt die Zahl der markierten Zellen im Prespore-Bereich mit dem Alter der Slugs zu.

### 3.2.2. Zurückfallen von Zellen aus dem Prestalk-Bereich

Bei Mischungen von 1-5% mit *pstA*-GFP transformierten Zellen mit ungefärbten Zellen kann das Verhalten einzelner markierter Zellen in der Spitze verfolgt werden. In diesen Versuchen läßt sich folgendes Verhalten beobachten:

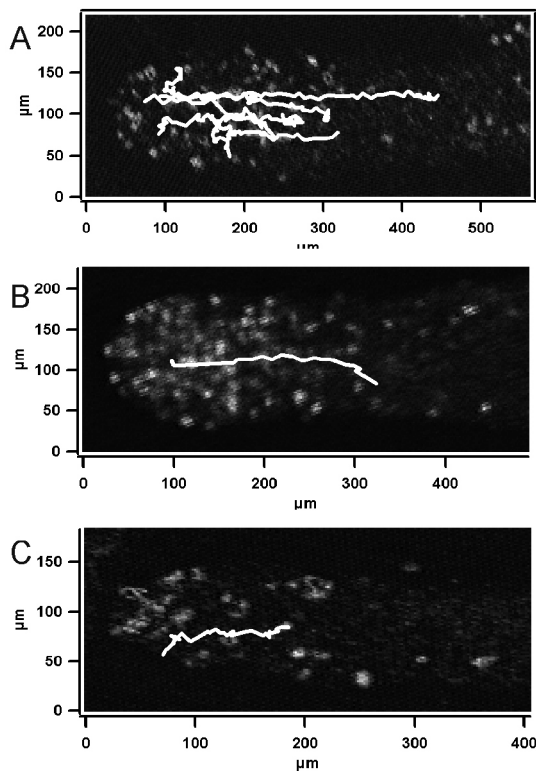
Einzelne Zellen in der Spitze wandern in die Mitte und fallen entlang der zentralen Sluglängsachse teilweise bis in den Prespore-Bereich zurück (Abb. 16, 17). Anschließend wird die Vorwärtsbewegung mit einer dem Slug angepaßten Geschwindigkeit wieder aufgenommen (Abb. 16A-C, E). Das Absinken und der Wiederanstieg der Geschwindigkeiten solcher Zellen sind in Abb. 16B deutlich erkennbar und unterscheiden sich von dem Verhalten von Zellen im Prespore-Bereich (Abb. 16D). Der Anstieg des Abstands zwischen Slug-Spitze und Zelle kann bei zwei zurückfallenden Zellen zeitversetzt beobachtet werden (Abb. 16E). Die Geschwindigkeit einer dieser Zellen paßt sich nach 15 Minuten wieder an die Slug-Geschwindigkeit an, der Abstand bleibt danach konstant. Im Vergleich bleibt der Abstand zwischen der Spitze und Zellen im Prespore-Bereich während der gesamten Messung gleich (Abb. 16E). Das Auswandern von Zellen aus der Slugspitze ist ein passiver Bewegungsvorgang, der durch eine Verlangsamung bzw. durch das Stehenbleiben der betroffenen Zellen im sich vorwärtsbewegenden Slug und nicht durch eine aktive Rückwärtsbewegung zustandekommt (Abb. 16A-C). Die Zellen sind während dieser Phase langsamerer Bewegung nicht inaktiv sondern ändern ihre Zellform und bilden Pseudopodien





**Abb. 16)** Einzelne Zellen aus dem pstA-Bereich fallen über das Zentrum in den Prespore-Bereich zurück. A) Zeitserie eines Slugs mit pstA-GFP-markierten Zellen. Während sich der Slug vorwärts bewegt, werden einzelne Zellen (Pfeilspitzen) aus der Spitze für mehrere Minuten langsamer bzw. bleiben stehen.  $\_$ : Zelle 1,  $\_$ : Zelle 2. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . B: Geschwindigkeit von Zelle 1 (durchgezogen) und Zelle 2 (punktiert) C: Geschwindigkeit von Zelle 1 und des Slugs (punktiert). D: Geschwindigkeit einer pstA-GFP-markierten Zelle aus dem Prespore-Bereich und des Slugs (punktiert). E: Abstand zwischen der Slugspitze und Zelle 1 (durchgezogen), Zelle 2 (punktiert) und einer Zelle aus dem Prestalk-Bereich (gestrichelt). F: Abstand zwischen der Slugspitze und zwei zurückfallenden Zellen, die noch im Prestalk-Bereich ihre Vorwärtsbewegung wieder aufnehmen. Die Zellen kehren in den Spitzenbereich zurück, wie die Verringerung des Abstands zur Spitze zeigt.

aus, bewegen sich aber nicht gerichtet. Die Dauer der vorübergehenden Geschwindigkeitsverminderung ist für die einzelnen Zellen hierbei sehr unterschiedlich (7- 17min, durchschnittlich 10 min,  $n=14$ ), viele nehmen die Vorwärtsbewegung deswegen schon im Prestalk-Bereich wieder auf. Nur ca. 20% der zurückfallenden Zellen fangen erst in der Prespore Zone an, sich wieder vorwärtszubewegen. Bei den nicht weit genug zurückgefallenen Zellen im Prestalk-Bereich kann eine erneute Bewegung zur Slugspitze hin



**Abb. 17)** A-C: Zellen wandern über das Zentrum aus der Slugspitze nach hinten. Beispiele von Zelltrajektorien in Relation zur Spitze aus drei Slugs. Das zurückfallende Bewegungsverhalten läßt sich nur bei Zellen beobachten, die sich in die Mitte der Spitze bewegt haben.

beobachtet werden (Abb. 16F). Die einsetzende Vorwärtsbewegung ist nicht so deutlich, da sie in derselben Richtung wie die Slugbewegung stattfindet.

Zellen zeigen das zurückfallende Bewegungsverhalten nur, wenn sie in die zentrale Längsachse des Slugs eintreten (Abb. 17) und bewegen sich wieder mit einer dem Slug angepaßten Geschwindigkeit, sobald sie die Längsachse verlassen, bzw. wenn sie aus der Prestalk- in die Prespore-Region übergegangen sind.

Bei diesem Zurückfallen von Prestalk-Zellen scheint es sich um einen während der Migration von Slugs kontinuierlich stattfindenden Vorgang zu handeln. Die Zellen, die weit genug zurückbleiben, verteilen sich dabei in der Prespore Zone. Eine Schätzung der Zahl der auf diese Weise in den Prespore-Bereich gelangenden Prestalk-Zellen in 24h alten Slugs liegt bei ca. 200 pro Stunde, wobei dieser Wert aufgrund der Zahl der ausgewerteten Beobachtungen (n=3) und möglicher Schwankungen im Mischungsverhältnis von markierten und Wildtypzellen nur ein Anhaltspunkt ist. Ein Rückfluß dieser Größe erklärt die vielen in alten Slugs im Prespore-Bereich vorliegenden mit pstA-GFP-markierten Zellen.

In Slugs, die älter als 48 Stunden sind und die ausschließlich aus mit pstA-GFP transformierten Zellen bestehen, befinden sich in der vorderen Region des Slugs in der Längsachse oft kompakte Gruppen von GFP-markierten Zellen (Abb. 15A). Diese Zellen werden ähnlich der oben beschriebenen Weise aus der Slugspitze nach hinten verlagert.

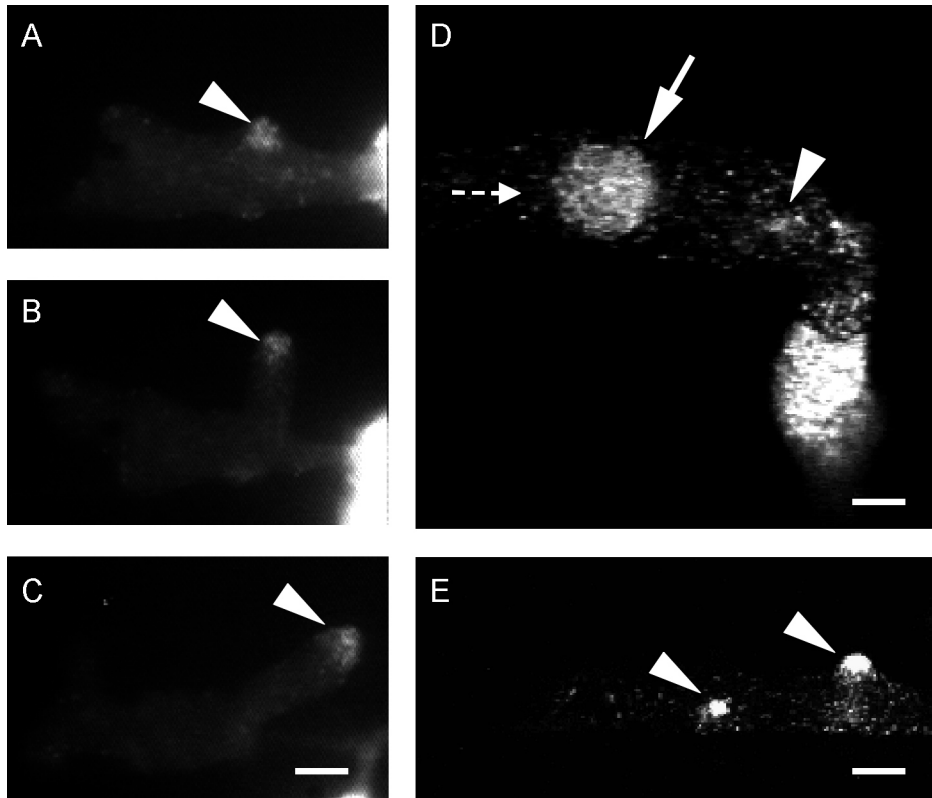
Das bei pstA-GFP-markierten Zellen dargestellte Verhalten kann auch in pst0-GFP Slugs beobachtet werden.

### **3.2.3. Bildung von neuen Spitzen**

In einem normal migrierenden Slug gibt es nur eine, die Bewegung der restlichen Zellen kontrollierende Spitze. Transplantationsexperimente haben gezeigt, daß die etablierte Spitze die Bildung weiterer Spitzen inhibiert, wobei die Effizienz dieser Inhibition entfernungsbedingt in Form eines Gradienten abnimmt (Durston, 1976). Bei Entfernung der Spitze bildet sich aus den im Prespore-Bereich vorliegenden ALCs innerhalb von 1-2 Stunden eine neue Spitze (Sternfeld und David, 1981; Sternfeld und David, 1982). Koffein blockiert die cAMP-abhängige Aktivierung der Adenylyl Cyclase A (Brenner und Thoms, 1984; Theibert und Devreotes, 1983) und es wurde gezeigt, daß Slugs auf koffeinhaltigem Agar ihre Vorwärtsbewegung einstellen und sich in gleichmäßigen Abständen neue Zentren bilden, in denen sich die im Prespore-Bereich vorliegenden ALCs ansammeln (Siegert und Weijer, 1993). Um das Verhalten der mit pstA- bzw. mit pst0-GFP-markierten Zellen bei der Neubildung von Spitzen zu untersuchen, wurden 28 Slugs verschiedener Altersstufen auf 5 mM Koffein enthaltenden Wasseragar transferiert und in Aufsicht und von der Seite in xyt- und 4D-Messungen betrachtet.

#### **3.2.3.1. pstA-GFP-markierte Zellen**

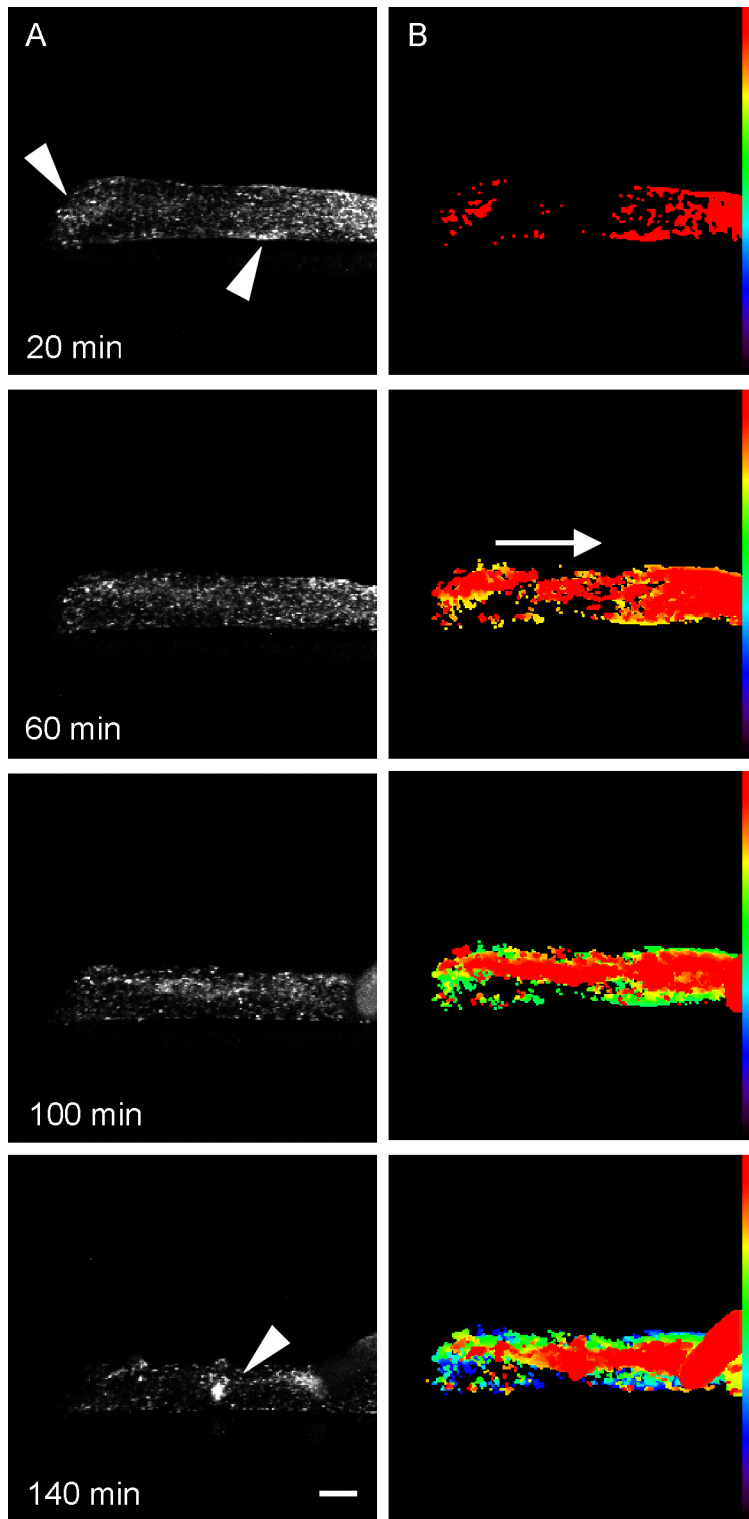
PstA-GFP-markierte Zellen im Prespore-Bereich bewegen sich spezifisch in sich neu bildende Spitzen (Abb. 18A-C). Spitzen entwickeln sich aus rotierenden Zentren, in denen pstA-GFP-Zellen lokalisiert sind (Abb. 18D). Die Spitzen wachsen nach oben und ziehen Prespore-Zellen mit. Dieser Vorgang kann sehr gut in älteren Slugs beobachtet werden, bei denen viele pstA-GFP-Zellen im Prespore-Bereich vorhanden sind (Abb. 18E). In neu gebildeten Spitzen befinden sich die pstA-GFP-markierten Zellen im vordersten Bereich und nehmen damit Positionen ein, die der Lokalisierung im pstA-Bereich der ursprünglichen Spitze entsprechen (Abb. 18A-C, E). Vor der durch Koffein induzierten Spitzenneubildung liegen diese Zellen in der Prespore-Zone in verschiedenen Bereichen vor und wandern von dort zu den Orten der Spitzenbildung. Im hinteren Bereich der Prespore Zone, der auch als „Rearguard“-Region bezeichnet wird (Abb. 5), befindet sich eine Anreicherung von pstA-GFP-Zellen, ebenso an der Slugunterseite in der vorderen Hälfte der Prespore Zone nahe dem Prestalk-Bereich (Abb.



**Abb. 18)** Bildung von neuen Zentren und Spitzen im Prespore-Bereich von *pstA-GFP* Slugs auf 5 mM Koffeinagar. Maßstab: 100 $\mu$ m. A-C: Seitenansicht eines Slugs während der Spitzenbildung (Pfeilspitzen). Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop. A: 100 min nach Transfer. B: 180 min. C: 270 min. *pstA-GFP* ist weiterhin spezifisch in der Spitze vorhanden. D: xy-Schnitt eines Slugs in Aufsicht 180 min nach Transfer (150 min nach Abb. 2A). Ein rotierendes Zentrum aus *pstA-GFP*-Zellen (Pfeil) hat sich 90 min nach dem Transfer aus einer vom Slughinterende kommenden Population von Zellen gebildet (gestrichelter Pfeil: Bewegungsrichtung). E: Projektionsbild des Prespore-Bereichs eines Slugs 160 Minuten nach Transfer (seitl. Ansicht). Rechts: anterior. Pfeilspitzen: Neue Spitzen im Prespore-Bereich.

19A). Beide sind an der Neubildung von Spitzen beteiligt. In von der Seite gemachten 4D-Aufnahmen kann beobachtet werden, wie Zellen aus dieser unteren Population nach oben zu sich neu bildenden Zentren wandern (Abb. 19). Ebenso bewegen sich die mit *pstA-GFP*-markierten Zellen aus der Rearguard-Region des Slugs spezifisch in die Gebiete, in denen neue Zentren gebildet werden (Abb. 18D, 19). Die Verlagerung der distalen Zellen beginnt mit einer Vorwärtsbewegung der Zellen in der vom koffeinhaltigen Substrat weiter entfernten Slugoberseite auf die ursprüngliche Spitze zu. Sobald sich entlang der Sluglängsachse neue Zentren bilden, beenden diese Zellen ihre Vorwärtsbewegung und bewegen sich gerichtet in das ihnen am nächsten liegende Zentrum.

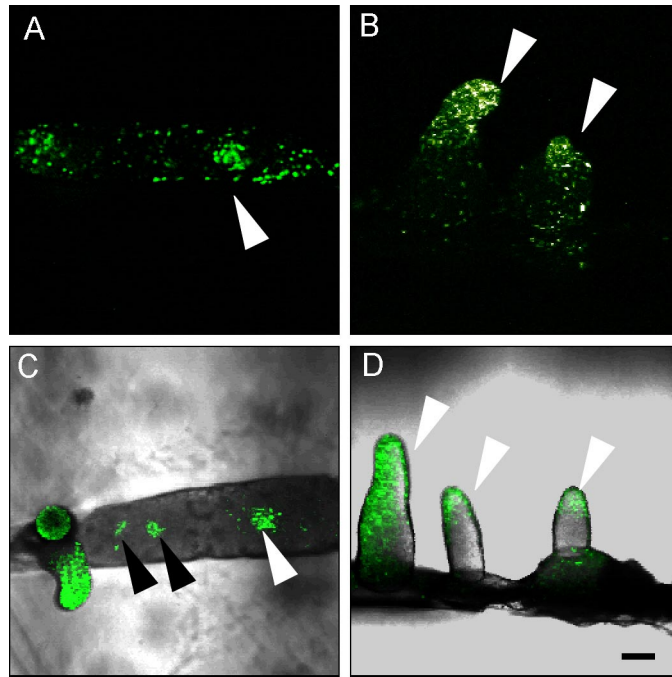
Die aus der Spitze zurückfallenden, mit *pstA-GFP*-markierten Zellgruppen (Abb. 15A) zeigen bei der Neubildung von Spitzen ein aufschlußreiches Verhalten. Obwohl sie im migrierenden Slug aus der Spitze auswandern, bewegen sie sich bei Transfer auf Koffein wieder auf die



**Abb. 19)** Bewegung von pstA-GFP-markierten Zellen in einem Slug (48h) während der Neubildung von Spitzen nach Transfer auf 5 mM Koffeinagar. A: 4D-Messung des Prespore-Bereichs. Rechts: anterior. Maßstab 100  $\mu$ m.

20 min: Ansammlungen pstA-GFP-markierter Zellen sind an der Slugunterseite und am Hinterende vorhanden (Pfeilspitzen). Innerhalb von zwei Stunden bilden sich neue Spitzen im Prespore-Bereich in denen pstA-GFP exprimierende Zellen im vordersten Bereich lokalisiert sind (Pfeilspitze bei 140 min). Maßstab: 100  $\mu$ m  
 B: Darstellung der Bewegungstrajektorien der Zellen des in A gezeigten Slugs. Die Zellen beginnen, sich vom Hinterende weg nach vorne zu bewegen (Pfeil) und werden in die sich im Prespore-Bereich bildenden Zentren rekrutiert.

Spitze zu, bzw. wandern an die Slugoberseite und bilden eigene Zentren, wenn sie weit genug von der ursprünglichen Spitze entfernt sind (Abb. 18D, 19). Auch Zellen, die bis in die Rearguard-Region des Slugs zurückgefallen sind, zeigen noch dieses Verhalten

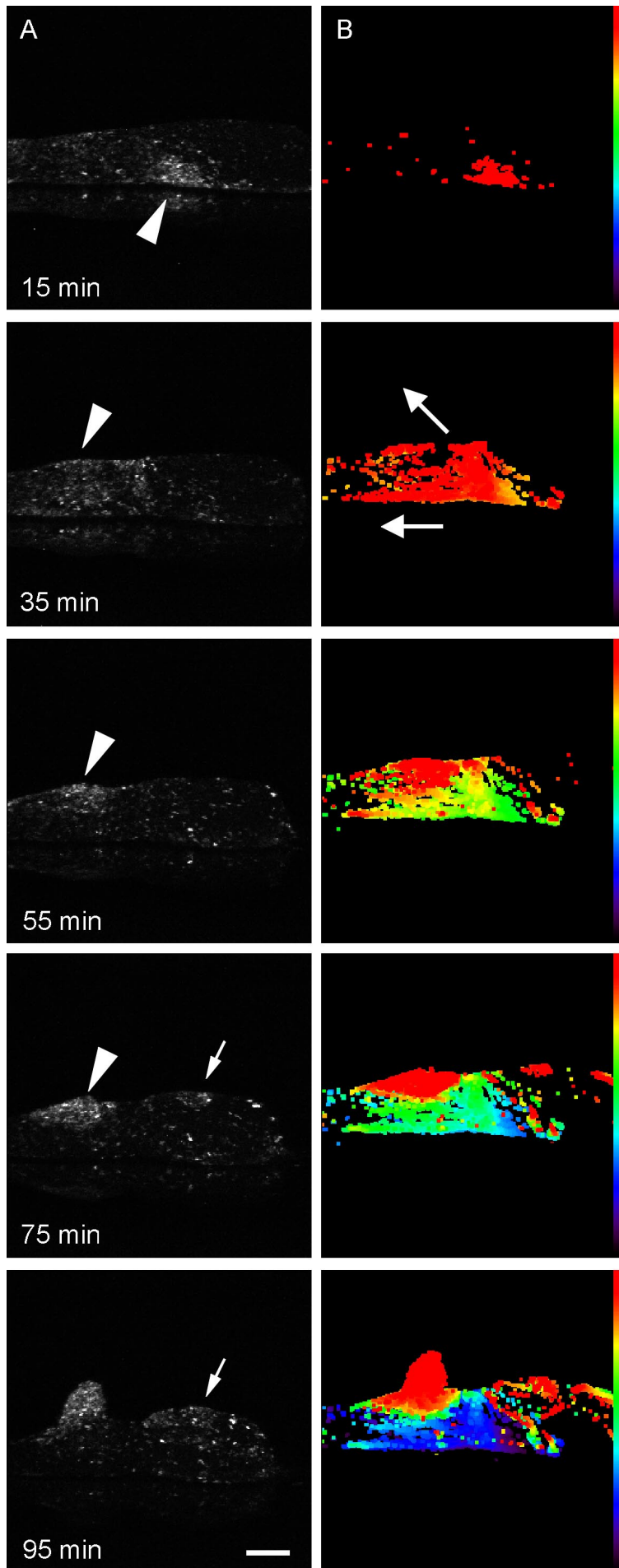


**Abb. 20)** Bildung neuer Spitzen im Prespore-Bereich von *pst0*-GFP Slugs auf 5 mM Koffeinagar. Links: anterior. A: xy-Schnitt im Prespore-Bereich eines Slugs (48h) 150 min nach dem Transfer (Aufsicht). Es hat sich ein rotierendes Zentrum aus *pst0*-GFP-Zellen (Pfeilspitze) im hinteren Prespore-Bereich gebildet. B: Projektionsbild zweier neugebildeter Spitzen (Pfeilspitzen) im Prespore-Bereich eines Slugs (48h) 140 min nach dem Transfer (seitl. Ansicht). C: Projektionsbild eines Slugs (24h) 120 min nach dem Transfer in Aufsicht. Im Prespore-Bereich befinden sich drei rotierende Zentren (Pfeilspitzen). D: Projektionsbild eines Slugs (72h) 180 min nach dem Transfer (seitl. Ansicht). Es haben sich drei neue Spitzen gebildet in denen *pst0*-GFP-Zellen im Prestalk-Bereich lokalisiert sind (Pfeilspitzen). Maßstab: 100  $\mu$ m

### 3.2.3.2. *pst0*-GFP-markierte Zellen

Aufgrund der Stabilität von GFP und dem von vielen Prestalk-Zellen durchlaufenen Differenzierungsweg ( $ALC/pst0 \Rightarrow pstA \Rightarrow pstAB$ , Abe et al., 1994; Sternfeld, 1992) ist es vor allem im Prespore-Bereich nicht möglich, diese Zellpopulationen mit einem *pst0*-GFP Reporter zu unterscheiden. Ähnlich wie mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot (Weijer et al., 1987) wird also eine Gruppe unterschiedlicher Zelltypen mit gemeinsamen Eigenschaften markiert, die sich in ihrem Verhalten von Prespore-Zellen unterscheiden. Ergänzend zu den für *pstA*-GFP gemachten Beobachtungen, bei denen die Zelltypen deutlicher definiert sind, werden im folgenden Messungen gezeigt, die Abläufe bei der Neubildung von Spitzen mit Hilfe von 4D-Messungen illustrieren.

*Pst0*-GFP-Zellen bewegen sich gezielt zu den Zentren, die sich an der Slugoberseite bilden. In diesen Zentren kommt es zu einer starken horizontalen Rotationsbewegung der *pst0*-GFP-Zellen (Abb. 20A, C), die der mit *pstA*-GFP-Zellen beobachteten Bewegung entspricht (Abb. 18D). *Pst0*-GFP-Zellen sind im gesamten vorderen Bereich der sich aus den Zentren



**Abb. 21)** Spitzenbildung in einem *pst0-GFP* Slug (48h) auf 5 mM Koffeinagar.

A: 4D-Messung des Prespore-Bereichs. Links: anterior. Maßstab: 100  $\mu$ m

15 min: Ansammlung markierter Zellen im vorderen Bereich der Prespore-Zone an der Slugunterseite (Pfeilspitze). 35 min: Pfeilspitze: Neu entstehendes Zentrum.

55 min: Die Zellen im Zentrum (Pfeilspitze) beginnen zu rotieren. 75 min: Pfeilspitze: Spitzenbildung. Pfeil: Neues Zentrum 95 min: Die Zellen im zweiten Zentrum (Pfeil) beginnen zu rotieren.

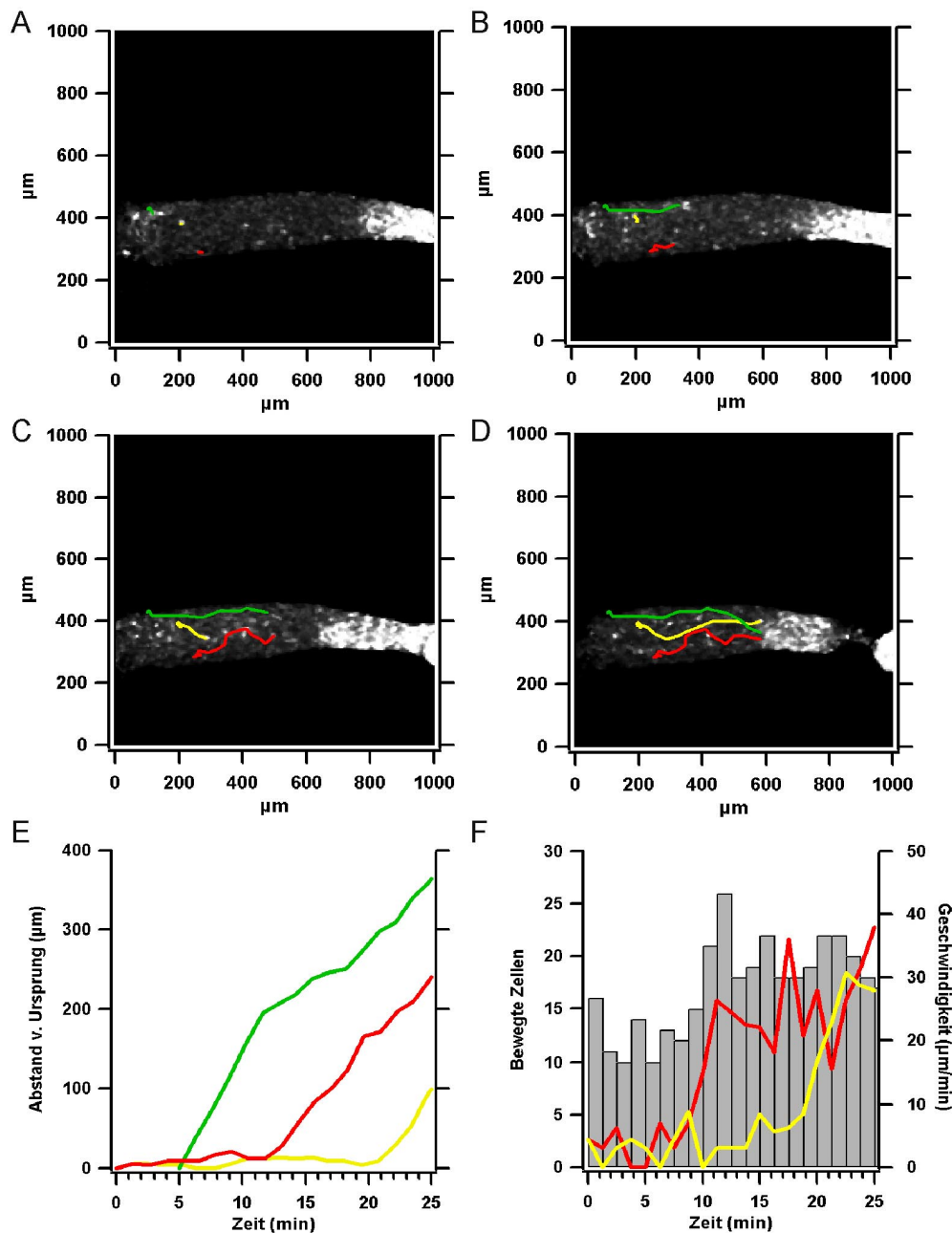
B: Darstellung der Bewegungstrajektorien der Zellen des in A gezeigten Slugs. Die Bewegung der Zellen zur ursprünglichen Spitze und an die Slugoberseite ist deutlich erkennbar (Pfeile).

entwickelnden Spitzen lokalisiert. Die neuen Spitzen entwickeln sich innerhalb der nächsten Stunde weiter, wobei sie ähnlich dem First-Finger-Stadium in die Höhe wachsen (Abb. 20B, D). Dieses Abheben vom Substrat ist wahrscheinlich durch das im Agar vorhandene Koffein bedingt, das eine koordinierte Bewegung auf dem Substrat verhindert. Die in ihrem Bereich befindlichen Prespore-Zellen werden in diese neue Struktur gezogen.

Der Ablauf der Spitzenbildung ist in Abb. 21 gezeigt. Deutlicher als bei den mit *pstA*-GFP-markierten Slugs ist bei älteren *pst0*-GFP-Slugs die basale Zellpopulation markiert (Abb. 21, 15 min). Innerhalb von 15 Minuten nach dem Transfer auf 5 mM Koffein-Agar, jedoch nach Einstellung der Slugbewegung, beginnen Zellen aus dieser Gruppe sich in Richtung der ursprünglichen Spitze zu bewegen. Nach 35 Minuten ist die Zellgruppe teilweise zur ursprünglichen Spitze, teilweise an die Slugoberseite gewandert, wo sich ein Zentrum bildet. Die Zellen in diesem Zentrum beginnen mit einer schnellen, zweidimensionalen Rotationsbewegung (Abb. 21A, B bei 55 min, in Aufsicht in Abb. 20A, C dargestellt). Immer mehr markierte Zellen sammeln sich im Zentrum (Abb. 21A, B, 75 min). Die Rotationsbewegung der Zellen wird durch Ausdehnung nach oben dreidimensional und eine Spitze beginnt sich zu bilden. Im hinteren Prespore-Bereich entsteht ein weiteres Zentrum. 95 Minuten nach dem Transfer auf Koffeinagar ist die neugebildete Spitze in die Höhe gewachsen. *pst0*-GFP-markierte Zellen sind dabei in der gesamten Spitze lokalisiert. Im sich daneben bildenden Zentrum hat eine Rotationsbewegung eingesetzt. Die Zellen im Prestalk-Bereich der in die Höhe wachsenden Spitze bewegen sich in einer nach oben gerichteten Spirale, die der Bewegung von Zellen im Prestalk-Bereich migrierender Slugs (Siegert und Weijer, 1992) entspricht. *Pst0*-GFP-markierte Zellen nehmen im Vergleich zu *pstA*-GFP-Zellen einen größeren Bereich des Prestalk-Bereichs ein (Abb. 18A-C, E, 20B, D). Dies paßt zu den für die verschiedenen Typen von Prestalk-Zellen gezeigten Lokalisierungen in den Spitzen von Slugs (Jermyn et al., 1989). Bemerkenswert ist dabei, daß der *pstA*-Bereich der neuen Spitze von Anfang an im gleichen Maß wie der *pst0*-Bereich durch *pst0*-GFP markiert ist.

Bei Slugs auf Koffeinagar bildet die ursprüngliche Tip oft aus einem großen Teil des Prestalk-Bereichs ein eigenes Aggregat, das sich vom Prespore-Bereich löst. Zellen des *pst0*-Bereichs verbleiben dabei jedoch beim Prespore-Bereich. Aus diesen *pst0*-GFP-markierten Zellen bildet sich ein neues Zentrum (wie in Abb. 22), bzw. sie werden vom nächstliegenden neugebildeten Zentrum im Prespore-Bereich angezogen.





**Abb. 22)** 4D-Bewegungstrajektorien von drei *pst0*-GFP-markierten Zellen während der Spitzenbildung in einem Slug (24h) auf 5 mM Koffeinagar (Aufsicht). A-C: Bewegungsspuren der verfolgten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. A: 35 min (nach Transfer) B: 45 min C: 55 min D: Gesamtrajektorien (dargestellt bei 65 min, die Zellen gingen jedoch nicht gleichzeitig in das neue Zentrum ein). E,F: Die Zeitachse bezieht sich auf den Beginn der Messung (30 min nach Transfer). E: Entwicklung des Abstands vom Ausgangspunkt für die in A-D gezeigten Zellen. F: Geschwindigkeitsprofile von zwei der Zellen in A-D, verbunden mit einer Analyse der bewegten Zellen im hinteren Prespore-Bereich des Slugs.

### 3.2.3.3. 4D-Zellverfolgung einzelner *pst0*-GFP-Zellen

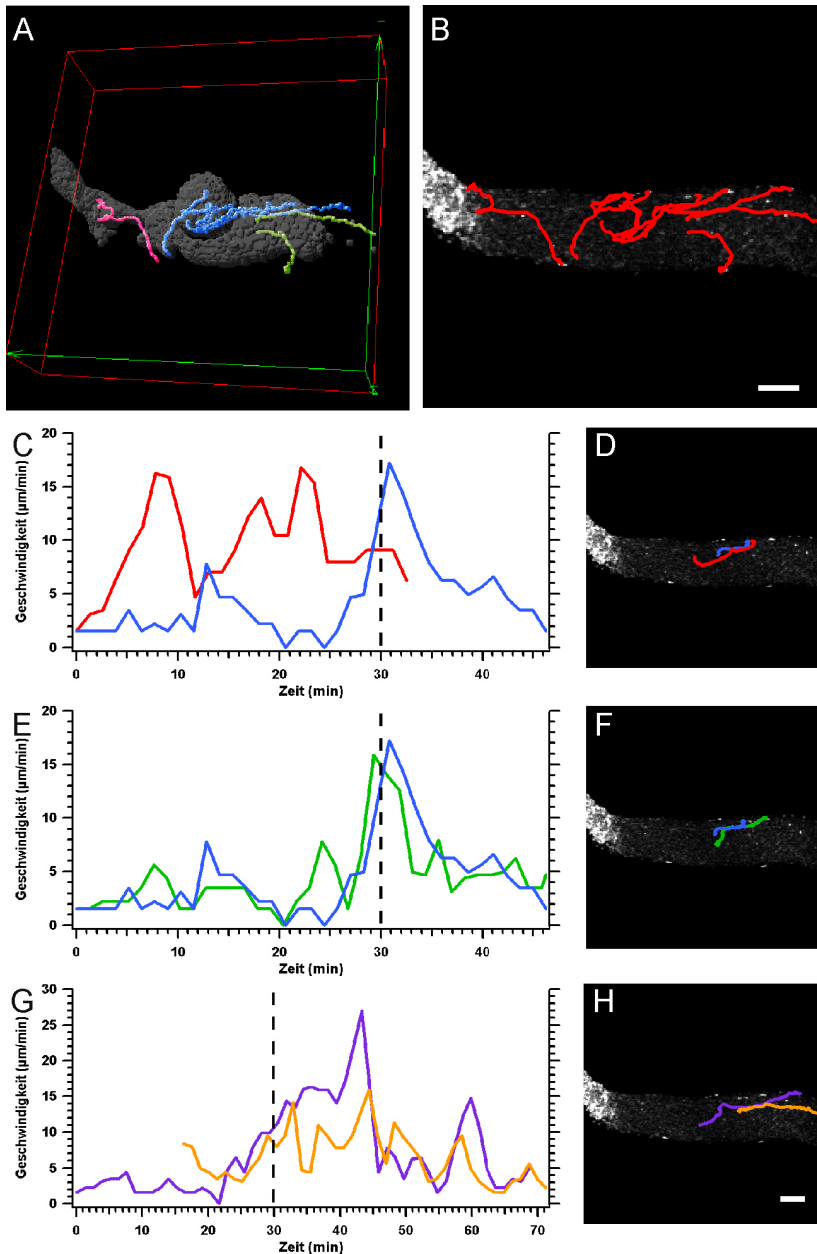
Während ältere Slugs (>48h) für die Verfolgung der an der Spitze Neubildung beteiligten Zellpopulationen geeignet sind, da bei ihnen viele Zellen im Prespore-Bereich markiert sind,

eignen sich jüngere Slugs (ca. 24h) aufgrund der geringeren Zahl an fluoreszierenden Zellen für die 4D-Verfolgung einzelner Zellen.

Da die Durchdringung ganzer Slugs auch mit einem Konfokalmikroskop unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich ist, wurden 4D-Messungen von Slugs von der Seite und in Aufsicht gemacht.

Eine in Messungen mit vielen markierten Zellen gemachte Beobachtung läßt sich bei der Verfolgung einzelner mit pst0-GFP-markierter Zellen bestätigen. Innerhalb der Gesamtgruppe der pst0-GFP-Zellen verhalten sich einzelne Zellen sehr unterschiedlich. In Abb. 22 ist gezeigt, wie sich 30 Minuten nach dem Transfer auf Koffein ein neues Zentrum aus Zellen des Prestalk-Bereichs bildet, die in den Prespore-Bereich einwandern. Pst0-GFP-Zellen aus dem hinteren Prespore-Bereich reagieren zu unterschiedlichen Zeiten auf dieses sich bildende Zentrum (Abb. 22A-E). Die Entfernung zum Signalzentrum ist nicht der entscheidende Faktor für das Verhalten, da die am weitesten entfernt liegende Zelle vor den sich näher an der Spitze befindenden Zellen anfängt, sich gerichtet zu bewegen.. Abb. 22F zeigt, daß das für einzelne Zellen demonstrierte Bewegungsverhalten von ganzen Gruppen von Zellen geteilt wird. Gleichzeitig mit dem Einsetzen der gerichteten Bewegung der gezeigten Zellen erhöht sich die Gesamtzahl der bewegten Zellen (11 min, 21 min).

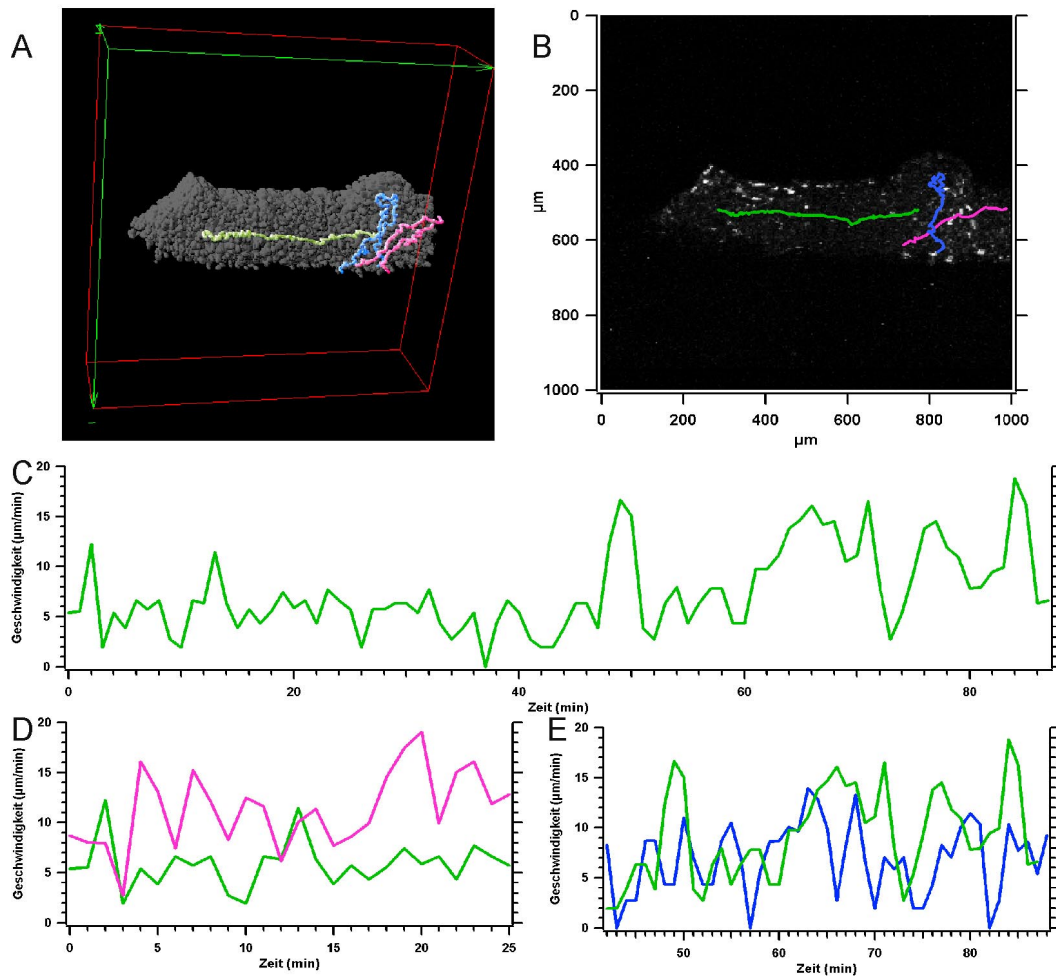
Abb. 23 zeigt den Prespore-Bereich eines Slugs 40 Minuten nach dem Transfer auf Koffein. Pst0-GFP-markierte Zellen aus dem Prespore-Bereich bewegen sich auf ein entstehendes Zentrum zu und gehen in die sich dort bildende Spitze ein (Abb. 23A, B). Benachbarte Zellen zeigen dabei unterschiedliches Verhalten (Abb. 23C, D). Während sich die eine Zelle in das Gebiet bewegt, in dem sich die neue Spitze bilden wird, bleibt die zweite Zelle nahe der ursprünglichen Position. Erst 30 Minuten später bewegt sich die zweite Zelle auf das neue Zentrum zu. Die erste Zelle befindet sich zu diesem Zeitpunkt schon im Zentrum. Zeitgleich mit der zweiten Zelle beginnen sich andere Zellen auch aus anderen Bereichen gerichtet auf das Zentrum zuzubewegen (Abb. 23E-H). Es ist anzunehmen, daß sich zu diesem Zeitpunkt das neue Zentrum etabliert. Wie schon bei den Zellen in Abb. 22 sind die Unterschiede in der Zellbewegung also nicht individuell und damit (idealerweise) gleichmäßig verteilt, sondern repräsentieren das Verhalten ganzer Zellgruppen, die während verschiedener Phasen der Spitzenneubildung rekrutiert werden. Die Messungen in Abb. 22 und 23 sind in Aufsicht gemacht und beschreiben das Verhalten von Zellen der Slugoberseite. Die Bewegung im Prespore-Bereich auf das neue Zentrum zu ist relativ zweidimensional und wird erst in der sich neu bildenden Spitze dreidimensional (Abb. 23).



**Abb. 23)** 4D- Bewegungstrajektorien einzelner pst0-GFP-markierter Zellen während der Spitzenbildung in einem Slug (24h) auf 5 mM Koffeinagar (Auf-sicht). Maßstab B, H: 100 µm A: Räumliche Darstellung der Zelltrajektorien während der Spitzenbildung. Blau: An der Spitzenbildung beteiligte Zellen. Rosa: In die ursprüngliche Spitze wandernde Zelle. Grün: Zur neugebildeten Spitze wandernde Zellen. B: Die Bewegungsspuren der verfolgten Zellen in Aufsicht. Deutlich ist die Rotationsbewegung im sich bildenden Zentrum zu sehen. C, D: Geschwindigkeit zweier benachbarter Zellen im Prespore-Bereich mit unterschiedlichem Verhalten und ihre Bewegungsspuren. E, F: Geschwindigkeit zweier benachbarter Zellen im Prespore-Bereich mit ähnlichem Verhalten und ihre Bewegungsspuren. Die blaue Zelle ist dieselbe wie in C. G, H: Geschwindigkeit zweier Zellen aus dem hinteren Prespore-Bereich und ihre Bewegungsspuren.

Die in Abb. 23 dargestellte Messung zeigt auch, wie eine im vorderen Prespore-Bereich liegende Zelle sich zur ursprünglichen Spitze bewegt, während eine Zelle aus ihrer Nähe zum neu gebildeten Zentrum wandert. Dies illustriert die Konkurrenz zwischen dem etablierten und dem sich bildenden Signalzentrum.

In der von der Seite aufgenommenen 4D-Messung in Abb. 24 kann das Verhalten von Zellen der Slugunterseite 20 Minuten nach dem Transfer verfolgt werden. Zellen aus der basalen Gruppe von ALCs werden teilweise von der ursprünglichen Spitze angezogen, teilweise gehen sie in das sich neu bildende Zentrum (Abb. 24A, B). Wie schon für pstA-GFP beschrieben, bewegen sich pst0-GFP-markierte Zellen aus dem hinteren Prespore-Bereich nach Einstellung der Slugbewegung nach vorne und gehen in sich im Prespore-Bereich



**Abb. 24)** 4D-Bewegungstrajektorien einzelner *pst0*-GFP-markierter Zellen während der Spitzenbildung in einem Slug (24h) auf 5 mM Koffeinagar (seitl. Ansicht). Rechts: anterior A: Räumliche Darstellung der Zelltrajektorien während der Spitzenbildung. Blau: An der Spitzenbildung beteiligte Zellen aus einer Zellgruppe an der Slugunterseite. Rosa: In die ursprüngliche Spitze wandernde Zellen. Grün: Zur neugebildeten Spitze wandernde Zelle. B: Bewegungstrajektorien der in C-E gezeigten Zellen, gleiche Farbkodierung wie in A. C-E: Die Zeitachse bezieht sich auf den Beginn der Messung (20 min nach Transfer). C: Geschwindigkeit der in A und B grün markierten Zelle. D: Geschwindigkeit der in C dargestellten Zelle (grün) und einer zur ursprünglichen Spitze wandernden Zelle (rosa). E: Geschwindigkeit der in C dargestellten Zelle (grün) und einer an der Spitzenneubildung beteiligten Zelle der basalen Zellgruppe (blau).

bildende Spitzen ein (Abb. 24A-C) Die geradlinigen Bewegungsspuren solcher Zellen passen zu den in Aufsicht gemachten Beobachtungen für Zellen aus dem oberen Slugbereich. Der Vergleich einer aus dem vorderen und einer aus dem hinteren Bereich nach vorne wandernden *pst0*-GFP-markierten Zelle zeigt deutliche Unterschiede in der Geschwindigkeit der gerichteten Bewegung (Abb. 24D). Die näher am Signalzentrum liegende Zelle hat eine durchschnittliche Geschwindigkeit von  $11.3 \mu\text{m}/\text{min}$ , während die weiter entfernte Zelle sich im selben Zeitraum mit durchschnittlich  $5.3 \mu\text{m}/\text{min}$  bewegt. Dies ist ein Indiz für die durch Koffein bedingte Störung der Kommunikation im Slug. 40 Minuten nach Beginn der Messung ( $\Rightarrow$  ca. 60 Minuten nach dem Transfer) beginnen sich einzelne Zellen aus der basalen

Population von ALCs nach oben zu bewegen (Abb. 24A, B). Zu diesem Zeitpunkt bildet sich ein neues Zentrum und beeinflusst die Zellen im Prespore-Bereich. Zeitgleich mit dem Einsetzen der nach oben gerichteten Bewegung einer Zelle der basalen Zellgruppe kommt es zu einem Anstieg der Geschwindigkeit der im Prespore-Bereich verfolgten Zelle (Abb. 24C, E). Betrug die Durchschnittsgeschwindigkeit in den ersten 40 Minuten der Messung  $5.3 \mu\text{m}/\text{min}$  so erhöht sie sich nun auf  $9.7 \mu\text{m}/\text{min}$ . Zellen, die sich zwischen der alten und der neuen Spitze befinden (in Abb. 24 nicht eingezeichnet) bewegen sich nicht mehr so gerichtet bzw. ändern mehrfach ihre Bewegungsrichtung zwischen den Zentren, bevor sie endgültig in eine Richtung wandern. Eine Zelle, die zur ursprünglichen Spitze wandert (Abb. 24A) hat nur noch eine Durchschnittsgeschwindigkeit von  $7.4 \mu\text{m}/\text{min}$ , deutlich weniger als die Zelle die vor der Bildung des neuen Zentrums in die ursprüngliche Spitze wanderte ( $11.3 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Der Großteil der *pst0*-GFP-markierten Gruppe von basalen Zellen beginnt sich erst 30 Minuten (90 Minuten nach Transfer) nach der ersten nach oben gewanderten Zelle nach oben zu bewegen. Zu diesem Zeitpunkt ist die erste Zelle im Zentrum an der Slugoberseite angekommen und es beginnt sich eine neue Spitze zu bilden. Die Bewegung der Gruppe von basalen Zellen nach oben fängt gleichzeitig an und ist schnell ( $11.7 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n=2$ ) und gerichtet.

#### **3.2.3.4. Dynamik der *pst0*-GFP Expression in Slugs**

In jungen Slugs mit relativ wenigen *pst0*-GFP gefärbten Zellen im Prespore-Bereich bilden sich Zentren aus nicht markierten Zellen. Die GFP-markierten Zellen werden zwar in diese Zentren rekrutiert, bilden sie aber nicht (Abb. 22, 24).

Eine *de novo* Expression von *pst0*-GFP bei der Spitzenbildung wurde weder in jungen noch in alten Slugs beobachtet. Bei jungen Slugs bilden die zum Zeitpunkt der Spitzenbildung noch nicht markierten Zellen ihre Fluoreszenzmarkierung wahrscheinlich noch aus, dies geschah jedoch nicht im Beobachtungszeitraum. Spätere Kontrollen von zum Zeitpunkt der Bildung nicht markierten Spitzen haben in diesen Spitzen GFP-markierte Zellen gezeigt.

### **3.2.4. Mischungen von GFP-Varianten in Slugs**

#### **3.2.4.1. pstA-GFP- und pst0-GFP-Zellen während der Spitzenbildung**

Obwohl es möglich ist, Mischungen von Zellen, die W2/W7-GFP und die S65T-GFP exprimieren, auch im Slugstadium verlässlich zu trennen (siehe Abschnitt 3.1) konnten Mischungen von pstA-GFP und pst0-GFP keine weiteren Ergebnisse zum Verständnis der Zellsortierung bei der Neubildung von Spitzen beitragen.

Wie schon an den pstA-GFP und pst0-GFP Einzelmessungen gezeigt, ist die Lokalisierung von pstA-GFP im vordersten Bereich von im Prespore-Bereich neu gebildeten Spitzen zwar spezifisch, kann jedoch auch mit pst0-GFP-markierten Zellen beobachtet werden, die darüber hinaus noch im hinteren Prestalk-Bereich vorliegen.

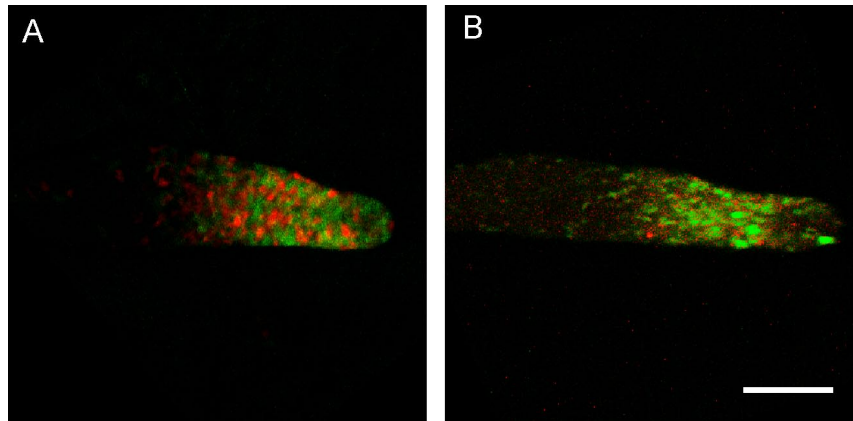
In Zellmischungen von pstA-GFP und pst0-GFP konnten aufgrund der Überschneidung der markierten Zellpopulationen in den meisten Messungen keine Unterschiede zwischen den markierten Zellpopulationen bei der Neubildung von Spitzen beobachtet werden. In einzelnen Messungen kam es jedoch zu einer früheren Lokalisierung von pstA-GFP-Zellen in die sich bildenden Zentren. Hier beteiligten die markierten Zellen sich an der Rotation bevor pst0-GFP-Zellen in das Zentrum rekrutiert wurden (Abb. 11I-K in Abschnitt 3.1).

Abb. 12B in Abschnitt 3.1 zeigt den Stiel eines Fruchtkörpers aus einer Mischung von pstA-GFP und pst0-GFP-Zellen. Die gleichmäßige Verteilung von Zellen beider Typen zeigt die Problematik, anhand der Reporter zelltypspezifische Aussagen zu treffen. Darüber hinaus demonstriert die hier gezeigte Abbildung die Stabilität der verwendeten GFP-Reporter.

#### **3.2.4.2. Labile und stabile GFP-Varianten**

Die Mischung von unter dem selben Promotor exprimierten stabilen und labilen GFP-Varianten (Deichsel et al., 1999) mit spektralen Unterschieden stellt eine vielversprechende Anwendung für separat detektierbare GFP-Varianten dar.

Friedel (1999) hat mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und in Abschnitt 3.1 beschriebenen Technik in Mischungsexperimenten gezeigt, daß eine labile GFP-Variante (ubiS65TGFP, d.h. S65T mit einer N-terminalen Fusion mit Ubiquitin-Isoleucin) ein anderes Verteilungsmuster im Slug hat als eine stabile GFP-Variante (W7), wenn sie mit dem



**Abb. 25)** Slugs aus Mischungen einer unter demselben Promotor exprimierten labilen und stabilen GFP-Variante. Rot: ubiS65TGFP; grün: W7 A: Expression unter dem ecmA Gesamtpromotor. B: Expression unter dem pst0-Element des ecmA Promotors. Maßstab: 100  $\mu$ m

gleichen Vektor unter demselben Promotor exprimiert wird. Dies wurde sowohl für den ecmA Gesamtpromotor als auch für das pst0-Element desselben Promotors demonstriert (Abb. 25).

### 3.3. Artspezifische Zellsortierung während der Entwicklung

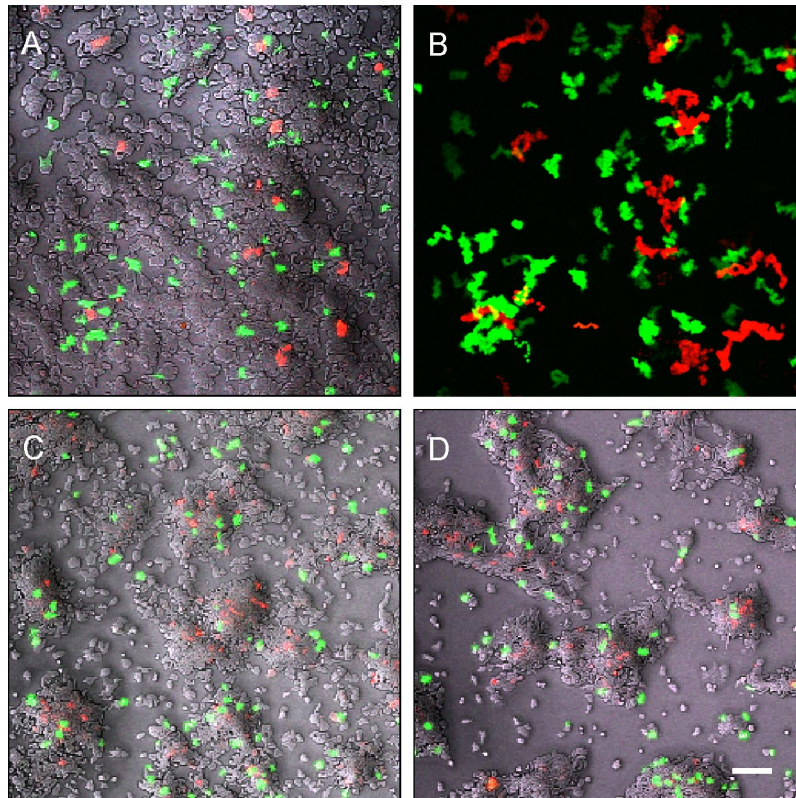
Mit der für die separate *in vivo* Detektion zweier GFP-Varianten verwendeten Technik (Abschnitt 3.1, Zimmermann und Siegert, 1998b) können auch die GFP-Variante W2 und ein weiterer Vitalfarbstoff, Cell Tracker Green, gleichzeitig detektiert werden. Auf diese Weise kann in Mischungen verschiedener *Dictyostelium*-Arten durch die Markierung von Zellen beider Arten die Zellsortierung *in vivo* in allen Entwicklungsstadien verfolgt werden.

#### 3.3.1. *D. discoideum* und *D. mucoroides*

Für die Untersuchung der artspezifischen Sortierung wurden 25 Messungen mit unterschiedlichen Mischverhältnissen verwendet.

##### 3.3.1.1. Beginn der Entwicklung

In durch gemeinsames Ausplattieren beider Spezies hergestellten gleichmäßig durchmischten Ansätzen bleibt die Zellmischung während der ersten Stunden erhalten, es kommt in dieser Zeit zu keiner Segregation der beiden Arten (Abb. 26A). Zellen beider Arten beginnen sich ungerichtet zu bewegen, wobei *D. mucoroides*-Zellen sich hierbei aktiver verhalten und



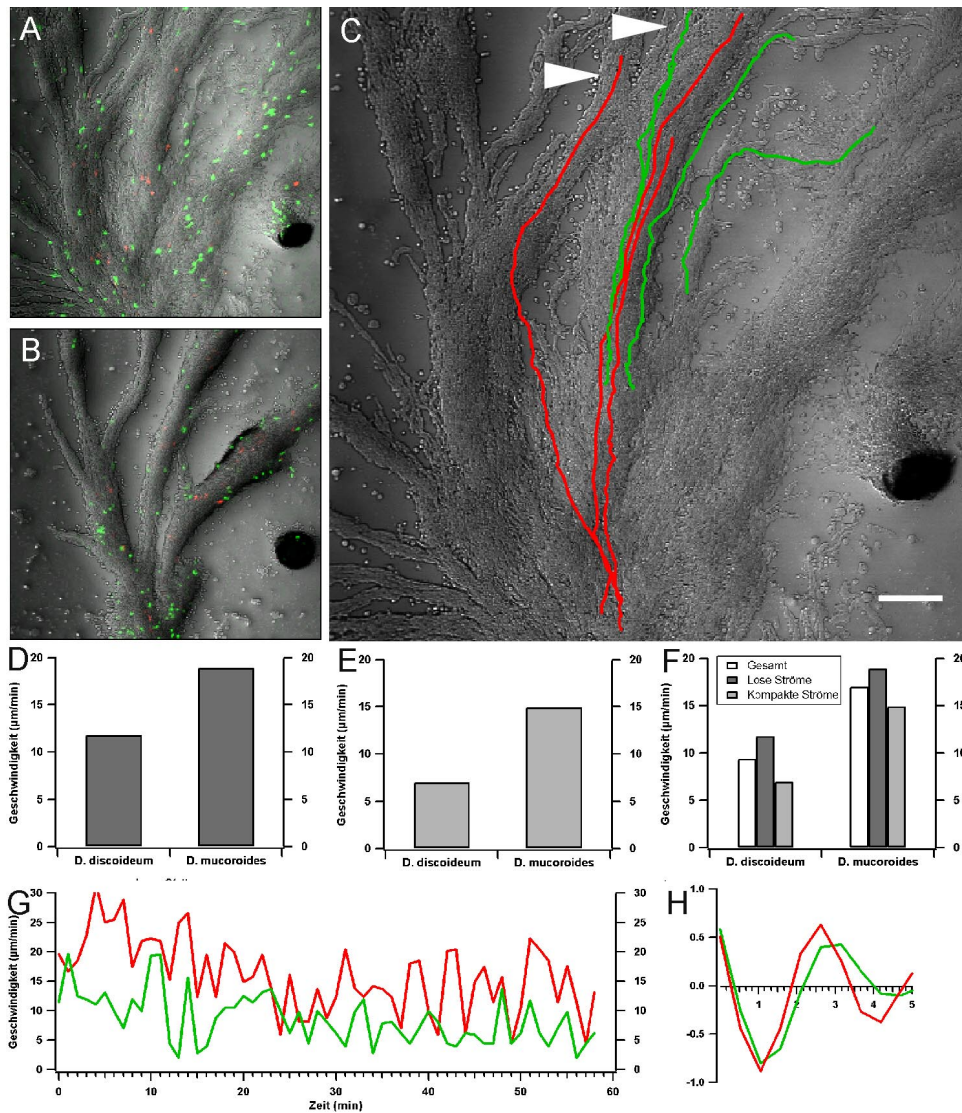
**Abb. 26)** Frühe Entwicklungsstadien von 1:1 Zellmischungen von *D. discoideum*/*D. mucoroides*. Beide Arten beinhalten jeweils 5% fluoreszenzmarkierte Zellen. *D. discoideum*: grün. *D. mucoroides*: rot. A: Frühes Aggregationsfeld (3h). B: Additionsbild aus 20 Zeitpunkten (8 min 30s) der Messung in A. C: Aggregationsfeld nach ca. 6h. D: Feld nach ca. 7h. Maßstab: 100  $\mu$ m

größere Strecken zurücklegen (Abb. 26B). Die erhöhte Bewegung führt weiterhin zu keiner Sortierung. Nach ca. 4 Stunden ändert sich das Verhalten der Zellen und sie beginnen sich chemotaktisch zu orientieren, wobei die gleichen Signale auf beide Arten zu wirken scheinen.

### 3.3.1.2. Aggregation

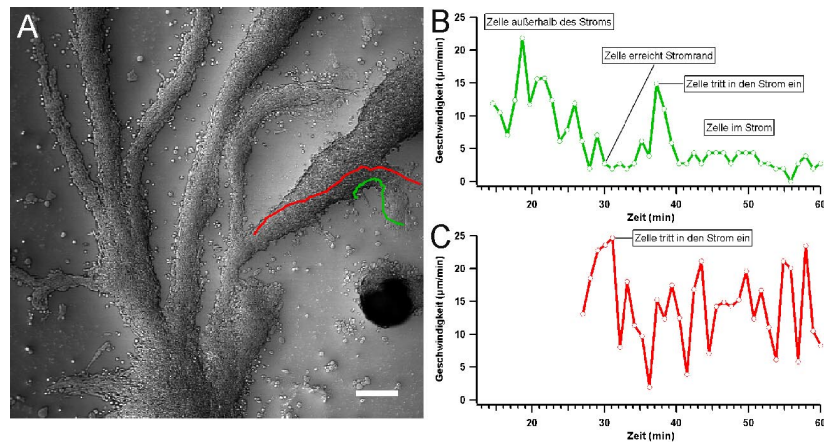
Nach 5-6 Stunden bilden sich Zellanhäufungen, in denen Zellen beider Arten gleichmäßig verteilt vorliegen (Abb. 26C, D). Um die neugebildeten Zentren beginnen sich die Zellen zu verdichten und es kommt zur Bildung von Strömen. Wie in den Zentren selbst bewegen sich hier Zellen beider Arten gleichmäßig verteilt miteinander (Abb. 27A). In Durchlichtbildern sind periodische cAMP-Signale als durch die Ströme nach außen laufende Wellen erkennbar (Siegert und Weijer, 1989). Eine Stunde später sind die Ströme kompakter geworden (Abb. 27B). *D. discoideum*-Zellen sind abgerundet und bewegen sich im Strom kaum noch vorwärts, während *D. mucoroides*-Zellen länglich sind und weiterhin zum Zentrum wandern. Obwohl die Verteilung in den Strömen anfangs sehr gleichmäßig wirkt, zeigt die detaillierte Untersuchung einzelner Zellen beider Spezies in den Strömen nun Unterschiede. *D.*





**Abb. 27)** 1:1 Zellmischung von *D. discoideum*/*D. mucoroides* in der Aggregationsphase. Beide Arten beinhalten jeweils 2% fluoreszenzmarkierte Zellen. *D. discoideum*: grün. *D. mucoroides*: rot. A: *D. discoideum* und *D. mucoroides* bilden gemeinsame Aggregationsströme. B: 60 min später. C: Zusammenfassung der Bewegungstrajektorien mehrerer Zellen beider Arten. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . Pfeilspitzen: In G dargestellte Zellen. D-F: Durchschnittliche Zellgeschwindigkeiten von *D. discoideum* und *D. mucoroides*. D: Erste Hälfte (30 min) der Messung. E: Zweite Hälfte (30 min) der Messung. F: Direkter Vergleich der durchschnittlichen Zellgeschwindigkeiten für beide Arten. Weißer Balken: Gesamte Messung (60 min). Dunkelgrauer Balken: Erste Hälfte der Messung. Hellgrauer Balken: Zweite Hälfte der Messung. G: Geschwindigkeiten der in B markierten *D. discoideum*- und *D. mucoroides*-Zelle im Aggregationsstrom. H: Autokorrelation der Zellgeschwindigkeiten einer *D. discoideum*- und einer *D. mucoroides*-Zelle. X-Achse: Minuten

*mucoroides*-Zellen bewegen sich durchschnittlich schneller im Strom als *D. discoideum*, so daß sich *D. mucoroides*-Zellen im gleichen Beobachtungszeitraum ungefähr doppelt so weit auf das Aggregationszentrum zubewegen wie *D. discoideum*-Zellen (Abb. 27C). Anhand von Zellen die während der gesamten Messung verfolgt werden konnten wurden die Durchschnittszellgeschwindigkeiten für beide Arten ermittelt (*D. discoideum*:  $n=4$ , *D. mucoroides*:  $n=3$ ). *D. mucoroides*-Zellen bewegen sich mit durchschnittlich  $17 \mu\text{m}/\text{min}$ ,



**Abb. 28)** Gleiche Messung wie in Abb. 2. A: Bewegungstrajektorien einer *D. discoideum*- (grün) und einer *D. mucoroides*-Zelle (rot), die zum gleichen Zeitpunkt an der gleichen Stelle in einen kompakten Aggregationsstrom eintreten. Maßstab: 100 µm. B-C: Geschwindigkeitsprofil der beiden Zellen vor, während und nach dem Eintritt in den Strom. B: *D. discoideum*. C: *D. mucoroides*. Die Zelle dringt ohne Verzögerung in den Strom ein und bewegt sich erheblich schneller als *D. discoideum* weiter, wobei die Reaktion auf die periodischen cAMP Wellen deutlich erkennbar ist.

während die Geschwindigkeit von *D. discoideum* nur 9,3 µm/min beträgt (Abb. 27F). Dies entspricht 55% der Geschwindigkeit von *D. mucoroides*.

Des weiteren läßt sich mit fortschreitender Aggregation und mit Verdichtung der Ströme eine Abnahme der Geschwindigkeit der Zellen beider Spezies beobachten (Abb. 27D, E, F). Die Geschwindigkeitsabnahme ist bei *D. discoideum*( von 11,8 auf 6,9 µm/min, -41%) ausgeprägter als bei *D. mucoroides* (von 18,9 => 14,9, -21%), so daß der Geschwindigkeitsunterschied zwischen beiden Spezies mit fortlaufender Aggregation immer ausgeprägter wird. Haben *D. discoideum*-Zellen in losen Strömen noch 62% Prozent der Geschwindigkeit von *D. mucoroides*-Zellen, so sind es in kompakten Strömen nur noch 46%, wobei das Verhältnis immer ungünstiger wird.

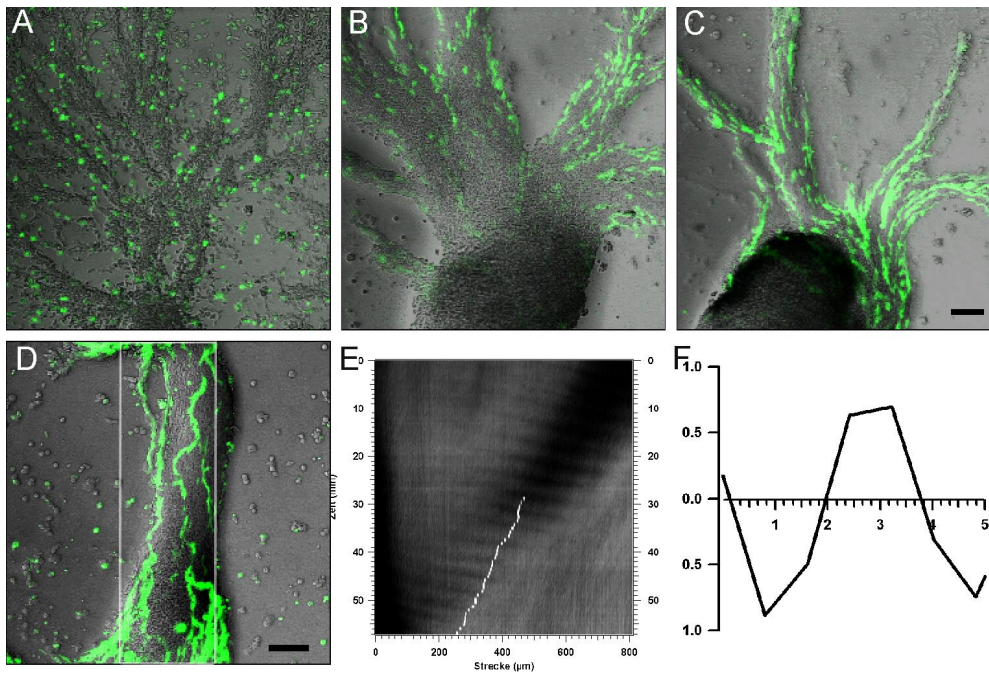
Die artspezifische Sortierung von *D. discoideum* und *D. mucoroides* beginnt also im Stadium der Aggregationsströme und führt zu einer Anreicherung von *D. mucoroides* im Zentrum während *D. discoideum* in der Peripherie bleibt.

Abb. 27G vergleicht die Geschwindigkeiten einer *D. discoideum*- und einer *D. mucoroides*-Zelle. Beide Zellen bewegen sich periodisch, unterscheiden sich jedoch in ihren Geschwindigkeiten. Der Geschwindigkeitsrückgang ist bei *D. discoideum* deutlich erkennbar. Im zweiten Teil der Messung zeigt sich, daß der Geschwindigkeitsunterschied zwischen beiden Zellen während der Phasen gerichteter chemotaktischer Bewegung zustande kommt, wohingegen die Geschwindigkeitsuntergrenzen vor dem nächsten Stimulus ähnlich sind.

Welche Faktoren beeinflussen das unterschiedliche Verhalten der beiden Arten? Die Aggregation beider Arten wird in Strömen durch cAMP-Signale mit einer Periodizität zwischen 3 und 4 Minuten koordiniert. Um festzustellen, ob die beiden Arten unterschiedlich auf das gleiche chemotaktische Signal reagieren, wurden die Bewegungstrajektorien einzelner Zellen mit Autokorrelation auf periodisches Verhalten untersucht (Siegert und Weijer, 1991). In beiden Arten können Geschwindigkeitsschwankungen mit einer Periode von 2,5 - 3 Minuten beobachtet werden (Abb. 27H). Die Periodenlänge ist für einzelne Zellen beider Arten etwas kürzer als die für ganze Ströme gemessene Dauer. Dies ist durch die Vorwärtsbewegung der Zellen innerhalb des Stroms bedingt (Rietdorf et al., 1997). Dementsprechend ist die für *D. mucoroides* gemessene Periodenlänge auch etwas kürzer als die von *D. discoideum* (Abb. 27H), da sich diese Zellen schneller bewegen. Beide *Dictyostelium*-Arten reagieren also auf dieselben koordinierenden Signale. Dementsprechend sind die für Zellen beider Arten gemessenen Bewegungstrajektorien ähnlich, unterscheiden sich aber in den Geschwindigkeiten (Abb. 27G). Die schnellere Bewegung von *D. mucoroides*-Zellen führt zu einer Sortierung, obwohl beide Arten denselben chemotaktischen Signalen folgen.

Da der Unterschied in den Zellgeschwindigkeiten nicht durch das chemotaktische Verhalten bedingt ist, könnte ein Unterschied in der Fähigkeit, sich in vielzelligen Strömen zu bewegen, zur Aussortierung führen. In reinen Strömen vergleichbarer Größe bewegen sich *D. discoideum*-Zellen mit höheren Geschwindigkeiten (ca. 19  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) als in Mischungen mit *D. mucoroides* (ca. 10  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Auch die kontinuierliche Abnahme der Geschwindigkeit von *D. discoideum* in den immer kompakter werdenden Mischströmen würde sich dadurch erklären. Abb. 28A zeigt die Trajektorien einer *D. discoideum*- und einer *D. mucoroides*-Zelle, die zum gleichen Zeitpunkt an der gleichen Stelle in einen Strom eintreten. Außerhalb des Stroms bewegen sich beide Zellen mit ähnlichen Geschwindigkeiten ( $> 20 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Das Erreichen des Stromrands führt bei *D. discoideum* zu einem starken Geschwindigkeitsverlust (Abb. 28B). Während des Übertritts in den Strom acht Minuten später erhöht sich die Geschwindigkeit der *D. discoideum*-Zelle kurzzeitig auf 15  $\mu\text{m}/\text{min}$  und geht anschließend auf ca. 5  $\mu\text{m}/\text{min}$  zurück. Dies deutet darauf hin, daß schon das Eindringen in das vielzellige Aggregat erschwert ist. Die *D. mucoroides*-Zelle hingegen dringt sofort nach Erreichen des Stroms in diesen ein und bewegt sich innerhalb mit fast unveränderter Geschwindigkeit weiter (Abb. 28C).

Die artspezifische Sortierung von *D. mucoroides* und *D. discoideum* beginnt demnach in den Aggregationsströmen und ist durch Unterschiede in der Fähigkeit, sich in ihnen



**Abb. 29)** 5-10% W2 GFP exprimierende *D. discoideum*-Zellen (grün) in *D. mucoroides* (ungefärbt). A-C: Entwicklung auf  $\text{KK}_2$ -Pufferagar mit 2mM Coffein. A: 0 min B: 60 min C: 110 min D: Bildung von *D. discoideum*-Zellschnüren während Entwicklung auf  $\text{KK}_2$ -Pufferagar ohne Coffein. Das für den Time-Space-Plot in E verwendete Fenster ist markiert. E: Time-Space-Plot des Aggregationsstroms in D. Die periodischen cAMP-Wellen verlaufen von links nach rechts durch den Strom. Die gegenläufige Bewegung der an der Spitze einer *D. discoideum*-Zellschnur befindlichen Zelle ist mit weißen Punkten eingezeichnet. Die chemotaktische Reaktion der Zelle auf die Stimuli ist deutlich erkennbar. F: Die Autokorrelation der in E eingezeichneten Zelle zeigt eine deutliche Periodizität. X-Achse: Minuten; Maßstab C, D: 100  $\mu\text{m}$

vorwärtszubewegen, bedingt. Die Sortierung ist jedoch noch nicht vollständig und in den Zentren liegen *D. mucoroides* und *D. discoideum* immer noch gemischt vor (Abb. 26D, 30A).

Bei Verringerung des *D. discoideum*-Anteils auf 10% und ausschließlicher Benutzung von mit W2-GFP-markierten Zellen erschließt sich ein weiterer Aspekt der frühen artspezifischen Sortierung. Während *D. discoideum* zu Beginn der Aggregationsphase gleichmäßig verteilt vorliegt (Abb. 27A, 29A) kommt es in den Aggregationsströmen zu einer spezifischen Verbindung mit anderen *D. discoideum*-Zellen, bei der nachfolgende Zellen enge Kontakte mit den vorausgehenden Zellen bilden (Abb. 29B). Auf diese Weise entstehen immer länger werdende, schnurartige, artspezifische Zellverbände innerhalb der Ströme, die mit fortschreitender Aggregation massiver werden (Abb. 29C, D). Da *D. mucoroides*-Zellen schneller aus den Strömen ins Zentrum wandern kommt es in den Endbereichen der Ströme zu einer immer größeren Konzentration dieser Strukturen bis schließlich nur noch *D. discoideum*-Zellen übrig sind. *D. discoideum*-Zellschnüre haben dabei in kompakten Strömen eine mit den Zellen in einer 1:1 Mischung vergleichbare Geschwindigkeit (ca. 7  $\mu\text{m}/\text{min}$ ).

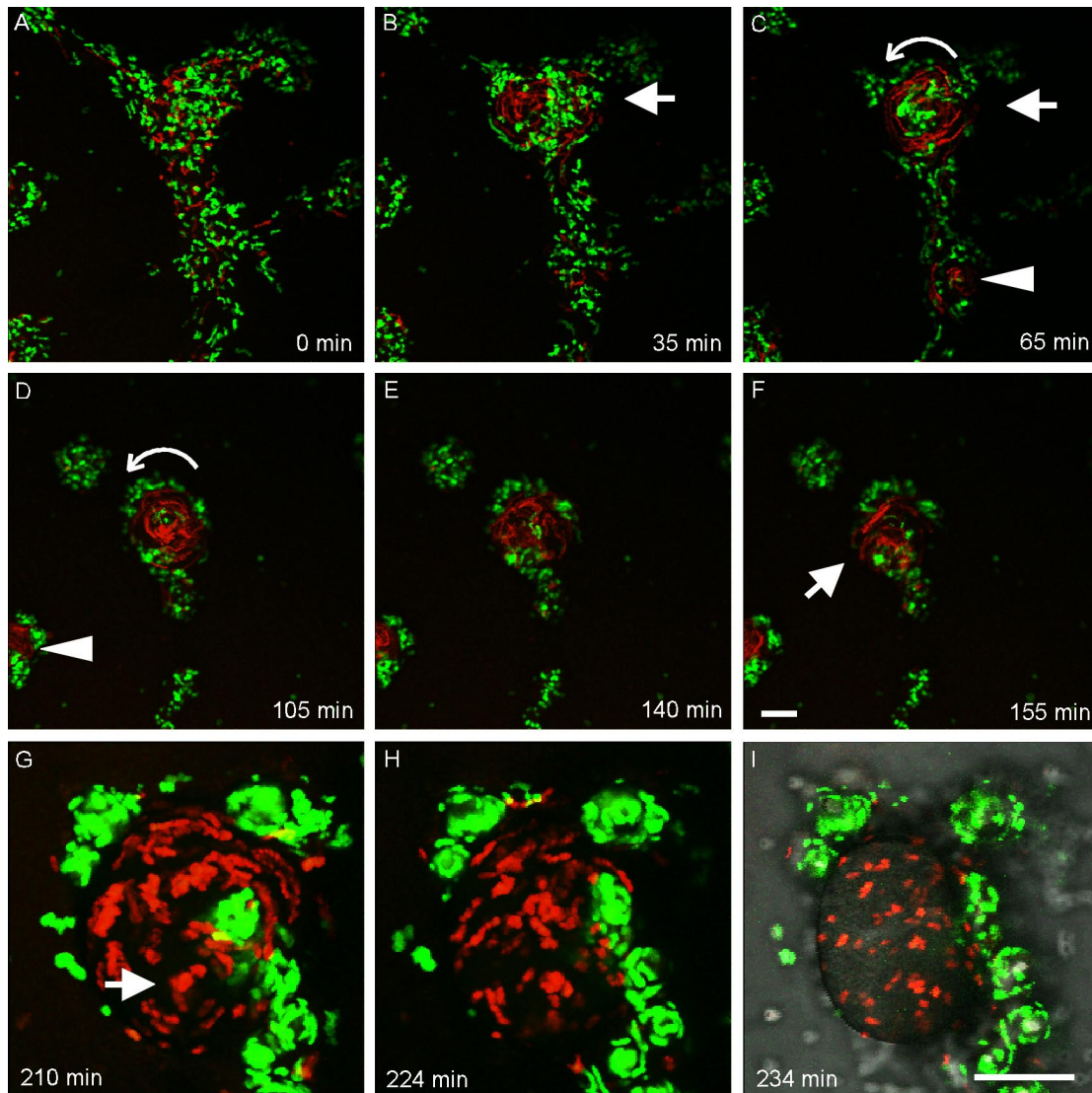
Im Gegensatz zu *D. discoideum* bilden *D. mucoroides*-Zellen keine artspezifischen Zellschnüre in gemischten Aggregationsströmen.

In der 10:1 Mischung der beiden Arten kann ein weiterer Beleg für die gemeinsame Chemotaxis von *D. discoideum* und *D. mucoroides* gefunden werden. Die Ströme sind durch deutlich messbare Signalwellen mit einer Periode zwischen 3-4 Minuten organisiert. *D. discoideum*-Zellschnüre reagieren deutlich auf jede der hauptsächlich von den umgebenden *D. mucoroides*-Zellen weitergeleiteten Erregungswellen (Abb. 29E, F).

### 3.3.1.3. Mounds

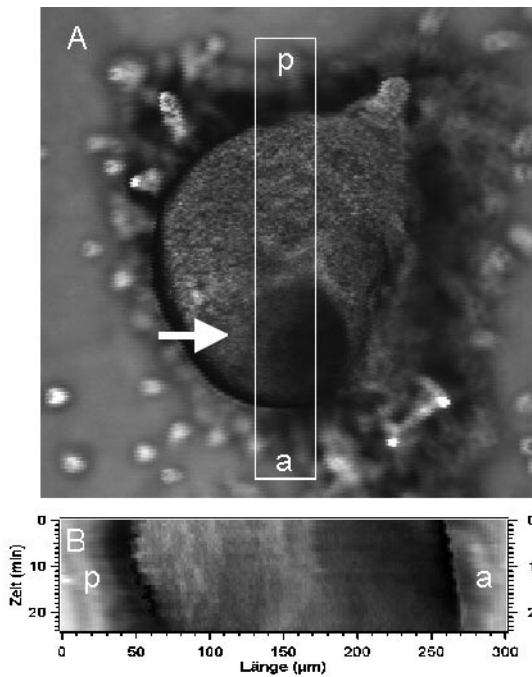
Nach ca. 9 Stunden haben sich große vielzellige Mounds gebildet, die von kompakten Aggregationsströmen umgeben sind. Aufgrund der unterschiedlichen Fähigkeit, sich in vielzelligen Aggregaten zu bewegen kam es zu einer Anreicherung von *D. mucoroides* in der Mitte und von *D. discoideum* in der Peripherie. In den Zentren der Mounds liegen jedoch weiterhin sowohl *D. discoideum*- als auch *D. mucoroides*-Zellen vor (Abb. 30A). In einem zweiten Sortierungsschritt beginnen nun die *D. mucoroides*-Zellen im Zentrum zu rotieren und nach oben zu wandern (Abb. 30B, C). In das rotierende Zentrum wandern weiterhin *D. mucoroides*-Zellen aus den Aggregationsströmen ein. An diesen Bewegungen sind *D. discoideum*-Zellen nicht beteiligt. Sie liegen hauptsächlich am Rand des Aggregats vor. Die im Zentrum befindlichen *D. discoideum*-Zellen bewegen sich auch nicht mit, sondern bleiben unten liegen, bzw. werden an den Rand sortiert, während *D. mucoroides*-Zellen rotierend nach oben wandern und sich aktiv aussortieren. Nach ca. 2 Stunden befinden sich fast nur noch rotierende *D. mucoroides*-Zellen im Zentrum, während *D. discoideum* am Rand des Mounds vorliegt (Abb. 30D). Die beiden Arten haben sich fast vollständig voneinander getrennt. Zu diesem Zeitpunkt stellen die *D. mucoroides*-Zellen die Rotationsbewegung ein und wandern einer sich entwickelnden Spitze folgend aus dem Zentrum des Mounds (Abb. 30E, F). Von *D. discoideum* getrennt, bildet *D. mucoroides* jetzt einen reinen Slug bzw. Fruchtkörper (Abb. 30G-I). Die Spitze beginnt, nicht mehr vorwärts, sondern in die Höhe zu gehen, während der hintere Teil des Aggregats sich weiter auf die Spitze zubewegt. Erst während *D. mucoroides* sich aus dem Moundzentrum bewegt, setzen die *D. discoideum*-Zellen ihre eigene Entwicklung fort und beginnen eigene kleine Mounds zu bilden (Abb. 30G-I), die sich später zu größeren *D. discoideum*-Aggregaten vereinigen.

Mit Hilfe von Bildsubtraktion und Time-Space-Plots wurden die periodischen cAMP Signale in den gemischten Mounds sichtbar gemacht. Während der Rotationsbewegung der *D.*



**Abb. 30)** Sortierung einer 1:1 Zellmischung von *D. discoideum* und *D. mucoroides* im Moundstadium. Beide Arten beinhalten jeweils 5% fluoreszenzmarkierte Zellen. *D. discoideum*: grün. *D. mucoroides*: rot. Zusammenhängende Messungen: A-C (xyt), D-F (xyt), G-I (4D). In allen Bildern ist derselbe Mound dargestellt. A-F: Additionsbilder von jeweils 10 Zeitpunkten (5 min). A: Ca. 9h nach Beginn der Entwicklung. B: Die *D. mucoroides*-Zellen im Zentrum beginnen sich koordiniert zu bewegen (Pfeil). C: Schnelle Rotationsbewegung (gebogener Pfeil) der *D. mucoroides*-Zellen im Zentrum (Pfeil). Pfeilspitze: Weiteres *D. mucoroides*-Rotationszentrum. D: Rotationsbewegung (gebogener Pfeil) der *D. mucoroides*-Zellen im Zentrum. Links unten im Bild befindet sich ein weiterer Mound mit gleichem Verhalten. E: Die Rotationsbewegung der *D. mucoroides*-Zellen wird unterbrochen und die Zellen beginnen sich als Aggregat aus dem Zentrum des Mounds zu bewegen. F: Die *D. mucoroides*-Zellen wandern aus dem Mound heraus (Pfeil). G-I: 4D-Messung des Mounds aus A-F (Projektionsbilder). G-H: Additionsbilder der Gesamtprojektionen von jeweils 10 Zeitpunkten (7,5 min) G: Pfeil: Neugebildete Spitze des *D. mucoroides*-Aggregats. H: Die beiden Arten haben sich vollständig voneinander getrennt. I: *D. discoideum* und *D. mucoroides* nach Abschluss der Sortierung. Maßstab F, I: 100  $\mu$ m

*mucoroides*-Zellen sind in den Mounds ein- bis mehrarmige Spiralen zu erkennen, wie sie auch für reine *D. discoideum*-Mounds beschrieben wurden (Rietdorf et al., 1996; Siegert und Weijer, 1995). Nach Einstellung der Rotationsbewegung bewegt sich das *D. mucoroides*-



**Abb. 31)** A: Transmissionbild des in Abb. 5 gezeigten *D. mucoroides*-Aggregats. Das für den Time-Space-Plot in B verwendete Gebiet ist durch einen Rahmen gekennzeichnet. Pfeilspitze: Spitze, a: anterior, p: posterior. B: Der Time-Space-Plot des Aggregats zeigt periodisches Bewegungsverhalten (Periode: 3,5 min).

Aggregat als Ganzes aus dem Zentrum des ursprünglich gemischten Mounds. In dieser Phase kommt es zu deutlichen periodischen Bewegungen (Periodenlänge ca. 3.5 min) des gesamten *D. mucoroides*-Aggregats, die von einer inzwischen gebildeten Spitze koordiniert werden (Abb. 31). Erregungswellen gehen von der Spitze aus und sorgen dafür, daß der posteriore Teil des Aggregats nachgezogen wird, während der Bereich um die Spitze anfängt, in die Höhe zu gehen.

Wurden *D. discoideum*-Zellen im Stadium der Aggregationsströme immer langsamer, so kommt die Vorwärtsbewegung während der Sortierung im Mound fast vollständig zum Erliegen (Abb. 30). Auch hier liegt nahe, daß der Grund dafür die immer weiter abnehmende Fähigkeit zur Bewegung in einem kompakten Zellaggregat ist. Obwohl sich die schnell rotierenden *D. mucoroides*-Zellen und die liegengebliebenen *D. discoideum*-Zellen in ihrem Verhalten völlig unterscheiden, ist anzunehmen, daß beide Arten weiterhin durch dasselbe chemotaktische System koordiniert werden. Es ist ein Merkmal dieses Stadiums, daß es in der Peripherie, in der *D. discoideum* schon weitgehend von *D. mucoroides* getrennt ist, zu keiner eigenständigen Entwicklung von *D. discoideum* kommt (Abb. 30). Dies deutet darauf hin, daß sich in diesen Bereichen kein eigenständiges Signalzentrum etablieren kann, gleichzeitig jedoch eine chemotaktisch orientierte Bewegung in das Moundinnere hinein nicht möglich ist. Erst wenn sich *D. mucoroides* aus dem Zentrum entfernt runden sich die *D. discoideum*-Ansammlungen ab und es bilden sich eigene Organisationszentren. Aus der Umgebung des Mounds bewegen sich während dieses Stadiums weiterhin Einzelzellen beider Arten gerichtet

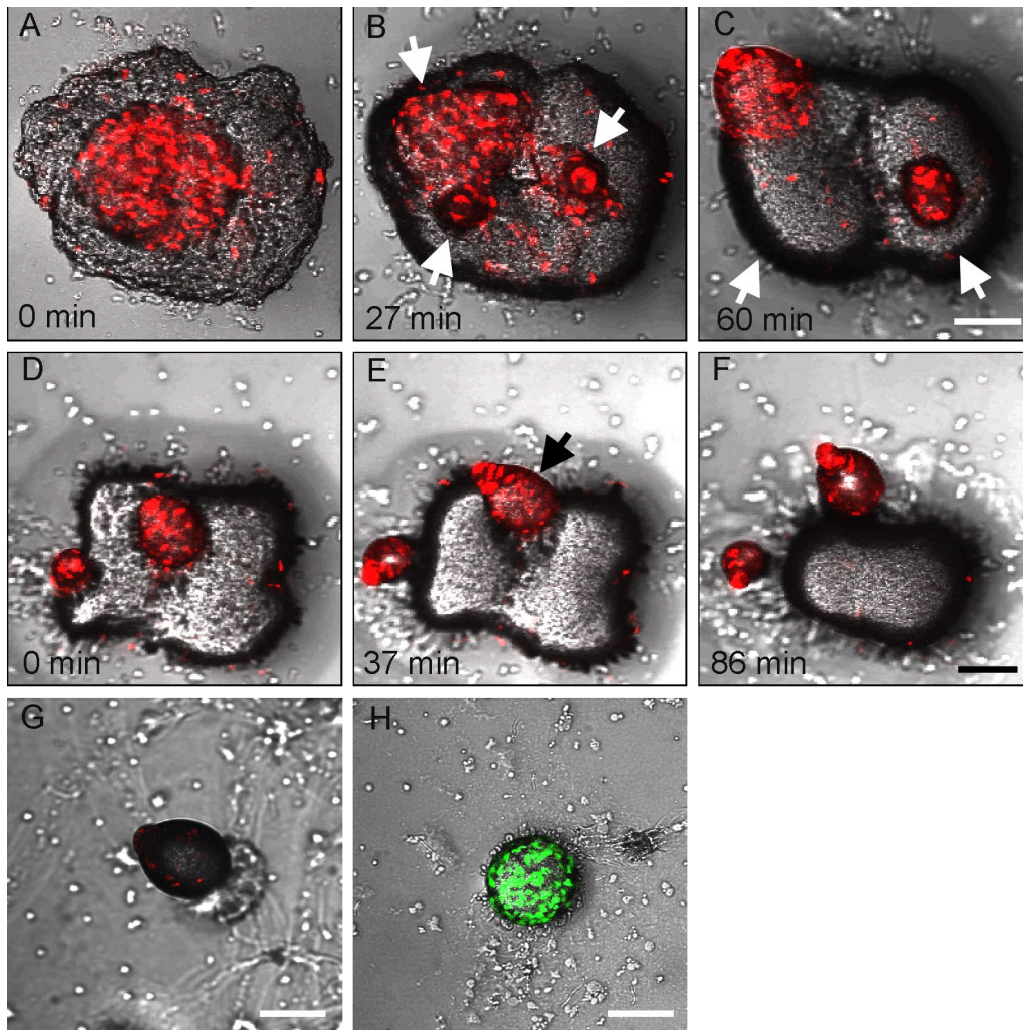
in den Mound hinein. Da zu diesen Zellen keine Zellkontakte bestehen belegt dies das weitere Vorhandensein von extrazellulärem cAMP als chemotaktischem Botenstoff.

Selbst wenn nur 10% *D. mucoroides*-Zellen mit *D. discoideum* gemischt werden sortieren sich die *D. mucoroides*-Zellen aktiv aus und bilden als erste Art Slugs bzw. Fruchtkörper aus dem gemeinsamen Mound heraus (Abb. 32). Auch in diesem Mischungsverhältnis entwickelt sich *D. discoideum* nicht weiter, bis die Entwicklung von *D. mucoroides* weit fortgeschritten ist. Dieses Verhalten paßt zu der Hypothese, daß *D. mucoroides*/*D. discoideum*-Mischungen ein gemeinsames Signalsystem haben, zu dessen Zentrum zuerst die *D. mucoroides*-Zellen segregieren, da sie sich effizienter in den vielzelligen Aggregaten bewegen können. Alternativ könnte jedoch auch eine schnellere Entwicklung von *D. mucoroides* die in gemischten Mounds gefundene Verteilung erklären. Aus diesem Grund wurden zeitliche Vergleiche der Entwicklung von Rein- und Mischansätzen der beiden Arten durchgeführt.

Parallelansätze von *D. discoideum*/*D. mucoroides*-Zellmischungen und von *D. discoideum*- bzw. *D. mucoroides*-Reinansätzen zeigen, daß sich *D. discoideum* und *D. mucoroides* ungemischt beide innerhalb von ca. 24 Stunden zu Slugs bzw. Fruchtkörpern entwickeln. Im Vergleich dazu wird die Entwicklung von *D. discoideum* schon durch eine Beimischung von ca. 10% *D. mucoroides*-Zellen deutlich verzögert. Während die frühen Aggregationsphasen (+6h) mit Zentren und Aggregationsströmen in beiden Ansätzen ähnlich sind, kommt es in der Moundentwicklung zu deutlichen Verzögerungen in den Mischansätzen. Nach 12 Stunden haben sich in den Reinansätzen kompakte Mounds gebildet, während die Mounds in den Mischansätzen weniger kompakt und flacher sind. Erst nachdem sich die *D. mucoroides*-Zellen aussortiert und das *D. discoideum*-Aggregat verlassen haben entwickeln sich diese Mounds weiter (+18h). In Reinansätzen haben sich zu diesem Zeitpunkt schon First-Finger-Stadien gebildet. Nach 22h kommt es im Reinansatz zur Bildung von Fruchtkörpern, während sich in den Mischansätzen erst kompakte Mounds gebildet haben. Insgesamt ist die Entwicklung zwischen den Ansätzen um ca. 6h verzögert. Im Gegensatz zu dem deutlichen Effekt von 10% *D. mucoroides* läßt sich bei Beimischungen von nur 1-5% *D. mucoroides*-Zellen zu *D. discoideum* keine Verzögerung der Entwicklung beobachten. Der Vergleich von Rein- und Mischansätzen zeigt, daß Unterschiede im zeitlichen Ablauf der vielzelligen Entwicklung nicht die Ursache für die in Abb. 32 gefundene Verteilung ist.

Nach der Segregation im Zentrum und der Aussortierung der dort befindlichen *D. discoideum*-Zellen entwickelt sich *D. mucoroides* weiter, ohne Zellen der anderen Art zuzulassen. *D. discoideum* selbst kann sich trotzdem nicht weiterentwickeln, da die vom *D.*





**Abb. 32)** A-F: 10% *D. mucoroides* (rot) in 90% *D. discoideum* (ungefärbt). A: Die *D. mucoroides*-Zellen haben sich nach oben in das Zentrum des Mounds sortiert. B: Es bilden sich drei Zentren (Pfeile) unter den *D. mucoroides*-Zellen, die auseinander und an den Moundrand wandern. C: Das linke untere Zentrum in B hat sich zurückgebildet und wurde von dem linken oberen Zentrum übernommen. Der *D. discoideum*-Mound hat sich den *D. mucoroides*-Zentren entsprechend in zwei Teile getrennt (Pfeile). D: *D. mucoroides* beginnt Slugs zu bilden und aus den *D. discoideum*-Mounds herauszuwandern. E: Während der *D. mucoroides*-Slug (Pfeil) auswandert zieht sich das Aggregat dahinter zusammen und beginnt, einen kompakten Mound zu formen. F: Die *D. mucoroides*-Slugs sind aus dem Aggregat gewandert und es hat sich ein kompakter *D. discoideum*-Mound geformt. G-H: Endzustand der Artentrennung nach ca. 20h. G: Kulminierender *D. mucoroides*-Slug H: *D. discoideum*-Mound (grün) Maßstab C, F-H: 100  $\mu$ m

*mucoroides*-Zentrum gebildeten Signale durch den gesamten Mound weitergegeben werden und die Etablierung weiterer Zentren verhindern. In Abb. 32A sieht man, daß sich die *D. mucoroides*-Zellen nach Abschluß der Rotationsphase zentral über den *D. discoideum*-Zellen gesammelt haben. Dieser Zustand entspricht Abb. 30E. Das *D. mucoroides*-Aggregat bildet nun zwei Zentren, die aus dem Mound wandern (Abb. 32B, C). Auch die *D. discoideum*-Zellen, die 90% des Mounds ausmachen, folgen diesen Zentren und der gesamte Mound teilt sich dementsprechend (Abb. 32C). Dies spricht für eine Weiterleitung der von *D. mucoroides* generierten Signale in den *D. discoideum*-Mounds. Abb. 32D-F zeigt einen weiteren in der

Sortierung weit fortgeschrittenen Mound, aus dem die *D. mucoroides*-Zellen auswandern. Die zurückbleibenden *D. discoideum*-Zellen ziehen sich um den sich bildenden *D. mucoroides*-Slug zusammen, ohne ein eigenes Signalzentrum zu bilden.

Der Endzustand von *D. discoideum*/*D. mucoroides*-Zellmischungen ist in Abb. 32G und H gezeigt. Die beiden Arten haben sich vollständig voneinander getrennt. *D. mucoroides* bildet Fruchtkörper zu einem Zeitpunkt, an dem *D. discoideum* noch als dichter Mound ohne Spitze vorliegt.

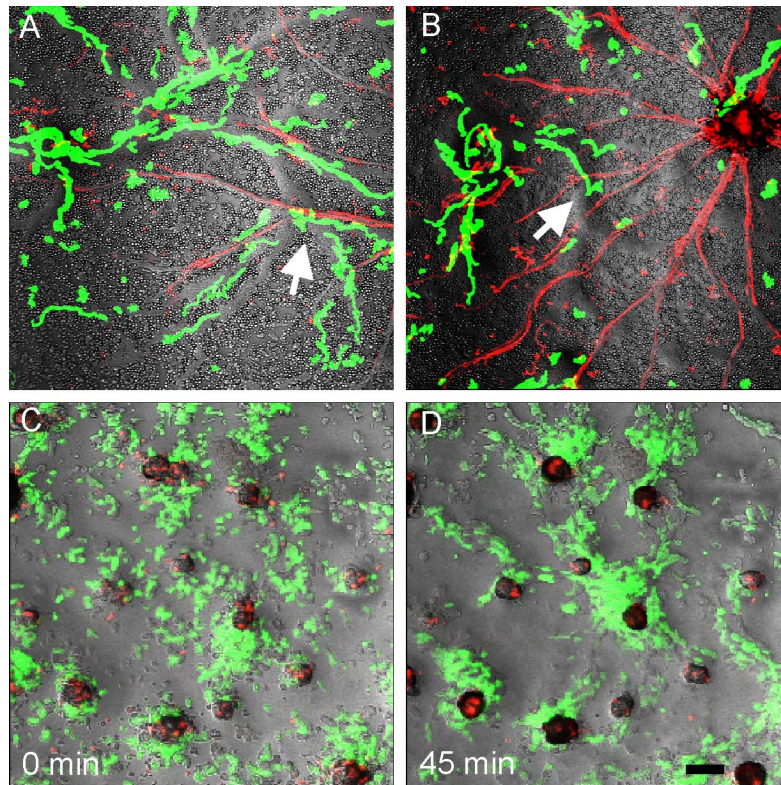
#### **3.3.1.4. Zusammenfassung**

Bei simultanen *in vivo* Messungen von Zellen beider Arten während der Entwicklung lassen sich folgende Beobachtungen über die artspezifische Sortierung von *D. discoideum* und *D. mucoroides* machen:

- 1) Zu Beginn der vielzelligen Entwicklung bilden sich Akkumulationen, die aus einer gleichmäßigen Mischung von Zellen beider Arten bestehen.
- 2) In den sich um diese Zentren bildenden Strömen bewegen sich *D. mucoroides*-Zellen schneller als *D. discoideum*-Zellen obwohl beide auf dieselben periodischen Signale reagieren. Dies führt zu einer Anreicherung von *D. mucoroides* in den Zentren. Der Grund liegt in der Fähigkeit von *D. mucoroides*, sich besser als *D. discoideum* in vielzelligen Aggregaten zu bewegen. Mit zunehmender Kompaktheit der Ströme wird die Geschwindigkeitsdifferenz immer ausgeprägter, was zu einer weiteren Anreicherung von *D. mucoroides* im Zentrum führt.
- 3) Die *D. mucoroides*-Zellen in der Moundmitte beginnen sich schnell rotierend nach oben zu bewegen. Dort befindliche *D. discoideum*-Zellen beteiligen sich nicht an der Bewegung und werden nach unten und an den Rand sortiert.
- 4) Nachdem sich *D. mucoroides* von den *D. discoideum*-Zellen getrennt hat wird die Rotation eingestellt und die *D. mucoroides*-Zellen wandern aus dem Zentrum um Slugs zu bilden. *D. discoideum* bleibt zurück und bildet jetzt eigene Mounds.

#### **3.3.2. *D. discoideum* und *Polysphondylium pallidum/violaceum***

Für die Auswertung wurden 38 Messungen verschiedener Stadien von Mischansätzen verwendet.



**Abb. 33)** A-B: Additionsbilder von Zellmischungen von *D. discoideum* (grün) und *P. pallidum* (rot) in der Aggregationsphase. Die beiden Arten bilden getrennte Aggregationszentren auf die sich die Zellen in separaten Strömen zubewegen. Dabei kommt es zu Überkreuzungen der Ströme (Pfeile). C-D: Zellmischung von *D. discoideum* (grün) in der frühen Aggregationsphase und *P. violaceum* (rot) mit entwickelten Zentren. Maßstab: 100  $\mu$ m

Der Unterschied im chemotaktischen System zwischen *D. discoideum* und den beiden *Polysphondylium*-Arten ermöglicht die Ausbildung von sich überkreuzenden und in entgegengesetzten Richtungen aneinander entlangbewegenden Aggregationsströmen der beiden Spezies im selben Gebiet (Abb. 33A, B). Anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der Arten wird deutlich, daß die Aggregationsströme jeweils nur aus Zellen einer Art bestehen und daß es an den Kreuzungspunkten verschiedener Ströme zu keiner Interaktion der Arten kommt. Der Sortierungseffekt durch Chemotaxis ist durch sich gezielt auf die Aggregationszentren zubewegende Einzelzellen deutlich gezeigt. In wie weit artspezifische Zellerkennung bei der Bildung der Ströme eine Rolle spielt, läßt sich nicht genau sagen. Aggregierende Zellen einer Art bilden jedoch untereinander stabile Kontakte aus.

Trotz der unterschiedlichen Signalmoleküle und der dadurch schon früh in der Aggregationsphase stattfindenden Sortierung kommt es unter bestimmten Bedingungen zu Interaktionen zwischen den Arten. In Zellmischungen, in denen die *P. violaceum*-Zellen in der Entwicklung weiter als die *D. discoideum*-Zellen sind, bilden sich *D. discoideum*-

Aggregate oft in direktem Kontakt zu den schon etablierten *P. violaceum*-Zentren (Abb. 33C, D). Die Häufigkeit dieser benachbarten Zentren deutet auf eine Anziehung von *D. discoideum* durch *P. violaceum*. In einer Auswertung von 5 Messungen mit gleichmäßig verteilten Zentren bilden sich an 22 von 30 *Polysphondylium*-Mounds vorübergehend Ansammlungen von *D. discoideum* (73%). Insgesamt sind dabei 28 *D. discoideum* Zentren vorhanden, so daß hier der Anteil benachbarter Aggregate bei 78% liegt. Die Anziehung von *D. discoideum*-Zellen ist mit der Größe der *Polysphondylium*-Mounds korreliert. Unterscheidet man die *Polysphondylium*-Aggregate nach Größe (9 große, 7 kleine, 2 Messungen), liegt der Anteil großer Aggregate mit *D. discoideum*-Akkumulation bei 100% und von 10 *D. discoideum* Aggregaten bildet sich nur eines separat (90%).

In dieser Phase der Entwicklung ist die Aggregation von *Polysphondylium* fast vollständig abgeschlossen und es sind nur noch sehr wenige Ströme vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Nutzung von cAMP in der Entwicklung von *Polysphondylium* nachgewiesen (Schaap, 1986). Im Gegensatz zu *D. discoideum*/*D. mucoroides*-Mischungen wandern jedoch trotz der gemeinsamen Nutzung von cAMP keine *Dictyostelium*-Zellen in die *Polysphondylium*-Mounds ein und es bilden sich keine gemischten *Dictyostelium*/*Polysphondylium*-Ströme. In Mischexperimenten kann beobachtet werden, daß weit entwickelte *Polysphondylium*-Mounds auch in Gegenwart benachbarter *Dictyostelium*-Zentren weiterhin einzelne *Polysphondylium*-Zellen spezifisch anziehen. Glorin scheint in dieser Phase also weiterhin als Signalmolekül aktiv zu sein.

Obwohl sich kleine *D. discoideum*-Aggregate oft an entwickelten *Polysphondylium* Mounds bilden, ist dieser Effekt nur vorübergehend. Die meisten dieser Aggregate strömen in einem zweiten Schritt zu einem größeren benachbarten *D. discoideum*-Zentrum, bzw. runden sich ab und entfernen sich etwas, wenn sie ein eigenes Signalzentrum bilden. Dies legt eine Dominanz des endogenen cAMP-Systems von *D. discoideum* über das von *Polysphondylium* nahe. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß in den hier geschilderten Versuchen die *Polysphondylium*-Mounds aufgrund der Ausgangszelldichte sehr klein waren und größere Mounds wahrscheinlich einen stärkeren Effekt hätten.

Während der Entwicklung von *Polysphondylium* werden kleinere Zentren von größeren angezogen und übernommen. Jones und Robertson (1976) zeigten, daß entwickelte *Polysphondylium* Zentren auch mit einer cAMP enthaltenden Mikropipette angezogen werden können und daß es bei Entwicklung auf cAMP-haltigem Agar zu keiner Konkurrenz zwischen den Zentren kommt. Die Ähnlichkeit der Anziehung durch größere Zentren und

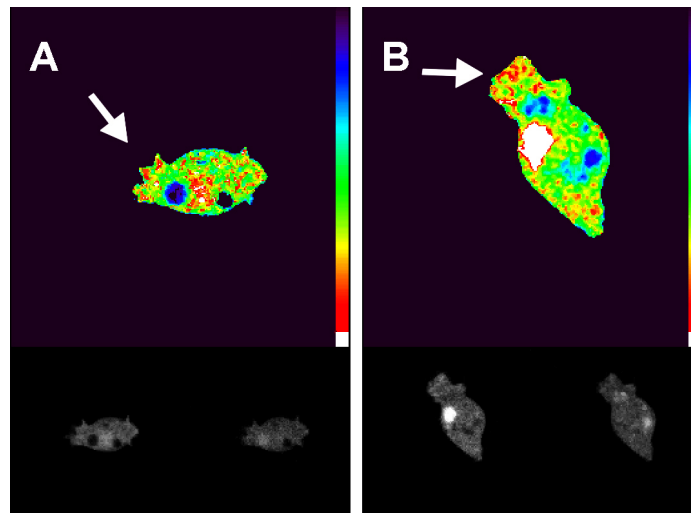
durch eine cAMP-Mikropipette wurde als Hinweis dafür angesehen, daß diese Attraktion über cAMP als Botenstoff stattfindet. In den Mischexperimenten konnte jedoch keine Anziehung von kleinen *Polysphondylium*-Mounds durch cAMP emittierende *Dictyostelium*-Mounds beobachtet werden, selbst bei direktem Kontakt zwischen *Dictyostelium*-Aggregationsströmen und *Polysphondylium*-Mounds. Solche Mounds entwickeln sich weiter zum First-Finger-Stadium, was auf eine weiterhin funktionierende Koordination innerhalb des Aggregats spricht. *Polysphondylium*- und *Dictyostelium*-Aggregate scheinen sich also auch dann in der Entwicklung nicht zu beeinflussen, wenn beide Arten den gleichen chemischen Botenstoff benutzen. Ob das konkurrierende Signal zu schwach ist, ob Unterschiede in der Periodizität der Signale eine Rolle spielen oder ob andere Faktoren, z.B. artspezifische Zelladhäsion wichtig sind, muß hierbei noch geklärt werden.

### **3.4. Intrazelluläre Lokalisierung eines Severin GFP-Fusionsproteins**

Für die Untersuchung der *in vivo* Verteilung wurde sowohl mit AX2-Zellen mit nativem Severin, als auch mit einer Severin-Deletionsmutante (André et al., 1989) gearbeitet. In beide ist das Severin-GFP Fusionsprotein eingebracht worden. Bei der Analyse der *in vivo* Lokalisierung von Severin-GFP konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne eigenes Severin festgestellt werden, so daß im weiteren nicht zwischen den beiden Zell-Linien unterschieden wird. Für Severin-GFP wurden die gleichen *in vitro* Eigenschaften in Aktin-Gelen wie für Severin nachgewiesen (S. Lee, persönliche Mitteilung).

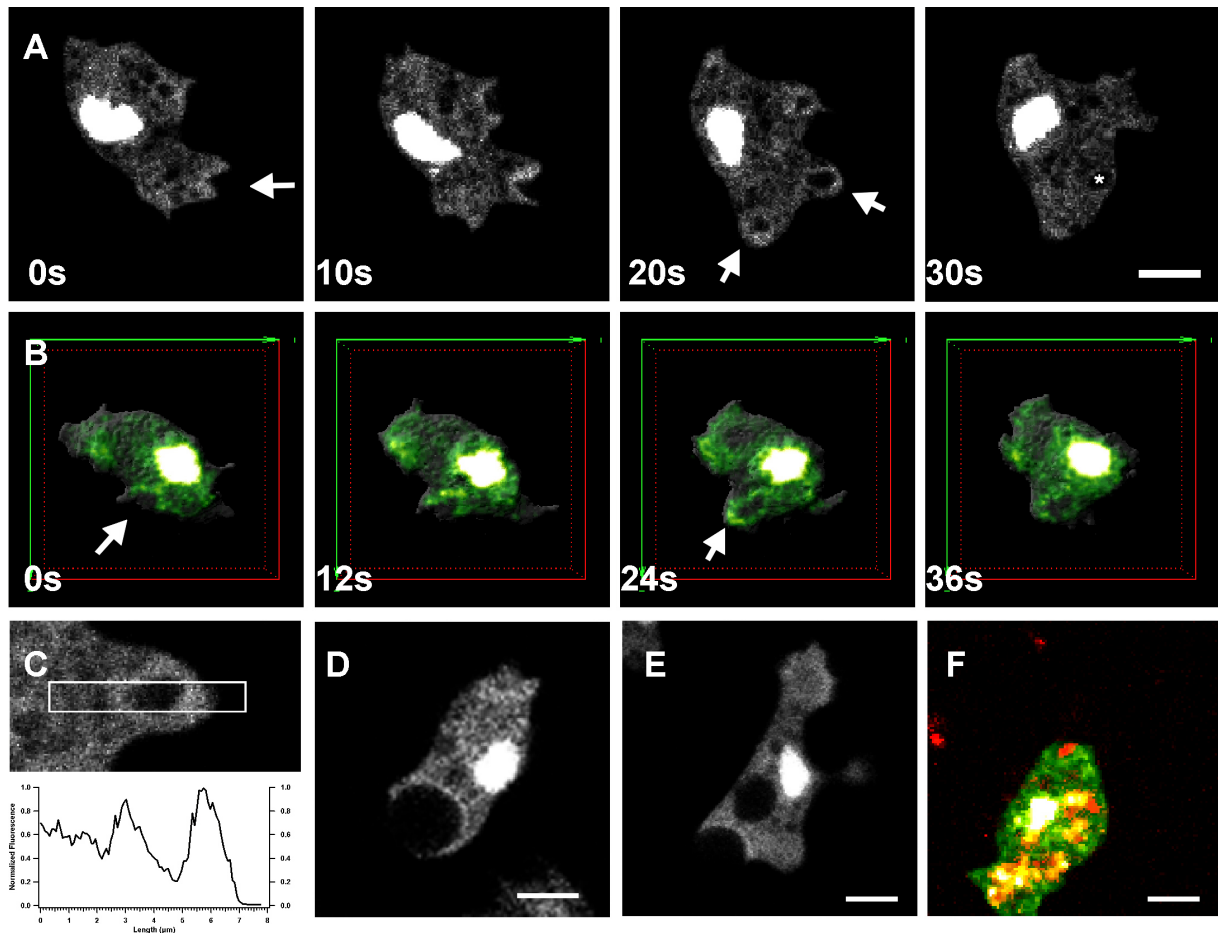
#### **3.4.1. GFP-Kontrolle und Ratio-Bilder Severin-GFP/TRITC-Dextran**

Das Severin-GFP Fusionsprotein zeigt spezifische vorübergehende Lokalisierungen in der Zellperipherie, befindet sich aber auch im Endoplasma. Um die Spezifität der Severin-GFP Lokalisierung zu überprüfen wurden auch Zellen untersucht, in denen GFP ohne Fusion an ein Protein exprimiert wird. Zellen, die S65T-GFP exprimieren, zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung des Proteins, obwohl in den Pseudopodien und auch im Nukleus eine erhöhte Fluoreszenz festzustellen ist. Yumura und Fukui (1998) haben gezeigt, daß das erhöhte Signal in Pseudopodien am deutlichsten in Zellen gesehen werden kann, die nicht mit Agar überschichtet sind. Dies ist durch die Abwesenheit von Membranorganellen in den Pseudopodien zu erklären. Die so entstehende Reduktion des Exklusionsvolumens im



**Abb. 34)** A,B: Ratio-Bilder von Severin-GFP und einem gleichmäßig im Zytoplasma verteilten Marker (TRITC-Dextran). Bereiche erhöhter Severin-Konzentration sind in Rot, Gebiete mit niedriger Konzentration mit Grün bis Blau (entsprechend der Farbtabelle an der rechten Bildseite) dargestellt. Pfeile markieren Bereiche erhöhter Severin-Konzentration. Die kleinen Bilder unter den Ratio-Bildern stellen den Severin-GFP Kanal (links) und den TRITC-Dextran Kanal (rechts) dar.

Pseudopodium führt zu einem höheren Fluoreszenzsignal. Um dies bei der Analyse der spezifischen intrazellulären Lokalisierung des Severin GFP-Fusionsproteins zu berücksichtigen, wurden Ratio-Messungen von Severin-GFP gegen einen gleichmäßig im Zytoplasma vorliegenden Volumenmarker vorgenommen. Dafür wurden Zellen durch Elektroporation mit TRITC-Dextran geladen (Yumura et al., 1995). Beim Vergleich der Fluoreszenzlokalisierung im GFP- und im TRITC-Detektionskanal zeigt sich, daß Severin-GFP in spezifischen Bereichen der Zelle angereichert ist, die nicht die gleiche Anreicherung für TRITC-Dextran zeigen (Abb. 34A, B). In diesen Regionen kommt es zu Umbildungen des Aktin-Zytoskeletts. Die Ratio-Bilder zeigen darüber hinaus, daß Severin-GFP in aktiven Zellen verstärkt in der Zellperipherie und weniger im Endoplasma vorliegt. Auch mit Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, daß Severin im Endoplasma vorliegt (Brock und Pardee, 1988). Dies paßt zu den biochemischen Untersuchungen, die gezeigt haben, daß Severin ein Bestandteil des Zytosols ist (Giffard et al., 1983). Die beobachtete spezifische *in vivo* Verteilung entspricht der eines zytosolischen Proteins, das funktionell mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert ist. Die deutliche Lokalisierung des Severin-GFP Fusionsproteins im Nukleus (Abb. 34) ist ein Artefakt des Konstrukts und entspricht nicht der Lokalisierung von nativem Severin. Sie wird wahrscheinlich durch die 10 AS Linkersequenz zwischen dem GFP und Severin verursacht. Da es sich bei der Kernlokalisierung von Severin-GFP um ein eindeutiges Artefakt handelt, wird im weiteren nicht mehr darauf eingegangen.



**Abb. 35)** A: Bildung eines makropinozytotischen Vesikels in einer durch Agar-Überschichtung abgeflachten Zelle (der Pfeil bei 0s markiert die Position der Vesikelbildung). Die Bilder wurden alle 2 Sekunden aufgenommen. Pfeil bei 20s: Anreicherung von Severin im Gebiet des Vesikelabschlusses. Stern bei 30s: Internalisiertes Vesikel. Maßstab: 5  $\mu$ m. B: 4D-Messung einer Zelle bei der Makropinozytose. Die Zelloberfläche (grau) und die Gebiete mit der höchsten Severinlokalisierung wurden dreidimensional dargestellt. C: Profil der Severin-GFP Fluoreszenzintensität eines Makropinosoms. Die Intensität ist distal vom Vesikel am höchsten. D: Severinlokalisierung während der Phagozytose einer Hefezelle. E: Severinlokalisierung während eines unvollendeten Versuchs der Phagozytose einer Hefezelle. F: Anreicherung von Severin an einem sich bildenden Phagosom während der Phagozytose von *Klebsiella* Bakterien (rot). Maßstab D-F: 5  $\mu$ m

### 3.4.2. Endozytose

#### 3.4.2.1. Makropinozytose

Die Umschließung und Internalisierung eines Flüssigkeitstropfens führt zur Bildung eines Makropinosoms. Als „Crowns“ bezeichnete Membranfalten bilden sich dabei an der Zelloberfläche und wachsen anschließend zusammen, wobei sie ein kleines Volumen Flüssigkeit einschließen (Hacker et al., 1997). Der zeitliche Verlauf wurde für 16 Makropinozytosevorgänge in 8 Zellen verfolgt. Während der Makropinozytose kommt es zur Akkumulation von Severin direkt am sich bildenden Vesikel (Abb. 35A: 0s-10s, B: 0s). Am

stärksten ist die Anreicherung an den distalen Rändern der Membranfalten, die das Vesikel abgrenzen. Darüber hinaus ist sie auch an den schon gebildeten Bereichen in der breiteren Basis der makropinozytischen Ausstülpung vorhanden (Abb. 35A: 10s, B: 12s). Severin ist distal vom Vesikel stark in dem Bereich angereichert, in dem das Vesikel vom Außenmedium abgeschlossen wird (Abb. 35A: 20s, B: 24s). Während der Retraktion der Ausstülpung bleibt die Severinkonzentration distal vom Vesikel erhöht, während sich die Lokalisierung um das Vesikel herum aufzulösen beginnt. 30-40 Sekunden nach dem Abschließen des Vesikels ist die ursprüngliche Severinlokalisierung vollständig verschwunden. Zum selben Zeitpunkt kommt es zur Abrundung des Vesikels, nachdem es den Zellkortex passiert hat. Die Lokalisierung am Vesikel verschwindet hierbei von proximal nach distal. In der in Abb. 35B gezeigten Messung ist die Anreicherung zum Zeitpunkt  $t=48s$  völlig verschwunden (nicht gezeigt).

Das Vorkommen von Severin in makropinozytischen „Crowns“ ist ausgeprägter, wenn den Zellen ein hyperosmotisches Medium zugegeben wird. Nach Austausch des Wachstumsmediums gegen 0.2M Sorbitol bilden die Zellen verstärkt Makropinozytosefortsätze, in denen es zu einer deutlichen Anreicherung von Severin kommt. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch eine an das Volumen gekoppelte Reduktion der Membranspannung durch das hyperosmotische Medium verursacht (Hacker et al., 1997; Sheetz und Dai, 1996). Eichinger et al. (1998) haben eine in *Dictyostelium* vorkommende mit Ste20 verwandte Kinase beschrieben, die spezifisch Severin phosphoryliert und bei der wahrscheinlich eine direkte Signaltransduktion von der Plasmamembran stattfindet. Diese Kinase phosphoryliert Severin spezifisch, wenn Zellen unter hyperosmotischen Streß gesetzt werden (Eichinger et al., 1999).

#### **3.4.2.2. Phagozytose**

Bei der Phagozytose von Hefe kommt es zur Lokalisierung von Severin an das sich formende Phagosom (Abb. 35D), wenn auch nicht so stark wie bei der Makropinozytose. Die deutlichste Akkumulation befindet sich in dem Bereich, in dem das Vesikel abgeschlossen wird. Die Anreicherung um das Phagosom verschwindet innerhalb von 30 Sekunden nach der Umschließung. Die Anreicherung von Severin findet nicht sofort bei Kontakt mit dem Partikel statt, sondern in einem frühen Stadium der Phagosombildung. Sowohl bei abgeschlossenen und als auch bei abgebrochenen Phagozytosevorgängen kommt es zur Severinlokalisierung (Abb. 35E). Mit Antikörpern nachgewiesenes Severin ist in den



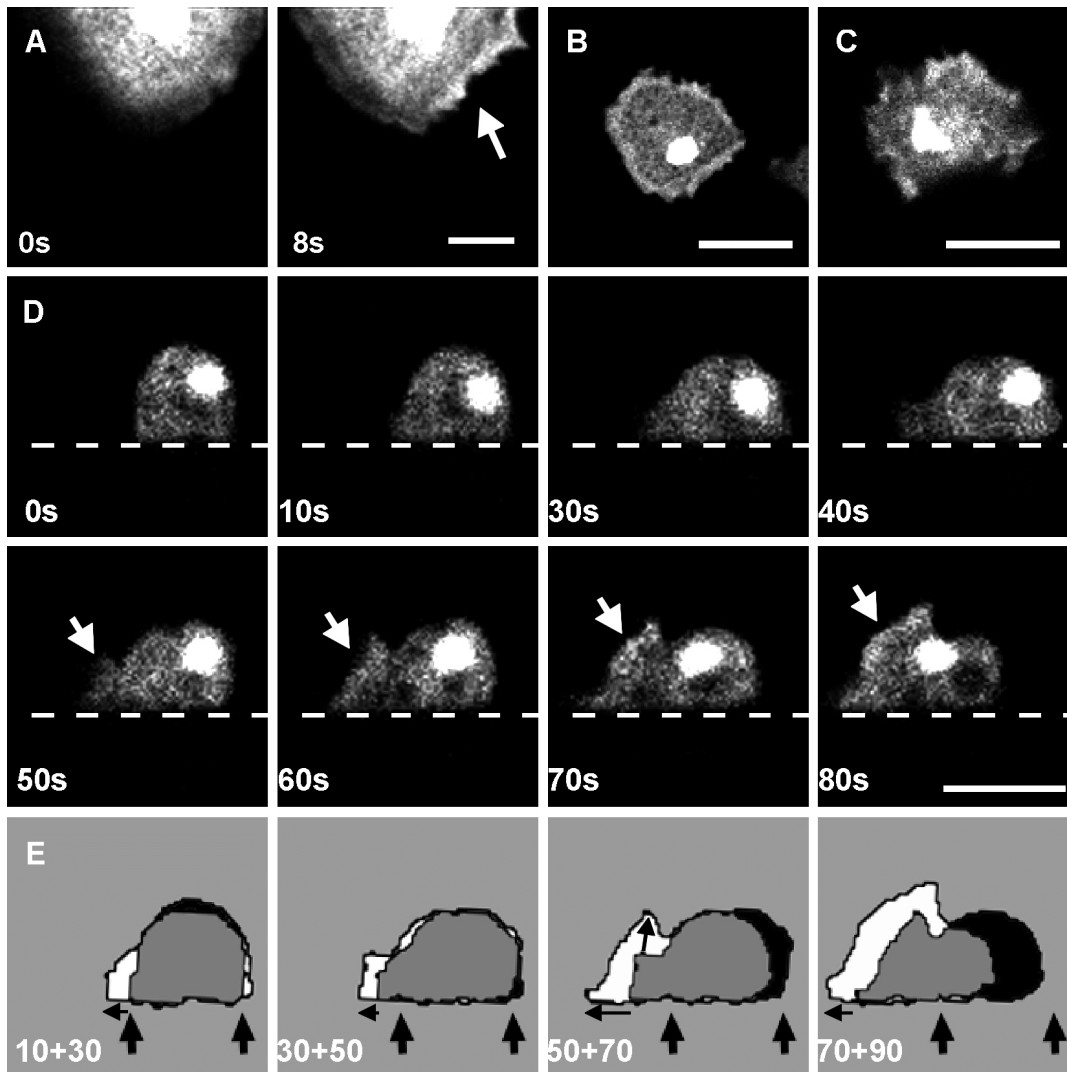
Zellregionen angereichert, die an der Phagozytose von Bakterien beteiligt sind (Brock und Pardee, 1988). Auch *in vivo* Messungen von Severin-GFP Zellen, die *Klebsiella* Bakterien aufnehmen, zeigen eine vorübergehende Anreicherung von Severin während der Phagozytose (Abb. 35F).

### 3.4.3. Zellbewegung

*Dictyostelium*-Zellen, die sich auf einer Oberfläche absetzen, entwickeln eine abgeflachte Morphologie mit großen Kontaktflächen zum Substrat (Weber et al., 1995), bevor sie innerhalb von 30-60 Minuten anfangen, sich zu bewegen. Während dieses Anheftungsvorgangs werden dünne Lamellipodien in alle Richtungen ausgestreckt und bewegen sich vorwärts, bis eine flache, runde Zellform erreicht ist. Während der Ausstreckung der Lamellipodien kommt es zu keiner Anreicherung von Severin (Abb. 36A, 0s), sobald jedoch die Vorwärtsbewegung eingestellt wird und sich an den Zellrändern Membranfalten bilden, ist Severin in diesen Falten lokalisiert (Fig. 36A, 8s). Bis zum Einsetzen der Zellbewegung kann eine Zelle in dieser ausgebreiteten Form bleiben, wobei sich an den Rändern ständig Falten bilden. Severin ist in dieser Phase im stationären Lamellipodienrand angereichert (Abb. 36A-C).

#### 3.4.3.1. Ungerichtete Zellbewegung

Die Lokalisierung von Severin in bewegten Zellen entspricht den in stationären Zellen gemachten Beobachtungen. Vegetative Zellen haben eine Fibroblasten-Zellen ähnliche Form und Bewegungsweise. In Zellen, die Lamellipodien bilden, ist Severin während des Ausstreckungsvorgangs in den Rändern nicht erhöht. Eine Lokalisierung von Severin findet jedoch in den an den Rändern dieser neu gebildeten Bereiche entstehenden Membranfalten statt. Abb. 36D zeigt die seitliche Ansicht einer Zelle auf einer Glasoberfläche. Ein Pseudopodium wird gebildet und der Zellkörper bewegt sich anschließend in dieses hinein. Anfangs ist die Zelle abgerundet und es findet keine Vorwärtsbewegung statt ( $t=0s$ ). Zum Zeitpunkt  $t=10s$  beginnt sich eine Ausstülpung auf der linken Seite zu formen, die für die nächsten 20 Sekunden ausgestreckt wird, ohne daß es hierbei im Pseudopodium zu einer Anreicherung von Severin kommt. Zwischen  $t=30s$  und  $t=40s$  nimmt die Ausstreckungsgeschwindigkeit ab und das Pseudopodium beginnt, auch in dorsaler Richtung



**Abb. 36)** A: Zwei Bilder einer vegetativen Zelle, die sich durch das Ausstrecken von Lamellipodien an einem Deckglas anheftet. Severin ist in den sich ausbildenden Membranfalten am Rand lokalisiert (Pfeil). Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ . B, C: Stationäre Zellen mit Severin-Anreicherungen in den Membranfalten der Lamellipodien. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . D: Zeitserie einer vegetativen Zelle während der Bildung eines Lamellipodiums. Die Bilder wurden alle 5 Sekunden aufgenommen. Die Zelle sitzt auf einem Deckglas und wird von der Seite betrachtet (gestrichelte Linie: Glasoberfläche). Maßstab: 10  $\mu\text{m}$  E: Kombination der Zellumrisse der in D dargestellten Zelle. Die dicken senkrechten Pfeile markieren die Anfangsposition der Zelle, die kleinen horizontalen Pfeile die Bewegung zwischen den Bildern. Neu belegte Flächen sind weiß, frei gewordene in schwarz und überlappende Flächen in grau dargestellt. Die vertikale Expansionskomponente des Pseudopodiums ist durch einen kleinen vertikalen Pfeil im Bild mit den Zeitpunkten 50+70 angezeigt.

zu wachsen. Die Severin-Konzentration im Pseudopodium ist zu diesem Zeitpunkt niedriger als im Endoplasma und eine leichte Anreicherung von Severin ist in dem Bereich sichtbar, in dem vor der Bildung des Pseudopodiums die Zellgrenze lag. Zum Zeitpunkt  $t=50\text{s}$  wächst das Pseudopodium sowohl nach vorne als auch nach dorsal. Bei  $t=60\text{s}$  kommt es zur Akkumulation von Severin im dorsalen Bereich der Zellfront, gleichzeitig beginnt sich der Zellkörper vorwärts zu bewegen. Die Zelle als Ganzes bewegt sich zum Zeitpunkt  $t=70\text{s}$ . Die

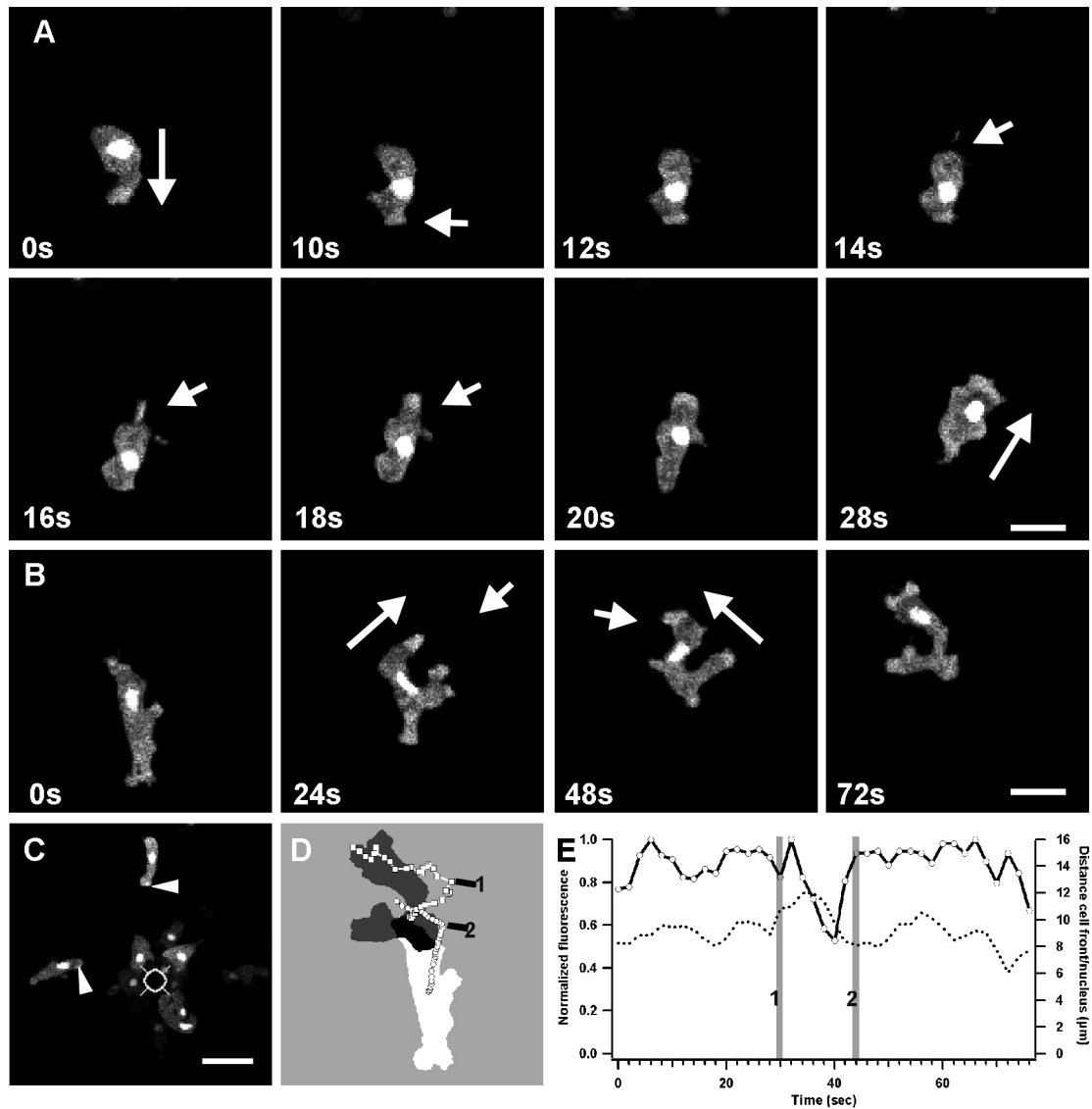
Geschwindigkeit der Pseudopodienausstreckung und der Retraktion des Zellendes sind hierbei ungefähr gleich. Severin ist deutlich im dorsalen Bereich der Zellfront lokalisiert. Im dem Substrat angehefteten basalen Teil des Pseudopodiums, der weiterhin expandiert, kommt es zu keiner solchen Anreicherung. Bei  $t=80s$  übersteigt die Geschwindigkeit der Retraktion des Zellendes die der Pseudopodienausstreckung und der Zellkörper bewegt sich in das Pseudopodium hinein. Severin ist dabei weiterhin im dorsalen Bereich der Zellfront lokalisiert. Wenig später stellt die Zelle die Vorwärtsbewegung ein und nimmt eine Form und Severin-Verteilung an, die dem Ausgangszustand von  $t=0s$  entspricht.

Abb. 36E zeigt die verschiedenen Phasen der Pseudopodienbildung und Zellbewegung mit Hilfe des Vergleichs der Zellgrenzen aus Abb. 36D zu verschiedenen Zeitpunkten. Durch Subtraktionsbilder kann der Vorgang in eine frühe Phase der Pseudopodienausstreckung (Abb. 36D: 0s-30s, E: 10+30) und eine spätere Phase der Bewegung der gesamten Zelle (Abb. 36D: 50s-80s, E: 50+70, 70+90) getrennt werden. Severin ist in der zweiten Phase deutlich in der Zellfront lokalisiert, während dies in der ersten Phase nicht der Fall ist. Zwischen diesen beiden Abschnitten gibt es ein Zwischenzustand, der durch einen Rückgang in der Ausstreckungsgeschwindigkeit des Pseudopodiums und eine gleichzeitige Zunahme der Dicke der Pseudopodienfront charakterisiert ist (Abb. 36D: 40s, E: 30+50). Ab diesem Zeitpunkt wächst das Pseudopodium auch nach dorsal, um Raum für den sich vorwärtsbewegenden Zellkörper zu schaffen. Die so entstandenen zwei Hauptachsen der Expansion (vorwärts und vertikal, eingezeichnet in Abb. 36E:50+70) haben ihren Ausgangspunkt in der Pseudopodienfront zum Zeitpunkt  $t=40s$ . Der Raum zwischen diesen Achsen füllt sich kontinuierlich mit dem sich vorwärtsbewegenden Zellkörper.

Fukui und Inoue (1997) haben F-Aktin enthaltende, kortikale Strukturen beschrieben, in denen auch einige andere Zytoskelett-Proteine angereichert sind, darunter  $\alpha$ -Aktinin und Myosin IB/D (Fukui und Inoue, 1997) und auch Coronin, Gelationsfaktor/ABP-120, Cofilin und Fimbrin (Fukui et al., 1999a). Diese „Eupodien“ können in mit Agar überschichteten *Dictyostelium*-Zellen beobachtet werden. Mit Severin-GFP konnte eine vergleichbare Lokalisierung in überschichteten Zellen nicht beobachtet werden. Auch mit Antikörperfärbungen (Brock und Pardee, 1988) wurden solche Anreicherungen nicht beschrieben, obwohl auch dort die Zellen mit Agar überschichtet wurden.

### **3.4.3.2. Chemotaxis**

Mit Einsetzen der Entwicklung kommt es zu einer Änderung im Zellverhalten. Aggregationskompetente Zellen haben eine längliche Form, die sich von der abgeflachten,



**Abb. 37)** A,B: Zellen unter leichter Agar-Überschichtung. Maßstab: 10 µm. A: Zeitserie einer aggregationskompetenten Zelle, die auf einen endogenen cAMP Stimulus reagiert. Große Pfeile: Zellbewegungsrichtung. Kleine Pfeile: Alte und neu gebildete Zellfront. B: Zeitserie einer sich chemotaktisch bewegenden Zelle, die Signale von zwei konkurrierenden Aggregationszentren erhält (außerhalb der linken und rechten oberen Ecke des Bildes). Großer Pfeil: Bewegungsrichtung. Kleiner Pfeil: Richtung des Stimulus. C: Chemotaxis von aggregationskompetenten Zellen auf eine mit  $10^{-4}$  M cAMP gefüllte Mikropipette (Fadenkreuz) zu. Pfeilspitzen: Anreicherung von Severin in der Zellfront während der Chemotaxis. Maßstab: 20 µm. D: Bewegungsverlauf der Zellfront (Quadrate) und des Zellmittelpunkts (Kreise) der in B gezeigten Zelle. Die chemotaktische Richtungsänderung ist deutlich sichtbar. Die Zellumrisse der Ausgangs- und der Endposition der Messung sind in weiß und dunkelgrau dargestellt. Die Zeitpunkte, an denen sich die Zellfront (1) und der Zellmittelpunkt (2) umorientieren sind markiert. E: Severinkonzentration in der Zellfront im Bezug zum Abstand zwischen Zellfront und Nukleus. Die Zeitpunkte der Richtungsänderung der Zellfront (1) und des Zellmittelpunkts (2) sind markiert (siehe auch D).

fibroblastenartigen Morphologie der vegetativen Zellen während der ungerichteten Bewegung unterscheidet. In dieser Phase reagieren die Zellen auf Stimuli von extrazellulärem cAMP mit der Bildung von Pseudopodien in der Richtung des Stimulus, einer Orientierung der Zelle

entlang des chemotaktischen Gradienten und anschließender gerichteter Bewegung auf die Quelle des Reizes zu. Für Chemotaxis-Untersuchungen wurden Zellen sowohl mit einer cAMP-gefüllten Pipette stimuliert, als auch in Aggregationsfeldern beobachtet. Während der Chemotaxis reichert sich Severin deutlich in der Zellfront von sich gerichtet bewegenden, länglichen Zellen an (Abb. 37A, B, C). Diese Lokalisierung findet hierbei innerhalb von Sekunden nach der Ausbildung der Zellfront statt. Abb. 37A zeigt wie auf einen cAMP-Stimulus hin eine neue Zellfront in dem Bereich der Zelle gebildet wird, der der Reizquelle am nächsten ist. Gleichzeitig kommt es zur Rückbildung der alten Zellfront. 0s: Die Zelle bewegt sich nach unten. 10s: Die Zelle befindet sich weiterhin in der Vorwärtsbewegung, Severin ist dabei in der Zellfront angereichert. 12s: Die Zelle hat die Vorwärtsbewegung eingestellt, zeigt aber noch die ursprüngliche Polarität. 14s: Ein Pseudopodium bildet sich am Hinterende der Zelle (nicht im Fokus). 16s: Das Pseudopodium befindet sich jetzt im Fokus, Severin ist darin angereichert. Die Severinlokalisierung in der ursprünglichen Zellfront beginnt sich aufzulösen. 18s: Aus dem Pseudopodium hat sich eine neue Zellfront gebildet, in der Severin lokalisiert ist. Die Zelle beginnt, sich in Richtung des Stimulus zu verlängern. Die alte Zellfront ist zu diesem Zeitpunkt fast vollständig zurückgebildet. 20s: Die Zelle hat sich völlig umorientiert (im Vergleich zu  $t=12s$ ). Die neue Zellfront ist voll entwickelt, während die alte verschwunden ist. Der Zellkern bewegt sich in die Richtung des Stimulus. 28s: Die Zelle bewegt sich gerichtet auf die cAMP Quelle zu. Die Umorganisation der Zellpolarität geschieht innerhalb von ca. 10 Sekunden und während dieses Vorgangs kann das Verschwinden der Severinlokalisierung in der alten Zellfront und das Erscheinen in der neu gebildeten Front beobachtet werden.

Anstatt eine neue Zellfront zu formen, so wie es in Abb. 37A gezeigt ist, behalten manche Zellen auch ihre ursprüngliche Polarität während der Chemotaxis bei. Abb. 37B zeigt eine Zelle, die sich abwechselnd zu zwei miteinander konkurrierenden Aggregationszentren hin orientiert, die sich rechts und links oben außerhalb des Bildes befinden. 0s: In Reaktion auf einen chemotaktischen Stimulus ist die Zelle dabei, sich nach rechts oben zu orientieren. Die Severin Konzentration ist während dieser Umorientierung in der Zellfront nicht erhöht. An der rechten Seite der Zelle bildet sich ein Pseudopodium. 24s: Die Zelle bewegt sich nach rechts oben. Eine mit der etablierten Front konkurrierende Zellfront hat sich aus dem bei 0s erwähnten Pseudopodium entwickelt. Severin ist in beiden Fronten angereichert. 48s: Die Zelle hat vor ca. 20 Sekunden einen cAMP Stimulus vom konkurrierenden Aggregationszentrum links oben erhalten. Die Zellfront hat sich dementsprechend umorientiert. Ein Pseudopodium formt sich in Richtung auf die cAMP-Quelle. In ihm ist zu

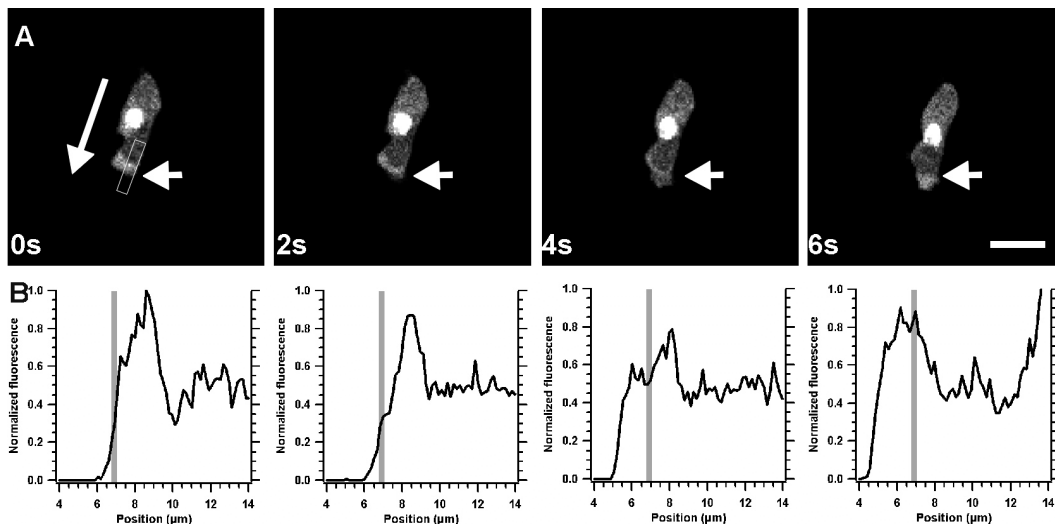
diesem Zeitpunkt keine Severin Lokalisierung vorhanden. Die bei  $t=24s$  vorhandene konkurrierende Zellfront wird zurückgebildet.  $72s$ : Die Zelle bewegt sich nach links oben. Severin ist in der Zellfront angereichert. Das bei  $t=48s$  beschriebene Pseudopodium hat sich am Zellende zu einer konkurrierenden Zellfront entwickelt, wird jedoch später zurückgebildet.

Durch Stimulation mit einer cAMP-gefüllten Pipette (22 positive Versuche) können dieselben Severinlokalisierungen induziert werden, die durch endogene Stimuli in Aggregationsfeldern ausgelöst werden (Abb. 37C).

Eine genaue Analyse der Severindynamik in der Zellfront, der Zellform und der Bewegungsrichtung der in Abb. 37B gezeigten Zelle gibt Aufschluß über den Ablauf der Umorientierung (Abb. 37D, E). Bei  $0s$  und  $40s$  orientiert sich die Zelle auf einen cAMP Stimulus zu (Abb. 37E). Die Ab- und Zunahme der Severin-GFP Fluoreszenz ist zu beiden Zeitpunkten sehr ähnlich. Für die bei  $40s$  stattfindende Umorientierung kann der gesamte Ablauf analysiert werden: Der Anstieg von Severin in der Zellfront findet mit etwa 10 Sekunden Verzögerung zu der Umorientierung der Zellfront, aber gleichzeitig mit dem Einsetzen der gerichteten Bewegung zum Stimulus hin statt (Abb. 37E, Zeitpunkte 1 und 2). Beim Beginn der Reorientierung der Zellfront ( $1=30s$ ) erhöht sich der Abstand zwischen Zellfront und Nukleus, während die Fluoreszenzintensität in der Zellfront absinkt. Gleichzeitig mit der Änderung der Zellbewegungsrichtung ( $2=44s$ ) lokalisiert Severin wieder in die Zellfront. Wie schon bei vegetativen Zellen gezeigt ist die Severinlokalisierung damit vom Prozeß der Pseudopodienbildung abgekoppelt und mit der Bewegung des Zellkörpers korreliert. Im Gegensatz zur ungerichteten Bewegung sind während der Chemotaxis diese beiden Prozesse zeitlich eng miteinander verbunden.

### **3.4.3.3. Gerichtete Bewegung**

In Zellen, die sich während der Chemotaxis gerichtet bewegen, ist Severin in der Zellfront gegenüber dem Endoplasma deutlich angereichert (Abb. 38A:  $0s$ ). Die Lokalisierung erscheint dabei durchgängig, in Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung zeigt sich jedoch, daß Severin in neu gebildeten Fortsätzen an der Zellfront noch nicht erhöht ist (Abb. 38A:  $2s-4s$ ). Es kommt jedoch innerhalb weniger Sekunden zu einer Anreicherung von Severin im neuen Fortsatz (Abb. 38A:  $6s$ ). Die anfängliche Verzögerung der Severinlokalisierung im Pseudopodium ähnelt der in vegetativen Zellen gemachten Beobachtung (Abb. 36D), wobei sich Severin während der gerichteten Bewegung schneller in der Zellfront anreichert.

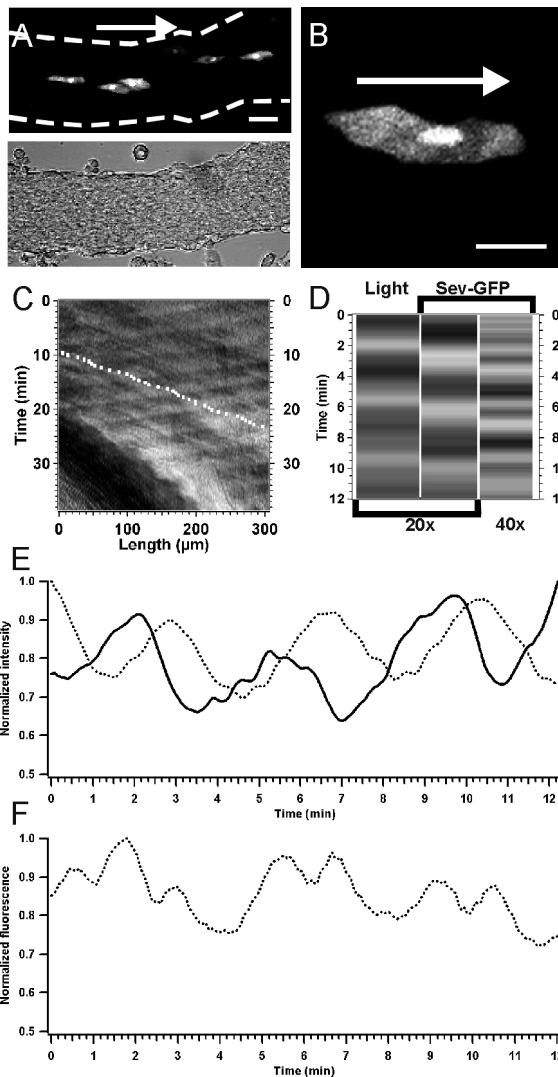


**Abb. 38)** A: Gerichtete chemotaktische Bewegung einer aggregationskompetenten Zelle unter leichter Agarüberschichtung. Großer Pfeil bei 0s: Bewegungsrichtung. Der horizontale Pfeil in allen Bildern markiert die Position der Zellfront bei 0s. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . B: Intensitätsprofil der Severin-GFP Fluoreszenz in der Front der in A dargestellten Zelle. Der verwendete Meßbereich ist in A bei 0s mit einem Rechteck markiert.

Intensitätsprofile aus dem Bereich der Zellfront (Abb. 38B) zeigen, daß die Fluoreszenzintensität im neugebildeten Bereich, ungefähr der im Endoplasma entspricht (4s) und anschließend ein Lokalisierung von Severin in die neue Zellfront stattfindet (6s). In Abb. 38A und B ist die ursprüngliche Zellfront bei 4s noch als Bereich mit erhöhter Severinkonzentration sichtbar. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine etwas dorsal von der neugebildeten Ausstülpung gelegene Region, in der die ursprüngliche Zellform noch erhalten ist. In 4D-Messungen sich bewegendender Zellen sind solche Strukturen in der Nähe von sich bildenden Ausstülpungen zu sehen, liegen dort aber nicht in derselben Ebene, sondern in entlang der z-Achse benachbarten Schnitten.

#### 3.4.4. Zell-Zell Kontakte

In einer späteren Phase der Zellaggregation bilden die Zellen untereinander Kontakte aus. Dabei heftet sich eine nachfolgende Zelle mit der Zellfront an das Zellende der vorangehenden Zelle und folgt deren Bewegungen. An den Kontaktstellen umhüllt die sich anheftende Zelle das Hinterende der vorderen Zelle, wobei sie es oft fast halbmondförmig umschließt. Die Severin-Konzentration ist in diesen Bereichen in der dünnen kortikalen Schicht der nachfolgenden Zelle erhöht. Diese Lokalisierung findet nur an aktiv durch Pseudopodien gebildeten Kontakten statt. Laterale Kontakte zu anderen Zellen, die nicht diese umhüllende Eigenschaft haben besitzen keine Severin-Anreicherung. Severin ist demnach



**Abb. 39)** A: Severin-GFP Zellen in einem Aggregationsstrom. Fluoreszenz- und Transmissionsbild (die gestrichelten Linien im Fluoreszenzbild stellen den Umriß des Stroms dar). Pfeil: Bewegungsrichtung. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ . B: Severin-GFP Zelle in einem Aggregationsstrom. Pfeil: Bewegungsrichtung. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . C: Time-Space-Plot eines Aggregationsstroms im Transmissionslicht. Die gegenläufige Bewegung einer einzelnen Zelle ist als weiße Bewegungsspur eingezeichnet.

D: Vergleich der in der Durchlicht und in der Severin-GFP Fluoreszenz sichtbaren Fluktuationen in einem aus Severin-GFP exprimierenden Zellen bestehenden Aggregationsstrom. Spalte 1+2 (20x): Die Sequenz aus C. Die dritte Spalte zeigt die Severin-GFP Fluoreszenz einer entsprechenden bei 40facher Vergrößerung aufgenommenen Sequenz. E: Graphen der in den Time-Space-Plots von C und D dargestellten Sequenz (durchgehend: Transmission, gestrichelt: Severin-GFP) aufgenommen bei 20facher Vergrößerung. Die Kurven der beiden Kanäle sind zueinander phasenverschoben. F: Severin-GFP Fluoreszenz einer entsprechenden bei 40facher Vergrößerung aufgenommenen Zeitserie eines anderen Stroms (40x in D).

nicht in allen Zell-Zell Kontakten lokalisiert, sondern nur in denjenigen, die sich während der Aggregation an der Zellfront bilden.

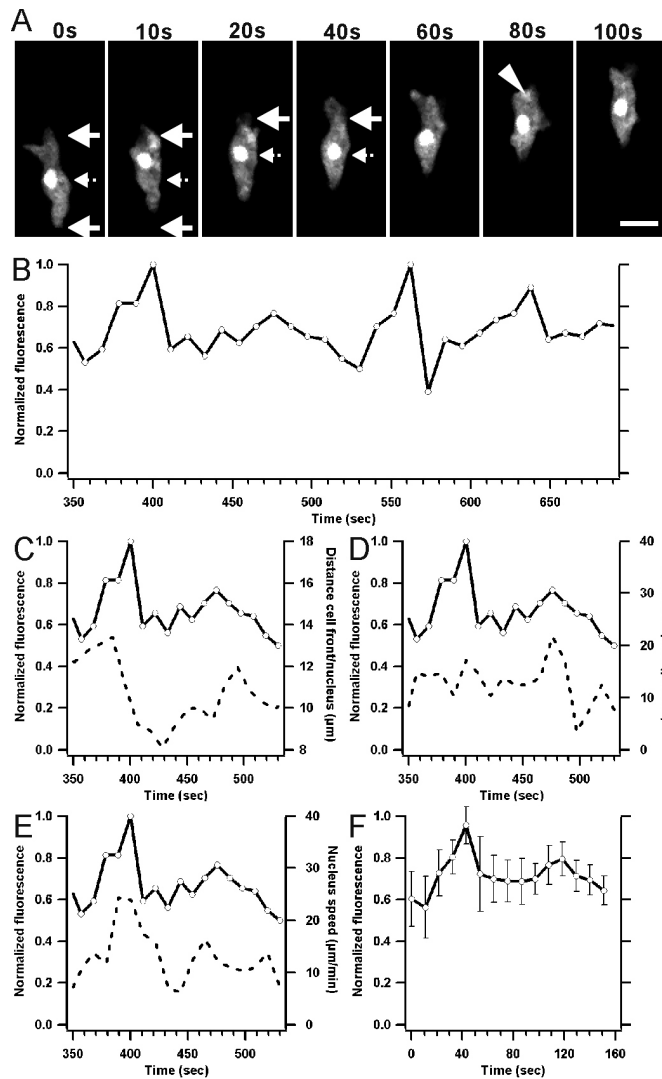
### 3.4.5. Zellen in Aggregationsströmen

Die Form und das Verhalten von Zellen, die sich in vielzelligen Aggregationsströmen bewegen, ähnelt dem von Zellen in Aggregationsfeldern während der chemotaktischen Bewegung (Abb. 39A). Zellen in Strömen sind länglich und Severin ist in der Zellfront angereichert (Abb. 39B). In den meisten Zellen ist die Severin-Konzentration auch vorübergehend am Zellende erhöht, während sich weniger Severin im Endoplasma um den Zellkern befindet (Abb. 39B). Aggregationsströme werden durch periodische cAMP Signale koordiniert die von den Aggregationszentren entlang der Ströme nach außen weitergegeben werden und zu einer Vorwärtsbewegung zum Zentrum hin führen. Zellen in Aggregationsströmen wurden untersucht, um festzustellen, ob die Severin-Dynamik einen



Bezug zu den periodischen cAMP Wellen hat, die als Dunkelfeldwellen dargestellt werden können. In ausschließlich aus Severin-GFP exprimierenden Zellen gebildeten Aggregationsströmen können periodische Ereignisse sowohl im Durchlichtkanal als auch im GFP-Fluoreszenzkanal detektiert werden (Abb. 39C, D). Die Fluktuationen in der Fluoreszenz und im Durchlicht sind eng miteinander korreliert, sind aber zueinander phasenverschoben, wobei die Veränderung im Durchlicht der Severin-GFP Fluoreszenz leicht vorausgeht (Abb. 39D, E). Eine entsprechende, mit 40facher Vergrößerung aufgenommene Zeitserie eines anderen Aggregationsstroms zeigt, daß die in Abb. 39D und E bei 20facher Vergrößerung gezeigte Fluktuation der Severin-GFP Intensitätswerte aus zwei durch ein lokales Minimum getrennten Maxima besteht. Die durch cAMP-Stimulation induzierte Änderung in der Zellmorphologie, die im Transmissionslicht gesehen werden kann, entspricht demnach einem zweigipfligen Anstieg in der Severin-GFP Fluoreszenz (Abb. 39D, E, F).

Diese Messungen, die das Verhalten hunderter von Zellen zusammenfassen, wurden durch hochauflösende 4D-Aufnahmen der subzellulären Lokalisierung von Severin-GFP in einzelnen Zellen in Aggregationsströmen ergänzt. In 35 4D-Messungen von Aggregationsströmen wurden 20 Einzelzellen verfolgt und 13 davon genauer untersucht. Messungen der Gesamtverteilung von Severin-GFP in Zellen zeigen keine periodischen Fluktuationen, die den in Abb. 39E gezeigten entsprechen würden. Dies deutet darauf hin, daß die beobachteten Schwankungen nicht passiv in der ganzen Zelle durch Kontraktion bzw. Streckung erzeugt werden. Die periodische Fluktuation könnte also die spezifische Lokalisierung von Severin-GFP innerhalb der Zelle wiedergeben. In Abb. 40A sind deutliche vorübergehende Anreicherungen von Severin in der Zellfront dargestellt. 0s: Die Zelle ist länglich und es ist keine Severin-Anreicherung in der Zellfront vorhanden. 10s: Die Zellfront ist an der gleichen Position wie bei 0s. Jedoch bewegt sich der Zellkörper vorwärts und damit auf die Zellfront zu. In der Zellfront ist eine deutliche Severinlokalisierung vorhanden. 20s: Die Zelle bewegt sich vorwärts. Die Severin-Akkumulation ist weiterhin sichtbar und es kommt zur Bildung eines neuen Pseudopodiums an der Zellfront. 40s: Das Pseudopodium bildet sich nach vorne aus wobei es in ihm zu keiner Anreicherung von Severin kommt. Der Zellkern bewegt sich zu diesem Zeitpunkt nicht vorwärts. Messungen der Severin-GFP Fluoreszenzintensität in der Zellfront zeigen periodische zweigipflige Fluktuationen mit Periodenlängen von ca. 150 Sekunden (Abb. 40B, F). Die zwei Gipfel eines periodischen Ereignisses liegen dabei ca. 70 Sekunden auseinander. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Gipfeln und die Eigenschaften der periodischen Ereignisse sind identisch zu den durch die cAMP-Signale ausgelösten, für ganze Aggregationsströme gemessenen Fluktuationen, die



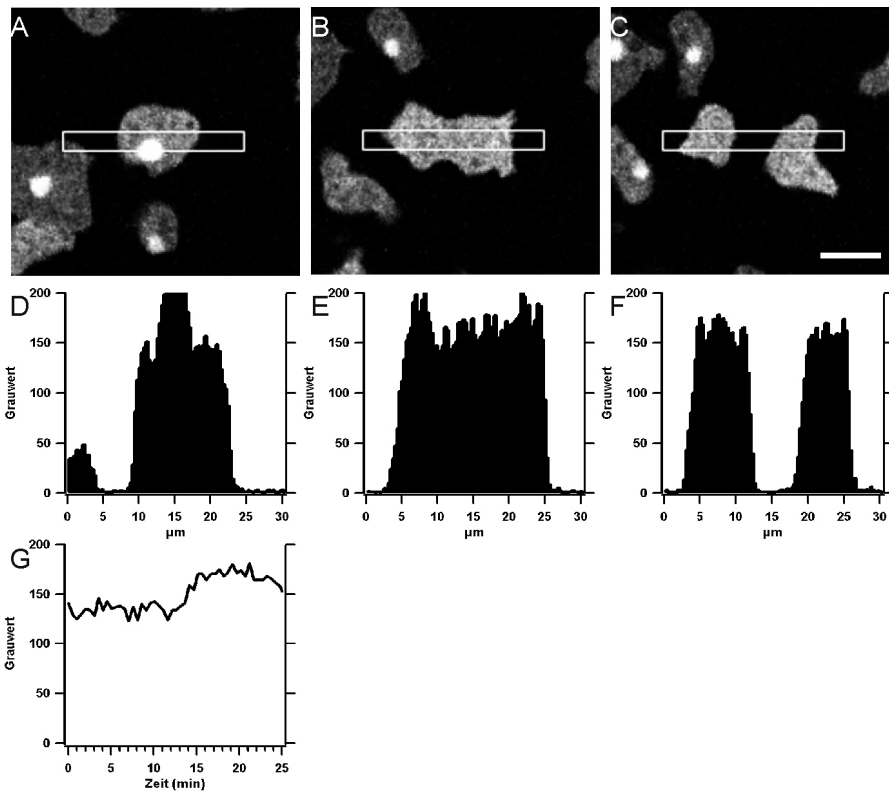
**Abb. 40)** A: 4D-Messung einer Zelle in einem Aggregationsstrom. Durchgezogene Pfeile: Zellanfang und Ende. Gestrichelter Pfeil: Position des Nukleus für den Vergleich zwischen aufeinanderfolgenden Bildern. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . B: Graph der periodischen Fluktuationen der Severin-GFP-Fluoreszenz in der Front einer Zelle in einem Aggregationsstrom. C-E: Korrelation der ersten der Severin-GFP Fluktuationen in B mit verschiedenen Zellparametern. Linke Achse: Severin-GFP Fluoreszenz, Rechte Achse: Abstand zwischen Zellfront und Nukleus (C), Geschwindigkeit der Zellfront (D), Geschwindigkeit des Nukleus (E). F: Die stereotype Fluktuation kann mehrmals hintereinander in derselben Zelle und in verschiedenen Zellen beobachtet werden. In diesem Graph werden acht periodische Ereignisse von vier Zellen zusammengefaßt. Die Standardabweichungen für die einzelnen Zeitpunkte sind eingezeichnet.

in Abb. 39F dargestellt sind. Die in vielzelligen Messungen erhaltene Severin-Dynamik kann also auch auf der Ebene einer einzelnen Zelle in der Zellfront beobachtet werden (Abb. 40B, F). Die Analyse anderer Zellparameter zeigt, daß die Severin-Dynamik eng an das durch cAMP-Stimulation induzierte Verhalten der Zelle gekoppelt ist. Der erste Gipfel fällt mit einer Abnahme der Zelllänge zusammen, die anhand des Abstands von Zellfront und Zellkern (Abb. 40C) wiedergegeben ist. Der Gipfel fällt mit einer deutlichen Vorwärtsbewegung des Zellkerns zusammen (Abb. 40D). Die Verkürzung der Zelle kommt durch eine Erhöhung der Geschwindigkeit des Zellkörpers zustande (hier durch den Nukleus wiedergegeben, Abb. 40E), die zu einer Annäherung an die sich langsamer bewegende Zellfront führt (Abb. 40D). Die Severin-GFP-Fluoreszenzintensität wird daraufhin vorübergehend niedriger während es gleichzeitig zu Minima in der Zell-Länge (Abb. 40C) und der Zellgeschwindigkeit (Abb. 40D) kommt. Anschließend kommt es zu einer zweiten Erhöhung, während die Zelle wieder länglicher wird und sich die Zellgeschwindigkeit erhöht. Die Zunahme in der Länge der Zelle kommt über einen starken Anstieg der Geschwindigkeit der Zellfront zustande, der nicht im

gleichen Maße für die gesamte Zelle stattfindet. Aggregationskompetente Zellen (noch als einzelne Zellen vorliegend) runden sich bei cAMP-Stimulation ab („cringe response“, Alcantara und Monk, 1974), bilden anschließend neue Pseudopodien und bewegen sich in die Richtung des Stimulus. Der zeitliche Ablauf dieses Vorgangs entspricht dem Verhalten von Zellen in Aggregationsströmen. Die durch die erhöhte Geschwindigkeit des Zellkörpers ausgelöste Verkürzung der Zelle entspricht der „cringe response“ (Abb. 40A: 10s) und die anschließende gerichtete chemotaktische Bewegung zeigt sich in der Vorwärtsbewegung der Zellfront (Abb. 40A: 40s, 60s). Severin-GFP Zellen in der frühen Aggregationsphase zeigen bei chemotaktischer Stimulation eine deutliche Severin-Umverteilung in die Zellfront. Diese Severin-Anreicherung findet auch in vielzelligen Aggregationsströmen statt. Die Periodenlängen von cAMP-Wellen in Aggregationsströmen liegen zwischen drei bis vier Minuten (Abb. 39E). Die Periodizität von Severin-Fluktuationen auf Einzelzellebene ist deutlich kürzer und liegt bei ca. 150 Sekunden (Abb. 40B). Diese Diskrepanz in den Periodenlängen wird durch die Vorwärtsbewegung der Zellen bedingt (Rietdorf et al., 1997), die zu einer „Doppler-Verschiebung“ in den Wellenfrequenzen führt, da die nächste Erregungswelle die Zelle früher erreicht als dies bei sich im Strom nicht bewegendem Zellen der Fall wäre (Abb. 39C).

#### **3.4.6. Severin-GFP während der Zellteilung**

In diesem Abschnitt wird eine Eigenschaft des Severin GFP-Fusionsproteins dargestellt, die nichts mit der Funktion und Lokalisierung von Severin zu tun hat. Während der Zellteilung ist Severin-GFP in der ganzen Zelle verteilt, wobei es zu einer leichten Anreicherung an den polaren Lamellipodien der gegenüberliegenden Zellenden kommt. Eine spezifische Lokalisierung in der Teilungsfurche konnte hierbei nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu sich bewegendem Zellen ist die Severin-GFP-Lokalisierung in den polaren Lamellipodien weniger deutlich, obwohl die Zelle vor der Teilung und auch die Tochterzellen danach spezifische Lokalisierungen von Severin-GFP während der Zellbewegung zeigen. Dieser Befund ist durch eine Eigenschaft des Severin GFP-Fusionsproteins erklärbar: Die starke Anreicherung im Zellkern, die ein Artefakt des GFP-Fusionsproteins darstellt, verschwindet vor der Zellteilung (Abb. 41A-C) und erscheint erst in den Tochterzellen wieder. Untersuchungen von Zellteilungen (n=13) zeigten folgenden Verlauf: Innerhalb eines Zeitraums von drei Minuten wird die Lokalisierung im Nukleus immer schwächer, bis sie ungefähr fünf bis sechs Minuten vor der Zellteilung völlig verschwunden ist und im Zellkern



**Abb. 41)** A-C: Vegetative Zelle während der Teilung. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . D-F: Intensitätsprofile des in A-C markierten Bereichs. Der Anstieg der Intensitätswerte im Zytoplasma ist in E und F erkennbar. A, D: 0 min; B, E: 16 min; C, F: 20 min. G: Fluoreszenz-Intensität im Zytoplasma während der Teilung.

die gleiche Severin-GFP Fluoreszenz wie im Zytoplasma vorliegt. Das Herausgehen von Severin-GFP aus dem Nukleus führt zu einem Anstieg der Severin-GFP Fluoreszenz in der gesamten Zelle um ca. 25% (Abb. 41D-G). Nach Beendigung der Zellteilung reichert sich Severin-GFP innerhalb von 10 Minuten wieder im Kern an. Durchschnittlich ist Severin-GFP während der Zellteilung für 15 Minuten nicht im Zellkern angereichert. Der Anstieg der Severin-GFP Konzentration im Zytoplasma maskiert wahrscheinlich die spezifische Lokalisierung von Severin-GFP während der Zellteilung.

## 4. Diskussion

### 4.1. Simultane Detektion von GFP-Varianten

Die in diesem Artikel beschriebene Methode zeigt, daß zwei spektral unterschiedliche GFP Mutanten, W2 (bzw. W7) und S65T, durch Anregung bei 457 nm gleichzeitig detektiert und unterschieden werden können und daß auf diese Weise sowohl in-vivo 3D-Mikroskopie als auch Zeitserien möglich sind (Zimmermann und Siegert, 1998b). Im Gegensatz zu bisher beschriebenen Methoden ist bei diesem Ansatz keine UV Anregung nötig und die Zahl der Aufnahmen, um zwei verschiedene GFP Mutanten zu detektieren, reduziert sich um die Hälfte. Da beide GFP-Mutanten in derselben Aufnahme erfaßt werden, ist die Lokalisierung der verschiedenen GFP-Varianten zueinander genau. Die Durchführung eines 3D-Scans benötigt zumindest ein paar Sekunden, die zeitliche Auflösung wird somit durch simultane Detektion erhöht. Schädigungen durch das Anregungslicht werden reduziert, da nicht zweimal angeregt werden muß und die verwendete blaue Laserlinie weniger Energie als UV Anregung enthält. Damit eignet sich die beschriebene Methode zur Langzeitbeobachtung von allen lebenden Zellen, in die GFP eingebracht werden kann. *Dictyostelium*-Zellen zeigten normales Verhalten in der Bewegung und in der Musterbildung bei Messungen, die sich über mehr als 2,5 Stunden hinzogen (85 Bilder). Experimente mit 4D-Mikroskopie zeigten, daß Zellen sich auch nach 100 3D-Scans mit 16 Fokusebenen (Zeitabstand 1 Minute) normal verhielten. Die Benutzung von langwelligerem Anregungslicht reduzierte das hohe Hintergrundsignal, das ein weiteres Problem der UV-Anregung darstellt. Wie oben dargestellt liegt das S65T-Fluoreszenzsignal nicht in einem eigenen Kanal vor, sondern erscheint zusammen mit dem W2/W7 Signal. Dennoch kann sogar ein schwaches S65T-Fluoreszenzsignal eindeutig identifiziert werden, wenn das im ersten Kanal vorliegende W2/W7 GFP Signal vom zweiten Kanal subtrahiert wird. Um das W2/W7 Signal vollständig aus dem Subtraktionsbild zu entfernen ist es notwendig, dieses Signal in beiden Kanälen auf dieselbe Intensität einzustellen. Das nach der Subtraktion verbleibende Signal aus einer GFP-Mischung repräsentiert dann allein die S65T-Fluoreszenz. Die korrekte Unterscheidung der beiden GFP-Signale kann durch die Betrachtung der Probe in separaten Aufnahmen unter für W2/W7 bzw. S65T-Fluoreszenz optimierten Anregungs- und Filtereinstellungen überprüft werden.

Neuerungen bei den Detektionsmethoden in der Konfokalmikroskopie sowie die Entwicklung neuer GFP-Varianten haben inzwischen die Möglichkeiten der Mehrkanal-Detektion von GFP erweitert (Ellenberg et al., 1999). Die Einführung des spektralen Konfokalmikroskops (Leica TCS SP) ermöglicht eine interaktive Optimierung der spektralen Fluoreszenz-Detektionsbereiche, die mit konventionellen Filtern nicht durchführbar ist. Somit kann die 488 nm Laserlinie zur Anregung der S65T-GFP Variante benutzt werden.

Yellow Fluorescent Protein (YFP, Ormo et al., 1996) eignet sich aufgrund der spektralen Eigenschaften (Ex. 514 Em. 527) zur Kombination mit W2/W7 bzw. der helleren Variante Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP, Miyawaki et al., 1997) und kann entweder simultan detektiert oder durch einen schnellen Wechsel der Anregungswellenlängen mit Hilfe von AOTFs separat angeregt werden. Die Kombination von W2/W7/ECFP und YFP wurde in verschiedenen Untersuchungen zur Markierung unterschiedlicher Proteine im selben Präparat verwendet (Ellenberg et al., 1998; White et al., 1999).

## **4.2. *In vivo* Zellsortierung zweier Prestalk-Zellpopulationen in Slugs**

### **4.2.1. Verteilung der GFP-Reporter in Slugs**

Mit den GFP-Reportern für *pstA*- und *pst0*-Zellen lassen sich in neu gebildeten Slugs ähnliche Verteilungsmuster wie mit anderen zelltypspezifischen Nachweisen finden (Early et al., 1995; Early et al., 1993; Jermyn et al., 1989). In migrierenden Slugs verwischt sich die Abgrenzung zwischen *pstA*- und *pst0*-Bereich für *pst0*-GFP-Zellen, eine Beobachtung, die auch mit *lacZ*-Färbungen gemacht wurde (Early et al., 1993). In beiden Fällen ist dies ein Effekt der Stabilität des Nachweisprodukts (Deichsel et al., 1999; Detterbeck et al., 1994), das auch nach Abschalten des Promotors weiterhin vorliegt.

Sowohl mit *pstA*-GFP als auch mit *pst0*-GFP läßt sich in zwei Tage alten Slugs im Prespore-Bereich eine deutliche Anreicherung markierter Zellen beobachten, die in neu gebildeten Slugs (ca. einen Tag alt) nicht vorhanden ist.

In vielen der ALCs im Prespore-Bereich (Sternfeld und David, 1981; Sternfeld und David, 1982), wird *ecmA* über das *pst0*-Element des Promotors exprimiert (Early et al., 1993). Der Anteil von ALCs im Prespore-Bereich liegt bei >10% (Sternfeld und David, 1982). In jungen, mit *pst0*-GFP-markierten Slugs sind bei weitem weniger Zellen im Prespore-Bereich markiert, als ALCs vorhanden sind. Daß diese ALCs nicht markiert sind, könnte an dem

Zeitraum zwischen Expression und dem Einsetzen der Fluoreszenz von W2- bzw. W7-GFP liegen. Weiterhin muß in einer Zelle genügend GFP exprimiert werden um als Markierungssignal detektierbar zu sein. Zellen, die den Promotor erst vor kurzem angeschaltet haben, oder nur schwach exprimieren, sind damit nicht erkennbar. Die geringe Zahl markierter Zellen im Prespore-Bereich junger Slugs und die mit zunehmendem Alter größer werdende Zahl dieser Zellen läßt sich folglich als Eigenschaft des Reporters erklären.

#### **4.2.2. Zurückfallen von Prestalk-Zellen in den Prespore-Bereich**

Zellen aus der Mitte des pstA-Bereichs des Slugs fallen durch eine vorübergehende Verringerung bzw. Einstellung der Vorwärtsbewegung innerhalb des Slugs in den Prespore-Bereich zurück. In 48h alten Slugs liegen viele pstA-GFP-markierte Zellen im Prespore-Bereich vor. Untersuchungen (Jermyn et al., 1989; Williams et al., 1989) haben gezeigt, daß nur wenige pstA-Zellen im Prespore-Bereich migrierender Slugs vorliegen. Die pstA-GFP-Zellen im Prespore-Bereich sind wahrscheinlich zu großen Teilen Zellen, die über den beschriebenen Weg aus der Spitze zurückgefallen sind und bei denen zu einem früheren Zeitpunkt der ecmA-Promotor aktiviert war. Aufgrund der großen Stabilität von GFP in Zellen (Deichsel et al., 1999) sind sie weiterhin als ehemalige Prestalk-Zellen erkennbar, auch wenn pstA-GFP in diesen Zellen nicht mehr neu exprimiert wird. GFP ist in dieser Funktion nicht so sehr ein Reporter für die aktuelle Genexpression sondern eine Markierung, die die Lokalisierung von Zellen auch nach Abschalten des Promotors verfolgen läßt.

In älteren Slugs befinden sich im Zentrum des Prestalk-Bereichs kompakte, mit pstA-GFP-markierte Zellgruppen. Bei diesen Zellen handelt es sich um pstAB-Zellen (Gaskell et al., 1992; Jermyn et al., 1989; Sternfeld, 1992; Williams et al., 1989), die die Gene ecmA und ecmB exprimieren und eine sich nach hinten verjüngende Ansammlung von Zellen im Zentrum der Slugspitze bilden. In einer Untersuchung der Lokalisierung dieser Zellen in Slugs (Sternfeld, 1992) wurde gezeigt, daß sich diese Zellen oft als Gruppe aus der Spitze nach hinten verlagern und schließlich in die Schleimspur abgegeben werden. Da die abgegebenen pstAB-Zellen aus der pstA Region nachgebildet werden (Jermyn und Williams, 1991, Abe et al., 1994; Sternfeld, 1992) und das ecmA-Gen weiterhin exprimiert wird, sind sie mit pstA-GFP markiert. Es ist zu überlegen, ob das in jungen Slugs beschriebene kontinuierliche Zurückfallen von Zellen, die zu großen Teilen dennoch in der Spitze verbleiben und nur zu ca. 20% in den Prespore-Bereich übergehen, der gleiche Vorgang wie die Verlagerung ganzer Zellgruppen ans Slugende ist, wie sie von Sternfeld (1992) in älteren

Slugs beschrieben wurde. Sternfeld weist darauf hin, daß die Färbung mit Vitalfarbstoffen (Methylenblau, Neutralrot) die Auftrennung in Prestalk- und Prespore-Bereich schon bald, die pstAB-Lokalisierung jedoch erst 10 Stunden nach der Bildung von Slugs zeigt. Andere Untersuchungen, in denen das Alter der Slugs nicht genau beschrieben ist (Jermyn et al., 1989), zeigen eher einzelne sich nach hinten verlagernde Zellen, so daß es sich hier um ein altersbedingtes Phänomen handeln könnte und das Auswandern einzelner Zellen in jungen Slugs einen Vorläufer des Auswanderns ganzer Zellgruppen in älteren Slugs darstellen könnte.

Die *in vivo* Beobachtung des Zurückfallens von Zellen aus der Spitze bestärkt die Hypothese, daß die Bewegung von Slugs im Prestalk-Bereich von dreidimensionalen cAMP-Spiralwellen organisiert wird, die im Prespore-Bereich als planare Wellen weitergeleitet werden (Bretschneider et al., 1995; Siegert und Weijer, 1992; Steinbock et al., 1993). In der Mittelachse der dreidimensionalen, sich nach hinten erstreckenden Spirale wäre eine Orientierung nach chemotaktischen Gradienten nicht möglich und eine gerichtete Bewegung von sich in diesem Bereich befindenden Zellen damit unterbunden. Dementsprechend zeigen zurückfallende Zellen keine eingeschränkte Aktivität, sondern bilden Pseudopodien in unterschiedliche Richtungen aus. Die Tatsache, daß Zellen, die diesen zentralen Bereich nach unterschiedlichen Verweildauern verlassen, sich sofort wieder gerichtet nach vorne bewegen impliziert ein positionsbedingtes Verhalten und ein Wiedererlangen der chemotaktischen Orientierung.

#### **4.2.3. Neubildung von Spitzen**

Im vorderen Prespore-Bereich befindet sich an der Unterseite des Slugs eine Gruppe aus Zellen mit Prestalk-Eigenschaften, die eine wichtige Rolle bei der Kulmination spielt. In dieser spezifisch lokalisierten Zellgruppe befinden sich ecmB und ecmA exprimierende Zellen (Dormann et al., 1996; Jermyn et al., 1996). Die Messungen in dieser Arbeit zeigen, daß diese basale Zellgruppe nicht nur bei der Kulmination eine wichtige Funktion hat, sondern, bei einer Störung der Kommunikation im Slug, an die Slugoberseite wandert und dort neue Spitzen bildet. In dieser Zellgruppe sind pstA-GFP- und pst0-GFP-Zellen lokalisiert. Der Vergleich mit pstA-GFP exprimierenden Slugs zeigt, daß diese Zellpopulation mit pst0-GFP deutlicher markiert ist. Dies deutet auf einen großen Anteil an ALCs hin, die nicht mit pstA-GFP markiert werden.



Die in älteren Slugs mit pstA-GFP markierte, hintere Zellgruppe entspricht in ihrer Lokalisierung den „Rearguard“-Zellen (Schaap, 1983). Es wurde gezeigt, daß aus der Slugspitze kommende pstAB-Zellen in migrierenden Slugs sich in diese Region verlagern, bevor sie in die Schleimspur abgegeben werden (Sternfeld, 1992). Wie weiter oben gezeigt, sind auch pstAB-Zellen mit pstA-GFP-markiert, da sie aus Zellen des pstA-Bereichs gebildet werden. Bei Transfer auf Koffein-Agar bewegen sich Verbände von pstA-GFP-Zellen aus diesem am Slugende gelegenen Bereich vorwärts und an die Oberseite des Prespore-Bereichs. Dort bilden sie rotierende Zentren und anschließend neue Spitzen. Dieses Verhalten läßt sich vor allem mit pstA-GFP-Zellen und weniger deutlich mit pst0-GFP zu beobachten.

Bei diesen beiden Gruppen von Zellen kommt es zu einer deutlichen Beteiligung an der Spitzenbildung, die zeigt, daß sie sich von anderen Zellen im Presporebereich unterscheiden.

PstA-GFP-Zellen aus dem Prespore-Bereich bewegen sich bei der Spitzenneubildung in den pstA-Bereich der neuen Spitze. Wie gezeigt sind diese Zellen wahrscheinlich zu einem früheren Zeitpunkt aus der ursprünglichen Spitze zurückgefallen. Die in neuen Spitzen beobachtete, dem ursprünglichen Zelltyp entsprechende Verteilung dieser Zellen scheint also einen Fall von zellulärem Gedächtnis darzustellen. Zellen, die sich permanent aus der Spitze in den Prespore-Bereich verlagern, wie auch die aus der Spitze auswandernden pstAB-Zellen (Jermyn et al., 1989; Sternfeld, 1992), haben mit Sicherheit veränderte Eigenschaften. In den Prespore-Bereich transplantierte pstA-Zellen bewegen sich durch den Prespore-Bereich zurück zur Spitze (Buhl und MacWilliams, 1991), ein Verhalten das von den pstA-GFP-markierten Zellen im Prespore-Bereich nicht gezeigt wird.

Bei der Neubildung von Spitzen besteht in der Verteilung der pst0-GFP-Zellen ein Unterschied zu der Lokalisierung in der ursprünglichen Slugspitze. Die dort vorhandene anfängliche Aufteilung in den pstA- und pst0-Bereich ist für pst0-GFP-Zellen bei der Spitzenbildung im Presporebereich nicht vorhanden, dort ist die gesamte Spitze markiert. Dies könnte an einer in diesen Zentren stattfindenden Neubildung von pstA-Zellen aus ALCs liegen. In diesem Fall wären beide Zelltypen mit pst0-GFP markiert. Es könnte jedoch auch eine erneute Lokalisierung von in den Prespore-Bereich zurückgefallenen Prestalk-Zellen darstellen, wie sie mit den pstA-GFP-Zellen gezeigt ist. Auch solche Zellen wären mit pst0-GFP markiert.

Spitzenbildungen ohne GFP-Markierung in jungen Slugs sollten wegen den zu diesem Zeitpunkt noch wenigen pst0-GFP-markierten ALCs nicht als Hinweis auf eine Umdifferenzierung von Prespore-Zellen in den neugebildeten Zentren angesehen werden. Die

alterskorrelierte Anhäufung markierter ALCs deutet auf einen verzögerten Nachweis durch den GFP-Reporter. Eine korrektere Darstellung der Spitzenneubildung liegt wahrscheinlich in älteren Slugs vor. In diesen Slugs mit vielen markierten Zellen im Prespore-Bereich war die Zentrenbildung grundsätzlich anhand der fluoreszenzmarkierten Zellen erkennbar.

Für *pstA*-GFP wurde der *ecmA*-Promotor verwendet. Die Expression eines Antikörper-Epitops unter dem *ecmA*-Promotor markierte spezifisch *pstA*-Zellen und nicht *pst0*-Zellen (Jermyn et al., 1989; Williams et al., 1989). Unter Verwendung der empfindlicheren *lacZ*-Färbemethode konnten mit längeren Färbezeiten auch die schwächer exprimierenden Zellen im *pst0*-Bereich und ALCs angefärbt werden (Jermyn und Williams, 1991). Der Nachweis mit GFP unterscheidet sich jedoch von einer in den Einwirkzeiten variierbaren Färbereaktion. Unter dem *ecmA*-Promotor exprimiertes GFP besitzt ähnliche quantitative Eigenschaften wie der Antikörpernachweis und markiert dementsprechend den *pstA*-Bereich der Spitze. Die Stabilität von GFP könnte jedoch zur Akkumulation über einen längeren Zeitraum führen und auf diese Weise in älteren Slugs die ALCs im Presporebereich markieren. Die im Vergleich zu *pst0*-GFP-Zellen spezifische Lokalisierung von *pstA*-GFP-Zellen in den *pstA*-Bereich einer neu entstehenden Spitze spricht jedoch dafür, daß es sich hierbei nicht um schwach exprimierende ALCs handelt, in denen sich *pstA*-GFP akkumuliert hat. *Pst0*-GFP, das in ALCs exprimiert wird, ist dementsprechend in einem weiteren Bereich der Spitze lokalisiert.

Die beschriebenen Verteilungsmuster der *pstA*- und *pst0*-Zellen bei der Spitzenbildung können auch anhand fixierter Präparate festgestellt werden. Der Vorteil der GFP-Reporter liegt jedoch in der Möglichkeit, die Bewegungen der beteiligten Zellen *in vivo* zu beobachten: *PstA*-GFP-Zellen im Prespore-Bereich migrierender Slugs kehren nicht in die etablierte Spitze zurück, bewegen sich bei einer Störung der Organisation des Slugs jedoch wieder zur ursprünglichen Spitze hin. Ein wichtiger Faktor könnte dabei sein, daß der Slug als Ganzes die Vorwärtsbewegung eingestellt hat. Dadurch, daß sich die Spitze nicht mehr selbst bewegt, wird aus der nachfolgenden Bewegung der Zellen im migrierenden Slug bei Stillstand eine Bewegung auf die Spitze zu. Ein Unterschied in der chemotaktischen Empfindlichkeit zu den umgebenden Prespore-Zellen könnte die unter diesen Umständen weiterhin stattfindende gerichtete Bewegung auf ein schwaches Signal zu erklären. Daß *pstA*-Zellen chemotaktisch empfindlicher als *pst0*- und Prespore-Zellen sind (Early et al., 1995) unterstützt diese Hypothese.

Trotz des Auswanderns aus der Spitze reagieren pstA-GFP-Zellen (wahrscheinlich pstAB-Zellen) also weiterhin auf chemotaktische Signale aus der Spitze. Das Zurückfallen innerhalb des Slugs beruht demnach nicht auf negativer Chemotaxis oder einem konkurrierenden Signal, sondern möglicherweise auf Veränderungen in der Fähigkeit, sich im Zellaggregat zu bewegen, eine Idee, die von Sternfeld (1992) und in ähnlicher Weise schon von Bonner (1957) formuliert wurde. Diese Vorstellung paßt auch zu der Sicht, daß das Auswandern von pstAB-Zellgruppen unvollständige Ansätze zur Kulmination und Stielbildung darstellt (Williams, 1997).

Diese Änderung der Bewegungseigenschaften scheint noch keine endgültige Differenzierung zu Stielzellen darzustellen, auch wenn es morphologische Ähnlichkeiten gibt (Sternfeld, 1992). pstAB-Zellen aus der Rearguard-Region sind an der Spitzenneubildung beteiligt und bewegen sich dort wieder in den pstA-Bereich. Da dieses Muster auch Stunden nach der Spitzenbildung unverändert ist, scheint sich das Bewegungsverhalten im Vergleich zu dem von im Slug zurückfallenden PstAB-Zellen wiederum zu ändern.

Die Auswertungen ganzer Zellpopulationen und von 4D-Bewegungstrajektorien einzelner pst0-GFP-markierter Zellen im Slug haben ergeben, daß es bei der Bildung neuer Zentren Unterschiede im Zellverhalten pst0-GFP-markierter Zellen gibt und daß einzelne Zellen sehr früh an der Zentrumsbildung beteiligt sind, während sich ein Großteil der pst0-GFP-markierten Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt gemeinsam in das neue Zentrum bewegt. Dies findet sowohl bei Zellen aus dem hinteren Prespore-Bereich, als auch bei solchen aus der basalen Zellpopulation im vorderen Prespore-Bereich statt. Die gleiche Beobachtung wurde schon bei Versuchen gemacht, in denen neue Spitzen in Slugs mit einer cAMP-gefüllten Mikropipette induziert wurden. Eine kleine Population von Neutralrot gefärbten Zellen wandert hier vor dem Großteil der anderen markierten Zellen von der Unterseite der Slugs zur Pipettenspitze (Rietdorf, 1997).

Der Abstand zu einem entstehenden Zentrum ist für das Einsetzen gerichteter Bewegung nicht entscheidend. Dies deutet auf spezifische, positionsunabhängige Eigenschaften dieser Zelltypen, u. U. in der Empfindlichkeit für chemotaktische Reize. Die Geschwindigkeit, mit der sich Zellen auf eine Signalquelle zubewegen, ist jedoch mit dem Abstand zu ihr korreliert. Dies kann entlang des Prespore-Bereichs anhand der Bewegung zur ursprünglichen Spitze beobachtet werden.

Die Bewegungen von Prestalk-Zellen und ALCs in Slugs mit durch Koffein gestörter Organisation und während der Neubildung von Spitzen sind ein weiteres Indiz für eine

wichtige Rolle von chemotaktischen Signalen bei der Koordination von Zellbewegungen im Slug. Die Vorwärtsbewegung von pstA-GFP-Zellen der Rearguard-Region und die gerichtete Bewegung von Prestalk-Zellen und ALCs durch den Prespore-Bereich zu einem an der Slugoberseite entstehendem Zentrum läßt sich am überzeugendsten mit einer höheren Empfindlichkeit für chemotaktische Signale erklären. Die Bewegungstrajektorien dieser Zellen während der Neubildung von Spitzen entsprechen den in der Spitze migrierender Slugs nachgewiesenen (Siegert und Weijer, 1992) und passen zu einer Organisation der Spitze durch dreidimensionale cAMP-Spiralwellen (Bretschneider et al., 1995). Pipetten-Stimulationsversuche mit cAMP (Rietdorf, 1997) zeigen, daß neue Spitzen in Slugs mit cAMP induziert werden können.

Die Beobachtung der Zellsortierung in Slugs mit Hilfe von 4D-Mikroskopie und GFP-Reportern komplementiert somit die „statischen“ Ergebnisse, die mit Expressionsnachweisen in fixierten Präparaten gewonnen wurden (Early et al., 1995; Early et al., 1993; Jermyn et al., 1989) und die in vivo Untersuchungen mit Vitalfarbstoffen wie Methylenblau und Neutralrot (Dormann et al., 1996; Sternfeld, 1992), denen wiederum der Nachweis der Genexpression fehlt.

#### **4.2.4. Mischungen von GFP-Varianten in Slugs**

Mischungen von pstA-GFP und pst0-GFP-Zellen in Slugs können wenige weitere Erkenntnisse zur Spitzenbildung beitragen, da es zu Überschneidungen bei den markierten Zelltypen kommt. Bei Prestalk-Zellen ist auf ihrem Differenzierungsweg (ALC/pst0 => pstA => pstAB, Abe et al., 1994) zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl das pst0-Element als auch das pstA-Element des ecmA Promotors aktiv. PstA-Zellen und aus der Spitze in den Prespore-Bereich zurückgefallene Zellen sind deswegen mit pstA-GFP und mit pst0-GFP markierbar.

Obwohl es in den meisten Messungen der Spitzenneubildung im Prespore-Bereich zu keinem unterschiedlichen Verhalten von pstA-GFP und pst0-GFP-markierten Zellen im Prespore-Bereich kommt, ist in einzelnen Messungen eine frühere Lokalisierung von pstA-GFP und die Bildung rotierender Zentren ausschließlich aus diesen Zellen zu beobachten. Dieses Verhalten und die spätere Lokalisierung in den vordersten Bereich neuer Spitzen paßt zu dem Befund, daß pstA-Zellen aus dissoziierten Slugs eine ausgeprägtere Chemotaxis auf cAMP zeigen (Early et al., 1995) und deswegen früher in sich neu bildende Zentren lokalisieren. Insgesamt wurde mit pstA-GFP als Reporter auch in ungemischten Ansätzen eine deutlichere

Lokalisierung in rotierende Zentren beobachtet als in vergleichbaren Versuchen mit pst0-GFP-Zellen.

Die inzwischen entwickelten labilen GFP-Varianten (Deichsel et al., 1999) könnten bei der weiteren Klärung der Unterschiede zwischen pstA- und pst0-Zellen hilfreich sein, indem sie Daten über die aktuelle Expression während der Spitzenneubildung liefern könnten.

In der Arbeit von Friedel (1999) wurde demonstriert, daß durch die Kombination spektral unterschiedlicher labiler und stabiler GFP-Varianten unter dem selben Promotor das Expressionsverhalten von Zellpopulationen untersucht werden kann.

### **4.3. Artspezifische Zellsortierung während der Entwicklung**

#### **4.3.1. *D. discoideum* und *D. mucoroides***

Die Analyse markierter Einzelzellen beider Arten im selben Experiment zeigt, daß *D. discoideum* und *D. mucoroides* gemeinsam unter Nutzung desselben chemotaktischen Systems aggregieren. Die Beobachtung der gemischten Mounds legt nahe, daß auch die weitere Entwicklung beider Arten durch gemeinsame cAMP-Signale koordiniert wird. Dies deckt sich mit den vorhandenen Erkenntnissen über Moundentwicklung und Spitzenbildung (Schaap, 1986). In den Mischexperimenten zeigt sich weiterhin, daß das Verhalten von *D. discoideum* während der Entwicklung aufgrund der Konkurrenz mit *D. mucoroides* stark von dem in reinen Aggregaten dokumentierten Verhalten (Rietdorf et al., 1996; Siegert und Weijer, 1995) abweicht. Der mit fortschreitender Entwicklung immer größer werdende Unterschied in der Fähigkeit der Arten, sich im Zellverband zu bewegen, läßt sich mit den in Suspensionsexperimenten gewonnenen Erkenntnissen zur Zelladhäsion (Nicol und Garrod, 1978; Sternfeld, 1979) erklären. Daß sich *D. mucoroides* in den Aggregationsströmen schneller bewegt deckt sich mit Sternfelds Beobachtung (1979), daß *D. mucoroides* in den suspendierten Zellaggregaten nach außen segregiert, während die *D. discoideum*-Zellen ins Innere wandern und damit nach Steinbergs Hypothese (1970) die adhäsiveren sind. Die Sortierung während der Aggregation wird wahrscheinlich durch die innerartliche Zellerkennung (McDonough et al., 1980; Springer und Barondes, 1978) unterstützt, die sich in den *D. discoideum*-Zellschnüren innerhalb von Aggregationsströmen äußert und eine selektive Assoziation mit Zellen der eigenen Art darstellt. Diese kann jedoch nicht bei *D. mucoroides* beobachtet werden.

Auch wenn die Sortierung der Arten über ihre Zelleigenschaften stattfindet, wird sie in natürlichen Aggregationsfeldern durch die chemotaktisch induzierte gerichtete Zellbewegung in den Strömen erheblich beschleunigt, die für eine effizientere Trennung der Spezies und für eine Anreicherung von *D. mucoroides*-Zellen im Zentrum sorgt. Die Zellsortierung in Aggregaten auf Agar ist nach ca. 12h abgeschlossen. Ein Vergleich des zeitlichen Ablaufs zeigt, daß die Zellsortierung in suspendierten gemischten Zellaggregaten (mit eingeschränkter bzw. nicht vorhandener Chemotaxis) nach 24h noch unvollständig ist (Nicol und Garrod, 1978) und es erst nach 48h zu einer vollständigen Trennung der Arten kommt (Sternfeld, 1979). Entsprechend der differentiellen Adhäsionshypothese beeinflußt die Veränderung des Mischungsverhältnisses von *D. discoideum* zu *D. mucoroides* in Sternfelds Suspensionsexperimenten stark den Anteil von erfolgreich sortierten Aggregaten, so daß ein deutlicher Unterschied zwischen 1:1 und 10:1 Mischungen besteht. In Aggregaten auf festem Substrat akkumuliert sich ein 10% *D. mucoroides*-Anteil in ungefähr der gleichen Zeit im Moundzentrum wie ein 50% Anteil. Wäre die Sortierung nur ein Effekt differentieller Zelladhäsion, müßten auch hier Variationen im Mischungsverhältnis zu Unterschieden in der Sortierung führen. Die Indifferenz gegenüber dem Mischungsverhältnis läßt sich jedoch mit einem gemeinsamen chemotaktischen Signal für *D. mucoroides* und *D. discoideum* erklären, da hier die Sortierung durch die chemotaktisch gerichtete Bewegung beider Arten unterstützt wird. Erst bei einer sehr großen Diskrepanz des Mischungsverhältnisses (<5% *D. mucoroides*) kommt es zu einer Änderung der Artenauftrennung, die sich im völligen Wegfall der Verzögerung der *D. discoideum*-Entwicklung im Mound-Stadium äußert.

Kellerman und McNally (1999) haben in einer sehr aufschlußreichen Arbeit das Verhalten verschiedener *D. discoideum*-Stämme (AX2 und KAX3) im Mound-Stadium mit 4D-Einzelzellmessungen untersucht. Die Bewegungstrajektorien der Zellen dieser Stämme sind dabei sehr unterschiedlich. Während AX2-Zellen sich im Mound radial und teilweise ungerichtet bewegen, sind KAX3-Zellen schneller und bewegen sich rotierend. Die Bewegung der KAX3-Zellen ähnelt dabei der von *D. mucoroides*-Zellen in der Moundmitte von *D. mucoroides*/*D. discoideum*-Mischaggregaten. In Mischungen von AX2- und KAX3-Zellen führen schon <10% KAX3-Zellen dazu, daß auch in AX2-Zellen das Bewegungsverhalten von KAX3-Zellen induziert wird. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu *D. mucoroides*/*D. discoideum*-Mischungen. Obwohl die Zellen beider Arten offensichtlich von denselben cAMP-Signalen koordiniert werden, übernehmen *D. discoideum*-Zellen nicht das Bewegungsverhalten von *D. mucoroides*. Selbst bei einem Anteil von nur 10% am Gesamtaggregat sortieren sich die *D. mucoroides*-Zellen aus den *D. discoideum*-Zellen. Dies

spricht für einen essentiellen weiteren Faktor, der die Segregation unter demselben chemotaktischen System ermöglicht. Dieser ist wahrscheinlich die unterschiedliche Zelladhäsion beider Arten.

#### **4.3.2. *D. discoideum* und *Polysphondylium pallidum/violaceum***

Mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenzmarkierung von *Dictyostelium*- und *Polysphondylium*-Zellen zeigt sich deutlich die frühe spezifische Sortierung während der Ausbildung von Aggregationsströmen. Anhand der markierten Zellen kann nachgewiesen werden, daß in diesen Strömen nur noch Zellen einer Art vorliegen.

Die Fähigkeit entwickelter *Polysphondylium*-Mounds aggregationskompetente Zellen der cAMP-sensitiven *Dictyostelium*-Arten anzuziehen ist schon in früheren Mischversuchen beobachtet worden (Shaffer, 1957; Shaffer, 1962). Inzwischen ist nachgewiesen, daß *Polysphondylium* nach Abschluß der Aggregation ein cAMP Signalsystem ausbildet, das in der weiteren Entwicklung eine Rolle als Morphogen bei der Zelldifferenzierung spielt (Hohl et al., 1977; Jones und Robertson, 1976; Schaap, 1986; Schaap und Wang, 1984).

Sussman (1956) hat nachgewiesen, daß ältere *Polysphondylium*-Aggregate *Dictyostelium*- und *Polysphondylium*-Zellen anziehen. Diese Beobachtung kann insofern ergänzt werden, daß einzelne *Polysphondylium*-Zellen spezifisch von in der Entwicklung fortgeschrittenen *Polysphondylium*-Mounds angezogen werden und dabei weiterhin nicht auf *Dictyostelium*-Aggregationszentren reagieren, auch wenn diese näher liegen. Ein zumindest vorübergehendes gleichzeitiges Vorhandensein des Glorin und cAMP-Systems während der Entwicklung von *Polysphondylium* liegt demnach nahe. Über die Botenstoffe hinaus sind für beide Arten unterschiedliche in der Aggregationsphase exprimierte Zelladhäsionsmoleküle beschrieben worden (*D. discoideum*: csA, Beug et al., 1973, *P. pallidum*: cs2, Bozzaro und Gerisch, 1978), die für eine Sortierung in suspendierten Zellaggregaten nötig sind (Bozzaro und Ponte, 1995).

### 4.3.3. Mechanismen der artspezifischen Zellsortierung

Die hier gezeigten in-vivo Untersuchungen der Aggregation von Zellmischungen tragen weitere Aspekte des Sortierungsvorgangs bei, und lassen sich mit den schon vorhandenen Untersuchungen zu einem vollständigeren Bild der artspezifischen Zellsortierung zweier ähnlicher *Dictyostelium*-Arten vereinigen. Bei der Sortierung von *D. discoideum* und *D. mucoroides* ergänzen sich somit zumindest drei unterschiedliche Mechanismen und sorgen für eine effiziente Sortierung: Differentielle Zelladhäsion (Nicol und Garrod, 1978; Sternfeld, 1979), artspezifische Adhäsion (McDonough et al., 1980; Springer und Barondes, 1978) und chemotaktische Signale. Um verschiedene Spezies voneinander zu trennen müssen dabei nicht alle Komponenten angepaßt werden. Wenn sich Unterschiede in der Zelladhäsion entwickeln, wird die Sortierung auch bei Nutzung desselben chemotaktischen Systems durch die gerichtete Zellbewegung unterstützt und beschleunigt. Auf diese Weise kann es innerhalb der Dictyostelidae schon durch die Entwicklung kleiner Unterschiede zur Artbildung und zur Erhaltung der Speziesidentität kommen.

Der Vergleich der hier beschriebenen Beobachtungen mit den anderen experimentellen Ansätzen zeigt die Notwendigkeit, die mit in-vitro Ansätzen gewonnenen Einzelergebnisse auch unter *in vivo* Bedingungen zu verifizieren und mit weiteren Faktoren in einen Gesamtzusammenhang zu setzen. Nicol und Garrod (1978) zogen aus ihren Ergebnissen den Schluß, daß an der Zellsortierung weitere mit ihrem Versuchsansatz nicht erfaßte Faktoren beteiligt sind und auch Barondes et al. (1982) wiesen auf die Schwierigkeit hin, den Einfluß anderer Faktoren in diesen Experimenten auszuschließen. Ponte et al. (1998) zeigten, daß sich die Relevanz von csA Adhäsionsmolekülen für die Entwicklung von *D. discoideum* erst im natürlichen Habitat zeigt.

### 4.3.4. Vergleich mit innerartlichen Sortierungsvorgängen

Die hier dargestellten Mischungsexperimente gemeinsam aggregierender *Dictyostelium*-Arten können zum Verständnis innerartlicher Sortierungsvorgänge im Mound beitragen, da dort ähnliche Faktoren beteiligt sind. In *D. discoideum*-Mounds kommt es zur zelltypspezifischen Sortierung von Prestalk- und Prespore-Zellen. Für Zellen von *D. discoideum*-Slugs sind Unterschiede in der Expression des Zelloberflächen-Glycoproteins gp150 beschrieben (Geltosky et al., 1979), die sich in unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften von Prespore- und Prestalk-Zellen äußern (Lam et al., 1981). Prespore-Zellen sind deutlich adhäsiver als Prestalk-Zellen. Dementsprechend zeigen disaggregierte Slugzellen in Suspension ein



Sortierungsverhalten der Prestalk- und Prespore-Zellen, das sich durch differentielle Zelladhäsion erklären läßt (Siu et al., 1983; Tasaka und Takeuchi, 1979) und das dem von *D. mucoroides* und *D. discoideum* unter den gleichen Bedingungen ähnelt (Sternfeld, 1979). Ebenso bewegen sich während der Moundentwicklung die Zellen mit der geringeren Adhäsivität in das Zentrum und bilden die Spitze. Innerartlich sind dies die Prestalk-Zellen, bei Speziesmischungen sind es *D. mucoroides*-Zellen.

Die Notwendigkeit von chemotaktischen Signalen bei der Zellsortierung im Mound ist weiterhin umstritten (Nicol et al., 1999) und es konnte gezeigt werden, daß in Aggregaten aus Zellen ohne Adenylyl Cyclase A bei PKA Überexpression rotierende Zellbewegung stattfindet (Rappel et al., 1999). Dies wird als Hinweis darauf gesehen, daß nicht ein chemotaktisches Signal, sondern differentielle Zelladhäsion für die Sortierung von Prestalk- und Prespore-Zellen verantwortlich ist (Nicol et al., 1999). *D. mucoroides* und *D. discoideum* zeigen sogar in 1:10 Mischungen eine Verzögerung der Entwicklung von *D. discoideum*-Mounds, bis die *D. mucoroides*-Zellen das Aggregat verlassen haben. Dies kann nicht durch unterschiedliche Zelladhäsion erklärt werden, da die Zellen schon aussortiert sind, sondern legt die gemeinsame Nutzung des cAMP Signalsystems nahe. Die Bildung eines konkurrierenden Zentrums wird dabei durch das etablierte Zentrum (*D. mucoroides*) unterdrückt. Die indirekte Inhibition der *D. discoideum*-Entwicklung durch *D. mucoroides* sowie der Nachweis der Exzitierbarkeit von Mounds mittels cAMP-Mikroinjektion und die dabei stattfindende partielle Auslöschung endogener Signale (Rietdorf et al., 1998) sprechen deutlich für eine Beteiligung des cAMP Systems an der Moundentwicklung. Die unterschiedlichen Befunde bezüglich Zelladhäsion und Chemotaxis schließen sich nicht aus, sondern lassen sich in einem Modell vereinigen, in dem beide Faktoren an der Zellsortierung beteiligt sind. Da sich die Organisation der vielzelligen Stadien in der Evolution sicherlich graduell entwickelt hat, ist eine nur auf Zelladhäsion basierende Zellsortierung mit sehr abgeleiteten Versuchsansätzen (Deletion eines Gens verbunden mit Überexpression eines anderen, bzw. Klumpenbildung in Suspension) sehr wohl möglich, wird aber der *in vivo* stattfindenden effizienten Sortierung nicht gerecht. Dies zeigt sich u. a. in der deutlichen zeitlichen Verzögerung in der Entwicklung. Untersuchungen an *D. discoideum*-Mutanten mit Entwicklungsdefekten belegen, daß Adhäsion und Chemotaxis bei der Entwicklung im Moundstadium eine Rolle spielen (Sukumaran et al., 1998). Inwieweit sich Zelladhäsion und Chemotaxis bei der Sortierung von Zellen vorteilhaft ergänzen, ist im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit an *D. mucoroides* und *D. discoideum* gezeigt.

#### 4.4. Intrazelluläre Lokalisierung eines Severin GFP-Fusionsproteins

Für *Dictyostelium*-Zellen ohne Severin ist kein stark vom Wildtyp abweichendes Verhalten beschrieben (André et al., 1989). Dies ist ein angesichts der nachgewiesenen *in vitro* Aktivität überraschender Befund. Antikörperfärbungen von Severin in aggregationskompetenten Zellen (André et al., 1989; Brock und Pardee, 1988) und in Zellen in Aggregationsströmen (Brock und Pardee, 1988) zeigen wenig oder keine Kolo-kalisation mit F-Aktin und eine relativ gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle. Dies wurde als ein Hinweis darauf angesehen, daß die Funktion von Severin nicht mit dem Wachstum, der Zellform, der Bewegung und der Entwicklung assoziiert ist und es wurde vorgeschlagen, daß Severin u.U. nur unter Streß aktiviert wird (André et al., 1989). Vor kurzem wurde eine spezifische Severin-Kinase charakterisiert, die zur Familie der Ste20p Kinasen gehört (Eichinger et al., 1998) und die Severin spezifisch bei hyperosmotischem Streß phosphoryliert (Eichinger et al., 1999). Dies paßt zu dem vorgeschlagenen Modell. Es ist jedoch nicht bekannt, welchen Effekt die Phosphorylierung auf die Funktion von Severin hat. Eine weitere Sichtweise, die sich in den letzten Jahren im Bezug auf das Fehlen von Mutanten-Phänotypen bei Zytoskelett-Proteinen entwickelt hat ist, daß in den Funktionen von Zytoskelett-Proteinen eine teilweise Redundanz vorhanden ist, durch die der Ausfall eines einzelnen Proteins kompensiert werden kann. Dieses Phänomen ist inzwischen nachgewiesen worden (Rivero et al., 1996a; Witke et al., 1992). Passend zu dieser Vorstellung zeigt die Deletion einiger Zytoskelett-Proteine mit ausgeprägten *in-vitro* Eigenschaften nur schwache Auswirkungen im Phänotyp. Dies ist bei den Aktin quervernetzenden Proteinen Gelationsfaktor/ABP 120 (Brink et al., 1990; Cox et al., 1992),  $\gamma$ -Aktinin (Schleicher et al., 1988), 34 kDA Aktin-bündelndes Protein (Rivero et al., 1996a) und Cortexilin I und II (Faix et al., 1996) der Fall. Die Inaktivierung von Paaren dieser Proteine erzeugt Phänotypen mit deutlichen Defekten (Faix et al., 1996; Rivero et al., 1999b; Rivero et al., 1996b; Witke et al., 1992). Neben Severin wurden in *Dictyostelium* weitere F-Aktin fragmentierende und an Filamentenden bindende Proteine gefunden, deren Funktionen sich mit denen von Severin überschneiden könnten. Protovillin (Hofmann et al., 1993) und Villidin (Eichinger et al., 1999) gehören, wie Severin, zur Familie der Gelsolin verwandten Proteine (Klasse I), während das heterodimere Cap32/34 (Eddy et al., 1996; Hug et al., 1995) zur Klasse II gehört und eine essentielle Funktion in der Regulation der Aktin-Polymerisierung bei chemotaktischer Stimulation hat. Eine mögliche funktionelle Überschneidung mit anderen F-Aktin fragmentierenden und Enden abdeckenden Proteinen bedeutet nicht, daß Severin während Aktivitäten des Zytoskeletts unspezifisch lokalisiert ist.

Die Untersuchung seiner *in vivo* Verteilung kann also nützliche Einsichten in die Rolle von Severin und verwandter Proteine während zellulärer Prozesse geben. Durch die Verbindung verschiedener mikroskopischer Ansätze ist es nun möglich, die *in vivo* Verteilung von Severin sehr detailliert zu beschreiben.

#### **4.4.1. Endozytose**

Die Bildung von Endosomen benötigt die koordinierte Umstrukturierung des F-Aktin Zellkortex um Vesikel zu bilden und abzuschließen. Viele Aktin-assoziierte Proteine sind in makropinozytotischen „Crowns“ angereichert, darunter Coronin (Hacker et al., 1997), DAip1 (Konzok et al., 1999), Myosin IB (Uyeda und Titus, 1997) und die GTPase RacF1 (Rivero et al., 1999a). Nach der Bildung des Endosoms verbleiben Aktin und Coronin anfangs in der Umhüllung des Vesikels bevor sie sich vom Vesikel lösen und möglicherweise zum Zellkortex zurückkehren. Für Mutanten ohne Coronin (Hacker et al., 1997) und DAip1 (Konzok et al., 1999) wurde eine deutliche Reduktion in der Flüssigkeitsaufnahme durch Makropinozytose gezeigt, womit für diese Proteine eine essentielle Funktion in diesem Prozeß naheliegt. Severin ist während der Bildung direkt am Vesikel lokalisiert. Nach Abschluß des Vesikels verschwindet die Anreicherung innerhalb von 30-40 Sekunden. Gleichzeitig rundet sich das Vesikel nach dem Eintritt ins Zytosol ab. Severin scheint demnach das Vesikel schneller als Coronin und Aktin zu verlassen, die bis zu einer Minute und länger nachweisbar am Vesikel verweilen (Hacker et al., 1997; Rauchenberger et al., 1997) und zeigt einen ähnlichen Verlauf wie er für RacF1 (Rivero et al., 1999a) beschrieben ist. Dieser Befund deutet auf eine gestaffelte Freisetzung von Zytoskelett-Proteinen vom Vesikel. Die genaue *in vivo* Untersuchung des zeitlichen Verhaltens anderer mit der Endozytose assoziierter Proteine könnte deswegen in der Bestimmung früher Phasen der Endozytose hilfreich sein.

#### **4.4.2. Vegetative Zellen**

Während es in den sich ausbreitenden Lamellipodienrändern von Zellen, die sich an ein Deckglas anheften, zu keinem Anstieg in der Severin Konzentration kommt, ist Severin in den dorsalen Falten, die sich an den Zellrändern nach der Anheftung bilden, lokalisiert. Die *in vivo* Visualisierung der F-Aktin Dynamik mit Hilfe eines F-Aktin bindenden GFP-Fusionsproteins zeigt schon in sich ausstreckenden Lamellipodien deutliche Anreicherungen (Pang et al., 1998), die nach der Anheftung der Zellen weiter in den Ruffles vorhanden sind.

Damit ist gezeigt, daß es keine gemeinsame Lokalisierung von F-Aktin und Severin während des Vorgangs der Ausstreckung von Lamellipodien, aber eine spätere Kolokalisierung in den Membranfalten gibt. In Säuger-Fibroblasten bilden Zellen ohne Gelsolin weniger Membranfalten (Azuma et al., 1998), was auf eine konservierte Funktion der Proteine hindeutet. Das in stationären Zellen gefundene Lokalisierungsmuster kann auch während ungerichteter Zellbewegung beobachtet werden, bei Severin nicht in sich ausbreitenden Lamellipodien, sondern in den sich kontinuierlich umbildenden Rändern zu finden ist und es oft während der Retraktion vorgestreckter Regionen zu einer Anreicherung kommt. Die Bewegung des Zellkörpers, nicht die Bildung von Pseudopodien ohne Bewegung des Zellkörpers, induziert die Anreicherung von Severin in der Zellfront. Dieses spezifische Lokisierungsverhalten von Severin deutet auf unterschiedliche funktionelle Anforderungen bei diesen beiden Vorgängen hin. Die Bildung eines Lumens für das Endoplasma im F-Aktin Kortex eines Pseudopodiums könnte eine funktionelle Erklärung für diese Beobachtung sein.

Die Severinlokalisierung in Membranfalten bildenden Lamellipodienrändern paßt zur Beobachtung der Severin-Anreicherung in makropinozytotischen „Crowns“. Diese Strukturen entstehen aus zirkulären Membranfalten, die das Makropinosom während des weiteren Vorgangs um- und abschließen (Hacker et al., 1997). Somit haben diese beiden Bildungen der Zelloberfläche dieselben grundlegenden Eigenschaften und es kommt in beiden zur Anreicherung von Severin.

#### **4.4.3. Frühe Aggregation und Chemotaxis**

Der Eintritt von Zellen in die Aggregationsphase induziert eine Änderung in der Substratanheftung und im Bewegungsverhalten von *Dictyostelium*-Zellen (Weber et al., 1995), das auch zu einer stärkeren Anreicherung von Severin in der Zellfront führt.

Die anfängliche Abwesenheit von sich neu bildenden Zellfortsätzen zeigt, daß Severin auch in dieser Phase nicht direkt an der Bildung von Pseudopodien beteiligt ist. Chemotaxis-Experimente mit hoher zeitlicher Auflösung zeigen, daß die gerichtete Pseudopodienbildung der Erhöhung der Severin-Konzentration um ca. 10 Sekunden vorausgeht, so daß wiederum die Lokalisierung von Severin von der Pseudopodienbildung und auch von der Chemotaxis getrennt ist. Eine ähnliche zeitliche Dynamik kann bei der kleinen GTPase RacF1 beobachtet werden, die im Zellkortex angereichert ist und die anfänglich auch nicht in sich bildenden Pseudopodien von vegetativen und von sich chemotaktisch bewegend Zellen zu finden ist (Rivero et al., 1999a). Nach dieser kurzen anfänglichen Verzögerung ist Severin in der

Zellfront deutlich angereichert während sich die Zelle auf den Reiz zubewegt. Dies verbindet wiederum Severin nicht mit der Bildung von Pseudopodien, sondern mit der Bewegung des Zellkörpers, bzw. der gesamten Zelle. In Experimenten mit einzelnen Zellen in Aggregationsfeldern besteht bei cAMP-Stimulation eine inverse Korrelation zwischen der Länge der Zelle und der Severinintensität in der Zellfront. In denselben Messungen kann eine direkte Korrelation zwischen der cAMP induzierten Änderung der Zellbewegung und der Anreicherung von Severin beobachtet werden.

In der frühen Phase der Aggregation ist Severin in den Zellkontakten lokalisiert, die durch Anheftung an das Hinterende der vorangehenden Zelle entstehen. Dieselbe Verteilung kann auch mit Aktin-GFP beobachtet werden (Westphal et al., 1997).

#### **4.4.4. Aggregationsströme**

Brock und Pardee (1988) haben gezeigt, daß Severin in Aggregationsströmen sowohl im Endoplasma als auch im Zellkortex vorhanden ist, während F-Aktin deutlich in der Zellfront lokalisiert ist. *In vivo* Messungen zeigen zu vielen Zeitpunkten eine ähnlich gleichmäßige Verteilung für Severin-GFP. Vorübergehende Anreicherungen können jedoch in der Zellfront und dem Hinterende von sich bewegendenden Zellen beobachtet werden. Intensitätsmessungen der Severin-GFP-Fluoreszenz in der Zellfront zeigen periodische, zweigipflige Fluktuationen, die mit den periodischen cAMP-Wellen in Aggregationsströmen assoziiert sind. Biochemische Untersuchungen von aggregationskompetenten *Dictyostelium*-Zellen zeigen einen steilen Anstieg im F-Aktin Gehalt wenige Sekunden nach der Stimulation mit cAMP, gefolgt von einem vorübergehenden Absinken, während sich die Zelle in der „cringe response“ abrundet (Chen et al., 1996; Newell et al., 1987). Nach ungefähr 60 Sekunden steigt der F-Aktin Gehalt wieder an, während neue Pseudopodien gebildet werden. Über die chemotaktische Dynamik des Zytoskeletts von Zellen in Aggregationsströmen ist weniger bekannt, obwohl in diesem Stadium eindeutig chemotaktische Signale vorhanden sind (Siegert und Weijer, 1991). Die vielzelligen Entwicklungsstadien von *Dictyostelium* sind einer biochemischen Untersuchung nicht so zugänglich, da der Anregungszustand einzelner Zellen in den Strömen positionsbedingt unterschiedlich ist. Als Aktin-Zytoskelett assoziiertes Protein spiegeln die Fluktuationen der Severinverteilung in der Zellfront wahrscheinlich die Aktin-Dynamik während der chemotaktischen Stimulation wieder. Wie schon im Einzelzellstadium ist auch hier die Anreicherung von Severin an die Bewegung des Zellkörpers gekoppelt. Das erste Maximum fällt mit der „cringe response“ zusammen, die in

vielzelligen Strömen durch ein Annähern des Zellkörpers an die Zellfront charakterisiert ist. Das zweite Maximum ist nicht so deutlich und ist mit der erneuten Verlängerung der Zelle und der gerichteten chemotaktischen Bewegung assoziiert.

Mit Hilfe der GFP-Methode und *in vivo* Mikroskopie kann nun die immunohistochemische Untersuchung von Brock und Pardee (1988) ergänzt werden und die Rolle und die zeitliche Dynamik von Severin in ein- und vielzelligen Stadien beschrieben werden. Entsprechend den unterschiedlichen Phasen des *D. discoideum*-Lebenszyklus zeigt Severin verschiedene Verteilungen innerhalb der Zelle, die die Unterschiede in den funktionellen Anforderungen an das Zytoskelett in diesen Stadien widerspiegeln. Wie von Brock und Pardee (1988) vorgeschlagen ist Severin in allen Phasen nur vorübergehend mit F-Aktin kolokalisiert und ist zu anderen Zeitpunkten unspezifisch im Endoplasma und im Zellkortex verteilt. Die *in vivo* Messungen zeigen, daß Severin in der Zellbewegung mit der Vorwärtsbewegung des Zellkörpers assoziiert ist, während es in allen untersuchten Abschnitten der Entwicklung primär nicht an der Bildung von Pseudopodien beteiligt ist. In sich ungerichtet bewegenden vegetativen Zellen bilden sich Lamellipodien über lange Zeit (>60s), ohne daß es zu einer Bewegung des Zellkörpers kommt. Deswegen kommt es in diesen Zellfortsätzen zu keiner Anreicherung von Severin bis sich Ruffles bilden und/oder die Fortsätze zurückgezogen werden. Die Anreicherung von Severin im Lamellipodienrand deutet auf eine Rolle in der Umstrukturierung vorhandener F-Aktin Strukturen, eine Funktion, die zu der *in vitro* nachgewiesenen F-Aktin Fragmentierungsaktivität (Brown et al., 1982; Giffard et al., 1984; Yamamoto et al., 1982) passen würde. Experimente mit Zellen in seitlicher Ansicht zeigen, daß Severin in sich bildenden Pseudopodien eindeutig nicht erhöht ist, es jedoch zu einer deutlichen Anreicherung von Severin in der dorsalen Region des Pseudopodiums kommt sobald der Zellkörper anfängt, sich in der Richtung des Pseudopodiums zu bewegen. Im Gegensatz zu vegetativen Zellen bewegen sich die Zellkörper länglicher, aggregationskompetenter Zellen fast sofort in die an der Zellfront neu gebildeten Pseudopodien, so daß es zu einer fast kontinuierlichen Anreicherung von Severin in der Zellfront kommt. Nur in Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung erscheint bei dieser Bewegungsform ein kurzes Intervall (<10s) zwischen dem Ausstrecken der Pseudopodien und der darauf folgenden Lokalisierung von Severin.

#### 4.4.5. Severin-GFP während der Zellteilung

Abschließend sei noch eine Eigenschaft des Severin GFP-Fusionsproteins besprochen. Das Verschwinden der Severin-GFP Anreicherung im Nukleus während der Zellteilung hat keine Relevanz für die Analyse der Severin-Funktion, ist jedoch erwähnenswert. Bei *Dictyostelium* findet während der Zellteilung eine intranukleäre Mitose statt, d.h. die Kernhülle bleibt erhalten und der Spindelapparat wird im Nukleus gebildet (Guhl und Roos, 1995). Zwischen Beginn der Mitose und dem Abschluß der Zytokinese liegen bei *D. discoideum* durchschnittlich ca. 10 Minuten (Roos und Camenzind, 1981). Das Verschwinden der Kernlokalisierung von Severin-GFP findet demnach während der Mitose statt. Während der geschlossenen Mitose können also Proteine aus dem Kern ins Zytoplasma gelangen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen passiven Ausgleich, da die Konzentrationen in den beiden Kernen und im Zytoplasma während der Zytokinese gleich sind. Es kommt jedoch nicht zu einem unregelmäßigen Eintritt von Proteinen aus dem Zytoplasma in die Nuklei. In Zellen mit z.B. Coronin-GFP sind die Kerne auch während der Zytokinese deutlich als Bereiche ohne Fluoreszenz erkennbar (Fukui et al., 1999b). Die Wiederherstellung der Severin-GFP Kernlokalisierung ca. 10 Minuten nach der Zytokinese ist im Gegensatz zum Austritt des Proteins offensichtlich ein aktiver Prozeß, der in den Tochterzellen zeitgleich stattfindet. In Zellen mit mehreren Kernen läßt sich eindrucksvoll beobachten, wie die Fluoreszenz gleichzeitig aus den Kernen verschwindet, mehrere Tochterzellen gebildet werden und die Lokalisierung in allen Kernen zum selben Zeitpunkt wieder aufgebaut wird. Aufgrund einer zufälligen Eigenschaft des GFP-Fusionsproteins können in *Dictyostelium*-Zellen also spezifische Transportprozesse in und aus dem Kern *in vivo* verfolgt werden. Spezifische Anreicherung von GFP-Fluoreszenz im Zellkern kann auch mit anderen GFP-Fusionsproteinen und sogar mit S65T allein beobachtet werden. Eine genauere Analyse dieser Vorgänge und der dafür verantwortlichen Proteinmotive wäre sicherlich lohnenswert.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abe T, Early A, Siegert F, Weijer C und Williams J. 1994. Patterns of cell movement within the Dictyostelium slug revealed by cell type-specific, surface labeling of living cells. *Cell*. 77:687-699.
- Alcantara F und Monk M. 1974. Signal propagation during aggregation in the slime mould Dictyostelium discoideum. *J Gen Microbiol*. 85:321-334.
- Amsterdam A, Lin S, Moss LG und Hopkins N. 1996. Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. *Gene*. 173:99-103.
- André E, Brink M, Gerisch G, Isenberg G, Noegel A, Schleicher M, Segall JE und Wallraff E. 1989. A Dictyostelium mutant deficient in severin and F-actin fragmenting protein shows normal motility and chemotaxis. *J Cell Biol*. 108:985-996.
- Ashworth JM und Watts DJ. 1970. Metabolism of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum grown in axenic culture. *Biochem J*. 119:175-182.
- Aubry L, Klein G und Satre M. 1997. Cytoskeletal dependence and modulation of endocytosis in Dictyostelium discoideum amoebae. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 65-74.
- Azuma T, Witke W, Stossel TP, Hartwig JH und Kwiatkowski DJ. 1998. Gelsolin is a downstream effector of Rac for fibroblast motility. *EMBO J*. 17:1362-1370.
- Baldauf SL und Doolittle WF. 1997. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:12007-12012.
- Barondes SH, Springer WR und Cooper DN. 1982. Cell adhesion. In: Loomis WF, Hrsg. The development of Dictyostelium discoideum. New York: Ac. Press. 195-231.
- Beug H, Katz FE und Gerisch G. 1973. Dynamics in antigenic membrane sites relating to cell aggregation in Dictyostelium discoideum. *J Cell Biol*. 56:647-658.
- Bonner JT. 1957. A theory of the control of differentiation in the cellular slime molds. *Quart Rev Biol*. 32:232-246.
- Bonner JT. 1983. Chemical signals of social amoebae. *Scientific Am*. 248 (April):114-120.
- Boyde A. 1993. Real-time direct-view confocal light microscopy. In: Shotton D, Hrsg. Electronic light microscopy. New York: Wiley-Liss. 289-314.
- Bozzaro S und Gerisch G. 1978. Contact sites in aggregating cells of Polysphondylium pallidum. *J Mol Biol*. 120:265-279.
- Bozzaro S und Ponte E. 1995. Cell adhesion in the life cycle of Dictyostelium. *Experientia*. 51:1175-1188.
- Brenner M und Thoms SD. 1984. Caffeine blocks activation of cyclic AMP synthesis in Dictyostelium discoideum. *Dev Biol*. 101:136-146.
- Bretschneider T, Siegert F und Weijer CJ. 1995. Three-dimensional scroll waves of cAMP could direct cell movement and gene expression in Dictyostelium slugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4387-4391.
- Bretschneider T, Vasiev B und Weijer CJ. 1997. A model for cell movement during Dictyostelium mound formation. *J Theor Biol*. 189:41.



- Brink M, Gerisch G, Isenberg G, Noegel AA, Segall JE, Wallraff E und Schleicher M. 1990. A Dictyostelium mutant lacking an F-actin cross-linking protein, the 120-kD gelation factor. *J Cell Biol.* 111:1477-1489.
- Brock AM und Pardee JD. 1988. Cytoimmunofluorescent localization of severin in Dictyostelium amoebae. *Dev Biol.* 128:30-39.
- Brown SS, Yamamoto K und Spudich JA. 1982. A 40,000-dalton protein from Dictyostelium discoideum affects assembly properties of actin in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *J Cell Biol.* 93:205-210.
- Buhl B und MacWilliams HK. 1991. Cell sorting within the prestalk zone of Dictyostelium discoideum. *Differentiation.* 46:147-152.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW und Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-805.
- Chen H, Swedlow JR, Grote M, Sedat JW und Agard DA. 1995. The collection, processing and display of digital three-dimensional images of biological specimens. In: Pawley JB, Hrsg. *Handbook of biological confocal microscopy.* New York: Plenum Press. 197-210.
- Chen MY, Insall RH und Devreotes PN. 1996. Signaling through chemoattractant receptors in Dictyostelium. *Trends Genet (TIG).* 12:52-57.
- Cox D, Condeelis J, Wessels D, Soll D, Kern H und Knecht DA. 1992. Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J Cell Biol.* 116:943-955.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA und Tsien RY. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* 20:448-455.
- de Wit RJW und Konijn TM. 1983. Identification of the acrasin of *D. minutum* as a derivative of folic acid. *Cell Differ.* 12:205-210.
- Deichsel H, Friedel S, Detterbeck A, Coyne C, Hamker U und MacWilliams HK. 1999. Green fluorescent proteins with short half-lives as reporters in Dictyostelium discoideum. *Dev Genes Evol.* 209:63-68.
- Delagrave S, Hawtin RE, Silva CM, Yang MM und Youwan DC. 1995. Redshifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *BioTechnology.* 13:151-154.
- Denk W, Piston DW und Webb WW. 1995. Two photon molecular excitation in laser scanning microscopy. In: Pawley JB, Hrsg. *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* New York and London: Plenum Press. 445-457.
- Detterbeck S, Morandini P, Wetterauer B, Bachmair A, Fischer K und MacWilliams HK. 1994. The 'prespore-like cells' of Dictyostelium have ceased to express a prespore gene: Analysis using short-lived beta-galactosidases as reporters. *Development.* 120:2847-2855.
- Dormann D, Siegert F und Weijer CJ. 1996. Analysis of cell movement during the culmination phase of Dictyostelium development. *Development.* 122:761-769.
- Durston AJ. 1976. Tip formation is regulated by an inhibitory gradient in the Dictyostelium discoideum slug. *Nature.* 263:126-129.
- Early A. 1999. Signalling pathways that direct prestalk and stalk cell differentiation in Dictyostelium. *Sem Cell Dev Biol.* 10:587-595.
- Early A, Abe T und Williams J. 1995. Evidence for positional differentiation of prestalk cells and for a morphogenetic gradient in Dictyostelium. *Cell.* 83:91-99.

- Early AE, Gaskell MJ, Traynor D und Williams JG. 1993. Two distinct populations of prestalk cells within the tip of the migratory Dictyostelium slug with differing fates at culmination. *Development*. 118:353-362.
- Eddy RJ, Han JH, Sauterer RA und Condeelis JS. 1996. A major agonist-regulated capping activity in Dictyostelium is due to the capping protein, cap32/34. *Biochim Biophys Acta*. 1314:247-259.
- Eichinger L, Bahler M, Dietz M, Eckerskorn C und Schleicher M. 1998. Characterization and cloning of a Dictyostelium Ste20-like protein kinase that phosphorylates the actin-binding protein severin. *J Biol Chem*. 273:12952-12959.
- Eichinger L, Lee S und Schleicher M. 1999. Dictyostelium as Model System for Studies of the Actin Cytoskeleton by Molecular Genetics. *Microsc Res Tech*. 47:124-134.
- Ellenberg J, Lippincott-Schwartz J und Presley JF. 1998. Two-color green fluorescent protein time-lapse imaging. *BioTechniques*. 25:838-846.
- Ellenberg J, Lippincott-Schwartz J und Presley JF. 1999. Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends Cell Biol*. 9:52-56.
- Faix J, Gerisch G und Noegel AA. 1992. Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in Dictyostelium. *J Cell Sci*. 102:203-214.
- Faix J, Steinmetz M, Boves H, Kammerer RA, Lottspeich F, Mintert U, Murphy J, Stock A, Aebi U und Gerisch G. 1996. Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell*. 86:631-642.
- Fisher PR. 1997. Directional movement of migrating slugs. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 437-452.
- Friedel S. 1999. Zellbewegung und Genexpression in der Prestalk Zone von Dictyostelium discoideum. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie, München
- Fukui Y, de Hostos E, Yumura S, Kitanishi-Yumura T und Inoue S. 1999a. Architectural dynamics of F-actin in eupodia suggests their role in invasive locomotion in Dictyostelium. *Exp Cell Res*. 249:33-45.
- Fukui Y, Engler S, Inoue S und de Hostos EL. 1999b. Architectural dynamics and gene replacement of coronin suggest its role in cytokinesis. *Cell Motil Cytoskel*. 42:204-217.
- Fukui Y und Inoue S. 1997. Amoeboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in Dictyostelium. *Cell Motil Cytoskel*. 36:339-354.
- Gaskell MJ, Jermyn KA, Watts DJ, Treffry T und Williams JG. 1992. Immunolocalization and separation of multiple prestalk cell types in Dictyostelium. *Differentiation*. 51:171-176.
- Geltosky J, Weseman J, Bakke A und Lerner R. 1979. Identification of a cell surface glycoprotein involved in cell aggregation in Dictyostelium discoideum. *Cell*. 18:391-398.
- Gerisch G und Keller HU. 1981. Chemotactic reorientation of granulocytes stimulated with micropipettes containing fMet-Leu-Phe. *J Cell Sci*. 52:1-10.
- Gerisch G, Krelle H, Bozzaro S, Eitle E und Guggenheim R. 1980. Analysis of cell adhesion in Dictyostelium and Polysphondylium by the use of Fab. In: Curtis ASG und Pitts JD,

- Hrsg. Cell Adhesion and Motility (Third Symp. British Soc. Cell Biol.). Cambridge: Cambridge Univ. Press. 293-307.
- Gerlich A. 1997. Signalausbreitung und Zellbewegung während der Entwicklung der zellulären Schleimpilze *Polysphondylium pallidum* und *Polysphondylium violaceum*. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie, München
- Giffard R, Spudich J und Spudich A. 1983. Ca<sup>2+</sup>-sensitive isolation of a cortical actin matrix from *Dictyostelium amoebae*. *J Muscle Res Cell Motil.* 4:115-131.
- Giffard RG, Weeds AG und Spudich JA. 1984. Ca<sup>2+</sup>-dependent Binding of Severin to Actin: A One-to-One Complex is formed. *J Cell Biol.* 98:1796-1803.
- Gross JD, Peacey MJ und Trevan DJ. 1976. Signal emission and signal propagation during early aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci.* 22:645-656.
- Guhl B und Roos UP. 1995. Mitosis in Amoebae of the Cellular Slime Mold (Mycetozoon) *Acytostelium leptosomum*. *Europ J Protist.* 31:97-108.
- Hacker U, Albrecht R und Maniak M. 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 110:105-112.
- Hagiwara H. 1992. Preliminary study of interspecific mixtures in Dictyostelids. *Bull Natl Sci Mus Tokyo, Ser B.* 18:83-100.
- Heim R, Cubitt AB und Tsien RY. 1995. Improved green fluorescence. *Nature.* 373:663-664.
- Heim R, Prasher DC und Tsien RY. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:12501-12504.
- Heim R und Tsien RY. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol.* 6:178-182.
- Hodgkinson S. 1995. GFP in *Dictyostelium*. *Trends Genet (TIG).* 11:327-328.
- Hofmann A, Noegel AA, Bomblies L, Lottspeich F und Schleicher M. 1993. The 100 kDa F-actin capping protein of *Dictyostelium amoebae* is a villin prototype (protovillin). *FEBS Lett.* 328:71-76.
- Hohl HR, Honegger R, Traub F und Markwalder M. 1977. Influence of cAMP on cell differentiation and morphogenesis in *Polysphondylium*. In: Cappuccinelli P und Ashworth J, Hrsg. *Development and differentiation in the cellular slime moulds.* Amsterdam: Elsevier/North-Holland. 149-172.
- Hug C, Jay PY, Reddy I, McNally JG, Bridgman PC, Elson EL und Cooper JA. 1995. Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in *Dictyostelium*. *Cell.* 81:591-600.
- Inoué S. 1995. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: Pawley J, Hrsg. *Handbook of biological confocal microscopy.* New York: Plenum Press. 1-17.
- Inoué S und Spring KR. 1997. Digital image processing. In: Inoué S und Spring K, Hrsg. *Video Microscopy. The Fundamentals.* New York: Plenum Publishing Corp. 536-539.
- Jermyn K, Traynor D und Williams J. 1996. The initiation of basal disc formation in *Dictyostelium discoideum* is an early event in culmination. *Development.* 122:753-760.
- Jermyn KA, Duffy KT und Williams JG. 1989. A new anatomy of the prestalk zone in *Dictyostelium*. *Nature.* 340:144-146.

- Jermyn KA und Williams JG. 1991. An analysis of culmination in *Dictyostelium* using prestalk and stalk-specific cell autonomous markers. *Development*. 111:779-787.
- Jones ME und Robertson A. 1976. Cyclic adenosine monophosphate and the development of *Polysphondylium*. *J Cell Sci*. 22:41-47.
- Kay RR. 1997. DIF signalling. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 279-292.
- Kellerman KA und McNally JG. 1999. Mound-cell movement and morphogenesis in *Dictyostelium*. *Dev Biol*. 208:416-429.
- Kessin RH. 1997. The evolution of the cellular slime molds. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 3-13.
- Konijn TM. 1975. Chemotaxis in the cellular slime moulds. In: Carlile MJ, Hrsg. *Primitive sensory and communication systems. The taxes and tropisms of micro-organisms and cells*. London, New York, San Francisco: Ac. Press. 101-153.
- Konijn TM, Barkley DS, Chang YY und Bonner JT. 1968. Cyclic AMP: a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. *Am Naturalist*. 102:225-233.
- Konijn TM, van de Meene JGC, Bonner JT und Barkley DS. 1967. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 58:1152-1154.
- Konzok A, Weber I, Simmeth E, Hacker U und Maniak M. 1999. DAip1, a *Dictyostelium* Homologue of the Yeast Actin-Interacting Protein 1, Is Involved in Endocytosis, Cytokinesis, and Motility. *J Cell Biol*. 146:453-464.
- Kwiatkowski DJ. 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 11:103-108.
- Lam TY, Pickering G, Geltosky J und Siu CH. 1981. Differential cell cohesiveness expressed by prespore and prestalk cells of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*. 20:22-28.
- Lichtman JW. 1994. Confocal Microscopy. *Scientific Am*. 271:30-35.
- Manstein DJ, Schuster HP, Morandini P und Hunt DM. 1995. Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene*. 162:129-134.
- McDonough JP, Springer WR und Barondes SH. 1980. Species-specific cell cohesion in cellular slime molds. *Exp Cell Res*. 125:1-14.
- Miura K und Siegert F. 2000. Light affects cAMP signaling and cell movement activity in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci*. 97:2111-2116.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M und Tsien RY. 1997. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 388:882-887.
- Mohanty S und Firtel R. 1999. Control of spatial patterning and cell-type proportioning in *Dictyostelium*. *Sem Cell Dev Biol*. 10:597-607.
- Newell PC, Europe-Finner GN und Small NV. 1987. Signal transduction during amoebal chemotaxis of *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol Sci*. 4:5-11.
- Nicol A und Garrod DR. 1978. Mutual cohesion and cell sorting-out among four species of cellular slime moulds. *J Cell Sci*. 32:377-387.

- Nicol A, Rappel WJ, Levine H und Loomis WF. 1999. Cell-sorting in aggregates of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci.* 112:3923-3929.
- Noegel AA, Rivero F, Fucini P, Bracco E, Janssen KP und Schleicher M. 1997. Actin binding proteins: role and regulation. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 33-42.
- Noegel AA und Schleicher M. 2000. The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J Cell Sci.* 113:759-766.
- Olive LS. 1975. *The Mycetozoans*. New York: Ac. Press. 293 S.
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY und Remington SJ. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273:1392-1395.
- Paddock SW, Hazen EJ und DeVries PJ. 1997. Methods and applications of three-color confocal imaging. *BioTechniques.* 22:120-126.
- Palsson E und Cox EC. 1997. On the origin of spiral waves in aggregating *Dictyostelium*. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 411-423.
- Pang KM, Lee E und Knecht DA. 1998. Use of a fusion protein between GFP and an actin-binding domain to visualize transient filamentous-actin structures. *Curr Biol.* 8:405-408.
- Plautz JD, Day RN, Dailey GM, Welsh SB, Hall JC, Halpain S und Kay SA. 1996. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene.* 173:83-87.
- Ponte E, Bracco E, Faix J und Bozzaro S. 1998. Detection of subtle phenotypes: The case of the cell adhesion molecule csA in *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:9360-9365.
- Prasher DC. 1995. Using GFP to see the light. *Trends Genet.* 11:320-323.
- Raper KB. 1940. Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *J Elisha Mitchell Sci Soc.* 56:241-282.
- Raper KB. 1984. *The Dictyostelids*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. 453 S.
- Raper KB und Thom C. 1941. Interspecific mixtures in the Dictyosteliaceae. *Am J Bot.* 28:69-78.
- Rappel WJ, Nicol A, Sarkissian A, Levine H und Loomis WF. 1999. Self-organized vortex state in two-dimensional *Dictyostelium* dynamics. *Phys Rev Lett.* 83:1247-1250.
- Rauchenberger R, Hacker U, Murphy J, Niewohner J und Maniak M. 1997. Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol.* 7:215-218.
- Rietdorf J. 1997. Signaltransduktion und Zellbewegung in den vielzelligen Entwicklungsstadien von *Dictyostelium discoideum*. Doktorarbeit. Fakultät für Biologie, München
- Rietdorf J, Siegert F, Dharmawardhane S, Firtel RA und Weijer CJ. 1997. Analysis of cell movement and signalling during ring formation in an activated Galphal mutant of *Dictyostelium discoideum* that is defective in prestalk zone formation. *Dev Biol.* 181:79-90.

- Rietdorf J, Siegert F und Weijer CJ. 1996. Analysis of optical density wave propagation and cell movement during mound formation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol.* 177:427-438.
- Rietdorf J, Siegert F und Weijer CJ. 1998. Induction of optical density waves and chemotactic cell movement in *Dictyostelium discoideum* by microinjection of cAMP pulses. *Dev Biol.* 204:525-536.
- Rivero F, Albrecht R, Dislich H, Bracco E, Graciotti L, Bozzaro S und Noegel AA. 1999a. RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol Biol Cell.* 10:1205-1219.
- Rivero F, Furukawa R, Fechheimer M und AA N. 1999b. Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 112:2737-2751.
- Rivero F, Furukawa R, Noegel AA und Fechheimer M. 1996a. *Dictyostelium discoideum* cells lacking the 34,000-Dalton actin-binding protein can grow, locomote, and develop, but exhibit defects in regulation of cell structure and movement: A case of partial redundancy. *J Cell Biol.* 135:965-980.
- Rivero F, Koppel B, Peracino B, Bozzaro S, Siegert F, Weijer CJ, Schleicher M, Albrecht R und Noegel AA. 1996b. The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci.* 109:2679-2691.
- Rizzuto R, Brini M, DeGiorgi F, Rossi R, Heim R, Tsien RY und Pozzan T. 1996. Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. *Curr Biol.* 6:183-188.
- Roos UP und Camenzind R. 1981. Spindle dynamics during mitosis in *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol.* 25:248-257.
- Schaap P. 1983. Quantitative analysis of the spatial distribution of ultrastructural differentiation markers during development of *Dictyostelium discoideum*. *WR Arch Dev Biol.* 192:86-94.
- Schaap P. 1986. Regulation of size and pattern in the cellular slime molds. *Differentiation.* 33:1-16.
- Schaap P und Wang M. 1984. The possible involvement of oscillatory cAMP signaling in multicellular morphogenesis of the cellular slime molds. *Dev Biol.* 105:470-478.
- Schleicher M, Noegel A, Schwarz T, Wallraff E, Brink M, Faix J, Gerisch G und Isenberg G. 1988. A *Dictyostelium* mutant with severe defects in alpha-actinin: Its characterization using cDNA probes and monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* 90:59-72.
- Shaffer BM. 1957. Properties of slime moulds amoebae of significance for aggregation. *Quart J Microscop Sci.* 98:377-392.
- Shaffer BM. 1962. The Acrasina. *Adv Morphogenesis.* 2:109-182.
- Sheetz M und Dai J. 1996. Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol.* 6:85-89.
- Sheppard CJR. 1994. Confocal microscopy: Basic principles and system performance. In: Cheng P, Lin T, Wu W und Wu J, Hrsg. *Multidimensional Microscopy*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 1-32.

- Shimomura O, Suthers HLB und Bonner JT. 1982. Chemical identity of the acrasin of the cellular slime mold *Polysphondylium violacium*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79:7376-7379.
- Shotton D. 1993. An introduction to the electronic acquisition of light microscope images. In: Shotton D, Hrsg. *Electronic light microscopy*. New York: Wiley-Liss. 1-38.
- Siegert F und Weijer C. 1989. Digital image processing of optical density wave propagation in *Dictyostelium discoideum* and analysis of the effects of caffeine and ammonia. *J Cell Sci*. 93:325-335.
- Siegert F und Weijer C. 1997. Control of cell movement during multicellular morphogenesis. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 425-436.
- Siegert F und Weijer CJ. 1991. Analysis of optical density wave propagation and cell movement in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Physica D*. 49:224-232.
- Siegert F und Weijer CJ. 1992. Three-dimensional scroll waves organize *Dictyostelium* slugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:6433-6437.
- Siegert F und Weijer CJ. 1993. The role of periodic signals in the morphogenesis of *Dictyostelium discoideum*. In: Rensing L, Hrsg. *Oscillations and Morphogenesis*. New York: M. Dekker. 133-152.
- Siegert F und Weijer CJ. 1995. Spiral and concentric waves organize multicellular *Dictyostelium* mounds. *Curr Biol*. 5:937-943.
- Siu CH, Des Roches B und Lam TY. 1983. Involvement of a cell-surface glycoprotein in the cell-sorting process of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80:6596-6600.
- Springer WR und Barondes SH. 1978. Direct measurement of species-specific cohesion in cellular slime molds. *J Cell Biol*. 78:937-942.
- Steinberg MS. 1970. Does differential cohesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configuration and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J Exp Zool*. 173:395-434.
- Steinbock O, Siegert F, Muller SC und Weijer CJ. 1993. Three-dimensional waves of excitation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:7332-7335.
- Sternfeld J. 1979. Evidence for differential cellular adhesion as the mechanism of sorting-out of various cellular slime mold species. *J Embryol Exp Morph*. 53:163-178.
- Sternfeld J. 1992. A study of *pstB* cells during *Dictyostelium* migration and culmination reveals a unidirectional cell type conversion process. *WR Arch Dev Biol*. 201:354-363.
- Sternfeld J und David CN. 1981. Cell sorting during pattern formation in *Dictyostelium*. *Differentiation*. 20:10-21.
- Sternfeld J und David CN. 1982. Fate and regulation of anterior-like cells in *Dictyostelium* slugs. *Dev Biol*. 93:111-118.
- Sukumaran S, Brown JM, Firtel RA und McNally JG. 1998. *lagC*-null and *gbf*-null cells define key steps in the morphogenesis of *Dictyostelium* mounds. *Dev Biol*. 200:16-26.
- Sussman M. 1956. The biology of the cellular slime molds. *Annu Rev Microbiol*. 10:21-50.

- Sussman M. 1987. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. In: Spudich JA, Hrsg. *Methods in Cell Biology*. Orlando, FL: Ac. Press. 9-29.
- Tasaka M und Takeuchi I. 1979. Sorting out behaviour of disaggregated cells in the absence of morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *J Embryol Exp Morphol*. 49:89-102.
- Terasaki M und Dailey ME. 1995. Confocal microscopy of living cells. In: Pawley JB, Hrsg. *Handbook of biological confocal microscopy*. New York: Plenum Press. 327-346.
- Theibert A und Devreotes PN. 1983. Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum*: adaptation is independent of activation of adenylate cyclase. *J Cell Biol*. 97:173-177.
- Uyeda TQ und Titus MA. 1997. The myosins of *Dictyostelium*. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 43-64.
- Van der Voort HTM und Smeudlers AWM. 1993. Acquisition, processing and visualization of three-dimensional confocal images. In: Shotton D, Hrsg. *Electronic light microscopy*. New York: Wiley-Liss. 247-271.
- van Haastert PJM. 1997. Transduction of the chemotactic cAMP signal across the plasma membrane. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 173-191.
- van Haastert PJM, de Wit RJW, Grijpma Y und Konijn TM. 1982. Identification of a pterin as the acrasin of the cellular slime mold *Dictyostelium lacteum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79:6270-6274.
- Weber I, Wallraff E, Albrecht R und Gerisch G. 1995. Motility and substratum adhesion of *Dictyostelium* wild-type and cytoskeletal mutant cells: A study by RICM/bright-field double-view image analysis. *J Cell Sci*. 108:1519-1530.
- Weijer CJ. 1999. Morphogenetic cell movement in *Dictyostelium*. *Sem Cell Dev Biol*. 10:609-619.
- Weijer CJ, David CN und Sternfeld J. 1987. Vital staining methods used in the analysis of cell sorting in *Dictyostelium discoideum*. In: Spudich JA, Hrsg. *Methods in Cell Biology*. Orlando, FL: Ac. Press. 449-459.
- Westphal M, Jungbluth A, Heidecker M, Muhlbauer B, Heizer C, Schwartz JM, Marriott G und Gerisch G. 1997. Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol*. 7:176-183.
- White J, Ludger J, Mallard F, Girod A, Grill S, Reinsch S, Keller P, Tzschaschel B, Echard A, Goud B und Stelzer EHK. 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol*. 147:743-759.
- White NS. 1995. Visualization systems for multidimensional CLSM images. In: Pawley JB, Hrsg. *Handbook of biological confocal microscopy*. New York: Plenum Press. 211-254.
- Williams J. 1997. Prestalk and stalk heterogeneity in *Dictyostelium*. In: Maeda Y, Inouye K und Takeuchi I, Hrsg. *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press. 293-304.
- Williams JG, Duffy KT, Lane DP, McRobbie SJ, Harwood AJ, Traynor D, Kay RR und Jermyn KA. 1989. Origins of the prestalk-prespore pattern in *Dictyostelium* development. *Cell*. 59:1157-1163.



- Wilson T. 1993. Image formation in confocal microscopy. In: Shotton D, Hrsg. Electronic light microscopy. New York: Wiley-Liss. 231-246.
- Wilson T und Hamilton DK. 1982. Dynamic focussing in the confocal scanning microscope. *J Microsc.* 128:139-143.
- Witke W, Schleicher M und Noegel AA. 1992. Redundancy in the microfilament system - abnormal development of Dictyostelium cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell.* 68:53-62.
- Wurster B, Pan, Tyan und Bonner J. 1976. Preliminary characterization of the acrasin of the cellular slime mold Polysphondylium pallidum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73:795-799.
- Yamamoto K, Pardee JD, Reidler J, Stryer L und Spudich JA. 1982. Mechanism of interaction of Dictyostelium severin with actin filaments. *J Cell Biol.* 95:711-719.
- Yang TT, Kain SR, Kitts P, Kondepudi A, Yang MM und Youvan DC. 1996. Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red shifted variant. *Gene.* 173:19-23.
- Yumura S und Fukui Y. 1998. Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in Dictyostelium. *J Cell Sci.* 111:2097-2108.
- Yumura S, Matsuzaki R und Kitanishi-Yumura T. 1995. Introduction of macromolecules into living Dictyostelium cells by electroporation. *Cell Struct Funct.* 20:185-190.
- Zimmermann T und Siegert F. 1998a. 4D confocal microscopy of Dictyostelium discoideum morphogenesis and its presentation on the Internet. *Dev Genes Evol.* 208:411-420.
- Zimmermann T und Siegert F. 1998b. Simultaneous detection of two GFP spectral mutants during in vivo confocal microscopy of migrating Dictyostelium cells. *BioTechniques.* 24:458-461.

# Lebenslauf

Timo Job Kristian Zimmermann

## Persönliche Daten

Geburtsdatum : 12. 07. 1968

Geburtsort : München

Familienstand : ledig

## Schulbildung

09/78 - 07/87 Besuch des Albert Einstein Gymnasiums, München

07/87 Abitur

## Dienstpflicht

11/87 - 06/89 Zivildienst auf der Pflegestation eines Münchner Altenheims.

## Studium

11/89 - 09/96 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Hauptfach : Zoologie

Nebenfächer : Immunologie, Genetik, Neurobiologie

08/95 – 04/96 Diplomarbeit: „Elektronenmikroskopische Untersuchung des ersten optischen Neuropils von *Chaoborus crystallinus* (De Geer, 1776) (Diptera, Nematocera)“, betreut von Prof. Dr. U. Smola am Zoologischen Institut LMU

09/96 Studienabschluss

Seit 10/96 Doktorarbeit am Zoologischen Institut LMU in PD Dr. Florian Siegerts Arbeitsgruppe.

## Dank

Für die Betreuung meiner Arbeit, die angenehme Arbeitsumgebung in seiner Gruppe und die Fähigkeit, zur rechten Zeit den richtigen Ansatz zur Problemlösung (nicht nur beim Snowboarden) vorzuschlagen, möchte ich mich bei PD Dr. Florian Siegert bedanken. Auch Prof. Dr. Charles David, in dessen Abteilung die Arbeit erstellt wurde, danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Soo Sim Lee, Dr. Ludwig Eichinger und Prof. Dr. Michael Schleicher vom Institut für Zellbiologie der LMU danke ich für die Unterstützung, die ergiebige Zusammenarbeit und die intensiven Diskussionen meiner Ergebnisse. Ohne die von ihnen geschaffenen Severin-GFP-Konstrukte hätte ich im wahrsten Sinne des Wortes nur „in die Röhre“ geguckt.

Mein ganz besonderer Dank geht an die Crew: Kota Miura, dessen Fähigkeit, elegante Experimente zu entwerfen, ich nie erreichen werde, für seine Freundschaft und seine hilfreichen Vorschläge. (Das, die Sushi-Rollen und die Pasta-Kreationen...) Claudia Roeben für die Hilfe bei den Artenmischexperimenten, die Tips und die Hilfe im Labor, das Aufhängen des Labor-Schutzpatrons Sankt Kurt und ihren guten Musikgeschmack. Dr. Jens Rietdorf für die praktische Unterstützung in der Anfangszeit und den fruchtbaren Austausch über Mikroskope seither. Außerdem weiß er, was in den Kassettenrekorder eines Autos gehört. Ursula Hamker für den „Social Room“ in ihrem Labor und die guten Essensabende. Claudius Mott sei für das geteilte Computerleid und „Slugdompteur“ Wolfgang Widorfer für die gute Stimmung gedankt. Despina Erhard und Frau Reisinger für das Drumherum.

Dr. Roland Melzer möchte ich herzlich für das große Interesse an meiner Arbeit danken und für die Vorschläge und Diskussionen, die mir immer sehr viel gebracht haben. Außerdem ist er als einziger mit mir einer Meinung, daß Schimmel auf Kaffee der beste Nachweis für den hohen Nährwert und die Bekömmlichkeit von altem, kaltem Kaffee ist. Prof. Dr. Ulrich Smola möchte ich für die Gespräche danken, die wir über die Jahre geführt haben und für meinen Einstieg in die biologische Laborarbeit (lang, lang ist's her).

Martin Hess danke ich für die schöne Zeit unter Wasser, Peter Ludwig, Dani Nicastro, Hilde Wohlfrom, Frank Reckel und Christine Dunkel haben immer dafür gesorgt, daß die Arbeitspausen in meiner „Zweitwohnung“ angenehm waren.

Caro danke ich dafür, daß sie es hin und wieder schafft, mich vom Arbeiten abzuhalten.

Zuguterletzt für Alles danke ich meiner Mutter und meiner Schwester.