

Vom Einzeller zum Vielzeller – Experimente mit *Dictyostelium*

Dictyostelium discoideum ist ein einzelliger amöboider Bodenbewohner, der sich von Bakterien und anderen Mikroorganismen, z.B. Hefen, ernährt (vegetatives Stadium, Wachstumsstadium). Wenn die Nahrungsquelle erschöpft ist (Hungersignal), bilden die ursprünglich gleichartigen, individuellen Zellen ein multizelluläres Aggregat, in dem Zelldifferenzierung, biologische Musterbildung, differentielle Genexpression und etliche andere Charakteristika vielzelliger Organismen verwirklicht werden (Entwicklungsstadium).

Im Laufe von 24 Stunden differenziert das Aggregat über eine Reihe morphologisch gut definierter Zwischenstadien zu einem Fruchtkörper, der im Wesentlichen aus zwei Zelltypen besteht: den absterbenden, vakuolisierten Stielzellen und den Sporen, die Dauerformen (keine meiotischen Produkte!) darstellen. Bei günstigen Umweltbedingungen keimen die Sporen aus und entlassen vegetative Amöben.

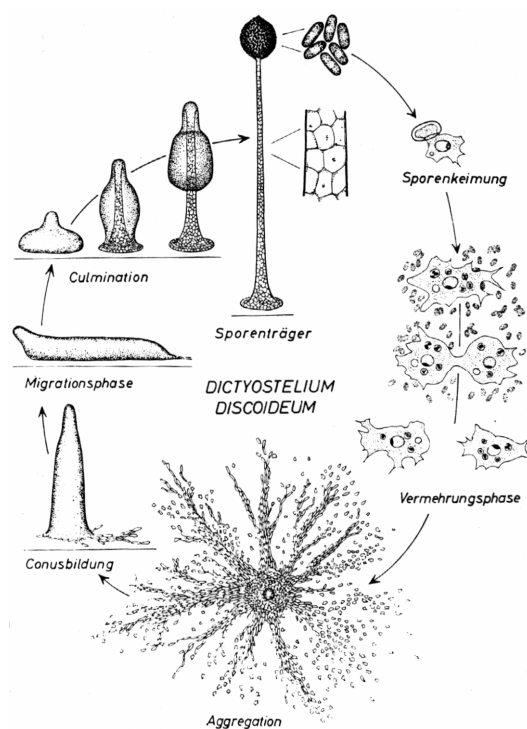


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.

(Abb. G. Gerisch, MPI Biochemie, Martinsried)

*Dictyostelium*kultur

*Dictyostelium*zellen werden im Labor auf Agarplatten (SM-Agar) mit einem Bakterienrasen (*Klebsiella aerogenes*) gehalten. Die Zellen fressen die Bakterien und vermehren sich mit einer Verdoppelungsrate von ca. 3 Stunden. Sie bilden dabei einen bakterienfreien Hof, in dem die Entwicklung beginnt. Am Rande der Kolonie steht aber noch Nahrung zur Verfügung. Die Kolonien zeigen demnach von außen nach innen fortschreitende Entwicklungsstadien.

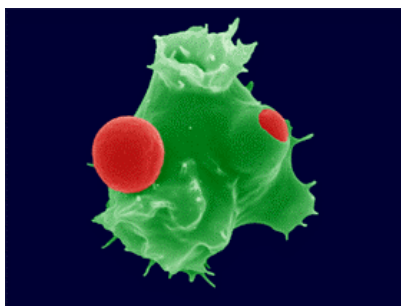


Abbildung 2:
Dictyosteliumzelle, die zwei rot gefärbte Hefezellen phagozytiert.

(Photo: Maniak, Abt. Zellbiologie, Univ. Kassel)

Die Laborstämme (Ax2 und Derivate davon) sind nicht mehr auf „feste“ Nahrung angewiesen, sondern können auch in einem „axenischen“ (bakterienfreien) Nährmedium (HL5-Medium) wachsen. Die Zellen werden entweder in einem Erlenmeyerkolben geschüttelt (220rpm) um sie mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, oder sie wachsen

angeheftet auf Petrischalen unter 3 bis 5mm Flüssigmedium. Die Oberfläche ist ausreichend groß um über Diffusion genügend Sauerstoff im Medium zu haben. Zellen nehmen die Flüssignahrung durch Pinozytose auf. In axenischem Medium haben die Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 8 Stunden. In einer Schüttelkultur wachsen die Zellen bis zu einer Dichte von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter. Danach sterben sie wegen zu hoher Dichte und zu hoher Konzentration an Abfallstoffen ab.

1. Synchrone Entwicklung auf Filtern

Der Entwicklungszyklus kann bei allen Zellen synchron initiiert werden, indem die Nahrungsquelle entzogen wird. Eine axenische Kultur wird bis zu einer Dichte von ca. 2×10^6 Zellen pro Milliliter angewachsen. Der Zelltiter wird mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dann werden 2×10^7 Zellen (oder ein Vielfaches davon) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und aus dem Medium abzentrifugiert (2.000 rpm, 5 Minuten). Das Zellpellet wird in $500\mu\text{l}/2 \times 10^7$ Zellen Phosphatpuffer (17mM Kaliumphosphat, pH 6,8) resuspendiert und mit einer Pipette gleichmäßig auf einen feuchten Papier- oder Nitrozellulosefilter (ca 18 cm^2) verteilt. Der Filter wird in einer feuchten Kammer inkubiert und die synchrone Entwicklung kann unter dem Binokular innerhalb von 24 Stunden beobachtet werden. Dabei sind in zeitlicher Folge die Entwicklungsstadien, die in Abb. 1 und 3 gezeigt sind zu finden. (Zur mikroskopischen Betrachtung der differenzierten Zellen s. Abschnitt 2 und 3.)

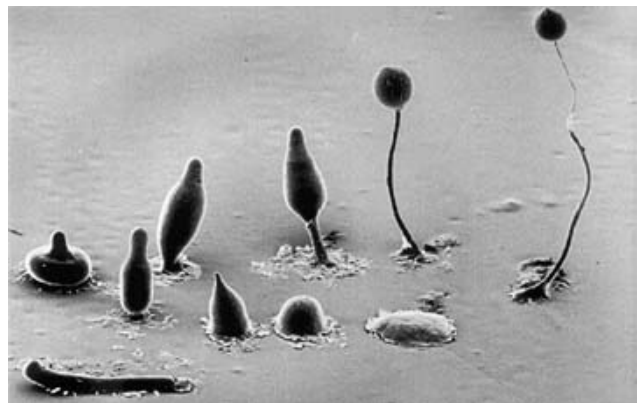


Abbildung 3: Aufnahme verschiedener Entwicklungsstadien im Raster-Elektronenmikroskop (von der Markierung im Uhrzeigersinn).

Foto: Grimson und Blanton, Texas Tech Univ.

Materialien:

Mikroskope
Objektträger, Deckgläser
Neubauer-Zählkammer
Binokulare
Rotationsschüttler
Zentrifuge (Fassungsvermögen: Röhrchen mit mind. 10ml Volumen)
Whatman-Papier oder ausgekochte Quadrate aus Kaffeefilterpapier
Sterile Pipetten (1ml) oder
blaue Spitzen für Eppendorfpipetten
Feuchte Kammer (z.B. Plastikdose für Kühlschrank)



Für ein Set mit einer Dictyostelium-Stammkultur, 200ml frisches HL5 Medium, sterile vorgeschchnittene Filter, Filterpapier f. feuchte Kammer, Neubauerkammer (leihweise) bis zu 5 Stück 1ml-Eppendorfpipetten (leihweise), 1 Box blaue Spitzenberechnen wir 15€ plus 50€ Pfand. Postversendung ist nicht möglich! Bestellung möglichst 5 Tage vor Beginn des Experiments.

Weil Zentrifugen und Schüttler nicht in allen Schulen zur Verfügung stehen, sind die unten aufgeführten Varianten eher zu empfehlen.

2. Wachstum und Entwicklung auf Bakterienrasen.

Mit einem sterilem Zahnstocher in das Röhrchen mit der gut geschüttelten Sporensuspension tauchen und mit dem Zahnstocher die Mitte des Bakterienrasens leicht berühren (man sollte den Berührungspunkt gerade sehen, kein tiefes Loch in den Agar bohren! Keine dicken Tropfen der Flüssigkeit auf den Agar bringen!).

Die Schüler beschriften ihre Platten mit Namen in kleiner Schrift auf dem Boden. Platten werden dann eingesammelt und umgedreht (Deckel nach unten) gestapelt und gelagert. 19° bis 22°C und Licht sind optimal. In sehr trockenen Räumen ist es empfehlenswert, die Platten in einer Plastikbox zu lagern oder einen Plattenstapel in Haushaltsfolie zu wickeln, um Austrocknung zu verhindern.

Nach ca. 2 Tagen sollte mit bloßem Auge ein kleines Loch im Bakterienrasen zu sehen sein. Die Zellen haben sich vermehrt und Bakterien gefressen. Ein kleiner Plaque ist entstanden. Der Plaque nimmt täglich an Größe zu und kann unter dem Binokular beobachtet werden. Nach etwa 3 Tagen sollten innerhalb des Plaques Fruchtkörper zu sehen sein.

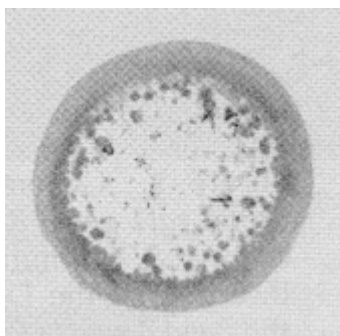


Abbildung 4: Dictyosteliumkolonie auf einem Bakterienrasen. Der dunkle Rand enthält wachsende Zellen im „aufgewühlten“ Bakterienrasen. Dunkle Flecken im helleren Zentrum des Plaques sind multizelluläre Entwicklungsstadien, die im Binokular besser zu erkennen sind als bei der hier verwendeten Technik.

Mit dem Binokular ist der etwas aufgewölbte Bakterienrasen am Rande des Plaques zu erkennen. Dort fressen sich die Dictyosteliumzellen in den Rasen hinein. Besonders interessant ist die Zone unmittelbar hinter dem Fressrand. Dort sieht man mit etwas Geduld und Glück kurze Ströme von Zellen, kugelige Aggregate, Slugs, Finger und andere Vorstadien des Fruchtkörpers. Die Zone zwischen Fressrand und abgeschlossener Entwicklung ist jedoch sehr schmal. Die Zellen liegen in so hoher Dichte vor, dass die Entwicklung sehr schnell abläuft und einzelne Stadien räumlich kaum getrennt sind. Sie sollten jedoch alle zu finden sein. Ein Vorteil des

Wachstums auf Bakterienrasen ist, dass die Platte auch nach etwa 2 Wochen noch beobachtet werden kann. Der Plaque ist dann zwar sehr groß, aber ein Fressrand mit den verschiedenen Entwicklungsstadien ist noch immer zu sehen.

Wenn alle Entwicklungsstadien ausgebildet sind (nach ca. 3 Tagen, aber auch später), können die Zellen mikroskopisch untersucht werden.

A) Mit einem Zahnstocher etwas Material vom Fressrand nehmen und in einem Tropfen Wasser auf einem Objektträger verstreichen, Deckglas drauf und ansehen. In einem Gewirr aus Bakterien sind größere amöboide Zellen zu sehen. Vorsicht, die Zellen runden sich schnell ab und sterben, wenn es ihnen durch die Mikroskoplampe zu warm wird! Bei Beleuchtung mit Spiegel oder schwachem Licht kann man mit Glück und Geduld die Bewegung der Zellen sehen – die ist aber sehr langsam und wird üblicherweise mit Zeitrafferaufnahmen dargestellt.

B) Mit einem Zahnstocher oder einer Präpariernadel einen oder mehrere Fruchtkörper in einen Wassertropfen auf dem Objektträger überführen. Das ist manchmal nicht ganz einfach, weil die Fruchtkörper eher am Zahnstocher als auf dem Objektträger kleben bleiben! Deckglas drauf und ansehen. Der Stiel besteht aus länglichen Zellen mit dicker Zellwand (Zellulose) und einer Vakuole. Die Stielzellen sind bei älteren Fruchtkörpern meist schon tot. Der Sporenkopf besteht aus gleichmäßig geformten ovalen, stark lichtbrechenden Sporen.

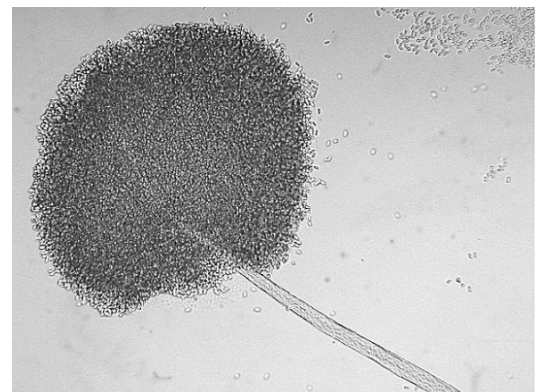


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Fruchtkörpers. Stiel und Sporenkopf sind zu erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung sind die Formen von Stiel- und Sporenzellen gut zu unterscheiden.

Die Schüler sollten die drei Zelltypen (Amöben, Stielzellen und Sporenzellen) leicht unterscheiden können. Sie sollen lernen, dass Zellen durch Differenzierung ihre Gestalt und ihre Funktion ändern.

Materialien

Platten mit SM Agar und Bakterienrasen (1 pro Schüler oder Schülergruppe)

von uns zu beziehen, Platten sind im Kühlschrank, verpackt in einen Plastikbeutel, ca. 4 Wochen haltbar

Stammplatte oder Sporensuspension

von uns zu beziehen, Sporensuspension ist im Kühlschrank, im verschlossenen Gefäß ca. 2 Monate haltbar, Stammplatte ca. 4 Wochen im Kühlschrank, mit Deckel nach unten lagern!

Sterile Zahnstocher

selbst im Dampfkochtopf sterilisieren oder über uns beziehen,

Binokulare (ca. 6 bis 40fache Vergrößerung)

Optional: Durchlichtmikroskope, 100fache Vergrößerung, Objektträger, Deckgläser

Für ein Set aus bis zu 20 Agarplatten mit Bakterienrasen, Sporensuspension und zwei Päckchen sterile Zahnstocher berechnen wir 15€ bei Abholung. Postversendung (nicht empfohlen!) 10€ extra. Bestellung möglichst 5 Tage vor Beginn des Experiments.

3. Zellströme

Auf eine kleine Petrischale (6 cm Durchmesser) werden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen mit Flüssigmedium aufgebracht, das Gesamtvolumen wird auf ca. 5ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Die Zellen werden durch leichtes Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Die Schüler können ihre Platten klein auf dem Rand des Deckels mit Namen beschriften. Danach bleibt die Platte für 10 bis 15 Minuten ruhig stehen, sie kann in dieser Zeit auch mit dem Binokular oder Inversmikroskop betrachtet werden, um die amöboiden Zellen zu beobachten. Bei guter Optik und 40 bis 100facher Vergrößerung sieht man, wie die runden Zellen sich auf den Boden der Schale absinken, dort anhaften und eine ungleichmäßige amöboide Form annehmen.

Nach der angegebenen Zeit haben sich die Zellen relativ fest auf dem Plastikboden verankert. Das Medium wird in ein Abfallgefäß abgegossen und die Platten werden mit 5ml Phosphatpuffer aufgefüllt. Den Puffer langsam am Rand in die Schale laufen lassen, sonst löst der Pufferstrom zu viele Zellen ab! Platte wieder 5 Minuten stehen lassen, den Puffer wieder abgießen und erneut mit 5ml auffüllen. Durch diesen Vorgang wird das Nährmedium vollständig abgewaschen, die Zellen befinden sich in Hungermedium und beginnen mit dem Entwicklungszyklus.

Mit bloßem Auge sieht man, dass der Boden der Platte einen trüben Film von Zellen enthält. Mit einem Binokular oder Inversmikroskop prüfen, ob die Platten einen gleichmäßigen dichten Rasen an Zellen enthalten. Platten auf einen Tisch oder in ein Regal stellen. Sie



sollten möglichst erschütterungsfrei im Licht stehen aber nicht der direkten Sonne ausgesetzt sein.

Variationen

Das Experiment kann variiert werden, indem verschiedene Gruppen unterschiedliche Zellzahlen auf ihre Platten geben: 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 Zellen. Bei den sehr hohen und sehr niedrigen Zelldichten wird die Entwicklung vermutlich nicht funktionieren. Bei einer Kontrollplatte kann Medium statt Phosphatpuffer aufgetragen werden, diese Zellen sollten nicht in die Entwicklung gehen sondern weiter wachsen. Ein oder zwei Platten können auch in den Kühlschrank gestellt werden um zu sehen, ob die Entwicklung abhängig von der Temperatur ist. Ebenso können Platten in der Dunkelheit aufgestellt werden, um den Einfluss von Licht zu untersuchen.

Nach etwa 5 Stunden haben sich (unter Normalbedingungen) Areale gebildet. Der gleichmäßige Zellrasen hat Strukturen angenommen, die man mit bloßem Auge erkennen kann: zwischen trüben Flecken von Zellen sind hellere Streifen zu sehen, in denen keine oder nur wenige Zellen zu finden sind. Beachte, dass die Areale alle eine ähnliche Größe haben! Die Zellen können „zählen“ und beginnen Gruppen mit etwa gleicher Zellzahl zu bilden. Im Mikroskop ist zu sehen, dass die Zellen ihre Form verändert haben: viele von ihnen sind jetzt lang gestreckt und meist in eine Richtung ausgerichtet.

Nach 6 bis 8 Stunden sind weitere Bereiche der Platte klar geworden. Mit bloßem Auge sieht man sternförmige Gebilde, Ströme von Zellen, die auf ein Zentrum zulaufen (s. auch Abb. 1). Das Strömen kann über etwa 3 bis 4 Stunden beobachtet werden. Danach haben sich die meisten Zellen in Aggregaten angesammelt.

Unter Flüssigkeit entwickeln sich die Zellen nicht weiter als bis zum Stadium der Aggregate. Die weitere Entwicklung wird erlaubt, wenn man den Puffer abgießt, aber einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf der Platte lässt. Platten wieder verschließen (mit Parafilm abdichten oder in einer feuchten Kammer lagern). Zumindest einige der Aggregate werden sich weiter entwickeln und im Laufe der nächsten 8 bis 16 Stunden Fruchtkörper bilden. Wenn Zeit ist, können die Platten zwischendurch unter dem Binokular beobachtet werden und man findet die Stadien, die in Abb.3 gezeigt sind. Weil trotz aller Vorsichtsmaßnahmen die Platten doch immer etwas austrocknen, werden einige Aggregate nie das Endstadium der Entwicklung erreichen. Durch die Ungenauigkeit des Experiments hat man den Vorteil, dass man zum Schluss meist verschiedene Zwischenstadien sieht, die zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung gestoppt wurden. Spätestens am nächsten Tag sollten fertige Fruchtkörper auf der Platte zu finden sein. Diese können wie unter 1. angegeben mikroskopiert werden um Sporen und Stielzellen zu sehen. Im Kühlschrank sind die Platten auch mehrere Tage haltbar.



„Sicherheitsplatten“

Das Experiment ist durch die langen Wartezeiten nicht sehr schulfreundlich. Auch können die angegebenen Entwicklungszeiten durch unbewusste Änderungen im Vorgehen stark variieren. Es ist zu empfehlen, dass Lehrer „Sicherheitsplatten“ anlegen: a) zwei Platten am Abend oder Nachmittag vor dem Kurs, diese Platten sollten am nächsten Morgen bereits Aggregate enthalten. Eine Platte kann den Schülern im Laufe des Kurses gezeigt werden, die andere wird morgens sofort abgegossen, sodass die Aggregate sich weiter entwickeln können. Mittags sind dann voraussichtlich bereits spätere Entwicklungsstadien zu sehen und können den Schülern gezeigt werden.

b) zwei Platten am frühen Nachmittag vor dem Kurs. Diese Platten werden für einige Stunden (Zeit notieren!) bei Raumtemperatur inkubiert und dann in den Kühlschrank gestellt, um die Entwicklung zu verzögern. Diese vorentwickelten Platten werden morgens als erstes auf Raumtemperatur gestellt und geben eine zusätzliche Chance, während des Kurses Strömen zu sehen.

Materialien

Kleine Petrischalen mit *Dictyostelium*flüssigkultur (1 pro Schüler oder Schülergruppe)

von uns zu beziehen, die Platten sind im Kühlschrank oder bei Zimmertemperatur max. 4 bis 5 Tage haltbar (unbedingt angeben, wie lange Sie die Platten vor dem Experiment lagern wollen!)

***Oder:** frische Petrischalen und ein Kolben mit *Dictyostelium*flüssigkultur. Diese Kultur kann zur Not über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden, muss vor Gebrauch aber gut geschüttelt werden, weil sich die Zellen absetzen. Wenn ein Schüttler vorhanden ist, Kultur bei Raumtemperatur auf den Schüttler stellen.*

Es ist dann günstig, den Zelltiter in einer Neubauer- oder Thomakammer mikroskopisch zu bestimmen – wir können den zu erwartenden Titer aber auch grob für Sie abschätzen.

Geben Sie uns an, wann sie das Experiment machen wollen, wir bereiten die Platten oder Flüssigkulturen termingerech vor. Platten und Schüttelkolben müssen vorsichtig transportiert werden, damit das Medium nicht ausläuft!

Phosphatpuffer (17mM, pH 6,8),

von uns zu beziehen

Binokulare (ca. 6 bis 40fache Vergrößerung)

Optional: Durchlichtmikroskope, 100fache Vergrößerung, besser: Inversmikroskop, mit dem die Platten von unten betrachtet werden können.

Objektträger, Deckgläser



Für ein Set mit bis zu 20 Kulturschalen oder Erlenmeyerkolben mit Flüssigkultur und bis zu 10 Röhrchen Phosphatpuffer berechnen wir 15€ bei Abholung. Eine Versendung per Post ist nicht möglich. Bestellung möglichst 5 Tage vor Beginn des Experiments.

Webseiten

http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d27_10/27_10.htm

<http://de.wikipedia.org/wiki/Dictyostelium>

<http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>

<http://www.biologie.uni-kassel.de/genetics>

<http://dictybase.org/>

