

**Biologische Variabilität bei der Musterbildung
von *Dictyostelium discoideum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Christiane Hilgardt
geb. am 17. April 1972 in Jugenheim

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Marwan
Prof. Dr. Markus Bär

eingereicht am: 31. Juli 2009
verteidigt am: 2. Juni 2010

Erklärung der Selbständigkeit

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Magdeburg, den 31. Juli 2009

Christiane Hilgardt

Für Lissi

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
2 Thematischer Hintergrund	7
2.1 Grundlagen der Erregungswellen	7
2.1.1 Formale Bedingungen zur Entstehung von Erregungswellen	7
2.1.2 Eigenschaften der Erregungswellen	10
2.1.3 Mechanismus der Entstehung von Spiralwellen	12
2.1.4 Formale Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Systemen	13
2.2 <i>Dictyostelium</i> als Modellorganismus für biologische Musterbildung	15
2.2.1 Entwicklungszyklus	16
2.2.2 Raumzeitliche Muster während der Aggregation	20
2.2.3 Signaltransduktion	22
2.2.4 Martiel-Goldbeter-Modell	25
2.3 Neuere Forschungsfragen zur Musterbildung bei <i>Dictyostelium</i>	28
2.3.1 Musterbildung bei <i>Dictyostelium</i> zwischen Biophysik und Systembiologie	28
2.3.2 Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungspfades	31
2.4 Zielsetzung und Ergebnisse dieser Arbeit	34
3 Methoden	39
3.1 Medien und Puffer	39
3.2 Kulturbedingungen	39
3.2.1 Produktion von Sporenmaterial	40
3.2.2 Kryokonservierung von Zellen	40
3.2.3 Axenische Kultivierung und Initiation der Musterbildung	41
3.3 Manipulation der Zellen durch chemische Effektoren	42
3.3.1 Veränderung der globalen Erregbarkeit durch Koffein	42
3.3.2 Verwendung eines Adenosinderivates mit unbekannter Wirkung auf die Musterbildung	42
3.4 Veränderung der zellulären Heterogenität	44
3.4.1 Synchronisierung des Zellzyklus – Erniedrigung zellulärer Heterogenität	45

3.4.2	Mischen von Zellpopulationen mit unterschiedlichem Entwicklungs- alter – Erhöhung der zellulären Heterogenität	46
3.5	Optischer Aufbau	47
3.5.1	Dunkelfeldmikroskopie	47
3.5.2	Phasenkontrastmikroskopie	48
3.6	Aufbereitung der Rohdaten	49
3.7	Konstruktion von Raum-Zeit-Plots zur quantitativen Analyse der Erre- gungswellen	50
3.8	Raumzeitliche Datenanalyse zur Extraktion von Zelleigenschaften	51
3.8.1	Transinformation I	51
3.8.2	Fluktuationszahl Ω	53
3.9	Extraktion globaler Mustereigenschaften	55
3.9.1	Detektion der räumlichen Verteilung von Phasensingularitäten	55
3.9.2	Detektion der räumlichen Verteilung von Targetwellen	58
3.10	Einfaches mathematisches Modell eines erregbaren Mediums	59
4	Resultate	63
4.1	Rekonstruktion von Zelleigenschaften aus raumzeitlichen Datensätzen – Variabilität im Automatenmodell	63
4.1.1	Qualitative Mustereigenschaften in Abhängigkeit von Variabilität	63
4.1.2	Rekonstruktion interner Zelleigenschaften aus den Mustern mit raum- zeitlichen Analysewerkzeugen	65
4.1.3	Rolle der Variabilität auf konkrete räumliche Aspekte der Muster- bildung	71
4.1.4	Rolle der Mustereigenschaften auf die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij}	75
4.2	Untersuchung von Zellschichten mit unterschiedlichen Eigenschaften der Signaltransduktion	81
4.2.1	Synchrone Zellen	82
4.2.2	Erhöhung des Grades der Desynchronisation einer Kultur durch Mi- schen von Zellgruppen unterschiedlichen Alters	90
4.2.3	Globale Änderung der Erregbarkeit durch chemische Effektoren	100
5	Diskussion und Ausblick	117
5.1	Variabilität in simulierten Mustern des Automatenmodells	118
5.2	Variabilität bei <i>Dictyostelium</i>	122
5.3	Wirkung chemischer Effektoren auf die Musterbildung	125
5.4	Abschließende Bemerkungen	130
5.4.1	Rolle biologischer Variabilität bei <i>Dictyostelium</i>	130
5.4.2	Untersuchung der Wirkung chemischer Effektoren bei <i>Dictyostelium</i>	131
	Literaturverzeichnis	133
	Anhang	163

Danksagung

165

Lebenslauf

167

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle biologischer Variabilität auf die Musterbildung des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* untersucht. Dahinter verbirgt sich die Vorstellung, dass durch individuelle, zeitlich konstante Zelleigenschaften die Erregungsmuster von *Dictyostelium* maßgeblich geprägt werden. Die Hypothese ist, dass Variabilität eine entscheidende regulatorische Funktion in komplexen biologischen Kommunikationsprozessen trägt.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden mit Hilfe raumzeitlicher Filter die räumlichen Verteilungen von Zelleigenschaften aus den Erregungsmustern von *Dictyostelium* extrahiert. Während des Entwicklungszyklus aggregieren autonome Zellen durch cAMP-Gradienten chemotaktisch geleitet. Das cAMP breitet sich dabei in Form raumzeitlicher Konzentrationswellen über eine Zellschicht aus und kann als propagierende Spiral- und Targetwellen beobachtet werden. Da die Eigenschaften der Erregungswellen den aus der Zellaggregation hervorgehenden multizellulären Organismus maßgeblich prägen, müssen Kenngrößen der Muster für den Organismus unterschiedlich vorteilhaft sein, d.h. mit den Eigenschaften der Muster ist ein Selektionsvorteil verbunden. Daher ist anzunehmen, dass das biologische System evolutiv verankerte regulatorische Mechanismen besitzt, um auf die Mustereigenschaften Einfluss nehmen zu können. Der besondere konzeptionelle Ansatz in dieser Arbeit liegt in der Erforschung der Verbindung zwischen regulatorischen Prinzipien auf zellulärer Ebene und den statistischen Eigenschaften makroskopischer Aggregationsmuster.

In numerischen Simulationen wurden die Regeln von Variabilität in den Musterbildungsprozessen eines Automatenmodells studiert und Methoden zur Untersuchung raumzeitlicher Datensätze auf die simulierten Muster angewendet. Variabilität wurde im Modell durch die Implementierung ortsabhängiger Systemparameter realisiert. Es wurde ein starker Einfluss von Variabilität auf die Mustereigenschaften festgestellt. Aus den generierten Mustern wurde dann mit Hilfe der Transinformation und der Fluktuationszahl (die auf der Abschätzung gerichteter und ungerichteter Zustandsänderungen in Raum und Zeit beruht) die räumliche Verteilung der implementierten Variabilität erfolgreich extrahiert. Zur Quantifizierung der Mustereigenschaften wurden Analysewerkzeuge zur Bestimmung der Phasensingularitäten und Targetzentren verwendet, die auf den Phasenvariablen der einzelnen Bildelemente beruhen. Damit konnten die Wahrscheinlichkeiten für die Entstehung von Spiralen in Abhängigkeit der vorhandenen Verteilung an Pacemaker-elementen bestimmt werden.

Die numerisch etablierten Methoden wurden im nächsten Schritt auf die Analyse der Muster von *Dictyostelium* übertragen, um die räumlichen Verteilungen von Zelleigenschaften sichtbar zu machen. Zum einen wurden in ihrem Zellzyklus synchrone Zellen verwendet, zum anderen Populationen unterschiedlichen Entwicklungsalters miteinander gemischt. Dies geschah in Anlehnung an einen Entwicklungspfad als Modellvorstellung zur Entstehung räumlicher Heterogenität, auf dem sich die Zellen desynchron entwickeln. Die Musterquantifizierung erfolgte durch die Extraktion der Phasensingularitäten. Durch die Abschätzung gerichteter räumlicher und zeitlicher Zustandsänderungen durch die Fluktuationenzahl konnten einerseits synchrone Zellen von nicht synchronen Zellen unterschieden, andererseits sogar der Synchronisationsgrad der Zellen aus den Mustern berechnet werden. Weiterhin ergaben sich systematische Zusammenhänge zwischen den Parametern des Mischens und den Häufigkeitsverteilungen der Fluktuationenzahl.

Komplementär zu diesen Experimenten, in denen die relativen Zelleigenschaften verändert wurden, wurden Experimente durchgeführt, in denen die globalen Eigenschaften der Zellen chemisch verändert wurden. Hier konnte keine Unterscheidung verschiedener Zellgruppen mit Hilfe der Observablen gefunden werden. Bemerkenswert ist, dass sich die Muster der synchronen und gemischten Zellen weder in der Phasensingularitätsdichte, noch in ihren qualitativen Eigenschaften unterscheiden, während bei chemisch modifizierten Zellen drastische Auswirkungen auf die Muster beobachtet werden.

Die Korrelation zwischen der räumlichen Verteilung der Fluktuationenzahl und Mustereigenschaften, insbesondere der Verteilung der Phasensingularitäten zeigten in vielen Fällen positive Korrelationen vor der Musterentstehung. Derartige Korrelationen ergaben sich aber nicht aus den reinen Grauwerten der Muster oder zufällig verteilter Phasensingularitäten. Daraus leitet sich ab, dass sich eine Symmetriebrechung innerhalb der Zellschicht schon vor dem Sichtbarwerden kohärenter Wellenstrukturen ergeben haben muss und dass diese mit geeigneten mathematischen Methoden extrahiert werden kann.

Abstract

Topic of this thesis is the investigation of the functional role of biological variability in pattern formation of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. It is assumed that individual cell properties, which are constant in time, determine certain properties of excitation patterns during the developmental cycle of *Dictyostelium*. It is postulated that variability has regulatory functions in complex biological communication processes.

To investigate this question spatial distributions of cell properties were extracted from excitation patterns of *Dictyostelium* with the help of spatiotemporal filters. During developmental cycle *Dictyostelium* undergoes a transition from the uni- to the multicellular state, mediated by chemotactic cell movement and spatiotemporal excitation waves of cAMP. These waves can be observed as propagating spirals and target waves. Since the properties of the excitation waves determine features of the developing multicellular organism, certain parameters of these patterns are more advantageous than others, in other words: wave properties are linked to selective advantages. Therefore, it can be assumed that the biological system has evolved regulatory mechanisms to influence the features of these patterns. The novel conceptual approach of the present thesis consists in studying the correlations between the regulatory principles occurring on the cellular level and the statistical properties of macroscopic aggregation patterns.

Rules of variability involved in pattern formation processes have been analysed numerically by a cellular automaton model and methods to analyse spatiotemporal data sets were applied to simulated patterns. Variability has been implemented as certain system parameters, which were fixed in space. Thus it was shown, that variability has a strong impact on the qualitative features of the simulated patterns. With the help of the mutual information and the fluctuation number, the latter of which estimates directed and undirected changes in state of an element in time and space, the spatial distribution of the underlying variability has been successfully extracted. To quantify the properties of the patterns, analytical tools to determine the positions of phase singularities and target centres were used, which are based on the phase variables of the single elements. Correlation analyses have revealed statistical probabilities for the development of phase singularities, i.e. spiral tips, in dependence of the underlying distribution of pacemaker elements.

Next, the numerically established methods were applied to experimental data sets of *Dictyostelium* to visualize spatial distributions of cellular properties. At first, synchronous cells were taken and populations of cells of different ages were mixed. This was done following the concept of a developmental path where the cells develop in desynchronized manner. This approach provides for a model where cellular heterogeneity is ensured. Pat-

tern quantification was obtained by detection of phase singularities.

The estimation of directed and non-directed changes in spatial and temporal states by the fluctuation number showed that synchronous and non-synchronous cells can be distinguished, and that even the order of synchronisation can be calculated.

Complementary to this experiments where relative cell properties were changed, global properties of the cells were modified chemically. Applications of the observables on corresponding patterns showed no differences between different cell groups. It is noteworthy that patterns of synchronous cells and mixed cells neither differ in their qualitative features, nor show differing spatial densities in phase singularities. By contrast chemical modification of the cells induces dramatic effects on their patterns.

Correlation analysis between the spatial distribution of the fluctuation number and phase singularities showed positive correlations in many cases before patterns were developed, whereas such correlations could not be found from pure grey values of the patterns or randomly distributed phase singularities. In conclusion, it can be deduced that the symmetry breaking within a cell population happens before coherent wave structures appear and that appropriate mathematical methods can be used to extract such relations.

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACA, ACB, ACG	AC der Aggregation, AC vom Typ B, AC der Sporenkeimung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifach entionisiert
cAR	cAMP-bindender Rezeptor
cAR1, cAR2, cAR3, cAR4	cAR vom Typ 1, 2, 3, 4
CRAC	Cytosolic Regulator of Adenylyl Cyclase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Erk2	Extracellular Signal-Regulated Kinase-2
GDP	Guanosindiphosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IC ₅₀	effektive Konzentration, die halbe maximale Inhibition der Enzymaktivität hervorruft
Int.	Intervall
IPA	2',3'-O-Isopropylidenadenosin
Korr	Korrelationskoeffizient
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein-Kinase
NAD ⁺ /NADH + H ⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (oxidiert/reduziert)
P ₁ , P ₂	Population 1, 2
PDE	Phosphodiesterase
ePDE, mPDE	extrazelluläre, membrangebundene PDE
PDI	Phosphodiesterase-Inhibitor
PKA	Proteinkinase A
PK-C, PK-R	katalytische, regulatorische Untereinheit der PKA
PS	Phasensingularität
PS-Punkt	Putative Shift-point
RegA	Typ IV Phosphodiesterase
TW	Targetwellen
upm	Umdrehungen pro Minute (1/60 Hz)
w/v, v/v	Gewicht pro Volumen, Volumen pro Volumen

1 Einleitung

Die Fähigkeit biologischer Systeme, sich zu Mustern zu organisieren, fasziniert die Wissenschaft und die an Wissenschaft interessierte Öffentlichkeit seit langem und ist innerhalb der Forschung seit vielen Jahrzehnten aus vielfältigen Perspektiven beschrieben worden [Gie72, Win80, Mei84, Win87, Mur89, Gol96, Mik06].

Raumzeitliche Musterbildung, insbesondere dynamische Wellenphänomene, finden sich auf vielen Größenskalen in den verschiedensten Systemen. Dabei lassen sich die zugrundeliegenden Ordnungsprinzipien nicht unmittelbar aus den mikroskopischen Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile erschließen. Dies ist das Grundprinzip biologischer Selbstorganisation. Selbstorganisation bezeichnet die spontane Entstehung von Strukturen oder Mustern durch die Wechselwirkungen der Systemkonstituenten. Mit „spontan“ ist hier die durch das System bedingte Musterentstehung unter Variation eines Parameters der Konstituenten oder der Wechselwirkungen (Kontrollparameter) gemeint. Übersetzt man Eigenschaften der Muster in eine Kenngröße, den Ordnungsparameter, so ändert sich diese also sprunghaft, im Sinne eines Phasenübergangs mit dem Kontrollparameter (siehe z.B. [Hak77, Hüt06a]).

In der Biologie treten propagierende Wellen sowohl intra- als auch interzellulär bei sehr unterschiedlichen Zelltypen auf. In allen Fällen besteht ein Zusammenhang des Auftretens solcher raumzeitlichen Muster zu Signaltransduktionsketten oder metabolischen Pfaden, die irreversible nichtlineare Reaktionskinetiken beinhalten.

Ein unter medizinischen Gesichtspunkten besonders relevantes Phänomen von – in diesem Fall dreidimensionaler – biologischer Musterbildung, lässt sich bei der Steuerung der rhythmischen Kontraktion des Herzens beobachten. Die Regulation der Muskelaktivität ist durch propagierende Potentialänderungen charakterisiert, die zunächst vom Sinusknoten als autonomer Taktgeber ausgehen und sich über das gesamte Herz ausbreiten, was zur koordinierten Kontraktion des Muskels führt. Veränderungen einzelner Muskelfasern können dabei zu lokalen Störungen in der Erregungsweiterleitung führen. Tatsächlich sind bestimmte arrhythmische Störungen (insbesondere Hauptkammerflimmern) von rotierenden Spiralwellen elektrophysiologischer Aktivität begleitet [Win80, Dav92], was zu erheblichen Beeinträchtigungen der Pumpleistung des Herzens führt.

Eine andere pathologisch interessante Erscheinung ist die Ausbreitung sogenannter *Spreading Depression Waves* (SD) in neuronalem Gewebe [Shi74, Gor83, Bas98], die in Zusammenhang mit Migräne steht. Dabei wird eine plötzliche kurzzeitige Erhöhung neuronaler Aktivität von ihrem Zusammenbruch gefolgt [Lea44]. Die Zerstörung bestehender Ionengradienten und damit der Membranpotentiale einzelner Neuronen breitet sich in Form raumzeitlicher Wellen über das betroffene Gewebe aus [dC84, Dah97, Bra97]. Die neuronale Aktivität kommt dabei solange zum Erliegen, bis die ursprünglichen Membranpo-

tentiale aktiv wiederhergestellt sind.

Ein intensiv untersuchter Mechanismus der zellulären Informationsverarbeitung ist die Kalziumdynamik als Element biologischer Signalkaskaden. Die Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wird bei ganz verschiedenen Zelltypen [Wie87, Lip93, Lin94] beobachtet. Regulation und Dynamik der intrazellulären Kalziumkonzentration sind durch experimentelle Analysen und mathematische Modellierung zu einem Modellsystem zellulärer Signaltransduktion geworden. Auch dieses System hat eine räumliche Dimension: Eines der eindrucksvollsten Beispiele ist die räumliche Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen während der Fertilisation bei Wirbeltiere, die eine bedeutende Rolle bei der Auslösung der Cortikalreaktion und der Stoffwechselaktivierung der Oocyten spielen [Lec91]. Im Fall von Kalzium kann die Propagation der Wellen mikroskopisch direkt sichtbar gemacht werden, im Gegensatz zu anderen Systemen, bei denen Wellen oft nur indirekt als morphologische oder funktionale Folgen der Dynamik beobachtet werden können.

Ein weiteres Beispiel für biologische Musterbildung ist die Entstehung von NADH-Wellen in räumlich aufgetragenem Hefeextrakt [Gho64, Gol73, Jac80, Jac82, Mül98]. Hier spiegelt sich in direkter Weise ein durch die Evolution ausgeübter Selektionsdruck auf die Ökonomie metabolischer Pfade wider. Die nichtlinearen, praktisch irreversiblen Reaktionen zweier allosterischer Enzyme zu Beginn und am Ende des Energiestoffwechsels der Glykolyse (Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase) führen zu einer physiologischen Selbstregulation des Systems und kontrollieren die Produktion von ATP aus mobilisierten energiereichen Reserven. Wichtige Effektoren sind dabei die Produkte beider Reaktionen selbst. Trägt man ein organellfreies Extrakt der Zellen räumlich auf, so führen diese Rückkopplungen zu propagierenden NADH-Wellen. NADH- und Protonenwellen spielen im Fall polarisierter Neutrophile eine große Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation innerhalb der Immunabwehr [Pet00].

Als letztes Beispiel soll hier die Musterbildung des zellulären Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* [Rap35] eingeführt werden, deren Untersuchung die vorliegende Arbeit gilt. Nahrungsmangel induziert bei *Dictyostelium* ein Entwicklungsprogramm, das die chemotaktisch geleitete Aggregation von bis zu 10^5 autonomer Amöben gewährleistet und eine Strategie zum Überleben darstellt. Dieser Entwicklungszyklus beinhaltet den morphogenetischen Übergang von der einzelligen zur mehrzelligen Organisationsform, Zelldifferenzierung und letztlich die Bildung eines Fruchtkörpers (siehe z.B. [Kes01, Wei04]; vgl. Kap. 2.2).

Zu Beginn der Entwicklung geben einzelne Zellen das chemotaktische Signal cAMP (zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat) an die Umgebung ab. Die Moleküle werden von Nachbarzellen über spezifische Membranrezeptoren (cARs) detektiert, die nun ihrerseits cAMP synthetisieren und ausscheiden. Es schließt sich eine Refraktärphase an, innerhalb der die Zellen für cAMP insensitiv sind. Diese autokatalytische Produktion von cAMP führt zur Propagation raumzeitlicher cAMP-Wellen, die indirekt in einer räumlich ausbreiteten Zellschicht beobachtet werden können (Abb. 1.1(b); [Ger71, Tom81]). Als Reaktion auf das chemotaktische Signal wandern die Zellen in Richtung des ansteigenden cAMP-Gradienten, also entgegen der Propagationsrichtung der Wellen zum Ursprung des

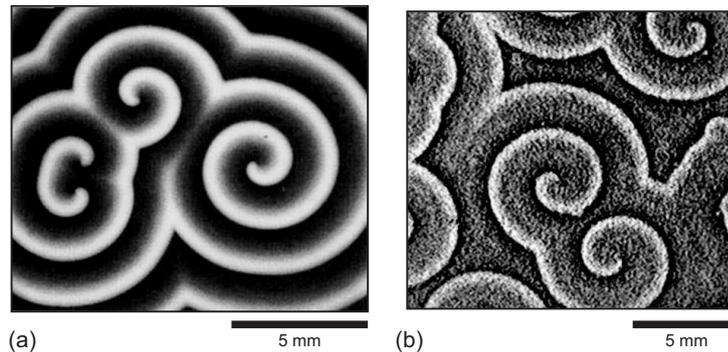


Abbildung 1.1: Erregungswellen der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion ((a), aus Sanger (1996); [San96]) und während der Aggregationsphase bei *Dictyostelium* (b). Beiden Systemen liegen trotz unterschiedlicher Reaktionsmechanismen gleiche Bildungsprinzipien zugrunde.

Signals hin, wo sie ein Zellaggregat bilden. Über eine Reihe mehrzelliger Zwischenstadien entsteht am Ende des Entwicklungsprogramms der Fruchtkörper mit keimungsfähigen Sporen.

Diese sehr unterschiedlichen Systeme zeigen neben ihren strukturellen Wellenanalogien grundlegende Gemeinsamkeiten in ihren elementaren Bildungsmechanismen, die für die Wellenentstehung verantwortlich sind. Allen Systemen gemein ist die Kopplung einer nichtlinearen (z.B. autokatalytischen) Reaktion mit Transport, insbesondere Diffusion [Kee86b], und der Austausch von Materie und Energie mit der Umgebung, der das System fern dem thermodynamischen Gleichgewicht hält [Pri69, Nic77].

Es sind nun genau diese Beobachtungen, die analog in chemischen und physikalischen Systemen zu finden, und dort als Grundvoraussetzungen für eine bestimmte Klasse raumzeitlicher Musterbildung bekannt sind. Das sicherlich prominenteste Beispiel eines solchen Systems ist die Belousov-Zhabotinsky-Reaktion [Bel58, Zha64, Zai70, Bel85], in der ein organisches Substrat (insbesondere Malonsäure) in Gegenwart eines Redoxkatalysators (meist Ferroin) mit Bromat in schwefelsaurer Lösung umgesetzt wird [Ros88]. In ihrer räumlichen Variante bilden sich blaue oxidierte Erregungsfronten in Form konzentrischer Wellen und archimedischer Spiralen innerhalb einer roten reduzierten Umgebung (Abb. 1.1(a); [Win72, Mül85]).

Ein anderes Beispiel eines durch raumzeitliche Erregungswellen gekennzeichneten Systems ist die katalytische Bildung von Kohlendioxid aus Sauerstoff und Kohlenmonoxid auf Platinoberflächen [Jak90].

Aus der Perspektive der mathematischen Modellierung gehören die bisher erwähnten musterbildenden Systeme zur Klasse der Reaktions-Diffusions-Systeme, welche als universelles Grundmodell biologischer Musterbildung, vor allem für Streifen-, Flecken- und Wellen-

muster erkannt wurden. Ihre Entdeckung und Erforschung geht auf die Pionierarbeit des britischen Mathematikers Turing zurück, der Wegbereiter einer Forschungsrichtung wurde, die sich bis heute zu einer Vielzahl verschiedenster Anwendungsfelder verzweigt.

Turing war einer der ersten, der ein formales, auf Differentialgleichungen basierendes Modell entwickelt hat, das Selbstorganisation aus dem Zusammenwirken von nichtlinearen Reaktionen und Diffusion erklärt. In seinem zentralen Papier von 1952 diskutierte er insbesondere die Bedeutung dieses Mechanismus für biologische Strukturbildung [Tur52]. Heute sind Turing-Muster ein feststehender Begriff für stationäre räumliche Oszillationen¹ (vgl. auch die experimentellen Nachweise: [Cas90, Quy91, Len93]). Als weitere wichtige wegbeitragende Beiträge sind an dieser Stelle auch die Arbeiten von Prigogine [Pri69, Nic77] zur Entwicklung der Nichtgleichgewichtsthermodynamik und Hakens Konzept der Synergetik [Hak77] zu nennen, welche den Begriff der Selbstorganisation, so wie er oben diskutiert wurde, entscheidend prägten. Wichtige Folgearbeiten auf dem Gebiet der mathematischen Biologie, in denen die allgemeinen Konzepte auf Selbstorganisation basierender Musterbildung mit konkreten biologischen Fallstudien verbunden wurden, stammen beispielsweise von Winfree (1980, 1987) und Murray (1989) [Win80, Win87, Mur89]. Eine direkte Anwendung des Turing-Konzepts auf biologische Situationen der Musterbildung (beispielsweise Fellzeichnungen bei Tieren und Muster auf Schalen der Mollusken durch räumliche Verteilung sogenannter Morphogene) sind die Arbeiten von Gierer & Meinhardt [Gie72, Mei84]. Dasselbe mathematische Prinzip stellt auch eines der Erklärungsmodelle für die Streifen der Genexpression in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* dar, eine Vorbedingung der Segmentierung [NV04].

Heute existiert zudem eine Vielzahl fachübergreifender Anwendungsfelder durch die perspektivische Erweiterung und Übertragung der Grundprinzipien von Reaktions-Diffusions-Systemen auf andere Bereiche, zum Beispiel Agentenmodelle in sozialwissenschaftlichen Arbeiten (siehe z.B. [Ebe98]), die eine direkte Folgeentwicklung und Anwendung von Reaktions-Diffusions-Prinzipien sind.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Strukturbildung des Schleimpilzes *Dictyostelium* während seines Entwicklungszyklus, der durch Nahrungsmangel induziert wird. Das Bildungsprinzip der Muster entspricht dabei dem Reaktions-Diffusions-Mechanismus, das von den Zellen aktiv zum Informationstransport genutzt wird, um eine koordinierte Bewegung Hunderttausender individueller Amöben zu vollziehen und so die kollektive Überlebenschance deutlich zu erhöhen. Auch hier entstehen konzentrische Ringwellen, insbesondere aber rotierende Spiralwellen, wie sie bereits in Abbildung 1.1 den Mustern der chemischen Belousov-Zhabotinsky-Reaktion gegenübergestellt wurden.

1 Besonders bei einem Spezialfall von Reaktions-Diffusions-Systemen, bei dem ein kurzreichweitiger Aktivator (mit niedriger Diffusionskonstante) und ein längerreichweitiger Inhibitor (mit höherer Diffusionskonstante) miteinander verknüpft sind. Hieraus ergeben sich eine Vielzahl räumlich stationärer Strukturen, beispielsweise hexagonale oder rhombische Punktmuster, Zickzack-Muster und Streifen, aber auch Situationen raumzeitlicher Turbulenzen. Die Wellenlänge der Strukturen spiegelt dabei die Diffusionsraten von Aktivator und Inhibitor wider.

In Kapitel 2.1 wird in die Grundlagen der Entstehung raumzeitlicher Erregungswellen in Reaktions-Diffusions-Systemen eingeführt. Aus dem universellen Bildungsmechanismus solcher Muster (und zwar der Kopplung einer nichtlinearen Reaktionskinetik mit Transport; Abschn. 2.1.1) ergeben sich systemübergreifende Eigenschaften (Abschn. 2.1.2), die zur Entstehung bestimmter Mustergeometrien, insbesondere von Spiralwellen führen (Abschn. 2.1.3). Spiralwellen und deren Entstehung in biologischen Systemen spielen innerhalb dieser Arbeit eine übergeordnete Rolle. Die formale Übersetzung der Regulationseigenschaften in Reaktionsterme gekoppelter Differentialgleichungen führt dabei zu einem quantitativen Verständnis beobachteter Dynamiken (Abschn. 2.1.4).

In Kapitel 2.2 wird gezeigt, wie Zellen des zellulären Schleimpilzes *Dictyostelium* physikalische Prinzipien zum Informationstransport in Form raumzeitlicher Wellen nutzen, um eine koordinierte Aggregation der Zellen zu gewährleisten. Vor diesem Hintergrund werden aktuelle Forschungsfragen zur Musterbildung von *Dictyostelium* in Abschnitt 2.3 aufgeführt. Die Zielsetzung der Arbeit und ihre Ergebnisse werden in Abschnitt 2.4 zusammengefasst.

In Kapitel 3 werden die experimentellen Methoden und die Verfahren der Datenanalyse zusammengestellt, die dann in Kapitel 4 zum Einsatz kommen. Insbesondere wird die mögliche Rolle von Variabilität bei der Musterbildung eines einfachen Automatenmodells (Abschn. 4.1) und bei *Dictyostelium* (Abschn. 4.2) ausführlich dargestellt und diskutiert. Variabilität stellt dabei die Verteilung bestimmter individueller Zelleigenschaften dar, die zeitlich konstant bleiben. Die Hypothese ist, dass diese Verteilung bestimmte Aspekte der Musterbildung determiniert. Eine Diskussion der Ergebnisse erfolgt im Anschluss in Kapitel 5.

2 Thematischer Hintergrund

2.1 Grundlagen der Erregungswellen

Trotz der Vielfalt ihrer Parameter folgen wellenbildende biologische Systeme ähnlichen Gesetzmäßigkeiten wie chemische und physikalische Systeme. Dennoch weisen die musterbildenden Systeme der Biologie im allgemeinen zwei fundamentale Unterschiede zu physikalischen oder chemischen Systemen auf: (1) Wie bereits in der Einleitung angesprochen, sind die Muster in biologischen Systemen oft ein Mittel zum Erreichen eines Ziels oder einer Organisationsform; werden Muster in diesem Sinne funktionell genutzt, haben sich die Regulationsprinzipien durch Evolution stabilisiert und weisen subtile Unterschiede zu nicht-biologischen Systemen auf. (2) Während für die Wissenschaften der unbelebten Natur Komplexität durch das Zusammenwirken vieler identischer Elemente zustandekommt, muss sich die Biologie einer Komplexität stellen, die durch das Zusammenwirken vieler unterschiedlicher Elemente entsteht, die über eine Vielzahl von Wechselwirkungen miteinander kommunizieren [Kit02, Coh04]. Dennoch eignen sich physikalische und chemische Grundmodelle zur Formulierung von Modellvorstellungen, die dann auf die Biologie übertragen werden können. Die folgenden Erkenntnisse über die formalen Bedingungen zur Entstehung von Erregungswellen wurden in den meisten Fällen theoretisch entwickelt und experimentell an chemischen Systemen, insbesondere der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion verifiziert.

2.1.1 Formale Bedingungen zur Entstehung von Erregungswellen

Nichtlineare Reaktionen: Autokatalyse

Nichtlineare Reaktionen sind die Basis der Musterbildung in sehr unterschiedlichen Systemen. Die dynamischen Zustände nichtlinearer Systeme lassen sich in zeitlich stabile, transiente und raumzeitliche Zustände gliedern. Diskutiert man nur das Zeitverhalten eines nichtlinearen Systems, gibt es als zeitlich stabile (asymptotische) Verhaltensformen (im Fall endlicher, nicht divergierender Systeme) nur stabile Fixpunkte, stabile Oszillationen und deterministisches Chaos. Übergänge zwischen Zuständen und die Trajektorien hin zu diesem asymptotischen Verhalten (Transienten) werden durch die Anfangsbedingungen und die Systemparameter festgelegt. Existieren mehrere stabile Fixpunkte (bistabile oder multistabile Systeme), so können Parameteränderungen und externe Störungen Übergänge zwischen diesen Zuständen induzieren. Analog zur Phasenumwandlung in der Thermodynamik können solche Systeme bei Variation ihrer Bifurkationsparameter diskontinuierliche Übergänge in einen anderen dynamischen Zustand zeigen. Koppelt man

solche dynamischen Elemente räumlich (durch Diffusion oder andere Wechselwirkungsterme), so kann das Spektrum raumzeitlicher Muster, das im vorangegangenen Kapitel diskutiert wurde, erzeugt werden, vor allem Wellenpropagation und räumliche Flecken- und Streifenmuster [Str00, Mur89, Hüt01a].

In der Biologie tragen nichtlineare, insbesondere autokatalytische Reaktionsschritte eine große Bedeutung in der Regulation metabolischer Pfade und der Informationspotenzierung innerhalb von Signaltransduktionsketten [Kos87]. Eine häufige Konstruktion ist das Zusammenspiel zwischen einem Aktivator und einem Inhibitor, welches das betreffende System zum Beispiel in einen oszillatorischen Zustand versetzen kann. Entscheidend ist

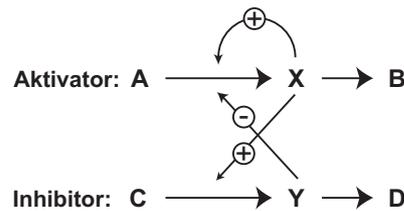


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines Aktivator-Inhibitor-Systems (nach einer Abbildung aus [Mai00]). Der Aktivator X ist unmittelbares Produkt oder Intermediat der Reaktion und katalysiert damit seine eigene Bildung. Die Produktion des Inhibitors Y ist ebenfalls an die Umsetzung des Aktivators gekoppelt. Entscheidend für die Entstehung einer oszillierenden Dynamik ist, dass dies in zeitverzögerter Weise und mit geringerer Produktionsrate als bei der Erzeugung von X geschieht. Liegt der Inhibitor Y mit der Zeit in ausreichend hoher Konzentration vor, wirkt er hemmend auf die autokatalytische Produktion des Aktivators. Der formalen Vereinfachung eines Wechselspiels aktivierender und inhibierender Prozesse liegt dabei meist ein System unzählige Reaktionen zugrunde.

dabei ein überschwelliger Stimulus, welche das System mit dem Verlassen des stationären Zustands beantwortet. Der Aktivator ist meist unmittelbares Produkt der Reaktion (Produktaktivierung, positive Rückkopplung), was nach der Aktivierung zunächst zu einem exponentiellen Anwachsen des Reaktionsproduktes führt, und zwar solange, bis die Wirkung des Inhibitors das System zurück in Richtung Ausgangszustand verschiebt (Abb. 2.1). Die Produktion des Inhibitors muss also an die Produktion des Aktivators gekoppelt sein, wobei eine langsame (und damit implizit zeitverzögerte) und geringere Produktionsrate als die des Aktivators entscheidend für eine bestimmte zeitliche Dynamik ist. Es hat sich gerade in den letzten Jahren als produktiv erwiesen, die Funktion zellulärer Prozesse (insbesondere zelluläre Signalkaskaden und genetische Regulation) auf solche universellen regulatorischen Grundkomponenten („Motive“) zurückzuführen [Tys03, Alo07, Bra08].

Räumliche Muster: Kopplung von Reaktion und Transport

Entscheidend für die räumliche Strukturbildung ist nun die Kopplung der autokatalytischen Reaktion mit Transport, insbesondere molekulare Diffusion, wie in Abbildung 2.2 dargestellt. Im Grundzustand ist die Konzentration des Aktivators unterhalb der Akti-

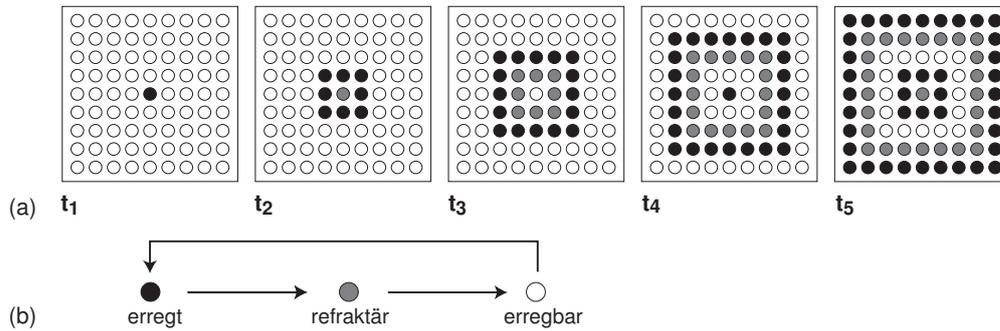


Abbildung 2.2: Diffusive Ausbreitung einer punktförmigen Erregung im Raum (nach einer Abbildung aus [Mai00]). Zur Verdeutlichung wurde hier ein System aus diskreten Raumpunkten und eine acht-elementige Nachbarschaft gewählt. Die Erregungsfront propagiert von einem Zeitschritt zum nächsten in Form einer geschlossenen Welle. Die Elemente hinter der Front befinden sich im refraktären Zustand, bevor sie wieder erregbar werden.

vierungsschwelle der autokatalytischen Reaktion. Das System bleibt räumlich homogen. Lokale Perturbationen können jedoch zu einem Anstieg der Aktivatorkonzentration über diese kritische Schwelle und damit zum Start der Reaktion führen (Abb. 2.2(a)). Die lokale Konzentration des Aktivators steigt durch den zugrundeliegenden autokatalytischen Mechanismus. Der Konzentrationsgradient treibt die Diffusion des Aktivators und die Aktivierung der autokatalytischen Reaktion in der unmittelbaren Umgebung an. Die lokale Störung breitet sich auf diese Weise in Form einer geschlossenen Front über das räumlich ausgedehnte System aus. Die zeitverzögerte Produktion des Inhibitors bewirkt dabei dessen Konzentrationsanstieg unmittelbar hinter der Aktivierungsfront. Eine erneute Erregung ist an diesem Ort erst dann wieder möglich, wenn die Konzentration des Inhibitors durch Diffusion unterhalb eines kritischen Wertes gefallen ist. Formal durchlaufen die räumlichen Elemente des Systems eine zeitliche Abfolge der drei Zustände „erregbar“, „erregt“ und „refraktär“, weshalb diese Klasse von Reaktions-Diffusions-Systemen auch als erregbare Medien bezeichnet wird (Abb. 2.2(b)). Die Refraktärzeit unterteilt sich dabei in eine absolute Refraktärphase, in der die vorherrschende Inhibitorkonzentration keine Erregung zulässt, und in eine relative Refraktärphase, in der durch fortgeschrittene „Akklimation“ der Elemente eine Reaktion beim Überschreiten einer stark nach oben versetzten Schwelle ausgelöst werden kann. Handelt es sich beim lokalen Ursprung der Erregungsaktivität um einen Schrittmacher (*Pacemaker*), d.h. um eine Region mit der Fähigkeit zu autonomer oszillatorischer Aktivität, geht von dieser Stelle die periodische Generierung weiterer Wellen aus, die sich als konzentrische Targetwellen räumlich ausbreiten.

2.1.2 Eigenschaften der Erregungswellen

Die Abfolge der drei formalen Zustände „erregbar“, „erregt“ und „refraktär“, welche die Elemente erregbarer Medien sukzessive durchlaufen, impliziert generische Eigenschaften, die diese Systeme unabhängig der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen und Größenordnungen aufweisen.

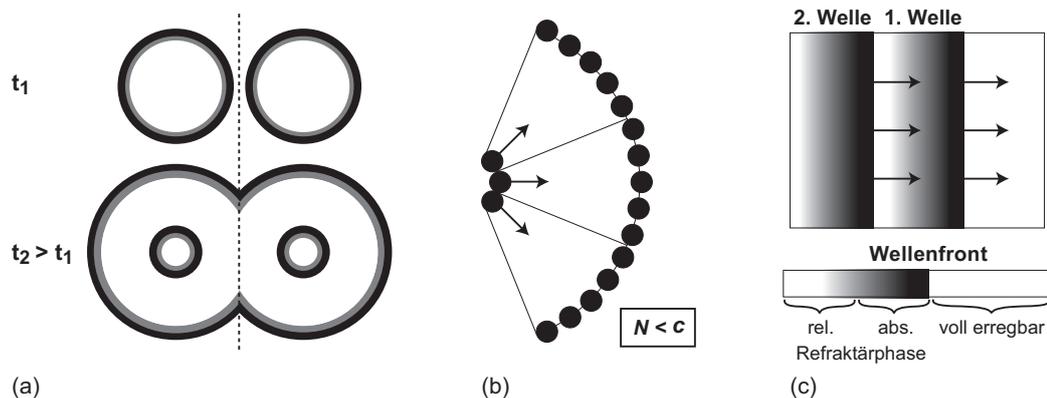


Abbildung 2.3: Eigenschaften der Erregungswellen. Kollidierende Wellen löschen sich durch die Refraktärphase unmittelbar hinter der Wellenfront aus (Annihilation (a)). Der Radius nach außen propagierender kreisförmiger Wellen nimmt kontinuierlich zu. Der Aktivator muss von jedem Punkt einer stark gekrümmten Wellenfront zu mehreren Punkten in Propagationsrichtung diffundieren (Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation (b)); N : Geschwindigkeit unter der lokalen Krümmung K , c : Geschwindigkeit einer planaren Welle). Bei hinreichend kleiner Wellenlänge diffundieren nacheinander auftretende Wellen in ein nicht vollständig regeneriertes Medium. Liegt dabei die Periodenlänge unterhalb der Dauer der absoluten Refraktärphase ist die Wellenpropagation unmöglich. Gelangt eine Welle in den Bereich der relativen Refraktärphase kann die Propagation bei reduzierter Geschwindigkeit stattfinden (frequenzabhängige Geschwindigkeit (c)).

1. Wechselseitige Annihilation und unidirektionale Wellenpropagation:

Die Anwesenheit der refraktären Phase unmittelbar hinter der Wellenfront bedingt das Auslöschen kollidierender Wellen [Win72]. Die Propagation einer einzelnen Welle kann also nur in eine Richtung erfolgen (Abb. 2.3(a)).

2. Geschwindigkeits-Krümmungsrelation:

Die Geschwindigkeit planarer Wellen ist konstant. Nach außen propagierende konzentrische Wellen zeigen eine Zunahme der Geschwindigkeit mit abnehmender Krümmung. Dieser Zusammenhang wird offensichtlich, wenn man die Wellenfront gedanklich als Zusammensetzung einzelner Elemente betrachtet (Abb. 2.3(b)). Zur Propagation einer Welle müssen die einzelnen Elemente einer stark gekrümmten Front die Erregung an mehrere Elemente weitergeben, da ihr Wellenradius während der Propagation nach außen kontinuierlich größer wird. Auf einer planaren Front

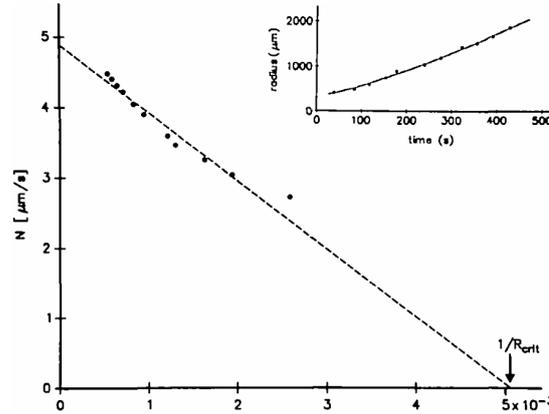


Abbildung 2.4: Lineare Abhängigkeit der Normalengeschwindigkeit N von der Krümmung K konzentrisch propagierender Targetwellen bei *Dictyostelium*. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt $(0,93 \pm 0,06 \times) 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$. Die Änderung des Wellenradius in Abhängigkeit der Zeit ist oben rechts dargestellt. Durch Interpolation der Regressionsgeraden ergibt sich bei diesen Daten die Geschwindigkeit einer planaren Welle von $c = 4,88 \text{ } \mu\text{m/s}$ und ein kritischer Radius $R_{krit} \approx 200 \text{ } \mu\text{m}$. Die Abbildung stammt aus [Foe89].

ist dieses Verhältnis 1:1, die Geschwindigkeit wird hier nur von den dynamischen Eigenschaften des Systems bestimmt. Es dauert länger, die Erregbarkeit an mehrere Elemente durch Diffusion weiterzugeben, als von einem Element zum nächsten.¹ Daher ergibt sich eine Verringerung der Geschwindigkeit bei zunehmender Krümmung [Kee86a, Zyk87, Foe88, Foe89, Foe90b]. Abbildung 2.4 zeigt entsprechende Messergebnisse bei *Dictyostelium* während eines bestimmten Zeitfensters der Entwicklung aus Foerster et al. (1989) [Foe89]. Das Verhältnis wird formal durch die Eikonal-Gleichung wiedergegeben:

$$N = c - KD . \quad (2.1)$$

N ist dabei die Geschwindigkeit in Normalenrichtung unter der lokalen Krümmung K , c die Geschwindigkeit einer planaren Welle und D der Diffusionskoeffizient des Aktivators. Daraus lässt sich der kritische Radius R_{krit} einer Welle ableiten, bei dem keine Propagation mehr stattfinden kann (siehe z.B. [Mai00]). Da also $N = 0$ und $K = \frac{1}{R}$ ergibt sich

$$R_{krit} = \frac{D}{c} . \quad (2.2)$$

¹ Dies wird besonders klar, wenn man sich eine „binäre Codierung“ der Dynamik vorstellt und Diffusion in eine „Infektionswahrscheinlichkeit“ überträgt, also den induzierten Wechsel von 0 nach 1 in dieser binär codierten Dynamik.

3. Dispersionsrelation:

Eine einzelne planare Welle propagiert mit maximaler Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit planarer Wellenfronten wird kleiner, wenn sich die Frequenz der Wellenerzeugung erhöht und so die Wellenlänge aufeinanderfolgender Fronten abnimmt (frequenzabhängige Geschwindigkeit). Während eine erste Welle durch ein voll erregbares Medium propagieren kann, hinterlässt diese hinter ihrer Front ein weniger erregbares Medium, in welchem die InhibitorKonzentration noch nicht wieder auf den Normalwert gesunken ist. Die Folgewelle kann hier nur mit reduzierter Geschwindigkeit propagieren (Abb. 2.3(c)). Je kleiner die Wellenlänge aufeinanderfolgender Wellen ist, um so weniger erregbar ist das Medium, in welches die Folgewelle propagiert, und um so geringer ihre Propagationsgeschwindigkeit. Die kürzeste mögliche Wellenlänge bzw. Periodenlänge, die eine Wellenpropagation zulässt, entspricht der absoluten Refraktärzeit.

2.1.3 Mechanismus der Entstehung von Spiralwellen

Durch lokale Defekte in räumlich ausgedehnten Reaktions-Diffusions-Systemen können geschlossene Wellenfronten in ihrer Propagation gestört werden und aufbrechen. An den

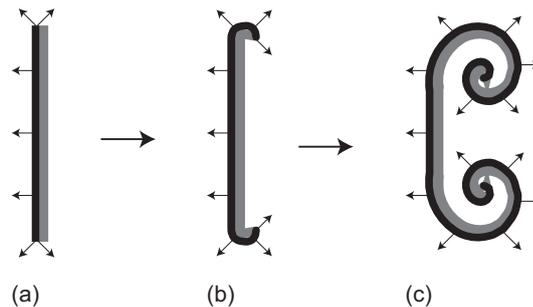


Abbildung 2.5: Entstehung von Spiralwellen aus Wellenfragmenten in Reaktions-Diffusions-Systemen. Spiralwellen gehen aus aufgebrochenen Wellenfronten (a) hervor. Die erregbare Front kriecht dabei an den äußeren Enden eines Wellenfragments hinter die refraktäre Zone (b). Aufgrund der Geschwindigkeitsdifferenz dieses stark gekrümmten Bereiches und den Zonen fern der Spitze, propagiert die erregte Front von innen nach außen mit kontinuierlich wachsender Geschwindigkeit (c). Das Szenario zeigt die Entstehung zweier gegenläufig rotierender Spiralwellen aus einem Wellenfragment.

so entstandenen offenen Wellenenden gelangt die Erregungsfront (Aktivator) hinter die refraktäre Zone (Inhibitor). Solche offenen Wellenenden weisen eine kontinuierlich wachsende Krümmung auf, die ihr Maximum an dieser äußersten Spitze erreicht. Dies ist der Ort niedrigster Geschwindigkeit (siehe Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation in Abschn. 2.1.2). Die Propagationsgeschwindigkeit der Erregungsfront nimmt von Innen nach außen kontinuierlich zu, was zum Aufwickeln der Welle und zur Bildung einer rotierenden Spirale führt (Abb. 2.5).

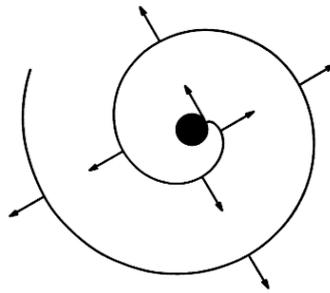


Abbildung 2.6: Spiralwellen sind selbsterhaltende Strukturen, deren Spiralspitze sich entlang einer Trajektorie um das Spiralzentrum bewegt. Die Abbildung stammt aus [Win72].

Im einfachsten Fall bleibt die Spiralspitze am Ort ihrer Entstehung bestehen und rotiert rigide um ein kreisförmiges Spiralzentrum (Abb. 2.6). In Abhängigkeit des zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus, insbesondere der Erregbarkeit und der Form der refraktären Zone, weisen erregbare Medien unterschiedliche Trajektorien ihrer Spiralspitzen auf. *Dictyostelium* zeigt ausschließlich rigide kreisförmige Trajektorien, die eine Abhängigkeit des Durchmessers von der globalen Erregbarkeit der Zellschicht aufweisen. Bei der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion findet man in Abhängigkeit der Systemparameter, insbesondere bei veränderter Erregbarkeit, neben der rigiden Rotation auch auf komplexeren (z.B. zykloiden, hyperzykloiden oder zickzackförmigen) Bahnen mäandernde Spiralspitzen [NU93, Ste00].

2.1.4 Formale Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Systemen

Die Entstehung raumzeitlicher Strukturen in Reaktions-Diffusions-Systemen unterliegt dem Zusammenwirken zweier, formal getrennter Prozesse, den nichtlinearen Wechselwirkungen einzelner Systemkomponenten und dem diffusiven räumlichen Transport (vgl. Abschn. 2.1.1). In der einfachsten Form kann dies durch ein auf zwei partielle Differentialgleichungen reduziertes System formuliert werden, das durch dynamische Verzahnung einer sich lokal selbstverstärkenden Substanz (Aktivator) mit einer zweiten Spezies, dem Inhibitor, welcher die Produktion des Aktivators hemmt (Abb. 2.1) und einem Diffusionsterm charakterisiert ist. Eine allgemeine Form eines solchen Modells mit räumlicher Kopplung lautet:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = f(u, v) + D_u \nabla^2 u \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \epsilon g(u, v) + D_v \nabla^2 v. \quad (2.4)$$

Das System ist durch die zeitliche Änderung einer schnellen Variablen u , dem Aktivator, und der langsamen Entwicklung des Inhibitors v charakterisiert. Die Separation beider sehr unterschiedlichen Zeitskalen wird durch den multiplikativen Faktor ϵ , für den

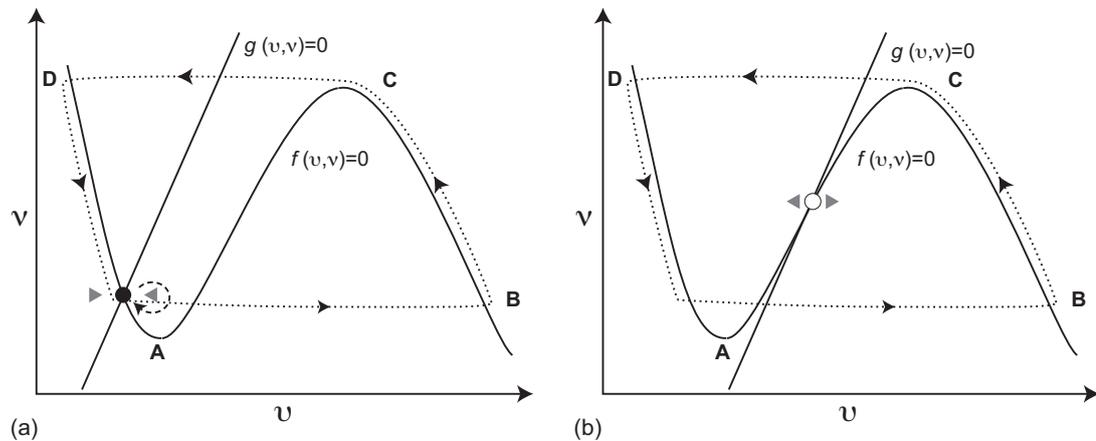


Abbildung 2.7: Nullcharakteristiken der Variablen u und v im Phasenraum in einem Zwei-Variablen-Modell. Im erregbaren System (a) klingen minimale Störungen in u exponentiell ab (gestrichelte Trajektorie). Bei überschwelliger Störung (gepunktete Trajektorie) durchläuft das System einen langen Weg im Phasenraum, bevor es wieder in den stabilen stationären Zustand gelangt. Besitzt das System einen instabilen Fixpunkt (b), wird dieser bereits bei kleinsten Störungen vom System verlassen und nicht wieder eingenommen (gestrichelte Trajektorie). Das System oszilliert.

$0 < \epsilon \ll 1$ gilt, realisiert. Der räumliche Konzentrationsverlauf der Spezies u und v wird durch die Fick'schen Diffusionsterme ausgedrückt, die sich aus dem Produkt der jeweiligen Diffusionskoeffizienten (D_u bzw. D_v) und der zweiten Ableitung nach den beiden Ortskoordinaten zusammensetzen ($\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2}$, Laplace-Operator) [Kee86b].

Die kinetischen Funktionen $f(u, v)$ und $g(u, v)$ müssen nur relativ wenige Eigenschaften besitzen, um das dynamische Verhalten verschiedener erregbarer Medien zu simulieren. Es genügt ein nichtlinearer Produktionsterm des Aktivators und die Kopplung zum degradativen Einfluss des Inhibitors. In Abhängigkeit der gewählten Parameter der Funktionen f und g können nun numerische Lösungen mit qualitativ unterschiedliche Dynamiken erzeugt werden. In Abbildung 2.7 sind die Nullcharakteristiken ($f = 0$ und $g = 0$) beider Funktionen in der $u - v$ -Ebene für ein erregbares System (Abb. 2.7(a)) und einen oszillatorischen Fall (Abb. 2.7(b)) dargestellt. Der Verlauf $f(u, v) = 0$ folgt einem Polynom dritten Grades (kubische Nullcharakteristik), $g(u, v) = 0$ einer Geraden (lineare Nullcharakteristik). Die Schnittpunkte beider Funktionen bei $\frac{\partial u}{\partial t} = 0$ und $\frac{\partial v}{\partial t} = 0$ entsprechen stationären Fixpunkten.

Im erregbaren System (Abb. 2.7(a)), in denen der Schnittpunkt beider Verläufe links vom Minimum der Nullcharakteristik von u liegt, besitzt das System einen stabilen stationären Zustand bei kleinen Konzentrationen von u . Kleine Störungen klingen exponentiell ab (gestrichelte Trajektorie in (a)). Das System strebt zum stationären Zustand zurück. Eine überschwellige Störung (die Separatrix AC wird überschritten) treibt das System entlang der Trajektorie ABCD durch den Phasenraum (gepunktete Trajektorie in (a)):

Der Zustandspunkt springt schnell nach B während des Erregungsprozesses (es kommt zur schnellen Produktion von u) und bewegt sich dann langsam nach C. Die zeitverzögerte Wirkung des Inhibitors kommt nun deutlich zum Tragen. Das System springt schnell nach D. Von dort bewegt es sich dann langsam in den stationären Zustand zurück, wobei sich auf dem Weg dorthin vor allem v langsam ändert. Das System ist in dieser Phase refraktär und damit nicht erregbar. Die formalen Zustände dieser Klasse von Systemen sind also: erregbar, erregt und refraktär, worin sich die in den Abschnitten 2.1.2 und 2.1.3 bereits diskutierten Eigenschaften von Erregungswellen und Bildungsmechanismen verschiedener Wellengeometrien wiederfinden.

Im Fall des zu Oszillationen fähigen Systems (Abb. 2.7(b)) treiben bereits kleinste Störungen das System aus dem stationären Zustand, der nicht wieder eingenommen werden kann (instabiler stationärer Fixpunkt). Das System beginnt zu oszillieren. Die dargestellte Situation wird dabei aufgrund schneller und langsamer Abschnitte der Trajektorie als Relaxationsoszillation bezeichnet. Grundsätzlich ist für das Gleichungssystem auch eine bistabile Lösung möglich (durch Kippen der linearen Nullcharakteristik). Der asymptotische Systemzustand hängt dann von den Anfangsbedingungen ab.

Beispiele für den hier dargestellten Modelltyp sind der von Keener & Tyson reduzierte Zwei-Variablen-Oregonator [Kee86b] als stark vereinfachtes Modell der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion oder das auf zwei Variablen reduzierte Martiel-Goldbeter-Modell (vgl. Abschn. 2.2.4; [Mar87, Tys89]).

2.2 *Dictyostelium* als Modellorganismus für biologische Musterbildung

Die erste Beschreibung und Namensgebung der Gattung *Dictyostelium* geht auf den Mykologen Brefeld in das Jahr 1869 zurück, der als erster aus Exkrementen von Pferden und Hasen *Dictyostelium mucoroides* isolierte [Bre69]. Der Gattungsname leitet sich dabei aus der Struktur der Aggregationsströme (*Dicty*=netzartig) und der Gestalt der Fruchtkörper am Ende des Entwicklungszyklus (*Stelium*=Turm) ab [Kes01]. *Dictyostelium discoideum* wurde 1935 von Raper beschrieben [Rap35]. Heute stellt *Dictyostelium* ein wichtiges Modellsystem für die hormonale Regulation höherer Organisationsformen, den morphogenetischen Übergang von der Ein- zur Vielzelligkeit, Zelldifferenzierung und interzellulärer Kommunikation durch biologische Musterbildung dar.

Die besondere Bedeutung von *Dictyostelium* liegt in der strikten Trennung zwischen einer vegetativen Lebensphase und einem faszinierenden, von fundamentalen Entwicklungs- und Organisationsprozessen geprägten Lebenszyklus begründet. Im vegetativen Stadium leben die zellulären Schleimpilze als solitäre Amöben, die sich mitotisch teilen und bakterielle Nahrung phagozytieren, im Boden. Das Entwicklungsprogramm stellt dagegen eine Strategie zum Überleben dar und wird unter widrigen Umweltbedingungen, vor allem durch Nahrungsmangel induziert [Cla88, Rat91, Cla92, Jai92, Cla95, VH96]. Dabei aggregieren bis zu 10^5 Zellen chemotaktisch geleitet und formen über morphogenetische Übergangsformen einen multizellulären Organismus mit den Sporen als resistenter Verbreitungsform (siehe z.B. [Loo82, Kes01]).

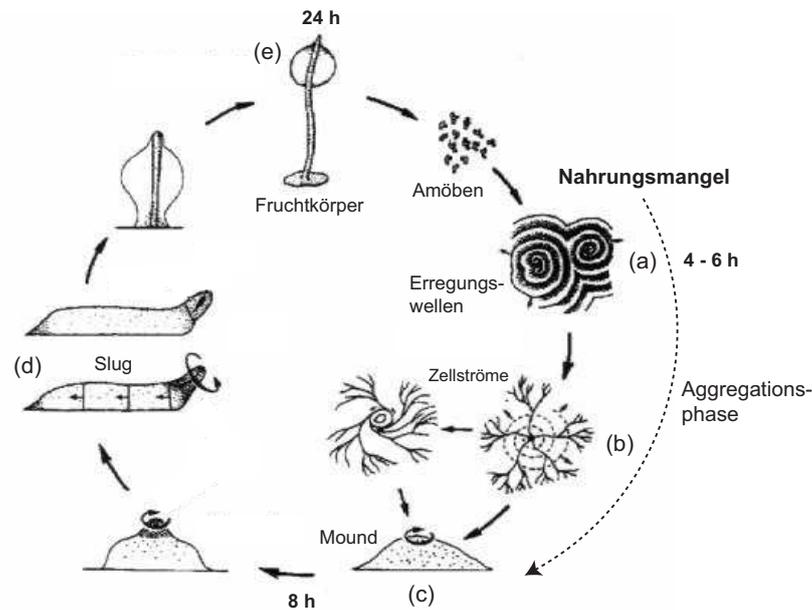


Abbildung 2.8: Entwicklungszyklus von *Dictyostelium*, der durch Nahrungsmangel innerhalb des Amöbenstadiums initiiert wird. Die koordinierte Zellaggregation erfolgt durch raumzeitliche Propagation von cAMP-Wellen (a). Die Zellen begeben sich chemotaktisch geleitet, innerhalb von Zellströmen senkrecht in Richtung des ansteigenden Konzentrationsgradienten zum Aggregationszentrum hin (b). Dort bildet sich als kompaktes Zellaggregat das Moundstadium (c), welches in ein mobiles Slugstadium übergeht (d). Diese Aggregate bestehen aus bis zu 10^5 individuellen Zellen, die sich in verschiedene Zelltypen differenzieren. Der Entwicklungszyklus schließt sich nach der Bildung eines Fruchtkörpers, der die Sporenmasse mit resistenten Sporen enthält (e). Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt des Entzugs der Nahrungsquelle, wobei Beginn und mittlere Dauer der einzelnen Phasen stark variieren kann. Die ursprüngliche Abbildung stammt aus [Sie94].

2.2.1 Entwicklungszyklus

Der in Abbildung 2.8 dargestellte Entwicklungszyklus von *Dictyostelium* unterteilt sich in die Aggregationsphase der Amöben, die durch Musterbildung in Form raumzeitlicher Wellen und Zellströme geprägt ist, und eine Abfolge mehrzelliger Organisationsformen, die am Ende der Entwicklung in der Bildung eines Fruchtkörpers endet. Die periodischen cAMP-Signale kontrollieren dabei nicht nur die Aggregation der Amöben, sondern auch die späteren Stadien der Morphogenese (siehe z.B. [Wei99, Wei04]).

Die koordinierte Aggregation individueller Amöben wird durch das chemotaktisch wirkende Molekül cAMP geleitet, das periodisch von den Aggregationszentren ausgeht [Sha56, Bon63, Kon67].

Wenige Stunden nach dem Nahrungsentzug beginnen einige Zellen mit der Produktion und Ausscheidung von cAMP, das sowohl diese Zellen selbst, ebenso aber auch benachbarte Zellen zur cAMP-Produktion und -Ausscheidung anregt. Die Detektion des cAMP erfolgt

mit Hilfe hochspezifischer Oberflächenrezeptoren (cARs; Abschn. 2.2.3; [Kle88, Par96]). Dabei werden zwei miteinander konkurrierende Vorgänge innerhalb der Zellen induziert: Zum einen bewirkt die Bindung von cAMP eine schnelle Erregung, welche zur Aktivierung der intrazellulären Adenylatzyklase (AC) und damit zur cAMP-Synthese führt, zum anderen folgt eine langsame Adaptation, welche die Aktivität der AC und damit die cAMP-Synthese wieder beendet [Pit90]. Das Binden des cAMP an die Rezeptoren der Zellen entspricht einer autokatalytischen Rückkopplungsschleife, die erst durch den langsam einsetzenden Adaptationsprozess gestoppt wird. Zellen, die das Signal amplifiziert haben, werden refraktär, also zeitweilig insensitive gegenüber einer weiteren Stimulation. Die extrazelluläre cAMP-Konzentration wird durch die membrangebundene und freie Phosphodiesterase (mPDE und ePDE) reguliert [Kes88]. Sinkt die extrazelluläre Konzentration während der Adaptation, führt dies allmählich zur Deadaptation der zyklischen Aktivierungsschleife, wodurch die Zellen ihre Kompetenz zur Erregbarkeit zurückerlangen. Das sezernierte cAMP verteilt sich durch Diffusion und aktiviert benachbarte Zellen, die dadurch angeregt werden und ihrerseits cAMP synthetisieren. Die Adaptation der Zellen nach ihrer Anregung ist maßgeblich für die raumzeitliche Propagation von cAMP-Konzentrationswellen verantwortlich (Abb. 2.8(a) und Abb. 2.9(a)).

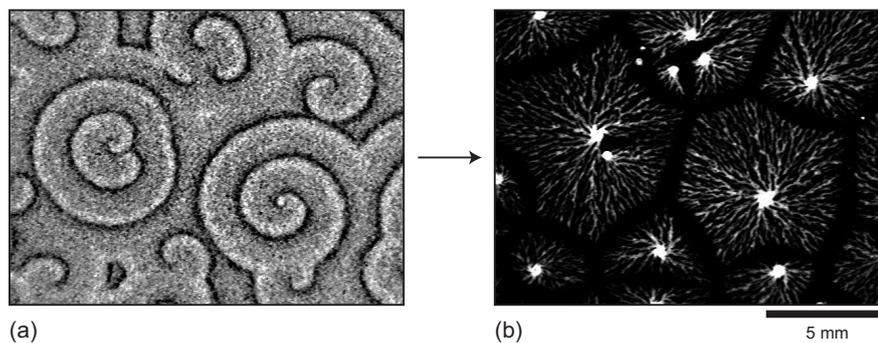


Abbildung 2.9: cAMP-Muster und Aggregationsströme bei *Dictyostelium* im Dunkelfeld. Die in (a) dargestellten Erregungswellen einer noch homogenen Zelllage gehen im Verlauf der Aggregation in Zellströme (b) über. Dabei stellt jede Spiralwelle das Einzugsgebiet eines Aggregationszentrums dar. In (b) sind diese Zentren von zulaufenden Zellströmen charakterisiert. Die Zellen sammeln sich im fortgeschrittenen Stadium in den Zentren und gehen in das Moundstadium über. Der zeitliche Abstand zwischen beiden Abbildungen beträgt etwa 3 h.

Neben den aktivierenden und inhibierenden Prozessen der Signaltransduktion, bewirkt die Bindung des cAMP an die Rezeptoren die chemotaktische Reaktion der Zellen [Ger76]. Die erregten Zellen werden dabei durch den cAMP-Gradienten geleitet, und bewegen sich in Richtung ansteigender cAMP-Konzentration, also senkrecht zur Wellenfront und entgegen der Propagationsrichtung des cAMP, auf den eigentlichen Ursprung der Wellen zu [Dev79, Din80b, Ger82, Par99]. Kehrt sich die zeitliche Änderung der Konzentration um (wenn eine Welle vorübergegangen ist), beenden die Zellen ihre gerichtete Bewegung.

Dies verhindert einen Richtungswechsel der Zellen bei Richtungsänderung des Gradienten [Din80b, Fut82]. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Desensitivierung der Rezeptoren durch reversible Phosphorylierung [VH92, Xia99], wie sie in Abschnitt 2.2.4 im Martiel-Goldbeter-Modell für die Simulation raumzeitlicher Wellen von besonderer Bedeutung ist. Die kovalente Rezeptormodifikation hat neben der Adaptation der AC einen entscheidenden Anteil an der refraktären Phase.

Die chemotaktische Bewegung der Zellen als Antwort auf die propagierenden Wellen führt zur kollektiven Zellbewegung in Richtung des Aggregationszentrums, also dem Zentrum einer Targetwelle oder der Spitze einer Spirale. Im fortgeschrittenen Stadium der Aggregation bewegen sich die polarisierten Zellen innerhalb charakteristischer Zellströme, die auf die einzelne Aggregationszentren weisen (Abb. 2.8(b)). Die beiden in Abbildung 2.9 dargestellten Momentaufnahmen zeigen denselben räumlichen Ausschnitt, in (a) während der Phase deutlich sichtbarer Wellenmuster, in (b) den bereits durch Zellströme geprägten Zeitpunkt der Aggregation.¹

Die chemotaktische Bewegung rührt aus der reversiblen Reorganisation des zellulären Actinnetzwerks in Interaktion mit Myosin am Uroid des Zellkörpers, was zum mechanischen Ausstülpen von Pseudopodien am vorderen Teil der Zelle in Richtung des cAMP-Gradienten führt [Yum85, Weh90, Fuk91, Noe95, Wes96, Fuk91, Wes97, Yum98, Clo99, Fuk99, Noe00]. Eine Rolle bei der Regulation der Chemotaxis spielen zum einen die schnelle cAMP-induzierte Bildung von cGMP [Ros81, Liu93, VH97] und der cAMP-abhängige Ca^{2+} -Influx [Mal82, Cub95, Unt95, Neb97].

Die Bildung der Zellströme erfolgt mehr oder weniger sprunghaft als Symmetriebruch in der homogenen Zellschicht. Theoretischen Vorstellungen zufolge führen lokale Dichtunterschiede in der Verteilung der Zellen zur Deformation der Wellenfronten und dem lokalen Anstieg der Propagationsgeschwindigkeit, was die Zellen der Umgebung veranlasst, ihre Orientierung zu ändern. Die damit verbundene lokale Erhöhungen der cAMP-Konzentration, veranlasst in selbstverstärkender Weise nun weitere Zellen der Umgebung, sich benachbarten Strömen anzuschließen [Lev91, Vas94, Höf95, Lev96, Bre97, Dal97, Höf97, Vas97, Lev98]. Verschiedene entwicklungsabhängige Klassen von Kohäsions- und Adhäsionssysteme (z.B. *Contact Sites A, B*) tragen zur Stabilisierung der Zellströme und späteren Stadien bei [Ger61, Ger68, Ger80, Siu90, Fon93, Siu97, Boz95].

Der kollektiven Zellbewegung zum Aggregationszentrum folgt der Übergang zum hemisphärisch geformten Mound, dem ersten multizellulären Stadium des Entwicklungszyklus, das durch dreidimensionale rotierende cAMP-Wellen und der entgegen gerichteten, aufgrund der hohen Packungsdichte nun verhältnismäßig langsamen Zellbewegung gekennzeichnet ist (Abb. 2.8(c); [Rie96, Dor98, Dor01c, Dor03, Dor06b]). Es bilden sich dabei keine polyenergidigen Zellen, sondern ein hochorganisiertes Pseudoplasmodium aus individuellen Zellen. Hier treten erste Differenzierungsprozesse in sogenannte *Prespore-* und *Prestalkzellen* auf, den Vorläuferzellen der im Fruchtkörper ausdifferenzierten Sporen-

¹ Auch in 2.9(b) wird die Zellbewegung durch cAMP-Wellen koordiniert, die jedoch in diesem Entwicklungsstadium mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie nicht zu sehen sind.

und Stielzellen. An der Determination des Zellschicksals spielen neben vielen, zum Teil unvollständig geklärten Regulationsmechanismen, der Ernährungsstatus und die Position innerhalb des Zellzyklus bei Entzug der Nahrung – also individuelle Zelleigenschaften, die bereits vor der Aggregation der Zellen vorliegen – eine übergeordnete Rolle [Tas83, McD84, Wei84a, Wei84c, McD86, Ara97, Hua99, Wei99]. Ein Teil der Prestalkzellen sortiert sich zu einer fingerförmigen Struktur im apikalen Bereich, dem Tip, aus, welcher als Organisationszentrum fungiert [Dor06a]. Die Sortierung erfolgt aufgrund differentieller Bewegungseigenschaften der Zellen [Mat79, Ear95], denen eine Kombination verschiedener Ursachen – wie Unterschieden in der Perzeption und Antwort auf das cAMP-Signal [Wei84d, Ott86, Sax91b, Sax93, Lou94, Yu96, Dor01b], den Organisationseigenschaften des Zytoskeletts [DL87, Wit92, Spr94, Riv96, Tsu99] und der Kohäsions- und Adhäsionsfähigkeit der Zellen [Siu90, Kel94, Kun83, Dyn94, Suk98] – zugrunde liegen. Es besteht also ein unmittelbarer Zusammenhang der Signal- und Bewegungseigenschaften der Zellen und ihrer Anordnung im Aggregat [Dor96, Dor97, Bre97]. Vereinfacht dargestellt beinhaltet der Mound eine Mischung schnell und langsam oszillierender Zellen, wobei Prestalkzellen Signale mit höherer Amplitude und Frequenz hervorbringen als Presporezellen [Ott86]. Diese Zellunterschiede spiegeln sich in den zelltypspezifischen Mustern der Genexpression wider (siehe z.B. [Mei99b]).

Das Slugstadium ist ein mobiles 1–2 mm langes schneckenförmiges Gebilde, welches photo- und chemotaktisch geleitet über den Untergrund kriechen und sich so Orte mit besseren Lebensbedingungen erschließen kann (Abb. 2.8(d); [Bon50, Ode86, Vas03, Dal04]). Die während des Moundstadiums begonnenen, in zelltypspezifischen Unterschieden begründeten Sortierungsprozesse führen zur Bildung der hochorganisierten räumlichen Anordnung verschiedener Zelltypen entlang einer Anterior-Posterior-Achse im Slug [Dor98, Dor00]. Dabei lässt sich das Pseudoplasmodium in eine Prestalkregion mit einer Tipstruktur am vorderen und in die Presporezone am mittleren und hinteren Ende unterteilen [Mae03]. Beide Bereiche besitzen definierte Regionen aus Subtypen dieser Zellgruppen, die später im Fruchtkörper unterschiedlichen Zellschicksalen folgen. Die Proportionierung des Slugs ist hochreguliert und weist auch bei abweichenden Gesamtzellzahlen ein Verhältnis von 80 % Prespore- und 20 % Prestalkzellen auf [Bon52, Ste82]. Eine detaillierte Darstellung der Kontrolle dieser räumlichen Verteilungen findet sich zum Beispiel bei Mohanty & Firtel (1999) [Moh99].

Siegert & Weijer (1991, 1992) haben in Experimenten gezeigt, dass sich innerhalb des Slugs die Zellen in der Presporeregion koordiniert in Kriechrichtung des Slugs bewegen, während die Zellen der Prestalkzone senkrecht zur Bewegungsrichtung des Slugs, also um die Zentralachse der Tipstruktur rotieren [Sie91, Sie92]. Diese Bewegungen lassen sich mit dem cAMP-Signal in Verbindung bringen. Daraus leitet sich ab, dass das cAMP-Signal innerhalb der Prestalkzone die Form einer dreidimensionalen Scrollwelle hat und innerhalb der Presporezone als zweidimensionale planare Wellen progagiert [Sie92, Bre95]. Diese Dynamiken liegen in den sich unterscheidenden oszillatorischen Eigenschaften der Zelltypen begründet. Tatsächlich konnte auch in numerischen Simulationen gezeigt werden, dass dieser geometrische Übergang durch einen Erregbarkeitssprung zwischen Prespore- und Presporezone des Slugs herbeigeführt werden kann. Die dreidimensionale Scrollwellen der

Prestalkzone verdreht sich beim Eintritt in die weniger erregbare Presporezone (*Twisted Scroll Wave*), wo sich dann planare Wellen abtrennen [Ste93, Bre95, Bre99, Vas99, Vas03]. Auch in einer dreidimensionalen Belousov-Zhabotinsky-Reaktion mit einem Gradienten der die Erregbarkeit ändert konnte, diese Wellengeometrie beobachtet werden [Yam91]. Die Entstehung des Fruchtkörpers wird durch eine von mannigfaltigen Umbauprozessen und Zellmigration geprägte Kulminationsphase eingeleitet (Abb. 2.8(e); [Bon44, Rap52], siehe z.B. [Dor96, Wei99, Wei04]). Die Vorläuferzellen differenzieren sich nun endgültig aus. Stalkzellen, welche Stiel und Basalplatte des Fruchtkörpers bilden, gehen nach der Vakuolisierung und Einlagerung von Zellulose zugrunde. Die Mehrzahl der Zellen differenziert sich zu resistenten Sporenzellen, welche unter geeigneten Bedingungen wieder zu solitären Amöben auskeimen können [Loo82]. Damit hat sich der Entwicklungszyklus geschlossen.

2.2.2 Raumzeitliche Muster während der Aggregation

Während der frühen Aggregationsphase können cAMP-Wellen in der noch homogenen Zellschicht indirekt im Dunkelfeld beobachtet werden (Abb. 2.9(a) und Abb. 2.10; [Alc74, Gro76, Tom81, Sie89]). Dabei besitzen die individuellen Zellen in Abhängigkeit ihres Er-

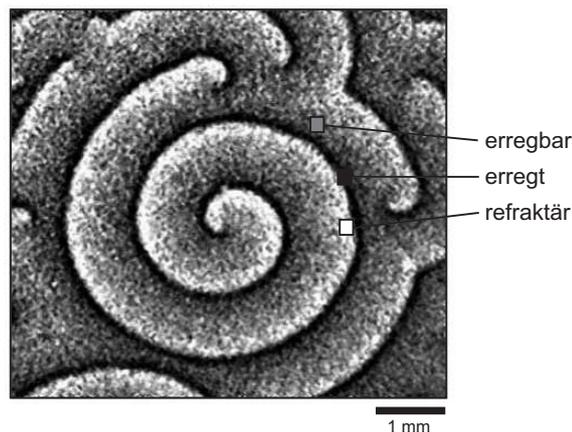


Abbildung 2.10: Zuordnung der formalen Zustände erregbarer Medien auf die Muster im Dunkelfeld von *Dictyostelium* (vgl. Abschn. 2.1.1). Die schwarze Wellenfront besteht aus erregten Zellen, die unmittelbar nach der Detektion des cAMP-Signals das Licht kaum streuen. Helle Bereiche sind chemotaktisch aktive Zellen. Sie sind refraktär. Der Bereich hinter dieser Zone besteht aus Zellen, die wieder erregbar sind. Sie bilden Pseudopodien in verschiedene Richtungen aus [Alc74].

regungszustandes sich periodisch ändernde Lichtstreuungseigenschaften. Maßgeblich sind dabei die Formänderungen auf Zellebene, die mit der chemotaktischen Bewegung und der Pseudopodienbildung einhergehen. Als unmittelbare Antwort auf die Detektion des cAMP-Signals runden die Zellen ihre Körper zunächst kurzzeitig ab, wodurch Licht verhältnismäßig wenig abgelenkt wird. Sich chemotaktisch bewegende Zellen haben gestreckte

Zellkörper. Die laterale Pseudopodienbildung ist unterdrückt. Sie streuen Licht verhältnismäßig stark. Läßt die lokale cAMP-Konzentration nach, wird die laterale Pseudopodienbildung erneut initiiert. Dies geschieht in zufälliger Weise, so daß sich keine Nettobewegung ergibt. Individuelle Zellen streuen also das Licht, jedoch nicht zeitlich konstant. Durch die Kohärenz dieser periodischen Zellformänderungen innerhalb einer Zellschicht ergeben sich auf makroskopischer Ebene alternierend helle und dunkle Wellenbanden. Tomchik & Devreotes (1981) zeigten durch den Einsatz von ^3H -markiertem cAMP, dass die Dunkelfeldwellen mit der raumzeitlichen Änderung der cAMP-Konzentration exakt überlagert sind [Tom81]. Damit können die formalen Zustände erregbarer Medien (vgl. Abschn. 2.1.1) nun direkt auf die Wellenmuster übertragen werden (Abb. 2.10).

Zu Beginn der Aggregation erscheinen zunächst verhältnismäßig viele ringförmige Aggregationszentren, die miteinander konkurrieren [Bon67, Dur74, Dur73, Loo75, Lee96]. Wellen benachbarter Aggregationszentren kollidieren und annihilieren. Zentren mit einer höheren Generierungsfrequenz expandieren in Domänen mit geringerer Frequenz und unterwerfen die Zellen dieser Bereiche der höheren Frequenz [Win72]. Beim Vergleich der beiden Momentaufnahmen in Abbildung 2.9(b) wird deutlich, dass die Territorialgrenzen der einzelnen Aggregationszentren, durch den Ort sich auslöschender Wellenfronten benachbarter Zentren bestimmt werden. Dabei ist die räumliche Anordnung und Ausdehnung der einzelnen Domänen nicht nur von der Position der Spiralspitzen abhängig, wie es im in Abbildung 2.11(a) eingezeichneten Voronoi-Diagramm der Fall ist, sondern auch

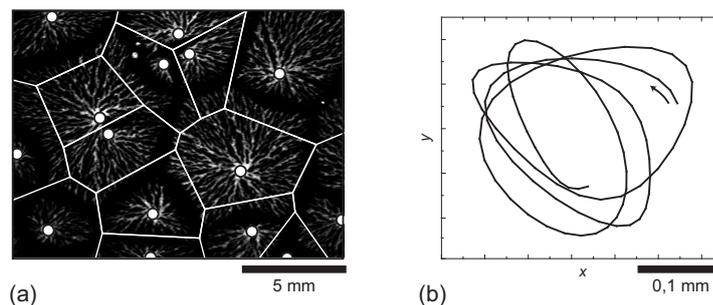


Abbildung 2.11: Voronoi-Diagramm, das sich nur aus der Position der Aggregationszentren ergibt, auf einem beobachteten Aggregationsmuster (a) und rigide Rotation einer Spiralspitze (b). Der Pfeil in (b) verweist auf die Richtung der Zeit entlang der Trajektorie. Zur Rekonstruktion wurden die Kanten aufeinanderfolgender Wellenfronten überlagert und die Koordinaten der Schnittpunkte ermittelt.

von der relativen Phase der konkurrierenden Zentren (siehe z.B. [Mül98, Pol05]).

Die Geometrie der Muster ist variabel und vor allem vom Stamm der Zellen abhängig. In den meisten Fällen aber, auch bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten AX2-Stamm, lassen sich ausschließlich rotierende Spiralwellen beobachten.¹ Andere Zell-

¹ An dieser Stelle ist von etablierten quasi-stationären Mustern die Rede. Spiralen sind durch Symmetriebrechung aus Targetmustern hervorgegangen (vgl. 2.1.3).

stämme bringen nur konzentrische Targetwellen hervor [Dur74, Dor98]. Wie bereits in Abschnitt 2.1.1 generell für Reaktions-Diffusions-Systeme eingeführt, entstehen Targetwellen durch die autonome periodische Aktivität – im Fall von *Dictyostelium* – von Zellen mit der Fähigkeit zur periodischen Signalerzeugung, während Spiralen selbsterhaltende kontinuierliche Strukturen sind. Die Spitze einer Spirale rotiert bei *Dictyostelium* rigide um ein Zentrum adaptierter Zellen und benötigt keine autonome Oszillation (Abb. 2.11(b); [Dur73, Foe90b]).

Mischexperimente mit Zellen, die unterschiedliche quasi-stationäre Wellengeometrien hervorbringen, haben ergeben, dass im Prinzip jede Zelle zu autonomen Oszillationen fähig ist [Gla81]. Während der Aggregationsphase evolviert das Signalsystem kontinuierlich und leitet die Zellen durch verschiedene dynamische Regime. Eine Zellpopulation entwickelt einige Zeit nach dem Entzug der Nahrung zunächst die Kompetenz zur Signalamplifikation (Erregbarkeit) und im späteren Verlauf die Fähigkeit zur periodischen Oszillation [Ger75a, Lax79]. Verantwortlich ist ein dynamisches und konkurrierendes Zusammenspiel einer durch Nahrungsmangel induzierten und einer entwicklungsabhängigen und cAMP-pulsinduzierten kontinuierlichen Änderung der Genexpression (Abschn. 2.2.3; [Man86, Kim91, Fir95, Sch95b]). Im Fall der pulsinduzierten Regulation koppelt sowohl die Konzentration als auch die Periodizität des cAMP-Signals auf die Genexpression wichtiger Komponenten des Signalsystems zurück [Fir95]. cAMP hat dabei in allen Entwicklungsstadien regulatorische Funktionen (siehe z.B. [Mei99b, Kes01]). Die Entwicklung regulatorischer Elemente des Signalsystems von *Dictyostelium* spielt in den in Abschnitt 2.3 diskutierten Modellvorstellungen zur Symmetriebrechung der Muster eine entscheidende Rolle.

2.2.3 Signaltransduktion

Die Bindung von extrazellulärem cAMP an die cAMP-Rezeptoren aktiviert eine Vielzahl verschiedener Klassen intrazellulärer Signalkaskaden, die zentrale Bedeutungen bei der Polarisierung des Zellkörpers, der Mobilisierung des Zytoskeletts und der chemotaktischen Bewegung, der Amplifizierung des cAMP-Signals, des Adaptationsprozesses und der Erregbarkeit haben (siehe z.B. [Kes01]). Die Prozessierung des cAMP-Signals spielt in jedem Stadium der Entwicklung eine herausragende Rolle. Die Prozesse sind dabei hochreguliert und steuern eine Vielzahl genregulatorischer Vorgänge, die wiederum auf die Generierung der Signale rückwirken. Neben den cAMP-abhängigen Signalkaskaden findet sich zudem eine Vielzahl nicht oder nur indirekt cAMP-abhängiger Prozesse.

An dieser Stelle soll kurz auf einige Details der Regulation der AC-abhängigen cAMP-Signalkaskade als zentrales Kernstück der autokatalytischen Generierung periodischer Pulse und deren Kopplung zur pulsabhängigen Genexpression während der Aggregationsphase eingegangen werden. In Abbildung 2.12 sind die wichtigsten Elemente der eng miteinander vernetzten Prozesse dargestellt.

Die Bindung des cAMP erfolgt an hochspezifische, aus sieben Domänen bestehende transmembrane Rezeptoren (cAR1), die als G-Protein-gekoppelte Signalsysteme zwischen dem

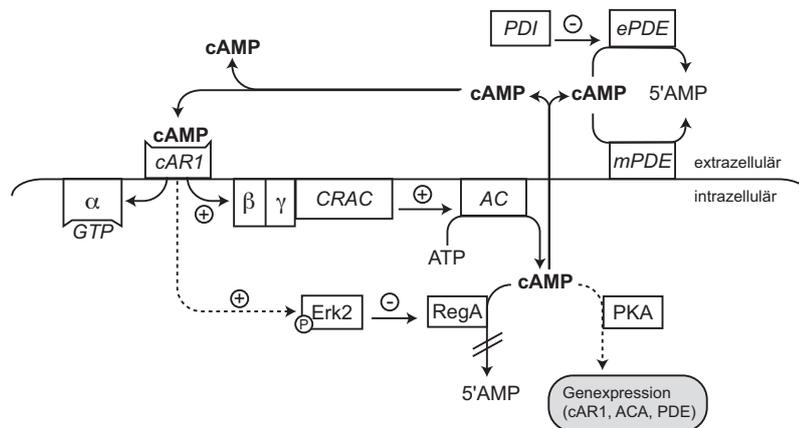


Abbildung 2.12: Signaltransduktion und cAMP-pulsinduzierte Kopplung zur Genexpression bei *Dictyostelium* nach dem Binden von cAMP an die Rezeptoren. Die Aktivierung der AC erfolgt durch den $G\beta\gamma$ -CRAC-Komplex. Neben einer Erhöhung der extrazellulären cAMP-Konzentration, kommt es zur intrazellulären cAMP-Akkumulation, was zur Aktivierung der PKA und der Bildung weiterer Komponenten des Signalsystems führt. Entscheidend ist hier die Inhibition der intrazellulären Phosphodiesterase RegA durch Erk2. Erk2 wird durch Binden des cAMP-Moleküls an den Rezeptor aktiviert. Die Regulation der extrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt durch ein Zusammenwirken aus PDE und PDI.

extra- und dem intrazellulären Raum vermitteln [Kle87, Kle88, Nee88].¹ Das in seine Untereinheiten dissoziierte G-Protein aktiviert nun im Inneren der Zelle eine Vielzahl zellulärer Antworten auf das Signal, wie die Aktinassemblierung und die Stimulation der AC. Das $G\beta\gamma$ -Dimer rekrutiert (neben anderen Proteinfaktoren [Mei99a, Ser00]) das zytosolische CRAC (*Cytosolic Regulator of Adenylyl Cyclase*) reversibel an den Bereich der Plasmamembran, welcher der höchsten extrazellulären cAMP-Konzentration ausgesetzt ist [Par99, Jin00]. Die Translokation des CRAC an das vordere Ende der Zellen kann als eine Übersetzung des cAMP-Gradienten in die Polarität der Zelle verstanden werden [Ins94, Lil94, Wu95c, Par98, Com05]. Der $G\beta\gamma$ -CRAC-Komplex stimuliert die AC, die daraufhin die Umsetzung von ATP in cAMP katalysiert [Wu95c, Par96].² Ein Teil des cAMP gelangt in den extrazellulären Raum und aktiviert dort andere Zellen.

- 1 Im Verlauf des Entwicklungszyklus werden drei weitere homologe Rezeptortypen (cAR2, cAR3, cAR4) mit variierender Affinität zum cAMP entwicklungs- und zelltypabhängig exprimiert [Sax91b, Sax91a, Joh92, Dor01b].
- 2 *Dictyostelium* besitzt insgesamt drei Adenylatzyklasegene, die entwicklungsabhängig exprimiert werden. Die Adenylatzyklasen ACA, ACG und ACB haben dabei überlappende Expressionsmuster und Funktionen. Die ACA übernimmt die zentrale Funktion bei der Generierung der cAMP-Pulse während der Aggregationsphase. Das Protein besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten und zwei Einheiten mit jeweils sechs transmembranen Domänen und weist strukturelle Ähnlichkeit zu den Adenylatzyklasen der Säugetiere auf [Sun96, Pit92]. Typischerweise ist, wenn nur von AC die Rede ist, und nicht zwischen den verschiedenen Formen unterschieden wird, die ACA gemeint.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der extrazellulären cAMP-Konzentration spielt ein hochreguliertes System aus einer cAMP-degradierenden Phosphodiesterase (PDE), die sowohl frei als auch membrangebunden vorliegen kann, und ihres Inhibitors (PDI). Das Zusammenspiel beider Komponenten übt erheblichen Einfluss auf das Adaptationsverhalten der Zelle und die Modulation der Erregungswellen aus [Ger72, Mal72, Mal75, Fra81, Fra91, Orl85, Wu95a]. Experimente mit PDE-Nullmutanten zeigen, dass diese nur in Anwesenheit von Wildtypzellen aggregieren können [Suc97]. In der Modellvorstellung zum Mechanismus der Symmetriebrechung räumlicher Muster von Palsson et al. (1997) kommt dem PDI eine besondere Bedeutung bei der Erzeugung notwendiger räumlicher Inhomogenitäten zu [Pal96, Pal97].

Im Inneren der Zelle führt die Akkumulation von cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) [DG84], der eine essentielle Rolle bei der Geninduktion zukommt [Ots88, Ira03, Mae04]. In Abwesenheit ihrer katalytischen Untereinheit werden die Gene einer Reihe wichtiger Elemente des chemotaktischen Apparates, einschließlich von ACA, PDE und cAR1, nicht transkribiert [Man92, Wu95b]. Die PKA kann also als zentrales und vermittelndes Element, der pulsinduzierten Transkription verstanden werden.¹ Das Protein ist ein Dimer aus einer regulatorischen (PKA-R) und einer katalytischen Untereinheit (PKA-C). Die regulatorische Untereinheit bindet mit hoher Affinität cAMP, dissoziiert von der katalytischen Untereinheit, die dadurch aktiviert wird. Dieser Vorgang ist reversibel und von der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängig [Par85]. Zellen mit inaktivierter PKA-R [Abe83a, Abe83b, Sim92] oder mit konstitutiv aktiver PKA-C [Anj92, Man92] entwickeln sich unverhältnismäßig schnell, was für eine regulative Rolle der zeitlichen Entwicklung durch die PKA hinweist [Wan97].

Eine bedeutende Rolle bei der Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration – und damit der durch die PKA vermittelten Genregulation – spielt die MAP-(Mitogen Activated Protein)-Kinase Erk2 [Seg95, Mae04]. Erk2 wird nach der Bindung von cAMP an cAR1 instantan durch reversible Phosphorylierung aktiviert. Erk2 reguliert die cAMP-Degradation durch Inhibition der intrazellulären Phosphodiesterase RegA [Sha98]. Ohne Erk2 kommt es zu keiner intrazellulären cAMP-Akkumulation, die für die Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA von Bedeutung ist.

Sawai et al. (2005) prägten den Begriff der „Autoregulation der Erregbarkeit“. Die Erregbarkeit einer Zelle wird von zwei Faktoren bestimmt: Zum einen von ihrer Sensitivität gegenüber cAMP, die durch die Expression von cAR1 während der Aggregation ansteigt, zum anderen von der Aktivität ihrer AC, welche die cAMP-Produktion katalysiert [Saw05]. Die Bildung der dabei entscheidenden Elemente der Signaltransduktion wie cAR1 und AC werden durch Pulse extrazellulären cAMP unter Vermittlung der PKA durch Akkumulation von cAMP in der Zelle induziert [Ira03].

¹ Neben dieser pulsinduzierten Transkription gibt es ebenfalls eine puls-unabhängige Transkription essentieller Komponenten der Chemotaxis und der Signaltransduktion, die in theoretischen Modellen der Musterbildung oft als pulsunabhängige und linear ansteigende Erregbarkeit unterschieden werden (z.B. [Lev96]).

Sawai et al. (2005) untersuchten die Fähigkeit, periodische Signale zu generieren, und die Eigenschaften der Musterbildung von *Knockout*- und überexprimierten Mutanten in den Elementen der Signaltransduktion des in Abbildung 2.12 dargestellten cAMP-PKA-Signalweges und übersetzten die Funktionen und Verknüpfung der Komponenten in Rückkopplungsstärke der Autokatalyse. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass Zellen mit eingeschränkter oder fehlender Kopplung der AC-vermittelten Signaltransduktion zur Genexpression via PKA in der Lage sind, periodische Signale zu erzeugen, jedoch in keinem Fall kohärente langreichweitige Spiralmuster hervorbringen können. Die periodische cAMP-Produktion kann auf einen Mechanismus im Sinne eines einfachen Aktivator-Inhibitor-Modells reduziert werden (extrazelluläre Rückkopplungsschleife), nicht jedoch die Entstehung hinreichend großer Einzugsbereiche der Aggregationszentren, die letztlich das Überleben von *Dictyostelium* sichern. Die Größe der Aggregationszentren wird durch eine pulsinduzierte Evolution der Erregbarkeit via Erk2, RegA und PKA optimiert (intrazelluläre Rückkopplungsschleife). Modellrechnungen zeigen, dass nur eine mittlere Kopplungsstärke langreichweitige Spiralwellen hervorbringen kann [Saw05]. Die Geometrie der Wellen wird durch den Mechanismus, mit dem die Erregbarkeit evolviert, vom System selbst determiniert. Dies entspricht einer genetischen Rückkopplungsschleife auf Zellebene, die spontane Symmetriebrechungen auf der makroskopischen Ebene der Muster hervorbringen und regulieren kann.

2.2.4 Martiel-Goldbeter-Modell

1987 veröffentlichten Martiel & Goldbeter ein biochemisch motiviertes Modell zur Beschreibung der cAMP-Dynamik bei *Dictyostelium* [Mar87]. Das sogenannte Martiel-Goldbeter-Modell basiert auf dem Wechsel zweier interkonvertibler Formen der membranständigen cAMP-Rezeptoren und der positiven Kopplung zur autokatalytischen cAMP-Synthese durch die intrazelluläre AC. Die elementaren Komponenten des Reaktionsmechanismus sind in Abbildung 2.13 dargestellt.

Bindet cAMP an die aktive *R*-Form des Rezeptors, so aktiviert der entstandene cAMP-Rezeptor-Komplex die intrazelluläre cAMP-Synthese durch die AC (*C* in Abb. 2.13). Das autokatalytisch entstandene cAMP verlässt die Zelle, was zur Erhöhung der cAMP-Konzentration im Extrazellulärraum führt. Hier hydrolysieren die membranständige und die extrazelluläre PDE das cAMP zu 5'-AMP [Din80a]. Im Inneren der Zelle erfolgt die Regulation der cAMP-Konzentration durch eine intrazelluläre PDE.

Die *D*-Form des Rezeptors weist eine niedrige Affinität zum cAMP-Molekül auf. Die Bindung von cAMP an diesen desensitivierten Rezeptor führt dabei nicht zur Aktivierung der AC. Die Annahme einer inaktiven Rezeptorform ohne funktionale Kopplung zur AC entspricht experimentell untermauerten Erkenntnissen [LH82, Dev85, Kle85a]. Ebenso leiten sich die Übergänge zwischen der aktiven *R*- und desensitivierten *D*-Form der Rezeptoren ($R \rightleftharpoons D$) von beobachteten kovalenten Rezeptormodifikationen ab [Dev85, Kle85c]. Tatsächlich lassen sich bei *Dictyostelium* periodische Wechsel zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten Zuständen der Rezeptoren beobachten [Dev85, Kle85a, Kle85c].

Numerische Analysen zeigen, dass das Modell alle wesentlichen qualitativen Aspekte der

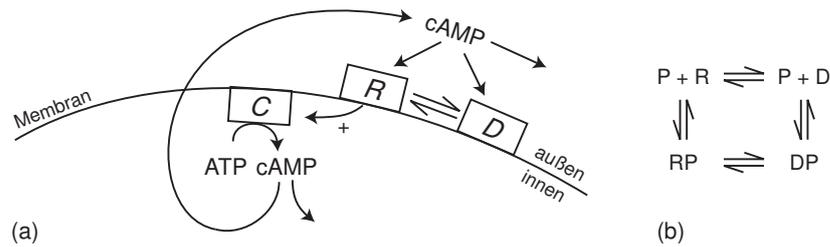


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der cAMP-Signaltransduktion nach Martiel & Goldbeter (1997) (a) und mögliche Übergänge zwischen der R - und D -Konformation des Rezeptors in Gegenwart von extrazellulärem cAMP (P ; (b)). Das Modell basiert auf der Desensitivierung der membranständigen cAMP-Rezeptoren und beinhaltet die autokatalytische cAMP-Synthese durch die intrazelluläre AC (C). Die Bindung von cAMP an die aktive Form des Rezeptors (R) führt zur Aktivierung der AC und zur cAMP-Synthese. Ein Teil des cAMP gelangt nach außen. Die Abbildung stammt in ihrer ursprünglichen Form aus [Mar87].

Musterbildung bei *Dictyostelium* angemessen erfasst. Die Regulation der AC [Roo75, Sha75] durch die Kombination einer aktivierenden und reaktionslimitierenden Rezeptorphosphorylierung ist dabei für die beiden experimentell beobachteten dynamischen Zustände, die autonome cAMP-Oszillation [Ger74, Ger79, Ger75b, VH92] und die Amplifikation überschwelliger cAMP-Pulse (Erregbarkeit) von elementarer Wichtigkeit. Ebenso geht ein mit der Rezeptormodifikation korrelierter Übergang zwischen einer absoluten und einer relativen Refraktärphase aus dem Modell hervor. Des Weiteren wird das im Experiment beobachtete adaptive Verhalten bei kontinuierlicher cAMP-Stimulation [Kle85c, Kle85b] reproduziert.

Die Verzahnung aktivierender und inhibierender Reaktionen, die durch elf kinetische Reaktionsschritte formuliert werden kann, wurde von Martiel & Goldbeter in ein System gekoppelter gewöhnlicher Differentialgleichungen übersetzt, das sich in einem ersten Schritt auf neun unabhängige Variablen reduzieren lässt. Eine zulässige Umwandlung weiterer dynamischer Variablen in Modellparameter führt schließlich auf ein System aus drei nicht-linearen Ratengleichungen (die Details der Reduktionsschritte, ebenso wie alle zugrundeliegenden Geschwindigkeitskonstanten und Modellparameter, finden sich in [Mar87]):¹

$$\begin{array}{rcl}
 d\rho_T/dt & = & -f_1(\gamma)\rho_T \quad + \quad f_2(\gamma)(1 - \rho_T) \\
 \text{aktive Rezeptoren} & & \text{Rezeptor-} \\
 & & \text{phosphorylierung} \quad \quad \quad \text{Rezeptor-} \\
 & & & & \text{dephosphorylierung}
 \end{array} \tag{2.5}$$

¹ Viele zeitliche Aspekte der Systemdynamik bei *Dictyostelium* können für bestimmte Parameterbereiche bereits mit einem Zwei-Variablen-Modell (extrazelluläre cAMP-Konzentration (γ) und Änderungsrate aktiver Rezeptoren (ρ)) angemessen reproduziert werden. Im folgenden wurde die Notation aus [Mar87] beibehalten; insbesondere wird die Funktion Φ immer noch mit expliziter Abhängigkeit der ursprünglichen dynamischen Variablen α , der intrazellulären ATP-Konzentration, aufgeführt.

$$d\beta/dt = q\sigma\Phi(\rho_T, \gamma, \alpha) - (k_i + k_t)\beta \quad (2.6)$$

intrazell.[cAMP] cAMP-Synthese intrazell. Degradation u.
cAMP-Sekretion

$$d\gamma/dt = (k_t\beta/h) - k_e\gamma \quad (2.7)$$

extrazell.[cAMP] cAMP- extrazell.
Sekretion Degradation

mit den phänomenologischen und sich aus den Schritten der Dimensionsreduktion ergebenden Parametrisierungen der nichtlinearen Wechselwirkungen:

$$f_1(\gamma) = \frac{k_1 + k_2\gamma}{1 + \gamma}; \quad f_2(\gamma) = \frac{k_1L_1 + k_2L_2c\gamma}{1 + c\gamma}$$

$$\Phi(\rho_T, \gamma, \alpha) = \frac{\alpha(\lambda\Theta + \epsilon Y^2)}{1 + \alpha\Theta + \epsilon Y^2(1 + \alpha)}; \quad Y = \frac{\rho_T\gamma}{1 + \gamma}.$$

Dabei entspricht ρ_T der Änderungsrate der aktiven Rezeptoren (also der *R*-Form) und wird auch als langsame autonome Variable bezeichnet (Gl. (2.5)). Die Rate der Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration wird durch β (Gl. (2.6)), die der extrazellulären cAMP-Konzentration durch γ (schnelle autonome Variable, Gl. (2.7)) repräsentiert. Die Sättigungsfunktion der Rezeptoren Y beschreibt die Bindungsdynamik von cAMP an die Rezeptoren im *R*- und *D*-Zustand. Die Größe c ist die relative Affinität der beiden Rezeptortypen gegenüber cAMP.

Neben den qualitativen Aspekten der Musterbildung bei *Dictyostelium* (Oszillationen, Erregbarkeit, Adaptation) erklären die numerischen Ergebnisse auch wesentliche quantitativen Beobachtungen.

Die entscheidende Erweiterung des Martiel-Goldbeter-Modells wurde 1989 durch Tyson & Murray [Tys89] eingeführt. Die nichtlinearen gewöhnlichen Differentialgleichungen des ursprünglichen Modells wurden durch Hinzufügen eines Diffusionsterms für die Variable γ in Gleichung (2.7) ($D\nabla^2\gamma$; vgl. Abschn. 2.1.1) in partielle Differentialgleichungen überführt, die dann ein Modell für raumzeitliche Musterbildung darstellen. Die raumzeitliche Verteilung der externen cAMP-Konzentration zeigt dabei unter bestimmten Bedingungen konzentrische Targetwellen und rotierende Spiralen ähnlich den Mustern experimenteller Beobachtungen. Das erweiterte Martiel-Goldbeter-Modell [Mar87, Tys89] gilt seither als Standardmodell für die Musterbildung von *Dictyostelium*. Es hat dabei im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Erweiterungen und Modifikationen erfahren (siehe z.B. [Lev91, Tan94, Bre95, Höf95, Höf97, vO96, Pal96, Bre97, Lau97, Pal97, Hal98, Gol04, Pol05]).

2.3 Neuere Forschungsfragen zur Musterbildung bei *Dictyostelium*

2.3.1 Musterbildung bei *Dictyostelium* zwischen Biophysik und Systembiologie

Es ist auffällig, dass gerade *Dictyostelium* als Modellsystem biologischer Musterbildung auf sehr vielen Ebenen einen Dialog zwischen Theorie und Experiment hervorgebracht hat. Neben dem qualitativen Nachbilden der beobachteten Muster durch mathematische Modelle lassen sich vor allem zwei Schwerpunkte theoretischer Arbeiten ausmachen. Zum einen wurde versucht, die beobachteten Mustereigenschaften – und vor allem die beobachteten Übergänge zwischen den Mustertypen – auf physikalische Prinzipien zurückzuführen (etwa die Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation und die frequenzabhängige Geschwindigkeit durch die Dispersionsrelation (vgl. Abschn. 2.1.2; [Sie89, Foe90b]) oder das Aufbrechen der Wellenfronten in Aggregationspfade durch eine dynamische Instabilität (vgl. Abschn. 2.2.1; [Höf95]). Zum anderen war es das Ziel, Kenngrößen der Muster durch biologische Eigenschaften des Systems zu erklären.

Mitte der 1990er Jahre wurde sehr intensiv die Frage untersucht, wie sich aus einer homogenen Zellschicht ein quasi-stationäres Muster stabiler Spiralen etablieren kann. Besonders interessante Hypothesen sind die Konkurrenz von Targetwellen und Spiralwellen [Lee96], die Annahme der Desynchronisation der Zellen entlang eines Entwicklungspfad [Lau97, Hal98] und die Etablierung räumlicher Heterogenität durch die Dynamik einer wichtigen biochemischen Komponente, dem Phosphodiesterase-Inhibitor (PDI; Abb. 2.14; [Pal96, Pal97]).

Im Fall der Konkurrenz von Targetwellen und Spiralwellen führt eine Frequenzabschätzung (bei der die Feuerrate autonomer Pacemakerzellen mit der durch die Refraktärzeit geprägten Umlauffrequenz von Spiralen verglichen wird) auf die Etablierung eines Spiralmusters [Win72, Lee96, Lee01]. Der Entwicklungspfad nach Lauzeral et al. (1997) nimmt im wesentlichen eine systematische Drift zweier Modellparameter (für die Synthese und die Degradation von cAMP) an, die das System sukzessive durch die dynamischen Regime (stationär, erregbar, oszillatorisch, erregbar) führt (Abschn. 2.3.2; [Lau97]). Im Fall der PDI-Dynamik nach Palsson et al. (1997) entsteht die für ein stabiles Spiralwellenmuster nötige Heterogenität durch die unterschiedlichen Zeitskalen von PDI-Produktion durch die Zellen (was durch die damit einhergehende Inhibition der PDE lokal zur Erhöhung der cAMP-Konzentration führt) und dessen räumlicher Diffusion [Pal97].

Die beiden letzten Ansätze zur Entwicklung von Spiralmustern bei *Dictyostelium* werden auch heute noch kontrovers diskutiert. Während Lauzeral et al. (1997) die Bildung von Spiralwellen auf die Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungspfad zurückführen, wird bei Palsson et al. (1997) die globale und lokale Erregbarkeit des Mediums vor Etablierung der Muster durch die Produktion und Diffusion von PDI verändert.

Die durch Target- und Spiralwellen charakterisierte Musterbildung von *Dictyostelium* wird oft mit der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion verglichen, die als rein chemisches System ein ähnliches Repertoire an Mustern aufweist (siehe Abb. 1.1). Tatsächlich ist dieser Vergleich eines chemischen und eines biologischen Systems der Musterbildung äußerst produktiv. Am Beispiel der Arbeit von Sawai et al. (2005) wird dies deutlich [Saw05]. Im Gegensatz

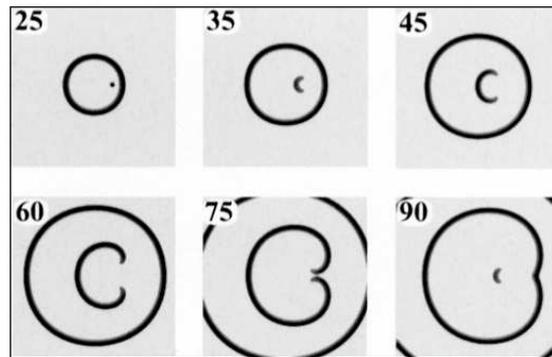


Abbildung 2.14: Entstehung einer Doppelspirale im Modell von Palsson & Cox (1996) durch das Auftreten eines cAMP-Pulses hinter einer Wellenfront. Zufälligen cAMP-Pulse werden durch stochastische raumzeitliche Änderungen eines regulatorischen Elements der externen cAMP-Konzentration, dem Phosphodiesterase-Inhibitor PDI verursacht. Durch die Asymmetrie in der räumlichen Verteilung der Refraktärphase kann sich die Erregungswelle nur in eine Richtung ausbreiten. Die entstehenden Wellenenden rollen sich zu gegenläufigen Spiralen ein. Die Abbildungsnummern entsprechen Rechenschritten. Die Abbildung stammt aus [Pal96].

zum chemischen System hat die Musterbildung bei *Dictyostelium* (und tatsächlich auch in vielen anderen zur Musterbildung fähigen biologischen Systemen) eine Funktion für den Organismus [Lev04]. Daher können bestimmte Kenngrößen der Muster für den Organismus mehr oder weniger vorteilhaft sein. Wenn aber mit den Eigenschaften der Muster ein Selektionsvorteil verbunden ist, so ist es wahrscheinlich, dass das biologische System (im Gegensatz zum chemischen System) regulatorische Möglichkeiten besitzt, um auf die Eigenschaften der Muster Einfluss zu nehmen. Sawai et al. (2005) führen dies im Detail vor: Die Dichte von Spiralwellen (und damit die typische Größe einer quasi-stationären Spiralstruktur) legt den Einzugsbereich eines Aggregationszentrums und damit im wesentlichen auch die Zellzahl des späteren multizellulären Aggregats fest. Im Sinne des oben skizzierten Arguments ist es daher wahrscheinlich, dass einzelne Zellen Mechanismen evolviert haben, die diesen wichtigen Parameter, die Dichte der Spiralwellen, indirekt regulieren und so Einfluss auf das spätere Entwicklungsstadium nehmen können. Sawai et al. (2005) können diese regulatorische Fähigkeit der einzelnen Zelle mit der Rückkopplungsstärke des periodischen cAMP-Signals auf die Genexpression in Verbindung bringen, indem sie zeigen, dass Mutanten mit höherer und niedrigerer Rückkopplungsstärke auf die pulsinduzierte Genexpression jeweils höhere Dichten von Spiralwellen (und damit kleinere Einzugsbereiche für jedes Aggregationszentrum) im Vergleich zum Wildtyp besitzen [Saw05]. In vergleichbarer Weise lässt sich auch für die Überlegenheit von Spiralwellen gegenüber Targetwellen in diesem System argumentieren [Pal97, Geb09b]. Konzentrische Targetwellen entstehen, wenn einzelne Zellen oder Zellgruppen periodische cAMP-Signale emittieren. Diese Zellen fungieren als Pacemaker. Spiralen dagegen entstehen durch Symmetriebruch dieser konzentrischen Wellen. Nach ihrer Entstehung benötigen sie keine weitere

periodische Aktivität. Die Spitze einer Spirale rotiert kontinuierlich um ein Spiralzentrum. Da Spiralwellen durch die Regeneration der Zellen nach einem Umlauf der Anregung um das Spiralzentrum selbsterhaltend sind, während Targetwellen eine bleibende Pacemaker-Aktivität im Zentrum erfordern, ist eine auf Spiralwellen basierende Musterbildung (und damit auch die nachfolgende Aggregation) wesentlich robuster als eine über Targetwellen koordinierte Aggregation der Zellen.

Jenseits der qualitativen Betrachtung raumzeitlicher Muster oder der Analyse der Muster mit Hilfe von Methoden der Bildverarbeitung stellt das Extrahieren physikalischer Parameter (Propagationsgeschwindigkeiten, Dispersionskoeffizienten, Rückkopplungsstärken, etc.) eine interessante Strategie dar, Verbindungen zwischen Regulationsprinzipien auf der zellulären Ebene und selbstorganisierten Strukturen herzustellen. Die beobachtbaren Muster werden so zu Datensätzen, die Aufschluss über molekulare Prozesse geben, etwa essentielle Komponenten in den intrazellulären Signalkaskaden. Dieses Arbeitsprinzip, mit biophysikalischen Methoden makroskopische Beobachtungen (auf der Ebene der Muster) in Eigenschaften der zellulären Kommunikation und der intrazellulären Signalverarbeitung zu übersetzen, ist seit vielen Jahren etabliert und hat zu Einsichten über die biologische Funktionsweise von *Dictyostelium* geführt. Beispiele für solche Untersuchungen sind: cAMP-Affinität der Rezeptoren [Dor01b], die Spiraldichten in Abhängigkeit der Rückkopplungsstärke zur Genexpression [Saw05], die Hypothese eines Entwicklungspfades [Lau97], zelluläre Erregbarkeit als unabhängiger Freiheitsgrad des Systems [Lev91, Lev96], Variation der Erregbarkeit durch Zugabe von Koffein [Sie91], Reproduzierbarkeit der chemotaktischen Antwort von Zellen [Sam06] und Vorhersagbarkeit bestimmter statistischer Eigenschaften von Mustern aus der räumlichen Verteilung zellulärer Parameter (biologische Variabilität; [Geb08, Geb09c]).

In einem Hybrid-Modell von Levine et al. (1996), welches die cAMP-Produktion und die Zellbewegung beinhaltet, wird die Bildung von Spiralwellen durch die positive Rückkopplung des cAMP-Signals auf die Erregbarkeit des Systems (Anstieg der Erregbarkeit in Abhängigkeit der cAMP-Wellen) begünstigt [Lev96]. Dabei wird die Erregbarkeit als dynamische Variable betrachtet, die graduell anwächst. Dallon & Othmer (1997) zeigen, dass die Variation der lokalen Zelldichte durch Chemotaxis in Anwesenheit von Pacemakern die Bildung von Spiralen fördert [Dal97].

Gerade die Arbeiten von Samadani et al. (2006) und Geberth & Hütt (2008, 2009) ebnen den Weg zu einem Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung, nämlich der Rolle von Variabilität in der Musterbildung [Sam06, Geb08, Geb09c]. Samadani et al. (2006) zeigen, dass in Stimulationsexperimenten die Fähigkeit von Zellen (innerhalb einer genetisch identischen Gruppe), auf räumliche cAMP-Gradienten zu reagieren, äußerst variabel ist. Im Gegensatz dazu ist die Reaktion einzelner Zellen auf eine periodische Stimulation mit cAMP verhältnismäßig individuell und zeitlich konstant. Die zeitliche Varianz in der Antwort individueller Zellen ist also deutlich geringer als die Varianz der Antwort innerhalb einer Zellgruppe. Geberth & Hütt (2008) haben das *Dictyostelium*-Modell aus Levine et al. (1996) und Sawai et al. (2005) verwendet, um die Korrelation zwischen Zellegenschaften (in diesem Fall die spontane Aktivität einer Zelle) und Mustereigenschaften

(die Verteilung von Spiralwellen) zu analysieren [Lev91, Lev96, Saw05, Geb08]. Schon die frühen Arbeiten von Lauzeral et al. (1997) und Palsson et al. (1997) identifizieren biologische Variabilität, also die räumliche Verteilung von Zelleigenschaften (die im Gegensatz zu Rauschen und Fluktuationen aber zeitlich konstant sind oder sich nur sehr langsam ändern), als eine treibende Kraft der Musterbildung, obwohl beiden Modellen fundamental andere biologische Annahmen zugrunde liegen [Lau97, Pal97]. Dort ist das Ziel, die Bereitstellung einer zur Spiralentstehung hinreichenden Menge räumlicher Heterogenität in der Zellpopulation zu erklären. Im folgenden Abschnitt wird die von Lauzeral et al. (1997) entwickelte Modellvorstellung zur Bildung von Spiralmustern bei *Dictyostelium* genauer betrachtet.

2.3.2 Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungspfades

Das von Lauzeral et al. (1997) vorgeschlagene Szenario, welches zur spontanen Entstehung von Spiralmustern in einem modifizierten Martiel-Goldbeter-Modell [Mar87, Gol96] führt, unterscheidet sich von allen anderen Ansätzen durch die Kombination zeitlicher Evolution dynamischer Eigenschaften des Systems mit räumlicher Heterogenität auf Zellebene [Lau97].¹ Dem physiologischen Mechanismus, der ausschließlich auf Zelleigenschaften beruht, liegt eine kontinuierliche Entwicklung entscheidender Parameter des Signalsystems zugrunde [Kle75, Kle76, Loo79]. Dieser Entwicklungspfad führt das System sukzessive durch verschiedene dynamische Regime. Anhand des Modells zeigen die Autoren, dass gerade die kontinuierliche Erhöhung der maximalen Aktivität der cAMP-synthetisierenden intrazellulären AC und der Rate der cAMP-degradierenden extrazellulären PDE nach dem Nahrungsentzug [Kle75, Kle76, Loo79] für diese dynamischen Übergänge verantwortlich ist. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Entwicklung bei *Dictyostelium* wurden bereits in Abschnitt 2.2.3 eingeführt (siehe auch Abb. 2.12; [Gol80, Gol88]).

Das Stabilitätsdiagramm in Abbildung 2.15(a) zeigt die Möglichkeiten der zeitlichen Änderung der Aktivität der beiden Enzyme AC und PDE im $AC(\sigma)$ - $PDE(k_e)$ -Parameterraum, denn gerade die Art der Variation der Parameterwerte hat nun ganz entscheidende Effekte auf die hervorgehenden Muster. Die Pfeile markieren einige mögliche Pfade des Systems durch den Parameterraum.

Die Konstruktion von Entwicklungspfaden, die nicht dem dynamischen Wechsel zwischen nichterregbar-erregbar-oszillatorisch-erregbar ($S \rightarrow E \rightarrow O \rightarrow E$) folgen, (also Pfad 1 und Pfad 2) führen nicht oder zumindest nicht befriedigend zur spontanen Entstehung stabiler Spiralmuster. Nur Pfad 3, so zeigt Lauzeral et al. (1997), leitet das System im Verlauf vom nichterregbaren Stadium zu Beginn der Entwicklung, über den erregbaren Zustand, in welchem das cAMP-Signal detektiert und amplifiziert wird, in den Bereich autonomer Oszillationen, bevor es schließlich in den erregbaren Zustand zurückgelangt [Lau97]. In Abbildung 2.15(b) ist die in Lauzeral et al. (1997) angenommene sigmoidale Aktivitätsänderung beider Parameter auf Pfad 3 als Funktion der Zeit dargestellt. Die

¹ Das Gleichungssystem aus Lauzeral et al. (1997) findet sich im Anhang dieser Arbeit.

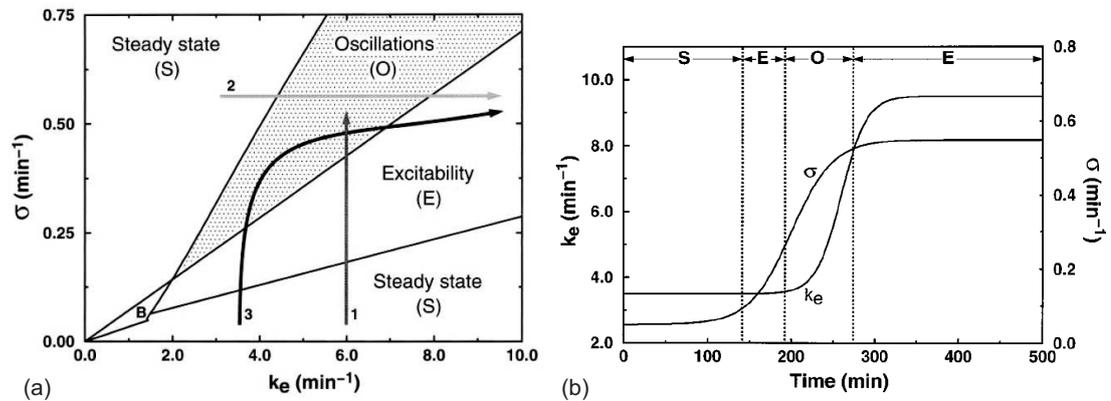


Abbildung 2.15: Dynamische Regime im AC (σ)-PDE(k_e)-Parameterraum (a) und simultaner sigmoidaler Anstieg der beider Modellparameter auf Entwicklungspfad 3 (b). In (a) zeigen die Pfeile mögliche Entwicklungspfade in Abhängigkeit der Variation der Enzymaktivitäten nach dem Entzug der Nahrungsquelle, auf welchen die Elemente des Systems den Parameterraum durchschreiten können; (stabiler nichterregbarer stationärer Zustand (S), Erregbarkeit (E) und Regime autonomer cAMP-Oszillationen (O); für den bistabilen Bereich koexistierender stabiler stationärer Zustände (B) existiert keine experimentelle Evidenz). Pfad 1 entspricht einer Entwicklung bei gleichbleibender Ratenkonstante der PDE. Die Elemente gelangen vom stationären, in den erregbaren und dann in den oszillatorischen Zustand ($S \rightarrow E \rightarrow O$). Bei Pfad 2 bleibt die Aktivität der AC konstant. Die Elemente gehen von stationären Zustand direkt in das oszillatorische Regime und dann in den Bereich der Erregbarkeit über ($S \rightarrow O \rightarrow E$). Auf Pfad 3 werden die Zustände S, E, O sukzessiv durchlaufen, bevor das System erneut in das erregbare Regime (E) zurückkehrt. In (b) erfolgt die Aktivitätsänderung der PDE zeitlich verzögert zur Evolution der AC entsprechend experimenteller Befunde [Loo79]. Beide Abbildungen stammen aus [Lau97].

Entwicklung der PDE erfolgt zeitlich verzögert zur Entwicklung der AC [Loo79]. Das sequentielle Durchlaufen der dynamischen Übergänge alleine (bei beispielsweise anfangs zufälliger Verteilung von σ - und k_e -Wertepaaren und homogener zeitlicher Änderung beider Parameter) bringt zunächst keine stabilen Spiralmuster hervor. Erst die Kombination des evolvierenden Systems mit der Einführung einer zellulären Heterogenität im Sinne einer Verteilung der einzelnen Zellen entlang des enzymatischen Entwicklungspfades 3 aus Abbildung 2.15(a) induziert, ganz ohne Beitrag weiterer externer Störungen, die Bildung von Spiralmustern.

Die Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungspfades liegt in der Annahme begründet, dass zum Zeitpunkt des Nahrungsentzugs, der die Entwicklung initiiert, nicht alle Zellen gleichzeitig ihre Entwicklung beginnen und damit auch nicht gleichzeitig ihre Kompetenz zur Detektion und Amplifikation des cAMP-Signals oder die Fähigkeit zu autonomen Oszillationen erlangen [McD84, McD86, Gom87]. Diese biochemische Heterogenität bildet, so die plausible Vermutung, eigentlich die Phasenverteilung der individuellen Zellzyklen zum Zeitpunkt des Nahrungsentzugs ab.

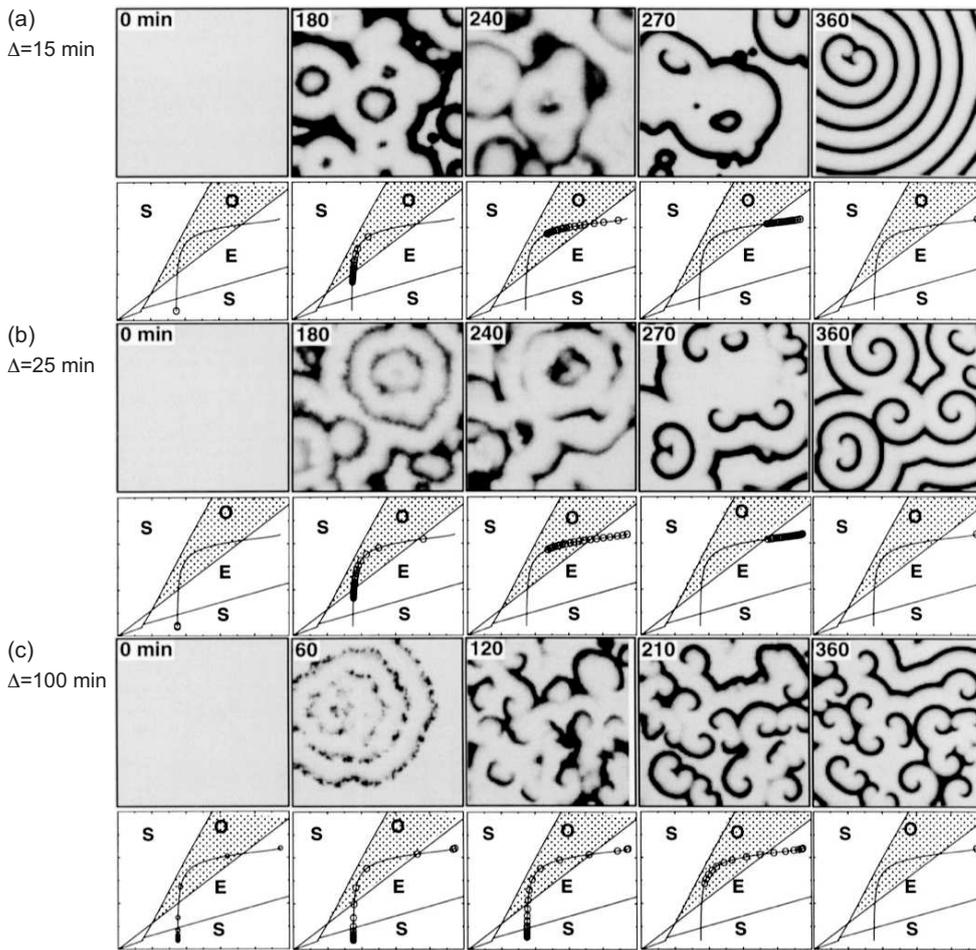


Abbildung 2.16: Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungspfad 3. Die obere Reihe jeder Unterabbildung zeigt die räumliche Verteilung der extrazellulären cAMP-Konzentration, die untere Reihe die Verteilung der Zellen (ein Kreis entspricht 5% der Gesamtzahl aller Zellen) entlang Pfad 3 im (σ, k_e) -Parameterraum zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Mit wachsendem Δ nimmt die Größe der Einzugsgebiete einzelner Spiralen ab. Die Abbildungen wurde aus Halloy et al. (1998) [Hal98] entnommen.

Diese zelluläre Heterogenität folgt im Modell einer exponentiellen Wahrscheinlichkeitsverteilung. Dadurch wird gewährleistet, dass ein kleiner Anteil der Zellen vor der Entstehung stabiler Strukturen deutlich weiterentwickelt ist als der Rest der Zellen. Pacemakerregionen sind interessanter Weise nicht die Zellen, die als erste das Regime der autonomen Oszillationen entlang des Entwicklungspfad in einer heterogenen Umgebung aus erregbaren Zellen und Zellen des stationären Zustands erreicht haben, wie die Autoren vermuteten, sondern die Zellen die im oszillatorischen Regime sind, wenn die letzten Zellen in das exzitatorische Regim eingetreten sind und damit das Medium für die Weiterlei-

tung des cAMP-Signals vorbereitet ist [Geb09c]. Durch die vom System selbst induzierte räumliche und zeitliche Heterogenität der Refraktärzeiten (und damit der Oszillationsfrequenzen) wird die Propagation der Wellenfronten konzentrischer Targetwellen gestört und die Bildung von Spiralen durch Einwickeln offener Wellenfragmente erheblich gefördert. Die asymptotischen Werte der Parameter des Systems entsprechen dabei einer Rückkehr in den erregbaren Zustand, was als Voraussetzung für die Symmetriebrechung und die Stabilisierung der Spiralmuster angesehen wird.

Der Grad der Desynchronisation wird durch den Modellparameter Δ repräsentiert. Je höher Δ ist, um so heterogener ist die anfängliche Verteilung der Zellen entlang des Entwicklungspfades. $\Delta = 0$ entspricht einer sich synchron entwickelnden Population. Abbildung 2.16 zeigt zeitliche Sequenzen der räumlichen cAMP-Konzentration in Abhängigkeit der progressiven Evolution der beiden biochemischen Parameter σ und k_e und die zu jedem dargestellten Zeitpunkt gehörende Verteilung der Zellen entlang des Entwicklungspfades 3. Eine verhältnismäßig starke Desynchronisation der Zellen (Abb. 2.16(c); $\Delta = 100$ min) bringt dabei eine größere Anzahl kleiner Spiralen, eine schwache Desynchronisation (Abb. 2.16(a); $\Delta = 15$ min) nur wenige große Spiralwellen und eine Tendenz zu Targetwellen hervor [Lau97, Hal98]. Ein mittlerer Grad der Desynchronisation erzeugt Spiralmuster, welche in ihren wesentlichen, vor allem auch zeitlichen Merkmalen, der Musterbildung von *Dictyostelium* entsprechen (Abb. 2.16(b); $\Delta = 25$ min). enen dynamischen Entwicklungszuständen des Signalsystems: I. \rightarrow nichterregbarer, Zustand (stabiler stationärer Zustand), II. \rightarrow erregbares Stadium (stabiler stationärer Zustand), III. \rightarrow oszillatorisches Regime (instabiler stationärer Zustand). In (a) markieren die gestrichelten Linien das durch eine Störung hervorgerufene Verhalten des Systems. Nach einer unterschwelligen Störung gelangt das System schnell wieder in den stationären Zustand (Region 1). Ist die Störung überschwellig (treibt also das System in γ -Richtung über den absteigenden Kurvenbereich von $f(\rho, \gamma) = 0$ hinaus), so kommt es zur schnellen cAMP-Produktion (Region 2), gefolgt von einer Refraktärphase (Region 3) und der Erholungsphase (Region 4). Die äußere Trajektorie zeigt das Verhalten des Systems, bei einer Störung im instabilen stationären Zustand (III.). Das System oszilliert autonom, also ohne vorangegangene Störung. In (b) ist die PDI-abhängige Entwicklung des Systems durch den schrittweisen Anstieg der Erregbarkeit im Bereich der Fixpunkte beider Funktionen schematisch dargestellt. Die Kreise entsprechen den Fixpunkten aus (a) (also den Schnittpunkte der Nullcharakteristiken). Die Abbildung stammt aus Palsson et al. (1996) [Pal96].

2.4 Zielsetzung und Ergebnisse dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Funktion biologischer Variabilität auf die Musterbildung von *Dictyostelium*. Dahinter verbirgt sich die Hypothese, dass die Erregungsmuster durch individuelle und zeitlich konstante Eigenschaften der Zellen geprägt werden, und dass biologische Variabilität eine regulatorische Funktion in komplexen biologischen Kommunikationsprozessen bewirkt. Abbildung 2.17 stellt die Bedeutung von

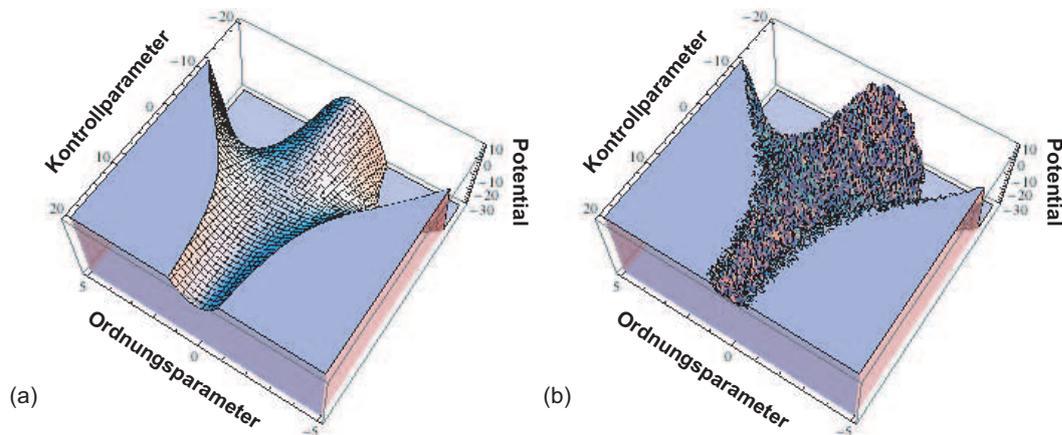


Abbildung 2.17: Potentiellandschaft eines Phasenübergangs zweiter Ordnung. Unter Änderung des Kontrollparameters geht das Minimum (d.h. der stabile Zustand) des Ordnungsparameters (der die verschiedenen Muster des zugrundeliegenden Systems repräsentiert) in zwei koexistierende Minima über. In der Physik (a) wird die Wahl eines der Minima häufig durch lokale Fluktuationen bestimmt, in biologischen Systemen (b) sind die systematischen Unterschiede der Konstituenten (hier als zufällige Modulation der Potentiellandschaft dargestellt, welche im Gegensatz zu Rauschen zeitlich konstant sind) oft groß genug, um ein bestimmtes Minimum tendenziell zu bevorzugen. Das Verhalten des Systems wird also prinzipiell vorhersagbar. Die Abbildung stammt aus [Geb09b].

Variabilität am Beispiel einer Potentiellandschaft eines Phasenübergangs zweiter Ordnung in einem nichtbiologischen System (a) und einem biologischen System (b) schematisch gegenüber. Unter Variation eines Kontrollparameters wird der ursprüngliche Zustand des Systems instabil und es bilden sich zwei gleichberechtigte stabile Zustände aus. Während beispielsweise ein physikalisches System oft nur unter dem Einfluss rein stochastischer Beiträge ein bestimmtes Minimum wählt, können im biologischen System zeitlich stationäre Eigenschaften der Systemkonstituenten dazu führen, dass ein bestimmter Zustand mit höherer Wahrscheinlichkeit eingenommen wird als ein anderer. Das Verhalten des Systems wird also im Prinzip vorhersagbar [Geb09b].

Natürlich ist es einleuchtend, dass die Muster eines deterministischen Systems von der zugrundeliegenden Parameterverteilung determiniert werden müssen. Unter der generellen Vorstellung von Selbstorganisation, bei der lokale Wechselwirkungen der Elemente Strukturen auf einer völlig anderen Größenskala hervorbringen, kann vermutet werden, dass auch in einem nichtdeterministischen (stochastischen) System entsprechende Korrelationen bestehen, welche eine Vorhersagbarkeit bestimmter Aspekte der Muster ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die räumliche Verteilung von Zelleigenschaften mit globalen Mustereigenschaften korreliert. Diese Vorgehensweise stellt einen neuen konzeptionellen Ansatz zur Analyse der Verbindung solcher Muster mit den zugrundeliegenden Regulationsmechanismen dar, da hier regulatorische Prinzipien auf Zellebene mit statistischen Eigenschaften raumzeitlicher Muster in Verbindung gebracht werden. Dies unterscheidet

sich von klassischen Analyseverfahren raumzeitlicher Daten, die oft keine gerichtete Suche nach den lokalen Regeln der Entstehung von Mustern verfolgen. Durch die Darstellung in Abbildung 2.18 soll dies deutlich werden. Üblicherweise impliziert die Analyse eines solchen dargestellten Raumzeitwürfels die hierarchische Unterteilung in dessen Dimensionen. So kann die zeitliche Änderung einer räumlichen Koordinate als Zeitreihe betrachtet und dann in eine Messgröße überführt werden. Die räumliche Anordnung der Messgrößen aller Koordinaten stellt dann die räumliche Verteilung einer bestimmten Observablen dar, die mit Verteilungen anderer experimenteller Bedingungen verglichen werden kann. Dreht man den Raumzeitwürfel, kann man das räumliche Bild eines Zeitpunktes in eine einzelne Observable, zum Beispiel die räumliche Heterogenität überführen und die Prozedur für jeden Zeitpunkt des Datensatzes wiederholen. Daraus ergibt sich die zeitliche Entwicklung dieser Observablen die wiederum denen anderer Experimente gegenübergestellt werden kann [Geb09b].

Das in dieser Arbeit verfolgte Konzept, Mechanismen der Selbstorganisation als Regelwerk aus den Mustern aufzudecken, wurde zunächst auf die simulierten Muster eines erregbaren Systems angewendet. Hier zeigte sich, dass die heterogene Verteilung von Mustereigenschaften (insbesondere von Phasensingularitäten und Pacemakern) eng mit der implementierten räumlichen Verteilung von Signaleigenschaften der Konstituenten (hocherregbare und hochsensitive Elemente) in Zusammenhang steht. Bei den Mustern von *Dictyostelium* fanden sich systematische Zusammenhänge zwischen den Verteilungen raumzeitlicher Fluktuationen dieser Muster vor ihrer Entstehung und den Positionen der Spiralspitzen nach Etablierung der Muster.

Auch die systematische Änderungen raumzeitlicher Muster von *Dictyostelium* und die daraus hervorgehende Änderung der Zell-Zell-Kommunikation unter Variation äußerer Bedingungen wurde untersucht um auf regulatorische Mechanismen des Systems rückzuschließen zu können.

Im Rahmen dieser Analysen sollte gezeigt werden:

1. dass räumliche Symmetrie in ausgedehnten biologischen Systemen über biologische Variabilität gesteuert wird.
2. dass sich durch die Analyse der biologischen Variabilität im Anfangszustand des Systems (vor der Symmetriebrechung) im Prinzip zentrale Eigenschaften der Muster (nach der Symmetriebrechung) vorhersagen lassen können.

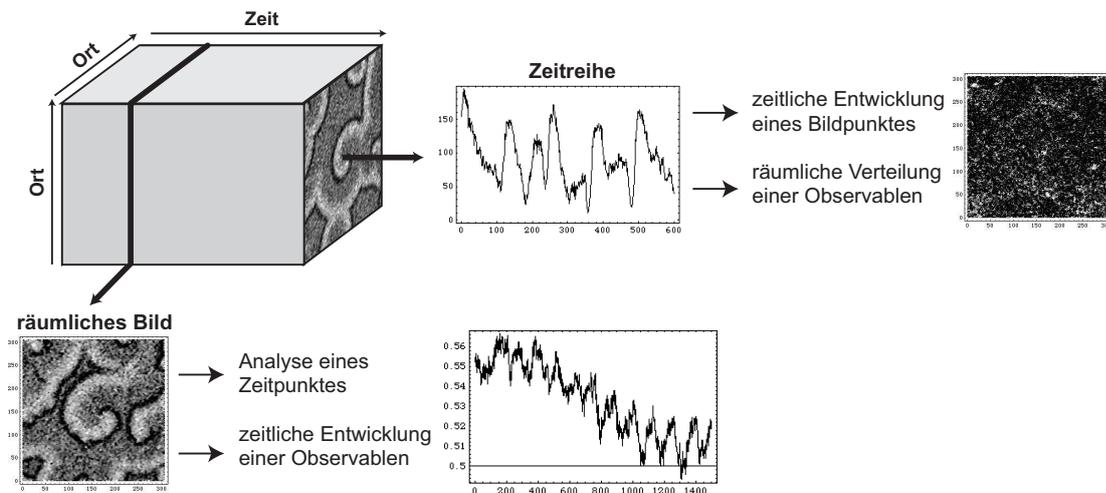


Abbildung 2.18: Klassische Strategien der Analyse raumzeitlicher Datensätze die zur räumlichen Verteilung einer zeitlichen Observablen und zur zeitlichen Entwicklung einer räumlichen Observablen führen. Die Abbildung stammt aus Geberth et al. (2009) [Geb09b].

Folgende Ergebnisse wurden in dieser Arbeit erzielt:

1. Jenseits der cAMP-Rezeptoren hat die Zelle noch weitere Möglichkeiten, ihre Erregbarkeit zu regulieren. Dies wurde aus einer detaillierten Analyse der Musteränderung in Anwesenheit von Koffein und eines Adenosinderivates (IPA) – mit weitestgehend unbekannter Wirkung auf das Signalsystem und die Musterbildung von *Dictyostelium* – abgeleitet [Pol05, Hil08].
2. In Spiralmustern lassen sich lokale Fluktuationen in systematische (über ein gewisses Zeitintervall hinweg korrelierte) Zelleigenschaften übersetzen [Hil07, Geb09b]. Die extrahierten Fluktuationsverteilungen unterscheiden sich in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen systematisch voneinander. Dieser Befund ist ein indirekter Nachweis systematischer Zelleigenschaften in den raumzeitlichen Mustern, der erst kürzlich direkt für individuelle Zellen außerhalb des Kontextes raumzeitlicher Muster geführt werden konnte [Sam06].

3 Methoden

3.1 Medien und Puffer

HL5-Medium

(modifiziert nach Watts & Ashworth (1970); [Wat70])

1,4 % (w/v) Pepton (Oxoid)
0,7 % (w/v) Hefeextrakt (Oxoid)
77,7 mM D-(+)-Glukose (Merck)
8,9 mM Na₂HPO₄ (Fluka)
3,7 mM KH₂PO₄ (Fluka)
134,63 μM Ampicillin-Natriumsalz
(AppliChem) in H₂O bidest.
pH 6,5

Phosphatpuffer (KK2)

1 mM Na₂HPO₄
14,7 mM KH₂PO₄
in H₂O bidest.
pH 6,14

NN-Agar

0,5 % Bacto Agar (Difco)
2 mM Koffein wasserfrei (Fluka)
in KK2

SM-Agar

(modifiziert nach Sussman (1987); [Sus87])

0,33 % Pepton
3,3 mM Na₂HPO₄
2,2 mM KH₂PO₄
1,87 mM D-(+)-Glucose
1,5 % Bacto Agar
in H₂O bidest.
pH 6,5

LB-Agar

1 % Bacto Trypton (Difco)
0,5 % Bacto Malzextrakt (Difco)
1 % NaCl
1,5 % Bacto Agar
in H₂O bidest.
pH 7,4

3.2 Kulturbedingungen

Sämtliche Arbeitsschritte mit Ausnahme der Bereitung von NN-Agar, der Ernte der Zellen zur Musterbeobachtung und der mikroskopischen Untersuchungen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die erforderlichen Medien, Puffer und Gegenstände wurden unter überhitztem Wasserdampf bei 1,1 bar und 121 °C sterilisiert (Sanoclav, Wolf). Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Durchführung bei Raumtemperatur (21 °C). Die Zelldichte flüssiger Kulturen wurde mit Hilfe einer Neubaur-Zählkammer (Neubauer improved)

lichtmikroskopisch (Askania RME 5) bestimmt. Zur Präparation der unterschiedlichen Agarschichten wurde Agar in KK2 durch Erhitzen gelöst. Die Zugabe von Effektoren der Signaltransduktion zum NN-Agar erfolgte während des Abkühlens der Agarlösung bei Temperaturen < 80 °C. Bei den meisten Untersuchungen der Erregungswellen wurden unterteilte Petrischalen (Roth) verwendet, die die parallele Beobachtung der Wellen unter Kontrollbedingungen ermöglichten.

3.2.1 Produktion von Sporenmaterial

Alle experimentellen Untersuchungen wurden mit dem axenischen Zellstamm *Dictyostelium discoideum* AX2 durchgeführt [Wat70]. Um die Verwendung von einheitlichem Ausgangsmaterial gewährleisten zu können, wurden im Vorfeld der Arbeiten verhältnismäßig große Mengen an Sporen aus einer Sporengeneration produziert. Sporen von *Dictyostelium* und einzelne Kolonien von *Escherichia coli* wurden in KK2-Puffer resuspendiert, homogen auf SM-Agarplatten in Polystyrol-Petrischalen (Roth) ausgestrichen und bei 22 °C inkubiert. Dabei spielt die aufgetragene Menge an Sporen und Bakterien eine untergeordnete Rolle, da vor der Sporenenkeimung nach etwa 3 Tagen die Bakterien sich in ausreichender Menge vermehrt hatten, um als Nahrungsgrundlage für *Dictyostelium* dienen zu können. In einem Zeitfenster von wenigen Tagen wurde der entstandene Bakterienrasen von den sich mitotisch vermehrenden Amöben verbraucht. Danach setzte der Entwicklungszyklus ein, welcher in der Ausbildung der Fruchtkörper endete. Von diesen Fruchtkörpern wurden Sporen durch Abklopfen der Agarplatten auf eine sterile Unterlage gewonnen. Die Sporen wurden in KK2-Puffer resuspendiert, auf eine Konzentration von 5×10^6 Sporen/ml eingestellt und zu Einheiten von jeweils 1 ml aliquotiert. Die Lagerung der Sporen erfolgte bei -18 °C. Zur Kultivierung und Lagerung von *E. coli* wurde LB-Agar verwendet. Die Bakterien wurden als Schrägkulturen bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Alternativ zur Produktion von Sporen wurde nach einer geeigneten Möglichkeit gesucht, vegetative Zellen in großen Mengen langfristig lagern zu können. Grundsätzlich gibt es drei gängige Konservierungsmethoden zur dauerhaften Aufbewahrung von *Dictyostelium*, die Lyophilisierung [Rap45], die Verwendung von Silicagel [Per62], und die Kryokonservierung [Lai75], wobei die ersten beiden Methoden auf die Verwendung von Sporen beschränkt bleiben [Sus87].

Zur Kryokonservierung wurden vegetative Zellen in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet, 4 min bei 21 °C und $400 \times g$ zentrifugiert (Avanti J-20, Beckmann), zweimal in KK2-Puffer gewaschen und in frisch vorbereitetem HL5-Medium resuspendiert. Die Zelldichte der Suspension wurde auf 5×10^7 Zellen/ml gebracht. Die anschließende Präparation erfolgte auf Eis. Als Gefrierschutzmittel wurde 9% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid, Roth) hinzugefügt. Nach behutsamem Mischen wurde die Zellsuspension in Gefrierröhrchen (Cryo Tubes, Nunc) zu 1 ml aliquotiert. Der Gefriervorgang erfolgte bei einer Rate von 1 °C/min auf -78 °C in Gefriercontainern (Cryo Freezing Container „Mr.

Frosty“, Nalgene; Befüllung mit 100 % Isopropanol (2-Propanol, Roth)). Das Auftauen der tiefgefrorenen Aliquots geschah zügig im Wasserbad bei 45 °C, um durch Scherkräfte verursachte Schäden an den Zellen möglichst gering zu halten.

Der Anteil an DMSO wurde systematisch variiert. Ebenso wurde der Gefrier- und Auftauvorgang modifiziert, und ein zusätzlicher Waschvorgang in KK2-Puffer nach dem Auftauen zum effektiveren Entfernen des DMSO eingeführt. Keine dieser geschilderten Methoden erbrachte eine zufriedenstellende Ausbeute an teilungsfähigen Zellen, weshalb im folgenden der Bedarf an Ausgangsmaterial ausschließlich durch die Produktion von Sporen auf SM-Agar (Abschn. 3.2.1) gedeckt wurde.

3.2.3 Axenische Kultivierung und Initiation der Musterbildung

Die Anzucht der Zellen erfolgte in flüssigen HL5-Schüttelkulturen. Für jedes Experiment wurde eine frische Kultur mit Sporen beimpft.¹ Dazu wurden 100 ml HL5-Medium in Enghalskolben (Duran, Schott) mit der Sporensuspension (Abschn. 3.2.1) auf eine Sporenkonzentration von 5×10^4 Sporen/ml eingestellt und bei 21 °C und 210 upm in einem Schüttler (Infors Minitron) inkubiert. Unter diesen Bedingungen können erste Zellen aus den gekeimten Sporen nach etwa 2–3 Tagen im Medium beobachtet werden. Nach einer Lag-Phase von 4–5 Tagen nach Beimpfen der Kultur nimmt die Zellzahl bei einer Generationszeit von 7–9 h exponentiell zu, bis die Kultur bei etwa $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml die stationäre Phase erreicht, in welcher die Zellteilungsrate stagniert (Abb. 4.16(a)). Die Ernte der Zellen fand nach 7 Tagen bei einer Zelldichte von $(6–8) \times 10^6$ Zellen/ml statt. Die Wahl einer geringeren Zelldichte führte erfahrungsgemäß zu kontrastärmeren Bildern der Erregungswellen im Dunkelfeld (siehe auch [Sie89]).

Zur Initiation des Entwicklungszyklus durch Entzug der Nahrung wurden die Zellen bei $400 \times g$ für 4 min zentrifugiert, zweimal in KK2-Puffer gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml gebracht. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $6,17 \times 10^5$ Zellen/cm² auf einer 1,23 mm hohen NN-Agarschicht in gläsernen Petrischalen (Duroplan, Duran) homogen verteilt.² Nachdem sich die Zellen auf der Agaroberfläche abgesetzt hatten, wurde der Überstand entfernt. Nach der Inkubation bei 21 °C für 4–6 h im Dunkeln konnten erste Wellenstrukturen im Dunkelfeld beobachtet werden.

1 Auf die kontinuierliche Verdünnung von Kulturen wurde verzichtet, da Zellen, die längere Zeit unter axenischen Bedingungen gehalten werden, während der Entwicklung häufig unvollständige Differenzierung zeigen [ZH78a].

2 Wenn nicht anders angegeben, wurde eine Agarschicht mit einer Koffeinkonzentration von 2 mM bereitet (vgl. Abschn. 3.1).

3.3 Manipulation der Zellen durch chemische Effektoren

3.3.1 Veränderung der globalen Erregbarkeit durch Koffein

Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) ist ein konzentrationsabhängiger, schnell und reversibel wirkender Inhibitor der cAMP-abhängigen Aktivierung der AC bei *Dictyostelium* [Bre84, Sie89]. In Standardpräparationen zur Beobachtung der Musterbildung ist es allgemein verbreitet, geringe Mengen an Koffein zum NN-Agar hinzuzugeben. Konzentrationen im Bereich von 2–3 mM Koffein sind dabei üblich. Ohne die Anwesenheit von Koffein wäre sowohl die qualitative, insbesondere aber auch die quantitative Untersuchung der Erregungswellen während der Musterbildung nicht möglich gewesen. In Abschnitt 4.2.3 wird dies anhand dokumentierter Wellenmuster deutlich. Der Effekt von Koffein liegt dabei in der Verlängerung der Adaptationsphase und Dauer der chemotaktischen Antwort der Zellen [Bre84, Sie89], was sich auf Ebene der Muster in größeren Einzugsgebieten der Aggregationszentren und in der systematischen Erhöhung der Wellenlänge widerspiegelt. Allgemein formuliert, reduziert Koffein die globale Erregbarkeit der Zellschicht durch dosisabhängige Inhibierung der Aktivität der AC. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Koffein und cAMP wird in Abbildung 3.1(a) und (b) offensichtlich.

Neben der standardisierten Verwendung von 2 mM Koffein in NN-Agar zur Beobachtung der Wellenmuster, wurde die Wirkung des Koffeins auf die Mustereigenschaften systematisch untersucht. Damit wurden Vergleichsdatensätze zur Interpretation der Wirkung eines bis zum Zeitpunkt der Experimente weitestgehend unbekanntes Effektors der Musterbildung bei *Dictyostelium* geschaffen (Abschn. 3.3.2).

Diese Datensätze wurden gleichzeitig auch dazu verwendet, die Sensitivität raumzeitlicher Filter zur Extraktion individueller Zelleigenschaften (Variabilität) auf globale Mustereigenschaften zu untersuchen (Abschn. 3.8).

Die Präparation der Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Die Koffeinkonzentration der NN-Agarschicht wurde im Bereich von 1–6 mM systematisch variiert.

3.3.2 Verwendung eines Adenosinderivates mit unbekannter Wirkung auf die Musterbildung

2',3'-O-Isopropylidenadenosin (IPA, AppliChem) ist ein Adenosinderivat, das die cAMP-Bindekapazität der cAMP-Rezeptoren während der Aggregation beträchtlich verringert [VLC86]. Dabei ist das Molekül durch die Modifikation der Riboseeinheit des Adenosins gekennzeichnet. Die Strukturformel von IPA ist in Abbildung 3.1(c) dargestellt. Wissenschaftliche Untersuchungen zu den Effekten von IPA auf die Musterbildung und den Entwicklungszyklus bei *Dictyostelium*, ebenso wie zum Wirkmechanismus innerhalb der Signaltransduktion wurden bisher nicht durchgeführt. Im Zusammenhang mit *Dictyostelium* existierte zum Zeitpunkt der Experimente eine Erwähnung innerhalb der wissenschaftlichen Literatur im Rahmen systematischer Untersuchungen zur Nukleotidspezifität der Inhibition der Bindekapazität von cAR1 durch Adenosin und zahlreiche Adenosinderivate [VLC86]. Weiterhin hatten Newell & Ross (1982) die Musterbildung unter dem Einfluss von Adenosin beschrieben [New82b].

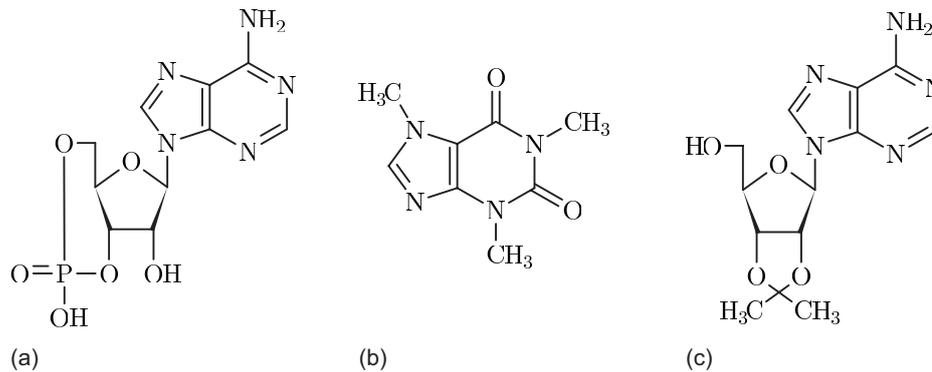


Abbildung 3.1: Strukturformel des Chemoattraktants cAMP (a), im Vergleich zu den Effektoren der Signaltransduktion Koffein (b) und IPA (c).

Als ein Teilaspekt dieser Arbeit wurde die Musterbildung von *Dictyostelium* in Anwesenheit von IPA während des Entwicklungszyklus systematisch untersucht. Die Präparation der Zellen erfolgte wie bei der unter Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Variation der Koffeinkonzentration. Die IPA-Konzentration in NN-Agar wurde zwischen 0,125 mM und 2 mM variiert. IPA wurde in der NN-Agarlösung während des Abkühlens gelöst. Entsprechend der Standardpräparation zur Beobachtung der Muster wurde zum NN-Agar neben IPA auch Koffein (2 mM) zugegeben.

Chemotaxis-Assays

Vegetative Zellen wurden wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert und aufbereitet. Zur Untersuchung der Chemotaxis in Anwesenheit von IPA wurden einzelne Tropfen (0,5 μ l) der nährstofffreien Zellsuspension auf NN-Agar mit IPA (0,25 mM in KK2; ohne Koffein) lokal aufgetragen und im Abstand von wenigen Millimetern Tropfen mit cAMP (30 nM in KK2) plaziert. Die Agarschalen wurden für einige Stunden im Dunkeln inkubiert und im Anschluss auf eine gerichtete Bewegung der Zellen in Richtung des cAMP-Tropfens untersucht. In Kontrollexperimenten wurde IPA-freier NN-Agar verwendet.

Um eine mögliche chemotaktische Attraktivität von IPA auf die Zellen zu untersuchen, wurden Tropfen mit Zellsuspension auf NN-Agar (ohne Zusatz von IPA und Koffein) gegeben. In entsprechender Entfernung wurde ein Tropfen mit IPA-Lösung (0,25–2 mM in KK2) und in Kontrollexperimenten Tropfen mit cAMP-Lösung (30 nM in KK2) aufgebracht. Auch hier wurde nach einigen Stunden die chemotaktische Aktivität der Zellen analysiert.

Aufsprühen von IPA auf die Muster

Auf bereits etablierte stabile Spiralmuster aggregierender Zellen wurde ein feiner Nebel einer IPA-Lösung (2 mM in KK2) gesprüht. Die Geschwindigkeit einer möglichen Änderung

der Muster sollte Aufschluss über die Wirkungsweise von IPA auf die Signaltransduktion geben.

Analyse der Sporenausbeute

Zur quantitativen Schätzung der Zelltypverteilungen im Fruchtkörper in Abhängigkeit der IPA-Konzentration wurde die relative Ausbeute an Sporen bestimmt. Die Präparation der Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Anstelle von NN-Agar wurde eine Agarschicht (2 %; kein Koffein) in Polystyrol-Petrischalen verwendet und vor Erstarren der Agarlösung definierte Mengen an IPA gelöst. Es ergaben sich daraus Endkonzentrationen von 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM IPA. Die Schalen wurden mehrere Tage im Dunkeln bei 21 °C gelagert. Nach Ausbildung der Fruchtkörper wurden die Sporen geerntet und die Ausbeute lichtmikroskopisch bestimmt.

3.4 Veränderung der zellulären Heterogenität

Unterschiedliche Modellvorstellungen und experimentelle Befunde führen die Symmetriebrechung einer homogenen Zellschicht und die Übergänge zwischen den verschiedenen Mustertypen (Spiralen und Targetwellen) auf zeitliche Entwicklungsprozesse der Elemente der Signaltransduktion und eine räumliche Heterogenität zurück. Obwohl die Vorstellungen über die zugrundeliegenden Mechanismen und die Rolle der beteiligten Komponenten stark divergieren (z.B. Desynchronisation entlang des Entwicklungspfad versus PDI-Mechanismus, vgl. Abschn. 2.3.1), können in den Modellen von Lauzeral et al. (1997) und Palsson et al. (1997) die notwendigen interzellulären Unterschiede zur Schaffung räumlicher Heterogenität auf die relative Phasenverschiebungen im Zellzyklus der einzelnen Zellen einer Population zurückgeführt werden [Lau97, Pal97]. Der Zellzyklus von *Dictyostelium* ist durch eine kurze Mitose (0,2 h), die unmittelbar von einer kurzen S-Phase (<0,5 h) gefolgt ist, und einer langen G2-Phase (etwa 6,5–8 h in axenischer Kultur) charakterisiert [Wee94]. Eine G1-Phase gibt es dagegen nach der Meinung vieler Autoren nicht [Wof82, Wei84b, Kes01]. Die relative Phasenverschiebung im Zellzyklus kann experimentell nur eingeschränkt vergrößert, zumindest jedoch durch die Herstellung synchroner Kulturen für die Dauer weniger Teilungszyklen stark verkleinert werden.

Im folgenden wurde die Heterogenität der Zellen durch die Herstellung synchroner Kulturen auf ein Minimum reduziert (Abschn. 3.4.1). Die Vergrößerung der Heterogenität einer Population, im Sinne einer Veränderung der Phasenverteilungen innerhalb der Zellzyklen, wurde durch Mischen von Zellgruppen mit unterschiedlichem Entwicklungsalter realisiert (Abschn. 3.4.2). Diese Experimente sollten zum einen Aufschluss über die Rolle der Phasenverteilungen im Zellzyklus bei der Musterbildung geben, zum anderen wurden die entstandenen Datensätze verwendet, um mit Hilfe der raumzeitlichen Filter aus Abschnitt 3.8 (Fluktuationszahl Ω und Transinformation I) systematisch einhergehende Unterschiede in der Zell-Zell-Kommunikation zu analysieren.

3.4.1 Synchronisierung des Zellzyklus – Erniedrigung zellulärer Heterogenität

Es existiert eine Reihe unterschiedlicher, mehr oder weniger effizienter Strategien, um in ihrem Zellzyklus synchrone Zellen von *Dictyostelium* zu erhalten:

1. bei der „Wash-Off-Methode“ werden mitotische Zellen aufgrund ihrer Adhäsionseigenschaften selektiv aus einer heterogenen Population entnommen [McD84],
2. die „Temperature-Shift-Methode“ bewirkt die Arretierung der Zellen in der späten G2-Phase des Zellzyklus durch Temperatursprünge auf niedrigere Temperaturen [Mae86, Ara94, Wee94],
3. die Reaktivierung stationärer Zellen führt wie auch die „Temperature-Shift-Methode“ zum Anhalten des Zellteilungszyklus in der späten G2-Phase [ZH78b, Wei84b, Wee94],
4. die Behandlung mit antimikrotubularen Substanzen (z.B. Nocodazol) inhibiert die Ausbildung des Spindelapparates, da die Polymerisation der Mikrotubuli unterbleibt. Es findet keine Zellteilung statt. Die Zellen verharren am Übergang der G2-zur M-Phase [Cap79, Rub82],
5. durch die Verwendung einer temperatursensitiven Wachstumsmutante von *Dictyostelium*, kann durch Erhöhung der Umgebungstemperatur die Zellteilung inhibiert werden [Kat74].

Grundsätzlich geht eine synchrone Zellkultur nach wenigen phasengleichen Zellteilungen wieder zu asynchroner Teilung über. Die Zellzahl nimmt dann nicht mehr stufenhaft, sondern kontinuierlich zu [Sch92]. Dies wird der hohen Variabilität in der Dauer der G2-Phase [Wee94] und einer nicht vorhandenen Kopplung der Zellzyklen in einer Kultur zurückgeführt.

Im folgenden wurde die „Wash-Off-Methode“ und die Methode zur Reaktivierung stationärer Zellen angewendet, um synchrone Zellen zu erhalten. Ein Einsatz von Mutanten und der „Temperature-Shift-Methode“ war unter den gegebenen Laborbedingungen nicht möglich. Die chemische Inhibition der Zellteilung als invasivste dieser Methoden wurde bisher in der Literatur nicht in ausreichendem Maß auf ihren Einfluss auf die Musterbildung beschrieben.

„Mitotic Wash-Off-Methode“

(nach Terasima & Tolmach (1961), McDonald & Durston (1984); [Ter61, McD84])

Durch Anwendung der „Mitotic Wash-Off-Methode“ können mitotische Zellen aufgrund ihrer verminderten Adhäsionseigenschaft selektiv aus einer heterogenen Kultur getrennt werden. Zellzählung und Messung der DNA-Synthese am Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin als Funktion der Zeit weisen auf einen hohen Grad an Synchronität der Zellen hin [McD84].

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben in HL5-Medium.

Bei einer Zelldichte von $(3-6) \times 10^6$ Zellen/ml wurde ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche (162 cm², Costar) überführt, so dass sich eine Zelldichte von 3×10^5 Zellen/cm² ergab. Das verbleibende Medium wurde durch Zentrifugation bei $800 \times g$ für 5 min von den Zellen befreit und für spätere Arbeitsschritte aufbewahrt. Während der folgenden 20 min setzten sich die überführten Zellen am Boden der Kulturflasche ab. Der Überstand wurde entfernt und mit 10,67 ml des aufbereiteten zellfreien Mediums ersetzt. Nach 10 min wurde die Kulturflasche vorsichtig bei 30 upm für 30 s gedreht. Während dieser Zeit lösten sich alle nur leicht haftenden Zellen vom Boden der Kulturflasche ab. Nach McDonald und Durston (1984) handelt es sich dabei um mitotische Zellen, welche wegen ihrer abgerundeten Form nur wenig adhäsiv sind [McD84].

Rekultivierung stationärer Zellen

(modifiziert nach Zada-Hames & Ashworth (1978), Weijer et al. (1984); [ZH78b, Wei84a])

Mit dieser Methode nutzt man die Eigenschaft einer statischen Kultur, bei Erreichen der stationären Phase die Zellteilung einzustellen und für einige Stunden in einem stationären Zustand ohne mitotische Aktivität zu verbleiben, bevor es durch reduzierte Substratkonzentration, Ansammlung von Stoffwechselprodukten und Wachstumsinhibitoren zum Absterben der Zellen kommt [Yar74]. Die Synchronisationsgrad der Zellen ist vergleichbar mit dem bei Anwendung der „Temperature-Shift-Methode“. In beiden Fällen stellen die Zellen ihren Zellzyklus in der späten G₂-Phase ein [Sol76, ZH78b, Wee94]. Nach dem Überführen der Zellen in frisches Medium wird der Zellteilungszyklus relativ synchron für wenige Teilungszyklen durchlaufen [Wei84a].

Um stationäre Zellen zu erhalten, wurden axenisch kultivierte Zellen (Abschn. 3.2.3) während der exponentiellen Wachstumsphase auf 1×10^6 Zellen/ml in frischem HL5-Medium verdünnt und erneut bei 21 °C und 210 upm kultiviert. Nach 40 h hatte die Kultur eine Zelldichte von etwa 2×10^7 Zellen/ml erreicht und befand sich in der stationären Teilungsphase. Diese Zellen wurden erneut in frisches HL5-Medium auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml überführt. Unter diesen Bedingungen zeigten die Zellen nach einer Lag-Phase von wenigen Stunden eine Verdopplung ihrer Zahl über einen Zeitraum von 2–3 h [Yar74].

3.4.2 Mischen von Zellpopulationen mit unterschiedlichem Entwicklungsalter – Erhöhung der zellulären Heterogenität

Mit dem Ziel die relative Verteilung der Phasen des Zellzyklus und damit den Grad der Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungspfadens im Sinne von Lauzeral et al. (1997) [Lau97] zu erhöhen, wurden jeweils zwei parallel in HL5-Medium gewachsene Kulturen (Abschn. 3.2.3) zeitverzögert geerntet und die Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. Die gewaschenen Zellen der älteren Kulturen wurde in nährstofffreiem KK2-Puffer bei 21 °C und 210 upm bis zur Vereinigung mit den gewaschenen Zellen der jüngeren Kultur aufbewahrt. Es wurden Verzögerungszeiten von 60–180 min und Mischungsverhältnisse von 1–50 % (an Zellen der älteren Kultur)

gewählt. Die Muster der gemischten Zellen wurden im Dunkelfeld dokumentiert (Abschn. 3.5.1).

3.5 Optischer Aufbau

Während die Bewegungen individueller Zellen lichtmikroskopisch beobachtet werden können, sind die Erregungswellen von *Dictyostelium* nur im Dunkelfeld zu sehen. Die Bemühungen innerhalb eines Experiments gleichzeitig Einzelzellen, als auch Wellen beobachten zu können, um so zum Beispiel direkt Welleneigenschaften auf Einzelzellereignisse zurückführen zu können, scheitern zunächst an der Tatsache, dass die Dunkelfeldmikroskopie im Gegensatz zum Lichtmikroskop nach dem Prinzip der differentiellen Lichtstreuung funktioniert. Im Rahmen dieser Arbeit unternommene Versuche, Erregungswellen auf andere Weise sichtbar zu machen, zeigten, dass diese im vollausgebildeten Stadium sehr wohl auch lichtmikroskopisch bei ausreichend großem Gesichtsfeld (z.B. mit einem Stereomikroskop im Durchlicht) zu sehen sind. Versuche, Erregungswellen im Auflicht sehen zu können, scheiterten. Die gleichzeitige Beobachtung von Einzelzellen in Wellenmustern ist also eher ein Problem unterschiedlicher Größenskalen der Zell- und Musterebene, als ein Problem nicht miteinander vereinbarere optischer Bedingungen.

3.5.1 Dunkelfeldmikroskopie

4–6 h nach dem Nahrungsentzug der Zellen können cAMP-Wellen im Dunkelfeld indirekt beobachtet werden. Die Dunkelfeldmikroskopie ist ein einfaches Verfahren, bei dem kein direktes Messlicht in das Objektiv der Kamera gelangt und ausschließlich das von den Zellen gestreute Licht detektiert wird [Gro76]. Befindet sich kein Objekt im Strahlengang, bleibt das Gesichtsfeld dunkel. Das Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Zur Beobachtung der Erregungswellen von *Dictyostelium* macht man sich die Eigenschaft der Zellen zunutze, dass diese Licht in Abhängigkeit ihres individuellen Erregungsstatus unterschiedlich stark streuen [Alc74]. So sind chemotaktisch aktive Zellen langgestreckt und erscheinen im Dunkelfeld als helle Bereiche. Stationäre Zellen sind abgerundet, wodurch Licht weniger stark gestreut wird (vgl. Abb. 2.10). Durch kohärente Zellformänderungen bilden sich auf makroskopischer Ebene raumzeitliche Wellenmuster aus hellen und dunklen Banden. Die lokale cAMP-Konzentration ist dabei mit der lokalen Zellformänderungen und den makroskopischen Wellenstrukturen in einer räumlich ausgedehnten Zellenpopulation vollständig korreliert [Tom81].

Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott), die sich unterhalb einer bikonvexen Linse ($d = 12$ cm, $f = 20$ cm) befand. Direkt über der Lichtquelle wurde der Strahl durch eine Spaltringblende (innerer Durchmesser $d = 2,5$ cm) gelenkt und das Licht mit Hilfe einer Milchglasscheibe homogenisiert. Die Petrischale mit den Zellen auf einer Agarschicht wurde über der Linse plaziert. Der Abstand der Probe zum Brennpunkt der Linse bestimmt dabei den minimalen Winkel, mit welchem Licht von den Zellen gestreut werden muss, um ins Objektiv der Kamera gelangen zu können. Die Dokumentation der

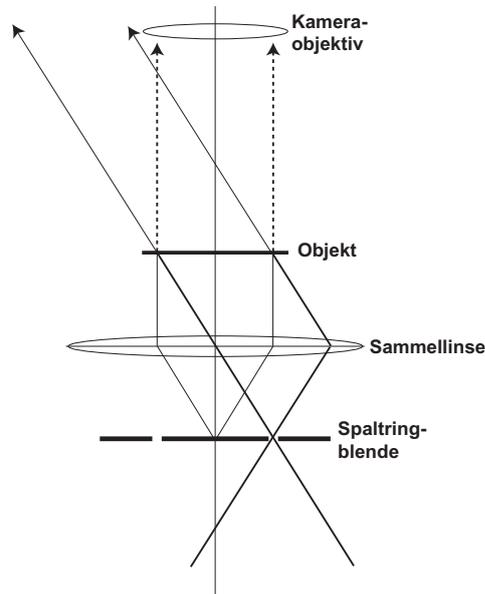


Abbildung 3.2: Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie zur Beobachtung von Erregungswellen. Nur von den Zellen gebrochenes Licht fällt ins Objektiv der Kamera.

Wellen erfolgte mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu C 3077; Tarcus Objektiv 35 mm) welche sich zwei Brennweiten über der Linse befand.

Durch diese Anordnung wurde die Spaltringblende im Verhältnis 1:1 auf Höhe des Kamera-chips abgebildet. Zur Abstandsvergrößerung von Objektiv und Kamera durch den Einbau von Zwischenringen konnte der Abbildungsmaßstab gegebenenfalls vergrößert werden. So konnten Bildausschnitte mit Flächen von bis zu 16 cm^2 , aber auch wesentlich stärker vergrößerte Ausschnitte von etwa 1 cm^2 beobachtet werden. Die Bilder wurden in Intervallen von 3 s über mehrere Stunden hinweg aufgenommen und als 8bit Bilder mit 256 Grauwerten gespeichert. Die Ansteuerung der Digitalisierungskarte (DT-Open Layers DT 3155 Mach Series Frame Grabber; Hamamatsu Camera Controller C2400; Computer Maxdata) zur Aufnahme raumzeitlicher Datensätze erfolgte mit der Windowsanwendung WinPic.

3.5.2 Phasenkontrastmikroskopie

Während sich im Dunkelfeld durch differenzierte Lichtstreuung makroskopische Erregungswellen abbilden, kann die kollektive Bewegung der verhältnismäßig kontrastarmen Einzelzellen mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie beobachtet werden. Es wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss), welches mit einem $10\times$ Plan-Neofluar Objektiv (Zeiss) ausgestattet war, verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte eine Fläche von etwa $0,75 \text{ mm}^2$ betrachtet werden. Zur Analyse der Zellbewegung wurden Bilder im Abstand von 60 s mit Hilfe einer CCD Kamera (Hamamatsu C2400-07) aufgenommen.

3.6 Aufbereitung der Rohdaten

Die Bildbearbeitung der experimentellen Datensätze erfolgte mit IDL 5.2 (Interactive Data Language, ITT Visual Information Solutions) und Mathematica 6.0 (Wolfram Research).

In Abhängigkeit der Fragestellung und der optischen Qualität wurden die Daten sequentiell unterschiedlichen Prozeduren unterworfen.

Die Grauwertspreizung ist eine Punktoperation, bei der die neu zugewiesenen Werte der einzelnen Bildpunkte nicht von den benachbarten Bildpunkten abhängen. Dabei wurden die äußeren Flanken der Häufigkeitsverteilung von Grauwerten (Histogramm) eines Datensatzes entfernt und die verbliebene Grauwerte auf den gesamten Wertebereich aller Grauwerte (0–255) abgebildet. Die Relation der Bildpunkte zueinander bleibt jedoch erhalten. Durch Ausnutzung des gesamten Wertebereichs kann der Bildkontrast deutlich erhöht werden.

Durch pixelbasierte Mittelung der Grauwerte in der Zeit kann statistisches Rauschen reduziert und der Bildkontrast erhöht werden. Diese Methode konnte sowohl „online“ direkt während der Aufnahme, aber auch im Nachhinein durchgeführt werden.

Die Bildsubtraktion ist ein einfaches und schnelles bildpunktbasierendes Verfahren, durch das aus einem raumzeitlichen Datensatz stationäre Bildelemente, wie optische Störungen und Bildhintergrund eliminiert und dynamische Strukturen extrahiert werden können. Dabei werden die Grauwerte koordinatengleicher Pixel aufeinanderfolgender Bilder mit einem zeitlichen Versatz voneinander subtrahiert. Der Versatz ist dabei so zu wählen, dass die zeitliche Skala der hervorzuhebenden Dynamik deutlich größer ist als der Versatz. Durch die Subtraktion von Bildern aus raumzeitlichen Datensätzen von *Dictyostelium* wurde die Sichtbarkeit der Erregungswellen in kontrastarmen und inhomogen ausgeleuchteten Bildern deutlich erhöht. Natürlich beschränkt sich der Nutzen dabei auf die frühe Aggregationsphase bzw. die Extraktion von Erregungswellen. Aggregationsströme der fortgeschrittenen Entwicklung erscheinen als stationäre Bildstrukturen und würden bei diesem Verfahren eliminiert.

Eine Verschiebung der Grauwerte in andere Bereiche kann beispielsweise durch Addition aufeinanderfolgender Differenzbilder oder durch Addition oder Multiplikation einer Konstanten erreicht werden.

Zur Rauschunterdrückung wurde in einigen Fällen ein gleitender Medianfilter angewendet und dann eine mittelwertbasierte Referenz erstellt. Dabei wurden in quadratischen Bildbereichen für jede Pixelposition Mittelwerte über die Nachbapixel und über die Zeit gebildet. Die Mittelwerte aller Bildpunkte wurden zu einer Referenz zusammengesetzt, welche als Hintergrundbild von allen Einzelbildern subtrahiert wurde. Nachteil dieser Methode ist die Zunahme der Unschärfe durch die räumliche Medianbildung und die Beschränkung der Anwendung auf verhältnismäßig kurze Zeitfenster der frühen Aggregationsphase ohne Zellströme, da diese bei der Referenzbildung als stationäre Strukturen einen Beitrag zum Hintergrundbild leisten.

3.7 Konstruktion von Raum-Zeit-Plots zur quantitativen Analyse der Erregungswellen

Viele Parameter der Wellenpropagation lassen sich direkt aus konstruierten Raum-Zeit-Plots ablesen. Abbildung 3.3 stellt die Vorgehensweise schematisch dar. Zunächst wird im ersten Bild eines raumzeitlichen Datensatzes senkrecht zu einer Wellenfront durch das

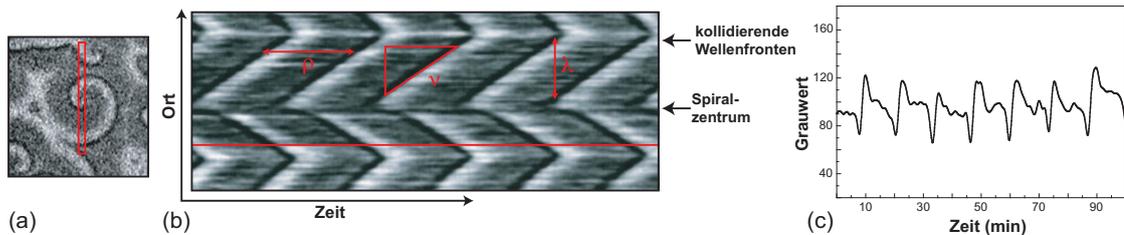


Abbildung 3.3: Extraktion der Wellenparametern aus Raum-Zeit-Plots. Momentaufnahme eines Wellenmusters (a). Senkrecht zur Wellenfront wird ein Areal bestimmt, das räumlich auf eine Linie gemittelt wird. Die zeitliche Anordnung solcher Linien ergibt einen Raum-Zeit-Plot (b). Daraus lassen sich die Wellenlänge (λ) und die Periode (ρ) aufeinanderfolgender Wellen direkt ablesen. Die Geschwindigkeit einer Welle (ν) wird durch die Steigung bestimmt. Die Anordnung der Grauwerte einer Linie entlang der Zeit geben Auskunft über das Profil aufeinanderfolgender Wellen (c).

Zentrum einer Spiral- oder Targetwelle ein räumliches Areal definiert, das von den Wellen mit fortschreitender Zeit durchlaufen wird (Abb. 3.3(a)). Die Grauwerte dieses Areals werden für jedes Bild des Datensatzes auf eine Linie gemittelt. So wird für jeden Zeitpunkt eine eindimensionale Repräsentation der zu vermessenden Wellen gebildet. Die erhaltenen Linien werden sequentiell zueinander angeordnet. So entsteht ein Diagramm, in dem die räumliche Grauwertveränderung des definierten Areals über die Zeit aufgetragen ist (Abb. 3.3(b)). Einzelne Wellenfronten erscheinen in diesem Raum-Zeit-Plot als diskrete Linien. Spiralzentren erscheinen als Täler, von denen einzelne Wellenlinien abwechselnd von beiden Seiten mit positiver Steigung nach außen propagieren (Abb. 3.3(b)). Von Zentren der Targetwellen propagieren die Wellen dagegen symmetrisch an beiden Seiten nach außen. Regionen in welchen sich kollidierende Wellen auslöschen erscheinen als spitz zulaufende Peaks.

Die Geschwindigkeit einer propagierenden Welle entspricht der Steigung der mit der Zeit auseinander laufenden Wellenlinien. Diese Wellenlinien bilden dabei jeweils eine Gerade. Je geringer die Steigung einer diskreten Wellenlinie ist, um so größer ist die Geschwindigkeit der Welle. Die Rotationsperiode einer Spirale ergibt sich aus dem Abstand der einzelnen Wellenlinien entlang der Zeitachse an einem räumlichen Punkt. Trägt man die Entwicklung eines solchen Punktes als Funktion der Zeit auf, erhält man dessen Grauwertprofil und damit die Amplitude und Form einer Welle, welche den entsprechenden Bildpunkt durchlaufen hat (Abb. 3.3(c)). Die Amplitude kann als chemotaktische Antwort der Zellen auf das cAMP-Signal interpretiert werden [Sie89]. Zur Bestimmung der

Wellenlänge wurde der Abstand zwischen zwei Wellenlinien entlang der räumlichen Achse vermessen (Abb. 3.3(b)). Neben der quantitativen Bestimmung von Wellenparametern lassen sich mit Hilfe von Raum-Zeit-Plots auch kontrastarme Wellenstrukturen identifizieren, welche beim Betrachten der Rohdaten nicht zu erkennen sind.

3.8 Raumzeitliche Datenanalyse zur Extraktion von Zelleigenschaften

Die raumzeitliche Strukturbildung bei *Dictyostelium* ergibt sich aus den stofflichen Wechselwirkungen benachbarter Zellen, die sich direkt in periodischen Zellformänderungen und den Aufnahmen aus der Dunkelfeldmikroskopie widerspiegeln. Die interzelluläre Kommunikation entspricht einer Übertragung von Information in Raum und Zeit. Dieser Informationstransfer der durch die Wechselwirkungen der Zellen vollständig festgelegt ist, kann mit Hilfe informationstheoretischer Größen, insbesondere der Transinformation I , quantifiziert werden (Abschn. 3.8.1; [Hüt01a]).

Die räumliche Verteilung der Zellen auf dem Agar stellt abstrakt gesehen eine Matrix individueller, erregbarer Elemente dar. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl raumzeitlicher Filter zur Datenanalyse basierend auf Prinzipien zellulärer Automaten formuliert, welche zur Übersetzung von Nachbarschaftskonstellationen in qualitative Systemeigenschaften [Hüt01b, Bus04] und in ihrer Erweiterung zur Analyse biologischer Datensätze auf raumzeitliche stochastische Resonanz und Synchronisationseigenschaften herangezogen wurden [Hüt02, Ras01]. Systemunabhängig basieren diese Anwendungen auf der zeitlichen Änderung räumlich gemittelter Observablen. Eine interessante dynamischen Kenngröße ist hier die Fluktuationszahl Ω , welche zur quantitativen Schätzung des Beitrags von schnellen (und damit wahrscheinlich stochastischen) Beiträgen zur Gesamtdynamik des Systems verwendet werden kann (Abschn. 3.8.2; [Hüt01b]).

Da die Berechnung von I und Ω auf der Analyse lokaler Korrelationen und Fluktuationen beruht, kann eine räumliche Verteilung beider Observablen (Ω_{ij} und I_{ij}) auch als eine Verteilung dynamischer, individueller Zelleigenschaften verstanden werden.

3.8.1 Transinformation I

Die Transinformation I ist neben der Entropie H eine der bedeutendsten Größen der Informationstheorie [Sha48] und stellt ein interessantes Maß zur Beurteilung des Grades an Komplexität und Informationstransport in einem System dar (siehe z.B. [Ebe98, Hüt01a, Hüt06b]). Die Idee ist, bestehende Korrelationen von Symbolpaaren (oder Zustandskombinationen) über eine räumliche oder zeitliche Distanz zu analysieren, und damit statistische Abhängigkeiten im Auftreten dieser Symbolkombinationen zu ermitteln. In der allgemeinen Form der Transinformation I wird die Wahrscheinlichkeit ρ_{ab} von Zuständen $a, b \in \Sigma$ aus dem Zustandsraum Σ für die räumliche oder zeitliche Nachbarschaft der Zustandsabfolge ab mit der Wahrscheinlichkeit des unabhängigen Auftretens der Einzelsymbole ρ_a und ρ_b verglichen:

$$I = \sum_{a,b \in \Sigma} \rho_{ab} \log \left(\frac{\rho_{ab}}{\rho_a \rho_b} \right). \quad (3.1)$$

Betrachtet man als Extremfall eine Abfolge von maximal korrelierten Zuständen, also $\rho_{ab} = 1$, dann folgt daraus $\rho_a = 1$, $\rho_b = 1$ und damit $I = 0$. Bei einer statistisch unabhängigen Abfolge der Zustände ist $\rho_{ab} = \rho_a \rho_b$. Daraus ergibt sich erneut $I = 0$. In beiden Fällen bietet der gegebene Zustand keine Information über den Folgezustand einer Zeitreihe oder eines benachbarten Elements in einem räumlich ausgedehnten System.¹ Jede andere Wahrscheinlichkeitsverteilung führt damit auf einen Wert von $I > 0$. Innerhalb dieses Bereiches muss es damit also auch einen Grad der Korrelation geben, bei dem der Informationsgewinn und somit I maximal ist.

Die Anwendungsmöglichkeiten der Transinformation erstrecken sich über eine Vielzahl biologischer Systeme, von der Analyse von DNA-Sequenzen (z.B. zur Trennung codierender und nichtcodierender Bereiche [Her98, Wei98, Guh00]) bis zu ökologischen Systemen, bei welchen Informationstransport als ein Evolutionskriterium aufgefasst werden kann.

Wie aus Gleichung (3.1) ersichtlich wird, dient als Ausgangsmaterial für die Berechnung von I eine eindimensionale Abfolge von Zuständen. Für raumzeitliche Datensätze existiert eine Reihe von Varianten zur Definition des Paarereignisses ab , und zwar in Abhängigkeit davon, ob die räumliche Paarbildung in der Zeit oder im Raum erfolgen soll. Abbildung 3.4 zeigt die Vorgehensweise bei der Binarisierung raumzeitlicher Daten von *Dictyostelium* und unterschiedliche Möglichkeiten, aus einer eindimensionalen Zeitreihe Paarkombinationen ab zu definieren [Hil07]. Jeder Datensatz kann in einzelne Zeitreihen von Grauwerten zerlegt werden. Im oberen Bildteil von Abbildung 3.4(a) sind die Grauwerte eines einzelnen Bildpunktes als Funktion der Zeit aufgetragen. Die zeitlichen Differenzen aufeinanderfolgender Werte ($x_{ij}(t+1) - x_{ij}(t)$) (mittlerer Teil in (a)) werden durch einen Binarisierungsfiler ($\delta_{ij}(t) = \text{Sig}(x_{ij}(t+1) - x_{ij}(t))$) nach ihren Vorzeichen befragt und in entsprechende Zeitreihen aus 0 und 1 transformiert. Beträgt die zeitliche Änderung aufeinanderfolgender Datenpunkte 0, so wird der Wert des vorangegangenen Zeitschritts verwendet. Der untere Bildteil von (a) zeigt die resultierende binäre Zeitreihe als Barcode-Diagramm, welche zur Berechnung von I verwendet werden kann, wobei hier zeitliche Nachbarschaften von a und b das Ereignis ab definieren. Die Paarbildung kann auch unter Einbeziehung der Nachbarschaft zwischen zwei räumlich benachbarten binären Zeitreihen (Abb. 3.4(b)) oder einer zuvor als Referenz festgelegten Zeitreihe (c) erfolgen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden die Ereignisse ab durch die erste Variante (zeitliche Differenzen in Abbildung 3.4(a)) gebildet. Das Ergebnis der Analyse aller Bildpunkte eines raumzeitlichen Datensatzes ist eine Matrix I_{ij} , deren Werte gegebenenfalls über alle Bildpunkte gemittelt werden können.

¹ Im Gegensatz dazu wird die Entropie $H = - \sum_{a \in \Sigma} \rho_a \log \rho_a$ als Maß für die Unordnung eines Systems bei vollständiger Kenntnis des Systemzustandes minimal, bei einer Gleichverteilung aller Zustandswahrscheinlichkeiten dagegen maximal.

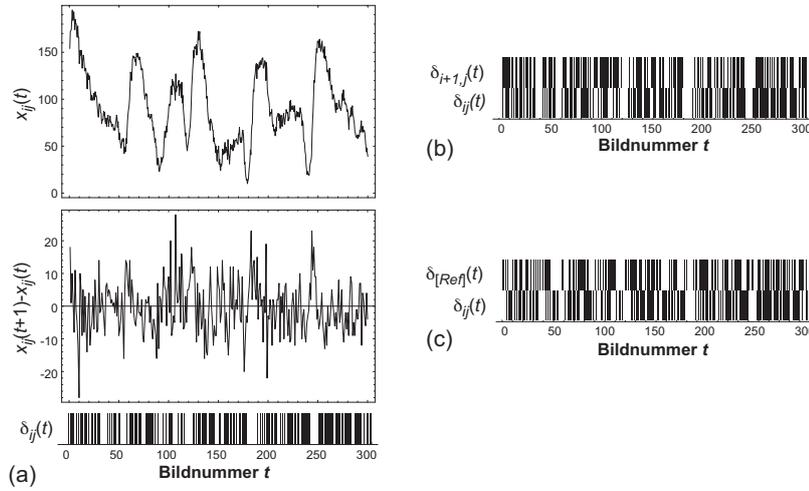


Abbildung 3.4: Transformation der zeitlichen Entwicklung eines Bildpunktes in eine binäre Abfolge von Symbolen. Durch Differenzenbildung aufeinanderfolgender Werte ($x_{ij}(t + 1) - x_{ij}(t)$) kann die Zeitreihe entsprechend der mittleren Änderung ihrer Werte durch Vorzeichenabfrage ($\delta_{ij}(t) = \text{Sig}(x_{ij}(t + 1) - x_{ij}(t))$) in eine Reihe von Nullen und Einsen überführt werden (a). Diese Ausgangssequenz kann zur Berechnung von I verwendet werden (wobei hier die Paarbildung in der Zeit erfolgt) oder unter Einbeziehung räumlicher Nachbarschaften (b) oder einer Referenzsequenz (c) durch Paarbildung im Raum erweitert und dann zur Bestimmung von I herangezogen werden. Die Abbildung stammt aus [Hil07]

3.8.2 Fluktuationszahl Ω

Ein bestehendes Problem bei der Analyse biologischer Datensätze ist, dass der Grad stochastischer Beiträge (Rauschen und Fluktuationen) zur Gesamtdynamik nicht direkt aus den Daten extrahiert werden kann. Mit Hilfe der Fluktuationszahl Ω lässt sich jedoch der Beitrag vergleichsweise schneller Dynamiken abschätzen. Die Idee dahinter ist, die relative Änderung (Grauwerte) der Elemente (Bildpunkte) zur Trennung von gerichtetem und ungerichtetem Verhalten zu nutzen. Ω stellt damit ein quantitatives Maß für Rauschen im System dar [Hüt01a].

Ausgangsmaterial ist ein zweidimensionaler räumlicher Datensatz \mathcal{I} , also eine Matrix der Größe $N \times N$ mit den Elementen $a_{ij} \in \Sigma$, wobei Σ alle möglichen Zustände bzw. Grauwerte enthält. Eine Zeitreihe der Bilder eines solchen Datensatzes entspricht dann $\{\mathcal{I}(t); t = 1, 2, \dots, N_T\}$; t ist die dimensionslose Zeit und N_T die Anzahl der Bilder. Es wird angenommen, dass es sich bei Rauschen und Fluktuationen um Beiträge mit verhältnismäßig kleiner Zeitkonstante handelt [VK01]. Zur Abschätzung des Grades von Rauschen in einer beobachteten Dynamik wird die relative Änderung eines Elements $a_{ij}^{(t)}$ zu einem Zeitpunkt t in Bezug auf seine $|\mathcal{N}_{ij}|$ Nachbarn $b(t)$ untersucht. Die Summe dieser räumlichen Differenzen $\delta_{ij}^{(t,k)}$ eines Elements $a_{ij}^{(t)}$ stellt nun eine Größe zur Trennung von gerichteter und ungerichteter (möglicherweise stochastischer) Änderung des Zustands ei-

nes Elements in Bezug zu seiner Nachbarschaft dar. Der Index k läuft dabei über alle Nachbarn des Elements ij . Für jede räumliche Differenz $\delta_{ij}^{(t,k)}$ eines Elements $a_{ij}^{(t)}$ wird dann die zeitliche Nachbarschaft (als Differenz) der Elemente herangezogen. Gleichung (3.2) stellt die Bedingung für das Vorhandensein von Rauschen in der relativen Änderung von $a_{ij}^{(t)}$ dar:

$$\begin{aligned} \text{Sig}\left[\delta_{ij}^{(t,k)} - \delta_{ij}^{(t-1,k)}\right] &\neq \text{Sig}\left[\delta_{ij}^{(t+1,k)} - \delta_{ij}^{(t,k)}\right] \quad \wedge \\ \delta_{ij}^{(t,k)} - \delta_{ij}^{(t-1,k)} &\neq 0 \quad \wedge \quad \delta_{ij}^{(t+1,k)} - \delta_{ij}^{(t,k)} \neq 0. \end{aligned} \quad (3.2)$$

Die Vorzeichenfunktion $\text{Sig}[x]$ ist 1, -1 oder 0, abhängig davon, ob x größer, kleiner, bzw. gleich Null ist. Jeder Übergang $\delta_{ij}^{(t-1,k)} \rightarrow \delta_{ij}^{(t,k)} \rightarrow \delta_{ij}^{(t+1,k)}$, der die Bedingung in Ausdruck (3.2) erfüllt, soll mit dem Mittelwert seiner zeitlichen Änderung zur Fluktuationenzahl Ω beitragen. Die Mittelung über alle k führt zum endgültigen Ausdruck dieser räumlichen Variante der Fluktuationenzahl $\Omega(t)$:

$$\begin{aligned} \Omega_{ij}(t) &= \frac{1}{|\mathcal{N}_{ij}|} \sum_{k=1}^{|\mathcal{N}_{ij}|} \frac{1}{2} \left(\left| \delta_{ij}^{(t,k)} - \delta_{ij}^{(t-1,k)} \right| + \left| \delta_{ij}^{(t+1,k)} - \delta_{ij}^{(t,k)} \right| \right) \times \\ &\frac{1}{2} \text{Sig}\left[\delta_{ij}^{(t,k)} - \delta_{ij}^{(t-1,k)}\right] \text{Sig}\left[\delta_{ij}^{(t+1,k)} - \delta_{ij}^{(t,k)}\right] \\ &\left(\text{Sig}\left[\delta_{ij}^{(t,k)} - \delta_{ij}^{(t-1,k)}\right] \text{Sig}\left[\delta_{ij}^{(t+1,k)} - \delta_{ij}^{(t,k)}\right] - 1 \right), \end{aligned} \quad (3.3)$$

wobei die Terme der beiden letzten Zeilen auf 0 oder 1 führen. Die Größe $\Omega_{ij}(t)$ stellt auf diese Weise eine einfache Schätzung der Fluktuationen jedes räumlichen Punktes eines raumzeitlichen Datensatzes dar.

Die Voraussetzung dafür, dass gerichtete und ungerichtete Änderungen aufgrund ihrer Dynamiken auf unterschiedlichen Zeitskalen getrennt werden können, ist natürlich ein ausreichend kleiner Diskretisierungsabstand der zugrundeliegenden Daten im Raum und in der Zeit. Die Diskretisierungsskala muss dabei sehr viel kleiner sein, als die Skala der eigentlichen Dynamik, um eine Trennung der stochastischen und deterministischen Anteile erzielen zu können. Ebenso müssen beide Skalen ausreichend unterschiedlich sein. Je „farbiger“ das Rauschen ist, um so größer ist der Grad der Fehlinterpretation [Hüt01a]. Zahlreiche Anwendungsbeispiele der Fluktuationenzahl $\Omega(t)$ an theoretischen Modellsystemen finden sich neben anderen raumzeitlichen Filtern in Hütt (2001) [Hüt01a], die erste Anwendung einer zeitlichen Version auf Datensätze von *Dictyostelium* in Hütt (2003) [Hüt03]. In Hilgardt et al. (2007) wurde $\Omega_{ij}(t)$ zum erstenmal zur Analyse der raumzeitlichen Muster von *Dictyostelium* verwendet [Hil07].

3.9 Extraktion globaler Mustereigenschaften

Ein wichtiger vorbereitender Arbeitsschritt auf der Suche nach universellen Organisationsprinzipien der raumzeitlichen Muster ist das Überführen räumlicher Verteilungen von Mustereigenschaften in Messgrößen (Musterquantifizierung). Bei Spiralwellen stellt das Konzept der Phasensingularitäten eine solche Methode dar, bei der Spiralspitzen automatisiert aufgrund ihrer mathematischen Eigenschaften aus den raumzeitlichen Daten extrahiert werden können.

3.9.1 Detektion der räumlichen Verteilung von Phasensingularitäten

Die bedeutendste Anwendung der Detektion von Phasensingularitäten auf experimentelle Datensätze geht auf die Arbeiten von Gray et al. (1998) zurück und diente zur Aufklärung der Rolle topologischer Defekte des Herzmuskels bei der Entstehung von kardialem Flimmern [Gra95, Gra98]. Spontane asynchrone Kontraktionen des Herzens (Kammerflimmern) werden von rotierenden, oft mäandernden Spiralwellen transmembraner Potentiale begleitet [Dav92]. Eine Phasensingularität definiert die Spitze einer rotierenden Spiralwelle, wo die Isolinien aller Phasen sich treffen. Die spiralförmige Depolarisierung des Herzmuskels beruht dabei auf anatomischen Eigenschaften (Defekten), welche lokale Störungen der räumlichen Erregungsweiterleitung darstellen. Das Zentrum einer Spirale besteht aus erregbarem vulnerablen Gewebe. Ein mathematischer Formalismus zur automatisierten Identifizierung von Phasensingularitäten stammt von Bray et al. (2001) [Bra01].

Die Spitze einer Spirale ist der Punkt im Raum, um welchen sich alle Phasen des oszillatorischen Zyklus finden lassen. Betrachtet man Erregungswellen als zyklischen Attraktor im Phasenraum, so kann jedem räumlichen Element zu jedem Zeitpunkt eindeutig ein Phasenwinkel θ zwischen $-\pi$ und π zugeordnet werden. Die Reihenfolge der Vorzeichenänderung wird dabei durch den Drehsinn der Spiralwelle bestimmt. Am Ort einer Phasensingularität ist die Phase nicht definierbar, da hier alle Phasenwerte angrenzen und somit keine stetige Änderung der Phasenvariablen angegeben werden kann. Mathematisch ist dieser Punkt also eine Singularität der (ansonsten stetigen) Phasenvariablen. Phasensingularität sind über Isolinien gleicher Phase miteinander verbunden [Gra98]. Entsprechend der zugrundeliegenden Erregungsmuster, interferieren diese nicht.

Untersuchungen der räumlichen Verteilung von Phasensingularitäten bei *Dictyostelium* in Abhängigkeit der Kopplungsstärke der pulsinduzierten Signaltransduktion zur Genexpression wurden erstmals von Sawai et al. (2005) durchgeführt [Saw05]. Die Wellenmuster von *Dictyostelium* spiegeln in ihren lokalen Grauwertänderungen direkt die Periodizität der einzelnen Zellen wider. Abbildung 3.5(a) zeigt sie periodische Grauwertänderung eines einzelnen Bildpunktes aus experimentellen Daten von *Dictyostelium* im Verlauf von 50 min. Die zeitverzögerte Einbettung in $(\rho(t), \rho(t + \tau))$ approximiert das zeitliche Verhalten eines erregbaren Elementes im Phasenraum (Abb. 3.5(b)). τ kann aus dem ersten

Nulldurchlauf der Autokorrelationsfunktion von $\rho(t)$ bestimmt werden.¹ Jedem Zustand

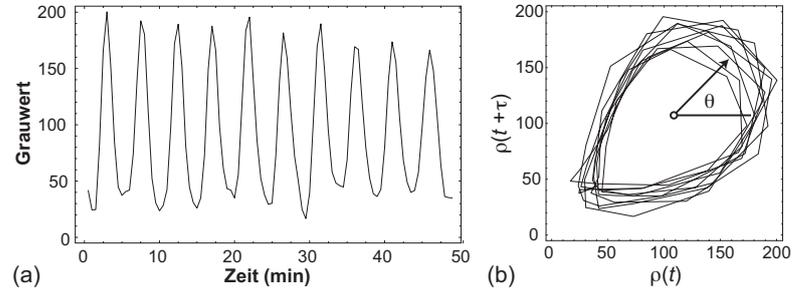


Abbildung 3.5: Zeitreihe der Grauwerte eines räumlichen Datenpunktes $\rho(t)$ (a) und Phasenportrait durch zeitverzögerte Einbettung in $(\rho(t), \rho(t + \tau))$ zur Definition des Phasenwinkels $\theta(t)$.

im Erregungszyklus kann exakt ein Phasenwinkel θ im Bereich von $-\pi$ und π zugeordnet werden. Es ergibt sich also eine Änderung um insgesamt 2π über den gesamten Zyklus hinweg. Damit kann auch für jeden Bild- und Zeitpunkt die mögliche Anwesenheit einer Phasensingularität berechnet werden. Abbildung 3.6 zeigt die Momentaufnahme einer Spiralwelle und die dazugehörige räumliche Verteilung der rekonstruierten Phasenvariablen. Eine Phasensingularität ist ein Punkt im Raum, dessen Phaseninformation nicht definiert

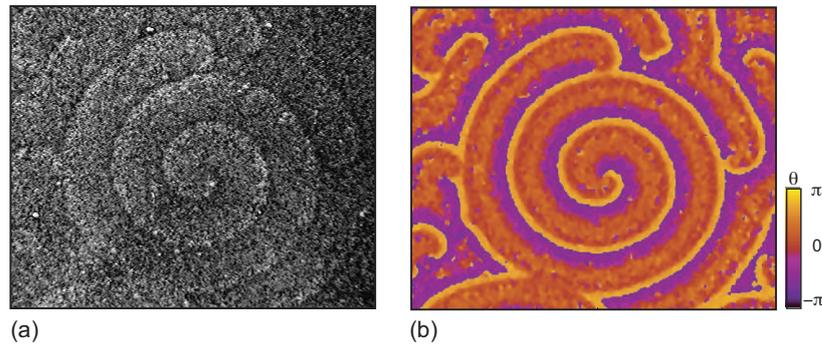


Abbildung 3.6: Momentaufnahme einer Spiralwelle aus den Rohdaten bei *Dictyostelium* (a) und der räumliche Verteilung der rekonstruierten Phasenvariablen (b).

ist, da hier alle Phasenwerte angrenzen. Die Identifizierung erfolgt nach dem Konzept der topologischen Ladung \tilde{C}_t [Mer79, Gor96] und geht auf den mathematischen Formalismus

¹ In den meisten Fällen, die in dieser Arbeit diskutiert werden, führte bereits eine grobe Schätzung (benötigte Zeit für den Aufstieg vom Minimum zum Maximum einer Wellen) zu einer kreisförmigen Aufspannung der Trajektorie im Phasenraum.

von Bray et al. 2001 [Bra01] zurück:

$$\tilde{C}_t = \oint_c \nabla \theta(x, y; t) d\vec{r} = \begin{cases} \pm n \cdot 2\pi, & n = 1, 2, \dots, \quad (\text{Phasensingularität}) \\ 0 \end{cases} \quad (3.4)$$

Das Linienintegral beschreibt einen engen Kreis von 3×3 Pixeln um die Phasensingularität. Dabei ist \vec{r} der Vektor auf den Punkt r auf dem Kreis c . Wie zuvor ist θ die lokale Phasenvariable und ∇ bezeichnet den zweidimensionalen Nabla-Operator ($\nabla = \partial/\partial x + \partial/\partial y$). Liegt im Inneren des geschlossenen Weges c keine Singularität von θ , so ist der Wert des Integrals exakt Null (positive und negative Phasendifferenzen heben sich aufgrund der Stetigkeit von θ auf). Das Vorzeichen des ganzzahligen Wertes \tilde{C}_t wird vom Umlaufsinn der Phasenwerte θ um die Singularität, also vom Drehsinn der Spirale bestimmt. Eine Phasensingularität ist gegeben unter der Bedingung $\tilde{C}_t = \pm n \cdot 2\pi$ (dabei zählt die Größe n die Anzahl der Spiralarme). Abbildung 3.7 zeigt die Momentaufnahme von Erregungsmustern aus einem experimentellen Datensatz (a) und die dazugehörige Darstellung im Phasenraum (b). In Abbildung 3.7(c) ist die räumliche Verteilung der identifizierten Phasensingularitäten gezeigt, welche in (d) ihrer Chiralität entsprechend gekennzeichnet sind. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 200–400 Einzelbilder mit ei-

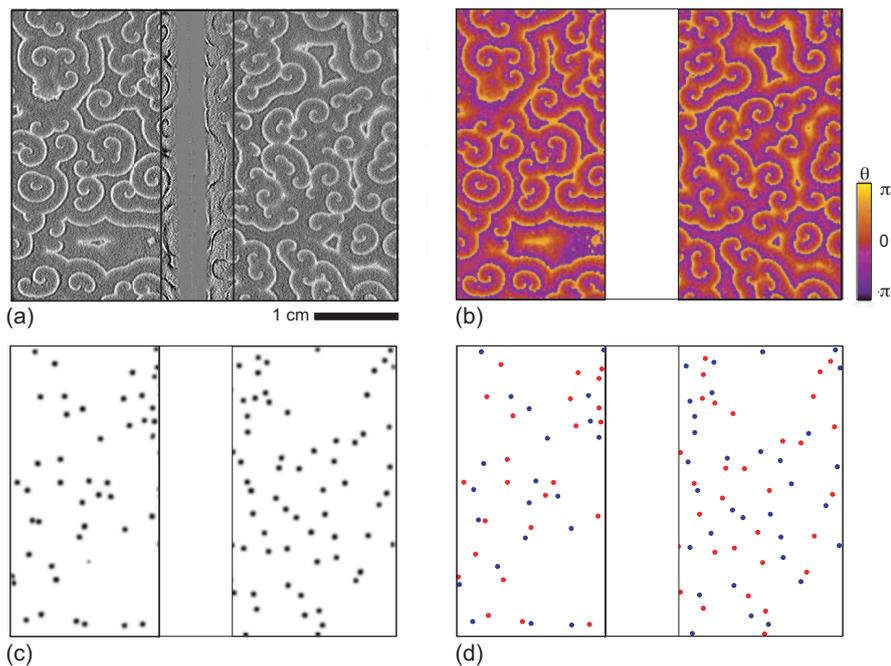


Abbildung 3.7: Momentaufnahme von Erregungsmustern (hier als Differenzenbild) eines raumzeitlichen Datensatzes mit unterteilter Petrischale (a), Repräsentation der einzelnen Bildpunkte im Phasenraum (b), extrahierte Positionen der Phasensingularitäten (c), Phasensingularitäten markiert entsprechend ihrer Chiralität (d)

nem zeitlichen Abstand von 3 s. Für τ wurde ein Wert im Bereich von 15 Bildern gewählt (dies entspricht einem zeitlichen Abstand von 45 s). Die einzelnen Bildpunkte wurden, wie oben beschrieben, im Phasenraum aufgespannt. Daraus ergaben sich individuelle Zeitreihen, aus denen eindeutig der jeweilige Drehwinkel θ bestimmt werden konnte. Die eigentliche Detektion der Phasensingularitäten erfolgte durch die Berechnung des Linienintegrals \tilde{C}_t (Ausdruck (3.4)) für entsprechende Areale von 3×3 Bildpunkten und die zeitliche Mittelung des Integrals über die Einzelbilder.¹

In Abhängigkeit der Datenqualität mussten in einigen Fällen fälschlicherweise als Phasensingularität deklarierte Bereiche (*false positives*) bewertet und erkannt werden. Dies erfolgte in Anlehnung an einen, auf der Bestimmung von Konturlinien basierenden Filter-Algorithmus von Zou et al. (2002) [Zou02]. Anhand der Originaldaten bzw. der Phaseninformationen wurden Konturlinien erstellt und die lokale Krümmung bestimmt. Die Voraussetzung für das Vorhandensein einer Phasensingularität ist eine starke konvexe Krümmung. Durch Annahme einer minimalen Krümmung kann ein großer Teil falsch deklarerter Bereiche identifiziert werden. Eine anschließende Prüfung auf zeitliche Konsistenz unter Einbeziehung der unmittelbaren Nachbarschaft lieferte eine sehr exakte Wiedergabe der tatsächlich vorhandenen Phasensingularitäten. In den folgenden Analysen sind mit „Phasensingularitäten“ stets die auf diese Weise bestimmten Zentren der Spiralwellen bezeichnet.²

3.9.2 Detektion der räumlichen Verteilung von Targetwellen

Dem Verfahren der Targetwellen-Detektion liegt ein von Geberth & Hütt (2009) entwickelter dreidimensionaler Fitmechanismus zugrunde, bei dem ein (in Zylinderkoordinaten parametrisierter) Kegel an den Raumzeitwürfel angepasst wird [Geb09c, Geb09a, Geb10]. Im Vergleich zu herkömmlichen Detektionsverfahren, die von Zeitpunkt zu Zeitpunkt unabhängig voneinander nach kreisförmigen Strukturen suchen, erhöht die im Raumzeitkegel automatisch geforderte zeitliche Konsistenz gerade in stark verrauschten Daten die Qualität der Targetwellen-Detektion um mehrere Größenordnungen. Spiralwellen können alternativ zur Detektion ihrer Phasensingularitäten (Abschn. 3.9.1) analog in einem solchen dreidimensionalen Fitverfahren rekonstruiert werden, wobei sich hier eine Reihe zusätzlicher Anpassungen an die Dynamik der Spiralwellen von *Dictyostelium* (z.B. die zeitliche Entwicklung der Wellenparameter) ergeben, die berücksichtigt werden müssen und die benötigte Rechenzeit um ein Vielfaches erhöhen. Die Implementierung und Entwicklung des in dieser Arbeit verwendeten Verfahrens zur Identifikation von Targetwellen aus raumzeitlichen Daten stammt von Daniel Geberth (Jacobs University Bremen). Die detaillier-

1 Die Berechnung erfolgte mit Dev C++ IDE 4.9.9.2 (Bloodshed Software) und GnuPlot 4.2.2 (Sourceforge).

2 Das komplette Analysepaket wurde von Daniel Geberth (Jacobs University Bremen) in C++ implementiert und zur Verfügung gestellt. Viele Details zur Analyse und beeindruckende Anwendungen auf mathematische Modellsysteme erregbarer Medien können in den Veröffentlichungen von Geberth & Hütt (2008, 2009, 2010) [Geb08, Geb09c, Geb10] und Geberth et al. (2009) [Geb09b] nachgelesen werden.

te Beschreibung der zugrundeliegenden Annahmen und der Detektionsalgorithmus sind in Geberth (2009), Geberth & Hütt (2009, 2010) dargestellt [Geb09a, Geb09c, Geb10]. Dort findet sich auch eine erste Anwendung des Verfahrens auf experimentelle Daten von *Dictyostelium*.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Targetwellen-Detektion nur auf die raumzeitlichen Muster des Automatenmodells angewendet (Abschn. 3.10). Die simultane Untersuchung der Entstehung räumlicher Verteilungen von Target- und Spiralwellen entlang der Zeit in experimentellen Daten kann als äußerst gewinnbringender Ansatz zum Verständnis der Entstehung von Spiralmustern bei *Dictyostelium* betrachtet werden.

3.10 Einfaches mathematisches Modell eines erregbaren Mediums

Zelluläre Automaten sind diskrete mathematische Ansätze zur Erzeugung und Untersuchung globaler Muster auf der Grundlage einfacher lokaler Regeln (siehe z.B. [Wol84, Gay95, BY97, Mik06]). In seiner einfachsten Form ist das Automatenmodell eines erregbaren Mediums ein räumliches Arrangement identischer Elemente, die die Zustände „erregbar“ (Q , *quiescent*), „erregt“ (E) und „refraktär“ (R) in der genannten Reihenfolge durchlaufen. Ein erregbares Element geht unter bestimmten Bedingungen in den erregten Zustand über, wird dann für eine definierte Anzahl von Zeitschritten refraktär, bevor es wieder in den erregbaren Zustand gelangt. Die Interaktion der Elemente und die Refraktärphase führen zur Propagation von Erregungswellen, bei Störung der Wellen bilden sich rotierenden Spiralen. In formaler Sprache lautet das Regelwerk eines einfachen deterministischen Modells folgendermaßen:

1. Ein Element a_{ij} im Q -Zustand geht im nächsten Zeitschritt in den E -Zustand über, wenn bestimmte Nachbarschaftskonstellationen erfüllt sind (z.B. wenn sich eines seiner nächsten Nachbarelemente $\mathcal{N}(a_{ij})$ bereits im E -Zustand befindet)

$$a_{ij} \equiv Q \xrightarrow{E \in \mathcal{N}(a_{ij})} E .$$

2. Ein Element im E -Zustand geht im nächsten Zeitschritt in den R -Zustand über

$$a_{ij} \equiv E \longrightarrow R .$$

3. Wenn $a_{ij} = R$, dann geht das Element im nächsten Zeitschritt wieder in den E -Zustand über, vorausgesetzt es befand sich im Zustand R für eine Zeit Δt , die länger oder gleich der Refraktärzeit τ ist

$$a_{ij} \equiv R \xrightarrow{a_{ij}=R \text{ für } \Delta t \geq \tau} Q .$$

Mit diesen verhältnismäßig einfachen Regeln kann nun (zwar schematisch) die Dynamik der Erregungswellen von *Dictyostelium* nachgebildet werden:

In einem Ensemble von Zellen ist jede Amöbe in der Lage, mit Hilfe ihrer Oberflächenrezeptoren cAMP zu detektieren, das zuvor von den Zellen nächster Nachbarschaft an die Umgebung abgegeben wurde (die Zellen wechseln vom Q -Zustand in den E -Zustand). Sie amplifizieren das Signal durch cAMP-Produktion und Sekretion in die Umgebung. Durch die Erregung gelangen die Zellen in den R -Zustand und bewegen sich senkrecht zur Wellenfront.¹ Nach der Refraktärzeit, die im Bereich einiger Minuten liegt, erlangen die Amöben ihre Sensitivität für cAMP zurück und kehren damit formal erneut in den Q -Zustand zurück.

Um den Zusammenhang zwischen individuellen Zelleigenschaften und der lokalen Signatur dieser Eigenschaften in den raumzeitlichen Mustern untersuchen zu können, wurde eine Variante eines erregbaren Mediums gewählt und modifiziert, welche in der ursprünglichen Form der Kolumne „Computer Recreations“ von Dewdney aus der Zeitschrift *Scientific American* stammt und die Ausbreitung von Infektionen über eine räumlich ausgedehnte Population von Elementen beschreibt [Dew88]. Es handelt sich dabei um ein einfaches zelluläres Automatenmodell mit quasi-kontinuierlichem Zustandsraum, welcher durch ein einfaches Regelwerk in einem bestimmten Parameterbereich phänomenologische Muster räumlich ausgedehnter autokatalytischer Reaktionen hervorbringt (Abb. 3.8). Die Einzel-

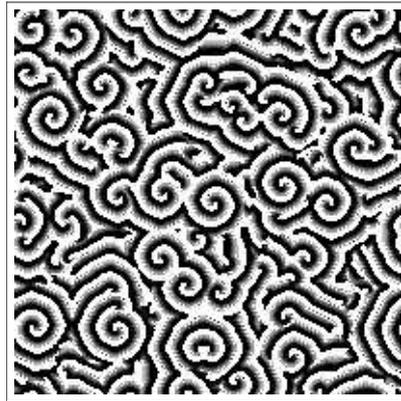


Abbildung 3.8: Momentaufnahmen von Mustern des zellulären Automatenmodells nach Dewdney (1988) nach 2000 Zeitschritten [Dew88]. Die Erregbarkeit wurde auf $g = 28$ festgesetzt. Die anderen Parameter waren $k_1 = 3, k_2 = 3$ und $n = 100$. Der Bildausschnitt hat eine Größe von 200×200 Elementen. Erregbare Elemente (0) sind schwarz, refraktäre Zellen (n) sind weiß. Die grauen Elemente sind im erregten Zustand ($1, \dots, n - 1$).

zellen im experimentellen System werden durch die Verteilung der Elemente repräsentiert. Die räumliche Diskretheit entspricht dabei der diskreten Natur der einzelnen Zellen, der Zustandsraum den durchlaufenen Zustände (erregbar, erregt, refraktär) der Zellen in ihrem Erregungszyklus [Hil07].

¹ Die chemotaktische Zellbewegung wird im Automatenmodell natürlich nicht berücksichtigt, was für die folgenden Fragestellungen von Vorteil ist.

Der quasi-kontinuierliche Zustandsraum ermöglicht nun eine für die folgenden Untersuchungen entscheidende Erweiterung, nämlich die Implementierung individueller Zelleigenschaften, welche analog zu Erregbarkeit und Sensitivität im experimentellen System sind [Hil07].

Der Zustandsraum des Modells ist gegeben durch: $\Sigma = \{0, 1, \dots, n-1, n\}$, wobei erregbare bzw. „gesunde“ Zellen (entsprechend dem Q -Zustand in der allgemeinen Form) durch 0 repräsentiert werden. Erregte bzw. „infizierte“ Elemente (i , E -Zustand) können die Zustände $1, \dots, n-1$ einnehmen (was in der ursprünglichen Form des Epidemiemodells einem Immunisierungszustand der Zellen entspricht) und refraktäre bzw. „kranke“ Elemente haben den Zustand n . Die Elemente werden nach den folgenden Update-Regeln synchron aktualisiert:

$$\begin{aligned} x_{ij} = 0 &\longrightarrow \left[\frac{a}{k_1} \right] + \left[\frac{b}{k_2} \right] \\ x_{ij} = i &\longrightarrow \left[\frac{s}{a+b+1} \right] + g, \quad i \neq 0, n \\ x_{ij} = n &\longrightarrow 0. \end{aligned} \tag{3.5}$$

Dabei ist $[x]$ ist der ganzzahlige Rest von x (also der verbleibende Wert nach Entfernen des Dezimalteils); a entspricht der Anzahl erregter Zellen ($1, \dots, n-1$) und b der Anzahl refraktärer Zellen (n) in der Nachbarschaft \mathcal{N}_{ij} eines Elementes (i, j) ; s gibt die Summe über alle Elemente aus \mathcal{N}_{ij} an.

Die verbleibenden ganzzahligen Modellparameter k_1 und k_2 bestimmen das Maß mit welchem erregte und refraktäre Nachbarelemente einen Einfluss auf die Anregung eines Elementes (also auf den Übergang $0 \longrightarrow i$) haben. Sie legen also formal die Erregungsschwelle fest, analog zur Sensitivität einer Zelle gegenüber dem cAMP-Signal, wobei mit wachsenden Werten von k_1 und k_2 die Sensitivität gegenüber den Nachbarelementen sinkt (analog zu einer wachsenden Resistenz). Die Konstante g reguliert die Rate mit welcher der erregte Zustand (i) durchlaufen wird und entspricht so formal der Erregbarkeit einer Zelle.¹

¹ Um so größer g ist, je schneller wird der erregte Zustand durchlaufen. Da die Refraktärzeit (n) konstant und das gewählte Modell deterministisch ist, kann die Periodenlänge des Erregungszyklus nur über die Rate des Durchschreitens des erregten Zustandes, und damit durch g reguliert werden.

4 Resultate

4.1 Rekonstruktion von Zelleigenschaften aus raumzeitlichen Datensätzen – Variabilität im Automatenmodell

Das vorliegende Kapitel stellt eine erweiterte Fassung von Hilgardt et al. (2007) und Gerberth et al. (2009) dar [Hil07, Geb09b].

Das Automatenmodell eines erregbaren Mediums nach Dewdney (1988) erzeugt in bestimmten Bereichen des Parameterraums eine Dynamik, die qualitativ realen erregbaren Systemen, wie der räumlichen Belousov-Zhabotinsky-Reaktion oder den Erregungsmustern von *Dictyostelium* ähnelt (vgl. Abb. 3.8; [Dew88]).

In Abschnitt 4.1.1 wird zunächst der Parameterraum des Modells untersucht und die Einführung von Variabilität (als Zell-Zell-Unterschiede) in räumlichen Verteilungen zeitunabhängiger Modellparameter realisiert. Diese Parameterverteilungen entsprechen im Modell räumlichen Verteilungen von Elementen mit erhöhter Sensitivität (gegenüber erregter und refraktärer Elemente der unmittelbaren Nachbarschaft) und räumlichen Verteilungen von Elementen mit erhöhter Erregbarkeit (die den Erregungszyklus mit einer erhöhten Rate durchlaufen). Die formalen Eigenschaften solcher Elemente im Modell sollen analog zu *Dictyostelium* für Zellen mit erhöhter Sensitivität für das cAMP-Signal (was einer erhöhten Anzahl oder Affinität der cAMP-Rezeptoren einer Zelle entsprechen könnte) und erhöhter Erregbarkeit (im Sinne einer verkürzten Dauer der Refraktärphase) stehen.

Es ist nun eine entscheidende Frage, ob diese internen Systemeigenschaften mit Hilfe der räumlichen Verteilungen der in Abschnitt 3.8 formulierten Analysegrößen korreliert sind. In Abschnitt 4.1.2 wird daher der Grad der Variabilität interner Zelleigenschaften mit Hilfe der raumzeitlichen Filter (Fluktuationszahl Ω_{ij} und Transinformation I_{ij}) aus den Mustern rekonstruiert und die Leistungsfähigkeit der Analysegrößen bewertet.

In Abschnitt 4.1.3 werden dann die Verteilungen der implementierten Zelleigenschaften mit konkreten Aspekten der Musterbildung, nämlich den lokalen Verteilungen von Phasensingularitäten und Targetzentren in Beziehung gebracht. Eine mögliche Rolle der Mustereigenschaften auf die räumlichen Verteilungen der Observablen Ω_{ij} und Transinformation I_{ij} wird dann in Abschnitt 4.1.4 analysiert.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei allen folgenden Simulationen stets zufällig verteilte Zustände der Elemente als Anfangsbedingungen gewählt.

4.1.1 Qualitative Mustereigenschaften in Abhängigkeit von Variabilität

Abbildung 4.1 zeigt Momentaufnahmen von Mustern des Automatenmodells im (k_2, g) -Parameterraum nach 2000 Zeitschritten bei $k_1 = k_2$. Propagierende Spiralwellen finden

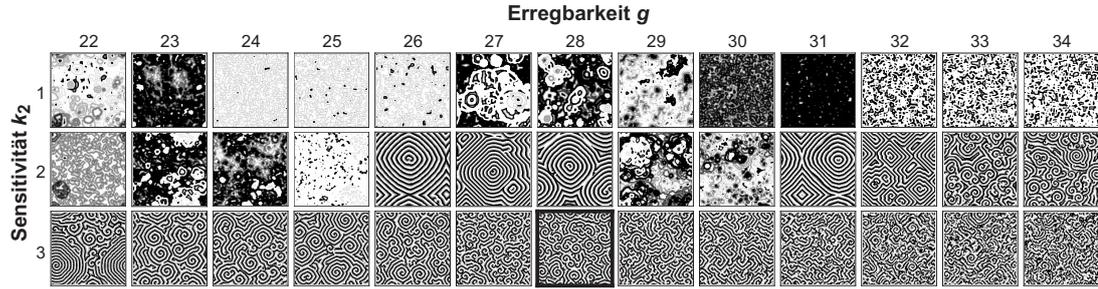


Abbildung 4.1: Muster des Automatenmodells nach 2000 Zeitschritten im (k_2, g) -Parameterraum bei $k_1 = k_2$ und einem Zustandsraum $n = 100$ auf einem Gitter von 200×200 Elementen. Von links nach rechts erhöht sich die Erregbarkeit schrittweise von $g = 22$ auf $g = 34$. Von oben nach unten ist die Sensitivität k_2 im Bereich von 1 bis 3 aufgetragen.

sich in weiten Bereichen des Parameterraums. k_2 hat einen entscheidenden Einfluss auf die Länge der Transienten. Bei $k_2 > 3$ gelangt das System nach wenigen Zeitschritten in einen stationären Zustand in dem alle Elemente erregbar sind. Bei $k_2 = 1$ und $g = 28$ finden sich selbst nach 10 000 Zeitschritten keine kohärenten und langreichweitigen Wellenmuster. Bei $k_2 = 3$ und $g = 28$ benötigt das System etwa 650 Zeitschritte um qualitativ das Muster in Abbildung 4.1 wiederzugeben. Bei $k_2 = 3$ verändert sich in Abhängigkeit von g vor allem die Größe der Einzugsgebiete der Spiralen. Der hervorgehobene Bereich in Abbildung 4.1 ($g = 28$ und $k_2 = 3$) entspricht qualitativ am besten den Mustern von *Dictyostelium* und wurde als Ausgangszustand des Systems, vor der Implementierung von Variabilität gewählt.

Da die Parameter k_2, g (und k_1) zeitunabhängig sind (also nicht von der vorliegenden Nachbarschaftskonstellation bestimmt werden), bietet sich an dieser Stelle die Möglichkeit, diese ortsabhängig zu machen (also $k_2 \rightarrow k_2(ij)$ und $g \rightarrow g(ij)$) und auf diese Weise Variabilität in das System einzuführen. Dies erfolgt durch Verteilungen von Elementen mit niedrigerem k_2 ($k_2 = 2$) und höherem g ($g = 40$), welche nun als k_2^* und g^* bezeichnet werden, vor einer Hintergrundsensitivität $k_2^B = 3$ und einer Hintergrunderregbarkeit $g^B = 28$ der restlichen Elemente. Zur Vereinfachung wurde $k_1 = k_2$ gesetzt (also $k_1^* = k_2^*$ und $k_1^B = k_2^B$).

Die Stärke der Variabilität ν_k und ν_g wird durch den prozentualen Anteil von Elementen mit k_2^* und g^* charakterisiert. Als K_{ij} wird die Matrix (also die räumliche Verteilung) von Elementen mit k_2^* bezeichnet, also Elementen bei welchen der Einfluss der Nachbar-elemente beim Übergang vom erregbaren (0) in den erregten (i) Zustand höher ist als bei den Elementen mit k_2^B . Diese Eigenschaft entspricht einer erhöhten Sensitivität gegenüber den erregten und refraktären Elementen der unmittelbaren Nachbarschaft. Im Gegensatz dazu ist G_{ij} die Verteilung von Elementen mit g^* , welche den erregten Zustand (i) mit einer höheren Rate durchlaufen (vgl. Regelwerk des Automaten in Abschn. 3.10). Diese Eigenschaft soll einer erhöhten Erregbarkeit solcher Elemente entsprechen. Variabilität

wurde auf diese Weise in zwei unterschiedlichen Zelleigenschaften in das System implementiert.

In Abbildung 4.2 sind die Muster des Automatenmodells bei unterschiedlichen Graden von Variabilität (ν_k und ν_g) dargestellt [Hil07]. Dabei wurden von identischen Anfangsbedingungen ausgehend bei jeder schrittweisen Erhöhung die Elemente mit k_2^* und g^* beibehalten und jeweils weiteren Elementen die gesonderten Eigenschaften zugewiesen. In Abbildung 4.2 sind deutlich systematische Änderungen in der Dichte der aktiven Zentren (Targetwellen und Spiralen) und den Mustergeometrien in Abhängigkeit von ν_k und ν_g zu erkennen. Mit wachsendem ν_k werden die räumlichen Einzugsbereiche der Spiralen immer größer. Mit gleichzeitig wachsenden Werten von ν_g geht diese Tendenz zu großen räumlichen Domänen verloren. In Abhängigkeit von ν_g wird vor allem die Mustergeometrie bestimmt. Es etablieren sich zunehmend Targetzentren, ausgehend von den rotierenden Spiralwellen bei niedrigen Werten von ν_g .

Quantitativ wird der Einfluss von ν_k und ν_g im Anteil auftretender Mustergeometrien deutlich. In Abbildung 4.3 ist die Anzahl der auftretenden Phasensingularitäten (a) und der Targetzentren (b) nach 1000 Zeitschritten in Abhängigkeit der Anteile von ν_k und ν_g dargestellt. Beide Mustertypen wurden aus raumzeitlichen Datensätzen mit quasi-stationären Mustern von jeweils 200 Bildern extrahiert. Die Detektion der Phasensingularitäten erfolgte wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben. Die Koordinaten der Targetzentren wurde durch das dreidimensionale Fitverfahren aus Abschnitt 3.9.2 ermittelt. In Abbildung 4.3(a) nimmt die Anzahl der Spiralen mit steigendem ν_k systematisch ab. Im Vergleich mit Abbildung (b) wird deutlich, dass hierfür bei niedrigem ν_g die Ausdehnung der Einzugsbereiche der Spiralen verantwortlich ist, während bei steigendem ν_g die wachsende Anzahl an Targetzentren die Ursache für die kleiner werdende Spiraldichte ist. Damit bestimmen die beiden Arten von Variabilität ganz unterschiedliche Mustereigenschaften. Während die Sensitivität (k_2^*) einen erheblichen Einfluss auf die Größe der Einzugsbereiche der Wellenstrukturen hat, spielt die Erregbarkeit (g^*) eine besondere Rolle bei der Entstehung verschiedener Mustergeometrien.

In Abbildung 4.4 ist die zeitliche Entwicklung beider Mustergeometrien bei $\nu_k = 55$ und $\nu_g = 3,1$ dargestellt. Über den dargestellten Zeitraum von 500–750 Zeitschritten verändern sich die etablierten Mustergeometrien des deterministischen Automatenmodells erwartungsgemäß nicht mehr. Besonders interessant ist diese Art der Musterrekonstruktion in der Zeit für experimentelle Daten von *Dictyostelium* und theoretische Modellsysteme insbesondere zu Beginn der Musterbildung und an den Übergängen zu verschiedenen Mustertypen [Geb09c, Geb09a, Geb10].

4.1.2 Rekonstruktion interner Zelleigenschaften aus den Mustern mit raumzeitlichen Analysewerkzeugen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Muster des Automatenmodells systematische Abhängigkeiten von der Stärke der beiden Formen von Variabilität ν_g und ν_k zeigen, wobei die Stärke der Variabilität durch den Anteil an Elementen mit g^* und k_2^* definiert wurde. Zur Erhöhung von ν_g und ν_k wurden dabei den ursprünglichen Verteilun-

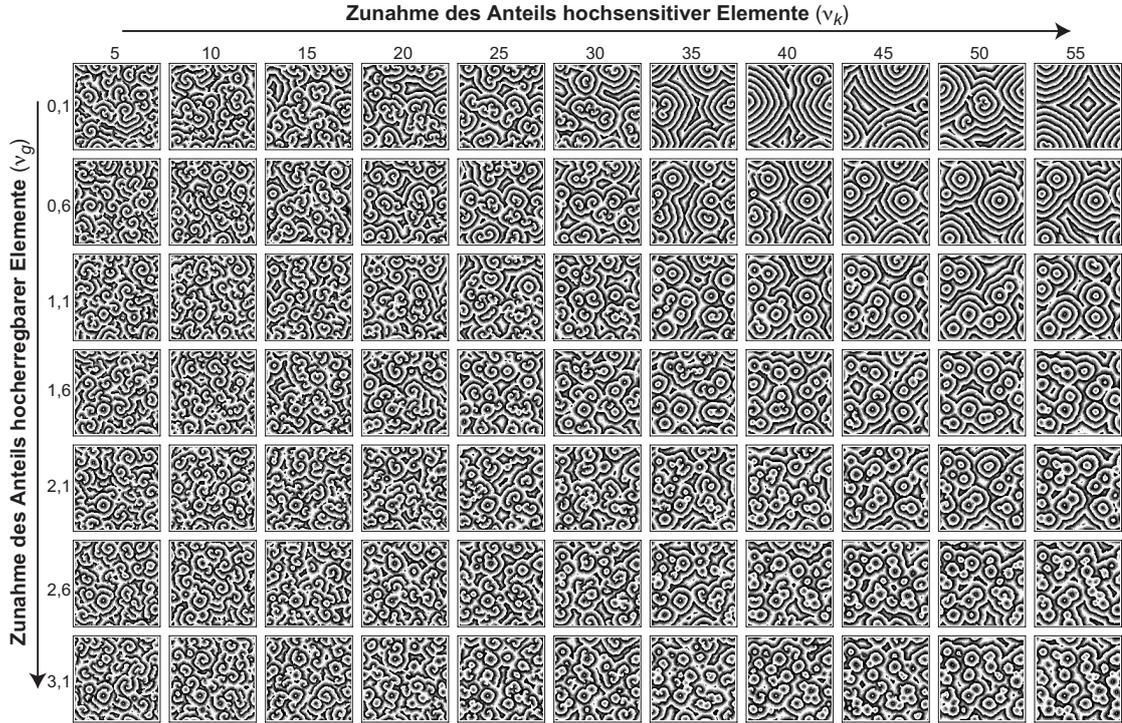


Abbildung 4.2: Momentaufnahmen bei zunehmenden prozentualen Anteilen hochsensitiver (ν_k) und hoherregbarer Elemente (ν_g) nach 1000 Zeitschritten auf einem Gitter mit 132×132 Elementen. Von links nach rechts nimmt der Anteil hochsensitiver Elemente ($k_2^* = 2$) ausgehend von 5% mit einer Schrittweite von 5% auf 55% zu. Von oben nach unten erhöht sich der Anteil an hoherregbaren Elementen ($g^* = 40$) von 0,1% mit einer Schrittweite von 0,5% auf 3,1%. Die Parameterwerte der Hintergrundelemente waren $k_2^B = 3$ und $g^B = 28$. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

gen von hochsensitiven und hoherregbaren Elementen weitere Elemente hinzugefügt. Die Positionen der bereits vorhandenen Elemente mit g^* und k_2^* blieben dabei bestehen. Anders ausgedrückt wurde Variabilität als „Pacemakerdichte“ implementiert, d.h. als Dichte hoherregbarer und hochsensitiver Elemente. Diese beiden Zelleigenschaften, welche in ihrer Gesamtheit zur Erregbarkeit bei *Dictyostelium* beitragen, werden zum Beispiel bei Sawai et al. (2005) diskutiert [Saw05].

An dieser Stelle ist es nun das Ziel, aus den Mustern die zugrundeliegenden lokalen Verteilungen der Zell-Zell-Unterschiede G_{ij} und K_{ij} zu rekonstruieren. Insbesondere soll nun überprüft werden, ob die räumlichen Verteilungen der Analysegrößen mit den internen Verteilungen der Systemeigenschaft „Erregbarkeit“ und „Sensitivität“ korreliert sind. Als Analysewerkzeuge dienten die räumliche Verteilung der Fluktuationzahl Ω_{ij} und die (aus der Zeitentwicklung jedes Bildpunktes) berechnete Transinformation I_{ij} (vgl. Abschn. 3.8). Abbildung 4.5 zeigt die systematische Anordnung der Korrelationskoeffizien-

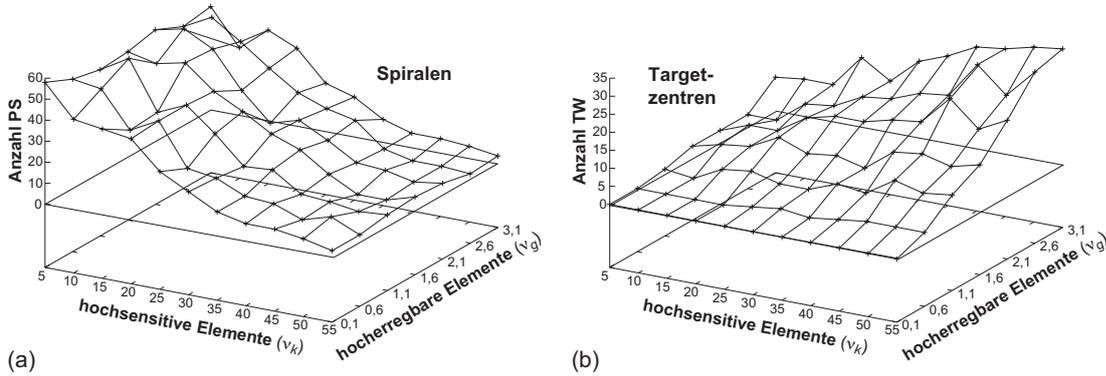


Abbildung 4.3: Anzahl der Phasensingularitäten (a) und der Targetwellen (b) in Abhängigkeit von ν_k und ν_g im Automatenmodell auf einem Gitter von 132×132 Elementen nach 1000 Zeitschritten. Die Modellparameter entsprechen denen in Abbildung 4.2.

ten zwischen den räumlichen Verteilungen der internen Systemeigenschaften G_{ij} bzw. K_{ij} und den räumlichen Verteilungen der Observablen Ω_{ij} bzw. I_{ij} für die in Abbildung 4.2 dargestellten Muster [Hil07]. Die Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} und K_{ij} bleiben erwartungsgemäß mit steigendem ν_g annähernd konstant, ändern sich jedoch systematisch mit wachsendem Anteil an hochsensitiven Elementen ν_k (a). Umgekehrt verhalten sich die Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} und G_{ij} (b). Mit steigendem Anteil hocherregbarer Elemente ν_g nehmen diese Werte systematisch zu. Die Transformation I_{ij} reagiert empfindlich auf G_{ij} (d). Die Korrelationskoeffizienten von I_{ij} und K_{ij} zeigt geringe aber systematische negative Werte (c). Besonders hervorzuheben sind die verhältnismäßig hohen Korrelationskoeffizienten in Abbildung 4.5 (b) und (d), die bei hohen ν_k sogar im Bereich von 0,2 und 0,3 liegen, was auf eine erfolgreiche Rekonstruktion der internen Zell-Zell-Unterschiede sowohl mit Hilfe der Fluktuationszahl Ω_{ij} , als auch mit der Transformation I_{ij} hinweist.

Eine entscheidende Bedingung in Hinblick auf die Anwendung der Analysewerkzeuge auf experimentelle Datensätze von Erregungswellen bei *Dictyostelium*, ist die Robustheit der Resultate, auch bei Verwendung stark verrauschter Ausgangsdaten. Im Automatenmodell kann Rauschen sehr einfach durch Addition eines ganzzahligen Zufallswerts zu x in jedem Zeitschritt erzeugt werden (vgl. Regelwerk (3.5) in Abschn. 3.10). Abbildung 4.6 zeigt Muster nach 1000 Zeitschritten unter dem Einfluss von Rauschen. Die addierten Zufallszahlen waren gleichverteilt zwischen -10 und 10 . Alle anderen Modellparameter entsprachen denen von Abbildung 4.2. Die wesentlichen Eigenschaften der Muster bleiben auch unter Rauschen erhalten (vgl. Abb. 4.2 und Abb. 4.6).

Abbildung 4.7 zeigt die Korrelationskoeffizienten der Observablen Ω_{ij} und I_{ij} und der Verteilungen K_{ij} und G_{ij} unter dem Einfluss von Rauschen, analog zu Abbildung 4.5 bei Bedingungen ohne Rauschen. Die Rekonstruktion der internen Variabilitätsverteilungen ist vom Rauschen völlig unbeschädigt mit Ausnahme der Korrelationen von I_{ij} und K_{ij}

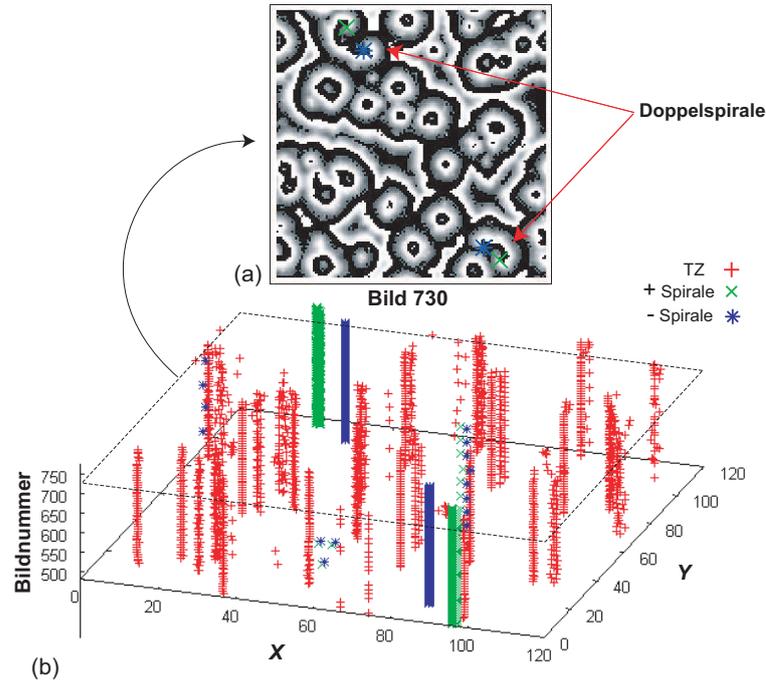


Abbildung 4.4: Momentaufnahme bei $\nu_k = 55$ und $\nu_g = 3,1$ (a) und simultane Rekonstruktion beider Mustergeometrien in Raum und Zeit (b). Die beiden Doppelspiralen in (a) bilden sich als Paare durchgängiger Säulen (grün und blau entsprechend der Chiralität) deutlich innerhalb der Targetzentren (rot) ab.

in (c). In (a), (b) und (d) ist es sogar so, dass die unter Abbildung 4.5 bereits diskutierte systematische Abhängigkeit der Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} von den implementierten Zell-Zell-Unterschiede wesentlich klarer hervortreten. Das trifft insbesondere auf die Fluktuationszahl Ω_{ij} zu (Abb. 4.7(a) und (b)) und liegt in ihrer Eigenschaft begründet, dass die Berechnung von Ω_{ij} immer eines gewissen Anteils an Rauschen bedarf, um systematische Unterschiede zwischen Nachbarelementen detektieren zu können. Rauschen vergrößert also hier den Möglichkeitsraum der nachbarschaftlichen Differenzen, welche die Fluktuationsbedingungen in Gleichung (3.2) durchlaufen. Insgesamt ist deutlich zu erkennen, dass die Rekonstruktion beider Arten von Variabilität sich in ihrer jeweiligen Empfindlichkeit unterscheiden. Während die Verteilungen der hoherregbaren Elemente G_{ij} auch unter Rauschen gut und sogar besser rekonstruiert werden können (vgl. Abb. 4.5(b) und (d) mit Abbildung 4.7(b) und (d)), zeigt die Rekonstruktion der Sensitivität K_{ij} mit Hilfe von Ω_{ij} unter Rauschen keine wesentlichen Unterschiede zum rauschfreien Fall (vgl. Abb. 4.5(a) und Abb. 4.7(a)). Die Rekonstruktion von K_{ij} mit Hilfe von I_{ij} aus verrauschten Daten zeigt allerdings deutliche Unterschiede zum rauschfreien Fall. Die Verstärkung der Rekonstruktion der internen Systemeigenschaften durch Rauschen, welche durch insgesamt höhere Korrelationskoeffizienten und systematischere Abhängig-

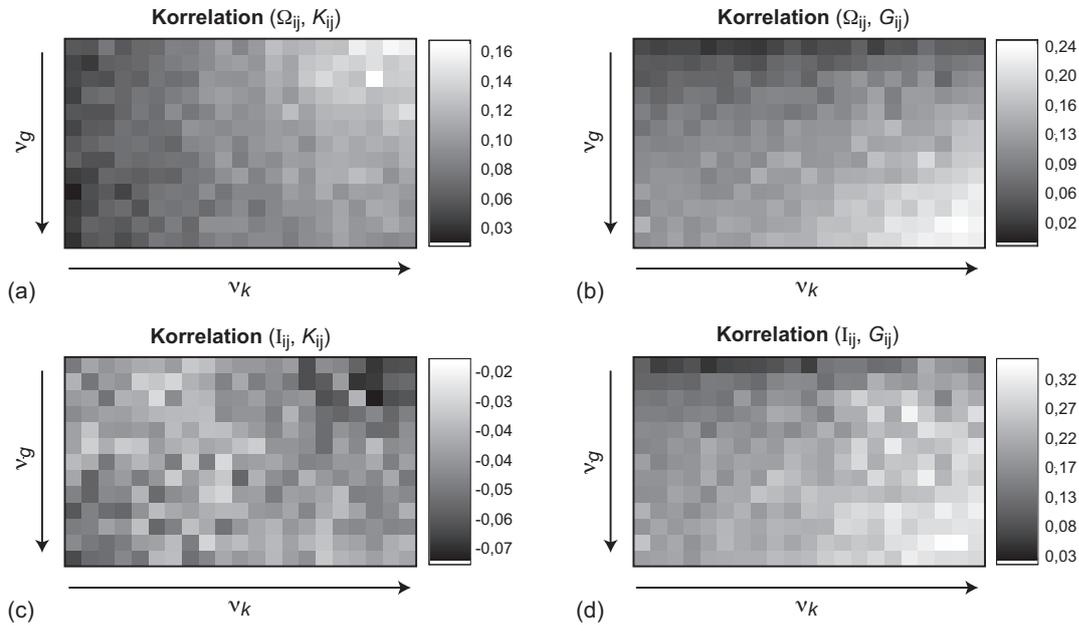


Abbildung 4.5: Korrelationskoeffizienten der Verteilungen der Observablen Ω_{ij} bzw. I_{ij} und der räumlichen Parameterverteilungen interner Zelleigenschaften K_{ij} bzw. G_{ij} der simulierten Daten in Abbildung 4.2. ν_g und ν_k wurden in gleicher Weise (ν_g von 0,1 bis 3,1 %, ν_k von 5 bis 55 %), jedoch mit halber Schrittweite, variiert. Die Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} und der Verteilung hochsensitiver Elemente K_{ij} bleibt mit wachsendem prozentualen Anteil erregbarer Elemente ν_g konstant, ändert sich jedoch systematisch mit steigendem Anteil hochsensitiver Elemente ν_k (a). In gleicher Weise zeigen die Korrelationskoeffizienten zwischen Ω_{ij} und G_{ij} ein sehr systematisches Verhalten mit steigendem Anteil hocheerregbarer Elemente ν_g (b). Die Transinformation I_{ij} beweist ebenfalls die Fähigkeit in der Detektion räumlicher Verteilungen hochsensitiver (c) und hocheerregbarer Elemente (d). Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

keiten von den Parametern in Abbildung 4.7 ausgezeichnet ist, wird noch deutlicher, wenn die jeweiligen Korrelationskoeffizienten als Funktion der Stärke einer der Arten von Variabilität dargestellt werden, während die andere Variabilitätsform konstant gehalten wird. Dies entspricht geraden Schnitten durch die Anordnung der Korrelationskoeffizienten in den Abbildungen 4.5 und 4.7. Die Observablen Ω_{ij} und I_{ij} sind als Funktion von ν_g bei $\nu_k = 20$ für den rauschfreien Fall in Abbildung 4.8(a) und (c), für die Muster mit Rauschen in (b) und (d) dargestellt. Abbildung 4.9 zeigt Ω_{ij} und I_{ij} bei festgehaltenem $\nu_g = 0,6$ in Abhängigkeit von ν_k . Es ist deutlich zu erkennen, dass die Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit von der jeweils rekonstruierten Form von Variabilität unter Rauschen ein systematischeres Verhalten in wesentlich höheren Wertebereichen aufweisen als im rauschfreien Fall.

Um die Empfindlichkeit der beiden Observablen Ω_{ij} und I_{ij} in Bezug auf die Zell-Zell-Unterschiede noch besser beurteilen zu können, wurde in einem numerischen Experiment

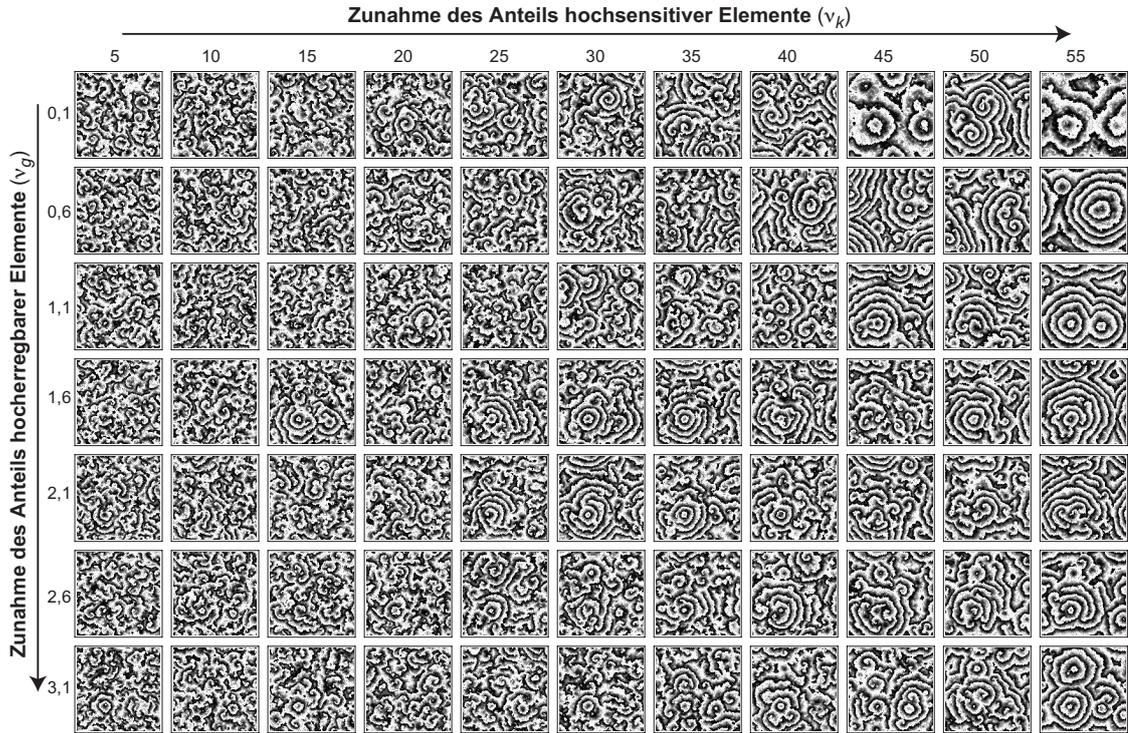


Abbildung 4.6: Momentaufnahmen der Muster nach 1000 Zeitschritten bei zunehmenden Anteilen hoherregbarer und hochsensitiver Elemente unter dem Einfluss von Rauschen. Die Modellparameter und aufgetragenen Wertebereiche entsprechen denen von Abbildung 4.2. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

als elementares Modell einer Pacemakerzelle ein einzelnes hoherregbares Element mit g^* in einem Arrangement von Elementen mit mittlerer Erregbarkeit plaziert, und danach die Rekonstruktion des Pacemakerelements in der (Ω, I) -Ebene verfolgt. In diesem Experiment wurden die Parameter aller Elemente auf $k_2 = 2$ und $g = 25$ gestellt, mit der Ausnahme einer einzigen Koordinate, welche eine Erregbarkeit g^* erhielt, die in aufeinanderfolgenden Simulationen sukzessiv von $g^* = 60$ auf $g^* = 10$ reduziert wurde.

Abbildung 4.10 zeigt die Rekonstruktion einer solchen Pacemakerzelle der Stärke g^* in der (Ω, I) -Ebene. Die Wolke schwarzer Punkte besteht aus (Ω, I) -Werten aller anderen (identischen) Elemente. Ausgehend von einer hohen Erregbarkeit ($g^* = 60$) kann die Trajektorie des Pacemakerelements entlang der graduellen Reduktion seiner Erregbarkeit auf $g^* = 10$ innerhalb der Ebene verfolgt werden. Die systematische Abhängigkeit der Position von g^* in der Ebene ist deutlich zu erkennen. Über weite Bereiche hoher Werte von g^* ($g^* > 46$) und extremer Werte niedriger Erregbarkeit ($g^* < 16$) bewegt sich das Element deutlich außerhalb des Einzugsbereichs der Masse identischer Elemente. Nur wenn sich g^* dem Wert dieser Elemente annähert, ist der Pacemaker innerhalb der (Ω, I) -Ebene nicht zu identifizieren.

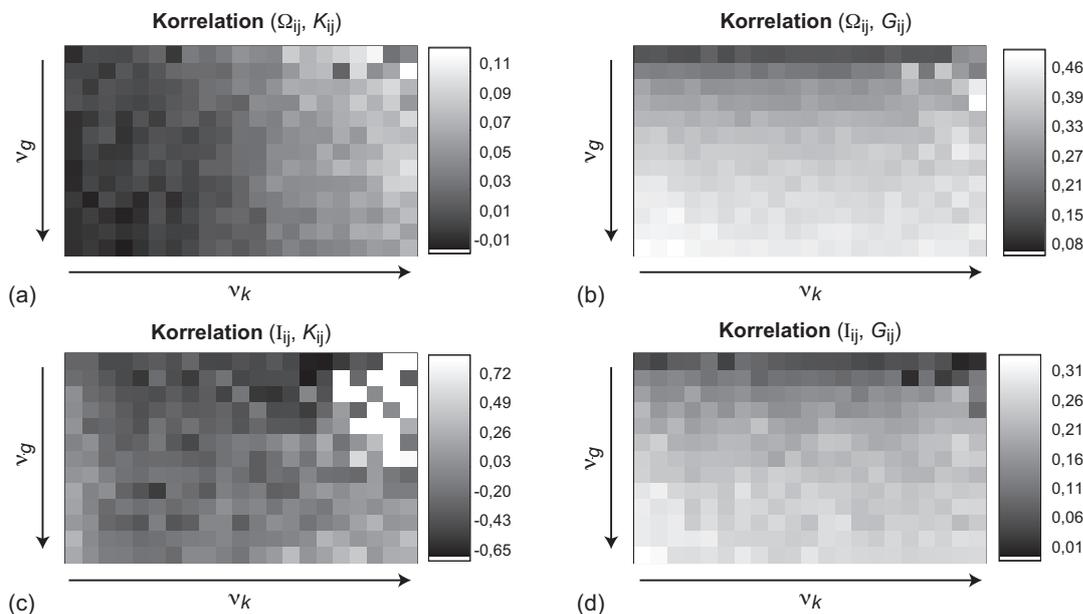


Abbildung 4.7: Korrelationskoeffizienten der Observablen Ω_{ij} bzw. I_{ij} und der Verteilungen von internen Zelleigenschaften K_{ij} bzw. G_{ij} der Muster in Abbildung 4.6 unter dem Einfluss von Rauschen, welches durch die Addition von Zufallszahlen zwischen -10 und 10 implementiert wurde. Aufgetragen sind ν_g von $0,1$ bis $3,1\%$ und ν_k von 5 bis 55% . Die Kapazität der beiden Observablen Ω_{ij} und I_{ij} , die Verteilung hocheffizienter und hocheffizienter Elemente zu detektieren wird durch Rauschen deutlich erhöht. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

Die hier untersuchten Analysegrößen, die Fluktuationzahl Ω und die Transinformation I , sind beide in der Lage, die Verteilungen von Zelleigenschaften näherungsweise aus den simulierten Daten zu extrahieren, d.h. ihre Verteilungen (Ω_{ij} und I_{ij}) werden vor allem durch die internen Zelleigenschaften geprägt. Selbst bei dem hier verwendeten Minimalmodell (zwei Formen von Variabilität, zwei Observablen) wird deutlich, dass die raumzeitlichen Größen unterschiedlich effektiv auf die beiden Formen von Variabilität reagieren. Für die Erweiterung der Analysen auf experimentelle Daten von *Dictyostelium* können solche Ergebnisse, trotz der Einfachheit des Modells, einen großen Beitrag leisten, um einschätzen zu können, welche Form von zellulärer Variabilität den stärksten und dadurch prägendsten Effekt auf die Eigenschaften der späteren Muster in Hinblick auf deren Vorhersagbarkeit haben können.

4.1.3 Rolle der Variabilität auf konkrete räumliche Aspekte der Musterbildung

Ein erster Schritt hin zur Vorhersagbarkeit bestimmter Aspekte der Musterbildung auf der makroskopischen Ebene aus Kenntnis der Verteilung bestimmter Zelleigenschaften

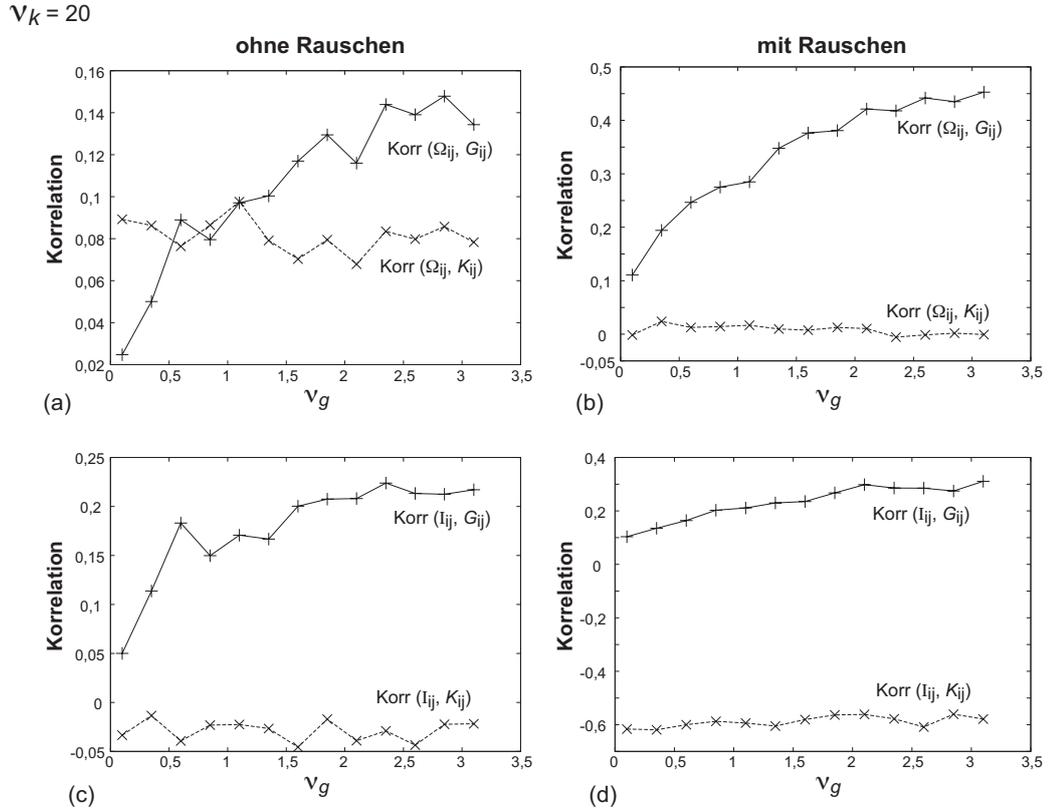


Abbildung 4.8: Korrelationskoeffizienten der rekonstruierten Verteilungen Ω_{ij} bzw. I_{ij} und der Stärke der Erregbarkeit ν_g bei konstantem $\nu_k = 20$. In der linken Bildhälfte sind die Verläufe für rauschfreie Situationen (a) und (c), auf der rechten Seite die der Muster mit Rauschen (b) und (d) dargestellt. Die Diagramme entsprechen Schnitten durch die Anordnung der Korrelationskoeffizienten in den Abbildungen 4.5 und 4.7. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

ist es, konkrete Eigenschaften dieser Muster in Beziehung zu Zell-Zell-Unterschieden zu setzen und so auf mögliche Mechanismen der Musterbildung zurückschließen zu können. Eine konkrete und vor allem einfach zu quantifizierende Eigenschaft der Muster ist die räumliche Verteilung der Phasensingularitäten und Targetzentren. Zell-Zell-Unterschiede liegen in der in Abschnitt 4.1.1 eingeführten Variabilität, also den Verteilungen von Elementen mit höherer Erregbarkeit g^* und höherer Sensitivität k_2^* (im Vergleich zu den identischen Hintergrundelementen mit g^B und k_2^B) begründet. Um einen nicht offensichtlichen, aber möglicherweise vorhandenen systematischen Trend der Muster in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Variabilität statistisch untersuchen zu können, wurden aus einem Ensemble von Elementen mit ortsfesten Pacemaker-elementen (mit g^* und k_2^*) Muster generiert, wobei die Anfangsbedingungen (räumliche Verteilung der Zustände innerhalb des

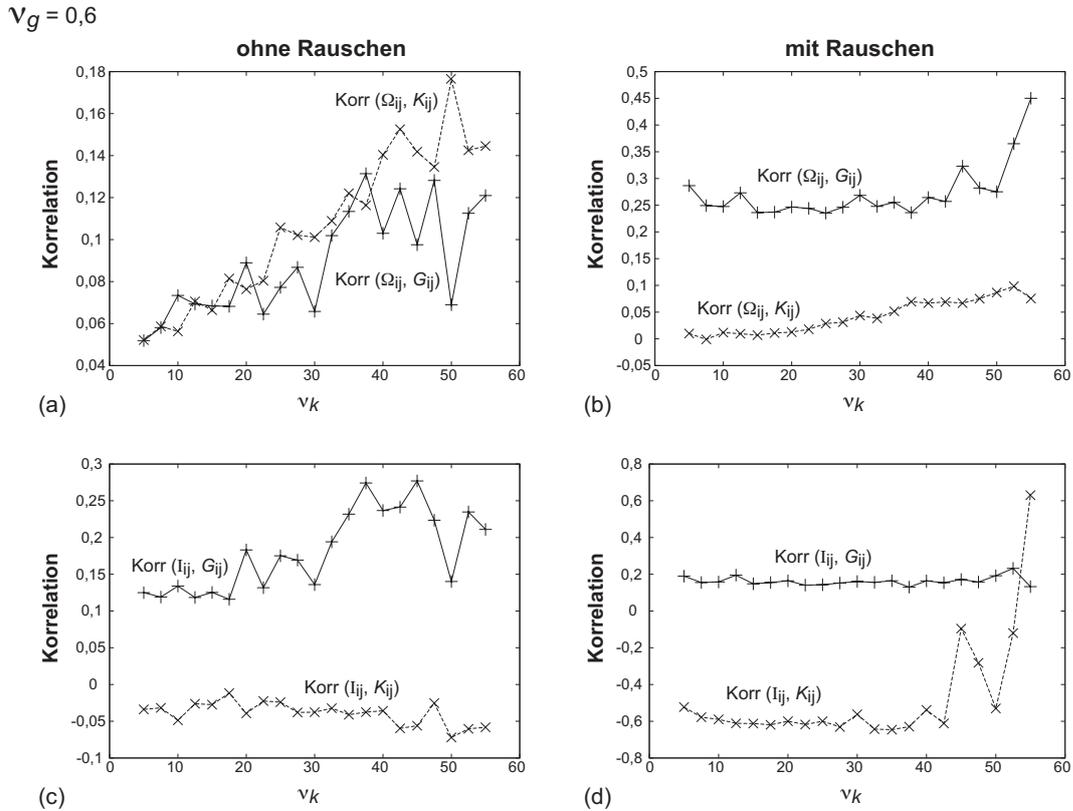


Abbildung 4.9: Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} bzw. I_{ij} in Abhängigkeit der Stärke der Sensitivität ν_k bei konstantem $\nu_g = 0,6$ im rauschfreien Fall (a), (c) und bei den von Rauschen beeinflussten Mustern (b), (d). Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

Zustandsraums Σ) in den insgesamt 1000 durchgeführten unabhängigen Berechnungen zufällig variiert wurden [Geb09b]. In Abbildung 4.11 ist die räumliche Parameterverteilung der Erregbarkeit (a) und der Sensitivität (b) dargestellt. (c) zeigt die sich nach 1000 Simulationen ergebende Dichte auftretender Phasensingularitäten und entspricht der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Entstehung einer Phasensingularität. Vergleicht man diese Mustereigenschaften in (c) mit den Zelleigenschaften (Parameterverteilungen) in (a) und (b), so ergibt sich eine äußerst starke optische Korrelation zwischen Bereichen hoher Spiraldichte und der lokalen Verteilung hocherregbarer und hochsensitiver Elemente. Für jede Position mit g^* gilt die maximal beobachtete Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Phasensingularität in den späteren Mustern. Es ist also statistisch mit einer überdurchschnittlich hohen Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Phasensingularität an Orten mit g^* zu rechnen. Das gleiche trifft, nur mit einer weniger deutlichen Ausprägung auf die Beziehung zwischen der Elementen mit k_2^* und Orten hoher Spiral-

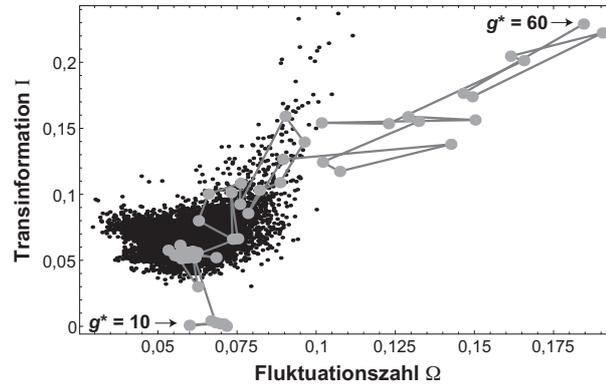


Abbildung 4.10: Rekonstruktion eines einzelnen Pacemakerelements in der (Ω, I) -Ebene als Funktion der Erregbarkeit g^* („Pacemakerstärke“), die in aufeinanderfolgenden Simulationen schrittweise von 60 auf 10 erniedrigt wurde. Die Erregbarkeit der anderen Elemente betrug $g = 25$. Die verbleibenden Parameter hatten die Werte $k_1 = k_2 = 2$. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2007) [Hil07].

dichte zu, wobei die Wahrscheinlichkeit für eine Phasensingularität bei Elementen mit k_2^* , aber g^B nur geringfügig höher ist, als bei Elementen mit k_2^* und g^* . Trotzdem besteht bei beiden Zelleigenschaften, sowohl der Erregbarkeit, als auch der Sensitivität ein systematischer Trend zur Bildung von Spiralen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Damit lassen sich statistisch grundlegende Aspekte der Muster bei Kenntnis der Parameterverteilung vorhersagen.

Bei all diesen Simulationen muss betont werden, dass die Ergebnisse (aufgrund der räumlichen und zeitlichen Diskretisierung und ebenso der Zustandsdiskretisierung) sehr stark von den Details der Simulationen (vor allem von den Anfangszuständen der Elemente) abhängen. Vergleichbare Befunde an kontinuierlichen (auf Differentialgleichungen basierenden) *Dictyostelium*-Systemen finden sich in Geberth (2009) [Geb09a] und Geberth & Hütt (2008, 2009) [Geb08, Geb09c, Geb09a].

Korreliert man nun die aus den Mustern des Automatenmodells detektierte räumliche Verteilung der Phasensingularitäten mit den aus diesen Mustern berechneten Verteilungen in Ω_{ij} und I_{ij} , so ergeben sich deutlich positive und verhältnismäßig hohe Korrelationskoeffizienten (rote Datenpunkte in Abb. 4.12) im Vergleich zur Korrelation mit zufälligen Verteilung von Phasensingularitäten gleicher Anzahl und Größe (schwarze Datenpunkte). Die positiven Werte bleiben auch bei Parameterpaaren von g^* und k_2^* erhalten, die nur wenige Phasensingularitäten hervorbringen, zeigen jedoch eine geringfügige Abhängigkeit von der Anzahl vorhandener Phasensingularitäten durch kleiner werdende Korrelationen. Die Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} und I_{ij} und den räumlichen Verteilungen der Targetzentren weisen im Gegensatz dazu keine deutlich positiven Werte auf und bewegen sich um Null (blaues Gitter in Abb. 4.12).

An dieser Stelle soll nun untersucht werden, welche Wertebereiche von Ω_{ij} und I_{ij} zu den hohen Korrelationskoeffizienten mit den Phasensingularitätsverteilungen beitragen.

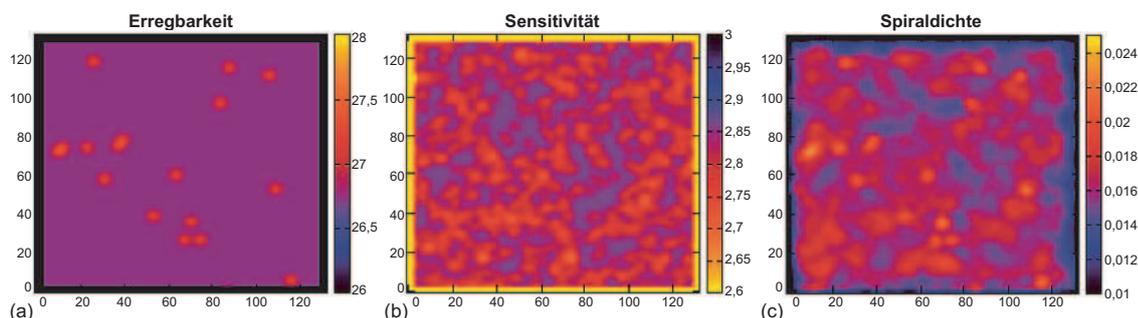


Abbildung 4.11: Räumliche Parameterverteilung und die sich ergebende Häufigkeitsverteilung der Phasensingularitäten nach 1000 Simulationen bei fixierter Pacemakerverteilung auf einem Gitter mit 130×130 Pixeln. In (a) ist die räumliche Verteilung der Erregbarkeit mit $g^* = 28$ und $g^B = 26,65$ dargestellt. (b) entspricht der räumlichen Verteilung der Sensitivität mit $k_1^* = k_2^* = 2,6$ und $k_1^B = k_2^B = 2,85$. Zur Vermeidung von Artefakten der Diskretisierung wurden die Elemente mit einem Gaußfilter räumlich geglättet ($\sigma = 2$). Die, nach 1000 Programmdurchläufen bei zufällig gewählten Anfangsbedingungen, beobachtete räumliche Dichte der Phasensingularitäten in (c) entspricht der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Phasensingularität. Die Einzelabbildungen stammen aus Geberth et al. (2009) [Geb09b].

Von beiden Verteilungen der Observablen Ω_{ij} und I_{ij} wurden die jeweils höchsten und niedrigsten Werte der errechneten Verteilungen extrahiert und räumlich aufgetragen. In Abbildung 4.13 ist eine Anordnung solcher Verteilungen am Beispiel eines Musters mit wenigen Spiralen zu sehen. Die zugrundeliegenden Muster stammen aus einer Zeitreihe des Automatenmodells mit $\nu_g = 10$ und $\nu_k = 55$. Momentaufnahmen dieser Muster sind in (c) zu sehen. In (a) und (b) sind die räumlichen Verteilungen der 100 höchsten und 30 niedrigsten Ω_{ij} dargestellt. (d) und (e) zeigt solche Verteilungen für die 100 maximalen und 30 minimalen Werte von I_{ij} . Die extremalen Elemente sind jeweils weiß, die restlichen Elemente schwarz gefärbt. Hohe Werte beider Observablen in (a) und (d) konzentrieren sich auf die räumlichen Positionen der Spiralspitzen in (c). Die niedrigen Werte von Ω_{ij} und I_{ij} in (b) und (e) sind vor allem in Bereichen ohne Phasensingularitäten, insbesondere in den Grenzgebieten der einzelnen Spiraldomänen zu finden. Erstaunlich ist es, dass sich beide Observablen in der räumlichen Verteilung extremaler Werte recht ähnlich verhalten, obwohl im Fall der Fluktuationszahl Ω_{ij} unmittelbare Nachbarschaften einzelner Bildpunkte einen Beitrag leisten, während die Transinformation I_{ij} unabhängig von nachbarschaftlicher Information berechnet wird. Zu bemerken ist auch, dass die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} nie systematisch Werte von Null aufweisen, die diese Korrelationen erzeugen könnten.

4.1.4 Rolle der Mustereigenschaften auf die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij}

In Abschnitt 4.1.2 und insbesondere in Abbildung 4.5 wurde gezeigt, dass Variabilität in Form von Verteilungen in g^* und k_2^* mit Hilfe der Fluktuationszahl Ω_{ij} und auch der

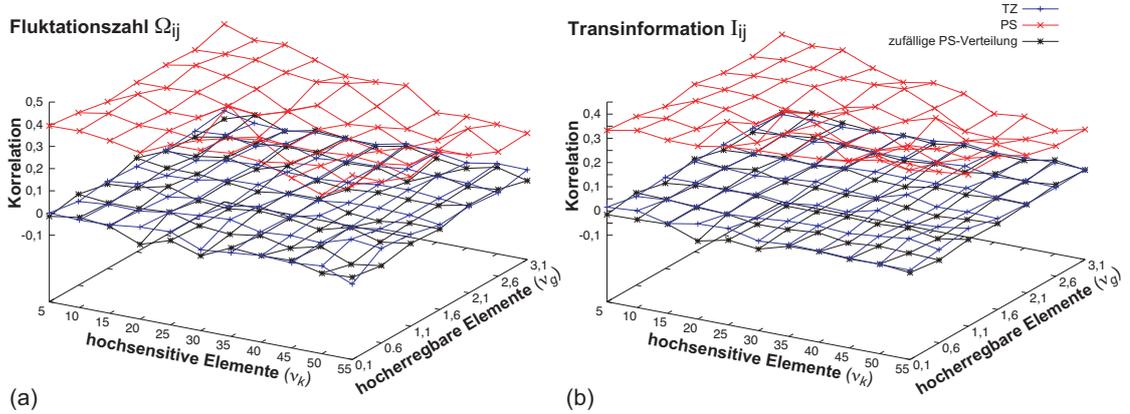


Abbildung 4.12: Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} (a) und I_{ij} (b) und der räumlichen Verteilung der detektierten Phasensingularitäten (rot) und Targetzentren (blau) im Vergleich zur Korrelation mit zufällig verteilten Phasensingularitäten gleicher Zahl und Größe (schwarz) bei $g^* = 40$, $g^B = 28$, $k_1^* = k_2^* = 2$ und $k_1^B = k_2^B = 3$. Ω_{ij} und I_{ij} wurden aus Intervallen von jeweils 200 Bildern (nach 800 Zeitschritten) berechnet. Hier waren die Muster bereits etabliert. Zur Vermeidung von Artefakten wurden sowohl die tatsächlich detektierten, als auch die zufälligen Verteilungen der Phasensingularitäten, ebenso wie die Koordinaten der Targetzentren einer räumlichen Gauß'schen Glättung ($\sigma = 2$) unterzogen. Während die Korrelationen zwischen den Observablen Ω_{ij} und I_{ij} und der Verteilung der Phasensingularitäten verhältnismäßig hohe Werte aufweisen, bewegen sich die Korrelationskoeffizienten der Targetzentren und der zufälligen Verteilungen von Phasensingularitäten für Ω_{ij} und I_{ij} um Null.

Transinformation I_{ij} erfolgreich rekonstruiert werden kann. Dabei führen höhere Anteile an Variabilität zu höheren Korrelationen. Besonders instruktiv und ein direkter Hinweis darauf ist hier zum einen die Verstärkung des Rekonstruktionsgrades in Anwesenheit von Rauschen (Abb. 4.7), das selbst keine qualitativen Auswirkungen auf die Muster hat (Abb. 4.6) und zum anderen das hohe Potential beider Observablen bei der Identifizierung eines individuellen Pacemakerelements innerhalb einer Umgebung aus Elementen gleicher Parameterkonstellationen (Abb. 4.10). Diese beiden Zusammenhänge sind entscheidende Hinweise darauf, dass Zell-Zell-Unterschiede mit Hilfe von Ω_{ij} und I_{ij} tatsächlich aus den Mustern detektiert werden können. Gleichzeitig weist die tendenzielle Erniedrigung der Korrelationskoeffizienten zwischen den Verteilungen der Phasensingularitäten und Ω_{ij} bzw. I_{ij} mit wachsendem ν_k auf einen möglichen Beitrag der Mustereigenschaften (insbesondere die Größe der Einzugsgebiete und damit die Anzahl an Phasensingularitäten) zu den berechneten Verteilungen hin. Wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist, zeigen die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} einen hohen Grad der Korrelation mit den räumlichen Verteilungen der Phasensingularitäten der Muster, jedoch keine Korrelation mit den Verteilungen der Targetzentren. In Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 ist zu erkennen, dass die Parameterkombinationen von ν_k und ν_g erheblichen Einfluss auf die Mustergeometrie und Größe der einzelnen Strukturen haben. Dabei wachsen bei Zunahme von ν_k besonders die Einzugs-

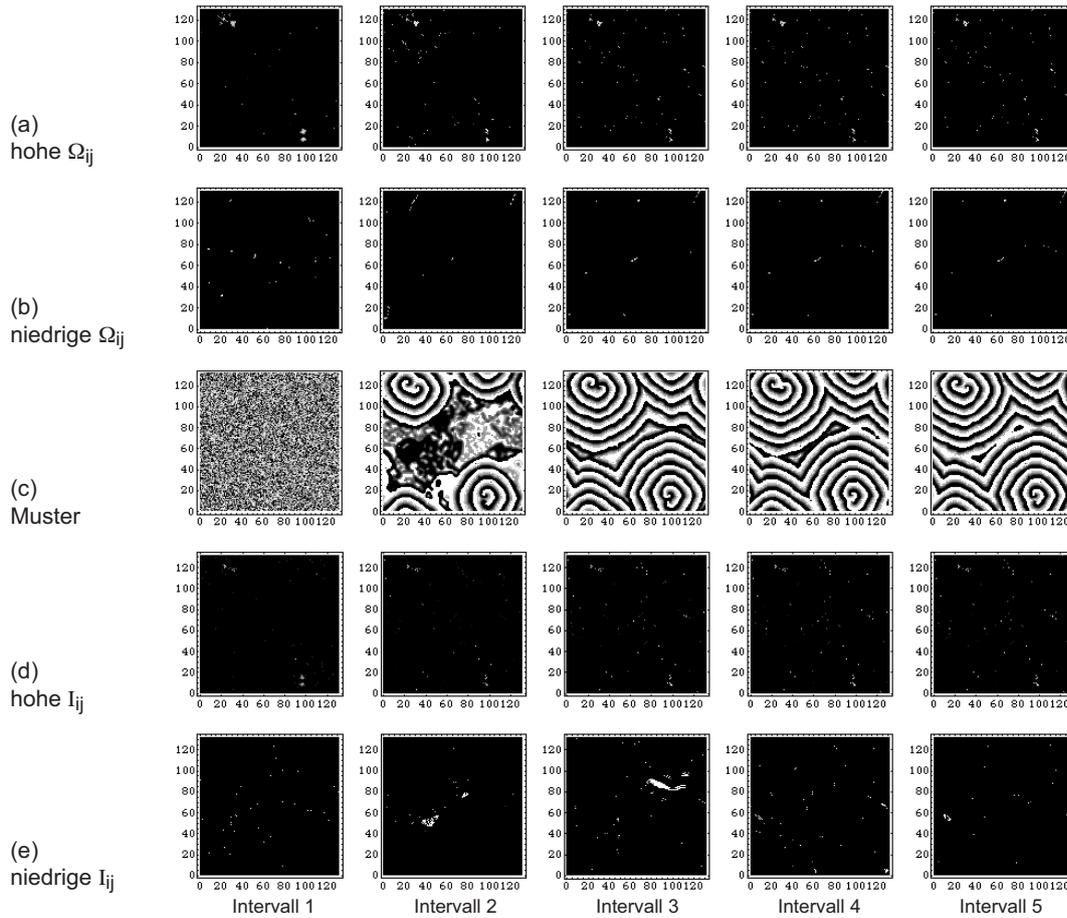


Abbildung 4.13: Extremale Werte von Ω_{ij} und I_{ij} aus fünf aufeinanderfolgenden Intervallen von jeweils 200 Bildern bei $\nu_g = 10$, $\nu_k = 55$ und $g^* = 40$, $g^B = 28$, $k_1^* = k_2^* = 2$ und $k_1^B = k_2^B = 3$. Die entsprechenden Elemente sind weiß, die restlichen Elemente in schwarz dargestellt. In (a) und (b) sind die 100 höchsten und 30 niedrigsten Werte von Ω_{ij} aufgezeigt, in (d) und (e) die 100 höchsten und 30 niedrigsten Werte von I_{ij} . (c) zeigt Momentaufnahmen der zugrundeliegenden Muster der zur Berechnung unterteilten Bildintervalle, wobei hier jeweils das erste Bild eines Intervalls abgebildet ist.

gebiete der Strukturen an, während bei wachsenden ν_g ein Übergang von Spiralmustern zu Targetmustern beobachtet werden kann. In Abbildung 4.13 wurde dann gezeigt, dass besonders hohe Fluktuationszahlen und hohe Werte der Transinformation an den Orten der Phasensingularitäten auftreten, während häufig niedrige Werte an den Orten sich auslöschender Wellenfronten zu finden sind. Die Tatsache, dass extremale Werte von Ω_{ij} und I_{ij} in ausgezeichneten Bereichen der Muster auftreten (Abb. 4.13) und dass die Korrelation bei wachsendem ν_k tendenziell niedriger wird, könnte auf ganz unterschiedliche Zusammenhänge zurückgeführt werden:

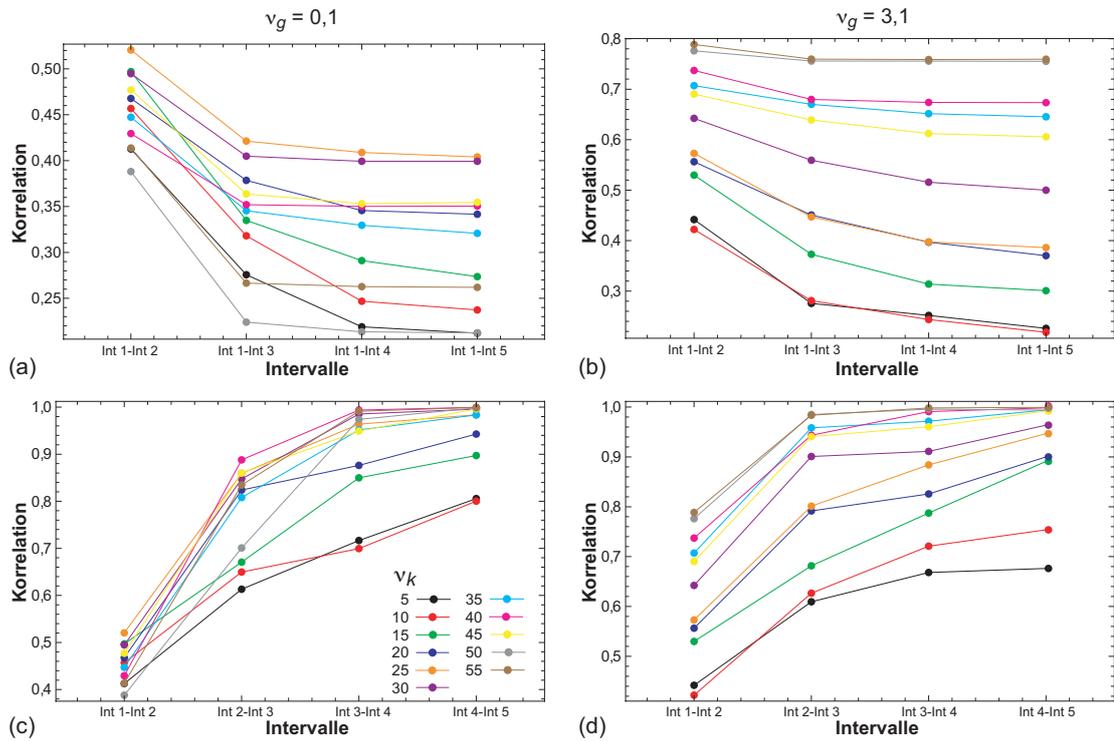


Abbildung 4.14: Korrelationskoeffizienten der Verteilungen von Ω_{ij} aufeinanderfolgender Bildintervalle. In (a) und (b) wurde Intervall 1 mit allen folgenden Intervallen korreliert, in (c) und (d) beträgt der Abstand zwischen den korrelierten Intervallen immer genau ein Intervall. Für (a) und (c) wurden Muster bei niedrigem ν_g , für (b) und (d) bei hohem ν_g verwendet.

(1) Mit Hilfe der Observablen wird Variabilität rekonstruiert, wobei gleichzeitig lokale Zell-Zell-Unterschiede die Strukturen entscheidend prägen (Elemente mit g^* und k_2^* führen durch eine lokale Störung der Wellenfront direkt zur Entstehung von Spiralen).

(2) Die Rekonstruktion von Variabilität aus den Mustern wird durch einen Beitrag der Mustereigenschaften zu Ω_{ij} und I_{ij} teilweise überlagert.

An dieser Stelle ist es nun also ein wichtiger Schritt, zwischen dem Beitrag der Mustereigenschaften und dem Beitrag der zugrundeliegenden Variabilität zu den aus den Mustern berechneten Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} zu unterscheiden. Um zu überprüfen, ob die Mustergeometrien (Spiralen oder Targetzentren) und die Größe ihrer jeweiligen Einzugsgebiete einen Einfluss auf die beiden Messgrößen haben, wurden die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} (die aus einzelnen aufeinanderfolgenden Intervallen von jeweils 200 Bildern einer Zeitreihe ermittelt wurden) miteinander korreliert. In Abbildung 4.14(a) und (b) sind die Korrelationskoeffizienten von Ω_{ij} aus Intervall 1 (Bild 1–201) und den Verteilungen der Folgeintervalle (Int.2: Bild 201–401, Int.3: Bild 401–601, Int.4: Bild 601–801 und Int.5:

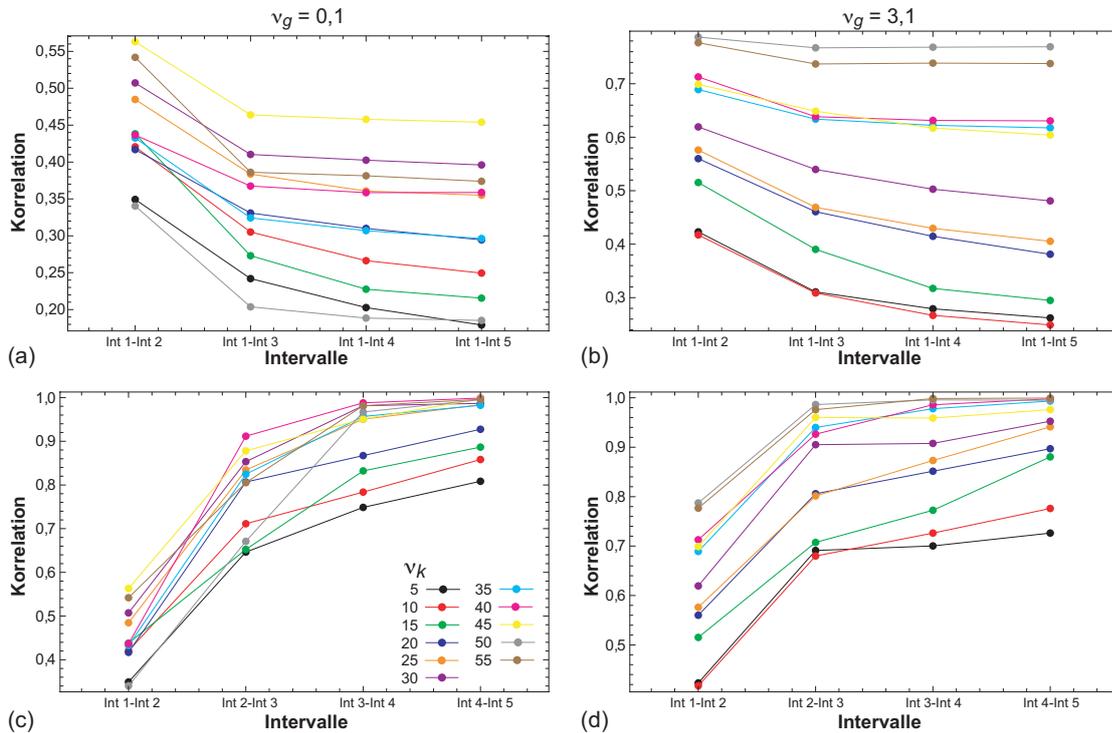


Abbildung 4.15: Korrelationskoeffizienten der I_{ij} -Verteilungen aufeinanderfolgender Bildintervalle. Die Parameterkombinationen entsprechen denen aus Abbildung 4.14.

Bild 801–1001) dargestellt. Der zeitliche Abstand der miteinander korrelierten Verteilungen der Zeitreihen nimmt demnach mit jedem Datenpunkt von links nach rechts um ein Intervall zu. Für Abbildung 4.14(a) wurden die Muster bei niedrigen $\nu_g = 0,1$, in (b) mit hohem $\nu_g = 3,1$ in Abhängigkeit von ν_k untersucht. Die zugrundeliegenden Muster entsprechen in ihren Eigenschaften solchen, wie sie in Abbildung 4.2 dargestellt sind. In (c) und (d) sind die Korrelationskoeffizienten der Verteilungen Ω_{ij} zwischen den aufeinanderfolgenden Intervallen (Int.1 und Int.2, Int.2 und Int.3 usw.) in Abhängigkeit von ν_k abgebildet, wieder bei $\nu_g = 0,1$ (c) und $\nu_g = 3,1$ (d). Hier beträgt der Abstand zwischen den korrelierten Intervallen also immer ein Intervall.

Allgemein beobachtet man einen erwartungsgemäßen Abfall der Korrelation zwischen Ω_{ij} -Verteilungen bei höherem zeitlichen Abstand, ebenso wie einen Anstieg (bei festem zeitlichen Abstand) mit wachsender Zeit, da sich immer stärker stabile Muster etablieren. Der hier diskutierte zelluläre Automat weist typischerweise nach einem Transienten sehr stabile, quasi-stationäre Muster auf. Dies erklärt die zum Teil sehr hohen Korrelationskoeffizienten. Würde die Anzahl der Phasensingularitäten die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} tatsächlich prägen (da hohe Werte von Ω_{ij} und I_{ij} insbesondere an den Spiralzentren auftreten, die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} aber nicht mit den Verteilungen der

Targetzentren korreliert sind; vgl. Abb. 4.12), müssten die Korrelationskoeffizienten der Verteilungen mit steigendem ν_k und ν_g systematisch kleiner werden, da im ersten Fall die Strukturen größer werden und im zweiten Fall die Spiralmuster in Targetzentren übergehen, also insgesamt die räumliche Dichte der Phasensingularitäten mit der Parametervariation abnimmt. Auf Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15 bezogen, bedeutet dies, dass sich die einzelnen Verläufe mit unterschiedlichen ν_k innerhalb der jeweiligen Unterabbildungen systematisch aufspalten müssten, wobei die mittlere Korrelation mit steigendem ν_k größer werden müsste. Die mittleren Korrelationskoeffizienten beider Abbildungen müsste dagegen bei $\nu_g = 0,1$ (jeweils in (b) und (c)) niedriger als bei $\nu_g = 3,1$ (jeweils in (a) und (d)) sein. Während in Abbildung 4.14(a) und Abbildung 4.15(a) keine eindeutige systematische Anordnung der einzelnen Verläufe in Abhängigkeit von ν_k beobachtet werden kann, ist dies jedoch jeweils in (b) deutlich zu sehen. Allerdings nehmen hier die Werte der Korrelationskoeffizienten mit steigendem ν_k sehr systematisch zu und nicht ab. Die Korrelationskoeffizienten in den jeweiligen Abbildungen sind bei $\nu_g = 3,1$ insgesamt deutlich höher als bei $\nu_g = 0,1$. Bei einer Abhängigkeit der Korrelationen von der Anzahl an Phasensingularitäten wäre dagegen eine Erniedrigung mit steigendem ν_g zu erwarten gewesen. Diese Ergebnisse können in folgender Weise gedeutet werden: Aus Abbildung 4.14(a) und Abbildung 4.15(a) ergibt sich, dass die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} nicht von der Größe der Einzugsgebiete der Muster abhängen. Auch die systematische Verringerung der Anzahl an Phasensingularitäten mit wachsendem ν_k und niedrigem ν_g hat keinen sichtbaren Effekt auf die Korrelationskoeffizienten. Die systematische Aufspaltung der Verläufe in Abhängigkeit von ν_k bei hohen ν_g in den Abbildungen 4.14(b) und Abbildung 4.15(b) weist (falls dieser Effekt tatsächlich durch die Mustereigenschaften bewirkt wird) darauf hin, dass die Geometrie der Muster eine nicht offensichtliche Rolle bei der Berechnung von Ω_{ij} und I_{ij} spielen könnte oder dass Ω_{ij} und I_{ij} empfindlicher auf Variabilität in Form von gesteigerter Erregbarkeit (also Elemente mit g^*), als auf eine erhöhte Affinität gegenüber dem Signal (also Elemente mit k_2^*) reagieren, was konsistent mit den hohen Korrelationskoeffizienten in Abbildung 4.5 und Abbildung 4.7 bei hohem ν_g ist.

Da niedrige Werte von Ω_{ij} und I_{ij} aus dem optischen Eindruck von Abbildung 4.13 auch an den Orten sich auslöschender Wellenfronten zu finden sind, dürfte bei einer Abhängigkeit der Verteilungen Ω_{ij} und I_{ij} von solchen Orten keine Wirkung auf die Korrelationskoeffizienten bei gleichbleibender Größe der Strukturen, also in Abhängigkeit von ν_g bei niedrigen ν_k , zu finden sein. Insgesamt sind die Korrelationskoeffizienten bei $\nu_g = 3,1$ deutlich höher als bei $\nu_g = 0,1$. Allerdings unterscheiden sich die Koeffizienten bei niedrigen ν_k weniger als bei hohen Parameterwerten, was für eine Rolle der Musterbereiche an Orten sich auslöschender Wellenfronten sprechen könnte.

Ein Einfluss der Muster auf Ω_{ij} und I_{ij} kann auch im Verlauf der Korrelationskoeffizienten bei gleichbleibendem Abstand der korrelierten Intervalle abgelesen werden ((c) und (d) in Abb. 4.14 und Abb. 4.15). Obwohl die Abstände zwischen den Intervallen gleich sind, sind spätere aufeinanderfolgende Intervall, deutlich stärker miteinander korreliert, als beispielsweise Intervall 1 und Intervall 2. Dies deutet auf einen globalen Effekt der Musterdynamik auf Ω_{ij} und I_{ij} hin, der wie oben erwähnt mit dem Transienten vor Er-

reichen des asymptotischen Zustands der Muster in Zusammenhang steht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verteilungen Ω_{ij} und I_{ij} Variabilität im Automatenmodell rekonstruieren können, dass jedoch auch Mustereigenschaften in die beiden Größen einfließen, wobei die Größe der Strukturen, ebenso wie die Anzahl an Phasensingularitäten keinen Effekt auf die Verteilungen hat.

4.2 Untersuchung von Zellschichten mit unterschiedlichen Eigenschaften der Signaltransduktion

Die im vorangegangenen Abschnitt am Automatenmodell untersuchten raumzeitlichen Filter Ω und I wurden im folgenden Schritt auf experimentelle Datensätze von *Dictyostelium* angewendet mit dem Ziel, individuelle Zelleigenschaften sichtbar zu machen. Um die Bedeutung der daraus resultierenden Verteilungen der beiden Observablen angemessen interpretieren zu können, wurde zunächst in Anlehnung an Lauzeral et al. (1997) die Verteilung der Zellen entlang des Entwicklungspfades experimentell verändert [Lau97].

Für die Ergebnisse in Abschnitt 4.2.1 wurden daher die Zellen in ihrem Zellzyklus synchronisiert. Nach Lauzeral et al. (1997) besitzt eine synchrone Zellkultur einen minimalen Grad der Desynchronisation entlang des postulierten Entwicklungspfades. Den Simulationsergebnissen der Autoren zufolge soll eine Erniedrigung des Desynchronisationsgrades einen deutlichen Effekt auf die Geometrie und die Größe der Muster hervorrufen (vgl. Abschn. 3.4.1; [Lau97]).

Die Erhöhung des Grades der Desynchronisation soll experimentell durch Mischen von Kulturen mit unterschiedlichem Entwicklungsalter realisiert werden (vgl. Abschn. 3.4.2). Die Muster solcher gemischten Kulturen werden in Abschnitt 4.2.2 untersucht.

In Abschnitt 4.2.3 wurden Zellschichten mit unterschiedlicher Erregbarkeit hergestellt. Dazu wurde zum einen die Konzentration von Koffein (einem dosisabhängigen Inhibitor der cAMP-abhängigen AC [Bre84, Sie89]) systematisch variiert, zum anderen wurde das bisher auf die Wirkung der Muster von *Dictyostelium* nicht erforschte Adenosinanalogen IPA verwendet, das dem Koffein ähnliche Effekte auf die Musterbildung, aber auch abweichende Wirkung auf die Zellaggregation hervorruft [Hil08].

In keinem dieser experimentellen Szenarien wurde tatsächlich die Variabilität der Zellschicht im Sinne zeitlich konstanter Zelleigenschaften artifiziell verändert. Unter den gegebenen Laborbedingungen war beispielsweise die Beimischung und Markierung von Mutanten mit abweichenden Eigenschaften der Signaltransduktion nicht möglich, was einer Variante der experimentellen Implementierung von Variabilität entsprochen hätte. Trotzdem kann die Analyse der Muster bei global erniedrigter Erregbarkeit der Zellschicht durch die chemischen Effektoren Aufschluss über die Natur der detektierten Zelleigenschaften geben. Das Mischen unterschiedlich weitentwickelter Zellgruppen kann dagegen als eine Änderung der Variabilität in einem frühen, wenn auch nur kurzen Zeitfenstern der Entwicklung betrachtet werden.

Zu Beginn der Abschnitte 4.2.1–4.2.3 werden zunächst die sich direkt auf die experimentelle Manipulation der Zellen beziehenden Ergebnisse und die beobachteten Effekte auf

Musterbildung und Zellaggregation ausführlich dargestellt, bevor im folgenden Teil jedes Abschnitts die Resultate der eigentlichen Musteranalyse mit den Observablen Ω und I genauer betrachtet werden.

4.2.1 Synchrone Zellen

Methoden der Herstellung synchroner Zellen

Während der mitotischen Teilungsphase besitzen die Zellen eine abgerundete Form und verhältnismäßig geringe Adhäsionseigenschaften. Die Zellen haften nur schwach am Untergrund und lassen sich mechanisch leicht ablösen. Auf dieser Eigenschaft beruht das Prinzip der „Mitotic Wash-Off-Methode“ nach Terasima & Tolmach (1961), welche zunächst angewendet wurde, um synchrone Kulturen zu erzeugen (vgl. Abschn. 3.4.1; [Ter61, McD84]). Der durchschnittliche Anteil an auf diese Weise gewonnenen mitotischen Zellen lag bei 1,8% der insgesamt eingesetzten Zellen. Dies nähert sich den Angaben von 2% in McDonald & Durston (1984) und entspricht in etwa dem prozentualen zeitlichen Anteil der Mitose an der Dauer eines vollständigen Zellzyklus [McD84, Wee94, Wei84a]. Hier wird der entscheidende Nachteil der Methode ersichtlich. Da sich zu einem Zeitpunkt immer nur etwa 2% der Zellen einer Population in der Mitose befinden, ist es mit dieser Methode nicht möglich, synchrone Zellen in ausreichender Menge zur Untersuchung von Erregungswellen zu erhalten. Die Ausbeute synchroner Zellen war so gering, dass selbst die Beurteilung der Synchronität der Zellen durch Erstellen einer Wachstumskurve nicht möglich war. Zur Präparation einer Petrischale mit ausreichend hoher Zelldichte zur Beobachtung von Mustern müssten mitotische Zellen aus etwa 25 Kulturflaschen gesammelt werden. Neben dieser Unwirtschaftlichkeit, ist die Gewinnung der Zellen mit dieser Methode nicht innerhalb der Dauer der Mitose von etwa 15 min (siehe z.B. [Wei84a, Wee94]) für diese Anzahl an Kulturflaschen möglich, was wiederum eine unerwünschte Heterogenität der Kultur zur Folge hat. Aus diesen Gründen wurde die Methode nicht zur Gewinnung synchroner Zellen angewendet.

Im Gegensatz zur geringen Ausbeute der „Mitotic Wash-Off-Methode“ konnten durch die Reaktivierung stationärer Kulturen (vgl. Abschn. 3.4.1; [ZH78b, Wei84a]) ausreichend große Mengen synchroner Zellen gewonnen werden. Abbildung 4.16(a) zeigt das exponentielle Wachstum einer axenischen Kultur und im Vergleich die stufenhafte Änderung der relativen Zellzahl einer durch Reaktivierung stationärer Zellen gewonnenen synchronen Kultur (Abb. 4.16(b)). Während die nicht synchrone Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase eine Generationszeit von rund 8 h aufweist (a), beginnt die mitotische Verdoppelung der Zellzahl in der synchronen Kultur nach einer Lag-Phase von 2–3 h und endet ungefähr 6,5 h nach Überführung der stationären Zellen in frisches HL5-Medium. Die stufenhaften Zellzahlverdoppelung nach der Reaktivierung stationärer Zellen weist auf eine hohe Synchronität der Zellen hin.

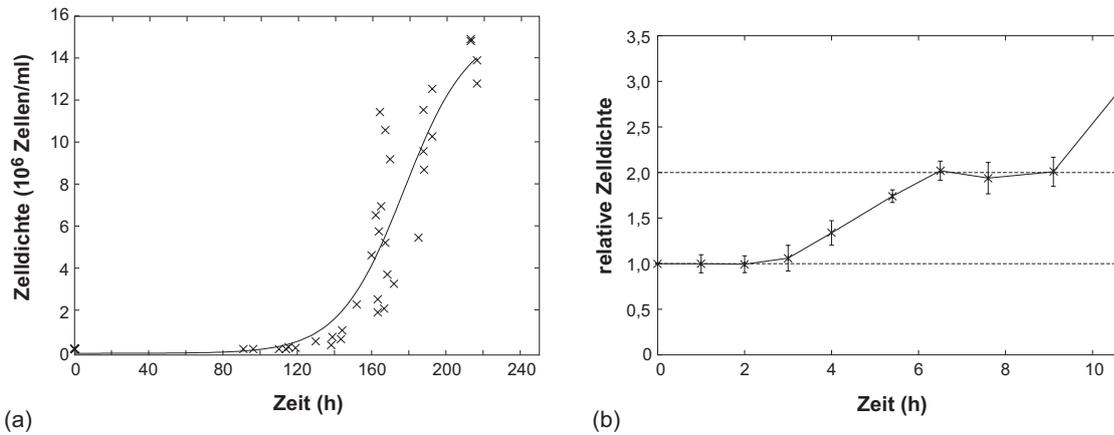


Abbildung 4.16: Wachstum einer axenischen Kultur (a) und stufenhafte Zellzahlverdopplung rekultivierter stationärerer Zellen (b). In (a) entspricht die x -Achse der Zeit nach dem Animpfen des HL5-Mediums mit Sporen (5×10^4 Sporen/ml). Die Generationszeit beträgt während der exponentiellen Wachstumsphase 7,56 h. In (b) beziehen sich die Zeitangaben auf den Zeitpunkt der Überführung der Zellen in frisches HL5-Medium und damit den Beginn synchroner Zellteilung (vgl. Abschn. 3.4.1 im Methodenteil).

Mustereigenschaften synchroner Zellen

Die Erregungsmuster synchroner Zellen und die der nicht synchronen Kontrollzellen wurden jeweils innerhalb eines Experiments zeitgleich in einer unterteilten Petrischale beobachtet. Zu Beginn der Entwicklung zeigen sich keine systematischen Unterschiede der Muster beider Gruppen, außer, dass sich ersten kohärenten Wellenstrukturen bei synchronen Zellen im Mittel 30 min früher erkennen lassen. Abbildung 4.17 zeigt Momentaufnahmen solcher Muster über einen Zeitraum von 5 h. Deutliche Spiralmuster treten hier bei beiden Gruppen etwa 5 h nach dem Entzug der Nahrung auf (Abb.4.18(a)–(c)). Ein Unterschied der Muster beider Zellgruppen wird im späteren Verlauf sichtbar. Während die Spiralmuster der Kontrollzellen stabil bleiben, werden die Wellenfronten der synchronen Zellen in einigen Fällen von plötzlich auftretender oszillatorischer Aktivität vieler Zentren gestört (f)–(g) bis das ursprüngliche Muster schließlich in ein von Targetwellen geprägtes Stadium übergeht (h). In Abbildung 4.18 wird dies anhand der Entwicklung der Grauwerte einzelner Bildpunkte deutlich. In den Mustern der synchronen Zellen (b) können zum Zeitpunkt $t = 200$ min plötzlich erneut verhältnismäßig hohe Wellenamplituden beobachtet werden, während die Wellenamplituden der Kontrollgruppe im Verlauf kleiner werden (a).

Ein offensichtlicher und systematischer Effekt der Synchronität der Zellen auf die Dichte der Phasensingularitäten in den zu Beginn der Entwicklung auftretenden Spiralmustern, konnte nicht beobachtet werden. Ein Vergleich der Muster synchroner Zellen aus einer Vielzahl von Experimenten zeigte, dass insgesamt eine höhere Varianz der gemessenen Spiraldichten zu beobachten ist, als es bei den Kontrollzellen der Fall ist, bei ver-

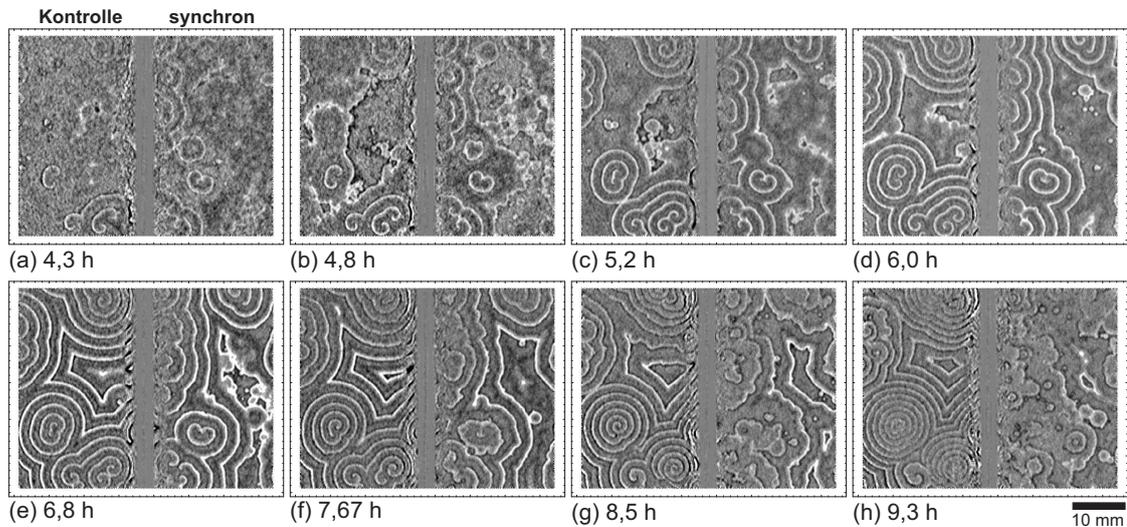


Abbildung 4.17: Zeitreihe der Erregungswellen von Kontrollzellen (linke Hälfte jeder Unterabbildung) und synchronen Zellen (rechte Hälfte). Der Kontrast der Originaldaten wurde durch raumzeitliche Mittelung verbessert. Zur besseren Sichtbarkeit der Wellen wurden zusätzlich Differenzen aufeinanderfolgender Bilder gebildet. Daher können Zellströme, insbesondere in (g) und (h) nicht gesehen werden. Die Zeitangaben unter jeder Abbildung beziehen sich auf den Moment des Nahrungsentzugs.

gleichbarer mittlerer Anzahl der Phasensingularitäten. Nach den Vorhersagen von Lauzeral et al. (1997) hätte sich die synchrone Entwicklung der Zellen in einer Erniedrigung der Spiraldichte abbilden müssen [Lau97].

In Experimenten, bei denen vor der Musterbildung lokal synchrone Zellen auf eine homogen verteilte Schicht nicht synchroner Zellen aufgetragen wurden, zeigten sich an den Orten mit synchronen Zellen keine statistischen Änderungen der Mustereigenschaften. Allerdings traten an solchen Orten häufig Phasensingularitäten auf. Eine eindeutige Aussage über die Rolle solcher Zellen bei der Muster- und insbesondere Spiralentstehung kann jedoch nicht getroffen werden.

Analyse der Muster synchroner Zellen mit Hilfe raumzeitlicher Filter

Die Wellenmuster synchroner und nicht synchroner Kontrollzellen von *Dictyostelium* wurden im nächsten Schritt mit Hilfe der Fluktuationszahl Ω_{ij} und der Transinformation I_{ij} (vgl. Abschn. 3.8.2 und Abschn. 3.8.1) analysiert. Dazu wurden Ausgangsdatensätze verwendet, die einen Aufnahmezeitraum von mehreren Stunden umfassten. Insbesondere wurden die Aufnahmen vor der Musterbildung bei homogen verteilten Zellen gestartet. Die Entwicklung synchroner und nicht synchroner Zellen erfolgte jeweils innerhalb eines Experiments in unterteilter Petrischale. Die Berechnung der Observablen wurde im Anschluss getrennt für jede Hälfte der Petrischale durchgeführt, wobei für beide Bedingungen

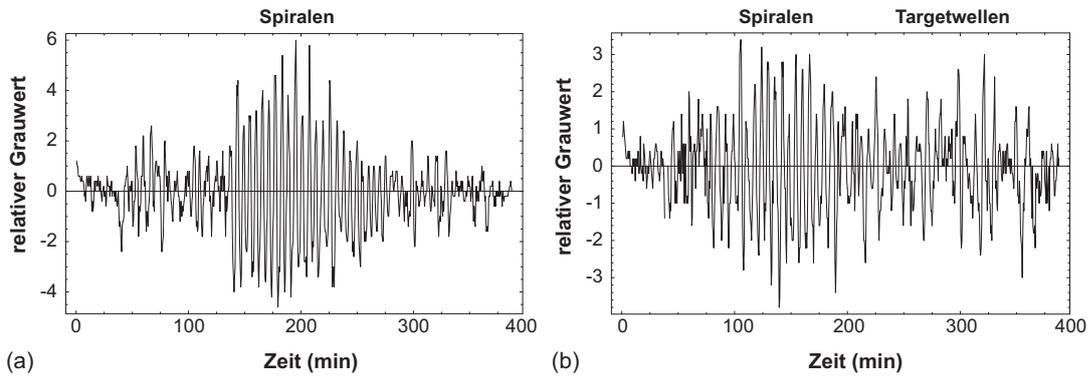


Abbildung 4.18: Veränderung der Grauwerte eines Bildpunktes unter Kontrollbedingungen (a) und bei synchronen Zellen (b) über einen Zeitraum von nahezu 7 h. Die Erregungswellen wurden während eines Experiments mit unterteilter Petrischale beobachtet. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Aufnahmebeginn, der 2 h 17 min nach dem Nahrungsentzug erfolgte.

immer gleich große Bildausschnitte verwendet wurden.

Abbildung 4.19 zeigt die errechneten Häufigkeitsverteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} synchroner

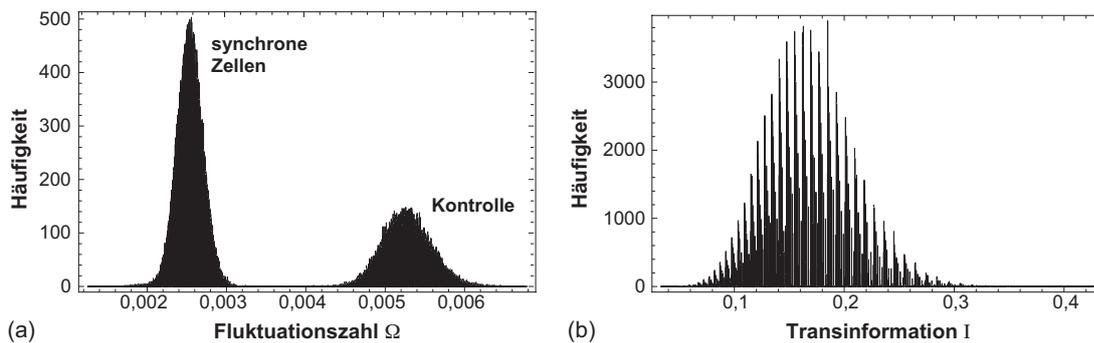


Abbildung 4.19: Häufigkeitsverteilung der Fluktuationszahl (a) und der Transinformation (b) synchroner und nicht synchroner Zellen eines Experiments mit unterteilter Petrischale. Vor der Berechnung der Observablen wurden jeweils gleich große Bildareale (304×296 Bildpunkte, entsprechend $3,53 \text{ cm}^2$) der linken und rechten Seite der Petrischale extrahiert. Diese beiden neuen Datensätze waren Ausgangsmaterial für die folgende Analyse. Zunächst wurden die Datensätze in Intervalle von jeweils 200 Bildern unterteilt. Für jedes dieser Intervalle wurde Ω_{ij} und I_{ij} berechnet. Die erhaltenen Werte wurde in 5000 Wertkategorien unterteilt und als Histogramm dargestellt. In (a) und (b) sind die Verteilungen von Ω_{ij} und I_{ij} eines Bildintervalls vor der Musterbildung dargestellt.

und nicht synchroner Zellen aus einem Experiment. Die Originaldaten wurden vor der Berechnung in Intervalle von jeweils 200 Bildern (die einem Zeitraum von 10 min im Experiment entsprechen) unterteilt. Für jedes Intervall wurde im Anschluss die räumliche

Verteilung von Ω_{ij} und I_{ij} berechnet. Das Histogramm in Abbildung 4.19(a) zeigt die Häufigkeitsverteilung der Fluktuationszahl Ω_{ij} eines Bildintervalls vor dem Auftreten der Muster. Das Grauwertprofile des zugrundeliegenden Datensatzes wurde bereits in Abbildung 4.18 dargestellt. In Abbildung 4.19(a) unterscheidet Ω_{ij} klar zwischen den beiden Zellpopulationen. Insbesondere bilden sich die unterschiedlichen Zellgruppen in deutlich getrennten – die Werte der synchronen Zellen sind insgesamt wesentlich kleiner – und unterschiedlich breiten Verteilungen der Wertebereiche von Ω_{ij} ab. Die Werte von I_{ij} liegen dagegen bei beiden Bedingungen exakt übereinander und sind nicht voneinander zu unterscheiden (Abb. 4.19(b)). Bemerkenswert ist, dass sich die Verteilungen von Ω_{ij} und

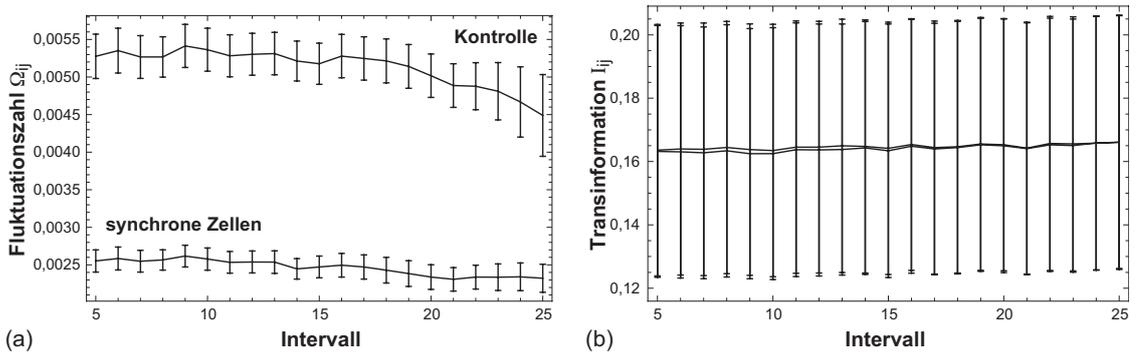


Abbildung 4.20: Gemittelte Werte von Ω_{ij} (a) und I_{ij} (b) aus den Mustern synchroner und nicht synchroner Zellen entlang einzelner Bildintervalle, die einem Zeitraum von 200 min entsprechen. In (a) unterscheiden sich die mittleren Ω_{ij} beider Zellgruppen deutlich voneinander. In (b) liegen die Werte von I_{ij} beider Zellgruppen exakt übereinander. Den Berechnungen lagen bei beiden Bedingungen gleich große Bildausschnitte zugrunde.

I_{ij} mit der Zeit nicht wesentlich ändern. Die dargestellten Häufigkeitsverteilungen lassen sich bereits aus Zeitfenstern vor der Musterbildung extrahieren und bleiben über einige Stunden der Entwicklung konstant. Erst im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium der Zellschicht nimmt die Anzahl an Bildelementen mit sehr niedrigen Ω_{ij} im Bereich von Null kontinuierlich zu.¹

In Abbildung 4.20 wurden ergänzend zu Abbildung 4.19 die Mittelwerte aus den berechneten Verteilungen von Ω_{ij} (a) und I_{ij} (b) entlang mehrerer Bildintervalle aufgetragen. Hier zeigt sich sehr deutlich die bereits erwähnte zeitliche Stabilität der Verteilungen. Die mittleren Ω_{ij} beider Zellgruppen sortieren sich auch in einem Verlauf von 200 min nicht voneinander aus. Zudem ist hier klar zu erkennen, dass die Standardabweichung der gemittelten Werte der synchronen Zellen insgesamt wesentlich kleiner ist als bei den Kontrollzellen. Dagegen liegen die Werte von I_{ij} in (b) unter beiden experimentellen Be-

¹ Dies kann verstanden werden, wenn man bedenkt, dass Ω_{ij} eine nachbarschaftsabhängige Größe ist und nur gerichtete Änderungen der Grauwerte zu Ω_{ij} einen Beitrag leisten. Wird die Zellschicht mit der Zeit inhomogen, entstehen immer größere zellfreie Bereiche, die keinen Beitrag zu Ω_{ij} leisten.

dingungen nahezu exakt übereinander und können nicht unterschieden werden. Die klare Trennung beider Zellgruppen durch Ω_{ij} und die zeitliche Stabilität der Wertebereiche sind erste Hinweise darauf, dass die Verteilungen von Ω_{ij} nicht durch spontane Fluktuationen, sondern durch die Zellen bestimmt werden. Die einzelnen Bildelemente müssen schon vor der Musterbildung Eigenschaften aufweisen, die sich im Verlauf der Aggregationsphase statistisch nicht ändern. Weiterhin wird Ω_{ij} scheinbar nicht in der Weise von den Mustereigenschaften geprägt, wie es sich im Gegensatz dazu im Automatenmodell (Abschn. 4.1.4) angedeutet hat.

Entscheidend ist an dieser Stelle nun, ob sich aus den Verteilungen von Ω_{ij} der jeweilige Synchronisationsgrad der Zellen ableiten lässt. Der Synchronisationsgrad einer Kultur wird hier durch den zeitlichen Abstand zwischen dem Überführen der stationären Kultur in frisches HL5-Medium und der Initiation des Entwicklungszyklus bestimmt. Eine synchrone Zellkultur geht in nährstoffhaltigem Medium nach wenigen Teilungszyklen wieder in einen nicht synchronen Zustand über. Verfolgt man die Entwicklung der relativen Zelldichte einer synchronen Kultur, wie in Abbildung 4.16(b) dargestellt, so nimmt der Synchronisationsgrad der Zellen entlang der Zeitachse von links nach rechts ab. Die Verlängerung der x -Achse in Abbildung 4.16(b) würde mit fortschreitender Zeit einen Übergang der stufenhaften Zellzahlverdopplung ins exponentielle Wachstumsverhalten zeigen. In Abbildung 4.21 sind die Verteilungen Ω_{ij} verschiedener Zellgruppen aufgetra-

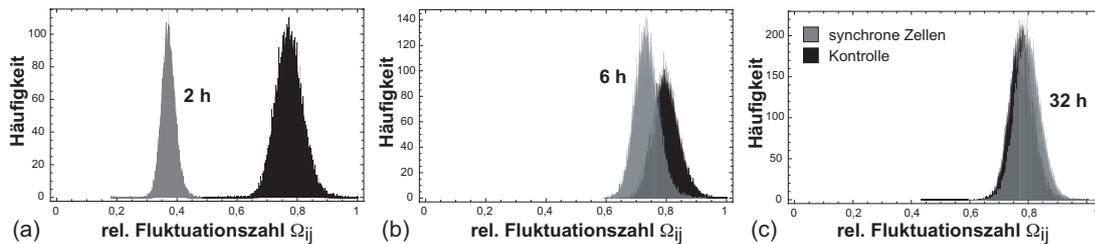


Abbildung 4.21: Häufigkeitsverteilungen der Fluktuationszahl Ω_{ij} bei unterschiedlichen Synchronisationsgraden. Als graue Bereiche sind die Ω_{ij} der synchronen Zellen, die der Kontrollgruppen als schwarze Bereiche dargestellt. In (a) wurde der Entwicklungszyklus 2 h nach dem Überführen der stationären Kultur in nährstoffhaltiges Medium eingeleitet. In (b) betrug dieser Zeitraum 6 h und in (c) 32 h. Der Synchronisationsgrad der synchronen Zellen nimmt so von (a) nach (c) ab. Der Berechnung lag innerhalb eines Experiments die gleiche Anzahl an Bildpunkten zugrunde. Ebenso war die optische Vergrößerung immer dieselbe und es wurden jeweils Bildausschnitte von einigen cm^2 analysiert. Zur Darstellung wurden die Werte der berechneten Ω_{ij} auf den jeweils aufgetretenen Maximalwert bezogen.

gen, die nach dem Erreichen des stationären Zustandes und dem Überführen in frisches HL5-Medium unterschiedlich lange die Möglichkeit zur Zellteilung hatten, bevor der Entwicklungszyklus eingeleitet wurde (graue Bereiche in jeder Unterabbildung). Damit wurde erreicht, dass diese Zellgruppen jeweils ganz unterschiedliche Synchronisationsgrade repräsentieren. Auch hier wurden zur Beobachtung der Muster unterteilte Petrischalen verwendet und so parallel die Muster einer Kontrollgruppe beobachtet (schwarze Berei-

che in jeder Unterabbildung). Der zeitliche Abstand zwischen dem Überführen der Zellen in HL5-Medium und dem Einleiten der Hungerphase beträgt in Abbildung 4.21(a) 2 h, in (b) 6 h und in (c) 32 h. Bezieht man dies auf die Wachstumskurve synchroner Zellen in Abbildung 4.16(b), so befand sich die Kultur in Abbildung 4.21(a) im Bereich der Lag-Phase unmittelbar vor dem Ansteigen der Zelldichte und war hochgradig synchron und die Kultur in (b) am Ende der ersten Teilungsphase. Nimmt man eine Generationszeit von 8 h an, so konnten die Zellen in (c) etwa vier Teilungszyklen durchlaufen, bevor der Entwicklungszyklus experimentell eingeleitet wurde. In Abbildung 4.21 sind jeweils Ω_{ij} -Verteilung eines Bildintervalls vor der Wellenpropagation dargestellt. Wie sich bereits gezeigt hat, ändert sich die relative Lage der Verteilungen im Verlauf der Entwicklung bis zum Auftreten der Zellströme nicht, so dass die Wahl anderer Bildintervalle zu sehr ähnlichen Ergebnissen führt. Vergleicht man nun die relativen Lagen der dargestellten Verteilung Ω_{ij} synchroner Zellen und die ihrer Kontrollgruppe, so nimmt der Abstand der mittleren Ω_{ij} entlang der x -Achsen zwischen beiden Verteilungen von (a) nach (c) tatsächlich ab. Der Beitrag synchroner Zellen zur Fluktuationszahl Ω_{ij} ist systematisch geringer als der nicht synchroner Kontrollzellen. Auch dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass sich die berechneten Verteilungen auf Zelleigenschaften beruhen.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede synchroner Zellen und ihrer Kontrollen nicht bereits aus den experimentellen Rohabbildungen sichtbar werden, und zwar ohne dass zuvor die Extraktion gerichteter raumzeitlicher Beiträge mit Hilfe von Ω_{ij} erfolgte, wurden die Grauwerte der für die Berechnung von Ω_{ij} verwendeten Datensätze beider experimenteller Bedingungen miteinander verglichen. In Abbildung 4.22(a) sind exemplarisch die Grauwertverteilungen des jeweils selben Bildausschnitts und Zeitintervalls zu sehen, wie er zur Berechnung von Ω_{ij} in Abbildung 4.21(a) zugrunde lag. In

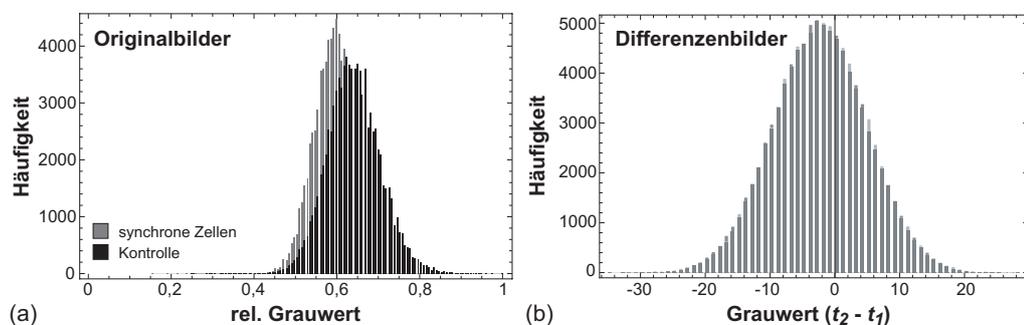


Abbildung 4.22: Grauwertverteilungen derselben Bildausschnitte synchroner Zellen (grau) und der Kontrollgruppen (schwarze), wie sie zur Berechnung von Ω_{ij} in Abbildung 4.21(a) verwendet wurden (a). In (b) wurden Differenzen aufeinanderfolgender Zeitpunkte dieser Bildausschnitte gebildet. Wie bei allen vorangegangenen Analysen enthielten diese immer die gleiche Anzahl an Bildpunkten.

Abbildung 4.21(b) sind die Differenzen der Grauwerte aufeinander folgender Abbildungen derselben Bildausschnitte dargestellt. Während in (a) die Grauwertverteilung der synchronen Zellen, tatsächlich leicht nach links verschoben ist, liegen die Differenzen der

Grauwerte beider Bedingungen exakt aufeinander, was darauf schließen lässt, dass die Verschiebung in (a) auf experimentelle Parameter (wie beispielsweise Unterschiede in der Beleuchtung der beiden Hälften der Petrischale) und nicht auf Zelleigenschaften zurückzuführen ist. Die Unterschiede zwischen beiden Zellgruppen werden erst nach der Trennung gerichteter und ungerichteter Grauwertänderungen in Raum und Zeit durch Ω_{ij} sichtbar und sind nicht offensichtlich beim Vergleich der Grauwerte der Rohabbildungen zu erkennen.

Im Rahmen der folgenden Analyse wurde versucht, (rekonstruierte) Zelleigenschaften mit konkreten Aspekten der Musterbildung in Verbindung zu bringen. Insbesondere wurden die räumlichen Fluktuationsverteilungen Ω_{ij} mit den räumlichen Verteilungen der aus den Mustern detektierten Phasensingularitäten korreliert, wie es zuvor schon am Automatenmodell in Abschnitt 4.1.3 durchgeführt wurde. Abbildung 4.23 zeigt die Korrelationskoeffi-

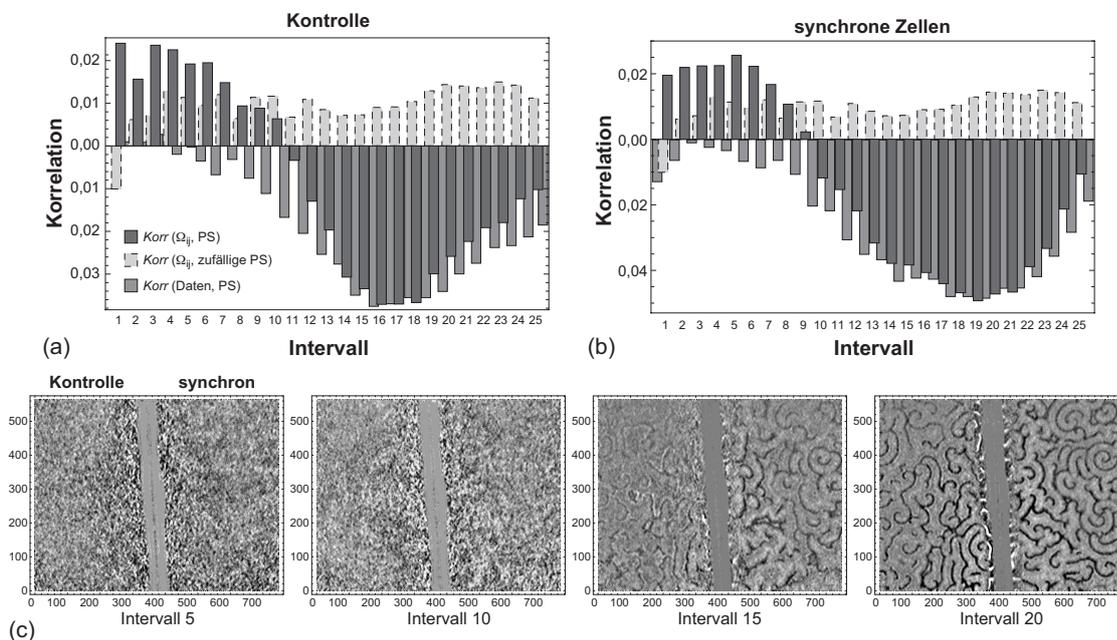


Abbildung 4.23: Korrelationskoeffizienten zwischen Ω_{ij} der einzelnen Intervalle und den räumlichen Verteilungen der Phasensingularitäten (dunkelgraue Balken) für Kontrollzellen (a) und synchrone Zellen (b). Weiterhin wurden die Phasensingularitäten mit den Originaldaten korreliert (mittelgraue Balken). Dem Nullmodell in beiden Unterabbildungen lag die gleiche Anzahl an zufällig verteilten Phasensingularitäten gleicher Anzahl und Größe zugrunde (hellgraue Balken). Jedes Intervall wurde aus 200 Originalbildern gebildet. Dies entspricht einem Zeitfenster von 10 min im Experiment. In (c) sind Momentaufnahmen der zugrundeliegenden Daten abgebildet, wobei es sich hierbei um Differenzbilder handelt, um kohärente Wellenstrukturen möglichst frühzeitig erkennen zu können.

zienten zwischen Ω_{ij} und den Phasensingularitäten der Muster ($Korr(\Omega_{ij}, PS)$), zwischen Ω_{ij} und zufällig verteilten Phasensingularitäten gleicher Anzahl und Größe ($Korr(\Omega_{ij},$

zufällige PS)) und die Korrelationskoeffizienten der Originaldaten und zwischen den Phasensingularitäten ($\text{Korr}(\text{Daten}, \text{PS})$) bei synchronen Zellen (b) und der zugehörigen Kontrolle (a). In (c) sind einige Momentaufnahmen des zugrundeliegenden Datensatzes zu sehen, die anhand der angegebenen Intervallnummern den in (a) und (b) dargestellten Koeffizienten zugeordnet werden können. Dabei befinden sich die Muster der Kontrollzellen auf der linken Seite der unterteilten Petrischale, die synchronen Zellen gegenüber. Vor der Berechnung von Ω_{ij} wurde aus beiden Hälften der Petrischale ein gleich großes Areal definiert, das in die Berechnungen einbezogen wurde.

Erste Wellenstrukturen lassen sich bei den synchronen Zellen in Intervall 10 in (c) erkennen. Tatsächlich findet im Verlauf von $\text{Korr}(\Omega_{ij}, \text{PS})$ in Abbildung 4.23(b) an dieser Stelle (zwischen Intervall 9 und 10) nach einer kontinuierlichen Verringerung der Korrelation ein Vorzeichenwechsel von positiven zu negativen Korrelationskoeffizienten statt. Bei den Kontrollzellen in (a) geschieht dieser Wechsel zwischen Intervall 10 und 11. Der Verlauf von $\text{Korr}(\Omega_{ij}, \text{PS})$ zeigt demnach in (a) und (b) einen musterabhängigen Verlauf. Nach dem Vorzeichenwechsel sind die Korrelationskoeffizienten zwischen Ω_{ij} und den Phasensingularitäten kaum von den entsprechenden Korrelationskoeffizienten der Originaldaten und der Phasensingularitäten zu unterscheiden. Interessant ist hier jedoch die Beobachtung, dass sowohl in (a), als auch in (b) vor dem Auftreten der Muster eine positive Korrelation zwischen Ω_{ij} und den Phasensingularitätsverteilungen besteht, die wesentlich höher ist als bei zufällig verteilten Phasensingularitäten. Bei der Verwendung der Originaldaten ist das dagegen nicht der Fall. Dies wurde in vielen Fällen auch bei anderen Datensätzen beobachtet, wobei ebenso Fälle aufgetreten sind, in welchen dies nicht der Fall war. Eine mögliche Skalenabhängigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht systematisch untersucht. Ein weiterer wichtiger Aspekt fällt beim Betrachten der Korrelationen zwischen den Phasensingularitäten und den Originaldaten in Abbildung 4.23(a) und (b) im Stadium der Wellenmuster auf. Selbst bei einem recht trivialen Zusammenhang zweier Größen, der sich in diesem Fall in einer Antikorrelation abbildet, können die tatsächlichen Werte der Korrelationskoeffizienten verhältnismäßig niedrig sein.

Zur Vervollständigung sind in Abbildung 4.24 die Korrelationskoeffizienten zwischen der Transinformation I_{ij} und der Phasensingularitäten der einzelnen Bildintervalle dargestellt, wobei sich bereits zuvor gezeigt hat, dass mit Hilfe von I_{ij} weder Unterschiede zwischen verschiedenen Zellgruppen detektiert, noch systematische Änderungen in der Zeit beobachtet werden können. Abbildung 4.24 verdeutlicht dies nun wieder.

4.2.2 Erhöhung des Grades der Desynchronisation einer Kultur durch Mischen von Zellgruppen unterschiedlichen Alters

Musterentstehung bei gemischten Zellpopulationen

Durch das Mischen von Zellgruppen unterschiedlichen Alters sollte experimentell der Grad der Desynchronisation einer Zellsuspension nach der Modellvorstellung von Lauzeral et al. (1997) erhöht werden [Lau97]. Der Grad der Desynchronisation wird dort durch den Parameter Δ bestimmt, welcher der zeitlichen Spreizung einer Zellpopulation entlang

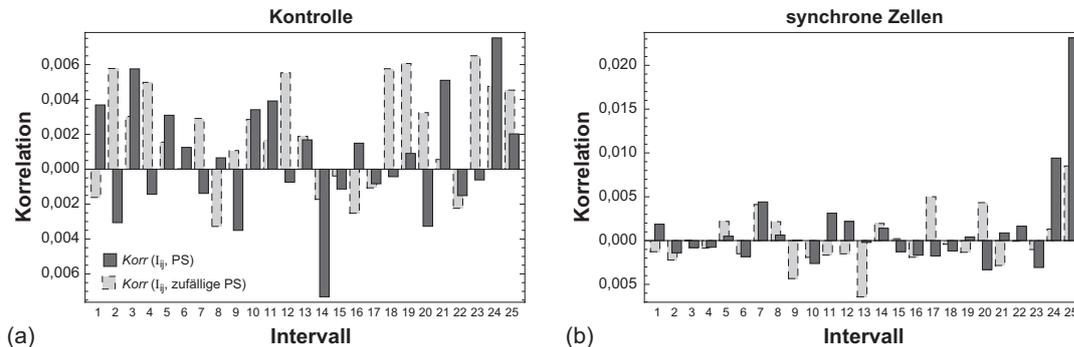


Abbildung 4.24: Korrelationskoeffizienten zwischen I_{ij} der einzelnen Intervalle und den räumlichen Verteilung der tatsächlich detektierten (dunkelgraue Balken) und zufällig verteilten Phasensingularitäten (hellgraue Balken) für Kontrollzellen (a) und synchrone Zellen (b). Hier wurde derselbe Datensatz wie in Abbildung 4.23 verwendet.

des Entwicklungspfades zu Beginn der Musterbildung entspricht (vgl. Abschn. 2.3.2). Es wurden Zellkulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und vor dem Aufbringen auf die Petrischalen zur Beobachtung der Muster vereint. Die ältere der beiden Kulturen wird im folgenden als Population P_1 , die jüngere als Population P_2 bezeichnet. Es wurden jeweils zwei Zellkulturen ($P_1 + P_2$) mit einer definierten Altersdifferenz τ_{Mix} in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. P_1 wurde bis zur Vereinigung mit P_2 in KK2-Puffer bei 21 °C und 210 upm für den Zeitraum τ_{Mix} aufbewahrt. Insgesamt betrug die Dichte der aufgetragenen Zellen einer Petrischale immer $6,17 \times 10^5$ Zellen/cm². Zur Beobachtung der Muster im Dunkelfeld wurden unterteilte Petrischalen verwendet, die auf einer Seite die gemischten Zellen M und auf der anderen Seite jeweils eine Kontrollgruppe (P_1 oder P_2) enthielten.

Ein erster optischer Vergleich der Muster unter den verschiedenen Bedingungen ergab zunächst Unterschiede. Wie zu erwarten, waren jedoch die Zeitpunkte, zu welchen sich bei den gemischten Zellen Erregungsmuster zeigten, von denen der Kontrollgruppe verschieden.

Um quantitative Aussagen über das zeitliche Auftreten der Muster in Abhängigkeit von τ_{Mix} und des Mischungsverhältnisses treffen zu können, wurde aus allen dokumentierten Wellenmustern der Zeitpunkt der maximalen Amplitude der Wellen als Referenzwert bestimmt.¹ Abbildung 4.25 zeigt hierbei die prinzipielle Vorgehensweise. Der Zeitpunkt der maximalen Wellenamplitude der älteren Kontrollgruppe wird hier als $t(P_2Max)$, der gemischten Gruppe als $t(MMax)$ und die der jüngeren Kontrollgruppe als $t(P_1Max)$ be-

¹ Die maximale Amplitude der Wellen als Referenzpunkt stellt eine verhältnismäßig einfach und objektiv zu extrahierende Kenngröße der Musterbildung dar, während der Beginn der Musterbildung aus experimentellen Daten schwer und nur näherungsweise bestimmt werden kann, da dieser zum einen stark von den optischen Gegebenheiten abhängt, zum anderen formal nicht klar definiert ist.

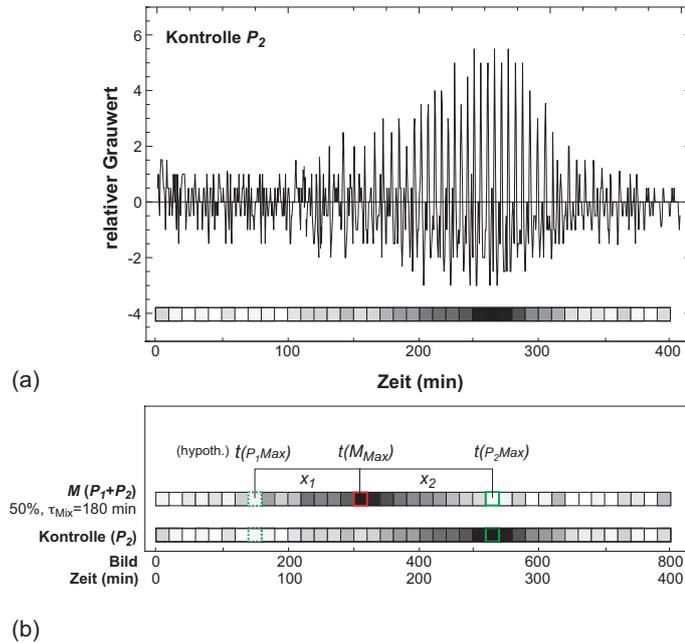


Abbildung 4.25: Vorgehensweise bei der quantitativen Bestimmung der zeitlichen Unterschiede im Auftreten der Muster. In (a) ist die Entwicklung der relativen Grauwerte eines einzelnen Bildpunktes über einen Zeitraum von mehr als 6,5 h aufgetragen. Die zugrundeliegenden Wellenmuster stammen in diesem Fall von der Kontrollgruppe P_2 . Die Originaldaten wurden zur Erstellung des Diagramms zunächst zeitlich (10 Bilder) gemittelt, dann räumlich geglättet ($\sigma = 2$ Pixel) und im Anschluss einem Differenzenfilter erster Ordnung unterworfen. In (b) sind die normierten Beträge der Amplituden aus (a) und auch die zugehörigen Werte der gemischten Zellen M (mit 50% P_1 und $\tau_{Mix} = 180$ min) als eindimensionale Abfolge von Grauwerte dargestellt. Dabei entsprechen die schwarzen Areale den maximalen Amplituden der gemischten Zellen ($t(M_{Max})$) und der Kontrolle ($t(P_2Max)$). Dieser Zeitpunkt kann dem Stadium voll ausgebildeter Wellenmuster zugeordnet werden. Die (hypothetische) Position von $t(P_1Max)$ ergibt sich aus $t(P_2Max) - \tau_{Mix}$.

zeichnet.¹ Im dargestellten Fall tritt die maximale Wellenaktivität der gemischten Zellen 100 min vor den Mustern der Kontrollzellen P_2 und theoretisch 80 min nach denen von P_1 auf. Wenn $t(P_1Max) < t(M_{Max}) < t(P_2Max)$, die Muster der gemischten Zellen M also vor denen von P_2 und nach denen von P_1 auftreten, dann haben sowohl P_1 , als auch P_2 zu den beobachteten Muster der gemischten Zellen beigetragen. Dies konnte bei allen untersuchten Mischungsverhältnissen (mit Anteilen an P_1 zwischen 1 und 50%) und τ_{Mix} (im Bereich von 60–180 min) beobachtet werden. Selbst eine gemischte Population mit einem

¹ Wobei es sich bei dem angegebenen Zeitpunkt der maximalen Amplitude einer der beiden Kontrollgruppe immer um einen hypothetischen Wert handelt, der aus dem zeitlichen Auftreten der Wellen der anderen Kontrollgruppe und τ_{Mix} bestimmt wurde (z.B. $t(P_2Max) - \tau_{Mix} = t(P_1Max)$).

Anteil von 50 % beider Zellgruppen zeigte eine zeitverzögerte Musterbildung im Vergleich zu Petrischalen mit 100 % Zellen von P_1 . Daraus leitet sich ab, dass eine Zelldichte von etwa 3×10^5 Zellen/cm² (50 % der aufgetragenen Gesamtzahl) zu gering ist, um cAMP-Signale in Form propagierender Wellen hervorbringen zu können. Von anderen Autoren wird eine kritische Zelldichte zwischen $3,8 \times 10^4$ und 5×10^4 Zellen/cm² angegeben, unterhalb derer keine langreichweitige Signalpropagation stattfinden kann [Kon61, Has75]. Da die aus den Mischexperimenten entstandenen Muster also aus beiden Zellgruppen unterschiedlichen Alters hervorgegangen sind, ergeben sich daraus folgende Überlegungen:

1. Wenn P_1 nicht allein zu den Mustern beigetragen hat, sondern auch Anteile von P_2 , dann muss bei gleichem Mischungsverhältnis, aber wachsendem τ_{Mix} der zeitliche Abstand zwischen $t(P_1Max)$ und $t(M_{Max})$, also x_1 , größer werden, der Abstand zwischen $t(M_{Max})$ und $t(P_2Max)$, also x_2 , jedoch konstant bleiben.

Der gegebene Anteil an P_1 ist bei Erreichen der Kompetenz zur Wellenpropagation von P_1 zu gering und die Propagation von Wellen ist erst möglich, wenn genügend viele Zellen der Gruppe P_2 ebenfalls erregbar geworden sind. τ_{Mix} bestimmt somit den Zeitpunkt, zu welchem ausreichend viele Zellen der Gruppe P_2 Wellenkompetenz erlangt haben. In Abbildung 4.26(a) und (b) bildet sich dieser Zusammenhang, also die Abhängigkeit der Größe x_1 und x_2 von τ_{Mix} sehr systematisch ab.

Wenn x_1 gleich τ_{Mix} wäre (gestrichelte Linie in Abb. 4.26(a)), dann hätte ausschließlich Gruppe P_2 die Muster hervorgebracht. Die Werte der Experimente bei einem Mischungsverhältnis von 5 und 10 % an P_1 nähern sich dieser Geraden an. Alle anderen Experimente mit höheren Anteilen an P_2 ordnen sich systematisch unterhalb davon an. Je höher der Anteil an Zellen von P_1 ist, um so kleiner wird x_1 (Abb. 4.26(a)) und um so größer x_2 (b).

Extrapoliert man die Verläufe unterschiedlicher Mischungsverhältnisse in (a), so liegt der Schnittpunkt der Zellen mit 50 % P_1 auf der x -Achse bei etwa $\tau_{Mix} = 50$ min, für 20 % bei etwa $\tau_{Mix} = 20$ min, 10 % bei etwa $\tau_{Mix} = 10$ min und 5 % bei $\tau_{Mix} = 18$ min. Diese Werte entsprechen den Werten von τ_{Mix} , bei denen kein sichtbar verzögerter Musterbeginn durch das Mischen mehr auftreten würde, da beim Beginn der Musterbildung schon ausreichend viele Zellen der Gruppe P_2 das Signal amplifizieren könnten. Interessanterweise liegt der Wert von 50 min für Mischungsverhältnissen mit gleichen Teilen beider Populationen sehr nahe an der von McDonalds (1986) bestimmten Zellzyklus-abhängigen zeitlichen Spreizung von 60 min beim Erlangen der Erregbarkeit individueller Zellen einer Kultur [McD86, Lau97].

2. Wenn erst genügend Zellen der Gruppe P_2 mit der Fähigkeit, das cAMP-Signal amplifizieren zu können, vorhanden sein müssen, damit globale Erregungswellen propagieren können, dann muss x_1 bei konstantem τ_{Mix} mit zunehmendem Anteil an P_1 kleiner, x_2 jedoch systematisch größer werden. Dies ist in Abbildung 4.26(a) und (b) zu beobachten.
3. Der Quotient x_1/τ_{Mix} muss bei gleichem Mischungsverhältnis konstant sein, mit

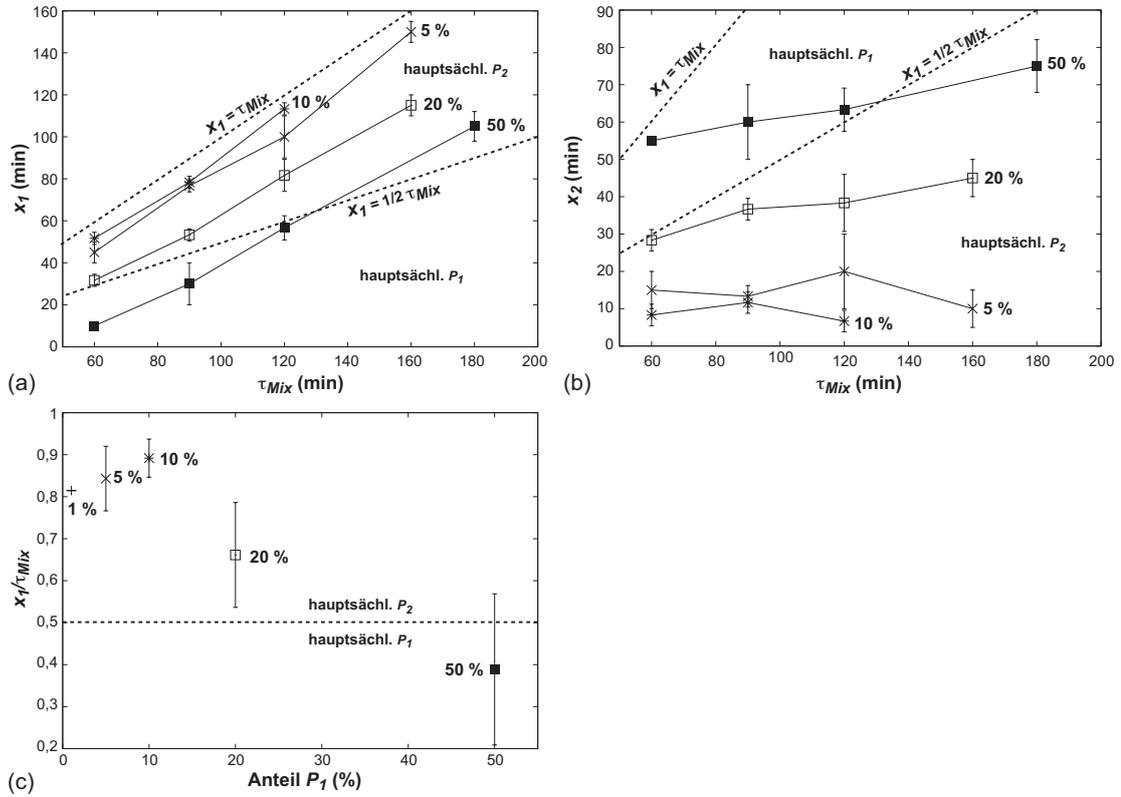


Abbildung 4.26: Größen zur Bestimmung der Anteile der Zellpopulationen an der Entstehung der Muster. x_1 ist der zeitlicher Abstand zwischen der maximalen Wellenamplitude der Zellgruppe P_1 und der maximalen Amplitude der gemischten Zellen M (a). x_1 steigt mit wachsendem τ_{Mix} an und zeigt eine starke Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis der Population. Bei $x_1 = \tau$ wären die Muster ausschließlich durch P_2 hervorgebracht worden. Bei $\tau_{Mix} > x_1 > \frac{\tau}{2}$ haben vor allem die Zellen von P_2 die Muster erzeugt, bei $x_1 < \frac{\tau}{2}$ dagegen die Zellen von P_1 . Dies ist bei einem Anteil an P_1 von 50 % und $\tau_{Mix} < 130$ min der Fall. Der zeitliche Abstand zwischen $t(M_{Max})$ und $t(P_2Max)$ ist x_2 (b). x_2 bleibt bei gleichem Mischungsverhältnis mit sich änderndem τ_{Mix} konstant. x_1/τ_{Mix} stellt ein Maß für den jeweiligen Anteil beider Gruppen an der Entstehung der Muster dar (c).

höher werdendem Anteil an Zellen der Gruppe P_1 jedoch kleiner werden. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4.26(c) zu erkennen. x_1/τ_{Mix} kann damit als ein Maß dafür betrachtet werden, welche der beiden Zellgruppen maßgeblich das zeitliche Auftreten der Mustern bestimmt. Bei großen x_1/τ_{Mix} dominieren die Zellen der Gruppe P_2 die Muster, bei kleinen x_1/τ_{Mix} sind vor allem die Zellen von P_1 am Prozess der Musterbildung beteiligt. Dies ist nur bei einem Mischungsverhältnis von 50 % an P_1 zu beobachten.

Mustereigenschaften gemischter Populationen

Wie im Fall der synchronen Zellen lassen sich auch bei den gemischten Zellpopulationen keine offensichtlichen Effekte des Mischens auf die räumliche Dichte der Phasensingularitäten finden. Abbildung 4.27 zeigt die Anzahl der Phasensingularitäten pro Fläche in Abhängigkeit der Verzögerungszeit und des Anteils an Zellen der Gruppe P_1 im Vergleich zu den berücksichtigten parallel untersuchten Kontrollgruppen. Die gemischten Zellen weisen keine systematische Abhängigkeit der Größe von den experimentellen Parametern auf, wobei jedoch die Mehrzahl der gemessenen Werte unterhalb der mittleren Dichte der Kontrollen liegt und in einigen Fällen extremale Werte durch besonders viele oder wenige Spiralwellen auftreten. Dieses Phänomen wurde bereits bei den Mustern synchroner Zellen beobachtet (Abschn. 4.2.1). Gleichzeitig ergibt sich aus der Standardabweichung der Werte der Kontrollgruppe, dass weitere Experimente auf ausgedehnteren Agarflächen durchgeführt werden müssten, um zuverlässige Aussagen über einen tatsächlichen Effekt des Mischens treffen zu können. Die Untersuchung der Erregungsmuster gemischter Zellen schließt einen Einfluss des Mischens auf andere Wellenparameter wie Rotationsperiode, Wellenlänge und Propagationsgeschwindigkeit der Wellen jedoch eindeutig aus. Die Ursachen einer möglichen Abweichung der Dichte der Phasensingularitäten wären demnach im Initiationsprozess der Muster und nicht in den Eigenschaften der Wellenpropagation zu suchen.

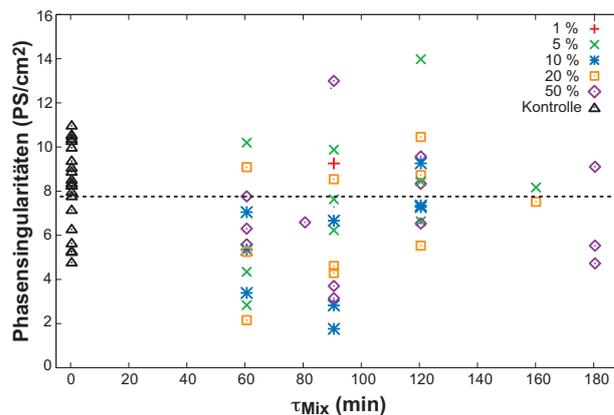


Abbildung 4.27: Anzahl der Phasensingularitäten in Abhängigkeit der Verzögerungszeit und des Anteils an Zellen der Gruppe P_1 . Die mittlere Anzahl an Phasensingularitäten der berücksichtigten Kontrollexperimenten beträgt $(7,9 \pm 2,0)$ PS/cm² (gestrichelte Linie).

Untersuchung der Muster gemischter Zellen mit raumzeitlichen Filtern

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 am Beispiel der Muster synchroner Zellen und ihrer Kontrollexperimente beobachtet, ändern sich die Häufigkeitsverteilungen der aus allen Bildpunkten einer Zeitreihe errechneten Werte von Ω_{ij} und I_{ij} nicht wesentlich im Verlauf

der Aggregation. Qualitativ und quantitativ zeigen die aus den einzelnen Bildpunkten raumzeitlicher Daten errechneten Verteilungen also schon vor der Entstehung der Muster im Stadium der homogen verteilten Zellschicht dieselben Eigenschaften, wie während der Phase der Wellenpropagation. Erst im fortgeschrittenen Stadium der Aggregation, das durch Zellströme deutlich geprägt ist, werden die Verteilungen von Ω_{ij} zunehmend flacher und beinhalten immer mehr verhältnismäßig kleine Werte. Dieses Phänomen ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Beiträge vermeintlich gerichteter, aufeinanderfolgender Änderungen der Grauwerte einzelner Bildpunkte zu Ω_{ij} nicht wesentlich von unveränderlichen Bildelementen und auch damit in Zusammenhang stehenden Randeffekten geprägt werden, da im Stadium der Zellströme (wenn unveränderliche Bereiche wachsenden räumlichen Anteil einnehmen) die Beiträge zu Ω_{ij} systematisch abnehmen. Die zeitliche Konstanz der Verteilungen vor und während der Musterbildung, spricht ebenso dafür, dass die eigentlichen Mustereigenschaften, wie Geometrie und räumliche Ausdehnung der Musterelemente, keinen Einfluss auf Ω_{ij} zu haben scheinen, wie es sich im Gegensatz dazu im Automatenmodell in Abschnitt 4.1.4 angedeutet hatte.

Da die aus aufeinanderfolgenden Bildintervallen berechneten Ω_{ij} über mehrere Stunden der Entwicklung konstant bleiben, können diese Verteilungen aus Mustern vor der Bildung der Zellströme unter verschiedenen experimentellen Bedingungen einander gegenüber gestellt und verglichen werden. Die Abbildungen 4.28 und 4.29 zeigen Häufigkeitsverteilungen

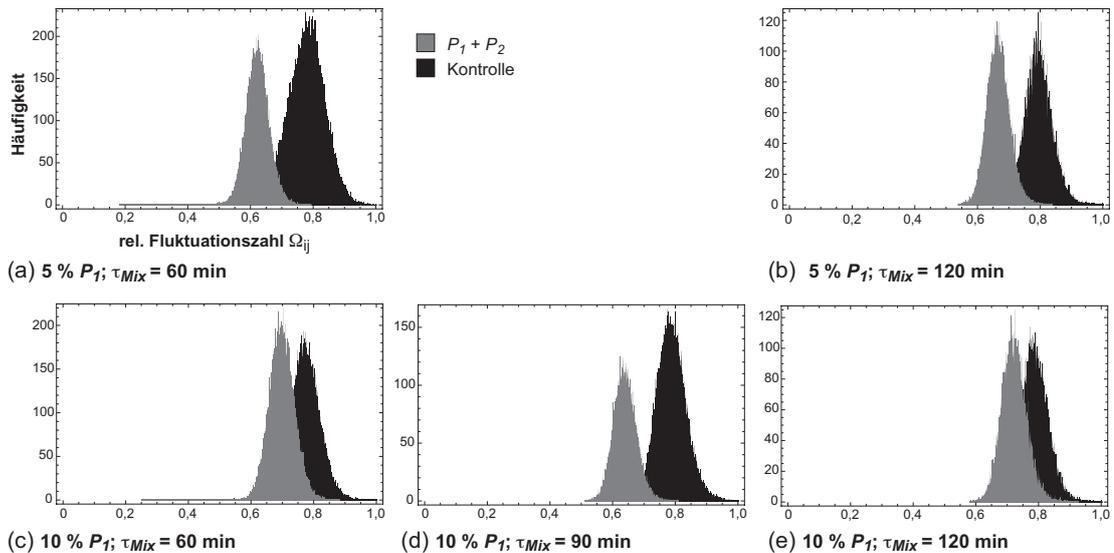


Abbildung 4.28: Verteilungen Ω_{ij} aus raumzeitlichen Datensätzen gemischter Populationen ($\Omega_{ij}(M)$ grau) und der Kontrollgruppen ($\Omega_{ij}(K)$ schwarz). Jeder Unterabbildung lagen die Daten eines Experiments mit unterteilter Petrischale und die gleiche Anzahl an Bildpunkten zugrunde. In (a) und (b) betrug der Anteil an P_1 5%, in (c)–(e) 10%.

gen von Ω_{ij} bei unterschiedlichen Verzögerungszeiten τ_{Mix} und Mischungsverhältnissen

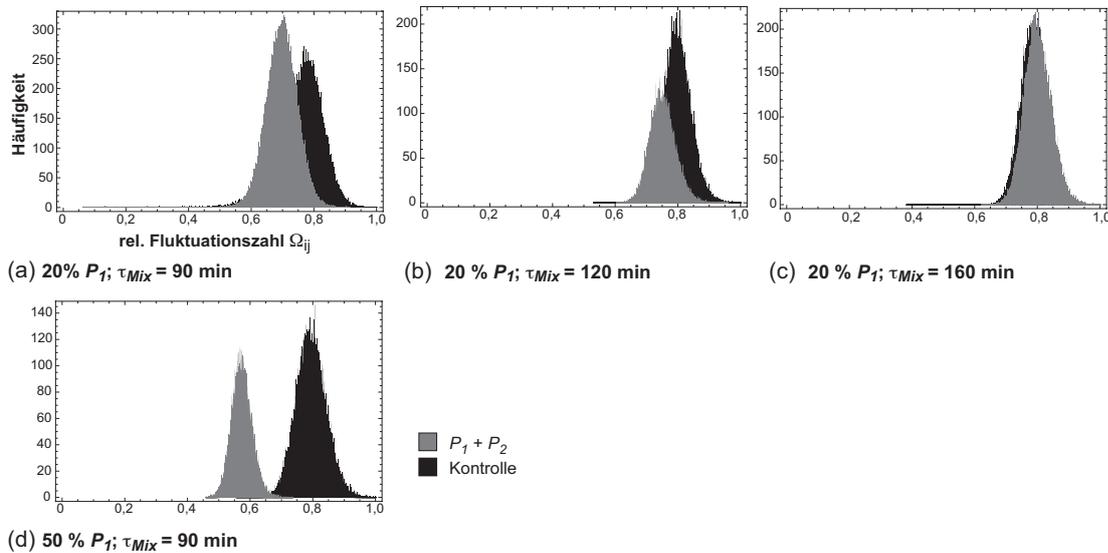


Abbildung 4.29: Verteilungen Ω_{ij} aus raumzeitlichen Datensätzen gemischter Populationen ($\Omega_{ij}(M)$ grau) und der Kontrollgruppen ($\Omega_{ij}(K)$ schwarz). In (a)–(c) betrug der Anteil an P_1 bei den gemischten Zellen 20%, in (d) 50%. In (d) wurde P_1 als Kontrollgruppe verwendet.

von P_1 und P_2 . Jede Unterabbildung gehört dabei zu einem einzelnen Experiment. Die jeweils dargestellten Verteilungen der gemischten Population ($\Omega_{ij}(M)$) und der Kontrollgruppe ($\Omega_{ij}(K)$) wurden also parallel innerhalb einer unterteilten Petrischale beobachtet. Aufnahmebedingungen, wie beispielsweise die Intensität des Messlichtes oder die optische Auflösung waren bei allen Experimenten gleich. Die errechneten Ω_{ij} wurden wie bereits zuvor in Abschnitt 4.2.1 normiert, weil hier lediglich bewertet werden soll, ob sich die relative Lage der Verteilungen der gemischten Zellen von denen der Kontrollgruppen grundsätzlich unterscheidet. Der Berechnung der Observablen lag innerhalb eines Experiments (also bei den beiden Verteilungen jeder Unterabbildung) jeweils ein exakt gleich großer Bildausschnitt zugrunde. Aus Abbildung 4.28, sowie Abbildung 4.29 und den Analysen weiterer Datensätze geht hervor, dass auch hier bei den meisten Kombinationen zwischen Mischungsverhältnis und Verzögerungszeit τ_{Mix} eine Separation von $\Omega_{ij}(M)$ und $\Omega_{ij}(K)$ stattfindet. In nahezu allen Fällen liegt $\Omega_{ij}(M)$ links von $\Omega_{ij}(K)$ und damit in einem niedrigeren Wertebereich als die Verteilung der jeweiligen Kontrolle. Hätte das Mischen von Zellgruppen unterschiedlichen Entwicklungsalters tatsächlich die Erhöhung des Grades der Desynchronisation der Zellkultur zur Folge gehabt, wäre nach den Ergebnissen bei synchronen Zellen (Abschn. 4.19, insbesondere Abb. 4.19) zu erwarten gewesen, dass sich $\Omega_{ij}(M)$ nun rechts von $\Omega_{ij}(K)$ anordnet. Tatsächlich ist das nur in seltenen Fällen und dann auch nicht deutlich zu beobachten gewesen. In der Mehrzahl der Experimente ordnet sich $\Omega_{ij}(M)$ links von den Verteilungen der Kontrollgruppen an.

Hier erhebt sich der Verdacht, dass die Aufbewahrung von P_1 in nährstofffreiem Puffer ungewollt dazu geführt hat, dass die Zellen synchron wurden. Ein einfacher Test kann zur Aufklärung beitragen. In Abbildung 4.29(d) wurde anstelle von P_2 (wie bei allen anderen in Abb. 4.28 und Abb. 4.29 zugrundeliegenden Experimenten) als Kontrolle P_1 verwendet. Wäre die Ursache der Separation der Verteilungen $\Omega_{ij}(M)$ und $\Omega_{ij}(K)$ darauf zurückzuführen, dass sich in der gemischten Population anteilmäßig Zellen in einem synchronen Zustand befunden hätten, so müsste sich die Position von $\Omega_{ij}(K)$ in der Abbildung zum einen von den Positionen der Kontrollen der übrigen Unterabbildungen unterscheiden, was nicht beobachtet wurde, zum anderen hätten $\Omega_{ij}(M)$ und $\Omega_{ij}(K)$ ihre relativen Positionen vertauschen müssen (die gemischte Population würde nur 50 % synchrone Zellen beinhalten im Gegensatz zum Anteil von 100 % der Kontrolle) oder zumindest mehr oder weniger übereinander liegen müssen. Tatsächlich bleibt aber auch beim Verwenden von P_1 als Kontrolle die relative Lage beider Ω_{ij} -Verteilungen erhalten. Die Ω_{ij} -Verteilung ungemischter Kulturen war immer im gleichen Wertebereich zu finden, unabhängig davon, ob die Zellen direkt nach dem Entfernen des nährstoffhaltigen Mediums in Puffer gelagert (P_1) oder sofort nach der Präparation auf der Agarschicht verteilt wurde (P_2). Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Zellen von P_1 unbeabsichtigt synchron geworden sind und auch dass Alterungs- oder Absterbeprozesse für die Aussortierung verantwortlich sind.

Ergänzend zu den Abbildungen 4.28 und 4.29 sind in Abbildung 4.30 die gemittelten

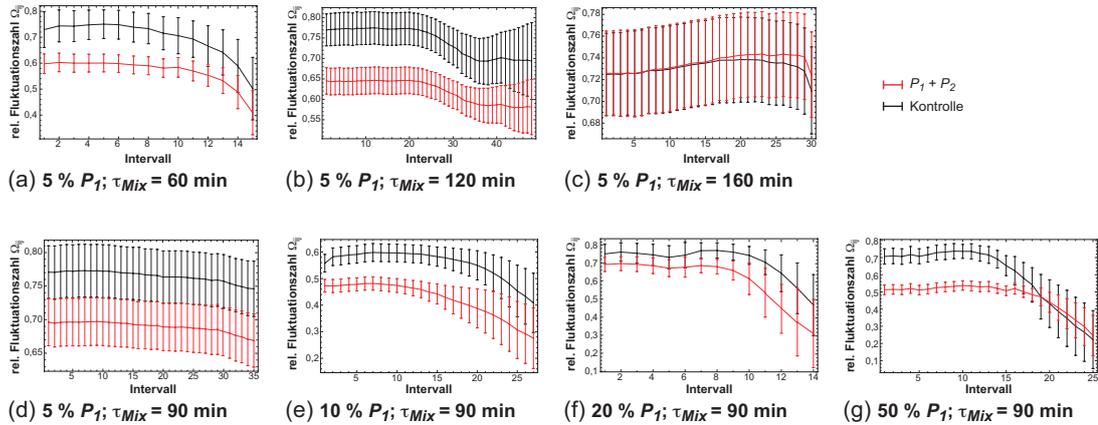


Abbildung 4.30: Gemittelte Ω_{ij} aufeinanderfolgender Intervalle bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und Verzögerungszeiten τ_{Mix} . Von (a)–(d) erhöht sich τ_{Mix} von 60 auf 160 min bei 5 % an Zellen der Gruppe P_1 . In (d)–(g) wurde das Mischungsverhältnis bei $\tau_{Mix} = 60$ systematisch variiert. Die gemittelten Ω_{ij} mit der jeweiligen Standardabweichung der gemischten Populationen sind rot, die der Kontrollgruppen schwarz dargestellt. Vor der Mittelwertbildung wurden die Ω_{ij} normiert.

Ω_{ij} einzelner aufeinanderfolgender Bildintervalle bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und Verzögerungszeiten dargestellt. Die Standardabweichung vom Mittelwert jedes Intervalls kann als ein Maß für die Streuung der Ω_{ij} der einzelnen Bildpunkte vom Mit-

telwert betrachtet werden. Hier wird die zeitliche Stabilität der Verteilungen nochmals verdeutlicht. Erst im fortgeschrittenen Stadium (z.B. im Bereich von Intervall 25 in Abb. (c)) ändern die Ω_{ij} ihren mittleren Wertebereich und die Streuung der Werte vergrößert sich. In Abbildung 4.30(a)–(c) wurde die Verzögerungszeit erhöht bei einem Anteil von 5 % der Zellen der Gruppe P_1 . Hier zeigt sich ein häufig beobachtetes Phänomen. Bei sehr hohen τ_{Mix} kann keine Separation der Verteilungen beobachtet werden (c). In (d)–(g) wurde das Mischungsverhältnis bei $\tau = 90$ min systematisch variiert. Hier zeigt sich bei

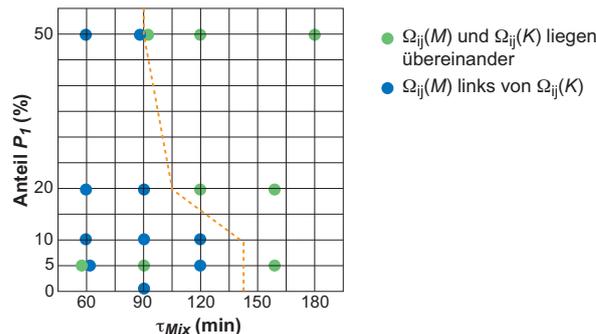


Abbildung 4.31: Anordnung der Verteilungen von Ω_{ij} nach ihrem Sortierungsverhalten in Abhängigkeit von τ_{Mix} und dem Anteil an P_1 . Jeder Punkt im Diagramm entspricht mehreren Experimenten mit unterteilter Petrischale und parallel beobachteter Kontrollgruppe. Blaue Punkte zeigen auf, dass sich die Lage der Ω_{ij} -Verteilung der gemischten Population ($\Omega_{ij}(M)$) deutlich von der Lage der Ω_{ij} -Verteilung der Kontrollgruppe ($\Omega_{ij}(K)$) unterscheidet, wobei sich $\Omega_{ij}(M)$ links von $\Omega_{ij}(K)$ anordnet. Grüne Punkte markieren experimentelle Bedingungen bei denen $\Omega_{ij}(M)$ und $\Omega_{ij}(K)$ übereinander liegen. Befinden sich zwei verschieden farbige Markierungen auf einem Gitterpunkt (wie bei 50 % P_1 und $\tau_{Mix} = 90$ min bzw. 5 % P_1 und $\tau_{Mix} = 60$ min), so konnte keine eindeutige Aussage über die Anordnung von $\Omega_{ij}(M)$ in Bezug zu $\Omega_{ij}(K)$ gemacht werden. Es wurden nur gleich große Bildausschnitte und experimentelle Bedingungen miteinander verglichen, die zeitgleich innerhalb einer unterteilten Petrischale untersucht wurden.

allen Mischungsverhältnissen eine Trennung der Verteilungen beider Zellgruppen. Die beiden Abbildungen 4.28 und 4.29 haben gezeigt, dass sich die räumlichen Verteilungen von Ω der gemischten Zellen von den Verteilungen der Kontrollgruppen deutlich unterscheiden können, wobei sich $\Omega_{ij}(M)$ dann links von $\Omega_{ij}(K)$ anordnet. Gleichzeitig treten auch Fälle auf, in denen sich die relative Lage der beiden Verteilungen nicht unterscheidet. Abbildung 4.31 fasst diese Beobachtungen für eine Vielzahl von Experimenten in Abhängigkeit des aufgetragenen Anteils an P_1 und τ_{Mix} in Form eines Punktdiagramms zusammen. Jeder Punkt geht dabei aus der Analyse mehrerer Einzelerperimente mit gleicher Parameterkombination hervor. Konnte keine eindeutige Anordnung bestimmt werden (wie es bei 5 % P_1 , $\tau_{Mix} = 60$ min und bei 50 % P_1 , $\tau_{Mix} = 90$ min der Fall war), so findet sich an der entsprechenden Stelle im Diagramm die farbliche Kennzeichnung aller beobachteten Situationen. Nach Abbildung 4.31 lassen sich die Verteilungen $\Omega_{ij}(M)$ bei

hohem τ_{Mix} nicht voneinander unterscheiden. Bei mittlerem τ_{Mix} ordnen sich die $\Omega_{ij}(M)$ -Verteilungen hauptsächlich links von $\Omega_{ij}(K)$ an. Bei niedrigem Anteil an P_1 (5%) und kleinem τ_{Mix} können die Verteilungen in einigen Fällen ebenfalls nicht voneinander unterschieden werden. Aus der Abbildung ergibt sich, dass eine systematische Separation beider Ω_{ij} -Verteilungen unter bestimmten Parameterkonstellationen, insbesondere in mittleren Parameterbereichen stattfindet, während eine starke zeitliche Trennung der Zellgruppen zu keiner Trennung führt.

Wie auch bei den synchronen Zellen in Abschnitt 4.2.1 beobachtet, zeigen die Verteilungen von I_{ij} keine systematischen Abhängigkeiten von den gewählten Parameterkonstellationen. In keinem Fall konnte die Lage oder Gestalt der I_{ij} -Verteilung einer gemischten Population von der Verteilung ihrer Kontrollgruppe unterschieden werden.

4.2.3 Globale Änderung der Erregbarkeit durch chemische Effektoren

Die Störung der Wellenpropagation durch chemische Effektoren oder die Verwendung von Mutanten in den Elementen der Signaltransduktion ermöglicht die Identifizierung von (für eine stabile Wellenpropagation und Zellaggregation) essentiellen Systemvariablen. Mit Hilfe bekannter Zusammenhänge kann bei Verwendung chemischer Verbindungen mit unbekanntem Wirkmechanismus phänomenologisch auf deren mögliche Wirkweise geschlossen werden. Muster können als eine Art Lupe betrachtet werden, um die regulatorische Wirkung unbekannter Effektoren zu bewerten. Die statistische Analyse der Muster leistet einen Beitrag zum Verständnis des Systems.

Im folgenden Abschnitt sind die Effekte von Koffein auf die Musterbildung dargestellt. Koffein ist ein bekannter Inhibitor der cAMP-abhängigen Aktivierung der AC und hat einen systematischen dosisabhängigen Einfluss auf die Musterbildung [Bre84, Sie89]. Die Zugabe von 2–3 mM Koffein zum Agar zur Beobachtung von Wellenstrukturen ist ein standardisiertes Verfahren zur Verringerung der globalen Erregbarkeit der Zellen und zur Kontrastverstärkung der Strukturen. Mit den im folgenden dargestellten Experimenten wurden bereits publizierte Resultate von Siegert & Weijer (1989) reproduziert [Sie89]. Die Ergebnisse wurden zur Aufklärung des Wirkmechanismus eines bisher auf die Musterbildung bei *Dictyostelium* nicht untersuchten Adenosinanalogs (IPA) zum Vergleich herangezogen. Weiterhin wurden die Datensätze mit Hilfe der Fluktuationszahl Ω_{ij} analysiert und die Ergebnisse im Zusammenhang konkreter Zelleigenschaften bewertet.

Zur Analyse der Wellenparameter unter dem Einfluss von Koffein wurden nur Spiralwellen – vom Beginn der Wellenpropagation bis zum Übergang der Zellschicht in Aggregationsströme – berücksichtigt. Unter Bedingungen, die zu einer Destabilisierung etablierter Spiralmuster führten (z.B. hohe Dosen von Koffein) wurden nur Zeitfenster der Daten mit stabilen Spiralmustern analysiert.

Effekte des Koffeins auf die Musterbildung und die Aggregation

Die Anwesenheit von Koffein verstärkt in hohem Maß den optischen Kontrast und die Stabilität der Erregungswellen. Abbildung 4.32 zeigt Erregungsmuster unter dem Ein-

fluss von 1, 3 und 6 mM Koffein (Abb. 4.32 (b)–(d)) im Vergleich zu Bedingungen ohne Koffein (Abb. 4.32 (a)). Während die Wellen in (a) nur als kontrastarme flächig pro-

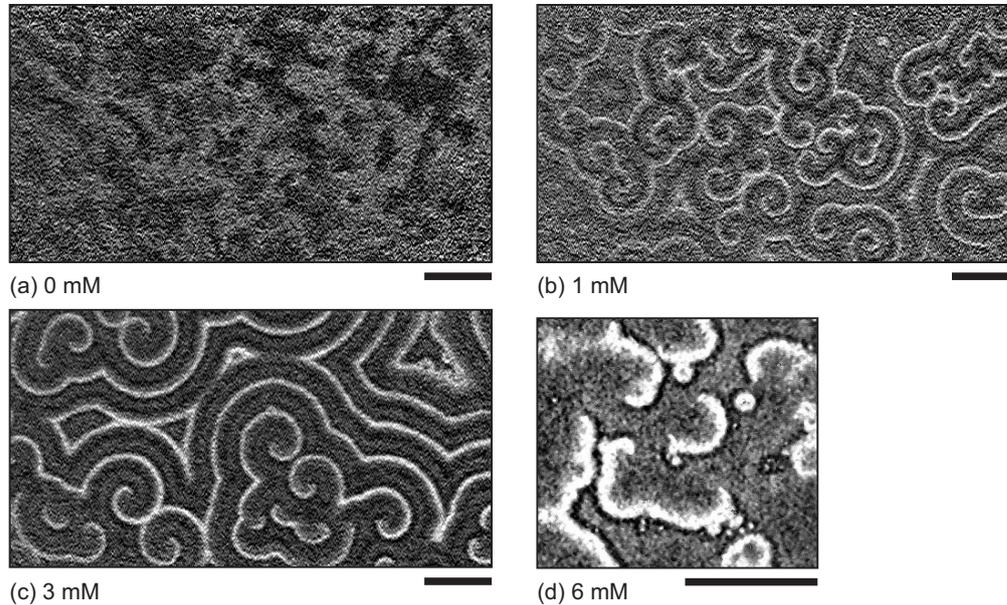


Abbildung 4.32: Wellenmuster unter dem Einfluss von Koffein. In (a) wurde kein Koffein zum Agar zugegeben. In (b) waren die Zellen Koffeinkonzentrationen von 1 mM, in (c) 3 mM und in (d) 6 mM ausgesetzt. Die Größenbalken unter jeder Abbildung entsprechen 5 mm.

pagierende Regionen zu erkennen sind, bilden sich bereits bei 1 mM Koffein deutliche Spiralmuster aus (b). Eine Konzentration von 3 mM Koffein führt dabei zu einer weiteren Kontrastverstärkung und der Vergrößerung der Einzugsgebiete einzelner Spiralen durch zunehmende Windungszahl und größere Wellenlängen (c). Koffeinkonzentration von 4 und 5 mM führen dagegen zu Spiralwellen mit häufig instabilen und gestörten Wellenfronten. Bei 6 mM Koffein treten bereits zu Beginn der Musterbildung deutlich weniger Spiralwellen und hauptsächlich Targetwellen auf (Abb. 4.32 (d)). Insgesamt sind die Strukturen weniger langreichweitig. Die Anzahl der in Abbildung 4.33 dargestellten Phasensingularitäten (also die Zahl der Spiralzentren; vgl. Abschn. 3.9.1) pro Fläche in Abhängigkeit der Koffeinkonzentration spiegelt diese Beobachtungen quantitativ wider.

In allen Experimenten mit Koffeinkonzentrationen zwischen 0–6 mM konnten zu Beginn der Musterbildung Spiralmuster beobachtet werden. Bei Koffeinkonzentrationen, die höher als 3 mM waren, wurden die Spiralzentren dosisabhängig im zeitlichen Verlauf kontinuierlich größer. Abbildung 4.34 zeigt dies am Beispiel einer Zellschicht, die 5 mM Koffein ausgesetzt war. Mit der Zeit bilden sich aus an den Orten ehemaliger Spiralzentren überdimensionierte und zellfreie Löcher. Dies entspricht den Beobachtungen von Siegert & Weijer (1989) [Sie89]. In Abbildung 4.35 ist die Entwicklung einer solchen Zellschicht und die

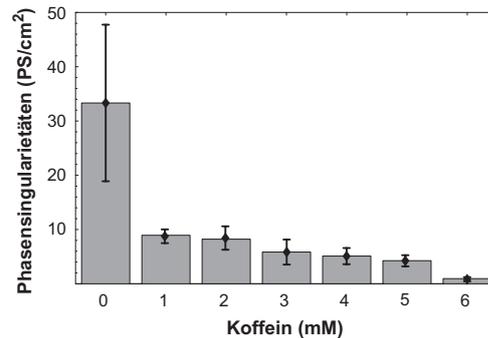


Abbildung 4.33: Räumliche Dichte der Phasingsingularitäten in Abhängigkeit der Koffeinkonzentration. Die Anzahl der Phasingsingularitäten bezieht sich auf die frühen Muster der Aggregation, unabhängig davon, ob die entsprechenden Spiralwellen durch hohe Dosen von Koffein im späteren Verlauf gestört oder instabil wurden. Bei 0 mM Koffein wurden nicht die Phasingsingularitäten aus den Erregungsmustern detektiert, sondern die Anzahl der Mounds pro Fläche nach der Aggregationsphase bestimmt.

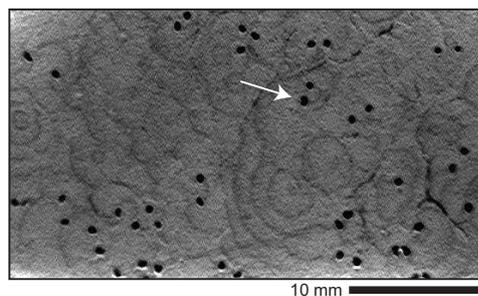


Abbildung 4.34: Zellfreie Löcher ehemaliger Spiralkerne in einer Zellschicht bei 5 mM Koffein

Entstehung der Löcher zu sehen. Spiralwellen mit anwachsenden Durchmessern ihrer Zentren werden im zeitlichen Verlauf instabil. Dabei bilden sich häufig scheinbar vielarmige Spiralwellen auf der durch fortgeschrittene Chemotaxis bereits inhomogenen Zellschicht (Abb. 4.35(f)). Die Destabilisierung der Spiralmuster geht mit dem Auftreten von Erregungsmustern aus Targetwellen einher, die im Vergleich zu den ursprünglichen Spiralwellen mit einer höheren Oszillationsfrequenz generiert werden [Pol05].

In Anwesenheit von 1–6 mM Koffein, ebenso wie bei den Experimenten ohne Koffein, konnten bei einzelnen Spiralen zwischen 20 bis 45 Rotationen beobachtet und meist auch ebenso viele Wellenfronten vermessen werden. Abbildung 4.36 zeigt die zeitliche Entwicklung der Propagationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Koffeinkonzentration. Die Geschwindigkeit der Wellen ist bei den eingesetzten Koffeinkonzentrationen zu Beginn der Aggregationsphase variabel. Bei den Kontrollexperimenten (in diesem Fall mit 0 mM Koffein) fällt die Geschwindigkeit im zeitlichen Verlauf der 18 vermessenen Wellenfronten

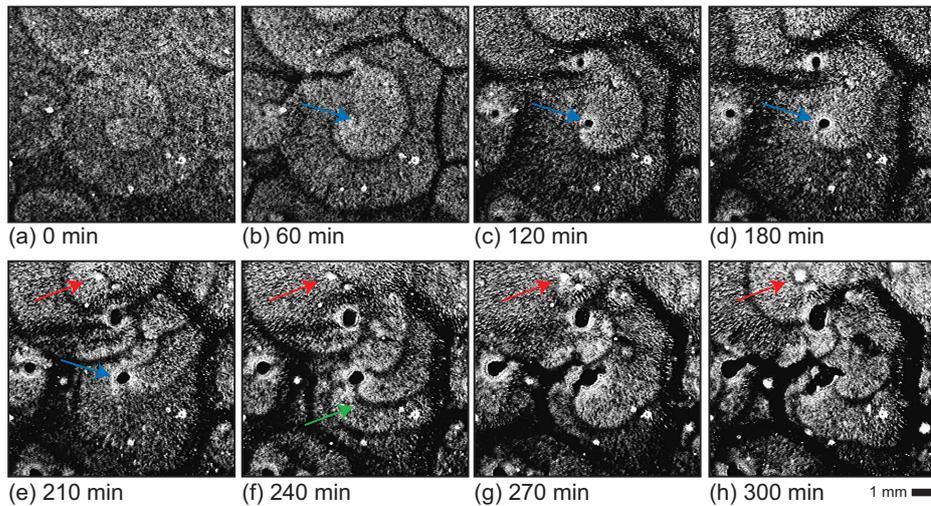


Abbildung 4.35: Musterbildung unter dem Einfluss von 5 mM Koffein mit kontinuierlich wachsenden Spiralzentren (blaue Pfeile in (b)–(e)). Die Inhomogenität der Zellschicht fördert die Entstehung mehrarmiger Spiralwellen (grüner Pfeil in (f)). Auftretende Targetwellen dominieren das ursprüngliche Spiralmuster (rote Pfeile in (e)–(h); vgl. [Pol05]). Die Zentren der Targetwellen bilden im weiteren Verlauf der Entwicklung die mehrzelligen Moundstadien. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Aufnahmebeginn.

von $420 \mu\text{m}/\text{min}$ auf $150 \mu\text{m}/\text{min}$ in sigmoidaler Weise ab. Die Verwendung von Koffein führt zur einem lineareren Abfall der Geschwindigkeit innerhalb der gleichen Größenordnung allerdings über einen Verlauf von etwa 30 Spiralrotationen. Da in Abbildung 4.36 die Geschwindigkeit der Wellenpropagation als Funktion der Wellennummer aufgetragen ist, wird anhand der Anzahl an vermessenen Spiralwellen deutlich, dass Koffein auch die zeitliche Entwicklung der Aggregationsphase maßgeblich beeinflusst. Ohne Koffein ist die Dauer der im Dunkelfeld sichtbaren Erregungswellen vor dem Übergang der Zellschicht zu den charakteristischen Strömungsmustern deutlich kürzer.

In Abbildung 4.37 ist die zeitliche Entwicklung der Rotationsperiode (a) und der räumliche Abstand aufeinanderfolgender Wellenfronten (b) dargestellt. Ohne Koffein verringern sich beide Größen linear von 6 auf 3 min bzw. 1,4 auf 0,4 mm, wobei 20 bis 25 Rotationen beobachten werden konnten. Die Dauer aufeinanderfolgender Spiralrotationen verringert sich in Anwesenheit von 1 und 2 mM Koffein von 6–7 min auf etwa 3 min. Der Verlauf entspricht im wesentlichen dem ohne Koffein, wobei sich dieser Vorgang über bis zu 40 Rotationen hinzieht. Bei Konzentrationen von 3–6 mM verändert sich die zeitliche Entwicklung beider Größen deutlich. Bei Konzentrationen von 3 und 4 mM Koffein verringert sich die Periodenlänge noch während der ersten 10 Rotationen von etwa 10 min auf 6–7 min. Danach folgt für die nächsten 5–6 Umdrehungen keine Veränderung der Periodenlänge, bis der Verlauf dann mit zunehmender Entwicklung nach etwa 20 Rotationen in einen ansteigenden Bereich übergeht. Bei 5 und 6 mM Koffein kommt es nach anfäng-

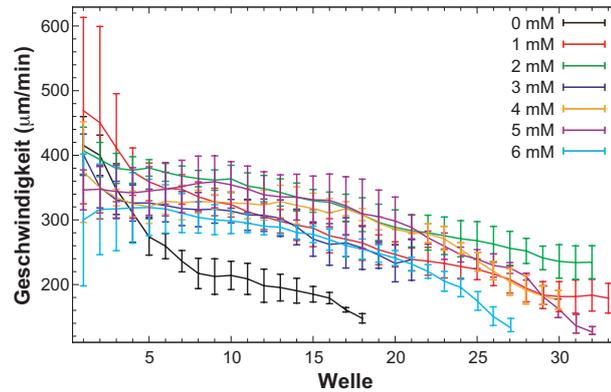


Abbildung 4.36: Propagationsgeschwindigkeit sukzessiver Wellenfronten in Abhängigkeit der Koffeinkonzentration. Von jeder Konzentration wurden 5–21 Spiralwellen aus unabhängigen Experimenten vermessen.

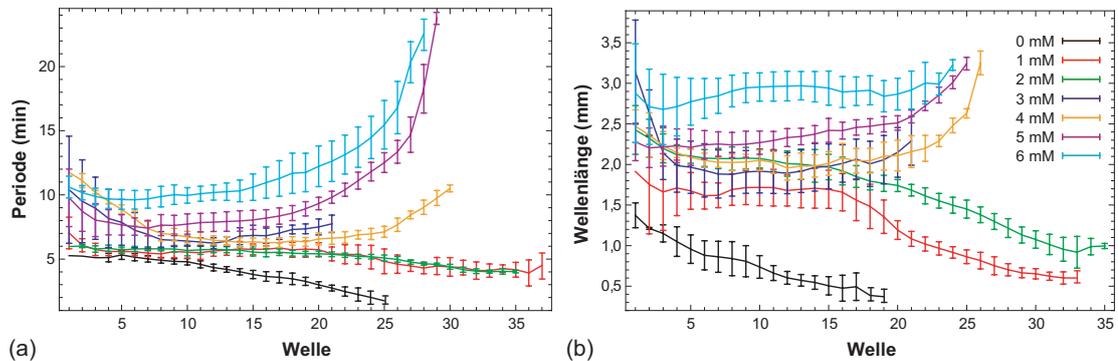


Abbildung 4.37: Rotationsperiode (a) und Wellenlänge (b) im Verlauf der Aggregation in Abhängigkeit der Koffeinkonzentration. Jeder Verlauf beinhaltet die gemittelten Werte von 5–21 vermessenen Spiralwellen aus unabhängigen Experimenten.

lichem Verringern der Periodenlänge über 4–5 Rotationen mehr oder weniger direkt zum Anstieg der Werte. Demgemäß verhält sich die Änderung der Wellenlänge qualitativ ähnlich (Abb. 4.37(b)). Bei Verwendung von 1 und 2 mM Koffein wird sie, wie auch ohne Koffein, mit jeder folgenden Rotation kleiner, wobei sich der Verlauf der Wellenlänge ohne Koffein von etwa 1,4 mm auf 0,4 mm linear verhält. Bei 1 und 2 mM finden sich zu Beginn der Aggregation wesentlich größere Wellenlängen als ohne Koffein im Bereich von 2–2,5 mm. Bei allen höheren Konzentrationen wird, wie auch bei der Periodenlänge ein Anstieg der Werte mit fortgeschrittener Entwicklung beobachtet.

Die Dispersionsrelation in Abbildung 4.38 fasst die Beziehung der Propagationsgeschwindigkeit und der Rotationsperiode in Abhängigkeit der verwendeten Koffeinkonzentration zusammen. Bei 0, 1 und 2 mM Koffein reduziert sich die Propagationsgeschwindigkeit

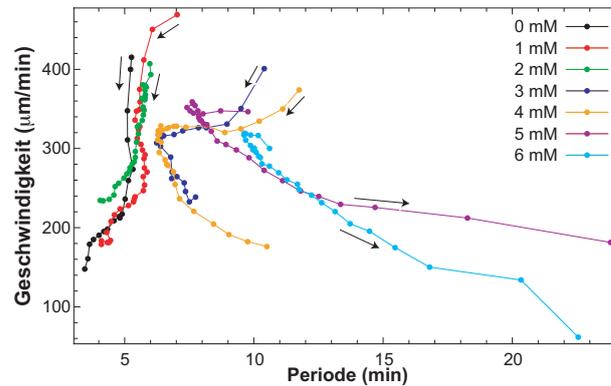


Abbildung 4.38: Dispersionsrelation in Abhängigkeit der Koffeinkonzentration. Der zeitliche Verlauf ist durch Pfeile angegeben.

bei kleiner werdender Periodenlänge. Bei 3 und 4 mM Koffein findet eine Umkehr des Verlaufs in Richtung ansteigender Periodenlänge nach etwa der Hälfte der durchlaufenen Spiralrotationen statt. Bei 5 und 6 mM hat sich das Verhältnis vollständig umgekehrt. Die Periodenlänge wächst nahezu sofort zu Beginn der Musterbildung bei gleichzeitig kleiner werdender Geschwindigkeit. Diese Beobachtungen entsprechen im wesentlichen denen von Siegert & Weijer (1989) [Sie89].

Analyse der Musterbildung unter dem Einfluss von Koffein mit Hilfe von Ω_{ij}

In den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 wurde am Beispiel synchroner und gemischter Zellen unterschiedlichen Entwicklungsalters gezeigt, dass sich die extrahierten Werte der räumlichen Verteilungen von Ω deutlich von solchen Verteilungen der Kontrollexperimente unterscheiden. Insbesondere konnte bei den synchronen Zellen der Grad der Synchronität – gemessen als Zeitraum zwischen dem Überführen der synchronen Kultur in nährstoffhaltiges Medium – aus den Verteilungen näherungsweise rekonstruiert werden. Die gemischten Zellen zeigten ebenfalls abweichende Werteverteilungen ihrer Ω_{ij} im Vergleich zu den Kontrollexperimenten. Die Muster der Zellen auf koffeinhaltigem Agar bieten nun die Möglichkeit, die extrahierten Ω_{ij} konzentrationsabhängig, zum einen mit zwar global modifizierten, aber konkreten Zelleigenschaften, zum anderen mit Mustereigenschaften in Verbindung zu bringen. Koffein ist ein dosisabhängiger Inhibitor der Aktivität der AC, der die Erregbarkeit einer Zellschicht reduziert, was sich in einer verlängerten Refraktärphase der Zellen äußert [Bre84, Sie89]. Hier ergibt sich eine Analogie zur Erregbarkeit g im Automatenmodell, die dort die Rate, mit welcher ein Element einen Erregungszyklus durchläuft, bestimmt (Abschn. 4.1). Zieht man dieses Modell zu Vergleichen heran, so kann die Änderung der Koffeinkonzentration im Agar mit einer systematischen, aber globalen Erniedrigung von g verbunden werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Analyse der Zellschichten auf koffeinhaltigem

Agar ist die konzentrationsabhängige Dichte auftretender Phasensingularitäten. Während die Muster synchroner und gemischter Zellen keine offensichtliche Änderung der Dichte der Phasensingularitäten zeigen, kann im Fall der Zellschicht in Anwesenheit von Koffein nun untersucht werden, welchen Einfluss die Mustereigenschaften auf die Verteilungen von Ω_{ij} haben. Abbildung 4.33 hat bereits gezeigt, dass Koffein eine deutliche Erniedrigung der Phasensingularitätsdichte bewirkt.

Abbildung 4.39 zeigt nun erneut exemplarisch einige Histogramme von Ω_{ij} , diesmal in

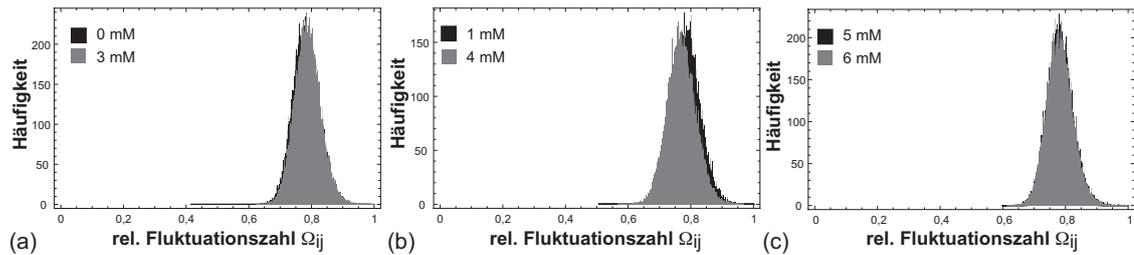


Abbildung 4.39: Ω_{ij} -Verteilungen bei unterschiedlicher Koffeinkonzentration. In (a) betrug die Konzentration 0 und 3 mM, in (b) 1 und 4 mM und in (c) 5 und 6 mM. Jede Unterabbildung stammt aus einem Experiment mit unterteilter Petrischale. Die Berechnung erfolgte jeweils mit derselben Anzahl an Bildpunkten. Die optische Vergrößerung der Zellschicht während der Aufnahme war mit der Vergrößerung während der Dokumentation synchroner und gemischter Zellen identisch.

Abhängigkeit von der vorhandenen Koffeinkonzentration. Die dargestellten Verteilungen in den Unterabbildungen (a)–(c) stammen von zeitgleich dokumentierten Mustern in unterteilten Petrischalen. Jeder Verteilung lag die gleiche Anzahl an Bildpunkten zugrunde. Die dargestellten Verteilungen bleiben über weite Zeitfenster hinweg (vor und während der Musterbildung) konstant.

Obwohl Koffein die Erregbarkeit der Zellschicht und damit die Mustereigenschaften offensichtlich beeinflusst, konnte in keinem Fall eine Separation der Ω_{ij} -Verteilungen beobachtet werden. Selbst bei dem in Abbildung 4.39(a) dargestellten Extremfall (die PS-Dichte bei 0 mM Koffein beträgt $33,32 \text{ PS/cm}^2$, bei 3 mM jedoch nur $5,85 \text{ PS/cm}^2$; vgl. Abb. 4.33), liegen die Verteilungen beider Zellgruppen übereinander. Ebenso verhält sich der Vergleich bei sehr hohen Koffeindosen. Selbst bei 6 mM Koffein, das eine besonders starke qualitative Änderung der Mustereigenschaften hervorruft, sind die Ω_{ij} -Verteilungen nicht von anderen Koffeinkonzentrationen zu unterscheiden. Einerseits war dies bei der globalen Änderung von Zelleigenschaften auch nicht unbedingt zu erwarten (da Ω_{ij} auf gerichteten Zell-Zell-Unterschieden in Raum und Zeit beruht), andererseits zeigt dies noch einmal deutlich, dass Ω_{ij} nicht trivial durch Mustereigenschaften und stationären Strukturen geprägt wird.

Muster und Entwicklungszyklus in Anwesenheit eines Adenosinanalogs

Der folgende Abschnitt ist eine erweiterte Fassung von Hilgardt et al. (2008) und behandelt die Wirkung von 2',3'-O-Isopropylidenadenosin (IPA) auf die Aggregation von *Dictyostelium* [Hil08]. Die Strukturformel des Adenosinderivates wurde bereits in Abbildung 3.1(c) dargestellt. Newell & Ross (1982) haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Adenosin während der Entwicklung einen erheblichen Effekt auf die Musterbildung bei *Dictyostelium* hat. Insbesondere inhibiert Adenosin die Bindung von cAMP an cAR1 und die cAMP-abhängige postaggregative Entwicklung der Zellen. Adenosin konkurriert dabei nicht um die Bindestellen der cAMP-Rezeptoren. Vielmehr wird die Wirkung des Adenosins über spezifische Adenosinrezeptoren vermittelt [New82b]. In einer systematischen Studie untersuchten Van Lookeren et al. (1986) den Effekt verschiedener anderer Adenosinderivate auf die cAMP-Bindekapazität der Zellen [VLC86]. Zum Zeitpunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente existierte keine Kenntnis über die Wirkung der Substanz IPA auf die Musterbildung von *Dictyostelium*.

Abbildung 4.40 zeigt Momentaufnahmen der Musterbildung unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 0,25 mM IPA im Dunkelfeld. Unter beiden Bedingungen können 4–5 h nach der Initiation der Hungerphase erste Wellenstrukturen beobachtet werden. Während sich unter Kontrollbedingungen nach 5,5 h bereits stationäre Spiralmuster etabliert haben, werden in Anwesenheit von IPA erste propagierende Targetwellen nur auf Differenzbildern sichtbar (a). Nach 6,6 h zeigen sich auch hier Spiralwellen (b), welche im weiteren Verlauf benachbarte oszillatorische Regionen in ihrer Umgebung vereinnahmen und sich über die gesamte Agarfläche ausbreiten (b)–(d). Unter Kontrollbedingungen treten bereits nach 6 h erste Territorialgrenzen auf, nach etwa 8 h bilden sich charakteristische Strömungsmuster mit deutlich abgegrenzten Einzugsbereichen der Aggregationszentren (b)–(d).

Neben der sehr verschiedenen Entwicklung der Musterbildung in der Zeit fällt vor allem die Ausdehnung der Spiralwellen in Anwesenheit von IPA auf. Der Durchmesser solcher Spiralen ist unverhältnismäßig groß und beträgt einige Zentimeter (d) und wird typischerweise durch die Grenzen der Petrischale limitiert, während sich die Ausdehnung der Einzugsbereiche von Spiralen unter Kontrollbedingungen in jede Richtung auf wenige Millimeter beschränkt (a). Die Ausdehnung der Spiralwellen mit IPA unterliegt dabei keiner Konzentrationsabhängigkeit im untersuchten Bereich zwischen 0,125 und 2 mM.

Während sich die Zellen unter Kontrollbedingungen 9,1 h nach Initiation der Musterbildung in der späten Aggregationsphase befinden, weist die Beschaffenheit der Zellschicht in Anwesenheit von IPA keine offensichtlichen zeitlichen Veränderung auf (e). Selbst nach 10,5 h ist keine Verminderung der Homogenität der Zellschicht durch gerichtete Zellbewegung und Formierung von Zellströmen zu beobachten (f). Dies wird auch durch die Abwesenheit von, durch gerichtete Zellbewegung verursachte, Territorialgrenzen in Bereichen kollidierender und annihilierender Wellenfronten deutlich. Weiterhin bildeten sich keine zellfreien Löcher an den Orten der Spiralspitzen, wie es bei den Experimenten mit Koffein beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 4.34).

Obwohl die Spiralwellen in Anwesenheit von IPA mehr als 2 h als stabile ungestörte

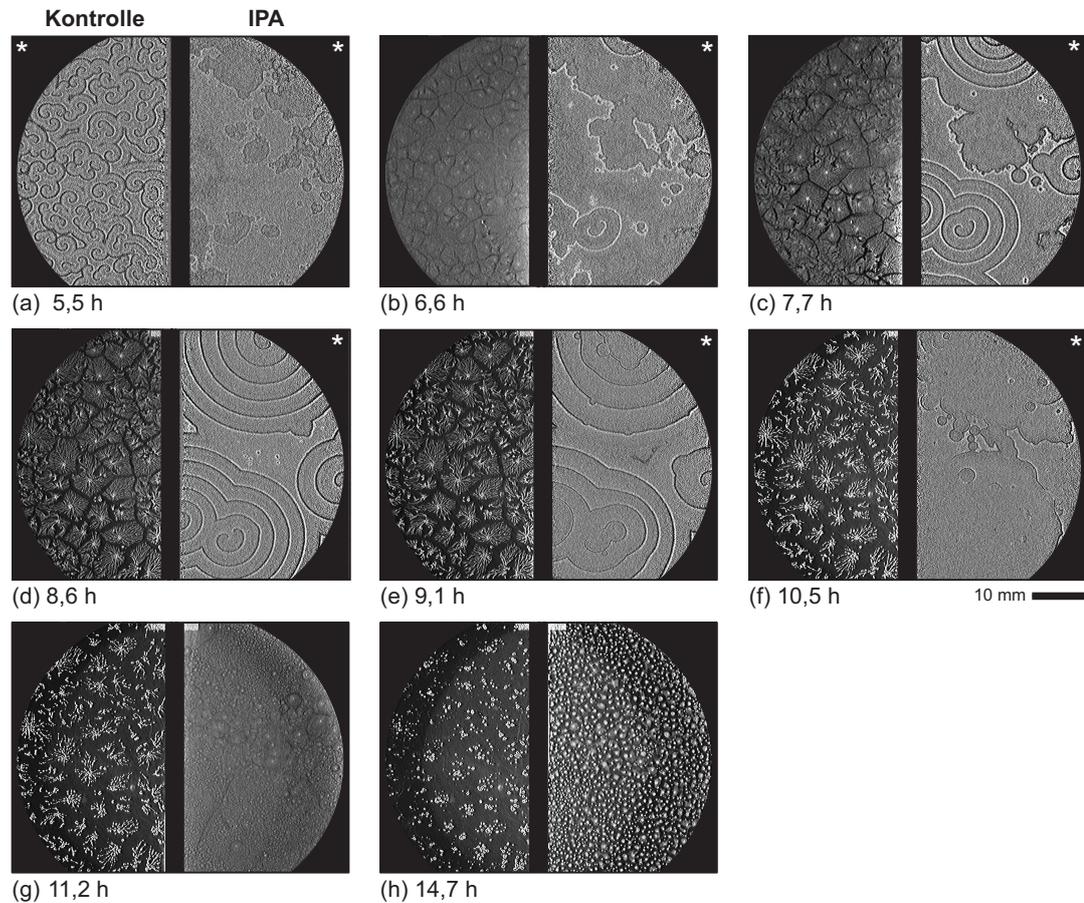


Abbildung 4.40: Erregungswellen in Anwesenheit von 0,25 mM IPA im Agar (rechte Hälfte in jeder Unterabbildung), und unter Kontrollbedingungen (linke Hälfte) im Dunkelfeld. Die Muster entstanden während desselben Experiments innerhalb einer unterteilten Petrischale. Markierungen (★) weisen auf Differenzbilder hin. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Zeit nach dem Entzug der Nahrung. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2008) [Hil08].

Fronten rotieren, lösen sich diese plötzlich innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeit simultan auf der gesamten Agarfläche auf (e)–(f). Insbesondere erfolgt dies innerhalb einzelner Spiralen von innen nach außen, d.h. dass die Rotation der Spiralspitze um das Spiralzentrum plötzlich aufhört. Das entstandene offene Wellenfragment propagiert nach außen, bis es an den Grenzen der Petrischale verlöscht. Während einer folgenden Übergangsphase von 2 h erscheint die Zellschicht mehr oder weniger unverändert. Auch hier zeigen Differenzbilder die Aktivität einzelner oszillatorischer Regionen, sowie die Propagation konzentrischer Targetwellen auf der noch immer homogenen Zellschicht (f). Sehr plötzlich bilden sich simultan viele verhältnismäßig kleine oszillierende Aggregationszentren, zu welchen sich die Zellen der unmittelbaren Nachbarschaft bewegen. Diese Bewegung

führt zum Zerfall der homogenen Zellschicht in regelmäßig über die gesamte Oberfläche verteilte Miniaturzentren (g)–(h), doch können auch hier keine charakteristischen Zellströme beobachtet werden. Im fortgeschrittenen Stadium gehen diese Zentren in Mounds über. Nach etwa 30 h ist der Entwicklungszyklus durch die Bildung vieler kleiner, aber vergleichsweise normal proportionierter Fruchtkörper abgeschlossen.

In starkem Kontrast zur Abwesenheit von Zellströmen steht die Beobachtung, dass in

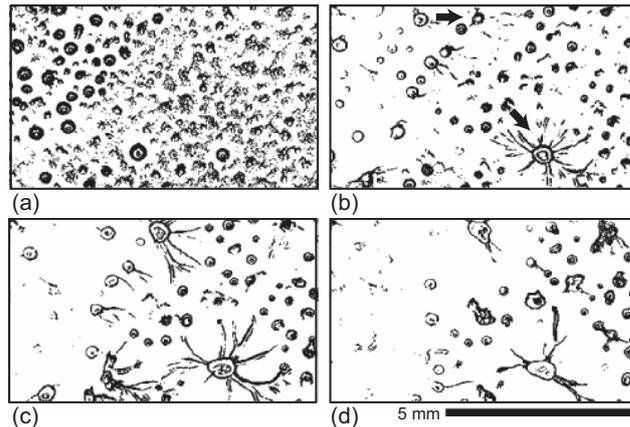


Abbildung 4.41: Moundfusion in Anwesenheit von 0,25 mM IPA im Agar (invertierte Grauwerte). Dominierende Mounds (Pfeile in (b)) absorbieren benachbarte Mounds über dicke „Zellströme“. Die Aufnahmedauer zwischen (a) und (d) betrug 8,5 h. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2008) [Hil08].

einigen Fällen während des Moundstadiums mit IPA einzelne dominierende Mounds mit benachbarten kleineren Mounds fusionieren. Eine derartige Situation ist in Abbildung 4.41 dargestellt. Die Absorption der Zellen erfolgt dabei innerhalb dicker, schlauchartiger mehr oder weniger verzweigter Strukturen (b)–(d). Die Analyse solcher Daten zeigt, dass die dominierenden Mounds konzentrische Targetwellen emittieren, die eine gerichtete Zellmigration über Einzugsgebiete von einigen Millimetern Entfernung verursachen.

Der optische Eindruck der Spiralmuster aus den Abbildungen 4.40 spiegelt sich quantitativ in der Dichte der Phasensingularitäten wider, die aus den Phaseninformationen der Muster bestimmt wurden und in Abbildung 4.42 dargestellt sind. Die Ausdehnung der Spiraldomänen der frühen Muster in Anwesenheit von IPA führt zu einer äußerst geringen Anzahl an Spiralen pro Flächeneinheit. Dabei zeigt sich keine Konzentrationsabhängigkeit im untersuchten Bereich zwischen 0,125 und 2 mM IPA.

Die Entwicklung der Muster, ebenso die zeitliche Änderung der lokalen Zelldichte, kann in den in Abbildung 4.43 dargestellten Raum-Zeitplots verfolgt werden. Die Unterabbildungen (a) mit den Mustern unter Kontrollbedingungen und (b) in Anwesenheit von 0,25 mM IPA stammen aus einem Experiment mit unterteilter Petrischale und können direkt entlang der Zeitachse miteinander verglichen werden. Für Abbildung (c) lagen die Muster aus der rechten Hälfte der Petrischale aus Abbildung 4.40 mit 0,25 mM IPA zugrunde.

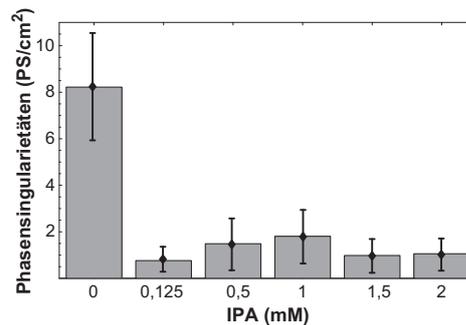


Abbildung 4.42: Dichte der Phasensingularitäten in Abhängigkeit der IPA-Konzentration im Agar.

Hier ist die zeitliche Entwicklung der Zellschicht über einen besonders langen Zeitraum von etwa 9 h zu sehen. Während in (a) die gerichtete Zellbewegung mit der Zeit kontinuierlich fortschreitet und zur Bildung deutlich abgesetzter Aggregationszentren entlang der räumlichen Achse führt, finden in Abbildung (b) und (c) erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium deutliche Änderungen der lokalen Zelldichte und zwar nach der frühen Wellenpropagation (Phase I) und dem Auflösen der Wellen (Phase II) in der Phase der sekundären Wellenmuster (Phase III) statt. Die Anordnung der Aggregationszentren ist – im Gegensatz zu den Kontrollbedingungen in (a) – nicht mit den Wellenstrukturen aus Phase I räumlich korreliert.

Zur Bestimmung der Wellenparameter wurden auch hier Raum-Zeitplots, wie sie in Abbildung 4.43 dargestellt sind und schon zuvor bei der Verwendung von Koffein (Abschn. 4.2.3) zum Einsatz kamen, systematisch vermessen. In Abbildung 4.44(a) ist der Verlauf der Propagationsgeschwindigkeit sukzessiver Erregungswellen in Anwesenheit von IPA (0,125–2 mM) während der frühen Phase der Musterbildung in Phase I und unter Kontrollbedingungen dargestellt. Unter allen Bedingungen propagieren die Wellen zu Beginn ihrer Entstehung mit Geschwindigkeiten im Bereich von 300–500 $\mu\text{m}/\text{min}$. Mit fortschreitender Entwicklungszeit verringert sich die Geschwindigkeit kontinuierlich. Es sind keine signifikanten Unterschiede in Anwesenheit von IPA im Vergleich zu den Kontrollbedingungen zu erkennen, doch unterscheidet sich der Verlauf der Geschwindigkeitsänderung. Während die Geschwindigkeit bei der Kontrolle linear abfällt, zeigt sich in Anwesenheit von IPA ein sigmoidaler Verlauf. Dies konnte bereits bei der Verwendung von Koffein beobachtet werden (Abschn. 4.2.3; vgl. Abb. 4.36).

In Abbildung 4.44(b) und (c) ist die zeitliche Änderung der Rotationsperiode und der Wellenlänge aufeinanderfolgender Erregungswellen bei 0,125–2 mM IPA und unter Kontrollbedingungen dargestellt. Die Wertebereiche und zeitlichen Änderungen beider Größen unterscheiden sich mit IPA deutlich von denen der Kontrollbedingungen. Bei den Kontrollexperimenten nehmen beide Parameter linear und kontinuierlich mit fortschreitender Entwicklung ab. In Anwesenheit von IPA ist sowohl die Rotationsperiode als auch die Wellenlänge zu Beginn der frühen Musterbildung (Phase I) verhältnismäßig hoch. Beide

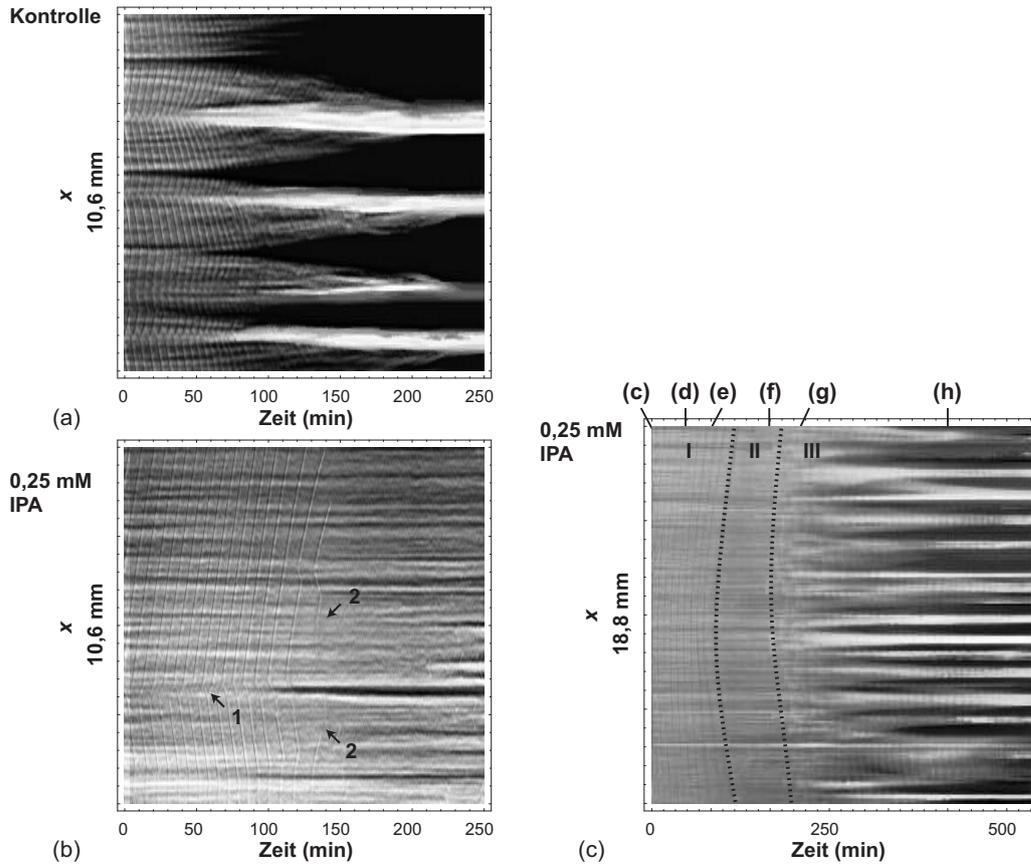


Abbildung 4.43: Raum-Zeitplots unter Kontrollbedingungen (a) und in Anwesenheit von 0,25 mM IPA im Agar (b) und (c). Die Muster von (a) und (b) stammen aus einem Experiment mit unterteilter Petrischale. Pfeile in (b) weisen auf ein Spiralzentrum (1) und auf offene Wellenenden (2) hin. (c) wurde aus den Mustern bei 0,25 mM IPA aus Abbildung 4.40 (rechte Hälfte jeder Petrischale) erzeugt. Die Positionen der Unterabbildungen (c)–(h) aus Abbildung 4.40 sind entlang der Zeitachse in (c) markiert. Besondere Entwicklungsabschnitte (frühe Spiralwellen (Phase I), Verschwinden der Wellenstrukturen und Übergangsphase (Phase II) und sekundäre Wellenmuster (Phase III)) sind ebenfalls angegeben. Die Abbildung stammt aus Hilgardt et al. (2008) [Hil08].

Größen werden zunächst kontinuierlich kleiner, bevor sie dann nach etwa 10 Rotationen wieder stetig ansteigen, solange bis die Wellen am Übergang zu Phase II verschwinden. Abbildung 4.44(d) zeigt die Propagationsgeschwindigkeit als Funktion der Periodenlänge der Wellen. Die Pfeile innerhalb der Abbildung markieren die Richtung der Zeit. Bei den Kontrollbedingungen nimmt die Geschwindigkeit mit kleiner werdender Periodenlänge ab. In Anwesenheit von IPA folgt die Dispersionsrelation einem komplexeren Verlauf. Die zunächst kleiner, dann wieder größer werdende Rotationsperiode bei kontinuierlich kleiner werdender Propagationsgeschwindigkeit äußert sich in einer Richtungsumkehr der

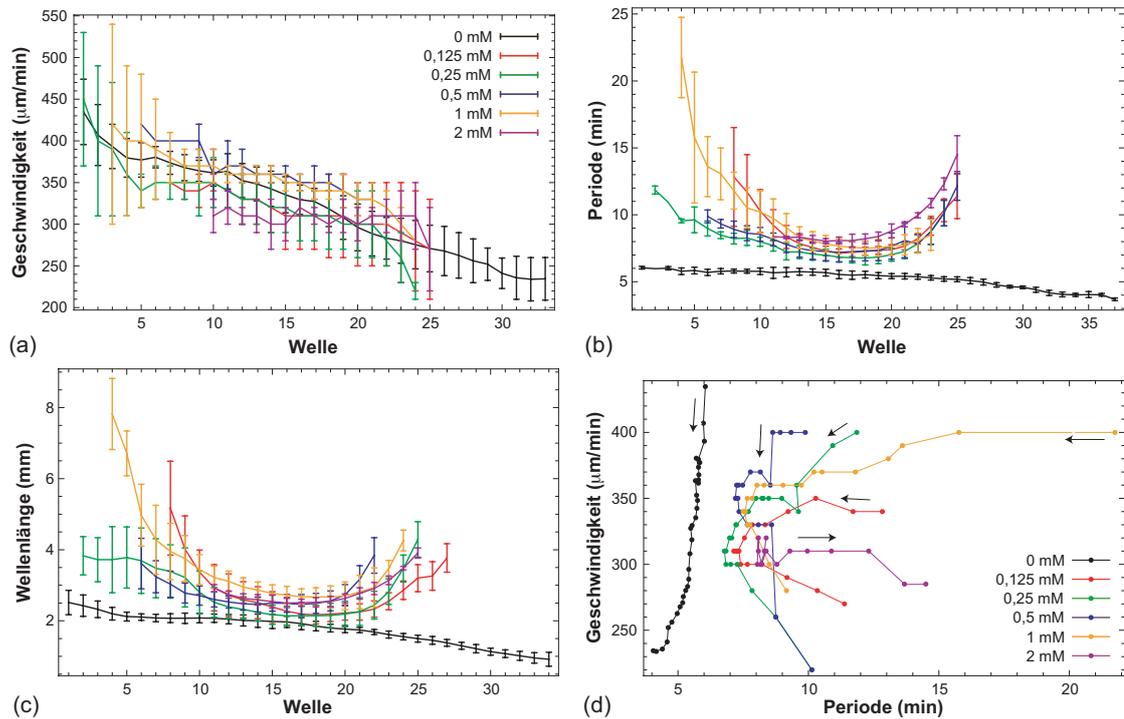


Abbildung 4.44: Wellenparameter (a)–(c) und Dispersionsrelation (d) in Abhängigkeit der vorhandenen Konzentration an IPA im Agar während der frühen Musterbildung (Phase I). Die x -Achse in (a)–(c) bezieht sich auf Wellen rotierender Spiralen die sukzessiv einen räumlichen Analysebereich durchlaufen haben. Zur Erstellung dieser Verläufe wurden von jeder Konzentration 6–11 Spiralwellen aus unabhängigen Experimenten analysiert. Die Standardabweichung um die gebildeten Mittelwerte ist durch Fehlerbalken dargestellt. Die Änderungen der Propagationsgeschwindigkeit sukzessiver Wellen aus (a) wurden als Funktion der Rotationsperiode (b) zur Erstellung der Dispersionsrelation (d) aufgetragen. Der Verlauf der Zeit ist dort durch Pfeile markiert.

Verläufe. Ähnliche Beobachtungen wurden in Zusammenhang mit Koffein gemacht (Abschn. 4.2.3; vgl. Abb. 4.38).

Um anhand der Reaktion der Zellen auf IPA Rückschlüsse auf die involvierten zellulären Strukturen ziehen zu können, wurden etablierte Wellenmuster der Kontrollzellen mit einem feinen Nebel einer IPA-Lösung (2 mM in KK2) besprüht. Eine unmittelbare und sichtbare Wirkung blieb dabei aus. Im Gegensatz dazu erzeugt das Aufsprühen von cAMP-Lösung ein „Resetting“ der Wellen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass IPA nicht mit cAMP um dieselben Rezeptoren konkurriert. Chemotaxis-Assays zeigten, dass IPA weder eine attraktive Wirkung auf die Zellen hat, noch dass die Bewegung der Zellen in Anwesenheit von IPA in Richtung einzelner aufgetragener Tropfen gelösten cAMP (30 nM in KK2) beeinträchtigt wird. Zellen mit und ohne IPA im Agar wandern in vergleichbarer Weise nach einer gewissen Zeit zum cAMP hin.

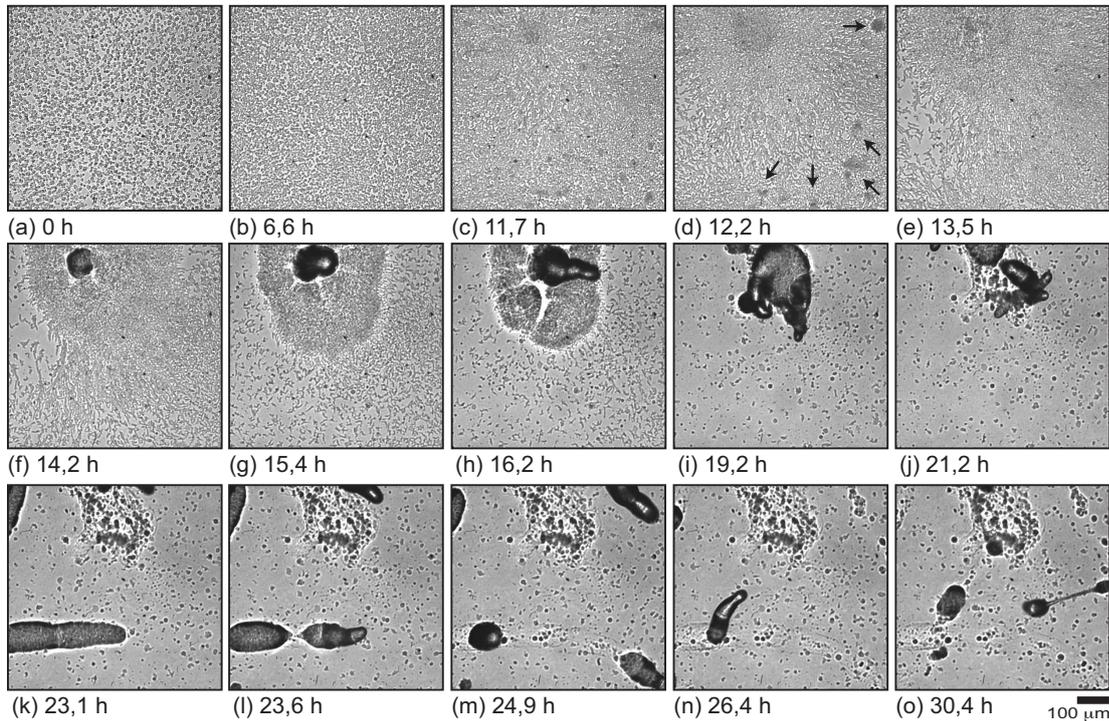


Abbildung 4.45: Aufnahmen eines vollständigen Entwicklungszyklus in Anwesenheit von 1 mM IPA im Phasenkontrast über ein Zeitintervall von 30 h. Die Zeitangaben entsprechen der vergangenen Zeit seit Initiation der Musterbildung. Die Zellen streben ohne die Formierung charakteristischer Aggregationsströme in Richtung eines Zentrums links oben (a)–(f). Das moundartige Gebilde in (f) erfährt vielfältige morphologische Änderungen und bildet mehr als eine fingerförmige Organisationsstruktur (g)–(j). Slugs zerreißen beim Migrieren über den Untergrund in kleinere Strukturen (k)–(n). In (o) hat sich ein Fruchtkörper gebildet. Die Abbildung stammt in ihrer ursprünglichen Fassung aus Hilgardt et al. (2008) [Hil08].

Mikroskopische Untersuchungen der Zellaggregation bei IPA im Agar bestätigen das zunächst im Dunkelfeld beobachtete Ausbleiben charakteristischer Zellströme während der Aggregation und die fehlende Korrelation der anfänglichen Spiralmuster mit den im Anschluss an die Aggregation folgenden morphologischen Stadien (Abb. 4.40). In Abbildung 4.45 ist eine mikroskopische Serie von Momentaufnahmen bei 1 mM IPA dargestellt. Die Aufnahme wurde direkt nach der Präparation der Zellen gestartet. Abbildung 4.45(a) kann also als der Zeitpunkt der Initiation der Hungerphase betrachtet werden. 5–6 h nach der Initiation der Hungerphase kann in Abbildung 4.45(b) eine lokale Zunahme der Zelldichte beobachtet werden. Parallele Aufnahmen im Dunkelfeld bestätigen, dass diese Dichtezunahme innerhalb von Phase I geschieht. In (c) und (d) lassen sich zumindest zeitweise einzelne Zellanhäufungen ausmachen, auf welche die Zellen der Umgebung zuströmen. An der Zellform in (c) bis (e) ist die Polarisierung der Zellen zu erkennen.

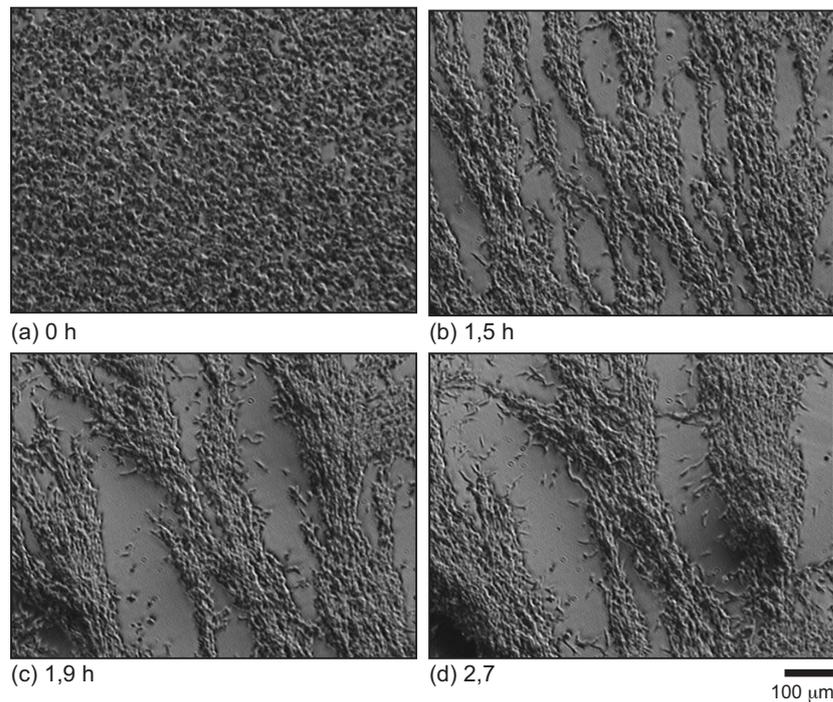


Abbildung 4.46: Momentaufnahmen von Zellströmen bei *Dictyostelium* unter Kontrollbedingungen im Phasenkontrast. Die Zeitangaben sind relativ und beziehen sich auf den Aufnahmebeginn. Während die Zellen in (a) noch verhältnismäßig homogen verteilt sind, streben diese in (b) in Richtung eines Aggregationszentrums außerhalb des Bildausschnitts. Mit der Zeit schließen sich die Ströme zusammen (c). In (d) ist die langgestreckte Form der polarisierten Zellen deutlich zu erkennen.

Trotzdem aggregieren diese in flächiger Weise und nicht innerhalb von Strömen auf das attraktive Zentrum links oben zu. In der filmischen Betrachtung dieser und anderer Daten ist zu sehen, dass die einzelnen Zellen auf Wellen aus verschiedenen Richtungen reagieren und häufig ihre Orientierung ändern. In (f) hat sich eine moundartige Struktur gebildet. Diese ist mannigfaltigen Umformungen unterworfen, bildet dabei jedoch nie ein kompaktes Zellaggregat (g)–(i). Immer wieder erscheinen gleichzeitig mehrere fingerförmige Organisationszentren, die wieder mit dem Zellhaufen verschmelzen können (i). In (j) hat sich ein Teil der Struktur vom Aggregat abgetrennt, der als slugartiges Gebilde über den Untergrund aus dem Aufnahmebereich migriert. Immer wieder durchlaufen Slugs anderen Ursprungs den Bildausschnitt (k)–(l), die auseinanderreißen und in mehrere kleinere Strukturen übergehen (m)–(n). In Abbildung (o) hat sich nach mehr als 30 h schließlich ein Fruchtkörper gebildet. In einigen Experimenten wurde beobachtet, wie sich aus dem Bereich der Sporenmasse erneut Slugs bilden, die wiederum über den Untergrund migrieren. Zum direkten Vergleich des Aggregationsverhaltens der Zellen auf IPA und unter Kontrollbedingungen sind in Abbildung 4.46 einige Momentaufnahmen der Aggregation

von Zellen unter Kontrollbedingungen zu sehen. Hier sind die sich zu Strömen vereinende Zellen deutlich zu erkennen.

Die morphologischen Untersuchungen der Zellen unter dem Einfluss von IPA werden an dieser Stelle durch die Bestimmung der gebildeten Sporenmenge der Fruchtkörper ergänzt. Die mikroskopischen Analysen in Abbildung 4.46 haben gezeigt, dass während des Entwicklungszyklus häufig unförmige Zellaggregate auftreten, die in bereits durchlaufene Stadien rücktransformieren können (z.B. vom Fruchtkörper ins Slugstadium nach dem Abreißen von Zellmassen). Daher stellt sich die Frage, ob unter solchen Bedingungen der Entwicklungszyklus erfolgreich abgeschlossen werden kann. Sporen von *Dictyostelium* sind lichtmikroskopisch einfach von den Zellkörpern zu unterscheidende Strukturen. In Abbildung 4.47 ist die relative Anzahl der aus den Fruchtkörpern isolierte Sporen

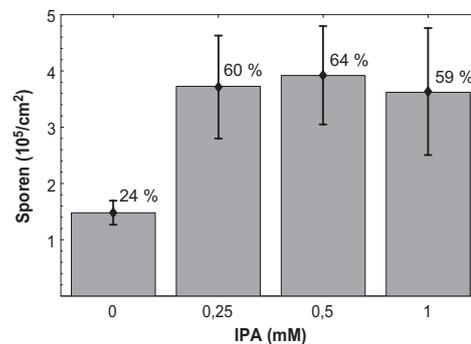


Abbildung 4.47: Sporenausbeute in Abhängigkeit der vorhandenen Konzentration an IPA im Agar. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die aufgetragene Gesamtzahl an Zellen. Für jede Konzentration wurden die Sporen von 25 Petrischalen gezählt. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

dargestellt. Zur Analyse wurde die gleiche Anzahl an Zellen auf Agarschichten mit variierten IPA-Konzentrationen aufgetragen. Die prozentualen Angaben in der Abbildung beziehen sich auf diese absolute Zahl an aufgetragenen Zellen, die dann einen vollständigen Entwicklungszyklus durchlaufen durften. Unter dem Einfluss von IPA haben sich dabei bei allen eingesetzten Konzentrationen etwa 60 % aller aufgetragenen Zellen in Sporen umgewandelt, im Gegensatz zu den Kontrollexperimenten. Hier wurden etwa 24 % der ursprünglich aufgetragenen Zellen als Sporen geerntet. Da die Ernte der Sporen von großen Verlusten begleitet ist, können diese Angaben nur als relative Angaben zwischen den IPA-Konzentrationen betrachtet werden. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Fehlerbalken. Zur Analyse wurde die Anzahl der Sporen von jeweils 25 Petrischalen bestimmt. Die quantitative Analyse der gebildeten Sporenzahl der Fruchtkörper ergibt eine signifikante Erhöhung ihrer Zahl in Anwesenheit von IPA.

Analyse der Muster in Anwesenheit von IPA mit Ω_{ij}

Die Analyse der Muster der Zellen auf IPA-Agar mit Hilfe der Fluktuationzahl ergab keine von den Kontrollzellen abweichenden Ω_{ij} -Verteilungen, wie es auch schon im Fall der mit Koffein behandelten Zellen in Abb. 4.39 beobachtet werden konnte. Abbildung 4.48 zeigt exemplarisch die zeitliche Entwicklung der gemittelten Ω_{ij} mit den zugehörigen Standardabweichungen aufeinanderfolgender Bildintervalle bei 0,25 mM IPA im Vergleich zu den Verteilungen der Kontrollzellen. Der zugrundeliegende Datensatz ist derselbe wie in

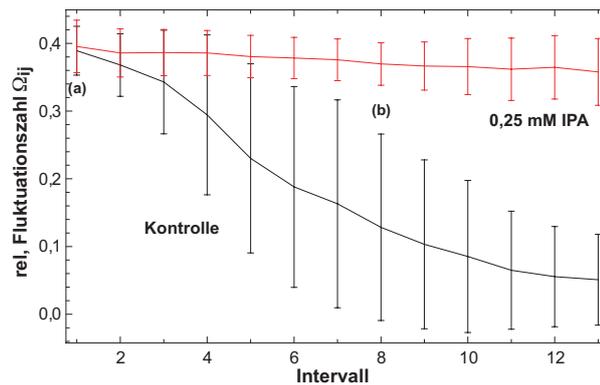


Abbildung 4.48: Gemittelte Ω_{ij} und Standardabweichungen aufeinanderfolgender Bildintervalle bei 0,25 mM IPA (rot) und bei Kontrollzellen (schwarz). Die Verteilungen wurden aus den Daten von Abbildung 4.40(a) bis nahezu (c) berechnet. Hier war die Entwicklung der Kontrollzellen bereits weit fortgeschritten. Die Ω_{ij} -Verteilung bewegt sich kontinuierlich zu kleineren Werten hin.

Abbildung 4.40. So kann die zeitliche Entwicklung der Observablen beim Vergleich mit den Mustern besser verstanden werden. Während auf der linken Seite in Abbildung 4.40(a) ausgeprägte Spiralwellen zu sehen sind, werden in (b) erste Territorialgrenzen deutlich sichtbar.¹ Die mittleren Ω_{ij} in Abbildung 4.48 sind zu diesem Zeitpunkt bereits in einem sehr niedrigen Wertebereich. Die Verteilungen der Zellen auf Agar mit 0,25 mM IPA bleiben dagegen auf hohem Niveau. Der Vergleich von Ω_{ij} -Verteilungen die von Zellen stammen, die weniger weit in ihrer Entwicklung fortgeschritten waren zeigte bei allen getesteten IPA-Konzentrationen zwischen 1,25 mM und 2 mM keine unterschiedlichen Wertebereiche.

¹ Da es sich bei Abbildung 4.40(a) um ein Differenzenbild handelt, können erste Territorialgrenzen nicht gesehen werden. Tatsächlich ist die Entwicklung der Kontrollzellen auf der linken Seite schon verhältnismäßig weit fortgeschritten.

5 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle biologischer Variabilität auf die Musterbildung von *Dictyostelium* untersucht. Motiviert wurde dieses Vorgehen durch die Hypothese, dass biologische Variabilität auf Zellebene einen entscheidenden Einfluss bei der Entstehung makroskopischer Muster hat, genauer gesagt, dass die Brechung räumlicher Symmetrien in biologischen Systemen durch Variabilität gesteuert wird. Nach dieser Vorstellung soll die räumliche Verteilung von Zelleigenschaften die raumzeitlichen Muster maßgeblich prägen.

In die experimentellen Arbeiten vorbereitenden numerischen Simulationen wurden zunächst die Regeln von Variabilität in den Musterbildungsprozessen eines einfachen Automatenmodells untersucht und für die Analyse raumzeitlicher Datensätze entwickelte Methoden auf die Muster des Modells angewendet (Abschn. 4.1). Diese raumzeitlichen Filter basieren dabei auf der Abschätzung von Systemeigenschaften aus Nachbarschaftskonstellationen raumzeitlicher Datensätze. Insbesondere die Methoden zur Quantifizierung raumzeitlicher Fluktuationen Ω_{ij} stellte hier einen geeigneten Ausgangspunkt dar, um Variabilität sichtbar zu machen. Auf diese Weise konnten wichtige Methoden der Datenanalyse etabliert und die allgemeine, oben skizzierte Fragestellung konkretisiert werden.

Der Hauptteil der Arbeit bestand in der experimentellen Untersuchung raumzeitlicher Muster von *Dictyostelium* unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Abschn. 4.2). Insbesondere wurden Zellen in ihrem Zellzyklus synchronisiert und Zellgruppen mit unterschiedlichem Entwicklungsalter miteinander gemischt (Abschn. 4.2.1 und 4.2.2). Dies geschah in Anlehnung an den von Lauzeral et al. (1997) postulierten Entwicklungspfad bei *Dictyostelium* und sollte in einem Fall einer Minimierung, im anderen Fall einer Erhöhung des Desynchronisationsgrades der Zellen entlang des Pfades entsprechen [Lau97]. Globale Zelleigenschaften wurde durch die Verwendung der chemischen Effektoren Koffein und IPA systematisch variiert (Abschn. 4.2.3). Koffein verringert konzentrationsabhängig die Erregbarkeit einer Zellpopulation [Bre84, Sie89]. Über die Wirkung von IPA auf die Musterbildung waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine Informationen vorhanden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Substanz einerseits dem Koffein ähnliche Effekte auf die Musterbildung hervorruft, zudem aber auch ein gestörtes Aggregationsverhalten im späteren Verlauf des Entwicklungszyklus bewirkt.

Schließlich wurden die zwar numerisch etablierten Methoden auf die Analyse der unter diesen Bedingungen entstandenen biologischen Muster von *Dictyostelium* übertragen, um die räumlichen Verteilungen der Zelleigenschaften bei geändertem Desynchronisationsgrad und bei global geänderten Zelleigenschaften zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass sich die Verteilungen der Fluktuationszahl Ω_{ij} der Zellgruppen mit verändertem Desyn-

chronisationsgrad jeweils deutlich von den Verteilungen der Kontrollgruppen separieren, während sich die Zellen mit global geänderten Eigenschaften anhand ihre Ω_{ij} -Verteilungen nicht von den Kontrollgruppen unterscheiden lassen.

Gewonnene Ergebnisse wurden in folgender Weise publiziert: In Polezhaev et al. (2005) wurde ein Übergang von Spiral- zu Targetmustern, wie er beispielsweise bei der Gabe hoher Dosen von Koffein beobachtet werden kann, mit Hilfe eines modifizierten Martiel-Goldbeter-Modells untersucht. Diese Analysen zeigten, dass der lokalen Zelldichte im späten Stadium der Aggregation eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Targetzentren zukommen kann [Mar87, Pol05]. In Hilgardt et al. (2007) wurde erstmals die mögliche Rolle von Variabilität auf die Musterbildung biologischer Systeme konkret bei *Dictyostelium* und das Konzept der Extraktion mikroskopischer Eigenschaften auf Ebene makroskopischer Muster formuliert. Hier wurden ebenfalls die Ergebnisse der Rekonstruktion von Zelleigenschaften mit Hilfe der Fluktuationszahl Ω_{ij} und der Transinformation I_{ij} im Automatenmodell und erste Untersuchungen an experimentellen Daten mit Hilfe der Observablen aufgezeigt [Hil07]. In Geberth et al. (2009) wurden diese Untersuchungen durch die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das Auftreten von Phasensingularitäten in Abhängigkeit der räumlichen Verteilungen von Pacemakerelementen im Automatenmodell erweitert und die Verteilungen der Phasensingularitäten experimenteller Daten mit den Observablen korreliert [Geb09b]. In Hilgardt et al. (2008) wurden erstmals experimentelle Beobachtungen der Musterbildung unter dem Einfluss von IPA publiziert und mögliche Wirkungsmechanismen diskutiert [Hil08].

Diese Arbeit entstand in enger Verzahnung mit der Arbeitsgruppe „Computational Systems Biology“ an der Jacobs Universität Bremen unter der Leitung von Prof. Marc-Thorsten Hütt. Insbesondere wurden hier von Daniel Geberth wichtige Aspekte der Musterentstehung und die Rolle von Variabilität bei *Dictyostelium* mit Hilfe mathematischer Modellsysteme und experimenteller Daten untersucht. Im Rahmen seiner Arbeit wurden große Fortschritte in der theoretischen Betrachtung von biologischer Variabilität erzielt. Obwohl an vielen Stellen dieser Arbeit die Ergebnisse bereits am Ort ihrer Darstellung diskutiert wurde, sollen im folgenden einige wichtige Aspekte herausgegriffen und im Kontext der Ergebnisse und Vorstellungen anderer Autoren betrachtet werden.

5.1 Variabilität in simulierten Mustern des Automatenmodells

Musterbildung im Automatenmodell

In Abschnitt 4.1.1 wurde am Automatenmodell Variabilität durch die Einführung räumlicher Verteilungen zweier qualitativ unterschiedlicher ortsabhängiger Parameter implementiert, wobei einer der Parameter implizit die Dauer der Refraktärphase und der andere den Einfluss der Nachbarschaft auf die Zustandsentwicklung der Elemente bestimmt. Dabei wurde Variabilität im Sinne einer Pacemakerdichte systematisch variiert. Hier zeigte sich, dass der Anteil an Elementen mit unterschiedlicher Erregbarkeit und Sensitivität erheblichen Einfluss auf die asymptotischen Muster hat. Die qualitativen Beobachtungen

bleiben auch unter dem Einfluss von Rauschen erhalten. Während mit steigendem Anteil hochsensitiver Elemente die Größe der Domänen ansteigt, wirkt sich ein erhöhter Anteil hocherregbarer Elemente vor allem auf die bevorzugten Mustertypen aus. Mit zunehmendem Anteil dieser Elemente bilden sich vor allem Targetmuster. Für die Untersuchungen wurden identische Anfangsbedingungen mit zufälliger Verteilung der Zustände innerhalb des Zustandsraums $\Sigma = \{0, 1, \dots, n-1, n\}$ gewählt. Daraus ergibt sich, dass sich die meisten Elemente zu Beginn der Simulationen im erregten Zustand $(1, \dots, n-1)$ befunden haben. Systematische Analysen von Geberth (2009) haben gezeigt, dass die Wahl der Anfangsbedingungen der Zustände dieses Automatenmodells einen erheblichen Einfluss auf den Wirkungsgrad interagierender Wellenfragmenten und damit auch auf das Gewicht der variablen Elemente bei der Musterbildung ausüben [Geb09a]. Dabei können minimale Änderungen der Anfangsbedingungen die qualitativen Eigenschaften der Muster drastisch verändern. Im Fall von mehrheitlich erregbaren Elementen bei Simulationsbeginn wird die Dynamik des Systems stärker von den Interaktionen dominiert. Es zeigen sich dann keine offensichtlichen Abhängigkeiten der asymptotischen Muster von der zugrundeliegenden Variabilität [Geb09a]. Hieraus ergibt sich die Option der Rekonstruktion von Variabilität aus den Mustern mit Hilfe mathematischer Werkzeuge bei sich nicht ändernden Mustereigenschaften. Auf diese Weise kann der Einfluss der Mustereigenschaften auf die Rekonstruktion implementierter Zelleigenschaften besser verstanden werden.

Mustereigenschaften in Abhängigkeit von Variabilität in anderen Modellsystemen

Die Untersuchungen von Sawai et al. (2005) deckten an einem Hybridmodell nach Levine et al. (1996), welches als dynamische Variable neben der cAMP-Konzentration auch die cAMP-abhängige Erregbarkeit (pulsinduzierte Erregbarkeit) beinhaltet, eine enge Beziehung der Stärke der Wirkung von cAMP auf die Erregbarkeit (und damit der Stärke der genetischen Rückkopplung von cAMP auf die eigene Produktion) und der globalen Phasensingularitätsdichte auf [Kes93, Lev96, Saw05]. Insbesondere zeigen Sawai et al. (2005), dass bei einer mittleren Stärke der Rückkopplung ein Minimum der Dichte an Phasensingularitäten (also ein Maximum der Einzugsgebiete einzelner Spiralwellen) vorliegt. Dieser Zustand kann mit der Musterbildung des Wildtyps von *Dictyostelium* in Verbindung gebracht werden. Vergleiche der Simulationsergebnisse mit experimentellen Mustern von Mutanten der intrazellulären cAMP-Prozessierung zeigten eine hohe Übereinstimmung dieser Abhängigkeit [Saw05].

In Geberth & Hütt (2008) konnten dann anhand dieses Modells Bildungsgesetze der asymptotischen Mustern in Abhängigkeit individueller Pacemakerelemente formuliert werden [Geb08]. Es ergab sich eine starke Antikorrelation zwischen der räumlichen Verteilung der Phasensingularitäten und individuellen spontan feuernenden Pacemakerelementen. Dabei kann dem positiven Feedback des periodischen cAMP-Signals auf die Genexpression der Elemente der Signaltransduktion eine essentielle Rolle bei der Musterbildung zugewiesen werden. Insbesondere zeigte sich, dass diese pulsinduzierte Erregbarkeit in unmittelbarer Umgebung der Pacemakerelemente die störungsinduzierte Spiralbildung herbeiführt. In einem Minimalmodell aus drei Pacemakerelementen können daraufhin durch einfache

geometrische und probabilistische Argumente die Spiralpositionen vorhergesagt werden. Weiterhin konnte ein Ungleichgewicht in der Chiralität der gebildeten Spiralen in Abhängigkeit der Pacemakerverteilung beobachtet und mit denselben Argumenten erklärt werden [Geb08]. Innerhalb dieser Arbeit wurden somit zum erstenmal makroskopische Muster auf der Grundlage von Zell-Zell-Unterschieden in *Dictyostelium*-Modellen vorhergesagt.

Ebenso kann der von Lauzeral et al. (1997) postulierte Entwicklungspfad unter dem besonderen Aspekten der Variabilität betrachtet werden [Lau97, Geb09c]. Hier evolviert das Enzymsystem aus cAMP-Synthese und -Degradation einzelner Zellen desynchron entlang des Pfades und führt das System durch die verschiedenen dynamischen Regime. Unter geeigneten (dynamischen) Definitionen von Pacemakerzellen konnte auch in diesem System eine Antikorrelation der Positionen der Pacemakerzellen zu den räumlichen Verteilungen der Spiralzentren nachgewiesen werden [Geb09c]. Mit den neuen Methoden zur Extraktion von Phasensingularitäten und Targetzentren konnten die Wege zur etablierten Spiralen untersucht und so die Musterentstehung weiter klassifiziert werden [Geb10].

Rekonstruktion von Variabilität aus simulierten Mustern mit Ω_{ij}

In Abschnitt 4.1.2 führte die Korrelation der im Modell implementierten Zelleigenschaften und der Observablen Ω_{ij} und I_{ij} auf die erfolgreiche Rekonstruktion der Verteilungen der Eigenschaften unter den hier gewählten Anfangsbedingungen und Modellparametern. Für beide Zelleigenschaften werden die Korrelationskoeffizienten mit steigendem Anteil an Variabilität höher. Die deutliche Erhöhung der Korrelationskoeffizienten in Anwesenheit von Rauschen, das die Muster qualitativ nicht verändert, kann als indirekter Beweis betrachtet werden, dass die hohen Korrelationskoeffizienten nicht nur auf einfache Mustermerkmale zurückgeführt werden können. Das war insbesondere bei der Fluktuationszahl Ω_{ij} der Fall und kann dadurch erklärt werden, dass Rauschen den Möglichkeitsraum nachbarschaftlicher Unterschiede vergrößert.

Ein sehr entscheidendes Ergebnis in Hinblick darauf, dass mit Hilfe der Analysewerkzeuge tatsächlich Zell-Zell-Unterschiede extrahiert werden konnten, war die in Abschnitt 4.1.3 durchgeführte Pacemakerrekonstruktion (Abb. 4.10). Hier konnte gezeigt werden, dass beide Observablen ein individuelles Pacemakerelement mit niedriger oder höherer Erregbarkeit aus allen anderen Elementen zuverlässig extrahieren können. Solche Pacemaker-elemente heben sich deutlich in der (Ω, I) -Ebene von allen anderen Elementen ab, ohne einen qualitativen Einfluss auf die Muster zu haben. Hier wird der besondere Wert der Observablen deutlich: Die Identifizierung von Variabilität beruht auf Zell-Zell-Unterschieden. Die Verteilungen dynamischer Eigenschaften einzelner Elemente können durch die Berechnung raumzeitlicher, nachbarschaftlicher Differenzen ohne Kenntnis der zugrundeliegende Natur dieser Unterschiede mit Hilfe der Analysegrößen extrahiert werden.

Durch eine statistische Analyse konnte gezeigt werden, dass sich nach einer Vielzahl von Programmdurchläufen bei fixierten Elementen mit erhöhter Erregbarkeit und Elementen hoher Sensitivität innerhalb einer Umgebung mit zufällig gewählten Anfangsbedingungen, hohe statistische Wahrscheinlichkeiten für Orte der Spiralentstehung in der unmittelbaren

Umgebung der Elemente mit den abweichenden Eigenschaften ergeben, ohne dass sich dieser Zusammenhang in den Einzelsimulationen offensichtlich bemerkbar macht (Abschn. 4.1.3). Wie sich bei der qualitativen Betrachtung der Muster im Zusammenhang mit den Anfangsbedingungen bereits gezeigt hat, spielen diese bei der Musterentstehung eine maßgebliche Rolle, da hier Eigenschaften einzelner Elemente unterschiedlich stark amplifiziert und die Dynamik des Systems unterschiedlich von den Interaktionen einzelner Wellenfronten dominiert wird. So finden sich auch hier statistische Zusammenhänge, die stark von den Anfangsbedingungen geprägt sind [Geb09a]. Besonders interessant ist aber, dass die Musterbildung im Modell zwar durch die Aktivität periodischer Targetzentren initialisiert wird, dass aber deren Einfluss und Rolle bei der qualitativen Ausprägung der Muster maßgeblich durch die Eigenschaften des Gesamtsystems verstärkt oder unterdrückt wird und dass der Ursprung solcher Zentren unterschiedlicher Natur sein kann. In Abschnitt 4.1.4 wurde die Frage der Rolle der Mustereigenschaften auf die Rekonstruktion von Variabilität untersucht. Ohne die direkte Messung der Zelleigenschaften ist die Aufklärung der Beziehung zwischen Variabilität und den Mustern äußerst schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen durch gezielte Rekonstruktion der Zelleigenschaften mit statistischen Werkzeugen das Problem der kausalen Verknüpfung direkter und indirekter Einflüsse (der Muster auf rekonstruierte Zelleigenschaften) auf die Beobachtungsgrößen zu umgehen.

Die Auswahl der bis hier diskutierten Ergebnisse und Zusammenhänge ergibt in Hinblick auf die Entstehung asymptotischer Muster und die Rolle von Variabilität auf die Musterbildung einige interessante Implikationen:

- Unterschiedliche Routen können zu gleichen asymptotischen Mustern führen. Selbst innerhalb eines sehr einfachen Modellsystems existieren verschiedene Mechanismen der Entstehung qualitativ vergleichbarer Muster.
- Die Verifizierung der Mustereigenschaften biologischer Systeme mit Hilfe theoretischer Modellsysteme ist demnach nicht immer ausreichend, um die zugrundeliegenden biologischen Annahmen auf das reale System übertragen zu können. Vielmehr muss auch die Route der Entstehung solcher Muster herangezogen werden.
- Spiralentstehung hängt nicht nur von lokalen Gegebenheiten, sondern auch von globalen oder langreichweitigen Bedingungen (Verteilungen und Beziehungen zwischen Pacemakern) ab.
- Der Einfluss von Einzelelementen kann durch die Gesamtheit aller Elemente, insbesondere deren dynamische Beziehung zueinander reguliert werden.
- In Einzelsimulationen nicht offensichtliche Zusammenhänge zwischen Zelleigenschaften und Mustereigenschaften können durch statistische Analysen aufgedeckt werden. Die Identifizierung der Mechanismen der Spiralentstehung und ihrer räumlichen Verteilungen in experimentellen Systemen ist möglicherweise nur über einen statistischen Zugang möglich.

Diese Überlegungen fordern eine Erweiterung des herkömmlichen Methodenrepertoires zur Analyse raumzeitlicher Datensätze und der Bewertung verschiedener kontroverser Modellvorstellungen zur Spiralentstehung bei *Dictyostelium*. Während die Evolution bestimmter Mustergeometrien mit der in dieser Arbeit vorgestellten simultanen Detektion von Phasensingularitäten und Targetzentren räumlich und zeitlich hochaufgelöst verfolgt werden kann, wie in Abbildung 4.4 exemplarisch gezeigt wurde, müssen statistische Ansätze gesucht werden, um Bildungsmechanismen und geometrische Zusammenhänge zwischen dem globalen Auftreten räumlicher Mustertypen aufdecken zu können. Hier bietet sich beispielsweise die Analyse von Punktprozessen an. Die Methode untersucht statistische Verteilungen und Eigenschaften von Punkten in der Ebene und stellt einen vielversprechenden statistischen Ansatz zur Untersuchung der Entstehung von Spiralmustern bei *Dictyostelium* dar (siehe z.B. [Ill08]). Genauer gesagt können mit dieser Methode Hypothesen über die Entstehung räumlicher Punktmuster überprüft werden und so beispielsweise Mechanismen, wie wechselseitige Anziehung oder Abstoßung, bei der Entstehung räumlicher Verteilungen asymptotischer Muster aufgedeckt werden. Signaturen (insbesondere Korrelationsfunktionen) der Muster verschiedener Modellsysteme können so miteinander verglichen werden. Beim Heranziehen experimenteller Daten können Modellsysteme als nicht realistisch ausgeschlossen werden. Zur Beurteilung der Mechanismen der Spiralentstehung aus der Aktivität von Targetzentren ist dabei zunächst nur die Kenntnis der jeweiligen räumlichen Verteilungen notwendig. Die allgemeine Problematik bei der Vergleichbarkeit experimenteller Datensätze, beispielsweise der unterschiedlichen räumlichen Vergrößerung, kann durch diese Methode umgangen werden. Auf diese Weise können experimentelle Daten verglichen und zusammengefasst werden. In Geberth (2009) wurde bereits an verschiedenen Modellen von *Dictyostelium* und experimentellen Daten gezeigt, dass beispielsweise die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Spirale in unmittelbarer Umgebung einer anderen Spirale als generische Eigenschaft erregbarer Systeme in allen Modellen und den Daten zu finden ist, dass die exakte Längenskala solcher Mustereigenschaften jedoch von Modell zu Modell variiert und von dessen dynamischen Eigenschaften bestimmt und nicht von den gegebenen Anfangsbedingungen dominiert wird [Geb09a, Geb09c].

5.2 Variabilität bei *Dictyostelium*

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden die Erregungsmuster von *Dictyostelium* unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Da es nicht möglich war, Variabilität (beispielsweise durch Mischen von markierten Mutanten der Signaltransduktion mit Wildtypzellen) zu realisieren, wurden zwei Gruppen von Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften untersucht. Die erste Gruppe beinhaltete Zellen, die in ihrem Zellzyklus synchron waren (Abschn. 4.2.1) und Zellen mit unterschiedlichem Entwicklungsalter, die miteinander gemischt wurden (Abschn. 4.2.2). Bei der anderen Gruppe wurden die Eigenschaften der Zellen global durch Koffein und IPA geändert (Abschn. 4.2.3).

Im Fall der gemischten und synchronen Zellen wurden also relative Unterschiede der Zel-

len einer Kultur geändert, während bei den mit Koffein und IPA behandelten Kulturen die Eigenschaften aller Zellen manipuliert wurden. Dieser fundamentale Unterschied spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Analyse von Zell-Zell-Unterschieden durch die Extraktion gerichteter Beiträge zur Fluktuationszahl wider. Die Ω_{ij} -Verteilungen der synchronen und gemischten Zellen unterscheiden sich sehr deutlich von denen der Kontrollgruppen (siehe z.B. Abb. 4.19 und Abb. 4.28). Die global geänderten Zellen zeigen dagegen bei keiner der eingesetzten Konzentrationen Unterschiede in ihren Ω_{ij} -Verteilungen (Abb. 4.39 und Abb. 4.48).

Obwohl bei einer globalen Änderung der Zelleigenschaften formal keine Unterschiede in den Werteverteilungen der Observablen zu erwarten sind, ist dieses Ergebnis durchaus erstaunlich. Immerhin unterscheiden sich die qualitativen Eigenschaften der Muster unter Koffein und IPA im Vergleich zu denen der Kontrollzellen äußerst deutlich voneinander (vgl. Abb. 4.32 und Abb. 4.40). Beide Substanzen bewirken eine starke Reduktion der Phasensingularitätsdichte (vgl. Abb. 4.33 und Abb. 4.42), was sich in wenigen Spiralwellen und großen Einzugsgebieten äußert. Zudem werden die Spiralmuster bei hohen Dosen instabil. Bei 5 und 6 mM Koffein ist dies schon bei Beginn der Musterbildung der Fall. Dagegen unterscheiden sich die Muster synchroner und gemischter Zellen nicht wesentlich von den Mustern der Kontrollen. Die Dichte der Phasensingularitäten der verglichenen Muster lag immer im selben Bereich.

Auch wenn hier zunächst keine Systematik zwischen den gemischten Zellen und den Unterschieden in den Verteilungen der Ω_{ij} in Abhängigkeit der Verzögerungszeit und dem Mischungsverhältnis gefunden werden konnte, bringen diese Zellen in weiten Bereichen beider Parameter stark abweichende Ω_{ij} -Verteilungen hervor. In Abbildung 4.31 wurde diese Parameterabhängigkeit anhand eines Punktdiagramms gezeigt. Diese Ergebnisse sind gewichtige Hinweise auf eine erfolgreiche Extraktion der Zell-Zell-Unterschiede, da das Prinzip der Fluktuationszahl auf der Extraktion räumlicher und zeitlicher Differenzen beruht, die nach den gemachten Annahmen im einen Fall geändert wurden und im anderen Fall nicht. In welchen Eigenschaften diese Unterschiede begründet liegen (z.B. in der Beweglichkeit und Reaktion individueller Zellen auf das cAMP; vgl. [Sam06]), kann nicht beantwortet werden.

Die Motivation hinter dem Mischen unterschiedlich entwickelter Zellen und der Verwenden synchroner Zellen lag in der Vorstellung, die in der Phasenverteilung der individuellen Zellen einer Kultur begründete Heterogenität systematisch zu verändern und diese Unterschiede aus den makroskopischen Mustern sichtbar zu machen.

Am Beispiel der synchronen Zellen hat sich gezeigt, dass die gerichteten Beiträge der Zellen zur Fluktuationszahl geringer waren als bei anderen Zellen. Dabei konnte sogar der Synchronisationsgrad der Zellen rekonstruiert werden (Abb. 4.21). Die extrahierten Verteilungen blieben über lange Zeitfenster hinweg stabil und waren damit nicht unmittelbar und offensichtlich von den Muster geprägt (Abb. 4.20). Die Grauwerte derselben Daten zeigten zudem keine Unterschiede in ihren Verteilungen (Abb. 4.22). Hier stellt sich die Frage nach der Rolle des Zellzyklus auf die Differenzierung der Zellen und vor allem auf die Musterbildung.

Die jahrzehntelange Forschung brachte kontroverse Meinungen über die Mechanismen der

Determination des Schicksals individueller Zellen hervor. Ein Konsens besteht jedoch in der Vorstellung, dass sich vielfältige Regulationsmechanismen evolviert haben müssen, welche die Aufrechterhaltung der recht stabilen Verhältnisse der Zelltypen im späteren Fruchtkörper gewährleisten können. Neben externen Faktoren, wie beispielsweise dem Ernährungsstatus einer Zelle, der sogenannten „growth history“ [For77], wurde in unzähligen experimentellen Arbeiten gezeigt, dass die Position einer Zelle in ihrem Zellzyklus beim Einsetzen der Hungerphase maßgeblich an der Determination späterer Differenzierungsprozesse beteiligt ist (zellzyklusabhängige Sortierung; [Kat74, ZH78a, Wan88, Wei84a, McD84, McD86, Gom87, Kre89, Zim93, Wee94, Ara97, Hua99]). Hier vertreten die Autoren die Hypothese eines sogenannten PS-Punktes (*putative shift-point*) innerhalb des Zellzyklus [Mae93, Ara94]. Zellen die sich bei Nahrungsentzug vor diesem Punkt befinden, aggregieren statistisch schneller und können möglicherweise die Funktion von Pacemakerzellen übernehmen. Zu finden sind solche Zellen am posterioren Teil des Slugs. Zellen kurz hinter dem PS-Punkt zeigen ein langsames Aggregationsverhalten und sortieren sich zum apikalen Tip in der anterioren Zonen [Ara94, Ara97]. Dieser Zusammenhang spiegelt sich in einer starken Korrelation zwischen der Zellzyklusposition und der Expression zelltypspezifischer Marker wieder [Ara97]. Zellen der spätern G2-Phase differenzieren sich selektiv in Tipzellen. Damit besteht ein Zusammenhang zwischen dem späteren Zellschicksal und Ereignissen, die bereits vor der Musterbildung stattgefunden haben. Inwieweit sich dieser Zusammenhang in der Musterbildung und den Signaleigenschaften einzelner Zellen abbildet, kann nicht beantwortet werden. Denn deutlich unterscheidbare zelltypspezifische Expressionsmuster werden vor allem im Moundstadium deutlich sichtbar.

In McDonald (1986) wurde gezeigt, dass sich der Synchronisationsgrad der Zellen systematisch in der Dichte der Fruchtkörper und damit in der Phasensingularitätsverteilung abbildet, womit dem Zellzyklus eine Modulation der Fähigkeit der Zellen zur autonomen Oszillation, die für die Verteilungen der Aggregationszentren verantwortlich ist zukommt [McD86]. Implizit bedeutet dies auch, dass der Zellzyklus eine Rolle bei der Erzeugung von Defekten der Wellenpropagation spielt und dass individuelle Zelleigenschaften die Muster prägen können. Da im Rahmen der Untersuchung experimenteller Muster gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe von Ω_{ij} zelluläre Unterschiede identifiziert werden können, ist die Korrelation der Ω_{ij} -Verteilungen mit den räumlichen Verteilungen der Phasensingularitäten vor diesem Hintergrund gerechtfertigt. Zwar spiegelt die Korrelation der Verteilungen der Phasensingularitäten und der Ω_{ij} den Verlauf der Musterbildung wider, doch zeigen sich schon im sehr frühen Entwicklungsstadium der Zellen (also vor der sichtbaren Musterentstehung im Dunkelfeld) positive Korrelationen, die sich aus der Korrelation der Grauwerte oder zufällig verteilter Phasensingularitäten mit Ω_{ij} nicht ergeben (Abb. 4.23). Daraus läßt sich ableiten, daß bereits vor dem Auftreten kohärenter Wellenstrukturen eine Symmetriebrechung in der homogenen Zellschicht stattgefunden haben muß, die mit Hilfe mathematischer Größen aus den Grauwerten der Aufnahmen extrahiert werden kann.

Mit der Untersuchung von McDonald (1986) erklärt sich nun auch möglicherweise die Beobachtung, dass keine systematischen Unterschiede der Phasensingularitätsdichte der synchronen Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gefunden wurden (Abschn. 4.2.1), da der Grad der Synchronität entscheidend die Dichte der Fruchtkörper reguliert. Bei den

hier vorgenommenen Untersuchungen wurde die Dichte der Phasensingularitäten nicht in Abhängigkeit des Synchronisationsgrads betrachtet.

5.3 Wirkung chemischer Effektoren auf die Musterbildung

In Abschnitt 4.2.3 wurde die Musterbildung und Entwicklung von *Dictyostelium* mit Hilfe chemischer Effektoren beeinflusst. Während im Fall des Koffeins vor allem dosisabhängige Veränderungen der Parameter der Wellenpropagation und Musterbildung beobachtet wurden, der Entwicklungszyklus jedoch unbeeinträchtigt blieb, wurde in Anwesenheit von IPA neben ähnlichen Effekten auf die Musterbildung, zusätzlich das Unvermögen der Zellen zur Bildung von Zellströmen, Übergänge zwischen unterschiedlichen Mustertypen und dramatische Folgen auf die morphologische Entwicklung beobachtet. Obwohl von beiden Substanzen eine Hemmung der Aktivität der AC bekannt ist oder zumindest (im Fall von IPA) aufgrund der im Lauf dieser Arbeit erzielten Ergebnisse angenommen werden kann, sind die vermittelnden zellulären Strukturen wahrscheinlich unterschiedlicher Natur und nicht hinreichend bekannt. In den nächsten beiden Abschnitten werden daher die Ergebnisse einiger Autoren im Zusammenhang mit dieser Fragestellung betrachtet und die in dieser Arbeit erzielten Beobachtungen der Musterbildung diskutiert.

Wirkmechanismus von Koffein

Koffein wirkt beim Menschen antagonistisch zu Adenosin auf die A1- und A2-Rezeptoren im Zentralnervensystem und inhibiert verschiedene cAMP-degradierende PDEs [Cha76]. Bei *Dictyostelium* wird Koffein gezielt eingesetzt, um die „Erregbarkeit“ der Zellschicht zu vermindern. Insbesondere bewirkt Koffein einen Anstieg der mittleren chemotaktischen Deadaptionszeit der Zellen [Bre84, Sie89, Kes01], was zur optischen Kontrastverstärkung der Wellenbanden führt. Weiterhin verringert Koffein die Anzahl an Spiralstrukturen der Muster, was sich in vergrößerten, deutlich unterscheidbaren Einzugsgebieten der Aggregationszentren äußert (vgl. Abb. 4.32 und Abb. 4.33). Diese Effekte werden in Standardpräparationen durch den Einsatz von Koffeinkonzentrationen im Bereich von 2–3 mM zur Beobachtung der Muster ausgenutzt (siehe z.B. [Foe90a]).

Koffein inhibiert schnell und reversibel die cAMP-Synthese, ohne dabei das intrazelluläre ATP- oder GTP-Level zu beeinflussen. Resuspendierte Zellen reagieren bereits messbar auf Konzentrationen von 50 μM [Bre84, The83]. Die Wirkung erfolgt in spezifischer Weise. Damit ist gemeint, dass keine weiteren cAMP-abhängigen Prozesse identifiziert werden konnten, die durch Koffein gehemmt werden. Eine Koffeinkonzentration von 3 mM verringert dabei die cAMP-Produktion der Zellen bereits auf 5 %, während die cAMP-abhängige Synthese von cGMP, das im Zusammenhang mit der chemotaktischen Bewegung steht, ansteigt, was sich sowohl in der Signalamplifikation als auch in der chemotaktischen Antwort der Zellen widerspiegelt [Bre84, VH84, Sie89].

Die betroffenen zellulären Strukturen und der genaue Mechanismen der Wirkung von Koffein bei *Dictyostelium* sind dabei nicht hinreichend geklärt. Brenner & Thoms (1984)

vermuteten zunächst eine indirekte Wirkung des Koffeins auf die ACs durch die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, auch weil die Verwendung von Ionophoren ähnliche Reaktionen der Zellen wie unter dem Einfluss von Koffein hervorruft [Bre84].¹ Schaap et al. (1995) zeigten jedoch, dass Ca^{2+} keine unmittelbare inhibierende Wirkung auf die AC und damit die cAMP-Synthese hat [Sch95a].

Alvarez-Curto et al. (2007) haben nachgewiesen, dass die Erniedrigung der intra- und extrazellulären cAMP-Konzentration in Anwesenheit von Koffein ebenfalls nicht durch die Stimulation einer der intra- (RegA, PdeE) oder extrazellulären PDE (PdsA, PDE4) durch Koffein hervorgerufen wird [AC07]. Weiterhin kann die messbar verringerte cAMP-Produktion der Zellen nicht auf die Änderung der cAMP-Sekretion zurückgeführt werden [AC07]. Daraufhin wurden differentielle Aktivitätsmessungen der einzelnen ACs von den Autoren durchgeführt [AC07]. Hier zeigte sich, dass Koffein bei intakten Zellen die Aktivität aller drei Adenylatzyklen ACB, ACG und ACA sehr deutlich und in vergleichbarer Stärke ($\text{IC}_{50} \approx 0,2\text{--}0,4 \text{ mM}$) inhibiert. 10 mM Koffein unterdrücken dabei die ACB- und ACA-Aktivität zu 100 %. Die Wirkung von Koffein auf die Enzyme im Lysat ist jedoch vollständig aufgehoben, was nur eine indirekte Wirkung des Koffeins bei intakten Zellen auf die cAMP-Synthese durch die AC anzeigt [Bre84, AC07].

Die direkte Blockierung der cAMP-Rezeptoren durch Koffein in Form einer kompetitiven Hemmung wird aufgrund der hohen Spezifität der Rezeptoren ausgeschlossen. Rezeptor-Bindungs-Assays bestätigten diese Annahme und zeigten, dass tatsächlich keine kompetitive Bindung des Koffeins an die cAMP-Rezeptoren stattfindet, obwohl Koffein die Bindung von cAMP an die Rezeptoren durchaus beeinflusst [Bre84]. Denn Van Haastert & De Wit (1984) haben nachgewiesen, dass Koffein in der Lage ist, die Affinität der cAMP-Rezeptoren zu modulieren. In Anwesenheit von 10 mM Koffein in einer Zellsuspension wechseln 100 % der cAMP-Rezeptoren einer Zelle in eine Konformation mit niedriger Affinität zu cAMP [VH84]. Weiterhin wurde von Brenner & Thoms (1984) ausgeschlossen, dass Koffein mit Adenosin um die Adenosinrezeptoren der Zellen konkurriert [Bre84].

Damit bleibt die eigentliche zelluläre Struktur, mit welcher Koffein direkt interagiert weiterhin ungeklärt. Nach den hier aufgeführten experimentellen Ergebnissen, kann nur vermutet werden, dass der genaue Wirkmechanismus des Koffeins bei *Dictyostelium* auf mehrfacher Ebene erfolgt. Zwar wird durch Koffein die Aktivität alle drei ACs nachweislich inhibiert, was eine Verminderung der cAMP-Synthese zur Folge hat, zu beachten ist aber, dass nur die ACA durch einen G-Protein-vermittelten Mechanismus in der intakten Zelle aktiviert wird, während die Aktivierung der beiden anderen ACG und ACB nicht Teil eines G-Protein-vermittelten Signalweges ist [Pit92, Kim98, AC07].

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden keine Effekte des Koffe-

¹ Tatsächlich reagieren aus Skelett- und Herzmuskeln isolierte sarkoplasmatische Reticuli auf Koffein mit der erhöhten Ausschüttung von Ca^{2+} [Kat77]. In *Physarum polycephalum* bewirkt Koffein ebenfalls die Ca^{2+} -Ausschüttung aus intrazellulären Vesikeln [Mat77].

ins auf die, sich der Musterbildung anschließenden Entwicklungsstadien bei *Dictyostelium* beobachtet. MacWilliams (1991) zeigte jedoch, dass durch Koffein die apikale Dominanz der zentralen Tipstruktur im Slug gehemmt wird. Dies äußert sich durch viele, in regelmäßigen Abständen entlang der Hauptachse des Aggregats auftretende Tipstrukturen. In der weiteren Entwicklung gehen aus diesen dann individuelle Fruchtkörper hervor [Mac91].

Die in dieser Arbeit erzielten Beobachtungen der Wirkung des Koffeins auf die Muster verifizieren die Ergebnisse und Beobachtungen von Siegert & Weijer (1989) [Sie89]. Die Vergrößerung der Wellenlängen sukzessiver Wellen ist dabei auf eine Verlängerung der Deadaptationszeit (Refraktärphase) der Zellen nach einer Erregung zurückzuführen, was in engem Zusammenhang zur erhöhten cGMP-Synthese steht (Abb. 4.37; [Sie89]). Aufgrund bimodaler Wellenprofile vermuten Siegert & Weijer (1989), dass ein Teil der Zellen nur auf jede zweite Erregung reagieren kann. Die Analyse entsprechender Powerspektren zeigte, dass sich die Signale tatsächlich aus zwei Frequenzen zusammensetzen [Sie89, Sie91].

Bei hohen Koffeinkonzentrationen verlieren etablierte Spiralwellen im späteren Verlauf der Aggregation ihre Stabilität und werden von auftretenden oszillatorischen Zentren vereinnahmt [Pol05]. Die Destabilisierung der Spiralwellen wird dabei vom Anwachsen der Spiralkerndurchmesser begleitet (vgl. Abb. 4.34 und Abb. 4.35). Die Zunahme der Durchmesser von Spiraltrajektorien in Zusammenhang mit verringerter Erregbarkeit ist in chemischen erregbaren Systemen, wie der lichtempfindlichen Belousov-Zhabotinsky-Reaktion hinreichend bekannt [Kes94, RR02, Han95, Yam96, Kad97, Sab02]. Verfolgt man dort die Trajektorien der Spiralspitzen, so können in bestimmten Intensitätsbereichen des eingestrahelten Lichts (in der Nähe der kritischen Intensität) rigide Rotationen und bei einer weiteren Erhöhung der Intensität wachsende Durchmesser der Spiralbahn gemessen werden [Khe01]. Spiraltrajektorien können dabei aus dem Zusammenwirken von Interaktionen der Wellenfronten (Dispersionseffekte) und Krümmungseffekten erklärt werden [Wie46, Zyk87, Mer91, Sie94].

In der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion ist der Spiralkern von jeder Erregung (Oxidation) ausgenommen und bildet ein ruhendes Zentrum [Mül85]. Wachsenden Spiralkernen bei *Dictyostelium* sind dagegen zellfrei und erscheinen im Dunkelfeld als schwarze Löcher (Abb. 4.34; [Sie89]). Da die Wellenpropagation direkt auf die Bewegung der Zellen und die Chemotaxis der Zellen direkt auf das Medium wirkt, also eine Rückkopplung zwischen den Mustern und den Eigenschaften des Mediums besteht, wird die Spiralspitze durch die einmal gebildeten zellfreien Löcher der Spiralkerne auf ihre Umlaufbahn gezwungen. Entwicklungsabhängige und regulatorische Prozesse des biologischen Systems führen dabei zur Änderung der Dynamik des Systems. Durch die hohen Rotationsperioden der Spirale können sich nun Targetzentren etablieren, was zur Destabilisierung der Wellenfronten und zur Vereinnahmung der ehemaligen Einzugsgebiete der Spiralen führt, da das Ergebnis dieser Konkurrenz beider Mustergeometrien ausschließlich von der jeweiligen Periodenlängen abhängt [Lee99].

Wirkung des Adenosinanalogs IPA auf die Musterbildung und Entwicklung

IPA ist ein an der Riboseeinheit modifizierte Adenosinanalogs (vgl. Abb. 3.1(b)). Adenosin ist ein physiologisches Degradationsprodukt des cAMP bei *Dictyostelium* und kann nahezu alle cAMP-induzierten Prozesse, wie die autonome cAMP-Synthese und Aktivierung der ACA [New82b], die Signalamplifikation [Bre84, The84] und die cAMP-induzierte cGMP-Synthese [VH83], die im Zusammenhang zur Chemotaxis steht, inhibieren. Diese Wirkung übernimmt während der gesamten Entwicklung entscheidende regulatorische Funktionen (z.B. bei der Verteilung der Zelltypen im Slugstadium [Bra74, Wei85, Sch86]). Auf Ebene der Muster wird die Bildung von Aggregationszentren durch Adenosin unterdrückt, was zu wenigen Spiralwellen mit großen Einzugsgebieten führt, wie es in dieser Arbeit auch in Anwesenheit von Koffein und IPA beobachtet werden konnte [New82a, New82b, Hil08].

Die Wirkung des Adenosins soll dabei in nicht kompetitiver Weise auf die Inhibierung der cAMP-Bindung an die cAMP-Rezeptoren erfolgen [New82b, The84, VLC86]. Binde-Assays und Spray-Experimente von Newell (1982) zeigten, dass die Wirkung des Adenosins schnell und spezifisch erfolgen muss, was auf einen rezeptorvermittelten Mechanismus hinweist [New82a, New82b].

Untersuchungen von Adenosinderivaten haben gezeigt, dass Moleküle mit modifizierter Purineinheit in ihrer Hemmung weniger effizient als Adenosin wirken, während bei Ribose-modifizierte Adenosinderivaten das Gegenteil der Fall ist [The84, VLC86, Soe96, VVW98, Dor01a]. Dabei konnte bisher nicht geklärt werden, ob die Moleküle an der AC selbst oder beispielsweise an den cAMP-Rezeptoren wirken [Kha87, VLC86, AC07]. In Abe et al. (2000) wird IPA als cAR1-spezifischer Inhibitor bezeichnet, obwohl die Substanz 2007 erstmals im Zusammenhang mit *Dictyostelium* in der Literatur erscheint [Abe00, AC07].

Bei Säugetieren werden ACs direkt durch Adenosin gehemmt. Und auch hier lässt sich eine vergleichbare Abhängigkeit der Inhibierung von möglichen Molekülmodifikationen erkennen [Lon77, Joh89]. In Anbetracht der Notwendigkeit einer intakten Purineinheit wird hier die Inhibition auch als *P-site*-Inhibition bezeichnet [Lon77, Zha97, Des99]. Es konnte gezeigt werden, dass hier die Inhibierung intrazellulär direkt durch eine Okkupierung der ATP-Bindestelle der ACs erfolgt.

Neben der direkten Wirkung des Adenosins auf die ACs sind auch Effekte auf G-Proteingekoppelte Adenosinrezeptoren bei Säugern bekannt [Fre01]. Da die Bindung des Adenosins an die Rezeptoren eine intakte Riboseeinheit voraussetzt, werden diese auch als *R-sites* bezeichnet [Lon77]. Diese Klasse von *R-site*-Adenosinrezeptoren wurden bei *Dictyostelium* bisher nicht nachgewiesen. [AC07]. Van Lookeren-Campagne et al. (1986) haben gezeigt, dass die Adenosinrezeptoren bei *Dictyostelium* nach ihrer Bindspezifität und Dynamik vom Typ der *P-Side*-Rezeptoren sind, dass diese jedoch ausschließlich membrangebunden und nicht intrazellulär wie bei höheren Organismen zu finden sind [VLC86]. Nach Newell & Ross (1982), sowie Van-Haastert (1983) sind dabei zwei verschiedene Typen von Adenosinrezeptoren identifiziert worden (α - und β -Rezeptor) [New82b, VH83], wobei die durch Adenosin hervorgerufenen Effekte auf dessen Bindung an die β -Rezeptoren verant-

wortlich sein sollen.

Von Alvarez-Curto et al. (2007) wurden Aktivitätsmessungen der einzelnen ACs in Anwesenheit von IPA durchgeführt. Im Lysat hat IPA keinen Effekt auf die Aktivität der ACG und ACB. Die Aktivität der ACA wird durch IPA leicht negativ beeinflusst. Messungen an intakten Zellen zeigen wie schon im Fall von Koffein beschrieben, ein anderes Bild. Hier bleiben die Aktivitäten der ACG und ACB weiterhin unbeeinträchtigt, dafür wird jedoch die Aktivität der ACA stark inhibiert ($IC_{50} \approx 30 \mu M$; [AC07]). Auch hier weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Wirkung von IPA auf die Aktivierung der ACA nur indirekt über die Inhibierung der Bindung von cAMP an die Rezeptoren erfolgen kann (siehe auch [VLC86]).

Es gibt Hinweise darauf, dass Adenosin eine wichtige regulatorische Rolle als Signalstoff in Zusammenhang mit den Übergängen der sukzessiven Stadien innerhalb des Entwicklungszyklus spielt [Bra74]. Nach der Aggregation treten hohe Adenosinkonzentration innerhalb der multizellulären Stadien auf, was durch die Behandlung von Slugs mit einer Adenosindeaminase zur Degradierung endogenen Adenosin gezeigt werden konnte [Sch86]. Nach der Behandlung konnten normalerweise nicht auftretende Prespore-spezifische Antigene in der Prestalkregion detektiert werden, was darauf hinweist, dass endogenes Adenosin in der Prestalkregion die Prespore-spezifische Differenzierung inhibiert. Auch nach Weijer & Durston (1985) wirkt Adenosin antagonistisch auf die cAMP-induzierte Prespore-differenzierung und verhindert die Umwandlung von Prestalk- in Presporezellen [Wei85]. Möglicherweise ist dies ein wichtiger Hinweis auf die Entdeckung der signifikant höheren Menge an produzierten Sporen in Anwesenheit von IPA im Vergleich zu ungestörten Zellen (vgl. Abb. 4.47; [Hil08]), wobei sich diese Beobachtung gegensätzlich zu den Ergebnissen von Weijer & Durston (1985) verhält [Wei85].

Neben den verhältnismäßig großen Einzugsgebieten der Spiralwellen, deren plötzlichem Verschwinden und dem Auftauchen vergleichsweise kleiner Targetzentren in Anwesenheit von IPA (vgl. Abb. 4.40 und Abb. 4.43), ist die flächige Aggregation der Zellen ohne die Bildung von Zellströmen eine wichtigste Beobachtung innerhalb dieser Arbeit (vgl. Abb. 4.45). Unter natürlichen Umständen orientieren sich die individuellen Zellen im fortgeschrittenen Aggregationsstadium innerhalb der Zellströme in einer „Kopf-an-Schwanz-Anordnung“ zum Aggregationszentrum hin an (vgl. Abb. 4.46). Kriebel et al. (2003, 2008) haben gezeigt, dass sich die ACA am Uropod einer chemotaktisch aktiven Zelle lokal anreichert und dass dieser Vorgang essentiell für die charakteristische Orientierung der Zellen innerhalb der Zellströme ist [Kri03, Kri08]. Es gibt viele Hinweise darauf, dass die Bildung von Zellströmen durch cAMP, das durch die Anreicherung der ACA verstärkt am Hinterende der polarisierten Zellen ausgeschieden wird, organisiert ist. *aca*⁻-Zellen sind nicht in der Lage zu aggregieren [Pit92]. Setzt man solche Mutanten oder auch Zellen, die eine nicht an G-Proteine gekoppelten Mutation der ACA exprimieren, periodischen cAMP-Stimulationen aus, sind diese jedoch zur Detektion eines cAMP-Gradienten fähig und bewegen sich chemotaktisch geleitet zum Aggregationszentrum hin [Pit92]. Allerdings können dabei keine charakteristischen Zellströme beobachtet werden [Kri03]. In gemischten Populationen aus Wildtyp- und *aca*⁻-Zellen sind solche Mutanten an den äußeren Enden der Ströme zu finden. Daraus leitet sich die Annahme ab, dass die asymmetrische

Verteilung der ACA einer Zellkompartimentierung gleicht, cAMP als lokaler Chemoattraktant am Hinterteil der Zellen wirkt und die charakteristische Anordnung der Zellen bewirkt [Kri03]. Stepanovic et al. (2005) beobachteten zudem eine Unfähigkeit von aca^- -Zellen, die Bildung lateraler Pseudopodien zu unterdrücken [Ste05].

Fruchtkörper der aca^- -Zellen, die periodischen cAMP-Pulsen ausgesetzt sind, sind deutlich kleiner als bei Wildtypzellen. Wang & Kuspa (1997) zeigte, dass sich aca^- -Zellen mit konstitutiv aktiver PKA-C normal entwickeln, wobei die Zellströme breiter sind, als beim Wildtypen [Wan97]. Auch die Anzahl an Sporen pro Fruchtkörper weicht hier aber nicht von den Beobachtungen der Wildtypzellen ab. Allerdings bedingt die Aggregation wesentlich höhere Zelldichten, als bei den nichtmodifizierten Zelle.

Die Inhibition der Aktivität der ACA bei intakten Zellen in Anwesenheit von IPA [AC07], die Beobachtung der Anreicherung der ACA am Uropod der Zellen [Kri03, Kri08] in Kombination mit den Untersuchungsergebnissen bei aca^- -Zellen anderer Autoren [Pit92, Wan97, Ste05] kann in direkten Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in Anwesenheit von IPA, insbesondere die Unfähigkeit der Zellen zur Bildung von Zellströmen, gestellt werden.

5.4 Abschließende Bemerkungen

5.4.1 Rolle biologischer Variabilität bei *Dictyostelium*

Auf vielen Ebenen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein klassischer, an raumzeitlicher Musterbildung und ihren physikalischen Eigenschaften orientierter Blick eine äußerst gewinnbringende Perspektive zur Ergründung biologischer Systeme darstellen kann. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit konnte jedoch nicht erreicht werden: eine endgültige Klärung der Frage, ob ein Entwicklungspfad im Sinne des von Lauzeral et al. (1997) formulierten Konzeptes oder aber beispielsweise die Erregbarkeitsvariable in dem von Levine et al. (1996) eingeführten und von Sawai et al. (2005) weiterentwickelten Modells biologisch sinnvolle Ergänzungen des Grundsystems darstellen [Lau97, Lev96, Saw05]. Dennoch liefern die hier vorgestellten Experimente deutliche und wichtige Evidenz für die Funktion biologischer Variabilität in der Musterbildung von *Dictyostelium*.

Das Extrahieren von Zelleigenschaften (bzw. Eigenschaften von Zellgruppen) mithilfe informationstheoretischer Observablen ist ein Beispiel für dieses Vorgehen. Anhand eines einfachen mathematischen Modells wurde durch numerische Simulation einer großen Zahl raumzeitlicher Muster überprüft, in welcher Weise die Observablen mit den Zelleigenschaften korrelieren. Im Experiment, in dem die Zelleigenschaften nicht direkt zugänglich sind, konnte dann ein systematisches Verhalten dieser raumzeitlichen Kenngrößen explizit nachgewiesen werden. Hier ist besonders die enge Zusammenarbeit mit der Theoriegruppe der Jacobs University in Bremen hervorzuheben, die an verschiedenen Modellsystemen zeigen konnte, dass die Korrelation zwischen Zelleigenschaften und Mustereigenschaften hochsensitiv auf die Mechanismen der Spiralentstehung und der intrazellulären Regulation sowie der Zell-Zell-Kopplung ist. Das Grundmuster der Zelmischexperimente, in der die

Korrelation zwischen extrahierten Zelleigenschaften und Phasensingularitäten entlang der Zeit diskutiert wurde, weist in diese Richtung: die anfänglich positive Korrelation wechselt im Regime der etablierten Spiralwellen zu einer negativen Korrelation, die den in Modellsimulationen beobachteten Antikorrelationen entsprechen kann. Allerdings haben sich die Mischexperimente zweier Zellpopulationen ebenso wie die Versuche mit synchronen Zellen als in ihren raumzeitlichen Verläufen als zu heterogen erwiesen, um eine eindeutige Aussage über den Entstehungsmechanismus und damit über die zellulären Freiheitsgrade treffen zu können.

5.4.2 Untersuchung der Wirkung chemischer Effektoren bei *Dictyostelium*

Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit konnten die Fragen zur Ursache der beobachteten Phänomene unter dem Einfluss von Koffein und IPA nicht beantwortet werden. Die zugrundeliegende Komplexität vielfältiger Regulationsmechanismen einer Zelle führt häufig zu gegenintuitiven Phänomenen. Nahezu alle experimentellen Einwirkungen auf die bisher bekannten Elemente der Signaltransduktion führen oft zu ganz ähnlichen Phänomenen, die in der enormen Fähigkeit der Zellen zur Selbst- und Gegenregulation auf jeder Ebene begründet liegen. Nahezu alle erwähnten oder diskutierten Zusammenhänge beinhalten nichtlineare Zusammenhänge in ihrer Regulation. Kürzlich wurden experimentell am Transkriptions-Regulations-Netzwerk von *E. coli* zufällige regulatorische Verbindungen zwischen den Genen ergänzt [Isa08]. Bemerkenswerterweise zeigten in 90 % der Fälle die kultivierten Mutanten vergleichbare Wachstumsraten wie der Wildtyp. An diesen und anderen Befunden zeigt sich die Robustheit komplexer biologischer Systeme gegenüber Störungen. Es sind im Kern solche gegenintuitiven Antwortmuster der Systeme, die definitive Aussagen über das Funktionieren und Verhalten so schwierig machen.

Literaturverzeichnis

- [Abe83a] ABE, K; OKADA, Y; WADA, M und YANAGISAWA, K: Genetic analysis of a gene regulating the timing of developmental events in *Dictyostelium discoideum*. *J Gen Microbiol* (1983), Bd. 129(6):S. 1623–1628
- [Abe83b] ABE, K und YANAGISAWA, K: A new class of rapidly developing mutants in *Dictyostelium discoideum*: implications for cyclic AMP metabolism and cell differentiation. *Dev Biol* (1983), Bd. 95(1):S. 200–210
- [Abe00] ABE, T; DORMAN, D; WEIJER, C J und WILLIAMS, J: *Visualising Dd-STATA activation in the slug*, International Dictyostelium conference, Dundee (2000)
- [AC07] ALVAREZ-CURTO, E; WEENING, K E und SCHAAP, P: Pharmacological profiling of the *Dictyostelium* adenylate cyclases ACA, ACB and ACG. *Biochem J* (2007), Bd. 401(1):S. 309–316
- [Alc74] ALCANTARA, F und MONK, M: Signal propagation during aggregation in the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J Gen Microbiol* (1974), Bd. 85(2):S. 321–334
- [Alo07] ALON, U: Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet* (2007), Bd. 8(6):S. 450–461
- [Anj92] ANJARD, C; PINAUD, S; KAY, R R und REYMOND, C D: Overexpression of Dd PK2 protein kinase causes rapid development and affects the intracellular cAMP pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Development* (1992), Bd. 115(3):S. 785–790
- [Ara94] ARAKI, T; NAKAO, H; TAKEUCHI, I und MAEDA, Y: Cell-cycle-dependent sorting in the development of *Dictyostelium* cells. *Dev Biol* (1994), Bd. 162(1):S. 221–228
- [Ara97] ARAKI, T; ABE, T; WILLIAMS, J G und MAEDA, Y: Symmetry breaking in *Dictyostelium* morphogenesis: evidence that a combination of cell cycle stage and positional information dictates cell fate. *Dev Biol* (1997), Bd. 192(2):S. 645–648
- [Bas98] BASARSKY, T A; DUFFY, S N; ANDREW, R D und MACVICAR, B A: Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices. *J Neurosci* (1998), Bd. 18(18):S. 7189–7199

- [Bel58] BELOUSOV, B P: A periodic reaction and its mechanism, in: *Sb. Ref. Radiats. Med.*, Medgiz, Moskau (1958), S. 145–147
- [Bel85] BELOUSOV, B P: A periodic reaction and its mechanism, in: R Field und M Burger (Herausgeber) *Oscillations and traveling waves in chemical systems*, Wiley, New York (1985), S. 605–613
- [Bon44] BONNER, J T: A descriptive study of the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Am J Bot* (1944), Bd. 31(3):S. 175–182
- [Bon50] BONNER, J T; CLARKE, W W Jr; NEELY, C L Jr und SLIFKIN, M K: The orientation to light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Physiol* (1950), Bd. 36(2):S. 149–158
- [Bon52] BONNER, J T: The pattern of differentiation in amoeboid slime molds. *Am Nat* (1952), Bd. 86:S. 79–89
- [Bon63] BONNER, J T und HOFFMAN, M E: Evidence for a substance responsible for spacing of aggregation and fruiting in cellular slime molds. *J Embryol Exp Morphol* (1963), Bd. 11:S. 571–589
- [Bon67] BONNER, J T: *The cellular slime molds*, Princeton Univ Press, Princeton, New York (1967)
- [Boz95] BOZZARO, S und PONTE, E: Cell adhesion in the life cycle of *Dictyostelium*. *Experientia* (1995), Bd. 51(12):S. 1175–1188
- [Bra74] BRACKENBURY, R W; SCHINDLER, J; ALEXANDER, S und SUSSMAN, M: A choice of morphogenetic pathways in *Dictyostelium discoideum* induced by the adenosine analog formycin B. *J Mol Biol* (1974), Bd. 90(3):S. 529–539
- [Bra97] BRAND, S; DAHLEM, M A; FERNANDES DE LIMA, V M; MÜLLER, S C und HANKE, W: Dispersion relation of spreading depression waves in the chicken retina. *Int J Bif Chaos* (1997), Bd. 7:S. 1359–1365
- [Bra01] BRAY, M A; LIN, S F; ALIEV, R R; ROTH, B J und WIKSWO, J P Jr: Experimental and theoretical analysis of phase singularity dynamics in cardiac tissue. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2001), Bd. 12(6):S. 716–722
- [Bra08] BRANDMAN, O und MEYER, T: Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* (2008), Bd. 322(5900):S. 390–395
- [Bre69] BREFELD, O: *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der *Myxomyceten*. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt* (1869), Bd. 7:S. 85–107

- [Bre84] BRENNER, M und THOMS, S D: Caffeine blocks activation of cyclic AMP synthesis in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1984), Bd. 101(1):S. 136–146
- [Bre95] BRETSCHNEIDER, T; SIEGERT, F und WEIJER, C J: Three-dimensional scroll waves of cAMP could direct cell movement and gene expression in *Dictyostelium* slugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995), Bd. 92(10):S. 4387–4391
- [Bre97] BRETSCHNEIDER, T; VASIEV, B und WEIJER, C J: A model for cell movement during *Dictyostelium* mound formation. *J Theor Biol* (1997), Bd. 189(1):S. 41–51
- [Bre99] BRETSCHNEIDER, T; VASIEV, B und WEIJER, C J: A model for *Dictyostelium* slug movement. *J Theor Biol* (1999), Bd. 199(2):S. 125–136
- [Bus04] BUSCH, H und HÜTT, M-Th: Scale-dependence of spatiotemporal filters inspired by cellular automata. *Int J Bif Chaos* (2004), Bd. 14:S. 1957–1973
- [BY97] BAR-YAM, Y: *Dynamics of complex systems*, Addison-Wesley, Reading (1997)
- [Cap79] CAPPUCINELLI, P; FIGHETTI, M und RUBINO, S: Differentiation without mitosis in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differ* (1979), Bd. 8(3):S. 243–252
- [Cas90] CASTETS, V V; DULOS, E; BOISSONADE, J und DE KEPPEL, P: Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern. *Phys Rev Lett* (1990), Bd. 64(24):S. 2953–2956
- [Cha76] CHASIN, M und HARRIS, D N: Inhibitory and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucl Res* (1976), Bd. 7:S. 225–264
- [Cla88] CLARKE, M; YANG, J und KAYMAN, S C: Analysis of the prestarvation response in growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet* (1988), Bd. 9(4-5):S. 315–326
- [Cla92] CLARKE, M; DOMINGUEZ, N; YUEN, I S und GOMER, R H: Growing and starving *Dictyostelium* cells produce distinct density-sensing factors. *Dev Biol* (1992), Bd. 152(2):S. 403–406
- [Cla95] CLARKE, M und GOMER, R H: PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia* (1995), Bd. 51(12):S. 1124–1134
- [Clo99] CLOW, P A und MCNALLY, J G: *In vivo* observations of myosin II dynamics support a role in rear retraction. *Mol Biol Cell* (1999), Bd. 10(5):S. 1309–1323
- [Coh04] COHEN, J E: Mathematics is biology’s next microscope, only better; biology is mathematics’ next physics, only better. *PLoS Biol* (2004), Bd. 2(12):S. 2017–2023

- [Com05] COMER, F I; LIPPINCOTT, C K; MASBAD, J J und PARENT, C A: The PI3K-mediated activation of CRAC independently regulates adenylyl cyclase activation and chemotaxis. *Curr Biol* (2005), Bd. 15(2):S. 134–139
- [Cub95] CUBITT, A B; FIRTEL, R A; FISCHER, G; JAFFE, L F und MILLER, A L: Patterns of free calcium in multicellular stages of *Dictyostelium* expressing jellyfish apoaequorin. *Development* (1995), Bd. 121(8):S. 2291–2301
- [Dah97] DAHLEM, M A und MÜLLER, S C: Self-induced splitting of spiral-shaped spreading depression waves in chicken retina. *Exp Brain Res* (1997), Bd. 115(2):S. 319–324
- [Dal97] DALLON, J C und OTHMER, H G: A discrete cell model with adaptive signalling for aggregation of *Dictyostelium discoideum*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (1997), Bd. 352(1351):S. 391–417
- [Dal04] DALLON, J C und OTHMER, H G: How cellular movement determines the collective force generated by the *Dictyostelium discoideum* slug. *J Theor Biol* (2004), Bd. 231(2):S. 203–222
- [Dav92] DAVIDENKO, J M; PERTSOV, A V; SALOMONSZ, R; BAXTER, W und JALIFE, J: Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature* (1992), Bd. 355(6358):S. 349–351
- [dC84] DO CARMO, R J und MARTINS-FERREIRA, H: Spreading depression of Leao probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. *An Acad Bras Cienc* (1984), Bd. 56(4):S. 401–421
- [Des99] DESSAUER, C W; TESMER, J J; SPRANG, S R und GILMAN, A G: The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* (1999), Bd. 20(5):S. 205–210
- [Dev79] DEVREOTES, P N; DERSTINE, P L und STECK, T L: Cyclic 3',5' AMP relay in *Dictyostelium discoideum*. I. A technique to monitor responses to controlled stimuli. *J Cell Biol* (1979), Bd. 80(2):S. 291–299
- [Dev85] DEVREOTES, P N und SHERRING, J A: Kinetics and concentration dependence of reversible cAMP-induced modification of the surface cAMP receptor in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* (1985), Bd. 260(10):S. 6378–6384
- [Dew88] DEWDNEY, A K: Computer recreations: the hodge-podge machine makes waves. *Sci Am* (1988), Bd. 259:S. 104–107
- [DG84] DE GUNZBURG, J; PART, D; GUISO, N und VERON, M: An unusual adenosine cyclic 3',5'-phosphate-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry* (1984), Bd. 23(17):S. 3805–3812

- [Din80a] DINAUER, M C; MACKAY, S A und DEVREOTES, P N: Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* III. The relationship of cAMP synthesis and secretion during the cAMP signaling response. *J Cell Biol* (1980), Bd. 86(2):S. 537–544
- [Din80b] DINAUER, M C; STECK, T L und DEVREOTES, P N: Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* IV. Recovery of the cAMP signaling response after adaptation to cAMP. *J Cell Biol* (1980), Bd. 86(2):S. 545–553
- [DL87] DE LOZANNE, A und SPUDICH, J A: Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* (1987), Bd. 236(4805):S. 1086–1091
- [Dor96] DORMANN, D; SIEGERT, F und WEIJER, C J: Analysis of cell movement during the culmination phase of *Dictyostelium* development. *Development* (1996), Bd. 122(3):S. 761–769
- [Dor97] DORMANN, D; WEIJER, C und SIEGERT, F: Twisted scroll waves organize *Dictyostelium mucoroides* slugs. *J Cell Sci* (1997), Bd. 110(16):S. 1831–1837
- [Dor98] DORMANN, D; VASIEV, B und WEIJER, C J: Propagating waves control *Dictyostelium discoideum* morphogenesis. *Biophys Chem* (1998), Bd. 72(1-2):S. 21–35
- [Dor00] DORMANN, D; VASIEV, B und WEIJER, C J: The control of chemotactic cell movement during *Dictyostelium* morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2000), Bd. 355(1399):S. 983–991
- [Dor01a] DORMANN, D; ABE, T; WEIJER, C J und WILLIAMS, J: Inducible nuclear translocation of a STAT protein in *Dictyostelium* prespore cells: implications for morphogenesis and cell-type regulation. *Development* (2001), Bd. 128(7):S. 1081–1088
- [Dor01b] DORMANN, D; KIM, J Y; DEVREOTES, P N und WEIJER, C J: cAMP receptor affinity controls wave dynamics, geometry and morphogenesis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* (2001), Bd. 114(13):S. 2513–2523
- [Dor01c] DORMANN, D und WEIJER, C J: Propagating chemoattractant waves coordinate periodic cell movement in *Dictyostelium* slugs. *Development* (2001), Bd. 128(22):S. 4535–4543
- [Dor03] DORMANN, D und WEIJER, C J: Chemotactic cell movement during development. *Curr Opin Genet Dev* (2003), Bd. 13(4):S. 358–364
- [Dor06a] DORMANN, D und WEIJER, C J: Chemotactic cell movement during *Dictyostelium* development and gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* (2006), Bd. 16(4):S. 367–373

- [Dor06b] DORMANN, D und WEIJER, C J: Visualizing signaling and cell movement during the multicellular stages of *Dictyostelium* development. *Methods Mol Biol* (2006), Bd. 346:S. 297–309
- [Dur73] DURSTON, A J: *Dictyostelium discoideum* aggregation fields as excitable media. *J Theor Biol* (1973), Bd. 42(3):S. 483–504
- [Dur74] DURSTON, A J: Pacemaker activity during aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1974), Bd. 37(2):S. 225–235
- [Dyn94] DYNES, J L; CLARK, A M; SHAULSKY, G; KUSPA, A; LOOMIS, W F und FIRTEL, R A: LagC is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Dev* (1994), Bd. 8(8):S. 948–958
- [Ear95] EARLY, A; ABE, T und WILLIAMS, J: Evidence for positional differentiation of prestalk cells and for a morphogenetic gradient in *Dictyostelium*. *Cell* (1995), Bd. 83(1):S. 91–99
- [Ebe98] EBELING, W; FREUND, J und SCHWEITZER, F: *Komplexe Strukturen: Entropie und Information*, Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig (1998)
- [Fir95] FIRTEL, R A: Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Dev* (1995), Bd. 9(12):S. 1427–1444
- [Foe88] FOERSTER, P; MÜLLER, S C und HESS, B: Curvature and propagation velocity of chemical waves. *Science* (1988), Bd. 241(4866):S. 685–687
- [Foe89] FOERSTER, P; MÜLLER, S C und HESS, B: Critical size and curvature of wave formation in an excitable chemical medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989), Bd. 86(18):S. 6831–6834
- [Foe90a] FOERSTER, P: *Nukleation, krümmungsabhängige Propagation und Dispersion von Erregungswellen: Belousov-Zhabotinskii-Reaktion und Schleimpilz Dictyostelium discoideum*, Dissertation, Ruhr Universität Bochum; Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie Dortmund (1990)
- [Foe90b] FOERSTER, P; MÜLLER, S C und HESS, B: Curvature and spiral geometry in aggregation patterns of *Dictyostelium discoideum*. *Development* (1990), Bd. 109:S. 11–16
- [Fon93] FONTANA, D R: Two distinct adhesion systems are responsible for EDTA-sensitive adhesion in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* (1993), Bd. 53(3):S. 139–147
- [For77] FORMAN, D und GARROD, D R: Pattern formation in *Dictyostelium discoideum*: I. Development of prespore cells and its relationship to the pattern of the fruiting body. *J Embryol Exp Morphol* (1977), Bd. 40:S. 215–228

- [Fra81] FRANKE, J und KESSIN, R H: The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. *J Biol Chem* (1981), Bd. 256(14):S. 7628–7637
- [Fra91] FRANKE, J; FAURE, M; WU, L; HALL, A L; PODGORSKI, G J und KESSIN, R H: Cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum* and its glycoprotein inhibitor: structure and expression of their genes. *Dev Genet* (1991), Bd. 12(1-2):S. 104–112
- [Fre01] FREDHOLM, B B; IJZERMAN, A P; JACOBSON, K A; KLOTZ, K N und LINDEN, J: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* (2001), Bd. 53(4):S. 527–552
- [Fuk91] FUKUI, Y; MURRAY, J; RIDDELLE, K S und SOLL, D R: Cell behavior and actomyosin organization in *Dictyostelium* during substrate exploration. *Cell Struct Funct* (1991), Bd. 16(4):S. 289–301
- [Fuk99] FUKUI, Y; KITANISHI-YUMURA, T und YUMURA, S: Myosin II-independent F-actin flow contributes to cell locomotion in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* (1999), Bd. 112(6):S. 877–886
- [Fut82] FUTRELLE, R P: *Dictyostelium* chemotactic response to spatial and temporal gradients. Theories of the limits of chemotactic sensitivity and of pseudochemotaxis. *J Cell Biochem* (1982), Bd. 18(2):S. 197–212
- [Gay95] GAYLORD, R J und WELLIN, P R: *Computer simulations with Mathematica. Explorations in complex physical and biological Systems (TELOS - The Electronic Library of Science)*, Springer-Verlag, Berlin (1995)
- [Geb08] GEBERTH, Daniel und HÜTT, Marc-Thorsten: Predicting spiral wave patterns from cell properties in a model of biological self-organization. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* (2008), Bd. 78(3 Pt 1):S. 031917
- [Geb09a] GEBERTH, D: *Exploring the influence of biological variability on pattern formation in Dictyostelium discoideum*, Dissertation, School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen (2009)
- [Geb09b] GEBERTH, D; HILGARDT, C und HÜTT, M-Th: Systematics of spatiotemporal heterogeneity, in: U Lüttge; B Osmond; U Rascher; U Schurr; S von Caemmerer und A Walter (Herausgeber) *Imaging and integrating heterogeneity of plant functions: functional biodiversity from cells to the biosphere*, Bd. 96, *Nova Acta Leopold* (2009), S. 145–159
- [Geb09c] GEBERTH, D und HÜTT, M-Th: Predicting the distribution of spiral waves from cell properties in a developmental-path model of *Dictyostelium* pattern formation. *PLoS Comput Biol* (2009), Bd. 5(7):S. e1000422

- [Geb10] GEBERTH, D und HÜTT, M-Th: Combining spiral and target wave detection to analyze excitable media dynamics. *Physica A* (2010), Bd. 389:S. 248–258
- [Ger61] GERISCH, G: Zellkontaktbildung vegetativer und aggregationsreifer Zellen von *Dictyostelium discoideum*. *Naturwissenschaften* (1961), Bd. 48:S. 436–437
- [Ger68] GERISCH, G: Cell aggregation and differentiation in *Dictyostelium*, in: A A Moscona und A Monroy (Herausgeber) *Current topics in developmental biology*, Academic Press, New York (1968), S. 157–197
- [Ger71] GERISCH, G: Periodic signals control pattern forming in cell associations. *Naturwissenschaften* (1971), Bd. 58(9):S. 430–438
- [Ger72] GERISCH, G; MALCHOW, D; RIEDEL, V; MÜLLER, E und EVERY, M: Cyclic AMP phosphodiesterase and its inhibitor in slime mould development. *Nat New Biol* (1972), Bd. 235(55):S. 90–92
- [Ger74] GERISCH, G und HESS, B: Cyclic-AMP-controlled oscillations in suspended *Dictyostelium* cells: their relation to morphogenetic cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1974), Bd. 71(5):S. 2118–2122
- [Ger75a] GERISCH, G; HULSER, D; MALCHOW, D und WICK, U: Cell communication by periodic cyclic-AMP pulses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (1975), Bd. 272(915):S. 181–192
- [Ger75b] GERISCH, G und WICK, U: Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from *Dictyostelium* cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1975), Bd. 65(1):S. 364–370
- [Ger76] GERISCH, G und MALCHOW, D: Cyclic AMP receptors and the control of cell aggregation in *Dictyostelium*. *Adv Cycl Nucl Res* (1976), Bd. 7:S. 49–68
- [Ger79] GERISCH, G; MALCHOW, D; ROOS, W und WICK, U: Oscillations of cyclic nucleotide concentrations in relation to the excitability of *Dictyostelium* cells. *J Exp Biol* (1979), Bd. 81:S. 33–47
- [Ger80] GERISCH, G: Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in *Dictyostelium*, in: M Friedlander (Herausgeber) *Current topics in developmental biology*, Academic Press, New York (1980), S. 243–269
- [Ger82] GERISCH, G: Chemotaxis in *Dictyostelium*. *Annu Rev Physiol* (1982), Bd. 44:S. 535–552
- [Gho64] GHOSH, A und CHANCE, B: Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1964), Bd. 16(2):S. 174–181
- [Gie72] GIERER, A und MEINHARDT, H: A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* (1972), Bd. 12:S. 30–39

- [Gla81] GLAZER, P M und NEWELL, P C: Initiation of aggregation by *Dictyostelium discoideum* in mutant populations lacking pulsatile signalling. *J Gen Microbiol* (1981), Bd. 125:S. 221–232
- [Gol73] GOLDBETER, A: Patterns of spatiotemporal organization in an allosteric enzyme model. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1973), Bd. 10(11):S. 3255–3259
- [Gol80] GOLDBETER, A und SEGEL, L A: Control of developmental transitions in the cyclic AMP signalling system of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* (1980), Bd. 17(3):S. 127–135
- [Gol88] GOLDBETER, A und MARTIEL, J L: Developmental control of a biological rhythm: The onset of cAMP oscillations in *Dictyostelium* cells, in: M Markus; S C Müller und G Nicolis (Herausgeber) *From chemical to biological organization*, Springer Series in Synergetics, Springer-Verlag (1988), S. 248–254
- [Gol96] GOLDBETER, A: *Biochemical oscillations and cellular rhythms: the molecular bases of periodic and chaotic behavior*, Cambridge Univ Press, Cambridge (1996)
- [Gol04] GOLDBETER, A: Computational biology: a propagating wave of interest. *Curr Biol* (2004), Bd. 14(15):S. R601–2
- [Gom87] GOMER, R H und FIRTEL, R A: Cell-autonomous determination of cell-type choice in *Dictyostelium* development by cell-cycle phase. *Science* (1987), Bd. 237(4816):S. 758–762
- [Gor83] GORELOVA, N A und BURES, J: Spiral waves of spreading depression in the isolated chicken retina. *J Neurobiol* (1983), Bd. 14:S. 353–363
- [Gor96] GORYACHEV, A und KAPRAL, R: Spiral waves in chaotic systems. *Phys Rev Lett* (1996), Bd. 76(10):S. 1619–1622
- [Gra95] GRAY, R A; JALIFE, J; PANFILOV, A V; BAXTER, W T; CABO, C; DAVIDENKO, J M und PERTSOV, A M: Mechanisms of cardiac fibrillation. *Science* (1995), Bd. 270(5239):S. 1222–1223
- [Gra98] GRAY, R A; PERTSOV, A M und JALIFE, J: Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature* (1998), Bd. 392(6671):S. 75–78
- [Gro76] GROSS, J D; PEACEY, M J und TREVAN, D J: Signal emission and signal propagation during early aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* (1976), Bd. 22(3):S. 645–656
- [Guh00] GUHARAY, S; HUNT, B; YORKE, J und WHITE, O: Correlations in DNA sequences across the three domains of life. *Physica D* (2000), Bd. 146(1):S. 388–396

- [Hak77] HAKEN, H: *Synergetics. An introduction*, Springer-Verlag, Berlin (1977)
- [Hal98] HALLOY, J; LAUZERAL, J und GOLDBETER, A: Modeling oscillations and waves of cAMP in *Dictyostelium discoideum* cells. *Biophys Chem* (1998), Bd. 72(1-2):S. 9–19
- [Han95] HANAZAKI, I; MORI, Y; SEKIGUCHI, T und RABAI, G: Photo-response of chemical oscillators. *Physica D* (1995), Bd. 84:S. 228–237
- [Has75] HASHIMOTO, Y; COHEN, M H und ROBERTSON, A: Cell density dependence of the aggregation characteristics of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* (1975), Bd. 19(1):S. 215–229
- [Her98] HERZEL, H; TRIFONOV, E N; WEISS, O und GROSSE, I: Interpreting correlations in biosequences. *Physica A* (1998), Bd. 249:S. 449–459
- [Hil07] HILGARDT, C; MÜLLER, S C und HÜTT, M-Th: Reconstruction of cellular variability from spatiotemporal patterns of *Dictyostelium discoideum*. *Nonlinear Biomed Phys* (2007), Bd. 1(1):S. 10–21
- [Hil08] HILGARDT, C; CEJKOVA, J; HAUSER, M J B und SEVCIKOVA, H: Streamless aggregation of *Dictyostelium* in the presence of isopropylidenadenosin. *Biophys Chem* (2008), Bd. 132(1):S. 9–17
- [Höf95] HÖFER, T; SHERRATT, J A und MAINI, P K: *Dictyostelium discoideum*: cellular self-organization in an excitable biological medium. *Proc Biol Sci* (1995), Bd. 259(1356):S. 249–257
- [Höf97] HÖFER, T und MAINI, P K: Streaming instability of slime mold amoebae: an analytical model. *Phys Rev E* (1997), Bd. 56(2):S. 2074–2080
- [Hua99] HUANG, H J und PEARS, C: Cell cycle-dependent regulation of early developmental genes. *Biochim Biophys Acta* (1999), Bd. 1452:S. 296–302
- [Hüt01a] HÜTT, M-Th: *Datenanalyse in der Biologie*, Springer-Verlag, Berlin (2001)
- [Hüt01b] HÜTT, M-Th und NEFF, R: Quantification of spatiotemporal phenomena by means of cellular automata techniques. *Physica A* (2001), Bd. 289:S. 498–516
- [Hüt02] HÜTT, M-Th; NEFF, R; BUSCH, H und KAISER, F: Method for detecting the signature of noise-induced structures in spatiotemporal data sets. *Phys Rev E* (2002), Bd. 66:S. 026117
- [Hüt03] HÜTT, M-Th: Method for detecting the signature of noise-induced structures in spatiotemporal data sets: an application to excitable media, in: L Schimansky-Geier; D Abbott; A Neiman und C Van den Broeck (Herausgeber) *Noise in complex systems and stochastic dynamics*, Bd. 5114, Proc of SPIE (2003), S. 383–395

- [Hüt06a] HÜTT, M-Th: Was ist Selbstorganisation und was nützt sie zum Naturverständnis?, in: M Vec; M-Th Hütt und A Freund (Herausgeber) *Selbstorganisation. Ein Denksystem für Natur und Gesellschaft*, Böhlau Verlag, Köln, Weimar, Wien (2006), S. 91–105
- [Hüt06b] HÜTT, M-Th und DEHNERT, M: *Methoden der Bioinformatik*, Springer-Verlag (2006)
- [Ill08] ILLIAN, J; PENTTINEN, A; STOYAN, H und STOYAN, D: *Statistical analysis and modelling of spatial point patterns*, Wiley-Interscience (2008)
- [Ins94] INSALL, R; KUSPA, A; LILLY, P J; SHAULSKY, G; LEVIN, L R; LOOMIS, W F und DEVREOTES, P N: CRAC, a cytosolic protein containing a pleckstrin homology domain, is required for receptor and G-protein-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* (1994), Bd. 126:S. 1537–1545
- [Ira03] IRANFAR, N; FULLER, D und LOOMIS, W F: Genome-wide expression analysis of gene regulation during early development. *Eukaryot Cell* (2003), Bd. 2:S. 664–670
- [Isa08] ISALAN, Mark; LEMERLE, Caroline; MICHALODIMITRAKIS, Konstantinos; HORN, Carsten; BELTRAO, Pedro; RAINERI, Emanuele; GARRIGA-CANUT, Mireia und SERRANO, Luis: Evolvability and hierarchy in rewired bacterial gene networks. *Nature* (2008), Bd. 452(7189):S. 840–5
- [Jac80] JACOBSEN, H; BUSSE, H G und HAVSTEEN, B: Spontaneous spatio-temporal organization in yeast cell suspension. *J Cell Sci* (1980), Bd. 43:S. 367–377
- [Jac82] JACOBSEN, H; BUSSE, H G und HAVSTEEN, B H: Spontaneous spatiotemporal organization in yeast extracts. *J Biol Chem* (1982), Bd. 257(7):S. 4001–4006
- [Jai92] JAIN, R; YUEN, I S; TAPHOUSE, C R und GOMER, R H: A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes Dev* (1992), Bd. 6(3):S. 390–400
- [Jak90] JAKUBITH, S; ROTERMUND, H H; ENGEL, W; VON OERTZEN, A und G, Ertl: Spatiotemporal concentration patterns in a surface reaction: propagating and standing waves, rotating spirals, and turbulence. *Phys Rev Lett* (1990), Bd. 65:S. 3013–3016
- [Jin00] JIN, T; ZHANG, N; LONG, Y; PARENT, C A und DEVREOTES, P N: Localization of the G protein $\beta\gamma$ complex in living cells during chemotaxis. *Science* (2000), Bd. 287:S. 1034–1036
- [Joh89] JOHNSON, R A; YEUNG, S M; STUBNER, D; BUSHFIELD, M und SHOSHANI, I: Cation and structural requirements for P side-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* (1989), Bd. 35:S. 681–688

- [Joh92] JOHNSON, R L; VAN HAASTERT, P J M; KIMMEL, A R; SAXE III, C L; JASTORFF, B und DEVREOTES, P N: The cyclic nucleotide specificity of three cAMP receptors in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* (1992), Bd. 267:S. 4600–4607
- [Kad97] KADAR, S; AMEMIYA, T und SHOWALTER, K: Reaction mechanism for light sensitivity of the $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -catalyzed Belousov-Zhabotinsky reaction. *J Phys Chem A* (1997), Bd. 101(44):S. 8200–8206
- [Kat74] KATZ, E R und BOURGUIGNON, L Y: The cell cycle and its relationship to aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1974), Bd. 36(1):S. 82–87
- [Kat77] KATZ, A M; REPKE, D I und HASSELBACH, W: Dependence of ionophore- and caffeine-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations. *J Biol Chem* (1977), Bd. 252(6):S. 1938–1949
- [Kee86a] KEENER, J P: A geometrical theory of spiral waves in excitable media. *SIAM J Appl Math* (1986), Bd. 46:S. 1039–1056
- [Kee86b] KEENER, J P und TYSON, J J: Spiral waves in the Belousov-Zhabotinskii reaction. *Physica D* (1986), Bd. 21(2-3):S. 307–324
- [Kel94] KELLER, T; EITLE, E; BALDING, K; CORRICK, C und PARISH, R W: A monoclonal antibody that interferes with the post-aggregation adhesion of *Dictyostelium discoideum* cells. *FEBS Lett* (1994), Bd. 339(1-2):S. 119–123
- [Kes88] KESSIN, R H: Genetics of early *Dictyostelium discoideum* development. *Microbiol Rev* (1988), Bd. 52(1):S. 29–49
- [Kes93] KESSLER, D A und LEVINE, H: Pattern formation in *Dictyostelium* via the dynamics of cooperative biological entities. *Phys Rev E* (1993), Bd. 48:S. 4801–4804
- [Kes94] KESSLER, D A; LEVINE, H und REYNOLDS, W N: Theory of the spiral core in excitable media. *Physica D* (1994), Bd. 70:S. 115–139
- [Kes01] KESSIN, R H: *Dictyostelium. Evolution, cell biology, and the development of multicellularity*, Developmental and Cell Biology Series, Cambridge Univ Pr, Cambridge (2001)
- [Kha87] KHACHATRIAN, L; KLEIN, C und HOWLETT, A: Regulation of *Dictyostelium discoideum* adenylate cyclase by manganese and adenosine analogs. *Biochim Biophys Acta* (1987), Bd. 927:S. 235–246
- [Khe01] KHEOWAN, O U; GASPAR, V; ZYKOV, V S und MÜLLER, S C: Measurement of kinematical parameters of spiral waves in media of low excitability. *Phys Chem Chem Phys* (2001), Bd. 3:S. 4747–4752

- [Kim91] KIMMEL, A R und FIRTEL, R A: cAMP signal transduction pathways regulating development of *Dictyostelium discoideum*. *Curr Opin Genet Dev* (1991), Bd. 1:S. 383–390
- [Kim98] KIM, H J; CHANG, W T; MEIMA, M; GROSS, J D und SCHAAP, P: A novel adenylyl cyclase detected in rapidly developing mutants in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* (1998), Bd. 273:S. 30859–30862
- [Kit02] KITANO, H: Computational systems biology. *Nature* (2002), Bd. 420:S. 206–210
- [Kle75] KLEIN, C und DARMON, M: The relationship of phosphodiesterase to the developmental cycle of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* (1975), Bd. 67(1):S. 440–447
- [Kle76] KLEIN, C: Adenylate cyclase activity in *Dictyostelium discoideum* amoebae and its changes during differentiation. *FEBS Lett* (1976), Bd. 68(1):S. 125–128
- [Kle85a] KLEIN, C; LUBS-HAUKENESS, J und SIMONS, S: cAMP induces a rapid and reversible modification of the chemotactic receptor in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* (1985), Bd. 100(3):S. 715–720
- [Kle85b] KLEIN, P; FONTANA, D; KONX, B; THEIBERT, A und DEVREOTES, P: cAMP receptor controlling cell-cell interactions in the development of *Dictyostelium*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* (1985):S. 787–799
- [Kle85c] KLEIN, P; THEIBERT, A; FONTANA, D und DEVREOTES, P N: Identification and cyclic AMP-induced modification of the cyclic AMP receptor in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* (1985), Bd. 260(3):S. 1757–1764
- [Kle87] KLEIN, C; VAUGHAN, R; BORLEIS, J und DEVREOTES, P: The surface cyclic cAMP receptor in *Dictyostelium*. Levels of ligand-induced phosphorylation, solubilization, identification of primary transcript, and developmental regulation of expression. *J Biol Chem* (1987), Bd. 262:S. 358–364
- [Kle88] KLEIN, P S; SUN, T J; SAXE III, C L; KIMMEL, A R; JOHNSON, R L und DEVREOTES, P N: A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science* (1988), Bd. 241:S. 1467–1472
- [Kon61] KONIJN, T M und RAPER, K B: Cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1961), Bd. 3:S. 725–756
- [Kon67] KONIJN, T M; VAN DE MEENE, J G; BONNER, J T und BARKLEY, D S: The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1967), Bd. 58(3):S. 1152–1154
- [Kos87] KOSHLAND, D E: Switches, thresholds and ultrasensitivity. *Trends Biochem Sci* (1987), Bd. 12:S. 225–229

- [Kre89] KREFFT, M und WEIJER, C J: Expression of a cell surface antigen in *Dictyostelium discoideum* in relation to the cell cycle. *J Cell Sci* (1989), Bd. 93(1):S. 199–204
- [Kri03] KRIEBEL, P W; BARR, Valarie A und PARENT, Carole A: Adenylyl cyclase localization regulates streaming during chemotaxis. *Cell* (2003), Bd. 112(4):S. 549–560
- [Kri08] KRIEBEL, P W; BARR, V A; RERICHA, E C; ZHANG, G und PARENT, C A: Collective cell migration requires vesicular trafficking for chemoattractant delivery at the trailing edge. *J Cell Biol* (2008), Bd. 183(5):S. 949–961
- [Kun83] KUNZLI, M und PARISH, R W: Developmentally regulated glycoprotein implicated in post-aggregative adhesion of *Dictyostelium* is restricted to prespore cells. *FEBS Lett* (1983), Bd. 155:S. 253–256
- [Lai75] LAINE, J; ROXBY, N und COUKELL, M B: A simple method for storing cellular slime mold amoebae. *Can J Microbiol* (1975), Bd. 21(7):S. 959–962
- [Lau97] LAUZERAL, J; HALLOY, J und GOLDBETER, A: Desynchronization of cells on the developmental path triggers the formation of spiral waves of cAMP during *Dictyostelium* aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), Bd. 94(17):S. 9153–9158
- [Lax79] LAX, A J: The evolution of excitable behaviour in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* (1979), Bd. 36:S. 311–321
- [Lea44] LEO, A A P: Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* (1944), Bd. 7:S. 359–390
- [Lec91] LECHLEITER, J D; GIRARD, S; PERALTA, E und CLAPHAM, D E: Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* (1991), Bd. 252(5002):S. 123–126
- [Lee96] LEE, K J.; COX, E C. und GOLDSTEIN, R E.: Competing patterns of signaling activity in *Dictyostelium discoideum*. *Phys Rev Lett* (1996), Bd. 76(7):S. 1174–1177
- [Lee99] LEE, K J: Wave pattern selection in an excitable system. *Phys Rev Lett* (1999), Bd. 79:S. 2907–2910
- [Lee01] LEE, K J; GOLDSTEIN, R E und COX, E C: Resetting wave forms in *Dictyostelium* territories. *Phys Rev Lett* (2001), Bd. 87(6):S. 068101
- [Len93] LENGYEL, I; KADAR, S und EPSTEIN, IR: Transient Turing structures in a gradient-free closed system. *Science* (1993), Bd. 259(5094):S. 493–495

- [Lev91] LEVINE, H und REYNOLDS, W: Streaming instability of aggregating slime mold amoebae. *Phys Rev Lett* (1991), Bd. 66(18):S. 2400–2403
- [Lev96] LEVINE, H; ARANSON, I; TSIMRING, L und TRUONG, T V: Positive genetic feedback governs cAMP spiral wave formation in *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996), Bd. 93(13):S. 6382–6386
- [Lev98] LEVINE, H: The dynamics of *Dictyostelium* development. *Physica A* (1998), Bd. 249(1-4):S. 53–63
- [Lev04] LEVINE, H und BEN-JACOB, E: Physical schemata underlying biological pattern formation - examples, issues and strategies. *Phys Biol* (2004), Bd. 1:S. 14–22
- [LH82] LUBS-HAUKENESS, J und KLEIN, C: Cyclic nucleotide-dependent phosphorylation in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *J Biol Chem* (1982), Bd. 257:S. 12204–12208
- [Lil94] LILLY, P J und DEVREOTES, P N: Identification of CRAC, a cytosolic regulator required for guanine nucleotide stimulation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* (1994), Bd. 269:S. 14123–14129
- [Lin94] LIN, C; HAJNOCZKY, G und THOMAS, A P: Propagation of cytosolic calcium waves into the nuclei of hepatocytes. *Cell Calcium* (1994), Bd. 16(4):S. 247–258
- [Lip93] LIPP, P und NIGGLI, E: Microscopic spiral waves reveal positive feedback in subcellular calcium signaling. *Biophys J* (1993), Bd. 65:S. 2272–2276
- [Liu93] LIU, G; KUWAYAMA, H; ISHIDA, S und NEWELL, P C: The role of cyclic GMP in regulating myosin during chemotaxis of *Dictyostelium*: evidence from a mutant lacking the normal cyclic GMP response to cyclic AMP. *J Cell Sci* (1993), Bd. 106:S. 591–595
- [Lon77] LONDOS, C und WOLFF, J: Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1977), Bd. 74:S. 5482–5486
- [Loo75] LOOMIS, W F: *Dictyostelium discoideum. A developmental system*, Academic Press, New York (1975)
- [Loo79] LOOMIS, W F: Biochemistry of aggregation in *Dictyostelium*. A review. *Dev Biol* (1979), Bd. 70(1):S. 1–12
- [Loo82] LOOMIS, W F: *The Development of Dictyostelium discoideum*, Academic Press, New York (1982)
- [Lou94] LOUIS, J M; GINSBURG, G T und KIMMEL, A R: The cAMP receptor CAR4 regulates axial patterning and cellular differentiation during late development of *Dictyostelium*. *Genes Dev* (1994), Bd. 8(17):S. 2086–2096

- [Mac91] MACWILLIAMS, H K: Models of pattern formation in *Hydra* and *Dictyostelium*. *Semin Dev Biol* (1991), Bd. 2:S. 119–128
- [Mae86] MAEDA, Y.: A new method for inducing synchronous growth of *Dictyostelium discoideum* cells using temperature shifts. *J Gen Microbiol* (1986), Bd. 132(5):S. 1189–1196
- [Mae93] MAEDA, Y: Pattern formation in a cell-cycle dependent manner during the development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Growth Differ* (1993), Bd. 35(6):S. 609–616
- [Mae03] MAEDA, M; SAKAMOTO, H; IRANFAR, N; FULLER, D; MARUO, T; OGIHARA, S; MORIO, T; URUSHIHARA, H; TANAKA, Y und LOOMIS, W F: Changing patterns of gene expression in *Dictyostelium* prestalk cell subtypes recognized by in situ hybridization with genes from microarray analysis. *Eukaryot Cell* (2003), Bd. 2:S. 627–637
- [Mae04] MAEDA, M; LU, S; SHAULSKY, G; MIYAZAKI, Y; KUWAYAMA, H; TANAKA, Y; KUSPA, A und LOOMIS, W F: Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* (2004), Bd. 304(5672):S. 875–878
- [Mai00] MAIR, T und MÜLLER, S C: Propagating waves of biological activity. *Recent Res Devel Biophys Chem* (2000), Bd. 1:S. 105–121
- [Mal72] MALCHOW, D; NÄGELE, B; SCHWARTZ, H und GERISCH, G: Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem* (1972), Bd. 28:S. 136–142
- [Mal75] MALCHOW, D; FUCHILA, J und NANJUNDIAH, V: A plausible role for a membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in cellular slime mold chemotaxis. *Biophys Acta* (1975), Bd. 385:S. 421–428
- [Mal82] MALCHOW, D; BOHME, R und GRAS, U: On the role of calcium in chemotaxis and oscillations of *Dictyostelium* cells. *Biophys Struct Mech* (1982), Bd. 9(2):S. 131–136
- [Man92] MANN, S K O; YONEMOTO, W M; TAYLOR, S S und FIRTEL, R A: DdPK3, which plays essential roles during *Dictyostelium* development, encodes the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), Bd. 89:S. 10701–10705
- [Man86] MANN, S K und FIRTEL, R A: Two-phase regulatory pathway controls cAMP receptor-mediated expression of early genes in *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (86):S. 1924–1928

- [Mar87] MARTIEL, J-L und GOLDBETER, A: A model based on receptor desensitization for cyclic AMP signaling in *Dictyostelium* cells. *Biophys J* (1987), Bd. 52(5):S. 807–828
- [Mat77] MATTHEWS, L M Jr: Ca^{++} regulation in caffeine-derived microplasmodia of *Physarum polycephalum*. *J Cell Biol* (1977), Bd. 72(2):S. 502–505
- [Mat79] MATSUKUMA, S und DURSTON, A J: Chemotactic cell sorting in *Dictyostelium discoideum*. *J Embryol Exp Morphol* (1979), Bd. 50:S. 243–251
- [McD84] McDONALD, S A und DURSTON, A J: The cell cycle and sorting behaviour in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* (1984), Bd. 66:S. 195–204
- [McD86] McDONALD, S A: Cell-cycle regulation of center initiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1986), Bd. 117(2):S. 546–549
- [Mei84] MEINHARDT, H: *Models of biological pattern formation*, Academic Press, New York (1984)
- [Mei99a] MEILI, R; ELLSWORTH, C; LEE, S; REDDY, T B; MA, H und FIRTEL, R A: Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in *Dictyostelium*. *EMBO J* (1999), Bd. 18(8):S. 2092–2105
- [Mei99b] MEIMA, M und SCHAAP, P: *Dictyostelium* development-socializing through cAMP. *Semin Cell Dev Biol* (1999), Bd. 10(6):S. 567–576
- [Mer79] MERMIN, N D: The topological theory of defects in ordered media. *Rev Mod Phys* (1979), Bd. 51:S. 591–648
- [Mer91] MERON, E: The role of curvature and wavefront interactions in spiral-wave dynamics. *Physica D* (1991), Bd. 49:S. 98–106
- [Mik06] MIKHAILOV, A S und CALENBUHR, V: *From cells to societies. Models of complex coherent action*, Springer Series in Synergetics, Springer-Verlag, Berlin (2006)
- [Moh99] MOHANTY, S und FIRTEL, R A: Control of spatial patterning and cell-type proportioning in *Dictyostelium*. *Semin Cell Dev Biol* (1999), Bd. 10:S. 597–607
- [Mül85] MÜLLER, S C; PLESSER, T und HESS, B: The structure of the core of the spiral wave in the Belousov-Zhabotinskii reaction. *Science* (1985), Bd. 230(4726):S. 661–663
- [Mül98] MÜLLER, S C; MAIR, T und STEINBOCK, O: Traveling waves in yeast extract and in cultures of *Dictyostelium discoideum*. *Biophys Chem* (1998), Bd. 72:S. 37–47

- [Mur89] MURRAY, J D: *Mathematical biology*, Springer-Verlag, New York (1989)
- [Neb97] NEBL, T und FISHER, P R: Intracellular Ca^{2+} signals in *Dictyostelium* chemotaxis are mediated exclusively by Ca^{2+} influx. *J Cell Sci* (1997), Bd. 110(22):S. 2845–2853
- [Nee88] NEER, E J und CLAPMAN, D E: Role of G-Protein subunits in transmembran signaling. *Nature* (1988), Bd. 333:S. 129–134
- [New82a] NEWELL, P C: Cell surface binding of adenosine to *Dictyostelium* and inhibition of pulsatile signaling. *FEMS Microbiol Lett* (1982), Bd. 13:S. 417–421
- [New82b] NEWELL, P C und ROSS, F M: Inhibition by adenosine of aggregaron centre initiation and cyclic AMP binding in *Dictyostelium*. *J Gen Microbiol* (1982), Bd. 128:S. 2715–2724
- [Nic77] NICOLIS, G und PRIGOGINE, I: *Self-organization in nonequilibrium systems. From dissipative structures to order through fluctuations*, Wiley, New York (1977)
- [Noe95] NOEGEL, A A und LUNA, J E: The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia* (1995), Bd. 51(12):S. 1135–1143
- [Noe00] NOEGEL, A A und SCHLEICHER, M: The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J Cell Sci* (2000), Bd. 113(5):S. 759–766
- [NU93] NAGY-UNGVARAI, Z; UNGVARAI, I und MÜLLER, S C: Complexity in spiral wave dynamics. *Chaos* (1993), Bd. 3:S. 15–19
- [NV04] NÜSSLEIN-VOLHARD, C: *Das Werden des Lebens. Wie Gene die Entwicklung steuern*, C. H. Beck, München (2004)
- [Ode86] ODELL, G M und BONNER, J T: How the *D. discoideum* grex crawls. *Phil Trans R Soc Lond* (1986), Bd. 312:S. 487–525
- [Orl85] ORLOW, S H; SHAPIRO, I; FRANKE, J und KESSIN, R H: The extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. *J Biol Chem* (1985), Bd. 256:S. 7620–7627
- [Ots88] OTSUKA, H und VAN HAASTERT, P J M: A novel Myb homolog initiates *Dictyostelium* development by induction of adenylyl cyclase expression. *Genes Dev* (1988), Bd. 12:S. 1738–1748
- [Ott86] OTTE, A P; PLOMP, M J; ARENTS, J C; JANSSENS, P M und VAN DRIEL, R: Production and turnover of cAMP signals by prestalk and prespore cells in *Dictyostelium discoideum* cell aggregates. *Differentiation* (1986), Bd. 32(3):S. 185–191

- [Pal96] PALSSON, E und COX, E C: Origin and evolution of circular waves and spirals in *Dictyostelium discoideum* territories. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996), Bd. 93(3):S. 1151–1155
- [Pal97] PALSSON, E; LEE, K J; GOLDSTEIN, R E; FRANKE, J; KESSIN, R H und COX, E C: Selection for spiral waves in the social amoebae *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), Bd. 94(25):S. 13719–13723
- [Par85] PART, D; DE GUNZBURG, J und VERON, M: The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*: cellular localization and developmental regulation analyzed by immunoblotting. *Cell Differ* (1985), Bd. 17(4):S. 221–227
- [Par96] PARENT, C A und DEVREOTES, P N: Molecular genetics of signal transduction in *Dictyostelium*. *Annu Rev Biochem* (1996), Bd. 65:S. 411–440
- [Par98] PARENT, C A; BLACKLOCK, B J; FROELICH, W M; MURPHY, D B und DEVREOTES, P N: G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* (1998), Bd. 95:S. 81–91
- [Par99] PARENT, C A und DEVREOTES, P N: A cell's sense of direction. *Science* (1999), Bd. 284(5415):S. 765–770
- [Per62] PERKINS, D D: Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. *Can J Microbiol* (1962), Bd. 8(4):S. 591–594
- [Pet00] PETTY, H R; WORTH, R G und L, Kindzelskii A: Imaging sustained dissipative patterns in the metabolism of individual living cells. *Phys Rev Lett* (2000), Bd. 84:S. 2754–2757
- [Pit90] PITT, G S; GUNDERSEN, R E und DEVREOTES, P N: Mechanisms of excitation and adaptation in *Dictyostelium*. *Semin Cell Biol* (1990), Bd. 1(2):S. 99–104
- [Pit92] PITT, G S; MILONA, N; BORLEIS, J; LIN, K C; REED, R R und DEVREOTES, P N: Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell* (1992), Bd. 69(2):S. 305–315
- [Pol05] POLEZHAEV, A A; HILGARDT, C; MAIR, T und MÜLLER, S C: Transition from an excitable to an oscillatory state in *Dictyostelium discoideum*. *IEE Proc Syst Biol* (2005), Bd. 152(2):S. 75–79
- [Pri69] PRIGOGINE, I; LEFEVER, R; GOLDBETER, A und HERSCHKOWITZ-KAUFMAN, M: Symmetry breaking instabilities in biological systems. *Nature* (1969), Bd. 223(5209):S. 913–916
- [Quy91] QUYANG, Q und SWINNEY, H L: Transition from a uniform state to hexagonal and striped Turing patterns. *Nature* (1991), Bd. 352:S. 610–612

- [Rap35] RAPER, K B: Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J Agr Res* (1935), Bd. 50:S. 135–147
- [Rap45] RAPER, K B und ALEXANDER, D I: Preservation of molds by the lyophil process. *Mycologia* (1945), Bd. 37:S. 499–525
- [Rap52] RAPER, K B und FENNELL, D I: Stalk formation in *Dictyostelium*. *Bull Torrey Bot Club* (1952), Bd. 79:S. 25–51
- [Ras01] RASCHER, U; HÜTT, M T; SIEBKE, K; OSMOND, B; BECK, F und LUTTGE, U: Spatiotemporal variation of metabolism in a plant circadian rhythm: the biological clock as an assembly of coupled individual oscillators. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), Bd. 98(20):S. 11801–11805
- [Rat91] RATHI, A; KAYMAN, S C und CLARKE, M: Induction of gene expression in *Dictyostelium* by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells. *Dev Genet* (1991), Bd. 12(1-2):S. 82–87
- [Rie96] RIETDORF, J; SIEGERT, F und WEIJER, C J: Analysis of optical density wave propagation and cell movement during mound formation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1996), Bd. 177(2):S. 427–438
- [Riv96] RIVERO, F; KOPPEL, B; PERACINO, B; BOZZARO, S; SIEGERT, F; WEIJER, C J; SCHLEICHER, M; ALBRECHT, R und NOEGEL, A A: 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* (1996), Bd. 109(11):S. 2679–2691
- [Roo75] ROOS, W; NANJUNDIAH, V; MALCHOW, D und GERISCH, G: Amplification of cyclic-AMP signals in aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett* (1975), Bd. 53(2):S. 139–142
- [Ros81] ROSS, F M und NEWELL, P C: Streamers: chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum* with altered cyclic GMP metabolism. *J Gen Microbiol* (1981), Bd. 127(2):S. 339–350
- [Ros88] ROSS, J; MÜLLER, S C und VIDAL, C: Chemical waves. *Science* (1988), Bd. 240:S. 460–465
- [RR02] RAM REDDY, M K; SZLAVIK, Z; NAGY-UNGVARAI, Zs und MÜLLER, S C: Influence of light on the inorganic part of the Ruthenium-catalyzed Belousov-Zhabotinsky reaction. *J Phys Chem* (2002), Bd. 99(41):S. 15081–15085
- [Rub82] RUBINO, S; UNGER, E; FOGU, G und CAPPUCINELLI, P: Effect of microtubule inhibitors on the tubulin system of *Dictyostelium discoideum*. *Z Allg Mikrobiol* (1982), Bd. 22(2):S. 127–131

- [Sab02] SABBAGH, H: Observation of spiral core expansion in an excitable medium. *Phys Lett A* (2002), Bd. 299(2-3):S. 207–211
- [Sam06] SAMADANI, A; METTETAL, J und VAN OUDENAARDEN, A: Cellular asymmetry and individuality in directional sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006), Bd. 103(31):S. 11549–11554
- [San96] SANGER, B M: Propagation of traveling waves in excitable media. *Genes Dev* (1996), Bd. 10(18):S. 2237–2250
- [Saw05] SAWAI, S; THOMASON, P A und COX, E C: An autoregulatory circuit for long-range self-organization in *Dictyostelium* cell populations. *Nature* (2005), Bd. 433(7023):S. 323–326
- [Sax91a] SAXE, C L 3rd; JOHNSON, R; DEVREOTES, P N und KIMMEL, A R: Multiple genes for cell surface cAMP receptors in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet* (1991), Bd. 12(1-2):S. 6–13
- [Sax91b] SAXE, C L 3rd; JOHNSON, R L; DEVREOTES, P N und KIMMEL, A R: Expression of a cAMP receptor gene of *Dictyostelium* and evidence for a multigene family. *Genes Dev* (1991), Bd. 5(1):S. 1–8
- [Sax93] SAXE, C L 3rd; GINSBURG, G T; LOUIS, J M; JOHNSON, R; DEVREOTES, P N und KIMMEL, A R: CAR2, a prestalk cAMP receptor required for normal tip formation and late development of *Dictyostelium discoideum*. *Genes Dev* (1993), Bd. 7(2):S. 262–272
- [Sch86] SCHAAP, P und WANG, M: Interactions between adenosine and oscillatory cAMP signaling regulate size and pattern in *Dictyostelium*. *Cell* (1986), Bd. 45(1):S. 137–144
- [Sch92] SCHLEGEL, H G: *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 7 Aufl. (1992)
- [Sch95a] SCHAAP, P; BRANDT, R und VAN ES, S: Regulation of *Dictyostelium* adenylyl cyclases by morphogen-induced modulation of cytosolic pH or Ca²⁺ levels. *Dev Biol* (1995), Bd. 168(1):S. 179–188
- [Sch95b] SCHNITZLER, G R; BRISCOE, C; BROWN, J M und FIRTEL, R A: Serpentine cAMP receptors may act through a G protein-independent pathway to induce postaggregative development in *Dictyostelium*. *Cell* (1995), Bd. 81(5):S. 737–745
- [Seg95] SEGALL, J E; KUSPA, A; SHAULSKY, G; ECKE, M; MAEDA, M; GASKINS, C; FIRTEL, R A und LOOMIS, W F: A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* (1995), Bd. 128(3):S. 405–413

- [Ser00] SERVANT, G; WEINER, O D; HERZMARK, P; BALLA, T; SEDAT, J W und BOURNE, H R: Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* (2000), Bd. 287(5455):S. 1037–1040
- [Sha48] SHANNON, C E: A mathematical theory of communication. *Bell Systems Technical Journal* (1948), Bd. 27:S. 379–423, 623–656
- [Sha56] SHAFFER, B M: Acrasin, the chemotactic agent in cellular slime moulds. *J Exp Biol* (1956), Bd. 33(4):S. 645–657
- [Sha75] SHAFFER, B M: Secretion of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Nature* (1975), Bd. 255(5509):S. 549–552
- [Sha98] SHAULSKY, G; FULLER, D und LOOMIS, W F: A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development* (1998), Bd. 125(4):S. 691–699
- [Shi74] SHIBATA, M und BURES, J: Optimum topographical conditions for reverberating cortical spreading depression in rats. *J Neurobiol* (1974), Bd. 5(2):S. 107–118
- [Sie89] SIEGERT, F und WEIJER, C: Digital image processing of optical density wave propagation in *Dictyostelium discoideum* and analysis of the effects of caffeine and ammonia. *J Cell Sci* (1989), Bd. 93:S. 325–335
- [Sie91] SIEGERT, F und WEIJER, C J: Analysis of optical density wave propagation and cell movement in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Physica D* (1991), Bd. 49(1-2):S. 224–232
- [Sie92] SIEGERT, F und WEIJER, C J: Three-dimensional scroll waves organize *Dictyostelium* slugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), Bd. 89(14):S. 6433–6437
- [Sie94] SIEGERT, F und STEINBOCK, O: Die Natur schlägt Wellen, in: A Deutsch (Herausgeber) *Muster des Lebendigen*, Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden (1994), S. 71–89
- [Sim92] SIMON, M N; PELEGRINI, O; VERON, M und KAY, R R: Mutation of protein kinase A causes heterochronic development of *Dictyostelium*. *Nature* (1992), Bd. 356(6365):S. 171–172
- [Siu90] SIU, C H und KAMBOJ, R K: Cell-cell adhesion and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet* (1990), Bd. 11(5-6):S. 377–387
- [Siu97] SIU, C H; HARRIS, T J C; WONG, E F S; YANG, C; SESAKI, H und WANG, J: Cell adhesion molecules in *Dictyostelium*, in: Y Maeda; K Inouye und I Takeuchi (Herausgeber) *Dictyostelium. A model system for cell developmental biology*, Univers Acad Press, Tokoy (1997), S. 111–121

- [Soe96] SOEDE, R D; HOPPER, N A; WILLIAMS, J G und SCHAAP, P: Extracellular cAMP depletion triggers stalk gene expression in *Dictyostelium*: disparities in developmental timing and dose dependency indicate that prespore induction and stalk repression by cAMP are mediated by separate signaling pathways. *Dev Biol* (1996), Bd. 177(1):S. 152–159
- [Sol76] SOLL, D R; YARGER, J und MIRICK, M: Stationary phase and the cell cycle of *Dictyostelium discoideum* in liquid nutrient medium. *J Cell Sci* (1976), Bd. 20(3):S. 513–523
- [Spr94] SPRINGER, M L; PATTERSON, B und SPUDICH, J A: Stage-specific requirement for myosin II during *Dictyostelium* development. *Development* (1994), Bd. 120(9):S. 2651–2660
- [Ste82] STERNFELD, J und DAVID, C N: Fate and regulation of anterior-like cells in *Dictyostelium* slugs. *Dev Biol* (1982), Bd. 93(1):S. 111–118
- [Ste93] STEINBOCK, O; SIEGERT, F; MÜLLER, S C und WEIJER, C J: Three-dimensional waves of excitation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993), Bd. 90:S. 7332–7335
- [Ste00] STEINBOCK, O und MÜLLER, S C: Control and perturbation of wave propagation in excitable systems, in: J Walleczek (Herausgeber) *Self-organized biological dynamics & nonlinear control*, Kap. 17, Cambridge Univ Pr, Cambridge (2000), S. 387–408
- [Ste05] STEPANOVIC, V; WESSELS, D; DANIELS, Ka; LOOMIS, W F und SOLL, D R: Intracellular role of adenylyl cyclase in regulation of lateral pseudopod formation during *Dictyostelium* chemotaxis. *Eukaryot Cell* (2005), Bd. 4(4):S. 775–786
- [Str00] STROGATZ, S H: *Nonlinear dynamics and chaos*, Westview Press (2000)
- [Suc97] SUCGANG, R; WEIJER, C J; SIEGERT, F; FRANKE, J und KESSIN, R H: Null mutations of the *Dictyostelium* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Dev Biol* (1997), Bd. 192(1):S. 181–192
- [Suk98] SUKUMARAN, S; BROWN, J M; FIRTEL, R A und MCNALLY, J G: lagC-null and gbf-null cells define key steps in the morphogenesis of *Dictyostelium* mounds. *Dev Biol* (1998), Bd. 200(1):S. 16–26
- [Sun96] SUNAHARA, R K; DESSAUER, C W und GILMAN, A G: Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1996), Bd. 36:S. 461–480
- [Sus87] SUSSMAN, M: Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol* (1987), Bd. 28:S. 9–29

- [Tan94] TANG, Y und OTHMER, H G: A G protein-based model of adaptation in *Dictyostelium discoideum*. *Biosci* (1994), Bd. 120:S. 25–76
- [Tas83] TASAKA, M; NOCE, T und TAKEUCHI, I: Prestalk and prespore differentiation in *Dictyostelium* as detected by cell type-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1983), Bd. 80(17):S. 5340–5344
- [Ter61] TERASIMA, T und TOLMACH, L J: Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* (1961), Bd. 190:S. 1210–1211
- [The83] THEIBERT, A und DEVREOTES, P N: Cyclic 3', 5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum*: adaptation is independent of activation of adenylate cyclase. *J Cell Biol* (1983), Bd. 97(1):S. 173–177
- [The84] THEIBERT, A und DEVREOTES, P N: Adenosine and its derivatives inhibit the cAMP signaling response in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1984), Bd. 106(1):S. 166–173
- [Tom81] TOMCHIK, K J und DEVREOTES, P N: Adenosine 3',5'-monophosphate waves in *Dictyostelium discoideum*: a demonstration by isotope dilution-fluorography. *Science* (1981), Bd. 212(4493):S. 443–446
- [Tsu99] TSUJIOKA, M; MACHESKY, L M; COLE, S L; YAHATA, K und INOUE, K: A unique talin homologue with a villin headpiece-like domain is required for multicellular morphogenesis in *Dictyostelium*. *Curr Biol* (1999), Bd. 9(7):S. 389–392
- [Tur52] TURING, A M: The chemical basis of morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (1952), Bd. 227(641):S. 37–72
- [Tys89] TYSON, J J und MURRAY, J D: Cyclic AMP waves during aggregation of *Dictyostelium amoebae*. *Development* (1989), Bd. 106(3):S. 421–426
- [Tys03] TYSON, J J; CHEN, K C und NOVAK, B: Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol* (2003), Bd. 15(2):S. 221–231
- [Unt95] UNTERWEGER, N und SCHLATTERER, C: Introduction of calcium buffers into the cytosol of *Dictyostelium discoideum* amoebae alters cell morphology and inhibits chemotaxis. *Cell Calcium* (1995), Bd. 17(2):S. 97–110
- [Vas94] VASIEV, B N; HOGEWEG, P und PANFILOV, A V: Simulation of *Dictyostelium discoideum* aggregation via reaction-diffusion model. *Phys Rev Lett* (1994), Bd. 73(23):S. 3173–3176
- [Vas97] VASIEV, B; SIEGERT, F und WEIJER, C J: A hydrodynamic model for *Dictyostelium discoideum* mound formation. *J Theor Biol* (1997), Bd. 184(4):S. 441–450

- [Vas99] VASIEV, B und WEIJER, C J: Modeling chemotactic cell sorting during *Dictyostelium discoideum* mound formation. *Biophys J* (1999), Bd. 76(2):S. 595–605
- [Vas03] VASIEV, B und WEIJER, C J: Modelling of *Dictyostelium discoideum* slug migration. *J Theor Biol* (2003), Bd. 223(3):S. 347–359
- [VH83] VAN HAASTERT, P J: Binding of cAMP and adenosine derivatives to *Dictyostelium discoideum* cells. Relationships of binding, chemotactic, and antagonistic activities. *J Biol Chem* (1983), Bd. 258(16):S. 9643–9648
- [VH84] VAN HAASTERT, P J und DE WIT, R J: Demonstration of receptor heterogeneity and affinity modulation by nonequilibrium binding experiments. The cell surface cAMP receptor of *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* (1984), Bd. 259(21):S. 13321–13328
- [VH92] VAN HAASTERT, P J; WANG, M; BOMINAAR, A A; DEVREOTES, P N und SCHAAP, P: cAMP-induced desensitization of surface cAMP receptors in *Dictyostelium*: different second messengers mediate receptor phosphorylation, loss of ligand binding, degradation of receptor, and reduction of receptor mRNA levels. *Mol Biol Cell* (1992), Bd. 3(6):S. 603–612
- [VH96] VAN HAASTERT, P J; BISHOP, J D und GOMER, R H: The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* (1996), Bd. 134(6):S. 1543–1549
- [VH97] VAN HAASTERT, P J und KUWAYAMA, H: cGMP as second messenger during *Dictyostelium* chemotaxis. *FEBS Lett* (1997), Bd. 410(1):S. 25–28
- [VK01] VAN KAMPEN, N G: *Stochastic processes in physics and chemistry*, North Holland, Amsterdam (2001)
- [VLC86] VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M M; SCHAAP, P und VAN HAASTERT, P J: Specificity of adenosine inhibition of cAMP-induced responses in *Dictyostelium* resembles that of the P site in higher organisms. *Dev Biol* (1986), Bd. 117:S. 245–251
- [vO96] VAN OSS, C; PANFILOV, A V; HOGEWEG, P; SIEGERT, F und WEIJER, C J: Spatial pattern formation during aggregation of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J Theor Biol* (1996), Bd. 181(3):S. 203–213
- [VVW98] VERKERKE-VAN WIJK, I; KIM, J Y; BRANDT, R; DEVREOTES, P N und SCHAAP, P: Functional promiscuity of gene regulation by serpentine receptors in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* (1998), Bd. 18(10):S. 5744–5749
- [Wan88] WANG, M; AERTS, R J; SPEK, W und SCHAAP, P: Cell cycle phase in *Dictyostelium discoideum* is correlated with the expression of cyclic AMP production, detection, and degradation. Involvement of cyclic AMP signaling in cell sorting. *Dev Biol* (1988), Bd. 125(2):S. 410–416

- [Wan97] WANG, B und KUSPA, A: *Dictyostelium* development in the absence of cAMP. *Science* (1997), Bd. 277(5323):S. 251–254
- [Wat70] WATTS, D J und ASHWORTH, J M: Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* (1970), Bd. 119(2):S. 171–174
- [Wee94] WEEKS, G und WEIJER, C J: The *Dictyostelium* cell cycle and its relationship to differentiation. *FEMS Microbiol Lett* (1994), Bd. 124(2):S. 123–130
- [Weh90] WEHNER, R und GEHRING, W: *Zoologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 22. Aufl. (1990)
- [Wei84a] WEIJER, C J; DUSCHL, G und DAVID, C N: Dependence of cell-type proportioning and sorting on cell cycle phase in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* (1984), Bd. 70:S. 133–145
- [Wei84b] WEIJER, C J; DUSCHL, G und DAVID, C N: A revision of the *Dictyostelium discoideum* cell cycle. *J Cell Sci* (1984), Bd. 70:S. 111–131
- [Wei84c] WEIJER, C J; MCDONALD, S A und DURSTON, A J: Separation of *Dictyostelium discoideum* cells into density classes throughout their development and their relationship to the later cell types. *Differentiation* (1984), Bd. 28:S. 13–23
- [Wei84d] WEIJER, C J; MCDONALD, S A und J, Durston A: A frequency difference in optical-density oscillations of early *Dictyostelium discoideum* density classes and its implications for development. *Differentiation* (1984), Bd. 28:S. 9–12
- [Wei85] WEIJER, C J und DURSTON, A J: Influence of cyclic AMP and hydrolysis products on cell type regulation in *Dictyostelium discoideum*. *J Embryol Exp Morphol* (1985), Bd. 86:S. 19–37
- [Wei98] WEISS, O und HERZEL, H: Correlations in protein sequences and property codes. *J Theor Biol* (1998), Bd. 190(4):S. 341–353
- [Wei99] WEIJER, C J: Morphogenetic cell movement in *Dictyostelium*. *Semin Cell Dev Biol* (1999), Bd. 10(6):S. 609–619
- [Wei04] WEIJER, Cornelis J: *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* (2004), Bd. 14(4):S. 392–398
- [Wes96] WESSELS, D; TITUS, M und SOLL, D R: A *Dictyostelium* myosin I plays a crucial role in regulating the frequency of pseudopods formed on the substratum. *Cell Motil Cytoskel* (1996), Bd. 33(1):S. 64–79
- [Wes97] WESTPHAL, M; JUNGBLUTH, A; HEIDECKER, M; MUHLBAUER, B; HEIZER, C; SCHWARTZ, J M; MARRIOTT, G und GERISCH, G: Microfilament dynamics

- during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol* (1997), Bd. 7(3):S. 176–183
- [Wie46] WIENER, N und ROSENBLUETH, A: The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex* (1946), Bd. 16:S. 205–265
- [Wie87] WIER, W G; CANNELL, M B; BERLIN, J; MARBAN, E und LEDERER, W J: Cellular and subcellular heterogeneity of $[Ca^{2+}]_i$ in single heart cells revealed by fura-2. *Science* (1987), Bd. 235:S. 325–328
- [Win72] WINFREE, A T: Spiral waves of chemical activity. *Science* (1972), Bd. 175(4022):S. 634–636
- [Win80] WINFREE, A T: *The geometry of biological time*, Springer-Verlag, New York (1980)
- [Win87] WINFREE, A T: *When time breaks down*, Princeton Univ Pr, Princeton, New York (1987)
- [Wit92] WITKE, W; SCHLEICHER, M und NOEGEL, A A: Redundancy in the microfilament system: abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell* (1992), Bd. 68(1):S. 53–62
- [Wof82] WOFFENDIN, C und GRIFFITHS, A J: The differentiation responses of *Dictyostelium discoideum* amoebae at various times during synchronous growth. *J Gen Microbiol* (1982), Bd. 128:S. 2449–2452
- [Wol84] WOLFRAM, S: Cellular automata as models of complexity. *Nature* (1984), Bd. 311:S. 419–424
- [Wu95a] WU, L; FRANKE, J; BLANTON, R L; PODGORSKI, G J und KESSIN, R H: The phosphodiesterase secreted by prestalk cells is necessary for *Dictyostelium* morphogenesis. *Dev Biol* (1995), Bd. 167(1):S. 1–8
- [Wu95b] WU, L; HANSEN, D; FRANKE, J; KESSIN, R H und PODGORSKI, G J: Regulation of *Dictyostelium* early development genes in signal transduction mutants. *Dev Biol* (1995), Bd. 171(1):S. 149–158
- [Wu95c] WU, L J; KUWAYAMA, H; VAN HAASSTERT, P J M und DEVREOTES, P N: The G Protein beta-subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* (1995), Bd. 129(6):S. 1667–1675
- [Xia99] XIAO, Z; YAO, Y; LONG, Y und DEVREOTES, P: Desensitization of G-protein-coupled receptors. agonist-induced phosphorylation of the chemoattractant receptor cAR1 lowers its intrinsic affinity for cAMP. *J Biol Chem* (1999), Bd. 274(3):S. 1440–1448

- [Yam91] YAMAGUCHI, T und MÜLLER, S C: Front geometries of chemical waves under anisotropic conditions. *Physica D* (1991), Bd. 49(1-2):S. 40–46
- [Yam96] YAMAGUCHI, T; SHIMAMOTO, Y; AMEMIYA, T; YOSHIMOTO, M; OHMORI, T; NAKAIWA, M; AKIYA, T; SATO, M und MATSUMURA-INOUE, T: Bromomalonic acid as a source of photochemically produced Br^- -ion in the $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -catalyzed Belousov-Zhabotinsky reaction. *Chem Phys Lett* (1996), Bd. 259(1):S. 219–224
- [Yar74] YARGER, J; STULTS, K und SOLL, D R: Observations on the growth of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium: evidence for an extracellular growth inhibitor synthesized by stationary phase cells. *J Cell Sci* (1974), Bd. 14(3):S. 681–690
- [Yu96] YU, Y und SAXE, C L 3rd: Differential distribution of cAMP receptors cAR2 and cAR3 during *Dictyostelium* development. *Dev Biol* (1996), Bd. 173(1):S. 353–356
- [Yum85] YUMURA, S und FUKUI, Y: Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in *Dictyostelium*. *Nature* (1985), Bd. 314(6007):S. 194–196
- [Yum98] YUMURA, S und FUKUI, Y: Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* (1998), Bd. 111(15):S. 2097–2108
- [Zai70] ZAIKIN, A N und ZHABOTINSKY, A M: Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system. *Nature* (1970), Bd. 225:S. 535–537
- [ZH78a] ZADA-HAMES, I M und ASHWORTH, J M: The cell cycle and its relationship to development in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* (1978), Bd. 63(2):S. 307–320
- [ZH78b] ZADA-HAMES, I M und ASHWORTH, J M: The cell cycle during the vegetative stage of *Dictyostelium discoideum* and its response to temperature change. *J Cell Sci* (1978), Bd. 32:S. 1–20
- [Zha64] ZHABOTINSKY, A M: Periodic process of the oxidation of malonic acid in solution (study of the kinetics of Belosouv's reaction). *Biofizika* (1964), Bd. 9:S. 306–311
- [Zha97] ZHANG, G; LIU, Y; RUOHO, A E und HURLEY, J H: Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* (1997), Bd. 386(6622):S. 247–253
- [Zim93] ZIMMERMAN, W und WEIJER, C J: Analysis of cell cycle progression during the development of *Dictyostelium* and its relationship to differentiation. *Dev Biol* (1993), Bd. 160(1):S. 178–185

-
- [Zou02] ZOU, R; KNELLER, J; LEON, L J und NATTEL, S: Development of a computer algorithm for the detection of phase singularities and initial application to analyze simulations of atrial fibrillation. *Chaos* (2002), Bd. 12(3):S. 764–778
- [Zyk87] ZYKOV, V S: *Simulation of wave processes in excitable media*, Manchester University Press, Manchester (1987)

Anhang

Desynchronisation der Zellen entlang des Entwicklungpfades

Ergänzende Angaben zu Abschnitt 2.3.2

Das von Lauzeral et al. (1997) modifizierte Martiel-Golbeter-Modell, welches auf der reversiblen Rezeptordesensitivierung beruht, besteht aus drei nichtlinearen Differentialgleichungen entsprechend der Anzahl aktiver Rezeptoren (ρ_T) und der normalisierten Konzentration des intra- (β) und extrazellulären (γ) cAMP [Mar87, Gol96, Lau97].

Extrazelluläres cAMP bindet an die Rezeptoren, welche in zwei Zuständen (aktive R - und desensitiviert D -Form) vorliegen können. Nur der cAMP- R -Komplex kann die intrazelluläre AC aktivieren, welche daraufhin cAMP synthetisiert. Durch den Transport von cAMP in den extrazellulären Raum entsteht eine positive Rückkopplung, da cAMP erneut an die Rezeptoren binden kann. Außerhalb der Zelle wird cAMP von der extrazellulären PDE hydrolysiert.

$$\frac{d\rho_T}{dt} = -f_1(\gamma)\rho_T + f_2(\gamma)(1 - \rho_T) \quad (.1)$$

$$\frac{d\beta}{dt} = q\sigma\phi(\rho_T, \gamma, \alpha) - (k_i + k_t)\beta \quad (.2)$$

$$\frac{d\gamma}{dt} = (k_t\beta/h) - k_e\gamma + D_\gamma\nabla^2\gamma \quad (.3)$$

mit

$$f_1(\gamma) = \frac{k_1 + k_2\gamma}{1 + \gamma}, \quad f_2(\gamma) = \frac{k_1L_1 + k_2L_2c\gamma}{1 + c\gamma},$$

$$\phi(\rho_T, \gamma, \alpha) = \frac{\alpha(\lambda\theta + \epsilon Y^2)}{1 + \alpha\theta + \epsilon Y^2(1 + \alpha)}, \quad Y = \frac{\rho_T\gamma}{1 + \gamma}. \quad (.4)$$

Gleichung (.3) beinhaltet den Diffusionsterm von cAMP ([Tys89]). Die chemotaktische Zellbewegung bleibt innerhalb des Modelle unberücksichtigt.

Die Implementierung zellulärer Heterogenität in Form einer Verteilung unterschiedlicher

Entwicklungsstadien (also Positionen entlang des Entwicklungspfades), wird über die Einführung von Wahrscheinlichkeiten des Entwicklungsbeginns einzelner Zellgruppen realisiert [Lau97]. Die Startzeit t_S der Zellen wird entlang des Entwicklungspfades (als Anfangswerte des Parameters σ in Gleichung .3) gestreut. Damit wird sichergestellt, daß einzelne Zellen in ihrer Entwicklung weiter fortgeschritten sind als andere und früher das oszillatorische Regim erreichen.

Die Wahrscheinlichkeit der Startzeit der Entwicklung folgt einer exponentiell wachsenden Funktion.

$$P(t_S) = \frac{1}{\Delta} e^{-\frac{t_S}{\Delta}} \quad (.5)$$

So befinden sich, nachdem die Entwicklung begonnen hat, an den äußeren Flanken der Verteilung wenige Zellen, welche verhältnismäßig fortgeschritten bzw. erst später die Entwicklung beginnen, im Vergleich zur Mehrheit der Zellen deren Startzeiten im mittleren Bereich liegen. Der Parameter Δ ist somit ein Maß für den Grad der Desynchronisation einer Population. Je größer Δ ist, umso breiter sind die Startzeiten der Zellen entlang des Entwicklungspfades gestreut. $\Delta = 0$ entspricht einer vollständig synchronisierten Entwicklung.

Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Marwan für sein Interesse am Thema und die Übernahme des Referats. Ich danke Prof. Dr. Stefan C. Müller, daß ich die Möglichkeit erhalten habe, meine experimentellen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Biophysik durchführen zu können. Prof. Dr. Marcus J. B. Hauser danke ich für die vielfältige und große Unterstützung, die ich während dieser Zeit erhalten habe. Gleichzeitig bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biophysik, insbesondere bei Dr. Wolfgang Jantsoß für seine wertvollen Beiträge bei technischen Problemen und bei Dr. Thomas Mair für die Beratung in experimentellen Fragen. Für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanke ich mich bei Katja Guttman und Uta Lehmann, ebenso bei Ramona Bengsch und Dorothea Erndt für ihre Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Christian Warnke, Gregor Nuglisch, Dr. Stefan Wilfert, Ulrich Storb und Jürgen Weissenborn für alle guten Gespräche bedanken.

Dr. Hana Sevcikova danke ich für die Ermöglichung der vielen und schönen Aufenthalte in Prag, die vielen freundschaftlichen Gespräche und unsere gute Kooperation bei der Untersuchung der Musterbildung mit IPA. Dr. Andrey Polezhaev danke ich für unsere Zusammenarbeit zum Thema des Übergangs von Spiral- zu Targetmustern.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Marc-Thorsten Hütt für die Formulierung der Fragestellung, das Verfassen des DFG-Projektantrags und für die unzähligen inhaltlichen Diskussionen. Ich danke gleichzeitig allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Computational Systems Biology der Jacobs Universität für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während meiner Aufenthalte in Bremen. Besonderer Dank gilt hier noch Dr. Daniel Geberth für die gute Zusammenarbeit und die Entwicklung der tollen Analysewerkzeuge zur Extraktion der Phasensingularitäten, die er mir zur Verfügung gestellt hat.

Silvia Simon danke ich ganz herzlich für ihre große Unterstützung beim Einreichen dieser Arbeit und während der Prüfungsphase.

Ganz besonders möchte ich mich bei Nico Fricke, Olaf Karopka und Dr. Somprasong Naknaimueang bedanken, die mich über die Jahre in Magdeburg begleitet haben.

Ohne die moralische und praktische Unterstützung durch meine Familie würde es diese Arbeit nicht geben.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der Arbeit im Rahmen des SFB 555 und der Einzelprojektförderung (MU 884/18-2).

Lebenslauf

Christiane Hilgardt

geboren am 17. April 1972 in Jugenheim

- 08/1978-06/1991 Grundschule/Förderstufe/Gymnasium und Abitur in Darmstadt
- 09/1991-12/1999 Biologiestudium Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt a. M. und
Technischen Universität Darmstadt
Diplomarbeit: „Phylogenetische Charakterisierung genetischer Polymorphismen durch
RAPD-Fingerprintings bei verschiedenen Vertretern der Pflanzengattung *Clusia*“,
Institut für Botanik, Technische Universität Darmstadt
- 08/1996-04/2000 Wissenschaftshilfskraft Genetic Toxicology & Cell Biology Division, Cyto-
test Cell Research GmbH in Roßdorf
- 06-11/2000 Wissenschaftshilfskraft Technische Universität Darmstadt und Eberhard-
Karls-Universität Tübingen
- 11/2000-11/2001 Wissenschaftshilfskraft Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaf-
ten (Die Junge Akademie, AG Selbstorganisation)
- 11/2001-12/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,
Abteilung Biophysik
DFG Sonderforschungsbereich 555 „Nichtlineare komplexe Systeme“,
Thema: „Externe Kontrolle der Reaktions-Diffusions-Wellen bei *Dictyostelium* durch
Temperatur“
- 05-06/2005 Wissenschaftshilfskraft Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaf-
ten (Die Junge Akademie, AG Selbstorganisation)
- 06/2005-06/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,
Abteilung Biophysik
DFG Projektnr.: MU 884/18-2, Thema: „Funktion biologischer Variabilität bei der
Musterbildung von *Dictyostelium discoideum*“

Im Rahmen der Arbeit durchgeführte wissenschaftliche Auslandsaufenthalte

2002 Biosphere II Center, Tucson Arizona (USA)

2002 Division of Cell and Developmental Biology, School of Life Sciences Research Biocentre, University of Dundee (Schottland)

viele Aufenthalte

Prague Institute of Chemical Technology (Tschechische Republik)

Publizierte Artikel in Fachjournalen

POLEZHAEV, A A; HILGARDT, C; MAIR, T UND MÜLLER, S C: **Transition from an excitable to an oscillatory state in *Dictyostelium discoideum*.**

IEE Proc Syst Biol (2005), Bd. 152(2):S. 75-79

HILGARDT, C; MÜLLER, S C UND HÜTT, M-TH: **Reconstruction of cellular variability from spatiotemporal patterns of *Dictyostelium discoideum*.**

Nonlinear Biomed Phys (2007), Bd. 1(1):S. 10-21

HILGARDT, C; CEJKOVA, J; HAUSER, M J B UND SEVCIKOVA, H: **Streamless aggregation of *Dictyostelium* in the presence of isopropylidenadenosin.**

Biophys Chem (2008), Bd. 132(1):S. 9-17

GEBERTH, D; HILGARDT, C UND HÜTT, M-TH: **Systematics of spatiotemporal heterogeneity.** in: U Lüttge; B Osmond; U Rascher; U Schurr; S von Caemmerer und A Walter (Herausgeber) Imaging and integrating heterogeneity of plant functions: functional biodiversity from cells to the biosphere. *Nova Acta Leopold* (2009), Bd. 96(357):S. 145-159