

**Dynamische Fließgleichgewichte und ihre Übergänge in  
Reaktionsnetzwerken: Experimenteller Nachweis der Quasi-potential-  
Landschaft der zellulären Reprogrammierung**

**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.-Ing. Viktoria Rätzel, geb. Lehmann

geb. am 11.08.1984 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Wolfgang Marwan

Prof. Georg Golderer

eingereicht am: 27.05.2015

verteidigt am: 09.11.2015

## Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das Ziel, die Regulationen der Zelldifferenzierung am Beispiel des Sporulationsvorganges vom Modellorganismus *Physarum polycephalum* zu untersuchen. Während seines Lebenszyklus entwickelt sich *Physarum polycephalum* zu einer vielkernigen Riesenzelle, dem sogenannten Plasmodium. Das Besondere an den Zellkernen ist die synchrone Regulation von Teilungsprozessen und Transkriptionsfaktoren. Diese erlauben es, die Zelldifferenzierung auf Einzelzellebene zu studieren.

Sporulationskompetente Plasmodium wurde über den Phytochromen-Photorezeptor mit dunkelrotem Licht stimuliert. Mithilfe der von der Verfasserin der vorliegenden Arbeit neu etablierten Methode können in bestimmten Abständen Proben von einem Plasmodium entnommen werden, ohne die Zelldifferenzierung des Organismus zu ändern. Anhand der so von jedem Plasmodium gewonnenen Zeitreihe konnte der Differenzierungsvorgang anhand des Expressionsniveaus von 35 Sporulationsmarkergenen mit Hilfe einer speziellen „Multiplex RT-PCR-Methode“ (GeXP) analysiert werden. Der Einfluss von äußeren Faktoren auf den Differenzierungsprozess wurde durch Variationen in der Länge der Hungerphase und der Belichtungsintensität analysiert. Unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests konnten Hoch-, runterrunter- und konstant regulierte Gene charakterisiert werden. Die Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten zeigte, dass die Plasmodien unterschiedliche Trajektorienverläufe annehmen, welche die Schicksalsentscheidung der Zelle wiedergeben. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass individuelles Zellverhalten bei Mittelwertbildung berücksichtigt werden sollte. Vergleiche für Gene mit paarweisen Korrelationen bezüglich der Expressionskinetiken zeigen qualitativ unterschiedliche Muster der Co-Regulation. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass alternative Programme der Genregulation in den Zellen vorliegen und optional verwendet werden können. Auf Basis der Einzelzellstudie konnten qualitative Unterschiede zwischen nicht sporulierten Mutanten und sporulierten Wildtypzellen in Bezug auf die Regulation von Genen sowie auf ihre Co-Regulation festgestellt werden. Die Beobachtung der individuellen Unterschiede in der Genregulation während des Differenzierungsvorganges unterstützt das Konzept der Quasi-Potentiallandschaft von Waddington zur Kontrolle der genregulatorischen Vorgänge in einer Zelle. Zudem bekräftigen die Daten aus dem Vergleich zwischen Wildtypzellen und sporulierten Mutanten, dass Mutationen einen Einfluss auf die Topologie der Landschaft ausüben.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	2
Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Einleitung .....	12
2. Theoretische Grundlagen .....	16
2.1 Der Organismus <i>Physarum polycephalum</i> .....	16
2.1.1 Phylogenetische Einteilung .....	16
2.1.2 Der Lebenszyklus .....	16
2.1.3 <i>Physarum polycephalum</i> : Verwendung als Modellorganismus.....	18
2.1.4 Die Sporulation und ihre sensorische Kontrolle .....	20
2.1.5 Mutanten .....	22
2.2 Molekularbiologische Grundlagen .....	23
2.2.1 Genexpressionsanalysen mit dem GenomeLab™ GeXP-System.....	23
2.2.2.1 Reverse Transkription .....	23
2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	24
2.2.2.3 Kapillarelektrophoretische Trennung .....	25
2.3 Auswertungsmethoden .....	27
2.3.1 Ermittlung der relativen Genexpressionswerte .....	27
2.3.2 Multivariate Verfahren.....	27
2.3.2.1 Hauptkomponentenanalyse.....	27
2.3.2.2 Hierarchische Clusteranalyse.....	28
2.3.3 Signifikanztest – „Mann-Whitney-U-Test“ .....	28
2.3.4 Korrelationsanalyse .....	29
3. Materialien .....	30
3.1 Chemikalien.....	30
3.2 Geräte.....	31
3.3 Verbrauchsmaterialien.....	31
3.4 Kit-Systeme .....	32
3.5 Medien.....	32
3.6 Lösungen und Puffer .....	33
3.7 Organismen .....	33

3.8 Oligonukleotide .....	34
4. Methoden.....	35
4.1 Probengewinnung .....	35
4.1.1 Umsetzen von Erhaltungskulturen.....	35
4.1.2 Fermentation .....	36
4.1.3 Ernte.....	38
4.1.4 Sporulationsinduktion und Probenahme .....	39
4.2 Aufbereitung des Zellmaterials .....	40
4.2.1 Zelllyse .....	40
4.2.2 Phasentrennung .....	40
4.2.3 RNA-Fällung.....	41
4.2.4 Resuspension.....	41
4.2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung .....	41
4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
4.2.7 Konzentrationseinstellung .....	42
4.3 GeXP-Analyse .....	43
4.3.1 RT-PCR .....	43
4.3.2 Kapillarelektrophoretische Auftrennung.....	45
4.4 Genexpressionsanalyse .....	46
4.4.1 Bestimmung der Transkriptmengen.....	46
4.4.2 Mann-Whitney-U-Test.....	47
4.4.3 Hauptkomponentenanalyse.....	48
4.4.4 Signifikante Clusteranalyse .....	49
4.4.5 Korrelationsanalyse .....	49
5. Ergebnisse.....	50
5.1 Erforderliche Kontrollen für die Interpretation der Ergebnisse von Zeitreihenexperimenten an Einzelzellen .....	52
5.1.1 Homogenität der Zellmasse eines Plasmodiums.....	52
5.1.1.1 Vergleich der Transkriptmengen zwischen Rand und Zentrum eines Plasmodiums.....	52
5.1.1.2 Analyse auf lokal unabhängige Transkriptmengen in einem Plasmodium .	55
5.1.2 Analyse des Einflusses der wiederholten Probenahme an einer Zelle auf das Genexpressionsniveau der Zelle .....	57
5.2 Charakterisierung des Wildtyps #31 anhand von Zeitreihenanalysen bei Einzelzellen	60

5.2.1 Analyse der Kontrollplasmodien .....	60
5.2.2 Identifikation von Hoch- und runterregulierten Genen .....	65
5.2.3 Identifikation von früh- und spätregulierenden Genen .....	68
5.2.4 Vergleich zwischen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien .....	69
5.2.5 Einfluss der Hungerperiode und der Lichtintensität auf das Expressionsprofil ..	76
5.3 Charakterisierung von Mutanten.....	81
5.3.1 Identifikation des Genexpressionsprofils der Mutante PHO68 .....	81
5.3.2 Identifikation des Genexpressionsprofils der Mutante PHO48 .....	85
5.3.3 Vergleich der Mutanten untereinander und mit dem Wildtyp #31 .....	90
5.4 Charakterisierung der Zellfusion zweier Mutanten.....	94
5.4.1 Charakterisierung des Heterokaryont (PHO48+PHO68) .....	94
5.4.2 Einfluss der Mutanten auf den Heterokaryont .....	98
5.4.3 Vergleich der Zellfusion der beiden Mutanten PHO48 und PHO68 mit dem Wildtyp #31.....	105
5.5 Charakterisierung der epigenetischen Landschaft.....	109
5.5.1 Wildtypplasmodien in der Quasipotential-Landschaft.....	109
5.5.2 Plasmodien von Mutanten in der Quasipotential-Landschaft.....	111
5.6 Korrelationsanalyse der Einzelplasmodien .....	113
5.6.1 Korrelationsanalyse des Wildtyps.....	113
5.6.2 Korrelationsanalyse der Mutanten PHO48 undPHO68.....	116
5.6.3 Vergleich der regulatorischen Netzwerke von Einzelplasmodien .....	118
6. Diskussion .....	119
6.1 Optimierung der Kultivierung von Physarum polycephalum .....	119
6.2 Der Wildtyp #31 .....	120
6.2.1 Identifizierung wichtiger regulatorischer Gene.....	121
6.2.2 Identifizierung äußerer Faktoren auf das Expressionsverhalten.....	122
6.3 Charakterisierung der Mutanten PHO48 und PHO68 sowie des Heterokaryonten (PHO48+PHO68).....	124
6.4 Die Quasipotential-Landschaft.....	127
6.5 Auswirkungen der dynamischen Fließgleichgewichte auf die regulatorischen Netzwerke.....	129
7. Ausblick.....	131
Literaturverzeichnis.....	132
Anhang .....	137

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus Physarum polycephalum.....	18
Abbildung 2: Lebenszyklus mit gadAh-Mutation .....	20
Abbildung 3: Minimalmodell der sensorischen Kontrolle der Sporulation nach Starostzik und Marwan (2002).....	21
Abbildung 4: zeitlicher Verlauf der Sporulation (Vergleich Starostzik und Marwan 2002).....	22
Abbildung 5: Reverse Transkriptase (Enriquez-Schäfer 2005) .....	24
Abbildung 6: Polymerase-Kettenreaktion (Enriques-Schäfer 2005 und Hayashi 2007) .....	25
Abbildung 7: Probengewinnung .....	35
Abbildung 8: Der Fermenter .....	38
Abbildung 9: Die Plattenmaschine .....	39
Abbildung 10: Vergleich der Transkriptmengen zwischen den einzelnen Achteln.....	56
Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Kontrollplasmodien des Wildtypstammes #31.....	64
Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse des sporulierten Wildtyps .....	66
Abbildung 13: Einteilung von früh- und spätregulierenden Genen.....	69
Abbildung 14: Vergleich sporulierte und nicht sporulierte Wildtypplasmodien mittels der Hauptkomponentenanalyse .....	71
Abbildung 15: Vergleich der Expressionsverläufe zwischen allen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien.....	73
Abbildung 16: Darstellung der Expressionsverläufe der auffälligen Gene .....	76
Abbildung 17: Analyse des Einflusses der Hungerphase.....	78
Abbildung 18: Expressionsverläufe in Abhängigkeit der Hungerphase .....	80
Abbildung 19: Hauptkomponentenanalyse der Mutante PHO68 .....	82
Abbildung 20: Clusteranalyse von PHO68.....	84
Abbildung 21: Hauptkomponentenanalyse der Mutante PHO48 .....	86
Abbildung 22: Clusteranalyse der Mutante PHO48 .....	89
Abbildung 23: Vergleich der Mutanten und des Wildtyps mittels der Hauptkomponentenanalyse ..	91
Abbildung 24: Hauptkomponentenanalyse der Fusion PHO68+PHO48.....	95
Abbildung 25: Clusteranalyse des auffälligen Fusionsplasmodiums 5.....	97
Abbildung 26: Hauptkomponentenanalyse zum Vergleich zweier Mutanten und deren Heterokaryont.....	99
Abbildung 27: Analyse des Einflusses der Genexpression der einzelnen Mutanten auf das Fusionsexperiment mithilfe der Clusteranalyse.....	100

Abbildung 28: Mittelwerte der Clusteranalyse .....	103
Abbildung 29: Hauptkomponentenanalyse – Vergleich des Heterokaryonts PHO48+PHO68 mit dem Wildtyp.....	106
Abbildung 30: Verlauf der Wildtypplasmodien .....	111
Abbildung 31: Verlauf der Plasmodien der Mutanten PHO68, PHO48 und des Heterokaryonts PHO48+PHO68 .....	112
Abbildung 32: Korrelationsnetzwerk Einzelplasmodien- Wildtyp.....	115
Abbildung 33: Korrelationsnetzwerk Einzelplasmodien - Mutanten .....	117
Abbildung 34: Model der epigenetischen Landschaft für <i>Physarum polycephalum</i> nach der Theorie Waddington .....	128

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phylogenetische Klassifikation von <i>Physarum polycephalum</i> (nach NCBI-Taxonomy-Datenbank-ID:5791) .....	16
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Organismen .....	33
Tabelle 3: 1. Schritt der RT-PCR (halber Ansatz des Beckman Coulter-Protokolls) .....	44
Tabelle 4: RT-Temperaturschema.....	44
Tabelle 5: PCR-Pipettierschema (halber Ansatz des Beckman Coulter-Protokolls).....	45
Tabelle 6: PCR-Temperaturschema.....	45
Tabelle 7: Kapillarelektrophoretische Auftrennung .....	46
Tabelle 8: Übersicht der durchgeführten Experimente .....	51
Tabelle 9: Vergleich der Transkriptmengen inneres und äußeres Material .....	54
Tabelle 10: Vergleich zweier Probenahmetechniken unter Verwendung der Transkriptionsverläufe	59
Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test: Der Wildtyp .....	67
Tabelle 12: Vergleich zwischen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests .....	74
Tabelle 13: Mann-Whitney-U-Test für PHO68.....	83
Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test für PHO48.....	87
Tabelle 15: Vergleich Mutanten und Wildtyp mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests .....	93
Tabelle 16: Mann-Whitney-U-Tests für den Heterokaryonten PHO68+PHO48 .....	96
Tabelle 17: Vergleich der Genregulationsvorgänge zwischen den Mutanten und dem Heterokaryont PHO48+PHO68 .....	105
Tabelle 18: Vergleich von Wildtyp und Heterokaryont PHO48+PHO68 mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests .....	108
Tabelle 19: Zusammensetzung des Wachstumsmediums.....	137
Tabelle 20: Zusammensetzung des Sporulationsmediums.....	137
Tabelle 21: Zusammensetzung des Sporulationsagars.....	138
Tabelle 22: Lösungen .....	139
Tabelle 23: Sequenz der 35 Gene: Forward-Primer.....	140
Tabelle 24: Sequenz der 35 Gene: Reverse-Primer.....	141
Tabelle 25: Mann-Whitney-U-Test für Kontrollplasmodien.....	142
Tabelle 26: Rohdaten Homogenitätstest .....	142
Tabelle 27: Grenzwerte für Rohdaten Homogenitätstest .....	142
Tabelle 28: Rohdaten Homogenitätstest bezüglich Achtelproben .....	143



Tabelle 29: Grenzwerte für Homogenitätstest Achtelproben .....	143
Tabelle 30: Rohdaten für Teilungsversuch.....	143
Tabelle 31 Grenzwerte für Teilungsversuch .....	143
Tabelle 32: Rohdaten Wildtyp Kontrollen (7Tage hungern, nicht belichtet, Vers. Nr. 18-C).....	143
Tabelle 33: Grenzwerte Wildtyp Kontrollen (7Tage hungern, nicht belichtet, Vers. Nr. 18-C).....	143
Tabelle 34: Rohdaten Wildtyp nicht belichtet Versuch 17 .....	143
Tabelle 35: Grenzwerte Wildtyp nicht belichtet Versuch 17.....	143
Tabelle 36: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 15 min belichtet (Vers. Nr. 15-B) .....	143
Tabelle 37: Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 5 bzw. 15 min belichtet (Vers. Nr. 15-B) .....	143
Tabelle 38: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 2 min belichtet (Vers. Nr. 18-A).....	143
Tabelle 39: Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 2 min belichtet (Vers. Nr. 18-A).....	143
Tabelle 40: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet (Vers. Nr. 18-B) .....	143
Tabelle 41: Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet (Vers. Nr. 18-B).....	143
Tabelle 42: Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 10 min belichtet (Vers. Nr. 11-A) .....	143
Tabelle 43: Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 20 min belichtet (Vers. Nr. 11-B) .....	144
Tabelle 44: Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 30 min belichtet (Vers. Nr. 11-A) .....	144
Tabelle 45: Grenzwerte Wildtyp 6 Tage hungern, 10 bis 30 min belichtet.....	144
Tabelle 46: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet (Vers. Nr. 15-A).....	144
Tabelle 47: Rohdaten der Mutante PHO48 .....	144
Tabelle 48: Rohdaten der Mutante PHO68 .....	144
Tabelle 49: Rohdaten des Hetrokaryont PHO48+PHO68.....	144
Tabelle 50: Grenzwerte für die Mutanten PHO48+PHO68 und des Heterokaryont PHO48+PHO68 .....	144
Tabelle 51: Übersicht der 35 Gene und ihre Ähnlichkeiten (Rätzel und Marwan, 2015).....	145

## Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Bedeutung
m	[ ]	Anstieg
mA	[ ]	Mittlerer Achsenabschnitt
$M_{\text{fragx}}$	[ng]	Transkript Menge von Fragment x
mRNA	[ng]	Menge an Boten-RNA
n	[ ]	Schnittpunkt mit der y-Achse
$n_A$	[ ]	Anzahl der Proben in Gruppe A
$n_B$	[ ]	Anzahl der Proben in Gruppe B
$\text{normPeakfl}_{\text{fragx}}$	[ ]	Normierte Peakfläche von Fragment x
$R_A$	[ ]	Rangsumme von Gruppe A
RCF	[g]	Relative Zentrifugalkraft (englisch: <b>relative centrifugal force</b> )
$\text{real}M_{\text{frag}}$	[ ]	Reale Transkriptmenge
rpm	$\left[ \frac{1}{\text{min}} \right]$	Umdrehungszahl pro Minute (rotation per minute)
T	[K]	Absolute Temperatur
t	[s], [min],[h] oder [d]	Zeit
$U_A$	[ ]	Prüfgröße
$U_{\text{krit}}$	[ ]	Kritischer Wert der Prüfgröße
$U_o$	[ ]	Obere Schranke
V	[ $\mu$ l], [ml] oder [l]	Flüssigkeitsvolumen
$y'$	[ ]	Neuer y-Achsenabschnitt

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständiger Name
1n	Haploid (ein Chromosomensatz)
2n	Diploid (zwei Chromosomensätze)
Abb.	<b>Abbildung</b>
Abk.	<b>Abkürzung</b>
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>
bp	Basenpaare (englisch: <b>base pair</b> )
cDNA	Komplementäre DNA (englisch: <b>complementary Deoxyribonucleic Acid</b> )
DEPC-Wasser	Diethyldicarbonat versetztes Wasser (englisch: <b>Diethylpyrocarbonate water</b> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <b>Deoxyribonucleic Acid</b> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (englisch: <b>Ethylenediaminetetraacetic Acid</b> )
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
gad	<b>greater asexual differentiation</b>
GeXP	<b>Gene eXpression Profiler</b>
Glc	chemische Abkürzung für Glucose
KAN <sup>R</sup> RNA	Kanamycin Ribonukleinsäure (englisch: <b>Kanamycin Ribonucleic Acid</b> )
KOH	chemische Formel für Kaliumhydroxid
Milli-Q Wasser	Millipore Wasser = deionisiertes aufbereitetes Wasser
MMZ	<b>Magnesiumsulfat-heptahydrat + Mangan(II)-Chlorid-Dihydrat + Zinksulfat-Heptahydrat</b>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (englisch: <b>messenger Ribonucleic Acid</b> )
NaOH	chemische Formel für Natriumhydroxid
nt	<b>Nukleotid</b>
NTC	Negativkontrolle (englisch: <b>No Template Control</b> )
OTR	Sauerstofftransferrate (englisch: <b>Oxygen Transfer Rate</b> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse (englisch: <b>Principle Component Analysis</b> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <b>Polymerase Chain Reaction</b> )
PNR	Punkt ohne Wiederkehr (englisch: <b>Point of no Return</b> )
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <b>Ribonucleic Acid</b> )
RT	<b>Reverse Transkriptase</b>
simprof	Ähnlichkeitstest (englisch: <b>similarity profile test</b> )
TBE-Puffer	<b>TRIS-BORATE-EDTA -Puffer</b>

# 1. Einleitung

Jeder Organismus besteht aus Millionen verschiedenartiger Zellen. Alle differenzierten Zellen eines vielzelligen Organismus enthalten in ihrem Zellkern die gleichen Erbinformationen in Form der DNA und sind doch nicht identisch. Durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wird das Genexpressionsmuster der Zelle bestimmt. Individuelle Differenzen zwischen Zellen von klonalen Populationen wurden beim Prokaryonten bis hin zum Menschen beobachtet und sind höchstwahrscheinlich wichtig für die Anpassung an physiologische und pathologische Situationen (Junker und van Oudenaarden 2014, Loomis 2014). Die Heterogenität innerhalb einer Zellpopulation ist möglicherweise zum einen stochastisch in der Genexpression begründet, z. B. Differenzen durch erworbene Mutationen, oder zum anderen durch unterschiedliche Umwelteinflüsse. Individuelle Differenzen können aber auch Folge einer verschiedenartigen Entwicklung sein oder aus unterschiedlichen funktionalen Zuständen der Zellen hervorgehen (Junker und van Oudenaarden 2014). Experimentelle Beobachtungen und theoretische Betrachtungsweisen zeigten, dass Heterogenität in klonalen Populationen von genetisch gleichartigen Zellen durch die dynamische Variationsmöglichkeit in regulatorischen Netzwerken hervorgehen und so das intrinsische Phänomen des komplexen Zellsystems erhöhen kann (Huang und Ingber 2006, Huang 2011, Zhou und Huang 2011). Diese Art der Betrachtung eines dynamischen Systems auf Grundlage der Zelldifferenzierung enthält Ansätze für ein besseres Verständnis der Vorgänge in einer Zelle und deren Manipulationsmöglichkeiten. Es suggeriert, dass Zellen unterschiedliche Zustände auf vielen verschiedenen Wegen erlangen können, z.B. durch die kurzzeitige Aktivität verschiedener Gene oder Proteine (Graf und Enver 2009; Zhou und Huang 2011). Obwohl all diese theoretischen Vorhersagen bezüglich der beschriebenen Phänomene auf allgemein gut studierten (bio-) chemischen Reaktionskinetiken basieren (Huang und Ingber 2006, Huang 2011 Krumsiek et al. 2011), und die Gültigkeit dieser Konzepte durch experimentelle Resultate unterstützt werden (Huang et al. 2005, Krumsiek et al. 2011), fehlen die direkten und systematischen experimentellen Beweise für die genannten Vielfältigkeiten einer Zelle bezüglich ihrer Reaktionsdynamik zwischen interagierenden Molekülen in Einzelzellen.

Eine Möglichkeit, die Kinetiken und die Regulationsmechanismen der Genexpression, welche die Differenzierung der Zelle (wie das Ausbilden von Sporen) steuern, zu

erforschen, sind Genexpressionsanalysen (Logan et al. 2009). Um die Genexpression einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt der Zellentwicklung zu untersuchen, wird bei den etablierten Standardverfahren die Boten-Ribonukleinsäure (englisch: messenger Ribonucleic Acid= mRNA) aus Zellpopulationen isoliert und analysiert. Anschließend wird die RNA vereinigt, um statistische Aussagen über die Genexpression zu treffen (Campbell 2003). Der Nachteil von Populationsmessungen ist jedoch, dass hiermit nur mittlere Änderungen der Genexpression analysierbar sind und sich individuelle Unterschiede überlagern können, sodass im ungünstigen Fall sich gegenregulierende Aktionen (d.h. dass ein Gen in der einen Zelle hoch- und in der anderen Zelle runterreguliert wird) gegenseitig neutralisieren (Campbell et al. 2003, Hayashi et al. 2007).

Hoffmann (2012) zeigte am Beispiel von *Physarum polycephalum*, dass Genexpressionsanalysen an einzelnen plasmodialen Zellen durchführbar sind und dabei bis zu 35 Gene parallel analysiert werden können. Möglich ist dies mithilfe einer kombinierten RT-PCR und einer anschließenden kapillarelektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente (Rai et al. 2009, Hayashi et al. 2007, Rothe et al. 2005). Zur Bestimmung der Genexpressionskinetiken sind wiederholte Messungen an einem Einzelplasmodium erforderlich, die den Entwicklungsverlauf vom hungernden Plasmodium bis hin zum sporulierten Plasmodium aufzeigen.

Derartige Einzelzellanalysen erlauben die direkte Identifizierung von Genen, die eine Expressionsveränderung vollziehen sowie die Analyse von paarweisen Korrelationen zwischen der zeitlichen Veränderung des Expressionsniveaus einzelner Gene, die in Bezug auf veränderte Umweltbedingungen gemeinsam reguliert werden (Rätzel 2013).

Damit ergeben sich 2 fundamentale Fragestellungen, die im Laufe dieser Arbeit beantwortet werden sollten:

1. Gibt es individuelle Differenzen in der Genexpression beim Vergleich der Einzelzellanalysen während des Differenzierungsvorganges eines hungernden Plasmodiums zu einem sporulierten Plasmodium, und welchen Einfluss üben verschiedene Umweltbedingungen auf die Kinetiken aus?
2. Haben individuelle Differenzen in den Genexpressionsdaten einen Einfluss auf das Muster von co-regulierten Genen, und welche Bedeutung liegt dem zu Grunde?

Zur Beantwortung der ersten Frage, wie ähnlich die Expressionskinetik von Markergenen zwischen den individuellen Zellen auf dem Weg zur Sporulation sind, werden alle Plasmodien dem dunkelroten Lichtimpuls ausreichend lange ausgesetzt, sodass am Ende alle Plasmodien sporulieren. Die Variabilität von Plasmodium zu Plasmodium soll zum einen über deren Trajektorienverlauf charakterisiert werden sowie über die Identifizierung von Hoch- und runterregulierten Genen, damit kann gleichzeitig überprüft werden, ob entgegengesetzte Regulationen in bestimmten Genen stattfinden.

Zur Klärung des Einflusses von variierenden Umweltbedingungen auf das Expressionsverhalten von Genen werden unterschiedliche äußere Einflüsse analysiert. Dazu zählen Variationen in der Hungerphasenlänge sowie in der Intensität des dunkelroten Lichtimpulses.

Mithilfe von Korrelationsanalysen der auffälligen Markergene aus vorherigen Forschungsarbeiten (Rätzel 2013) sollen die co-regulierten Muster erstellt werden. Durch die Analyse der Trajektorienverläufe der Einzelzellen bei gleichzeitiger Annahme, dass der Fluss von Informationen innerhalb einer Zelle unterschiedliche Wege durch das regulatorische Netzwerk durchlaufen kann, sowie durch systematische Evaluierungen von co-regulierten Genen und deren Variabilität in den individuellen Zellen kann das zu grundlegende regulatorische Netzwerk erstellt werden.

Die Bedeutung dieser Arbeit liegt in der möglichen Schlussfolgerung, dass sporulierte Zellen in individuell unterschiedlichen multistationären Zuständen verweilen können und dass der Charakter der Zelle durch veränderte Umweltbedingungen umorganisiert werden kann. Diese Subzustände können eine Folge alternativer Wege durch das regulatorische Netzwerk sein. Mechanistische Schlussfolgerungen, auch im Hinblick auf die Analyse der Interaktionsnetzwerke, verlangen eine Charakterisierung und eine systematische Darstellung der Zeitserien von Einzelplasmodien. Eigene Vorarbeiten zeigten bereits (Rätzel 2013), dass Mutanten, die in ihrer Sporulationsfähigkeit verändert sind, sich auch in der differentiellen Regulation der Genexpression als Antwort auf einen Dunkelrotimpuls vom Wildtyp unterscheiden. Die paarweisen Korrelationen hängen höchstwahrscheinlich von mindestens einem gemeinsamen Transkriptionsfaktor ab. Dieser sorgt dafür, dass 2 Gene zwischen 2 oder mehreren aufeinander folgenden Zeitpunkten im gleichen Verhältnis hoch- oder runterreguliert werden. Mutationen, die die Sporulationsfähigkeit von Zellen durch die Veränderungen im Regulationsnetzwerk der Sporulation bewirken, führen dann zu einem modifizierten dynamischen Verhalten des veränderten Netzwerkes und

nicht nur zu einer einfachen Blockade des Signalfusses. Dies haben die erwähnten Vorarbeiten klar gezeigt (Rätzel et al. 2013).

Für die geplanten Quantifizierungen des dynamischen Systems musste zunächst die Etablierung einer geeigneten Methode erfolgen, die ein Zeitserienexperiment an Einzelzellen ermöglicht.

Die Bewertung, inwieweit es individuelle Unterschiede zwischen den Plasmodien gibt, erfolgte über die Charakterisierung und den Vergleich von sporulierten sowie nicht sporulierten Wildtypplasmodien, Mutanten und Fusionsplasmodien unter Anwendung von Clusterverfahren und dem Mann-Whitney-U-Test.

Zur Klärung, ob Plasmodien divergierende Trajektorien durchlaufen und somit dem Einfluss von Attraktoren unterliegen, und damit gleichzeitig die Theorie von Waddington (1957) und Macarthur (2009) bestätigen, eignet sich die Hauptkomponentenanalyse (englisch: **P**ro**u**n**c**ipal **C**omponent **A**nalysis = PCA).

Auf Grundlage aller gewonnenen Erkenntnisse über das Verhalten von Einzelplasmodien in Bezug auf das Genexpressionsniveau lässt sich ein Reaktionsnetzwerk mit den ausgewählten Genen erstellen, wodurch Aussagen über den mechanistischen Hintergrund möglich sind. Alle Daten zusammen betrachtet ermöglicht die Darstellung der Quasipotential-Landschaft, die die kinetischen Eigenschaften des genregulatorischen Netzwerkes widerspiegelt.

Kapitel 2 zeigt die theoretischen Hintergründe der verwendeten Methoden und Organismen. Die Methodik und die notwendigen Materialien für die einzelnen Kultivierungs- und Analysetechniken sind aus den darauffolgenden Kapiteln 3 und 4 zu entnehmen. Die Darstellung der Ergebnisse aus den einzelnen Versuchsreihen erfolgt in Kapitel 5. Im letzten Kapitel werden die Resultate diskutiert und es wird ein Ausblick auf nachfolgende Experimente gegeben.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Der Organismus *Physarum polycephalum*

#### 2.1.1 Phylogenetische Einteilung

Der Einzeller *Physarum polycephalum* wurde von dem US-amerikanischen Botaniker Lewis David von Schweinitz (1780–1834) erstmals 1822 erwähnt und ist ein Vertreter der Myxomycota, der echten Schleimpilze (Baldauf und Doolittle 1997). Phänotypisch besitzt die Riesenzelle Übereinstimmungen mit den Pilzen und den Protozoen (Brandmaier 2005) Stammesgeschichtlich gehört *Physarum* zu den Amoebozoen, einer Schwestergruppe der Opisthokonten (Baldauf & Doolittle, 1997; Glöckner et al.). Die Tabelle 1 zeigt die phylogenetische Klassifikation von *Physarum Polycephalum*.

Tabelle 1: Phylogenetische Klassifikation von *Physarum polycephalum* (nach NCBI-Taxonomy-Datenbank-ID:5791)

Abteilung	Myxomycota
Klasse	Myxogastria
Unterklasse	Myxogastromycetidae
Ordnung	Physarales
Familie	Physaraceae
Gattung	<i>Physarum</i>
Art	<i>Physarum polycephalum</i>

#### 2.1.2 Der Lebenszyklus

*Physarum polycephalum* ist vorrangig auf feuchten Waldböden, morschem Holz oder auf Pflanzenresten vorhanden und durch seine gelbe Färbung auffällig. Der Eukaryont ernährt sich von toten und lebenden organischen Materialien (Hu 1985, Daniel und Rusch 1961, Blumenthal et al. 2002, Starostzik und Marwan 1995, Burland et al. 1993).

Der Lebenszyklus, Abbildung 1, stellt 2 vegetative Lebensformen dar: die einkernige Amöbe und das vielkernige Plasmodium. Freigesetzte Sporen aus dem reifen Sporangium entwickeln sich zu Amöben. Diese Amöben sind zur Phagozytose befähigte Zellen und erzeugen durch Mitose identische Tochterzellen. Diese Zellzyklusphase dauert ca. 8h. Fusionieren 2 Amöben unterschiedlichen Paarungstyps, so entsteht eine Zygote. Unter



synchroner Kernteilung (Gutttes und Gutttes 1961, Rusch et al. 1966) ohne Zellteilung und permanenter Nahrungsaufnahme wächst die Zygote zu einer Riesenzelle mit  $10^7$  bis  $10^8$  oder je nach Zellgröße auch mehr Zellkernen, dem Makroplasmodium, heran (Gutttes und Gutttes 1961, Rusch et al. 1966, Marwan 2001, Sachsenmaier et al. 1976). Folgt nun eine Hungerphase über einen längeren Zeitraum, kann der Prozess der Sporulation durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht oder durch Hitze induziert werden. Dieser Vorgang ist jedoch durch Zugabe von Nahrung bis vor dem Umkehrpunkt (englisch: *Point of no return* = PNR) reversibel. Nach dem Überschreiten des PNR kann die Sporulation nicht mehr verhindert werden, man sagt, die Zellen sind zur Sporulation determiniert, und das gesamte Zellplasma mit den darin enthaltenen Zellkernen formt sich irreversibel zum Fruchtkörper (Sporangium). Durch Meiose entstehen erneut einkernige Sporen, womit sich der Kreislauf schließt (Gutttes et al. 1961, Putzer et al. 1984, Sauer et al. 1969). Eine weitere Überlebensstrategie des Organismus ist das Erzeugen von Dauerstadien, welche nicht abgebildet sind, da sie in dieser Arbeit keine Rolle spielen. Dazu gehören zum einen die Bildung von Flagellaten, wenn eine Amöbe mit Wasser in Kontakt kommt, und zum anderen die Entstehung von Zysten. Beide Morphogenesen sind reversibel (Gutttes et al. 1961).

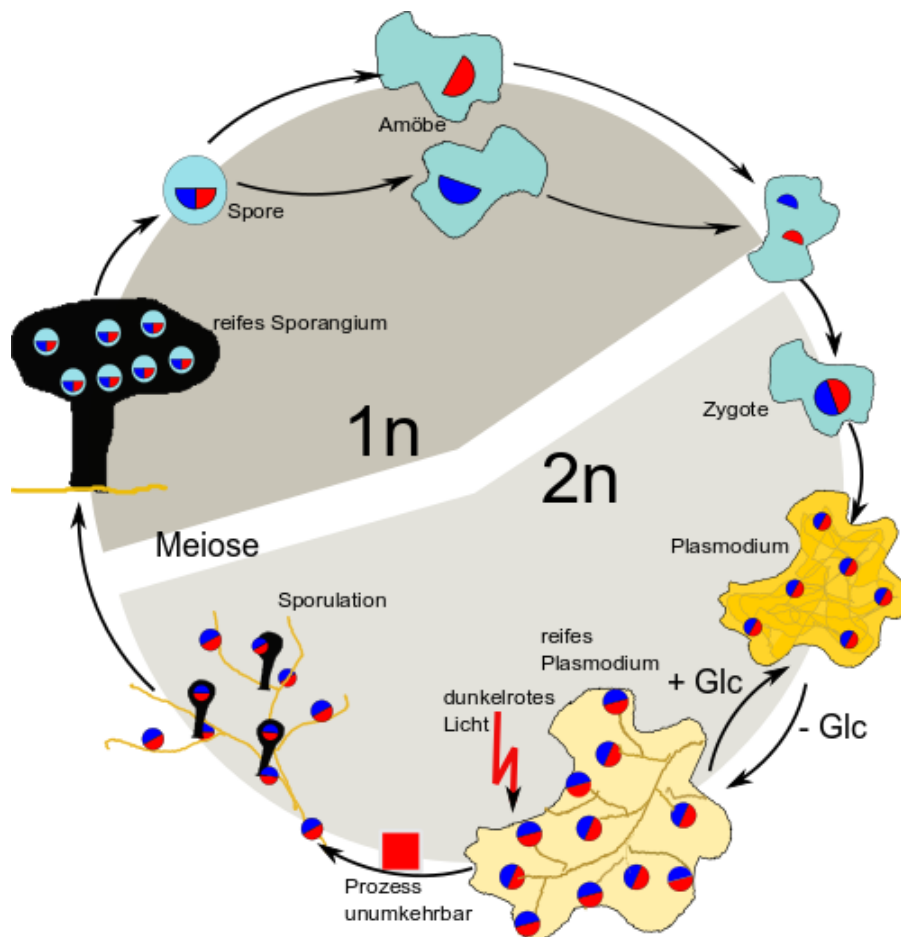


Abbildung 1: Lebenszyklus *Physarum polycephalum*

Dargestellt sind die beiden vegetativen Lebensformen von *Physarum polycephalum* und der Weg der Sporulation

### 2.1.3 *Physarum polycephalum*: Verwendung als Modellorganismus

Zellen befinden sich in den meisten vielzelligen Organismen in unterschiedlichen Stadien des Wachstums und der Entwicklung. Dies erschwert die Analyse von Genen, welche die Entwicklung bestimmter Zellen steuern (Sauer 1969). Anhand von Modellorganismen, wie Pilzen, Bakterien, Pflanzen und Tieren, können grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden, die oft auf andere Organismen übertragbar sind. Der Vorteil von einzelligen Modellorganismen ist die oft unkomplizierte und kostengünstige Haltung sowie die kurze Generationszeit (Judd 2001). Für genetische Experimente greift man gerne auf einfache Einzeller zurück, wie z. B. *Physarum polycephalum* (Judd 2001).

*Physarum polycephalum* überzeugt durch seine kurze Generationszeit von ca. 8h sowie

durch die Möglichkeit, in Gegenwart von ausreichend Nahrung zu einer beliebigen Größe heranzuwachsen (Baldauf 1999, Burland et al. 1993). Hinzu kommt, dass alle Zellkerne eines Plasmodiums synchron reguliert sind, sodass lediglich eine Zelle anstelle eines komplexen Zellsystems analysiert werden muss. Ein weiterer Vorteil liegt in der Einfachheit der Manipulation von Plasmodien (Marwan 2001). Dies erlaubt die Herstellung spezifischer Mutanten durch Zellfusion oder mithilfe von rekombinanter DNA (Barrantes 2010). Die synchrone Zellteilung im reifen Plasmodium (Rusch et al. 1966) und die Feststellung, dass eine makroskopische Probenahme ausführbar ist, ohne den Differenzierungsprozess zu unterbrechen (Marwan 2005), macht *Physarum polycephalum* zu einem besonders geeigneten Modellorganismus, an dem Zellzyklus-, zelluläre Reprogrammierungs- und Zelldifferenzierungsstudien durchgeführt werden können (Hildebrandt 1986).

Der Lebenszyklus, der in dieser Arbeit verwendeten Plasmodien (Abbildung 2), weicht vom natürlichen Lebenszyklus (Abbildung 1) ab. Die verwendeten Riesenzellen tragen die temperatursensitive *gad* (greater asexual differentiation) Ah-Mutation (Starostzik und Marwan 1998, Marwan 2003). Die *gad*Ah-Mutation ermöglicht die Entwicklung eines Plasmodiums direkt aus einer einkernigen Amöbe, ohne dass diese sich zuvor mit einer anderen Amöbe paaren muss. Haploide Plasmodien, die aus einer haploiden Amöbe entstanden sind, verhalten sich identisch in Bezug auf die Sporulation zu ihrem natürlichen Pendant. Durch einen Shift von 24°C auf 30°C erfolgt eine Unterdrückung dieser sogenannten apogamen (ungeschlechtlichen) Entwicklung, und die Amöbe durchläuft den natürlichen Entwicklungszyklus (Abbildung 1) mit der haploiden und diploiden Phase, die aber bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellmaterialien keine Rolle spielt.

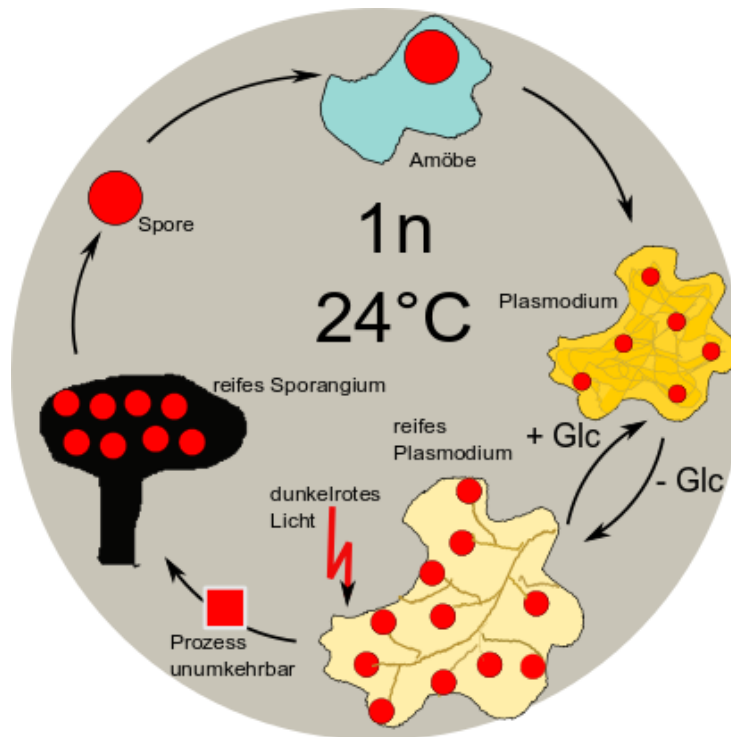


Abbildung 2: Lebenszyklus mit *gadAh*-Mutation

Die Amöben bilden Plasmodien ohne vorherige Paarung mit einer weiteren Amöbe unter anschließender Ausbildung einer einkernigen diploiden Zygote durch Karyogamie. Der Prozess der Sporulation verläuft wie im diploiden Entwicklungszyklus Abbildung 1.

## 2.1.4 Die Sporulation und ihre sensorische Kontrolle

Eine Überlebensstrategie von *Physarum polycephalum* ist die Ausbildung von Sporen. Diese transportieren das Erbmateriale in einen neuen Lebensraum mit potentiell besseren Lebensbedingungen und sind Dauerstadien, die ungünstige Umweltbedingungen (Hunger, Trockenzeit, Hitze, Kälte, etc.) überstehen können.

Die Sporulation kann im Labor nach Kultivierung im Dunkeln und einer anschließenden Hungerphase von mindestens 5 Tagen experimentell ausgelöst werden (Golderer et al. 2001). Nach dieser Periode beginnt das Zytoplasma ein Netz aus dünnen Adern zu formen (Renzel et al. 2000). Die Auslösung der Sporulation bei einem sporulationskompetenten Plasmodium kann durch die Anregung des Blaulichtrezeptors, durch einen Hitzeschock oder durch Photoaktivierung des Phytochroms mit dunkelrotem Licht erfolgen (Starostzik und Marwan 1995) (siehe Abbildung 3). Die Initiierung des Vorganges der Sporulation erfolgt durch die Aktivierung eines morphologischen Signals, die durch eine der genannten Perturbationen ausgelöst wird (Marwan 2003).

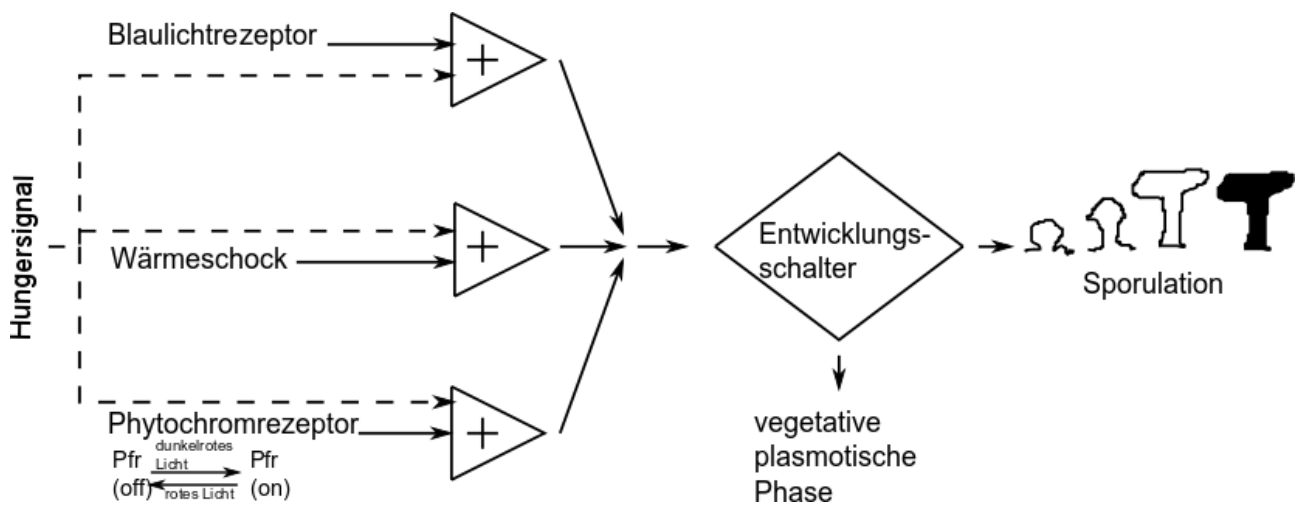


Abbildung 3: Minimalmodell der sensorischen Kontrolle der Sporulation nach Starostzik und Marwan (2002)

Erfolgte eine Induktion der Sporulation durch die Aktivierung eines in Abbildung 3 gezeigten Rezeptors, endet das Wachstum des kompetenten Plasmodiums. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Riesenzelle in der prämorphogenetischen Phase, die ca. 10h dauert (Abbildung 4). In diesem Stadium vollzieht das Plasmodium noch keine morphogenetischen Veränderungen. Durch Nahrungszufuhr vor dem sogenannten Point of no return (PNR), nach dessen Überschreitung die Induktion zur Sporulation irreversibel wird und der bei ca. 5h nach Lichtinduktion liegt, kommt es zur Einstellung des Sporulationsprozesses, und das Wachstum der Riesenzelle setzt erneut ein (Marwan 2002). Eine Nahrungszufuhr nach dem PNR ist zwecklos, da die Zellen irreversibel auf die Sporulation eingestellt sind. 10h nach der Induktion startet die zweite Phase der Sporulation, die Morphogenese (Abbildung 4). Charakteristisch für dieses Stadium sind die Verdickung der Adern und die Aufspaltung in knotenartige Strukturen (sog. Noduli). Die Knoten formen anschließend Fruchtkörper aus, aus denen durch Meiose das Sporangium mit haploiden Sporen hervorgeht (Starostzik und Marwan 1998, Marwan 2001).

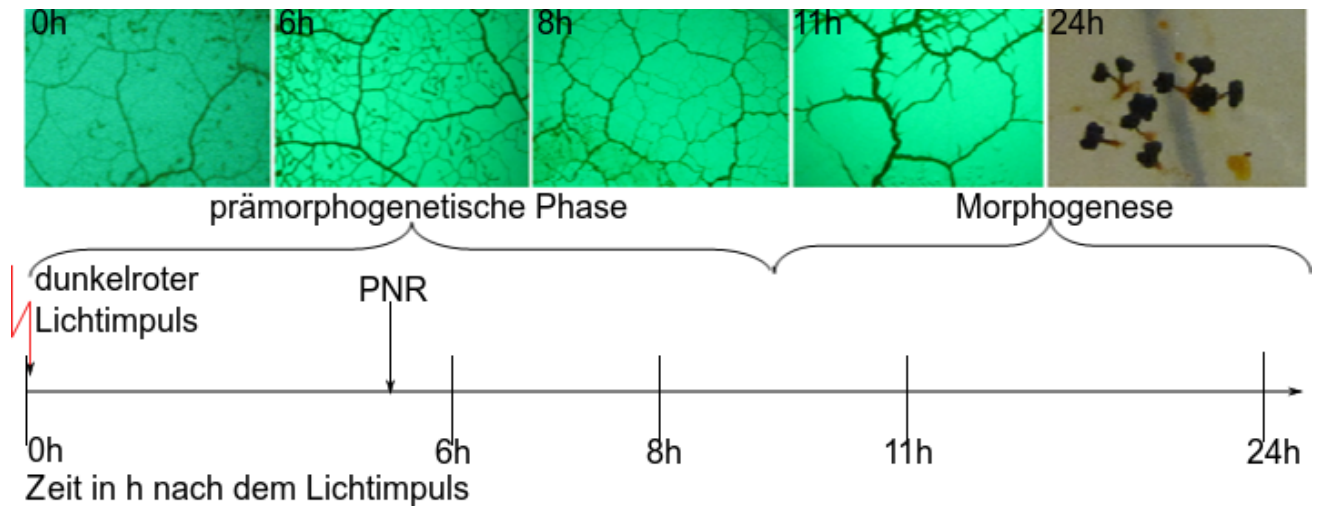


Abbildung 4: zeitlicher Verlauf der Sporulation (Vergleich Starostzik und Marwan 2002)

Abgebildet ist der Entwicklungsprozess der Sporulation vom Modellorganismus *Physarum polycephalum* der Riesenzelle. Startpunkt ist die unbelichtete kompetente Zelle. Ein Lichtimpuls nach der ersten Probenahme mit dunkelrotem Licht induziert den Prozess der Sporulation. Die Induktion ist bis zum Umkehrpunkt (PNR) reversibel. Nach 24h sind Sporen auf der Platte zu sehen.

## 2.1.5 Mutanten

Wie bereits erwähnt, fungiert *Physarum polycephalum* in dieser Arbeit als Modellorganismus zur Aufklärung der Zelldifferenzierungsprozesse auf molekularer Ebene. Dies soll über die Analyse des Ablaufes der Sporulation stattfinden. Die Abbildung des Sporulationsprozesses im Labor erfolgt durch das Kultivieren von Plasmodien auf Spo-Platten und anschließender Belichtung mit dunkelrotem Licht. Durch chemische Mutagenese von Amöben des Stammes #WT31, die *gadAh*-positiv sind, mit dem Mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) wurden verschiedene Mutanten erzeugt, die in der sensorischen Kontrolle der Sporulation verändert sind (Marwan 2003, Marwan und Starostzik 2002, Sujatha et al. 2005). Diese sind entweder sporulationsnegativ, in ihrer Sporulationsmöglichkeit stark eingeschränkt oder sporulieren nach Hungern spontan, d. h. ohne Belichtung oder Hitzeschock (Starostzik und Marwan 1998, Rätzel et al. 2013).

## **2.2 Molekularbiologische Grundlagen**

### **2.2.1 Genexpressionsanalysen mit dem GenomeLab™ GeXP-System**

Das US-amerikanische Biotechnologie-Unternehmen Beckman Coulter entwickelte zusammen mit Althea Technologies Inc. (San Diego, USA) das in dieser Arbeit verwendete Gene eXpression Profiling-System (GeXP). Dieses System dient u.a. der Geneexpressionsanalyse und basiert auf einer RT-PCR-Methode mit einer anschließenden Kapillarelektrophorese und bietet die Möglichkeit, die Genexpressionsanalyse an einer Vielzahl von Genen einer Probe durchzuführen (Enriquez-Schäfer 2005). Der Vorteil liegt in der Parallelanalyse einer hohen Probenzahl bei gleichzeitiger Analyse von bis zu 35 Genen einer Zelle (Hayashi et al. 2007). Die GeXP-Analyse besteht zunächst aus den bekannten Schritten der RT-PCR: Synthese der cDNA mithilfe der reversen Transkriptase und einer anschließenden PCR zur Amplifizierung der cDNA. Dann folgt der neue Schritt mit der kapillarelektrophoretischen Trennung der PCR-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe im Kapillar-Sequencer, dem CEQ™800 der Firma Beckman Coulter (Enriquez-Schäfer 2005) und der anschließenden Fragmentanalyse.

#### **2.2.2.1 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription (RT) hat als Ziel, gering konzentrierte mRNA mithilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase in cDNA umzuschreiben. Das Enzym reverse Transkriptase, eine DNA-abhängige Polymerase, ist notwendig für die Transkription der mRNA in die cDNA (Berg et al. 2003). Die verwendeten Primer sind genspezifisch und tragen eine Taq-Sequenz, welche für die weitere Analyse wichtig ist (siehe Abbildung 6). Für die Multiplexanalyse werden für die zu analysierenden Gene alle Rückwärtsprimer gemeinsam zugegeben. Die eingesetzte Konzentration der jeweiligen Primer muss über Vorexperimente bestimmt werden. Die Konzentration ist so einzustellen, dass alle zu analysierenden Gene in ähnlichen Mengen vorliegen (Hoffmann et al. 2012). Sobald sich die Reverseprimer an die entsprechende mRNA-Matrize angelagert haben, katalysiert die RT das Umschreiben der RNA in eine DNA (Abbildung 5). Durch die spezifischen Primer werden lediglich RNA-Transkripte transkribiert, für die auch ein entsprechender Primer vorhanden ist. Als Resultat der RT sind cDNA-Fragmente von verschiedenen Genen

entstanden, die unterschiedliche Längen haben und einen Universal Taq am 5'-Ende (Rothe et al. 2005).

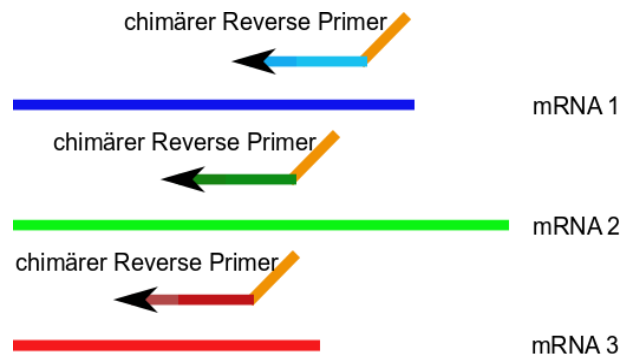


Abbildung 5: Reverse Transkriptase (Enriquez-Schäfer 2005)

Erzeugung der cDNA aus der mRNA mithilfe chimärer Rückwärtsprimer (chimäre = spezifische Reverse Primer) und der reversen Transkriptase.

### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die Amplifizierung der gewonnenen cDNA aus der RT (2.4.2.1) unter Zugabe der spezifischen Vorwärtsprimer und eines fluoreszenzmarkierten Universalprimers. Die PCR beginnt mit der Denaturierung der cDNA. Mithilfe der DNA-Taq-Polymerase und den angelagerten Primern wird die einzelsträngige DNA-Matrize in mehreren Reaktionsschritten kopiert. Der Zyklus, welcher aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung besteht, läuft 35-mal ab (Hayashi et al. 2007). Dabei ist zu berücksichtigen, dass ab dem dritten Zyklus der Prozess ausschließlich über die Universalprimer vonstattengeht, da diese im Überschuss vorliegen und somit für das Gelingen dieser RT-PCR verantwortlich sind (Enrique-Schäfer 2005). In den ersten 2 Zyklen binden Vorwärts- und Rückwärtsprimer spezifisch an die entsprechenden DNA-Abschnitte an (Abbildung 6A). Die Universalprimer lagern sich gleichzeitig an die Stränge an, die bereits den Universal-Taq tragen. Ab dem dritten Zyklus sind ausreichend viele DNA-Stränge mit dem Universal-Taq vorhanden, wodurch die Amplifizierung allein über die Universalprimer abläuft (Abbildung 7B). Dies ist unabdingbar für die Gewährleistung, alle Fragmente mit der gleichen Effizienz zu amplifizieren. Damit bleibt das ursprüngliche Genverhältnis erhalten (Rothe et al. 2005, Beckman Coulter 2009). Am Ende der 35 Zyklen ist eine Gesamtheit aller Genvariationen aus Kopien der zu



untersuchenden Gene entstanden. Jede Kopie trägt am 5'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung für die spätere Detektion (Abbildung 6C) (Beckman Coulter 2003).

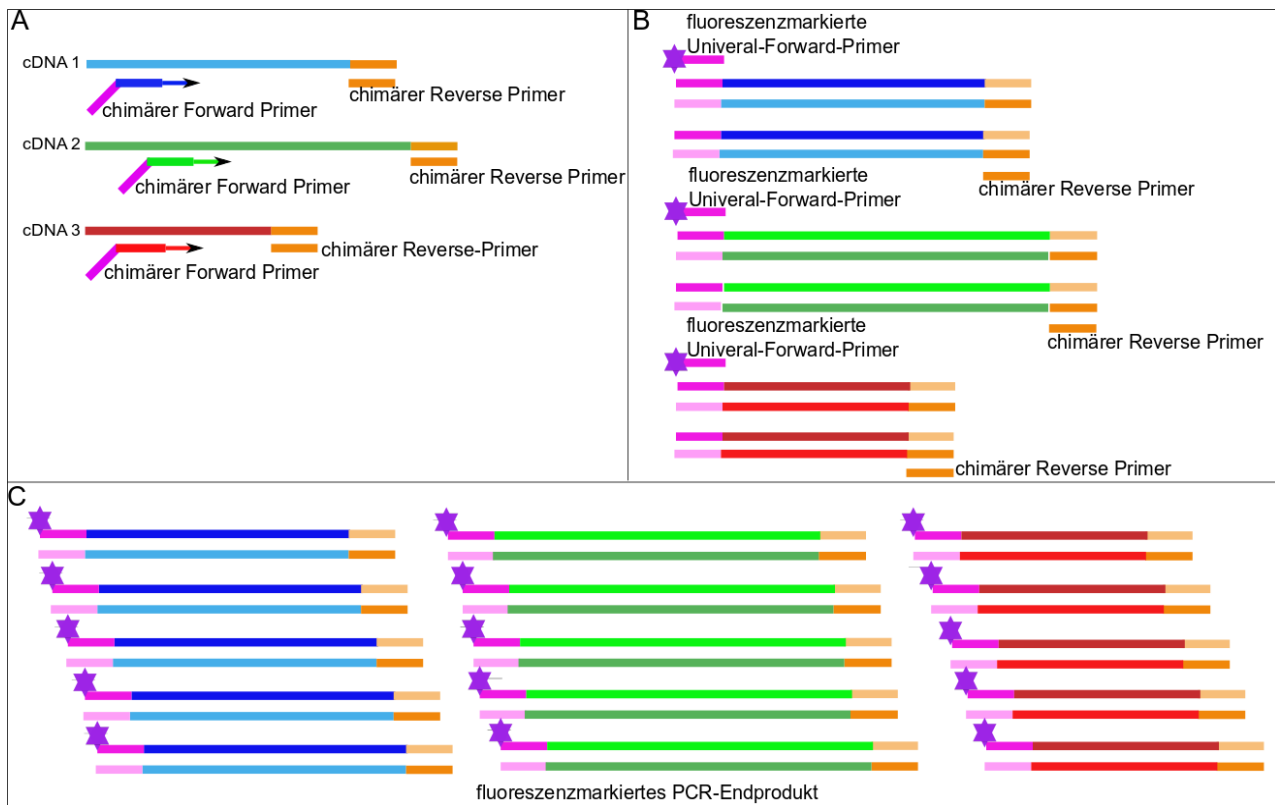


Abbildung 6: Polymerase-Kettenreaktion (Enriques-Schäfer 2005 und Hayashi 2007)

A: PCR ab erstem Zyklus nach Zugabe der chimären (spezifischen) Vorwärtsprimer (chimäre Forward Primer), der Universalvorwärtsprimer (Universal-Forward-Primer) und der DNA-Polymerase. B: Nach 2 bis 3 Zyklen läuft die PCR nur über die Universalvorwärtsprimer. C: Das fluoreszenzmarkierte PCR-Produkt

### 2.2.2.3 Kapillarelektrophoretische Trennung

Die entstandenen fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte werden mithilfe einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt, detektiert und zum Schluss quantifiziert (Rai et al. 2009, Hayashi 2007). Das analytische präparative Trennverfahren (Kapillarsequenzier = CEQ™800 der Firma Beckman), welches auf der Wanderung von geladenen Teilchen beruht, steht dazu zur Verfügung. Moleküle wandern unterschiedlich schnell auf Grund ihrer Größe. Damit erreichen die Moleküle den Detektor am Ende des Gels zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Kleine Moleküle gelangen schneller zum Detektor als große Fragmente. In einem Elektropherogramm erfolgt die Darstellung der detektierten Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit, in der eine Subpopulation der

aufzutrennenden Moleküle den Detektor passiert. Diese Zeit ist abhängig von der Wanderungsgeschwindigkeit der aufzutrennenden Fragmente. Hierbei entspricht die Peakhöhe, die für die Berechnung der Genexpressionsstärke benötigt wird, der Fluoreszenzintensität. Dabei korreliert die Peakfläche mit der eingesetzten Produktmenge. Das Elektropherogramm entspricht einem reproduzierbaren eindeutigen Fingerprint für jede Probe (Rai et al. 2009). Während der Separation wird neben der Peakhöhe auch die Fragmentgröße gemessen, die es ermöglicht, die Intensität von zahlreichen Fragmenten über eine Verhältnisrechnung zum Standardfragment Kanamycin-RNA (Kan<sup>R</sup>RNA) zu bestimmen. Zur Identifikation der Fragmentlängen dient ein DNA-Standard. Dieser Standard enthält 22 DNA-Moleküle unterschiedlicher Basenlängen. Das kleinste DNA-Fragment besitzt 60 Nukleotide und das größte DNA-Molekül 420 Nukleotide. Aus den Eluationszeiten dieser Standardfragmente kann mithilfe der CEQ<sup>TM</sup>800-Software und über die Wanderungszeit eines Fragments die Fragmentlänge berechnet werden. Als interne Kontrolle zur Überprüfung der RT-PCR dient die in jeder Probe mitgeführte Kan<sup>R</sup>RNA, die eine Fragmentlänge von 324 Basen hat und im weiteren Verlauf als Normierungsfaktor für alle Fragmente fungiert (Rai et al. 2009). Der interne Standard ermöglicht einen quantitativen Vergleich der getrennten Fragmente über verschiedene Kapillaren sowie den Vergleich verschiedener Transkripte innerhalb einer Kapillare (Hayashi et al. 2007).

## **2.3 Auswertungsmethoden**

### **2.3.1 Ermittlung der relativen Genexpressionswerte**

Nach der kapillarelektrophoretischen Auftrennung mithilfe des GeXPs können die relativen Expressionswerte ermittelt werden. Für die Berechnung der Transkriptmengen ist die Erstellung einer Standardkurve essentiell. Die eigentliche Bestimmung der Expressionsniveaus aus den Peakprofilen erfolgt über arbeitsgruppeninterne Skripte, deren Funktionsprinzip in Kapitel 3.4.1 erläutert ist.

### **2.3.2 Multivariate Verfahren**

Für eine erste Trendanalyse aller Daten eines Versuches, ohne vorab eine Einschränkung vorzunehmen, eignen sich multivariate Verfahren. Das Zusammenspiel mehrdimensionaler Daten (Probenahmezeitpunkte, Einzelplasmodien und die Menge der relativen mRNA) steht hierbei im Vordergrund. Die Ergebnisse sollen am Ende klar und verständlich dargestellt und relevante Daten herausgefiltert werden.

Es gibt eine Vielzahl von multivariaten Verfahren. Eine Gruppe bilden strukturentdeckende Methoden/Klassifikationsverfahren, zu denen die Clusteranalyse und die Faktoranalyse gehören (Backhaus et al. 2003).

Der Unterschied zwischen beiden Methoden liegt in der Herangehensweise, um die vielen Informationen zu strukturieren und zu minimieren. Während die Clusteranalyse die Daten/Objekte entsprechend ihrer Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit zusammenfügt, bündelt die Faktoranalyse die Variablen für eine Reduktion der Merkmale (Backhaus et al. 2013).

#### **2.3.2.1 Hauptkomponentenanalyse**

Die große Datenmenge soll mithilfe der Hauptkomponentenanalyse (englisch: **P**inciple **c**omponent **a**nalysis = PCA) ohne große Informationsverluste in einem Koordinatenraum dargestellt werden, der möglichst nur eine einzige Ebene besitzt. Ziel ist eine Dimensionsreduzierung zur Filterung von Rauschen. Dazu nutzt das Verfahren die Eigenwertzerlegung (Backhaus et al. 2003). Dabei werden die ursprünglichen Daten

orthogonal transformiert in eine neue Menge nichtkorrelierter Daten. Die Erstellung der Hauptkomponenten erfolgt in absteigender Bedeutung. Somit sind die Hauptkomponenten Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen. Nach der Durchführung der PCA sind Variablen (Probenahmezeitpunkt, Einzelplasmodien) und Objekte (Genexpression der relativen mRNA-Menge) in einem Plot dargestellt. Die Anzahl der Dimensionen entspricht im Maximalfall der Anzahl der Variablen (Backhaus et al. 2003). Als Distanzmaß ist die euklidische Distanz hinterlegt.

### **2.3.2.2 Hierarchische Clusteranalyse**

Häufig lassen sich aber nicht alle wichtigen Informationen mittels dieser euklidischen Distanz in einer Ebene darstellen. Daher sollten beide Techniken der multivariaten Verfahren in Kombination Anwendung finden. So werden die Objekte beim hierarchischen Clusterverfahren nach dem agglomerativen Verfahren bezüglich ihres Abstandes zueinander sortiert. Zusammengefasst und in Form eines Baumdiagramms graphisch dargestellt, sind jeweils die beiden Objekte, die den kleinsten Abstand zueinander haben (Backhaus et al. 2003, Langfelder et al. 2008).

### **2.3.3 Signifikanztest – „Mann-Whitney-U-Test“**

Zur Überprüfung, ob signifikante Änderungen der relativen mRNA-Menge der spezifischen Gene vorliegen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Methode ist der Homogenitätstest „Mann-Whitney-U-Test“. Dieser parameterfreie Test (Modellstruktur ist nicht a priori festgelegt und wird aus den Daten bestimmt) basiert zum einen auf unabhängigen Daten und setzt zum anderen voraus, dass die zu vergleichenden Stichproben gleich verteilt sind (Mann und Whitney, 1947). Wird die Voraussetzung auf Normalverteilung zu stark verletzt und handelt es sich gleichzeitig um intervallskalierte Merkmale, so findet der Mann-Whitney-U-Test Anwendung (Mann und Whitney, 1947).

### **2.3.4 Korrelationsanalyse**

Zur Analyse, ob Transkriptionsfaktoren auf verschiedene Gene einwirken, eignet sich die Pearson-Korrelation. Dieser Korrelationskoeffizient ist ein dimensionsloses Maß und gibt an, wie stark der lineare Zusammenhang zwischen 2 intervallskalierten Merkmalen ist. Es ist also möglich, zu untersuchen, ob paarweise Verbindungen zwischen den einzelnen 35 Genen existieren (Rovine 1997).

### 3. Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Produkt	Firma	Artikelnummer
Agarose	Sigma- Aldrich	A9539
Chloroform	Roth	3313.1
DEPC- Wasser	Roth	T143.2
Essigsäure 100 %	Roth	3738.4
Ethanol ( $\geq 99.8\%$ )	Roth	9065.3
Natriumacetat	Affymetrix	75897500
PeqGOLD TriFast™-Lösung	Peqlab	302020
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	115-39-9
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	1239-45-8
EDTA	Sigma-Aldrich	139-33-3
Genome Lab Separation Buffer	Beckmann Coulter	608012
Genome Lab Separation Gel	Beckmann Coulter	391438
Glycerin ( $\geq 99,5\%$ )	Roth	3783.1
Sample Loading Solution	Beckman Coulter	608082
Tris	Roth	4855.1
TBE- Buffer (10 x)	Sigma-Aldrich	T4415
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride Buffer Solution (=Tris- HCL-Puffer) pH 8.0 (1000 mM)	Sigma-Aldrich	154563

### 3.2 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Kapillarsequenzierer CEQ™8800	Beckman Coulter
Spektrophotometer NanoDrop™ 1000	NanoDrop
Thermozykler	Biometra
UV-Kamera	Biometra Uvsolo Geldoc
Fermenter mit Marinegegenrührer und Marinerührer im Abstand von 13 cm	Minifors
Grünlichtlampe 25W, 240V	Osram
Rotlicht	(PAR38 Cool Beam 120 Watt von Philips)
Rotlichtbank	Eigene Produktion der AG
Brutschrank	Faust GmbH
Erlenmeyerkolben 500 ml mit einer Schikane	Schott
Precellys® 24-Dual Homogenisator	Peqlab
Plattenmaschine	Eigenbau

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
peqGOLD PhaseTrap 2 ml	Peqlab
Thermowell™ Sealing Tape Aluminium	Corning
Haftsichtfolie	Roth
PCR-Platte (96-Well Platte)	Greiner bio-one
GeXP-Platte (96-Well Platte)	Corning
GeXP-Bufferplatte (96-Well Flat Bottom)	Corning
Precyelles Glaskügelchen 0.5 mm	Peqlab

### 3.4 Kit-Systeme

Name des Kits	Firma	Artikelnummer
DNA Size Standard Kit 400	Beckman Coulter	608098
GenomeLab GeXP Start Kit	Beckman Coulter	A85017
ThermoStart Taq Polymerase Kit	Beckman Coulter	A25395

### 3.5 Medien

Medium	Zusammensetzung
Wachstumsmedium	Die 7 Komponenten aus Tabelle 19 im Anhang in 700 ml MilliQ-Wasser lösen. Anschließend 10 ml 100xMMz-Lösung hinzugeben und mit NaOH auf einen pH-Wert von 4,6 einstellen. Zum Schluss auf 1l mit MilliQ-Wasser auffüllen, in eine Schottflasche überführen und autoklavieren.
Waschmedium	Die 4 Komponenten aus Tabelle 20 im Anhang in Milli-Q Wasser lösen und mit 30 % KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 4,6 einstellen. Anschließend auf 1l mit MilliQ-Wasser auffüllen, in eine Schottflasche überführen und autoklavieren.
Sporulationsagar	17 g Bacto-Agar in 905 ml MilliQ-Wasser in einer 1-l-Schott-flasche auflösen und dann mit dem Rührfisch autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf 50 °C müssen die Lösungen 1 bis 3 aus Tabelle 21 im Anhang hinzugegeben werden, die ebenfalls auf 50 °C vorgewärmt und autoklaviert sind. Anschließend die Gesamtlösung auf 42 °C abkühlen lassen, bevor jede Platte mit 30 ml dieser Lösung gegossen werden kann.



### 3.6 Lösungen und Puffer

Lösungen	Puffer
Sulfat-Stamm-Lösung 10%	Laufpuffer
Chlorid- Stamm- Lösung 10%	
100 x MMZ- Lösung	
Hemin	

Die genaue Zusammensetzung ist der Tabelle 22 im Anhang zu entnehmen.

### 3.7 Organismen

Alle verwendeten Stämme tragen die *gadAh*-Mutation, die ein apogames Wachstum zu einem haploiden Plasmodium ermöglicht. Als Wildtyp dient der Stamm #31, da dieser ein identisches Verhalten bezüglich der Sporulation zu diploiden Plasmodien zeigt. Die verwendeten Mutanten wurden durch eine chemische Mutagenese des Stammes #31 mit dem Mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) erzeugt (Starostzik und Marwan 1998). Der in dieser Arbeit verwendete Heterokaryont ist durch Fusion einer 50:50 Mischung der Mikroplasmodien-Pellets zweier Stämme vor der Hungerperiode entstanden, wobei eine selbst konstruierte Apparatur zum Einsatz kam, die es erlaubt, exakt 1 g Zellmasse je Platte aufzutragen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Organismen

Stamm	Mutiertes Allel	Phänotyp	Genotyp	Referenz	Abk.
CS310		Sporulation positiv, gelb	<i>matA2,fusA1, gadAH,whiA+</i>	Starostzik & Marwan 1998	#WT31
PHO68	PhoL-68	Sporulation negativ, gelb		Rätzel et al. 2013	L
PHO48	PhoN-48	stark eingeschränkt in der Sporulation, gelb		Rätzel et al. 2013	N
PHO48+ PHO68	PhoN-48+ PhoN-68	stark eingeschränkt in der Sporulation, gelb		Rätzel et al. 2013	NL

### 3.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die RT-Reaktion sind alle Rückwärts-Primer in ihrer Konzentration angepasst (Hoffmann 2012). Die eingestellten Konzentrationen der Rückwärtsprimer im verwendeten Primermix sind ebenfalls in Tabelle 3 aufgelistet. Tabelle 51 im Anhang zeigt den Überblick der 35 Gene mit den Informationen zum E-value, Uniport entry und Ähnlichkeiten.

Tabelle 3: ID der 35 Gene

Nr.	Gen	locus	Oligo-ID		FW-Primer soll [µM]	RW-Primer soll [µM]	PCR-Produkt [bp]
			FW-ID	RW-ID			
1	<i>ribA</i>	Contig08681_1.exp	#2167	#2168	0.20000	0.00025	114.51
2	<i>nhpA</i>	Contig12862_1.exp	#2169	#2170	0.20000	0.03130	120.23
3	<i>pksA</i>	Contig00120_1.exp	#2171	#2172	0.20000	0.12500	134.64
4	<i>ligA</i>	Contig11497_1.exp	#2173	#2174	0.20000	0.0625	138.82
5	<i>ralA</i>	Contig02400_1.exp	#2175	#2176	0.20000	0.00391	146.01
6	<i>damA</i>	PpolyNOa11.rm13f01.s1	#2177	#2178	0.20000	0.00390	149.75
7	<i>ehdA</i>	Contig05597_1.exp	#2179	#2180	0.20000	0.03130	159.32
8	<i>pumA</i>	Contig00369_1.exp	#2181	#2182	0.20000	0.00390	163.26
9	<i>pakA</i>	Contig11781_1.exp	#2183	#2184	0.20000	0.50000	171.29
10	<i>cdcA</i>	Contig03233_1.exp	#2185	#2186	0.20000	0.50000	176.31
11	<i>ardA</i>	PpolyN0a11e12.t7	#2187	#2188	0.20000	0.00098	183.31
12	<i>hstA</i>	Contig03326_1.exp	#2189	#2190	0.20000	0.01560	194.75
13	<i>psgA</i>	PpolyNOa14b03.t7	#2191	#2192	0.20000	0.01560	200.97
14	<i>pptB</i>	Contig02333_1.exp	#2193	#2194	0.20000	0.50000	207.46
15	<i>tspA</i>	PpolyN1a03e03.t7	#2195	#2196	0.20000	0.50000	217.20
16	<i>dspA</i>	PpolyNOa06h03.t7	#2197	#2198	0.20000	0.12500	231.59
17	<i>pikB</i>	PpolyNOa09a09.t7	#2199	#2200	0.20000	0.12500	237.53
18	<i>uchA</i>	PpolyN1a05c09.m13r	#2201	#2202	0.20000	0.12500	244.32
19	<i>gapA</i>	Contig05590_1.exp	#2203	#2204	0.20000	0.50000	250.64
20	<i>meiB</i>	PpolyN1d32d11.t7	#2205	#2206	0.20000	0.50000	254.73
21	<i>pcnA</i>	Contig00262_1.exp	#2207	#2208	0.20000	0.50000	260.20
22	<i>ribB</i>	Contig12081_1.exp	#2209	#2210	0.20000	0.06250	267.90
23	<i>arpA</i>	Contig00969_1.exp	#2211	#2212	0.20000	0.50000	271.57
24	<i>rasA</i>	PpolyN0a05c07.t7	#2213	#2214	0.20000	0.03130	276.75
25	<i>pldA</i>	PLD_738_polyA	#2215	#2216	0.20000	0.06250	286.22
26	<i>anxA</i>	Contig10470_1.exp	#2217	#2218	0.20000	0.50000	291.87
27	<i>pptA</i>	PpolyN1d18d06.t7	#2219	#2220	0.20000	0.50000	298.25
28	<i>pwiA</i>	Contig10153_1.exp	#2221	#2220	0.20000	0.50000	303.56
29	<i>cdcA</i>	PpolyN1d50g09.t7	#2223	#2224	0.20000	0.50000	308.79
30	<i>pldC</i>	Contig00397_1.exp	#2225	#2226	0.20000	0.12500	316.56
31	<i>pikC</i>	Contig04854_1.exp	#2227	#2228	0.20000	0.50000	328.42
32	<i>pldB</i>	PpolyN1d66e10.t7	#2229	#2230	0.20000	0.50000	337.42
33	<i>spiA</i>	PpolyN1d106h10.t7	#2231	#2232	0.20000	0.50000	344.38
34	<i>hcpA</i>	Contig01538_1.exp	#2233	#2234	0.20000	0.50000	348.29
35	<i>rsgA</i>	PpolyN1a08g07.t7	#2235	#2236	0.20000	0.50000	357.13

## 4. Methoden

### 4.1 Probengewinnung

Die Vorgehensweise für die Gewinnung des Probenmaterials von der Kultivierung über die Lichtinduktion bis zur Probenahme ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Die Kultivierung findet in geschwärmten Räumen statt, sodass keine unerwünschte Lichtquelle die Versuchsreihe beeinträchtigt. Alle Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

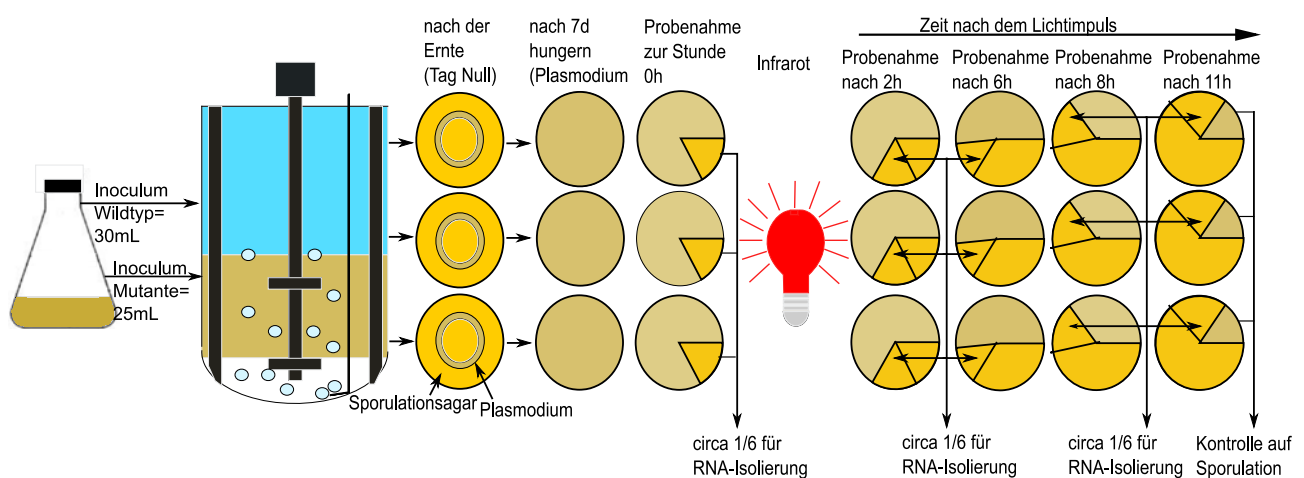


Abbildung 7: Probengewinnung

Die Grafik zeigt, von links nach rechts, den Ablauf der Materialgewinnung. Eine Vorkultur dient als Inokulum für den Fermenter. Nach 3,5 Tagen erfolgt in einem dunklen Raum bei Grünlicht die Ernte. Auf jede Hungerplatte wird kreisförmig ein Gramm Zellmasse *Physarum polycephalum* aufgetragen. Nach weiteren 7 Tagen erfolgt die, im Uhrzeigersinn schrittweise dargestellte, Probenahme. Nach der ersten Entnahme werden die kompetenten Zellen belichtet. Dies ist notwendig für die Einleitung des Sporulationsvorganges.

#### 4.1.1 Umsetzen von Erhaltungskulturen

Die Kultivierung der Mikroplasmodien findet in 500-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben statt. Diese dienen als Vorkultur für den Fermenter. Das Umsetzen der Kultur erfolgt in einem 3,5-Tage-Rhythmus. Spätestens nach zwanzig Passagen müssen neue Erhaltungskulturen angelegt werden, da mit zunehmender Kultivierungszeit die Gefahr der Ausbildung von unerwünschten Mutationen entsteht. Das Kulturmedium besteht zum einen aus dem Wachstumsmedium und zum anderen aus Hemin. Die Menge des Hemin entspricht einem Prozent des gewünschten Gesamtvolumens (Daniel und Rusch 1961+1962). Für das Umsetzen einer Erhaltungskultur werden 50 ml gemischten Mediums

(Wachstumsmedium + Hemin) mit einem spezifischen Volumen der entsprechenden Vorkultur versetzt. Die Menge des Inokulums hängt von der Dichte der Zellen und damit von der Wachstumsgeschwindigkeit ab. In der Regel handelt es sich um ein Volumen von 1–2 ml.

#### 4.1.2 Fermentation

Als Inokulum für die Fermentation werden 100 ml Wachstumskultur inklusive Hemin in einem 1000-ml-Kolben (entspricht 1/10 des Gesamtvolumens des Kolbens) 3,5 Tage bei 24 °C und 150 rpm im Dunkeln geschüttelt.

Innerhalb dieser 3 Tage muss der Fermenter zusammengebaut und autoklaviert werden, sodass dieser nach den 3,5 Tagen Kultivierung einsatzbereit ist. Der Ablauf zur Vorbereitung der Fermentation ist dem Fließschema zu entnehmen. Der fertige Fermenter ist in Abbildung 8 dargestellt.

Ziel	Aktivität	Ort
Vorbereitung des Kühlwassers	Einschalten des Kühlwasserbades Soll: Kühlflüssigkeit 15 °C	Arbeitswerkbank Fermenter
	↓	
Medienpräparation	1,5l Wachstumsmedium mit 15 ml Hemin versetzen	“Klasse 1 Sterilwerkbank”
	↓	
Vorbereitung der Fermenter	Überführung des fertigen Mediumgemischs in den Fermenter über die Animpfstutzen	“Klasse 1 Sterilwerkbank”
	↓	
	Zugabe der Vorkultur über die Animpfstutzen	
	Soll: Wildtyp 30 ml Mutanten 25 ml	
	↓	

Starten der Fermenter

Fertig befüllten Fermenter in  
den Block einhängen

Arbeitswerkbank Fermenter



Temperiermanschette  
anlegen



Temperaturfühler einführen



Zuluft an das Rotameter an-  
schließen und 1l/min  
einstellen



Kühlschläuche an den  
Abgaskühler anschließen



Rührer in Position bringen



Basisstation anschalten  
Temperatur: 24 °C  
Rührgeschwindigkeit: 250rpm



Fermentation

Fermentation in völliger  
Dunkelheit für 3,5 Tage

Arbeitswerkbank Fermenter

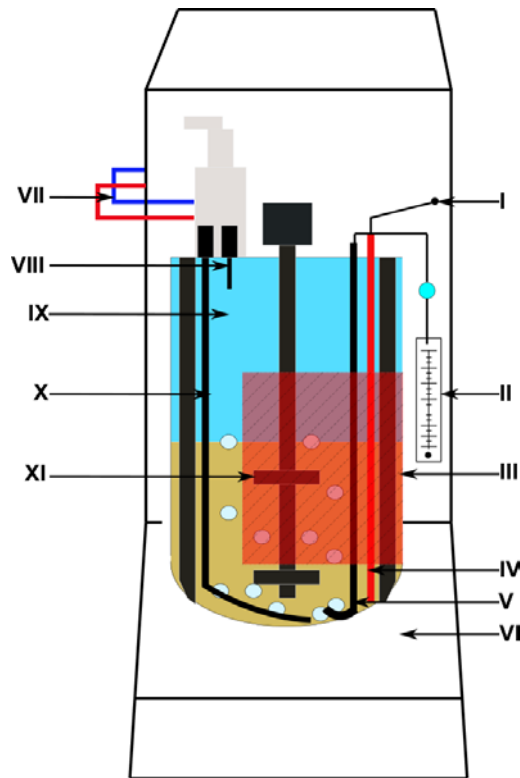


Abbildung 8: Der Fermenter

I: Pt-100-Kabel, II: Rotameter, III: Wärmeleitplatte, IV: Pt-100-Kabel-Rohr, V: Begasungsrohr, VI: Halterung Fermenter, VII: Kühlschläuche, VIII: Befüllungsrohr, IX: Kulturgefäß mit Medium, X: Ernterohr, XI: Rührwerk

### 4.1.3 Ernte

Damit keine Sporulation vorzeitig induziert wird, steht als einzige Lichtquelle während des Erntevorganges Grünlicht zur Verfügung.

Zunächst werden die geernteten Flüssigkulturen in 750 ml Beckmann-Zentrifugengefäße dekantiert. Diese können für die Zentrifugation mittels Spo-Medium austariert werden und bei 630 x g, einer Beschleunigungsrate von 9 und einer Abbremsrate von 4, für 5min zentrifugieren. Das entstandene Pellet ist mit ca. 300 ml Sporulationsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 20 im Anhang) 2x zu waschen. Das Pellet muss so lange kräftig geschüttelt werden, bis es vollständig gelöst ist. Dann erfolgt der 2. Zentrifugationsschritt für 5min unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Nach dem ersten Waschschrift ist das Pellet mittels Waschmedium in den 500 ml-Zentrifugenbecher zu überführen, damit das Pellet fester wird und das Waschmedium nach dem Zentrifugationsschritt leichter zu entfernen ist. Das entstandene Pellet muss nun auf 4 Lagen sterilen Filterpapiers aufgebracht und gewogen werden. Dies entspricht der

Feuchtmasse der Zellen. Anschließend muss die Zellmasse für mindestens eine 30min im Dunkeln auf dem Filterpapier inkubieren, damit sie trocknen kann. Allgemein sollte die Trocknungszeit so gewählt sein, dass es nicht zum Austrocknen der Zellmasse kommt, aber dennoch die aus den Waschschrritten verbleibende Flüssigkeit entfernt ist. Gleichzeitig fusionieren die Mikroplasmodien in dieser Zeit zu einem homogenen Makroplasmodium. Im Anschluss an die Trockenzeit erfolgt die Übertragung der Zellmasse mittels eines Spatellöffels in einer Einwegspritze. Die Zellmasse muss von Luftblasen befreit und mithilfe eines Löffels gut durchmischt werden. Anschließend wird ca. 1 g der Plasmodienmasse auf die Spo-Agarplatten (Zusammensetzung siehe Tabelle 21 im Anhang) ringförmig mit einer Pumpe aufgetragen (Abbildung 9). Die Rateneinstellung für die gewünschte Grammzahl beträgt 18,66 ml/min und der Durchmesser der Einwegspritze von 27,7 mm. Im Anschluss erfolgt die Inkubation der fertigen Platten (Durchmesser: 9 cm) im Brutschrank vor Licht geschützt für 6 bzw. 7 Tage bei 23 °C.

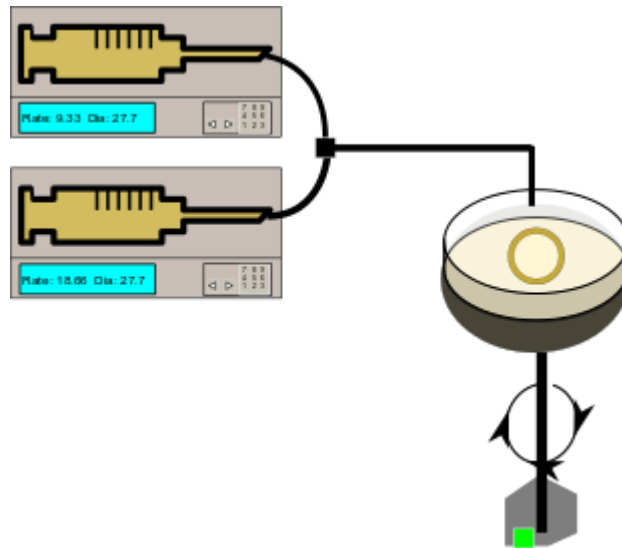


Abbildung 9: Die Plattenmaschine

Mithilfe dieser Plattenmaschine können verschiedene Stämme *Physarum polycephalum* gemischt werden. Das gewünschte Mischungsverhältnis erfolgt über die Anpassung der Geschwindigkeitsrate beider Pumpen, damit weiterhin ein Gramm Masse auf die Petrischale aufgetragen wird.

#### 4.1.4 Sporulationsinduktion und Probenahme

Die Induktion der Sporulation bei *Physarum polycephalum* erfolgt in allen hier durchgeführten Experimenten über einen dunkelroten Lichtimpuls. Zum Erreichen der Sporulationskompetenz wurden die Plasmodien 7 Tage auf Spo-Agar (einem Agar ohne

Glucose) kultiviert. Für das Zeitserienexperiment der Einzelzellanalyse ist eine Teilung in 6 Teile notwendig (Abbildung 7). Die erste Probenahme fand bereits vor der Lichtinduktion statt und diente als Startpunkt (0 h) bzw. Dunkelprobe (DK). Die restlichen 5 Teile wurden, in Abhängigkeit vom Versuchsaufbau, zwischen 5min und 60min dem dunkelroten Licht ausgesetzt ( $\lambda \geq 700 \text{ nm}$ ,  $13 \text{ W/m}^2$ ). Nach 2h, 6h, 8h und 11h fanden die Probenahmen der anderen Teile statt und wurden für die Genexpressionsanalyse in Stickstoff eingefroren. Das verbliebene Sechstel diente der Analyse auf Sporulation am darauffolgenden Tag.

## **4.2 Aufbereitung des Zellmaterials**

Für die Gewinnung des Zellmaterials sind mehrere Schritte notwendig. Auf der Grundlage des Manuskript „Instruction Manual peqGold Phase Trap“ von Peqlab für RNA-Isolierung findet die Aufbereitung des Zellmaterials statt.

### **4.2.1 Zellyse**

Für die Isolierung der RNA aus den Plasmodien muss zunächst die Aufspaltung der eingefrorenen Zellen mithilfe von mechanischen Prozessen erfolgen. Die tiefgefrorenen Proben werden in Mikrolitergefäße (Eppis), welche 1,5 ml einer phenolhaltigen Lösung (peqGOLD TriFast™-Lösung der Firma Peqlab) enthalten, überführt und direkt mithilfe des Zellaufschlussgerätes Precellys® bei 5900 rpm für 10 s zügig homogenisiert unter Verwendung von Glaskugeln, die einen Durchmesser von 0,5 mm besitzen.

### **4.2.2 Phasentrennung**

Nach dem Probenaufschluss liegen RNA, DNA und Proteine in der TriFast™-Lösung in gelöster Form vor. Zur Trennung der 3 Komponenten werden Gefäße (Phase Traps) verwendet, welche Wachs enthalten und damit eine Trennung der wässrigen Lösung hinsichtlich des unterschiedlichen Dichteverhältnisses ermöglichen.

Zunächst müssen die Phase Traps vor der Benutzung bei Raumtemperatur für eine Minute bei  $16000 \times g$  zentrifugiert werden. Im Anschluss muss die Suspension in das Eppi überführt und 300  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben werden. Anschließend wird das Eppi für



30s kräftig geschüttelt, damit alle Komponenten gut durchmischt sind. Vor der Zentrifugation werden die Eppis weitere 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 16000 x g für eine Minute bewirkt die Phasentrennung. Die gesuchte RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase über der Wachsschicht. Diese wird abgenommen und in neue 1,5 ml-Eppis überführt. Da die isolierte RNA hitzeempfindlich ist, muss die Probe nach dem Zentrifugationsschritt direkt auf Eis gelagert werden.

### **4.2.3 RNA-Fällung**

Die Fällung der gelösten RNA erfolgt mit Ethanol/1M-Essigsäure (4:1). Dabei wird zur Lösung das 0,9-fache Volumen an Ethanol/1M-Essigsäure hinzugegeben, kräftig geschüttelt und für mindestens 24h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fällen gelassen. Für die Pelletierung der RNA wird die Suspension für 15min bei 17949 x g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewonnene RNA wird 3x gewaschen: Zu Beginn 1x mit 400  $\mu\text{l}$  eisgekühltem 3M-Natriumacetat und anschließend 2x mit 70 % Ethanol. Zwischen den Waschsritten erfolgt jeweils eine Zentrifugation für 10min bei 17949 x g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2.4 Resuspension**

Nach dem letzten Waschschrift ist der Überstand zu verwerfen, und das Pellet muss bei geöffnetem Deckel kurz getrocknet werden (für ca. 10min), zur Entweichung des restliche Ethanols. Im Anschluss wird nun jedes Pellet in 90  $\mu\text{l}$  kaltem, mit Diethyldicarbonat versetztem Wasser (DEPC-Wasser) resuspendiert (bei großen bzw. kleinen Pellets in entsprechend mehr oder weniger DEPC-Wasser resuspendieren).

### **4.2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die anschließende Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgt mithilfe photometrischer Messung am NanoDrop 100, welches die optische Dichte ermittelt. Die Konzentration errechnet sich aus der Extinktion bei 260 nm. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Proteine werden hingegen bei 280 nm

gemessen. Damit soll mittels des Adsorptionsverhältnisses 260/280 Aufschluss über die Reinheit der RNA erlangt werden. Bei reiner RNA beträgt dieser Wert ca. 2,0.

#### **4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Kontrolle auf Degradation erfolgt durch ein 1-prozentiges Agarosegel. Für die Herstellung dient Tris-Borate-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (englisch: **Tris-Borate-EDTA** [englisch = **Ethylendiamintetraacetic Acid** = EDTA]-Puffer = TBE-Puffer). Die Elektrophoresekammer wird mit dem TBE-Puffer befüllt und jede Probe zusammen mit 1 µl Laufpuffer auf das Gel geladen. Um ein Anfärben der RNA zu erreichen, werden zwanzig Mikroliter Ethidiumbromid (5 mg/ml) in den Puffertank pipettiert. Der Lauf erfolgt bei einer Spannung von 150 Volt für 45min. Nach dem Lauf ist das Gel mit der UV-Kamera zu fotografieren und zu analysieren.

#### **4.2.7 Konzentrationseinstellung**

Die überprüfte RNA wird im letzten Schritt auf 20 ng/µl mittels DEPC-Wasser auf der Basis des NanoDrop100-Ergebnisses eingestellt.

## 4.3 GeXP-Analyse

### 4.3.1 RT-PCR

Für die RT-PCR steht das GenomeLab GeXP Start Kit von Beckman Coulter sowie das ThermoStart Taq Polymerase Kit von Thermo zur Verfügung. Forward- und Reverse-Primer sind im Kit-System nicht enthalten und müssen selbst konfiguriert werden (siehe Anhang: Tabelle 23 und 24). Die verwendeten Primer haben eine Produktlänge von 114,15 Nukleotiden bis 357,14 Nukleotiden. Die Konzentration der chimären Primer muss in Vorexperimenten ermittelt werden. Sie sollten so eingestellt sein, dass alle zu analysierenden Gene in ähnlichen Mengen vorliegen (Hoffmann et al. 2012). Als Referenz-RNA dient die mitgelieferte KAN<sup>R</sup>RNA. Eine spätere Analyse der Gene kann nur über eine Standardkurve, die alle zu analysierenden Proben enthält, erfolgen. Dabei müssen die Reagenzien für die Transkriptanalyse und die Standardkurve aus den gleichen Kitsystemen stammen. Die Standardkurve, ein Pool aus allen RNA-Proben, setzt sich aus 8 Suspensionen mit verschiedenen RNA-Konzentrationen zusammen. Für den RNA-Pool werden jeweils 5 µl einer Probe (20 ng/µl) zu einem Mix zusammen pipettiert. Das daraus resultierende Verdünnungsschema lautet:

- (1) 100 ng RNA
- (2): 20 µl aus (1) + 20 µl H<sub>2</sub>O (50,00 ng RNA)
- (3): 20 µl aus (2) + 20 µl H<sub>2</sub>O (25,00 ng RNA)
- (4): 20 µl aus (3) + 20 µl H<sub>2</sub>O (12,50 ng RNA)
- (5): 20 µl aus (4) + 20 µl H<sub>2</sub>O ( 6,25 ng RNA)
- (6): 20 µl aus (5) + 20 µl H<sub>2</sub>O ( 3,12 ng RNA)
- (7): 20 µl aus (6) + 20 µl H<sub>2</sub>O ( 1,56 ng RNA)
- (8): 20 µl aus (7) + 20 µl H<sub>2</sub>O ( 0,78 ng RNA)

Das Pipettierschema für die RT ist in Tabelle 3 aufgeführt. Zunächst wurden 2 Mastermixe, bestehend aus Wasser, RT-Puffer, RW-Primer, RT-Enzym sowie KAN<sup>R</sup>RNA, für die Proben der Verdünnungsreihe und der Einzelklone hergestellt. Die KAN<sup>R</sup>RNA-Konzentration

wurde jeweils in einem Vorversuch festgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Peakhöhe im GeXP im Mittel den anderen 35 Peaks entsprach. Der Mastermix der Verdünnungsreihe wurde in 5 µl Aliquote aufgeteilt und jedes mit 5 µl Template versetzt. Die Aliquotierung des Einzelklon-Mastermixes erfolgte zu folgenden Volumina: 9 µl Mix auf 1 µl Template. Zur Überprüfung des Mastermixes bezüglich Kontamination und Funktionalität ist zusätzlich das Mitführen einer Probe ohne DNA (englisch: **No Template Control = NTC**) und einer RT-Minus-Probe notwendig.

*Tabelle 3: 1. Schritt der RT-PCR (halber Ansatz des Beckman Coulter-Protokolls)*

<b>Ort</b>	<b>Reaktionsmix</b>	<b>Standard- kurve</b>	<b>NTC</b>	<b>RT-Minus</b>	<b>RT-Plus</b>
Template	Dnase/RNase free				
free area	water	5,5 µl	5,5 µl	6,0 µl	4,5 µl
	RT Buffer 5x	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
	rev Primer Plex	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
	RT Enzym	0,5 µl	0,5 µl	0,0 µl	0,5 µl
Template	KAN <sup>R</sup> RNA				
area		1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
	Template RNA	5,0 µl	0,0 µl	1,0 µl	1,0 µl

Für die RT-Reaktion im Thermozykler ist folgende Temperaturreihenfolge notwendig:

*Tabelle 4: RT-Temperaturschema*

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Funktion</b>
48 °C	1 min	Auflösung der Sekundärstruktur
37 °C	5 min	Anlagerung der Primer an die RNA-Stränge
42 °C	60 min	Reverse Transkription
95 °C	5 min	Inaktivierung der reversen Transkriptase
4 °C	halten	

Die Herstellung des Mastermixes für die PCR erfolgt nach dem Pipettierschema in Tabelle 5. Jedes zu analysierende Well enthält 5,35 µl Mastermix und 4,65 µl cDNA. Die

Universalprimer selbst sind im PCR-Puffer enthalten.

Tabelle 5: PCR-Pipettierschema (halber Ansatz des Beckman Coulter-Protokolls)

PCR Reaktionsmix	Volumen pro Well
PCR Buffer 5x	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
fwd Primer Plex	1 µl
DNA Polymerase	0,35 µl

Die PCR läuft nach dem Prinzip in Tabelle 6 ab.

Tabelle 6: PCR-Temperaturschema

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	95 °C	10 min	Denaturierung des DNA-Doppelstranges
2	94 °C	30 s	Denaturierung des Doppelstranges
3	55 °C	30min	Anlagerung der Primer an die cDNA
4	68–70 °C	1 min	Primer-Verlängerung
5		Wiederholung der Schritte 2 – 4 für weitere 34 Zyklen	
6	4 °C	halten	

### 4.3.2 Kapillarelektrophoretische Auftrennung

Mithilfe des CEQ™800 wurde die in cDNA umgeschriebene und amplifizierte mRNA kapillarelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Überstieg das Fluoreszenzsignal der Probe einen Wert von 120000 RUF war eine Verdünnung der PCR-Produkte mit TrisHCL notwendig. Zur Präparation der Proben wurde jeweils 1 µl des PCR-Produkts zu dem Mix aus 38,6 µl formamidhaltiger Lösung (von der Firma Beckman als **Sample Loading Solution** = SLS bezeichnet, ist im Kit-System enthalten) und 0,4 µl DNA-Standard-400 hinzugegeben. Ab einem Probenumfang von mehr als 2 Proben empfahl sich die Herstellung eines Mastermixes, der dann in die Probenplatte zu je 39 µl pro Well verteilt wurde. Nach kurzem runterzentrifugieren wurde die Probe mit einem Öltropfen abgedeckt, und die Wells in der Pufferplatte wurden mit dem Separationspuffer zu ca.  $\frac{3}{4}$  gefüllt. Die Trennung im CEQ™800 erfolgte mit dem modifizierten Frag3-Programm, welches in

Tabelle 7 erläutert ist:

Tabelle 7: Kapillarelektrophoretische Auftrennung

<b>Ablauf der Auftrennung</b>	<b>Bedingungen</b>
Arbeitstemperatur der Kapillare	50 °C
Denaturierung des Doppelstranges	120 min bei 90 °C
Probeninjektion in die Kapillare	30 sec bei 2.0 kV
Separation	40 min bei 6.0 kV

## 4.4 Genexpressionsanalyse

### 4.4.1 Bestimmung der Transkriptmengen

Für die Normierung aller ermittelten Fragmente auf der Peakfläche der KAN<sup>R</sup>RNA stand ein internes Skript zur Verfügung, das auf der Gleichung 4-01 basiert.

$$\text{normPeakfl}_{\text{fragx}} = \frac{\text{Peakfl}_{\text{fragx}}}{\text{Peakfl}_{\text{KANrRNA}}} \quad \text{Gleichung 4-01}$$

$\text{normPeakfl}_{\text{fragx}}$  = normierte Peakfläche vom Fragment x

$\text{Peakfl}_{\text{fragx}}$  = Peakfläche für das Fragment x aus dem CEQ<sup>TM</sup>800

$\text{Peakfl}_{\text{KANrRNA}}$  = Peakfläche für die KAN<sup>R</sup>RNA

Die normierten Peakflächen der Standardkurvenproben werden doppeltlogarithmisch über die eingesetzte RNA-Menge aufgetragen. Für die Ermittlung des Anstieges aus der Geradengleichung sowie des Schnittpunktes mit der y-Achse erfolgte eine lineare Regression für jedes einzelne Fragment. Das Skript mittelt über alle Anstiege und ersetzt die individuellen Anstiege durch die gemittelten Anstiege. Damit ergaben sich gleichzeitig neue y-Achsenabschnitte. Die Geradengleichung (4-02 bzw. 4-03) jedes Fragments musste nach x bzw. nach  $M_{\text{fragx}}$  für die Berechnung der Transkriptmenge umgestellt werden.

$$f(x) = mx + n \quad \text{Gleichung 4-02}$$

$$normPeakfl_{fragx} = mA \cdot \lg(M_{fragx}) + y' \quad \text{Gleichung 4-03}$$

$$M_{fragx} = 10^{\frac{\lg(normPeakfl_{fragx}) - y'}{mA}} \quad \text{Gleichung 4-04}$$

- $M_{fragx}$  = Transkriptmenge vom Fragment x
- $normPeakfl_{fragx}$  = normierte Peakfläche vom Fragment x
- $mA$  = mittlerer Achsenabschnitt
- $y'$  = neuer y-Achsenabschnitt

Diese Transkriptmenge muss durch die eingesetzte RNA-Menge dividiert werden, wie der Gleichung 4-05 zu entnehmen ist. Damit ist die Transkriptmenge eine einheitslose Größe. Diese Transkriptmenge wird von Beckman Coulter (2003) auch als Gene Expression Quantitation (GEQ) bezeichnet.

$$realM_{fragx} = \frac{M_{fragx}}{mRNA} \quad \text{Gleichung 4-05}$$

- $realM_{fragx}$  = reale Transkriptmenge
- $M_{fragx}$  = Transkriptmenge aus der Gleichung 4-04
- $mRNA$  = eingesetzte RNA für RT-PCR

#### 4.4.2 Mann-Whitney-U-Test

Die Voraussetzung dafür, dass die untersuchten Proben zum einen einer gleichen Verteilung angehören, da sie alle aus einem Fermentationslauf kommen, und dass die Proben zum anderen unabhängig voneinander sind, da jede RNA-Probe einer Zelle aus einer unterschiedlichen Messung stammt, ist erfüllt. Die Nullhypothese für alle durchgeführten Analysen lautete:

*Es gibt keinen signifikanten Genexpressionsunterschied für ein betrachtetes Gen zwischen den einzelnen Zeitpunkten.*

Die Berechnung von  $U_A$  erfolgt nach der Gleichung 4-06. Dazu werden die Stichproben gemeinsam der Größe nach sortiert, und entsprechend der Rangfolge wird jedem Wert eine Rangzahl zugeordnet. Zur Ermittlung der Rangsummen werden die Rangzahlen je Stichprobe summiert. Die Prüfgröße  $U_A$  wird mithilfe der Gleichungen 4-06 ermittelt, wobei  $n_a$  und  $n_b$  die Stichprobenumfänge und  $R_a$  die Rangsumme von Gruppe A darstellt. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests erlauben anhand der Expressionsverläufe eine Einteilung in Hochregulation, Runterregulation oder keine Veränderung des Expressionsniveaus. Dabei kann das x-Fache des Expressionsniveaus eines Gens im Vergleich zur Kontrolle prinzipiell beliebig klein sein, soweit die statistische Streuung der Werte kleiner ist. (Mann und Whitney, 1947).

$$U_A = n_a \cdot n_b + \frac{n_a(n_a + 1)}{2} - R_a \quad \text{Gleichung 4-06}$$

$U_A$  = Prüfgröße

$n_a$  = Anzahl der Proben in Gruppe A

$n_b$  = Anzahl der Proben in Gruppe B

$R_a$  = Rangsumme von Gruppe A

### 4.4.3 Hauptkomponentenanalyse

Bei der PCA handelt es sich um eine Dimensionsreduzierung. In dieser Arbeit wurde mit 2 bzw. mit 3 Komponenten gearbeitet. Für die Berechnung der 2 oder 3 Komponenten in der PCA steht das Programm R mit den Funktionen „prcomp“ und „predict“ zur Verfügung<sup>1</sup>. Jeder dargestellte Punkt in der Abbildung enthält die Gesamtinformationen aller 35 Gene eines Plasmodiums zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die unterschiedlichen Zeitpunkte von einer Einzelzelle werden durch verschiedene Farben dargestellt und die verschiedenen Plasmodien über Ziffern gekennzeichnet. Somit kann aus dem Diagramm der zeitliche Entwicklungsverlauf jedes einzelnen Plasmodiums entnommen werden. Gleichzeitig ermöglicht diese Vorgehensweise einen Vergleich der Einzelzellen untereinander (Backhaus et al. 2003, Timm 2002).

---

<sup>1</sup> (<https://stat.ethz.ch/R-manual/>).



#### 4.4.4 Signifikante Clusteranalyse

Die signifikante Clusteranalyse wird mit der Arbeitsbox „simprof“ im Programm R ausgeführt. Eine Normierung der Daten ist unabdingbar, wenn die betrachteten Datensätze nicht mithilfe eines GeXP-Kit's generiert wurden. Als Distanzmaß wurde die euklidische Distanz gewählt (Backhaus et al. 2003, Langfelder et al. 2008).

#### 4.4.5 Korrelationsanalyse

Zur Analyse, ob paarweise Korrelationen in den 35 Genen vorhanden sind, wird die Pearson-Korrelation verwendet. Der Korrelationskoeffizient wird folgendermaßen bestimmt:

$$r = \sum_{i=1}^n \left( \frac{(xi - \bar{x}) \cdot (yi - \bar{y})}{(n-1) \cdot sx \cdot sy} \right)$$

Gleichung 4-07

$r$  = Korrelationskoeffizient

$i$  = Gene

$x$  = Expressionsniveau von Gen  $x$

$y$  = Expressionsniveau von Gen  $y$

$s_x$  = Standardabweichung der Transkriptmenge von Gen  $x$

$s_y$  = Standardabweichung der Transkriptmenge von Gen  $y$

Als Schwellenwert für den Korrelationskoeffizienten wird  $r \leq -0,8$  für signifikante negative Korrelationen (entgegen gerichtete Korrelationen) festgelegt und  $r \geq 0,8$  für signifikante positive Korrelationen (gleichgerichtete Korrelationen) (Rovine 1997).

## 5. Ergebnisse

Hoffmann zeigte bereits (2012), dass die Durchführung von Genexpressionen an einzelnen plasmodialen Zellen möglich ist. Durch die kombinierte RT-PCR mit einer anschließenden kapillarelektrophoretischen Auftrennung können so parallel 35 Gene analysiert werden. Dies ermöglichte die Identifizierung von Markergenen, deren Expressionsmuster mit der Schicksalsentscheidung der individuellen multinuklearen plasmodialen Zellen korrelieren und während des Differenzierungsprozesses signifikante veränderte Konzentrationen aufweisen. Um die bereits festgestellte Heterogenität in klonalen Populationen nachzuweisen, sind Wiederholungsmessungen an Einzelplasmodien erforderlich. So kann die Vielfalt der dynamischen Variationsmöglichkeit einer Zelle im regulatorischen Netzwerk aufgezeigt werden. Dazu wurde der Prozess von hungernden Plasmodien (Wildtyp und Mutanten) auf ihrem Weg zur Sporulation untersucht. Um zu berücksichtigen, welchen Einfluss äußere Faktoren auf die Kinetiken der Einzelplasmodien haben, wurde die Hungerphase und Belichtungszeit unterschiedlich lang ausgeführt. Darüber hinaus soll die Analyse der Zellfusion aus den 2 zuvor untersuchten Mutanten dabei helfen, Komplementationen aufzuzeigen, die es ermöglichen, genetische Defekte auszugleichen, und deren Nachweis gleichzeitig mögliche Ansätze für eine zelluläre Reprogrammierung liefert. Diese Mutanten sind in ihrer Sporulation zum einen stark eingeschränkt und zum anderen komplett sporulationsunfähig.

Durch die Charakterisierung und die systematische Darstellung von Zeitreihen der Einzelplasmodien kann das zugrundeliegende Interaktionsnetzwerk analysiert werden. Dazu sollen Korrelationsanalysen genutzt werden. Denn Voruntersuchungen zeigten bereits, dass zum einen Mutanten als Antwort auf einen Lichtstimulus hin ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Muster der differentiellen Genexpression aufweisen. Zum anderen zeigte Rätzel (2013) bereits, dass die Mutanten sich innerhalb bestimmter paarweiser Korrelationen unterscheiden, also bestimmte Regulatoren nicht angeschaltet werden.

Diese Untersuchungen waren notwendig zur Klärung der Fragen, ob es individuelle Differenzen in der Genexpression beim Vergleich der Einzelzellenanalysen während des Differenzierungsvorganges eines hungernden Plasmodiums zu einem sporulierten Plasmodium gibt und welchen Einfluss verschiedene Umweltbedingungen auf die

Kinetiken ausüben. Weiterhin sollte so geklärt werden, ob individuelle Differenzen in den Genexpressionsdaten einen Einfluss auf das Muster von co-regulierten Genen haben.

Damit ergaben sich folgende Versuchsreihen:

*Tabelle 8: Übersicht der durchgeführten Experimente*

<b>Stamm</b>	<b>Anzahl Hunger-tage</b>	<b>Belichtungs-zeit</b>	<b>Platten-anzahl</b>	<b>Anzahl sporulierter Plasmodien</b>	<b>Anzahl nicht sporulierter Plasmodien</b>	<b>Ziel des Versuches</b>
#WT31	7d	2 min	18	9	9	Vergleich
#WT31	7d	5 min	20	11	9	sporulierter und
#WT31	7d	0 min	10	0	10	nicht sporulierter Wildtyp
#WT31	7d	0 min	13	4	9	Einfluss von
#WT31	7d	5 min	12	11	1	unterschiedlich
#WT31	7d	15 min	12	12	0	langen Hunger-
#WT31	6d	30 min	12	11	1	phasen und
#WT31	6d	20 min	12	11	1	Belichtungs-
#WT31	6d	10 min	12	12	0	intensitäten auf die Sporulation
PHO48	7d	60 min	11	11	0	Charakterisie-
PHO68	7d	60 min	11	11	0	rung der Mutante
PHO48+	7d	60 min	11	11	0	Komplemen-
PHO68						tationseffekte
#WT31	7d	40 min	10	4 Teile (DK-6h-11h-spo-Kontrolle)		Einfluss des Schneidens
#WT31	7d/8d	20 min und 30 min	A: 6 B: 5	A: pro Plasmodium sind 7 Proben zum selben Zeitpunkt weggefroren im UZS B: 1/2 von 1/8 außen bzw. innen weggefroren pro Plasmodium		Überprüfung der Homogenität auf der Platte

Die zu den Plasmodien gehörigen RNA-Nummern mit den Expressionswerten sind aus den Tabellen 26 bis 50 im Anhang zu entnehmen.

## ***5.1 Erforderliche Kontrollen für die Interpretation der Ergebnisse von Zeitreihenexperimenten an Einzelzellen***

Um die an einzelnen plasmodialen Zellen gemessenen Zeitreihen korrekt interpretieren zu können, waren Kontrollen erforderlich, die es erlauben sollten, mögliche methodisch bedingte Aspekte auszuschließen. Dazu wurde untersucht, inwieweit die relativen Konzentrationen der 35 analysierten Gene im Plasmodium lokal unterschiedlich sind, und ob das bei den Probenahmen durchgeführte Abschneiden der Plasmodien und die damit einhergehende Verletzung der Zelle eine Auswirkung auf die Expression der untersuchten Gene haben.

### **5.1.1 Homogenität der Zellmasse eines Plasmodiums**

Ob von einer homogenen Genexpressionsverteilung aller 35 Gene ausgegangen werden kann, sollte anhand zweier verschiedener Experimentierreihen untersucht werden:

1. Vergleich der Transkriptmengen zwischen Rand und Zentrum eines Plasmodiums
2. Vergleich von 8 Achtel-Proben eines Plasmodiums auf lokale Unabhängigkeit der Transkriptmengen.

#### ***5.1.1.1 Vergleich der Transkriptmengen zwischen Rand und Zentrum eines Plasmodiums***

Für den Vergleich der Transkriptmengen zwischen äußerem und innerem Rand wurde der Wildtypstamm genutzt. Die Kultivierung des Stammes erfolgte für 3 ½ Tage bei völliger Dunkelheit im Fermenter. Die anschließende Ernte und das kreisförmige Auftragen der Zellmassen (1 g) auf nährstoffarme Agarplatten erfolgten bei Grünlicht. Vor dem eigentlichen Versuch mussten die Plasmodien 7 Tage hungern. Nach der Hungerphase erfolgte die Belichtung mit dunkelrotem Licht für 20min. Weitere 2h später konnte die Probenahme für die Analyse gestartet werden. Dazu wurde das Plasmodium zunächst gefünftelt. Jedes Fünftel wurde ein weiteres Mal halbiert und das geerntete Material für die spätere Genexpressionsanalyse in Stickstoff eingefroren. Nach der wie in Kapitel 4.2

beschriebenen Probenaufbereitung und der Generierung der Transkriptmengen (Kapitel 4.3 und 4.4; Rohdaten siehe Anhang, Tabelle 26+27), erfolgte eine Normierung auf den Maximalwert über alle Proben innerhalb eines Genes. Die normierten Daten sind getrennt nach innerem und äußerem Material in Tabelle 9 dargestellt. Bei Betrachtung der Verhältnisse aller 35 Gene zwischen innerer und äußerer Probenahme zeigt sich im Mittel eine 84%ige Übereinstimmung zwischen beiden Hälften. Einzige Ausnahme bildet das Gen *ribB*. Die Übereinstimmung der relativen mRNA-Menge zwischen äußerem Zellrand und innerem Zellbereich beträgt für dieses Gen lediglich 36%. Die genaue Ursache ist schwer analysierbar. Da alle anderen Gene, die gleichzeitig gemessen wurden, eine höhere Übereinstimmung aufweisen, kann es nicht an der Probenaufbereitung und an der Messung selbst liegen. Die jeweiligen Mittelwerte der Transkriptmengen der Proben von Innen und Außen sind jedoch sehr gering, sodass Schwankungen zwischen beiden Hälften größer erscheinen als sie in Wirklichkeit sind.

Generell kann aber ausgeschlossen werden, dass der Ort der Probenahme (innerer Rand oder äußerer Rand) einen Einfluss auf die Expressionsanalyse ausübt. Damit konnte eine wichtige Frage für die Etablierung einer Zeitserienreihe von einem Plasmodium geklärt werden.

Tabelle 9: Vergleich der Transkriptmengen inneres und äußeres Material

<b>Gen</b>	<b>Mittelwert (5 Proben) der Transkriptmenge inneres Material</b>	<b>Mittelwert (5 Proben) der Transkriptmenge äußeres Material</b>	<b>Verhältnis der Transkriptmenge innen : außen</b>
<i>ribA</i>	4,41	5,06	0,87
<i>nhpA</i>	1,35	1,34	1,09
<i>pksA</i>	7,86	9,31	0,84
<i>ligA</i>	15,50	17,89	0,87
<i>ralA</i>	1,86	2,30	0,81
<i>damA</i>	9,10	10,92	0,83
<i>ehdA</i>	12,86	15,87	0,81
<i>pumA</i>	1,98	2,36	0,84
<i>pakA</i>	17,41	19,11	0,91
<i>cdcA</i>	17,00	20,77	0,82
<i>ardA</i>	7,52	7,59	0,99
<i>hstA</i>	3,84	4,36	0,88
<i>psgA</i>	1,14	1,50	0,76
<i>pptB</i>	7,96	9,66	0,82
<i>tspA</i>	8,86	11,26	0,79
<i>dspA</i>	3,65	4,31	0,85
<i>pikB</i>	0,58	0,67	0,87
<i>uchA</i>	9,05	10,90	0,83
<i>gapA</i>	10,84	12,32	0,88
<i>meiB</i>	3,21	3,63	0,89
<i>pcnA</i>	6,08	7,59	0,80
<i>ribB</i>	0,20	0,56	0,36
<i>arpA</i>	2,26	2,22	1,02
<i>rasA</i>	2,65	3,32	0,80
<i>pldA</i>	10,79	12,22	0,88
<i>anxA</i>	1,92	2,55	0,75
<i>pptA</i>	9,54	11,36	0,84
<i>pwiA</i>	9,88	10,33	0,96
<i>cudA</i>	3,27	3,59	0,91
<i>pldC</i>	1,32	1,87	0,70
<i>pikC</i>	7,87	9,58	0,82
<i>pldB</i>	0,39	0,50	0,77
<i>spiA</i>	2,18	2,32	0,94
<i>hcpA</i>	3,65	4,82	0,76
<i>rgsA</i>	8,12	9,74	0,83

### **5.1.1.2 Analyse auf lokal unabhängige Transkriptmengen in einem Plasmodium**

Neben dem Vergleich zwischen innerem und äußerem Zellmaterial auf einer Agarplatte ist es ebenso wichtig, zu untersuchen, ob das Genexpressionsniveau einer Zelle auf der Platte generell schwankt. Dazu wurde erneut der Wildtypstamm verwendet und nach dem gleichen Schema kultiviert wie die Proben aus Kapitel 5.1.1.1. Der einzige Unterschied lag in der Länge der Hungerphase, die in diesem Versuch 8 Tage entsprach. Die Belichtungsintensität betrug zwischen 20min für die Plasmodien 7 und 8, sowie 30min für die Plasmodien 9, 10 und 11. Bei den übrigen Plasmodien erfolgte keine Stimulation der Lichtrezeptoren. Die Probenahme für die belichteten Plasmodien fanden nach 2,5h für die Plasmodien 7 und 8 statt sowie nach 7h für die restlichen Proben. Jedes Plasmodium wurde hierzu geachtet und den entstandenen Teilen nacheinander die Zellmasse entnommen. Während der Probenaufbereitung ging Material verloren, sodass am Ende für die Analyse je Zeitpunkt 2 Platten zur Verfügung standen (Genexpressionsdaten siehe Anhang, Tabelle 28+29). Wie in Kapitel 5.1.1.1 dargestellt, erfolgt für alle Gene eine Normierung bezüglich ihres Maximalwertes und deren logarithmische Darstellung (Abbildung 10). Jedes Achtel ist verschieden farbig markiert. Auf der x-Achse sind alle 35 Gene der Fragmentgröße nach von 114bp bis 357bp aufgetragen. Die y-Achse zeigt die normierte logarithmisch aufgetragene relative mRNA-Menge. Eine systematische Entwicklung wie Anstieg oder Abnahme der Transkriptmenge bezüglich der Reihenfolge in den Probenahmen ist nicht ersichtlich. Die Schwankungen der mRNA-Mengen zwischen den einzelnen 8 Zellstücken sind vernachlässigbar klein. Die größte Divergenz der Transkriptmengen zwischen den einzelnen Teilen ist erneut bei dem Gen *ribB* zu beobachten. Die maximale Streuung zwischen den einzelnen Zellstücken über alle Proben und Gene liegt bei 3,84. Damit sollten bei späteren Analysen in Bezug auf eine Hoch- oder Runterregulation Vielfache unter einem Wert von 4,0 kritisch betrachtet werden. Außerdem müssen die Ergebnisse des ribosomalen Proteins *ribB* genauer betrachtet werden, da es bei beiden Analysen der Expressionsverteilung auf einer Platte auffällig wegen der geringen Übereinstimmung der einzelnen Teilstücke war.

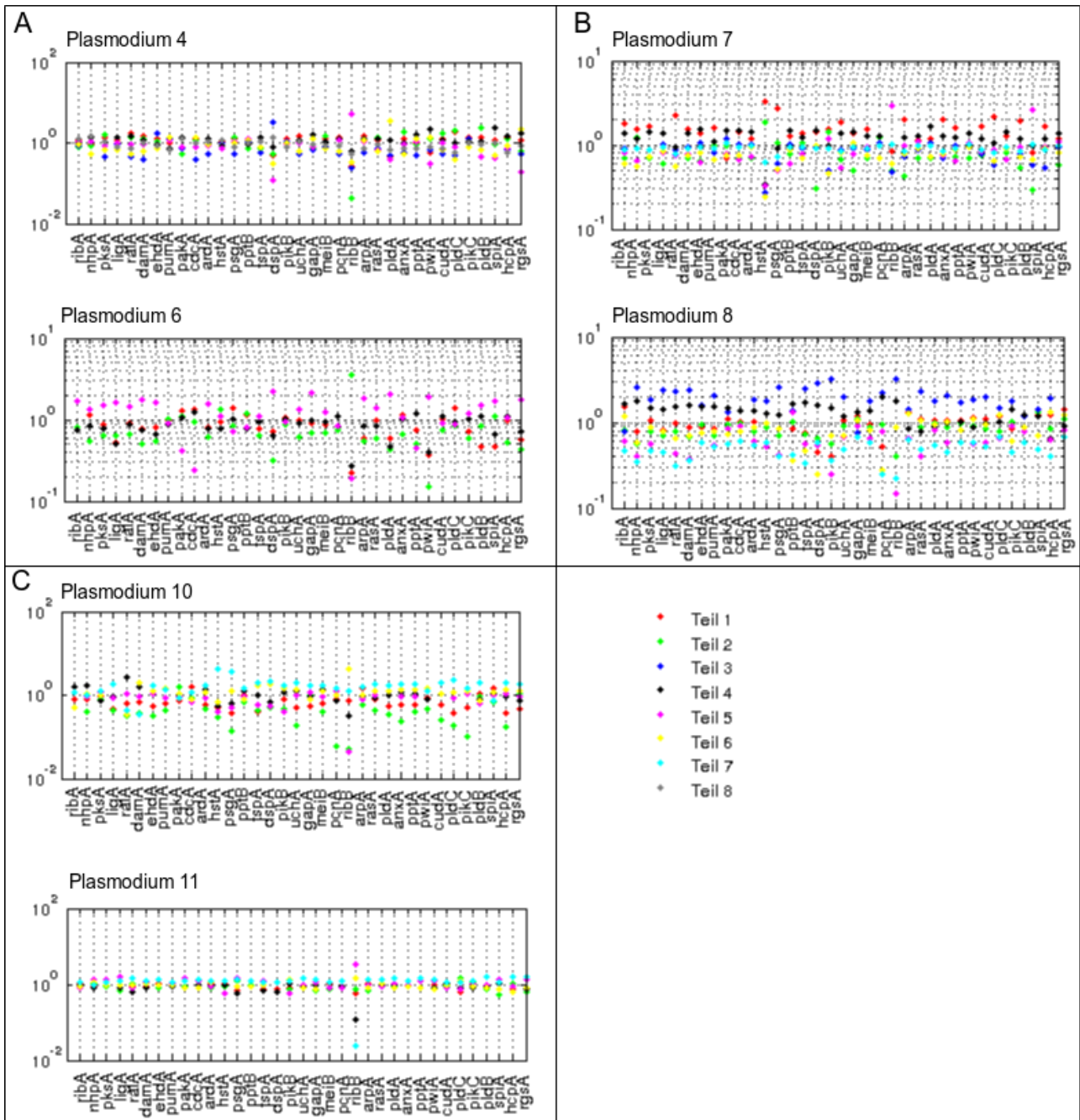


Abbildung 10: Vergleich der Transkriptmengen zwischen den einzelnen Achteln

Dargestellt sind die Ergebnisse für 3 Zeitpunkte: A = keine Stimulation, B=2,5h nach Belichtung und C = 7h nach dem Lichtstimulus. Für jeden Zeitpunkt stehen 2 Plasmodien zur Verfügung. Jede Platte wurde geachtet und die Zellprobe entnommen. Die Farbe der entsprechenden Teilstücke ist aus der Legende zu entnehmen. Dargestellt sind jeweils die normierten Gene bezüglich ihrer Mittelwerte.



### **5.1.2 Analyse des Einflusses der wiederholten Probenahme an einer Zelle auf das Genexpressionsniveau der Zelle**

Der letzte Schritt für die Etablierung von Experimenten zur Messung der Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellentwicklung einer einzelnen Zelle ist die Überprüfung des Einflusses der Probenahme mittels Schneiden auf das Transkriptionsverhalten der 35 Gene. Wie schon in den beiden vorangegangenen Experimenten wurde auch hier auf den Wildtypstamm zurückgegriffen. Für die Generierung der Gene standen 10 Plasmodien, die 6 Tage hungerten, zur Verfügung. Von jeder Zelle, die zuvor auf Platten mit wenigen Nährstoffen gewachsen ist, wurde entsprechend einem festen Zeitintervall 1/4 Zellmaterial entnommen und weggefroren. Die Zeitspanne war auf Dunkelprobe, 6 h und 11 h nach der Stimulation mit dunkelrotem Licht, festgelegt. Die Belichtung erfolgte für 40min. Das letzte Viertel diente der Überprüfung, ob eine Zelldifferenzierung stattgefunden hat, welche durch die Ausbildung von Sporen sichtbar war (Expressionsdaten siehe Tabelle 30+31 im Anhang).

Für die Analyse, ob Veränderungen im Expressionsverhalten auftreten, fand ein Vergleich mit den Daten aus dem bisherigen Probeentnahmeverfahren (Hoffmann 2012) und der 454-Sequenzierung (Barrantes et al. 2010) statt. Für das bereits verwendete Verfahren und die neu etablierte Methode wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft, ob eine Hoch- oder Runterregulation über die 11h hinweg stattgefunden hat. Der alpha-Wert betrug  $\leq 0,01$ . Die Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests, separat dargestellt für die einzelnen Zeitabschnitte. Grau hinterlegte Zeilen zeigen eine Diskrepanz zwischen der Standardmethode oder der 454-Sequenzierung mit der neuen Zeitreihenanalyse. Gene, bei denen eine Zelle mit einer +1 ausgefüllt ist, wurden hochreguliert, mit einer -1 versehene Gene wurden runterreguliert und bei mit einer Null versehenen Genen veränderte sich das Expressionsniveau in dem betrachteten Zeitraum nicht signifikant. Die Gene sind bezüglich ihrer Fragmentlänge und ihrer Regulationsänderung von runter- nach hochreguliert angeordnet.

Allgemein ist zu erkennen, dass die neue Methode im Vergleich zu den beiden bisherigen Vorgehensweisen lediglich in 3 Fällen eine komplett entgegengesetzte Regulation vermuten lässt. Betrachtet man die verschiedenen Zeitabschnitte, so zeigt sich bei dem Vergleich der Standardmethode mit der neuen Methode eine 83%ige Übereinstimmung zwischen 0h und 6h nach Belichtung, eine 77%ige Deckung zwischen 0h und 11h nach

dem Lichtstimulus sowie eine 71 %ige Kongruenz zwischen 6–11 h nach Belichtung.

Beim Vergleich mit der 454-Sequenzierung ergibt sich eine Übereinstimmung von 65%. Dazu ist zu beachten, dass die Konformität zwischen der Sequenzierung und der bisherigen Standardmethode ebenfalls nur eine 71 %ige Deckung erbrachte. Die Ursache liegt in der Methodik der 454-Sequenzierung. Schon vor der Analyse werden bei diesem Verfahren alle Proben zusammengefügt (gepoolt) und gemeinsam analysiert.

Damit lässt sich schlussfolgern, dass bis auf wenige Ausnahmen die Hoch- und Runterregulationen mit den Ergebnissen der Standardmethode und der 454-Sequenzierung übereinstimmen, und der mechanische Eingriff keine gravierenden Auswirkungen auf das Expressionsverhalten der untersuchten 35 Gene ausübt. Weiterhin offenbaren die Daten starke Schwankungen zwischen den einzelnen Plasmodien, die allesamt sporulierten. Daher sind Zeitserienexperimente an einer Einzelzelle sehr wichtig für die Identifizierung von Genen, die eine Zelle aus dem Gleichgewicht bringen können, ohne den Prozess der Sporulation zu beeinflussen.

Alle 3 Untersuchungen zeigen, dass die Durchführung einer Zeitreihe von einem Plasmodium möglich ist, da zum einen das Zellmaterial homogen auf der Platte verteilt ist, und zum anderen das Schneiden als Probenahmeverfahren keine signifikante Auswirkung auf die betrachteten 35 Gene hat.

Tabelle 10: Vergleich zweier Probenahmetechniken unter Verwendung der Transkriptionsverläufe

	Entwicklung zwischen 0h und 6h nach Belichtung		Entwicklung zwischen 6h und 11h nach Belichtung		Entwicklung zwischen 0h und 11h nach Belichtung		Entwicklung zwischen 0h und 6h nach Belichtung		
	Standard- methode <sup>1</sup>	neue Methode	Standard- methode <sup>1</sup>	neue Methode	Standard- methode <sup>1</sup>	neue Methode	Standard- methode <sup>1</sup>	neue Methode	454 Sequenzierung <sup>2</sup>
ribA	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0
nhpA	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
ralA	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
pumA	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
hstA	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
psgA	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
pikB	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
meiB	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
anxA	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
pIdC	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
cutA	-1	0	0	0	-1	0	-1	0	1
pcnA	-1	0	1	-1	0	-1	-1	0	-1
hcpA	-1	0	1	0	0	-1	-1	0	-1
ardA	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	0
uchA	0	0	-1	0	-1	0	0	0	-1
pikC	0	0	-1	0	-1	0	0	0	1
dspA	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
ribB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
damA	0	0	1	0	1	0	0	0	0
ispA	0	0	1	0	1	0	0	0	-1
pIdB	0	1	-1	-1	-1	-1	0	1	1
rasA	0	1	1	1	1	1	0	1	-1
pksA	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1
arpA	1	1	0	1	0	1	1	1	0
ligA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ehdA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pakA	1	1	0	1	1	1	1	1	1
cdcA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
gapA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pIdA	1	1	-1	1	1	1	1	1	1
pptA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pwIA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
spiA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rgsA	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Die Analyse bezüglich des Einflusses von Schneidevorgängen am Plasmodium auf das Expressionsprofil wird hier durch den Vergleich mit den Expressionsdaten aus der bereits etablierten Probenahme = Standardmethode (1) (Hoffmann 2012) vorgenommen. Der Expressionsverlauf wurde jeweils mithilfe des Mann-Whitney U-Tests ( $\alpha \leq 0,1$ ) für die verschiedenen Zeitpunkte DK-6h, 6h-11h und DK-11h charakterisiert. Hochregulationen sind mit +1, Runterregulationen mit -1 und keine signifikanten Veränderungen sind mit 0 dargestellt. Zusätzlich erfolgt der Vergleich mit der 454-Sequenzierung (2)(Barrantes 2010). Dunkelgrau hinterlegte Zeilen zeigen Unterschiede hinsichtlich der Regulation zwischen den Methoden.

## **5.2 Charakterisierung des Wildtyps #31 anhand von Zeitreihenanalysen bei Einzelzellen**

Für die Bewertung, inwieweit individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Plasmodien existieren (Hoffmann et al. 2012), erfolgt eine erneute Charakterisierung des Wildtypstammes. Der Unterschied zu der bereits stattgefundenen Charakterisierung von Hoffmann (2012) liegt in der Durchführung der Datengenerierung. So entstand eine Zeitreihe von einem Plasmodium. Zuvor wurde die Zeitreihe über verschiedene Plasmodien generiert. Zudem sollte bei der Charakterisierung von *Physarum polycephalum* auch der Einfluss der äußeren Bedingungen wie Hungerphase und Intensität des Lichtstimulus auf das Expressionsverhalten beobachtet werden. Zuletzt sollte eine Analyse von sporulierten und nicht sporulierten, aber belichteten Plasmodien Auskunft darüber geben, welche Gene für die Sporulation verantwortlich sein könnten, da diese bis jetzt noch nicht identifizierbar waren.

Damit ergaben sich<sup>2</sup> verschiedene Wildtypversuchsreihen zur Klärung und Analyse der oben genannten Schwerpunkte.

### **5.2.1 Analyse der Kontrollplasmodien**

Für die Typisierung der einzelnen Wildtypplasmodien war zunächst eine Charakterisierung von plasmodialen Zellen, die nicht belichtet wurden (= Dunkelproben), erforderlich. Hierbei sollten keine signifikanten Expressionsunterschiede hinsichtlich der 11h zu beobachten sein, damit alle signifikanten Änderungen bei den folgenden Experimenten Resultate der Stimulation mit dunkelrotem Licht sind. Sollten dennoch bereits Änderungen in den Dunkelproben auftreten, die identisch mit denen in belichteten Zellen sind, so ist dies auf Mechanismen zurückzuführen, die nicht durch die Belichtung aktiviert werden. Diese Gene würden dann nicht im Zusammenhang mit der Sporulation stehen und daher keine weitere Beachtung finden.

Für beide Wildtypexperimente waren jeweils mindestens 10 Plasmodien veranschlagt.

### Versuch A (Versuchsnummer: 18):

Die Kultivierung erfolgte wie bei den bereits beschriebenen Experimenten in Abschnitt 5.1. Für das Experiment standen 10 Plasmodien zur Verfügung, die 7 Tage hungerten. Zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 6h, 8h und 11h wurde jeweils etwas Material für die späteren Expressionsstudien in Stickstoff weggefroren, ohne die Plasmodien zu belichten. Kein einziges Plasmodium sporulierte spontan. Daraufhin wurde das übrige Sechstel, das der Kontrolle auf Sporulation dient, am darauffolgenden Tag mit dunkelrotem Licht induziert. Ein Tag später zeigten alle Plasmodien schwarze Sporen. Damit wären alle betrachteten plasmodialen Zellen zur Sporulation fähig gewesen. Während der RNA-Isolierung nach Kapitel 4.2 kam es jeweils zu einem Zellmaterialverlust eines Zeitpunktes bei den Plasmodien 1 und 2, die damit nicht für die weitere Analyse zur Verfügung standen (Genexpressionsdaten siehe Anhang, Tabelle 32+33).

### Versuch B (Versuchsnummer: 17):

Identisch zum Versuchsaufbau A erfolgte die Vorgehensweise in Versuchsreihe B. Von den 15 bearbeiteten Plasmodien sporulierten 6 Plasmodien spontan. Vorherige Studien zeigten, dass die Rate der Spontansporulation bei 10% liegt. In Versuchsreihe B lag die Rate mit 40% allerdings deutlich höher. Die Plasmodien 5 und 15 sporulierten bereits während der Probenahme. Durch die Belichtung am Tag darauf zeigte sich, dass lediglich 4 von 9 Plasmodien sporulierten. Materialverluste bei den Plasmodien 1, 2 und 8 während der Aufreinigung minimierten die Anzahl der Plasmodien für die Charakterisierung (Expressionsdaten siehe Tabelle 34+35 im Anhang).

Abbildung 11 zeigt die Hauptkomponentenanalyse (englisch: **P**inciple **C**omponent **A**nalysis = PCA) beider Versuchsreihen. Jeder Datenpunkt enthält die Gesamtinformation über alle 35 Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt eines Einzelplasmodiums. Die verschiedenen Zeitpunkte der Probenahme sind über die 5 Farben: rot (DK) – blau (2h) – grün (6h) – cyanblau (8h) – rosa (11h) nach Belichtungsdauer gekennzeichnet (Legende aus Abbildung 12). Jedes Plasmodium hat seine eigene Nummer. Durch die Nummerierung der Plasmodien kann eine Charakterisierung der Entwicklung der Transkriptmengen der einzelnen Plasmodien stattfinden. Die beiden Achsen zeigen die 2 Hauptkomponenten PC1 und PC2, mit denen es möglich ist, über 90% (Ergebnis der PCA) der Gesamtinformationen der gesamten Datenmenge, welche sich aus den Einzelplasmodien, den jeweils 5 Zeitpunkten für die Einzelzelle und der relativen mRNA-Menge der 35 Gene aus jeder Einzelzelle zu jedem einzelnen Zeitpunkt zusammensetzen,

wiederzugeben.

Die linke Grafik aus Abbildung 11 präsentiert die Ergebnisse von Versuchsaufbau A und die rechte Abbildung die Resultate von Versuchsteil B. Hierbei sind die Plasmodien, die trotz fehlender Rotlichtbestrahlung sporulierten, mit einem Sternchen gekennzeichnet (sind spontan sporuliert).

In beiden PCA's bilden die Daten jeder Einzelzelle ein eigenständiges Cluster. Eine Trennung bzw. ein Trend zwischen den Zeitpunkten der Probenahme ist bei den nicht sporulierten Plasmodien nicht erkennbar. Die Einzelplasmodien sind nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Probenahme kreisförmig angeordnet. Dieses Phänomen lässt auf ein konstantes mRNA-Level der 35 Gene schließen, da die Datenpunkte aus den Zeitreihen der einzelnen Plasmodien nicht weit voneinander angeordnet sind und auch kein Muster bezüglich der Reihenfolge in der Probenahme erkennbar ist, welches auf eine Änderung des Expressionsniveau schließen ließen. Der Mann-Whitney-U-Test im Anhang, Tabelle 24 bestätigt das konstante Expressionsniveau. Die Plasmodien 6, 8 und 10 aus dem Versuchsaufbau A sind in der PCA weiter entfernt angeordnet und scheinen damit in mindestens einem der 35 Gene über die 11h hinweg ein anderes mRNA-Level zu haben als die restlichen Plasmodien. Eine Analyse über die Clusterbäume, welche mithilfe der Programmiersprache R und der *Toolbox* *simprof* generiert wurden, ermöglicht eine Identifizierung der Gene, die in den betroffenen Plasmodien (6, 8, und 10) im Vergleich zu den restlichen Plasmodien ein anderes mRNA-Level aufweisen. Diese Gene haben in der Gegenüberstellung zu den anderen Plasmodien ein höheres Expressionsniveau, aber dennoch einen konstanten Verlauf.

Lediglich die spontan sporulierten Plasmodien (11, 12, 13 und 14) weisen eine räumlich-zeitliche Trennung der Datenpunkte der jeweiligen Einzelzellen im Diagramm auf (Abbildung 11), was auf eine Änderung der Expressionswerte, bei gleichzeitiger Betrachtung aller 35 Gene, zurückzuführen ist. Welches Gen welche Expressionsänderung vollzieht, ist hiermit jedoch nicht identifizierbar. Im Diagramm ist eine Trennung der einzelnen Probenahmezeitpunkte in den sporulierten Plasmodien erkennbar. Die Datenpunkte aus den Plasmodien 11 und 14 sind ähnlich lokalisiert und müssten damit eine ähnliche Änderung im Expressionsmuster der 35 Gene zeigen. Analog verhalten sich die Plasmodien 12 und 13. Auch hier sind die Datenpunkte von beiden sporulierten Plasmodien räumlich dicht beieinander angeordnet. Während die Datenpunkte der sporulierten Plasmodien in chronologischer Reihenfolge, entsprechend

ihrer Probenahme, angeordnet sind, und diese Entwicklung bei den nicht sporulierten Plasmodien nicht zu beobachten ist, scheint die räumliche zeitliche Entwicklung im Diagramm charakteristisch für sporulierte Plasmodien zu sein. Dies muss aber in nachfolgenden Experimenten noch bestätigt werden, ebenso wie die Clusterbildung der jeweiligen Einzelzelle. Zudem lassen sich bereits unterschiedliche Entwicklungsverläufe der einzelnen Plasmodien erkennen.

Festzuhalten bleibt: Alle beobachtbaren signifikanten Änderungen der mRNA-Mengen in den belichteten Experimenten stellen eine Reaktion auf den Lichtimpuls dar, da keine genregulatorischen Veränderungen für die betrachteten 35 Gene in den nicht belichteten Plasmodien vorhanden sind, das auch der Mann-Whitney-u-Test (Tabelle 25 im Anhang) bestätigt.

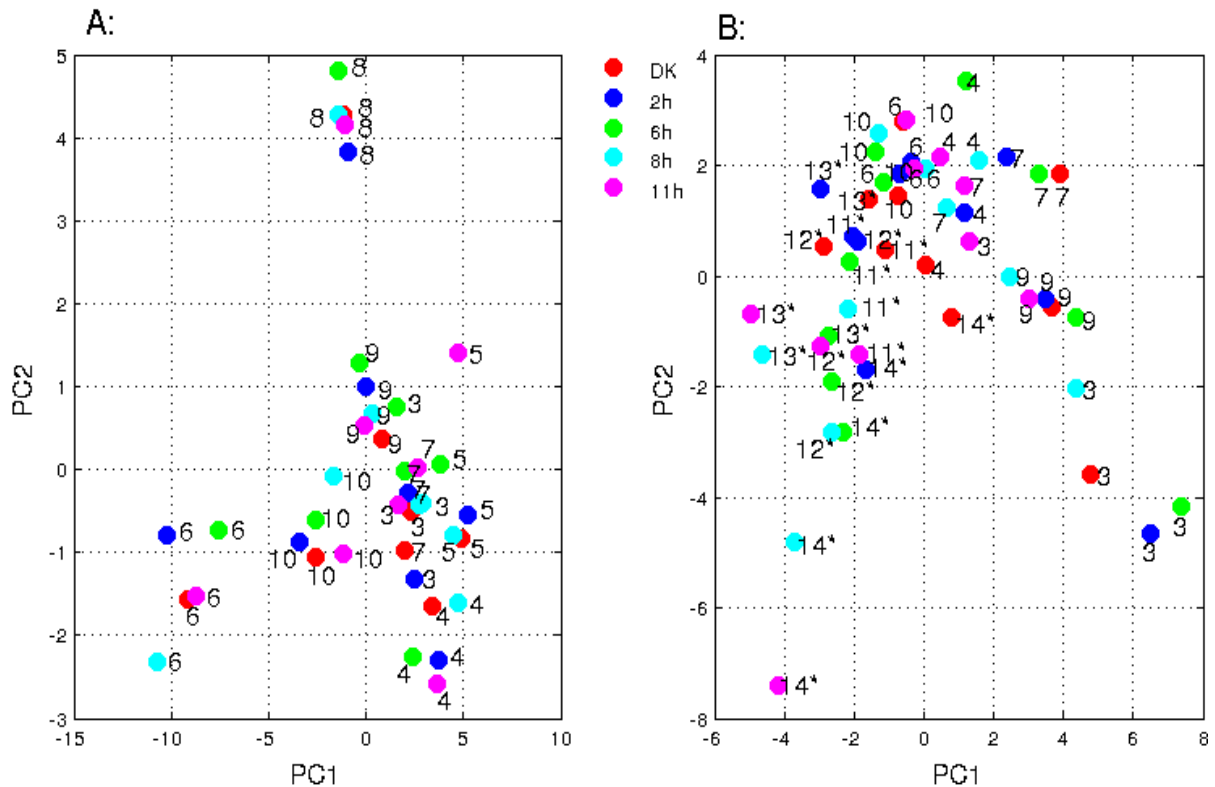


Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Kontrollplasmodien des Wildtypstammes #31

Dargestellt ist die Hauptkomponentenanalyse für die Kontrollplasmodien des Wildtypstammes. Jeder Punkt enthält die Gesamtinformation über das mRNA-Level der 35 Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt einer Einzelzelle. Die linke Abbildung (A) zeigt alle nicht belichteten Plasmodien von Versuchsaufbau A. Die Probenahme erfolgte zu folgenden Zeitpunkten: DK–2h–6h–8h–11h, die farblich jeweils verschieden dargestellt sind. Die Nummern entsprechen dem jeweiligen Einzelplasmodium. In der rechten Abbildung (B) sind die Ergebnisse aus Versuchsaufbau B dargestellt. Nicht belichtete Riesenzellen, die spontan sporulierten, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die Nummer an den Punkten dient der Identifikation der Einzelplasmodien. Die verschiedenen farblichen Punkte entsprechen den unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten. Die Zuordnung der Farben zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten ist der Legende zu entnehmen.



## 5.2.2 Identifikation von Hoch- und runterregulierten Genen

Zur Charakterisierung der Einzelzellen in Bezug auf ihre Individualität soll zunächst anhand des Wildtyps eine Identifizierung von hoch- und runterregulierten Genen stattfinden. Die Kultivierung (Versuch 15-B) erfolgte über eine 3,5 Tage andauernde Fermentation mit einem Animpfvolumen von 30ml Vorkultur. Nach der Fermentation und dem Überführen der Masse auf die Platte folgte eine Hungerphase von 7 Tagen im Dunkeln. Nach der ersten Probenahme (0h) wurden alle zwölf Plasmodien für 15min belichtet. Anschließend folgten 4 weitere Probenahmen zu den Zeitpunkten 2h, 6h, 8h und 11h jeweils von einem Plasmodium. Am Tag darauf wurde das letzte Sechstel hinsichtlich der Ausbildung von Fruchtkörpern untersucht, mit dem Ergebnis, dass alle 12 Platten sporulierten. Bei der anschließenden RNA-Isolierung, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, kam es zum Verlust eines Zeitpunktes bei den Plasmodien 1, 2 und 11, welche damit nicht für weitere Analysezwecke zur Verfügung standen (Expressionsdaten siehe Anhang, Tabelle 36+37). Die Generierung der Genexpressionsdaten erfolgte wie in Kapitel 4.3 und 4.4 beschrieben. Ein erster Blick auf das Ergebnis der PCA in Abbildung 12 zeigt eine räumliche Trennung der einzelnen Probenahmezeitpunkte. Auf der x-Achse ist die Komponente 1 (PC1) und auf der y-Achse die Komponente 2 (PC2) aufgetragen, womit mehr als 90% der Gesamtinformationen abgebildet sind (Ergebnis PCA). Bei allen Plasmodien sind die einzelnen Zeitpunkte der Probenahme von links nach rechts angeordnet (Abbildung 12). Kein einziges Plasmodium fällt aus diesem Schema heraus. Besonders auffällig ist die Trennung zwischen den ersten Probenahmen vor der Belichtung und 6h nach dem Lichtstimulus bzw. zwischen 6h und 11h nach Belichtung. Eine mögliche Ursache könnte in den Abständen zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten liegen. Eine gewisse Variabilität zwischen den einzelnen Plasmodien führt zu fließenden Übergängen zwischen den Zeitpunkten 0h/2h, 6h/8h sowie 8h/11h nach Belichtung.

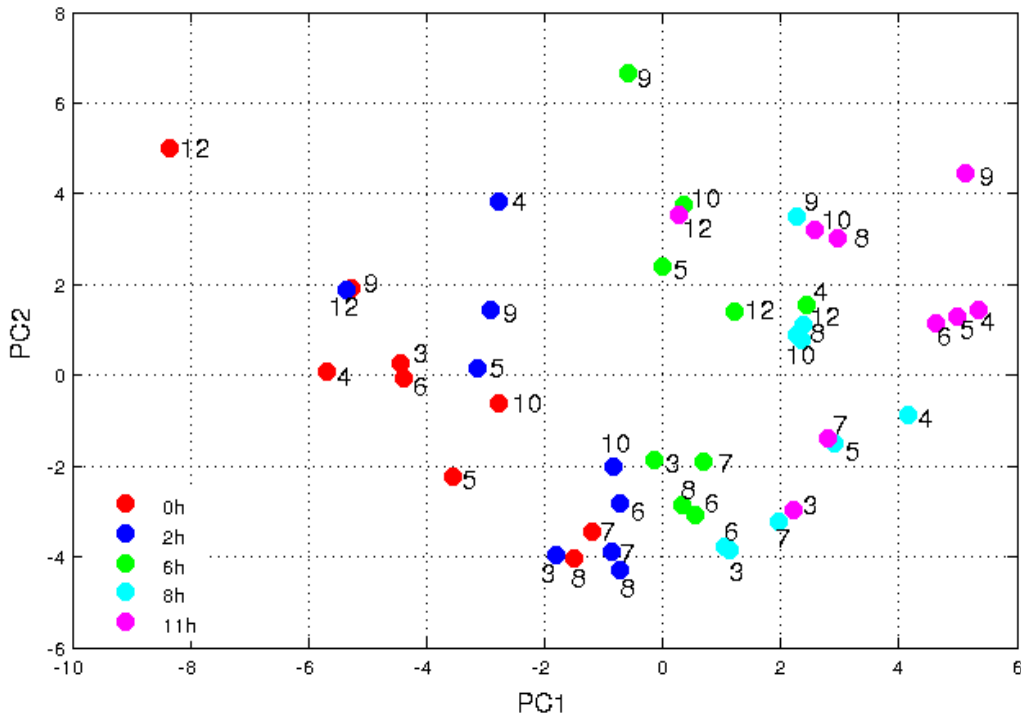


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse des sporulierten Wildtyps

Dargestellt sind sporulierte Wildtypplasmodien, die 7 Tage hungerten und 20min dunkelrotem Licht ausgesetzt waren. Die unterschiedlichen Farben der Kreise entsprechen dem Zeitpunkt der Probenahme. Die Zahlen dienen der Identifikation der Einzelzellen, welche durchnummeriert sind. Die Legende zeigt den Probenahmezeitpunkt mit der dazugehörigen Farbe.

Die nachfolgende Analyse mithilfe der Clusterbäume bestätigt die scheinbare Homogenität aus der PCA-Abbildung 12. In 25 Fällen (86% aller Gene) ist die Einheitlichkeit unter den Plasmodien so stark ausgeprägt, dass lediglich ein Cluster bei der Analyse mit simprof entstand. Bei weiteren 5 Genen ist jeweils ein Plasmodium separat geclustert. Für die restlichen 4 Gene sind die Plasmodien 3x in 3 Cluster gruppiert und einmal in 4 Cluster zerfallen. Diese Daten sind nicht extra dargestellt, da keine Besonderheiten zu beobachten waren.

Die Identifikation der hoch- bzw. runterregulierten Genen erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests zu folgenden Zeitintervallen: 0h–11h, 0h–6h, 6h–11h, 0h–2h, 2h–6h, 6h–8h und 8h–11h nach Belichtung. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Hochregulierte Gene sind mit +1 markiert, runterregulierte Gene mit -1 und nicht regulierte Gene mit 0 gekennzeichnet. Die Werte mit einem Sternchen entsprechen einem Vertrauensbereich von mindestens 95, aber kleiner als 99%. Die Anordnung der Gene in der Tabelle erfolgt von runterregulierten Genen über nicht veränderte Genexpressionen zu hochregulierten Genen. Gleichzeitig dient die Fragmentgröße als weiteres Anordnungskriterium. Bei der Analyse des gesamten

Zeitraumes 0–11h nach Belichtung zeigt die Tabelle 11 11 runterregulierte Gene, 12hochregulierte Gene und 12 Gene mit einem konstanten Expressionsniveau. Eine Gruppierung der Gene bezüglich ihrer Funktionseigenschaften ist nicht möglich. Das Verhalten der Genregulation in den weiteren Zeitabschnitten und deren Auswirkungen auf das Gesamtsystem sollen in Abschnitt 5.2.3 herausgearbeitet werden.

Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test: Der Wildtyp

Gen	Wildtyp 7 Tage hungern und 15 Minuten belichtet (9 Plasmodien)						
	0h–11h	0h–6h	6h–11h	0h–2h	2h–6h	6h–8h	8h–11h
<i>ribA</i>	-1	-1*	0	0	0	0	0
<i>nhpA</i>	-1	0	0	0	0	-1*	0
<i>ralA</i>	-1	-1	-1*	0	-1*	0	0
<i>pumA</i>	-1	-1	0	0	0	0	0
<i>psgA</i>	-1	-1	-1	0	-1*	-1	0
<i>pikB</i>	-1	-1*	0	0	0	-1*	0
<i>uchA</i>	-1	0	-1*	0	0	0	0
<i>meiB</i>	-1	-1*	0	0	0	0	0
<i>cudA</i>	-1	0	0	0	0	-1*	0
<i>pIdC</i>	-1	-1	0	0	-1*	0	0
<i>pIdB</i>	-1	0	0	0	0	-1*	0
<i>pksA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>damA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>ardA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>hstA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>pptB</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>tspA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>dspA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>pcnA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>ribB</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>rasA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>anxA</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>pikC</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>ligA</i>	1	1	1	0	1	0	0
<i>ehdA</i>	1	1	0	0	1*	0	0
<i>pakA</i>	1	1	0	0	1*	0	0
<i>cdcA</i>	1	1	0	0	1*	0	0
<i>gapA</i>	1	1	1*	0	1	0	0
<i>arpA</i>	1	1*	0	0	1	0	0
<i>pIdA</i>	1	1	0	0	1*	0	0
<i>pptA</i>	1	1	0	1	0	0	0
<i>pwiA</i>	1	1	0	0	1*	0	0
<i>spiA</i>	1	1	0	0	1	0	0
<i>hcpA</i>	1	1	0	0	1	0	0
<i>rgsA</i>	1	1	0	0	1	0	0

Die Tabelle zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene für 6 verschiedene Zeitintervalle gemäß Mann-Whitney-U-Test. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 markiert, runterregulierte Gene mit -1 und nicht regulierte Gene mit 0. Die Werte mit einem Sternchen entsprechen einem Vertrauensbereich von  $\geq 95\% - < 99\%$ .

### 5.2.3 Identifikation von früh- und spätregulierenden Genen

Für die Charakterisierung des Wildtypstammes ist es nicht nur wichtig zu wissen, welche Gene wie reguliert werden, sondern auch wann und wie schnell der Prozess abläuft. Dies ist für die spätere Übertragung der Ergebnisse bzw. für einen gezielten Eingriff in den Regulationsmechanismus von Zellen wichtig. Es ist bereits bekannt, dass es sowohl früh regulierte Gene gibt, die nach Belichtung zeitnah eine signifikante Expressionsveränderung vollziehen, als auch spät regulierte Gene, bei denen die Änderung des Expressionsniveaus wesentlich später einsetzt.

Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests aus Tabelle 11 verdeutlichen eine sehr frühe Regulation von hochregulierten Genen. Noch vor dem Erreichen des *committed*-Stadiums sind alle Gene, die am Ende ein höheres Expressionsniveau haben als zu Beginn, hochreguliert. Für die runterregulierten Gene konnte dagegen die Einteilung in vor oder nach dem „*Point of no return*“ (Tabelle 11) nicht bestätigt werden.

Tabelle 11 aus 5.2.2 zeigt jedoch nicht nur Hoch- und Runterregulierte Gene, sondern ermöglicht ebenfalls eine Aussage über die Geschwindigkeit der Regulationsvorgänge. Bei langsam regulierten Genen erfolgt die Veränderung allmählich. Eine signifikante Veränderung ist nur über mehrere Zeitabschnitte hinweg erkennbar. Zu dieser Gruppe gehören Gene wie *pumA*, *ribA*, *meiB* und *uchA* (Tabelle 11). Im Unterschied dazu ist für schnell regulierte Gene eine signifikante Änderung des Expressionsniveaus bereits während eines einzigen Zeitabschnitts erkennbar.

Eine Zusammenfassung der zeitlich abhängigen Regulation von Genen ist in Abbildung 13 dargestellt. Runterregulierte Gene befinden sich oberhalb und hochregulierte Gene unterhalb der Zeitachse. Jeweils der erste Zeitpunkt einer signifikanten Änderung in einem Gen ist entsprechend markiert.

Auffällig ist die außerordentlich frühe Regulation der Phosphatase *pptA* (Abbildung 13). Eine signifikante Änderung des Expressionsniveaus ist bereits im ersten Zeitabschnitt, d. h. 0–2 h nach Belichtung, zu verzeichnen.

Der Zeitpunkt 6h nach Belichtung scheint ein kritischer Punkt für die Änderung des Expressionsniveaus der hochregulierten Gene zu sein. Mit Ausnahme der beiden Gene *ligA* und *gapA* enden zum Zeitpunkt des „*Point of no return*“ die regulatorischen Änderungen der hochregulierten Gene. Damit scheint der Zeitpunkt des *committed*-

Stadiums 2 verschiedene Bedeutungen für die Regulation von Genen in den Plasmodien zu haben. Zum einen beenden hochregulierende Prozesse ihre Aktivität und zum anderen starten zeitgleich runterregulierende Vorgänge in den Zellen. Ob möglicherweise eine der beiden Gruppen eine stärkere Bedeutung für den Sporulationsprozess besitzt, soll durch einen Vergleich von sporulierten und nicht sporulierten, aber belichteten Wildtypplasmodien im Kapitel 5.2.4 erfolgen.

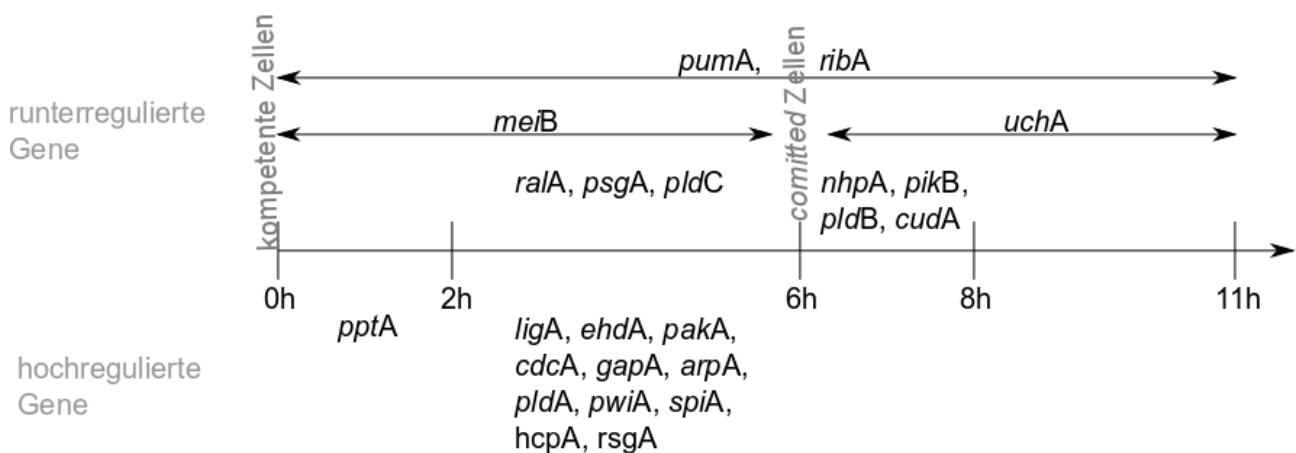


Abbildung 13: Einteilung von früh- und spätregulierenden Genen

Die Abbildung basiert auf dem U-Test aus Tabelle 12. Dargestellt ist jeweils der erste Zeitabschnitt, in dem eine signifikante Änderung mit einem Vertrauensbereich von mindestens 95 % aufgetreten ist.

## 5.2.4 Vergleich zwischen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien

Die Auswahl der 35 Gene beruhte auf möglichen Genen, die an der Sporulation beteiligt sind. Bis jetzt konnte aber über die Charakterisierung nicht eindeutig festgelegt werden, ob alle Gene wirklich an der Sporulation beteiligt sind. Zur Klärung, welche Gene für die Sporulation von Bedeutung sind, muss nun ein Vergleich zwischen sporulierten und nicht sporulierten, aber belichteten Plasmodien erfolgen.

Damit nicht alle Plasmodien sporulieren, wurde die Belichtungslänge mit dem dunkelroten Licht auf 2min bzw. 5min reduziert. Die restlichen Bedingungen während der Fermentation, der Hungerphase und der Probenahme blieben identisch zu den vorangegangenen Experimenten. In der Versuchsanordnung mit 2min Rotlichtbestrahlung reduziert sich aufgrund von Zellmaterialverlust bei der RNA-Aufreinigung nach Kapitel 4.2 der

Probenumfang um 2 Plasmodien (Expressionsdaten siehe Anhang 38+39). Somit stehen für diese Quantifizierung 9 sporulierte Plasmodien, die jeweils 2min belichtet sind, 11 sporulierte Plasmodien, die 5min belichtet sind, sowie 18 nicht sporulierte Plasmodien mit je 9 Proben pro Belichtungsintensität zur Verfügung (Expressionsdaten siehe Anhang, Tabellen 40 und 41).

Da bereits die Ergebnisse aus Kapitel 5.2.1 zeigten, dass die PCA die Datenpunkte der sporulierten von den nicht sporulierten Plasmodien trennen kann, wird diese Methode auch hier wieder verwendet.

Die Ergebnisse der PCA zeigen gravierende Unterschiede zwischen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien in der räumlichen Anordnung der einzelnen Plasmodien im Koordinatenraum (Abbildung 14). Die Daten aus den sporulierten Plasmodien (Abbildung 14 oben rechts) zeigen eine zu der PCA-Abbildung 14 identische Trennung der Probenahmezeitpunkte 0h–2h–6h–8h–11h nach dem Lichtstimulus. Alle Plasmodien vollziehen eine Änderung des Expressionsniveaus, die sich in der Anordnung der einzelnen Probenahmezeitpunkte jedes Einzelplasmodiums widerspiegelt. So befinden sich die ersten Probenahmezeitpunkte am oberen Rand des Diagramms und die letzten Zeitpunkte der Probenahme am unteren Rand. Es gibt also eine Änderung der Transkriptmengen im Laufe des Differenzierungsprozesses in den Plasmodien. Die räumlich-zeitliche Trennung der Datenpunkte ist bei den sporulationsnegativen Plasmodien (Abbildung 14 unten links) nicht zu beobachten. Diese zeigen eine vergleichbare Anordnung zu den Kontrollplasmodien (Abbildung 14 unten rechts), die ebenfalls nicht sporulierten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen liegt in der Anordnung der Einzelplasmodien zueinander. Die nicht sporulierten Plasmodien scheinen in ihrem Expressionsprofil einander ähnlicher zu sein als die Kontrollplasmodien, welche in einzelne Cluster zerfallen. Die Daten der nicht sporulierten Plasmodien sind dagegen sehr eng beieinander angeordnet. Für eine Analyse der Gene, welche in ihrem Expressionsniveau eine Änderung vollziehen, eignet sich erneut die Clusterbaummethode.

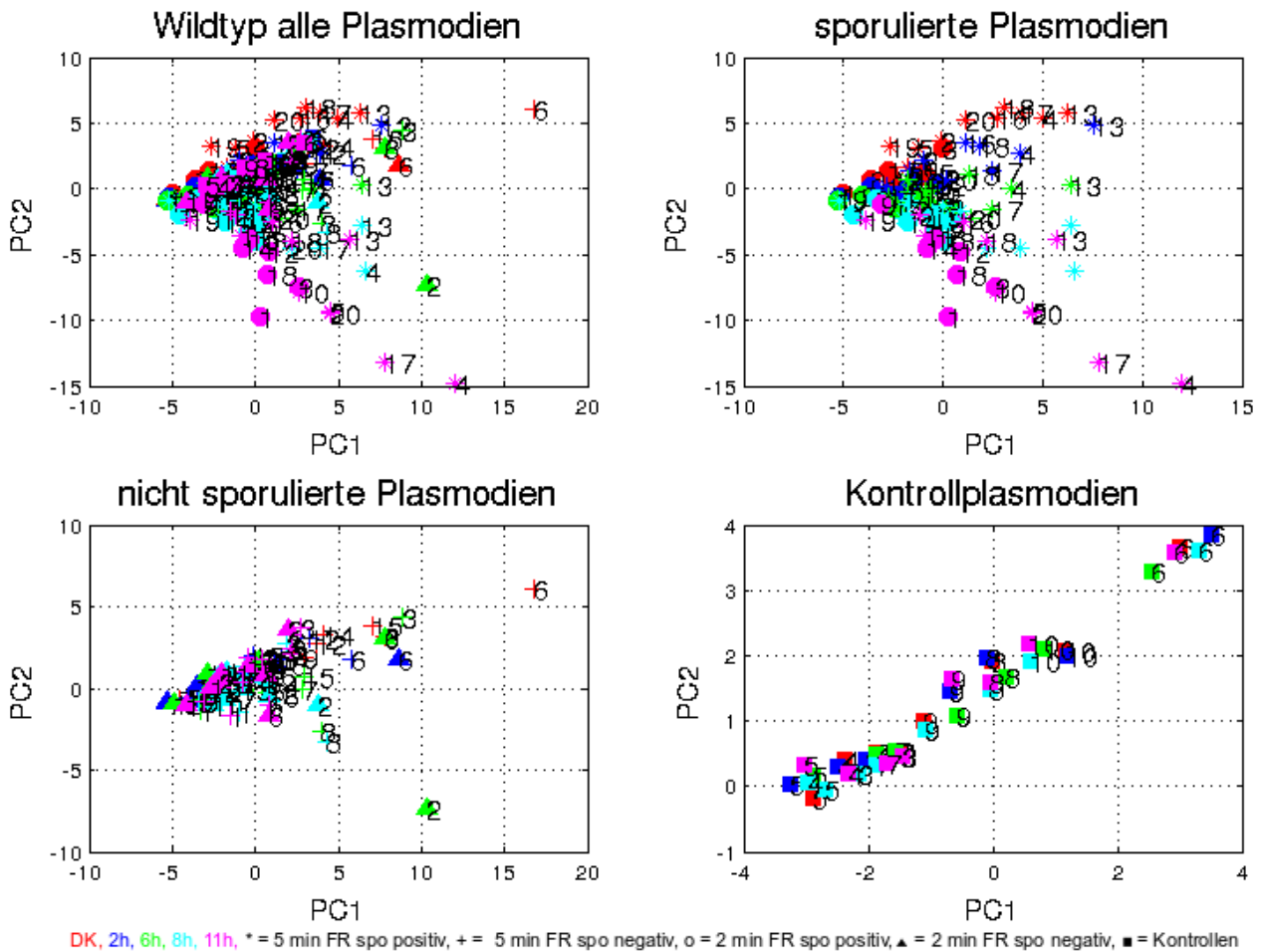


Abbildung 14: Vergleich sporulierte und nicht sporulierte Wildtypplasmodien mittels der Hauptkomponentenanalyse

Verglichen werden sporulierte Plasmodien, nicht sporulierte Plasmodien und nicht belichtete Plasmodien. Die Legende unterhalb der Abbildungen zeigt, wie die verschiedenen Plasmodien gekennzeichnet sind. Die obere linke Abbildung enthält alle Plasmodien: die sporulierten, nicht sporulierten, sowie die Kontrollplasmodien. Die 3 weiteren Abbildungen zeigen jeweils den Ausschnitt der einzelnen Klassen aus der Gesamtabbildung.

Betrachtet man die PCA einzeln für jedes der untersuchten Plasmodien und trennt diese nach sporulierten und sporulationsnegativen Plasmodien, werden die unterschiedlichen Trajektorien bezüglich der Entwicklung der mRNA-Menge über die Zeit besonders deutlich sichtbar (Abbildung 15). Während die Daten der sporulierten Plasmodien eine ähnliche Anordnung der einzelnen Probenahmezeitpunkte zeigen – von der linken unteren Ecke zur oberen rechten Bild Ecke (Abbildung 15, linke Spalte) –, ist solche einheitliche Tendenz bei den sporulationsnegativen Plasmodien nicht zu beobachten (Abbildung 15, rechte Spalte). Bei den meisten nicht sporulierenden Plasmodien sind die einzelnen Zeitpunkte der Probenahme kreisförmig angeordnet. Eine minimale Änderung des Expressionsniveaus scheint also stattzufinden, dass aber 11h nach Belichtung noch nahezu dem Anfangszustand entspricht.

Gleichzeitig ist zu beobachten, dass die nicht sporulierten Plasmodien sich entgegengesetzt verhalten wie die sporulierten Plasmodien. So ist die Anordnung der Probenahmezeitpunkte bei den sporulierten Plasmodien generell von links unten nach rechts oben, wohingegen bei den nicht sporulierten Plasmodien die Daten der Zeitpunkte entweder von links oben nach rechts unten oder von rechts unten nach links oben angeordnet sind. Auch die Distanz zwischen den einzelnen Zeitpunkten ist bei den sporulierten Plasmodien um ein Vielfaches größer als bei den nicht sporulierten Plasmodien.

Außerdem zeigt sich die Individualität bei der Betrachtung der einzelnen Plasmodien zueinander, egal ob sporulierte oder nicht sporulierte Plasmodien. Die Diagramme zeigen keine einzige Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Plasmodien. In den beiden folgenden Kapiteln 5.5 und 5.6 soll nach der Ursache für die hier herausgestellte Individualität der Plasmodien geforscht werden.



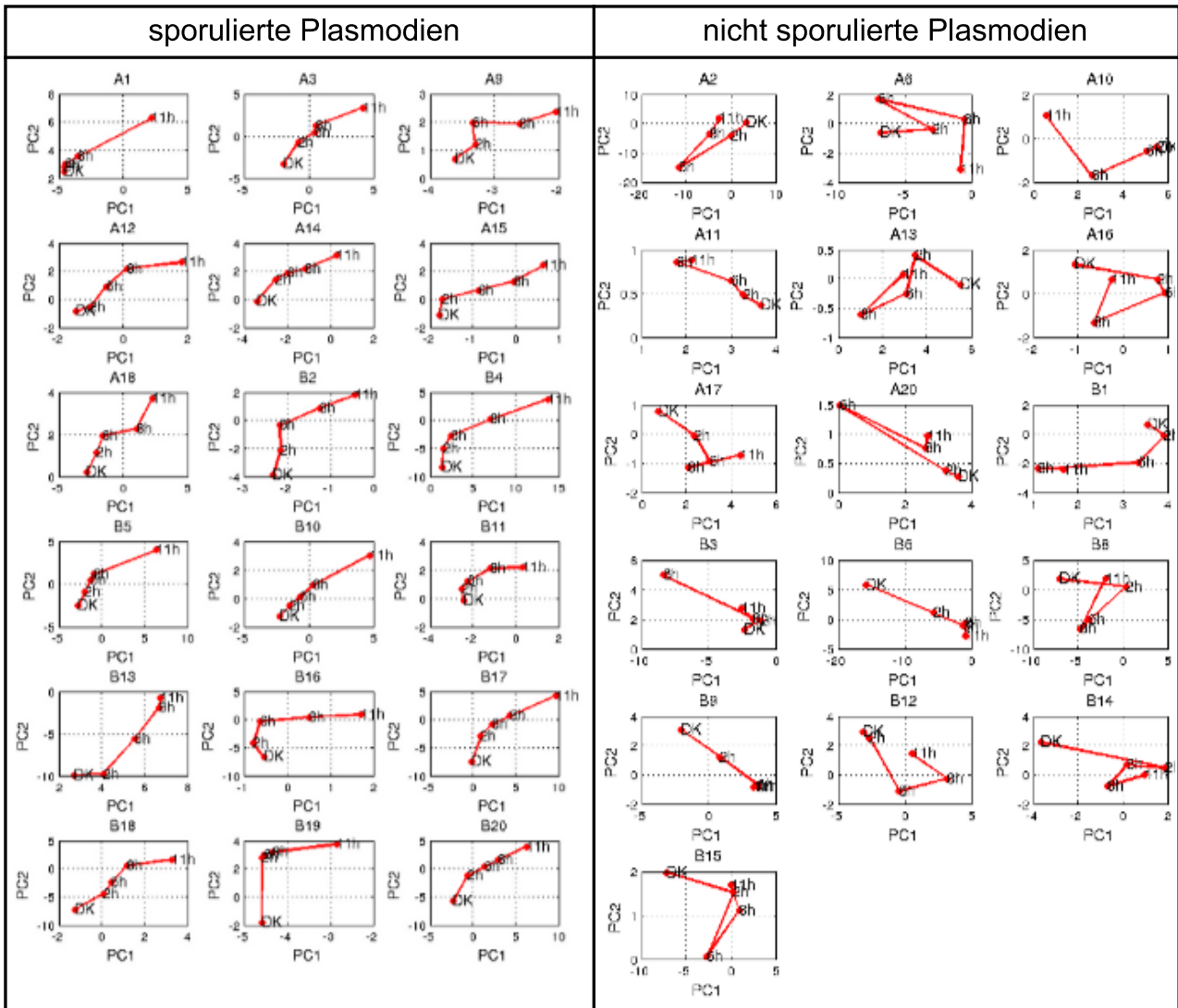


Abbildung 15: Vergleich der Expressionsverläufe zwischen allen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien

Die Abbildung zeigt links alle sporulierten Plasmodien und rechts alle nicht sporulierten Plasmodien. Die Buchstaben A und B stehen für 2 min (A) bzw. für 5 min (B) Bestrahlung mit dunkelrotem Licht.

Auch der Mann-Whitney-U-Test bestätigt die Divergenz zwischen den sporulierten und den nicht sporulierten Plasmodien. Die Tabelle 12 zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene getrennt nach sporulierten, nicht sporulierten und nicht belichteten Plasmodien für 6 verschiedene Zeitintervalle nach der Analyse der Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 und rot markiert, runterregulierte Gene mit -1 und grün markiert und nicht regulierte Gene haben den Eintrag 0. In den Kontrollplasmodien, die nicht mit dem dunkelroten Licht induziert wurden, finden keine signifikanten Genexpressionsveränderungen statt. Ein vergleichbares Bild ist bei den nicht sporulierten Plasmodien feststellbar: Auch hier ist keine einzige signifikante Runterregulation erkennbar. Lediglich folgende 3 Gene sind hochreguliert: *cdcA* (Gen 10), *pldA* (Gen 25) und *pptA* (Gen 27).

Diese Regulationsweise stimmt mit derjenigen der sporulierten Plasmodien überein.

Tabelle 12: Vergleich zwischen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests

sporulierte Plasmodien																																				
Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
DK-6h	-1	-1	0	0	-1	0	0	0	1	1	0	1	-1	0	0	0	-1	0	1	-1	0	0	1	0	1	0	1	1	-1	-1	0	-1	1	1	1	1
6h-11h	-1	-1	0	-1	-1	0	1	1	1	1	0	1	-1	0	0	0	-1	0	1	-1	0	0	1	0	1	0	1	1	-1	-1	0	-1	0	1	1	1
DK-2h	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
6h-8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
8h-11h	-1	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-1	0	0

nicht sporulierte Plasmodien																																					
Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
DK-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DK-2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h-8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Kontrollplasmodien																																						
Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35			
DK-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DK-2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h-8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene bezüglich des Mann-Whitney-U-Tests für sporulierte, nicht sporulierte und nicht belichtete Plasmodien. Betrachtet wurden 6 verschiedene Zeitintervalle. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 und rot markiert, runterregulierte Gene mit -1 und grün markiert und nicht regulierte Gene haben den Eintrag Null.

Spielen diese Gene damit für den Prozess der Sporulation eine untergeordnete oder sogar gar keine Rolle? Die Beantwortung dieser Frage erfordert einen Vergleich zwischen den einzelnen Plasmodien hinsichtlich ihres Genexpressionsverlaufs, wie in Abbildung 16 dargestellt. Die Daten der sporulierten Plasmodien sind jeweils in Rot dargestellt, die Daten der nicht sporulierten Plasmodien in Blau. Auf der x-Achse befinden sich die 5 Zeiten der Probenahme vor und nach Belichtung mit dunkelrotem Licht. Die Werte der relativen mRNA-Menge sind auf der y-Achse abzulesen. Bereits ein erster Blick lässt erkennen, dass die Expressionswerte der sporulierten Plasmodien einen stärkeren Anstieg aufweisen als die nicht sporulierten Plasmodien. Die Regulation des am Zellzyklus beteiligten Gens *cdcA* (NCBI-Datenbank) unterscheidet sich zwischen den sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien ab der 2h nach Belichtung. Während eine kontinuierliche Hochregulation in den sporulierten Plasmodien bis zu einem Wert zwischen 0,5 und 4,5 zu beobachten ist, bleibt das Expressionsniveau bei den nicht sporulierten Plasmodien relativ konstant bei ca. 0,3 (Abbildung 16 linkes Bild). Der Vergleich zwischen dem Anfangs- und Endlevel zeigt keine signifikante Änderung der relativen mRNA-Menge von *cdcA* bei den sporulationsnegativen Plasmodien im Zeitintervall 0–11h nach Belichtung.

Ähnliches ist bei dem Gen *pptA* (Abbildung 16 rechtes Bild) zu beobachten. Auch hier steigt die mRNA-Menge in den sporulierten Plasmodien bis auf einen Wert zwischen 1 und 9 kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu weisen die sporulationsnegativen Plasmodien bis auf wenige Plasmodien ein kontinuierliches Expressionsniveau von ca. 0,5 auf.

Bei dem Gen *pldA* (Abbildung 16 mittlere Grafik) schwanken die relativen mRNA-Mengen in den nicht sporulierten Plasmodien zwischen 2h und 8h nach dem Lichtstimulus stark, erreichen aber nach 11h Belichtung ein ähnliches Expressionsniveau wie zu Beginn der ersten Probeentnahme. Dies ist ein erheblicher Kontrast zu den sporulierten Plasmodien.

Die festgestellten differenziellen Regulationen der 3 Gene (*cdcA*, *pldA* und *pptA*) könnten, jeweils separat betrachtet, entweder eine Folge der Determination der Zelle zur Sporulation sein oder aber auch eine Voraussetzung für eine solche Sporulation darstellen.

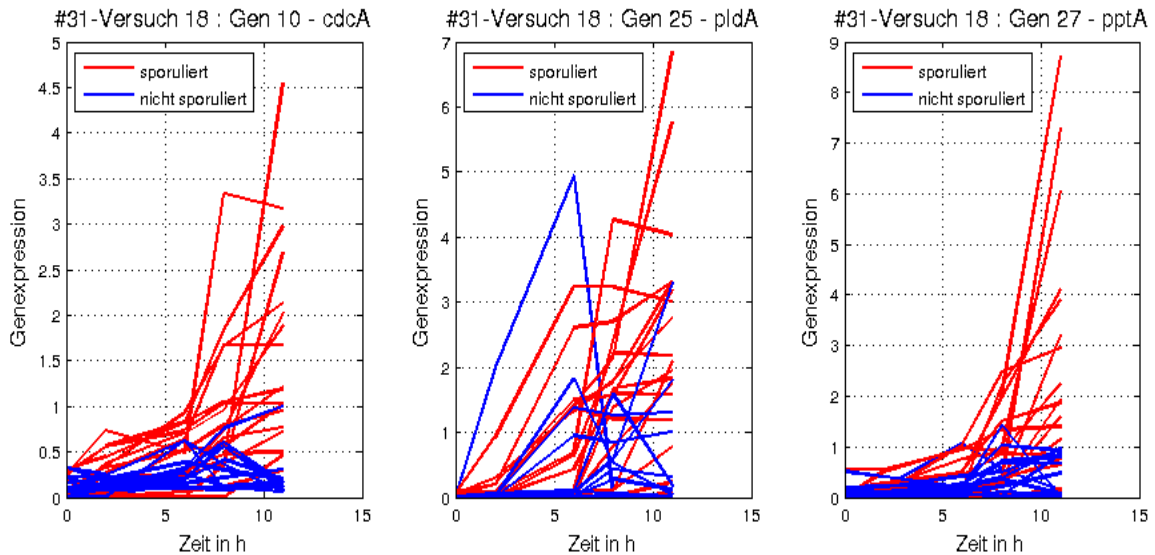


Abbildung 16: Darstellung der Expressionsverläufe der auffälligen Gene

Dargestellt sind die Expressionsverläufe der auffälligen Gene aus der U-Test-Analyse über einen Zeitraum von 11 h. Sporulierte Plasmodien sind in Rot und nicht sporulierte Plasmodien in Blau dargestellt.

## 5.2.5 Einfluss der Hungerperiode und der Lichtintensität auf das Expressionsprofil

Ob äußere Bedingungen das dynamische System der Genregulation der ausgewählten 35 Gene beeinflussen, soll mithilfe eines Vergleiches verschieden langer Hungerphasen und Belichtungsintensitäten an *Physarum polycephalum* getestet werden. Sollte einer dieser Faktoren, Hungerphase oder Lichtintensität, einen Einfluss auf das Expressionsmuster der Plasmodien haben, bietet dies einen Ansatz dafür, die Plasmodien durch veränderte Umweltreize einfach und gezielt in einen anderen Zustand zu bringen.

Dazu fand eine Versuchsreihe mit Änderungen der oben genannten Bedingungen statt. Zunächst wird zwischen 6- und 7-tägigen Hungerphasen unterschieden. Zusätzlich kommen unterschiedliche Belichtungszeiten zum Einsatz. Bei 6 Tage gehungerten Plasmodien findet eine Klassifizierung der Proben in 10min, 20min und 30min lange Belichtungsphasen statt (Versuch 11-A, 11-B, 11-C, Expressionsdaten siehe Tabelle 42,43,44 und 45 im Anhang). Für die 7 Tage gehungerten Plasmodien erfolgt die Differenzierung in 5min und 15min Rotlichtbestrahlung (Versuch 15-A und 15-B, Genexpressionsdaten siehe Tabelle 46,36 und 37 im Anhang).

Nach der Generierung der Expressionswerte, wie in Kapitel 4.3 und 4.4 beschrieben,

erfolgt eine Mittelwertbildung über alle Zeitpunkte aller Plasmodien für jedes der 35 Gene, getrennt jeweils nach dem Belichtungszeitraum und der Hungerperiode. Damit ergeben sich jeweils 5 Mittelwerte für jeden Zeitpunkt. Diese Mittelwerte der einzelnen Teilversuche werden dann in einen Clusterbaum überführt, der eine Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen Hungerperiode und Belichtungsintensität ermöglicht.

Zur Abbildung des Merkmales (Mittelwert des einzelnen Teilversuches) dient die x-Achse. Die y-Achse hilft bei der Bestimmung des Abstandes zwischen den einzelnen Clustern bezüglich des Fusionierungsalgorithmus (Kapitel 2.3.2.2). Mithilfe von Farben werden die unterschiedlichen Fusionierungen angezeigt. So erhalten Teile, die zu einer gleichen Fusionierung gehören und damit keine signifikanten Unterschiede untereinander aufweisen, eine identische Farbe. Schwarze Linien verbinden anschließend die verschiedenen Cluster, die sich signifikant voneinander unterscheiden, zu einem Baumdiagramm. In den betrachteten Clusterbäumen gibt es bis zu 3 verschiedene Farben, also Hauptcluster, die untereinander signifikante Unterschiede in einzelnen Genen hinsichtlich bestimmter Kultivierungseigenschaften aufweisen. Zusätzlich sind die alpha-Werte für die signifikanten Unterschiede dargestellt. Als Ergebnis der signifikanten Clusteranalyse ergeben sich 6 Gene, bei denen die veränderten äußeren Bedingungen Einfluss auf das Expressionsniveau ausüben (Abbildung 17). In allen restlichen untersuchten Genen entsteht lediglich ein einziges Cluster, womit keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsbedingungen erkennbar sind und somit auch nicht abgebildet werden.

In 4 von 6 Fällen findet die Trennung anhand der Hungerphase statt. Lediglich bei den Genen *pksA* und *ribB* scheint auch die Belichtungsintensität eine zusätzliche Rolle zu spielen. Die Mittelwerte der Gruppe „6 Tage Hungern und 30min Belichtung“ werden in der Hälfte der betrachteten Fälle sehr dicht an die 7 Tage gehungerten Plasmodien oder zwischen beiden Hungerphasen geclustert. Die Daten der 6 Tage gehungerten Plasmodien, die entweder 10min oder 20min lang mit dunkelrotem Licht bestrahlt wurden, sind durchgehend zusammenhängend gruppiert (Abbildung 17).

Worin sich die einzelnen Cluster unterscheiden, soll über die Betrachtung der gemittelten Expressionsdaten der einzelnen Teilversuche über die Zeit betrachtet erfolgen.

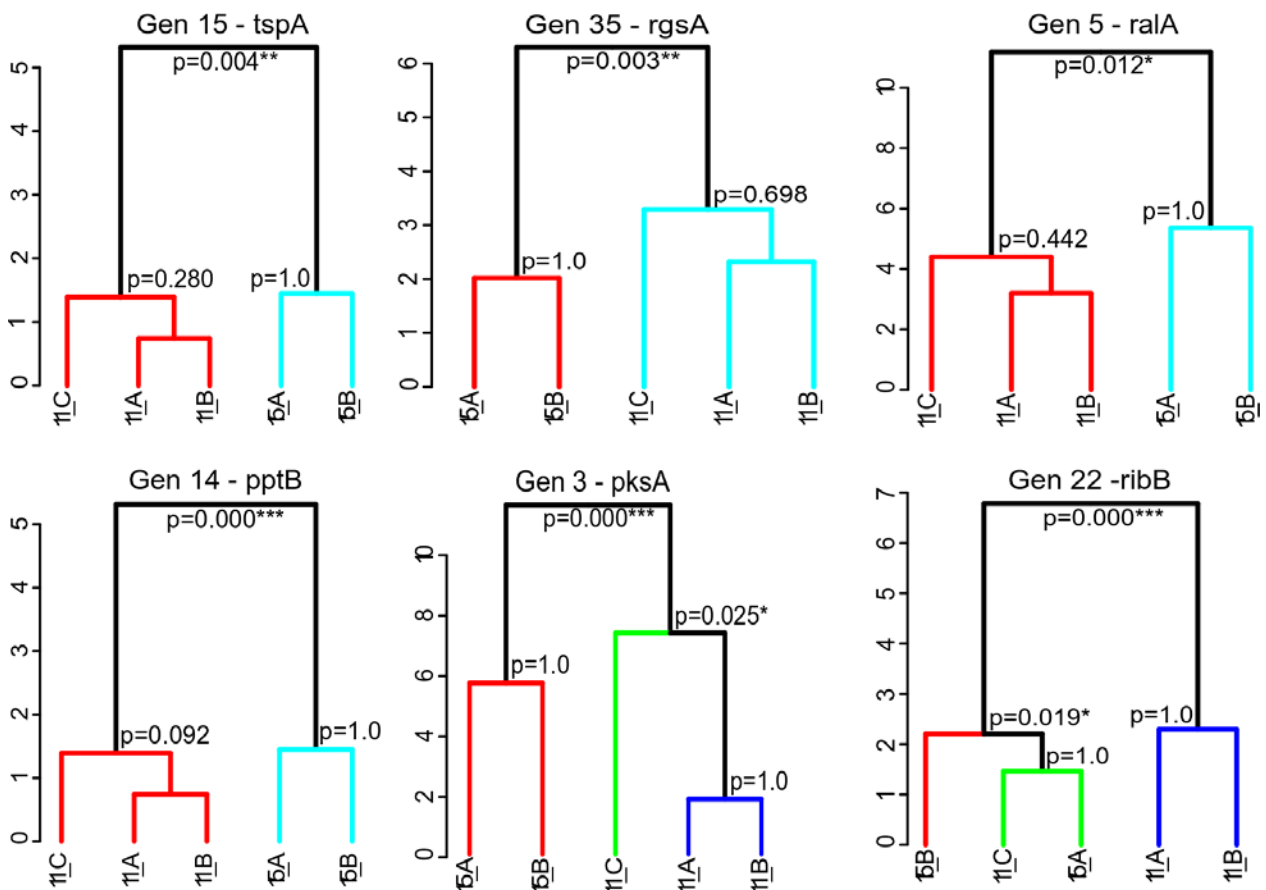


Abbildung 17: Analyse des Einflusses der Hungerphase

Die signifikante Clusteranalyse erfolgte in der Programmiersprache R mit der Toolbox *simprof*. Bezüglich jeder Experimentalserie wurde der Mittelwert über jedes Gen gebildet. Die Daten, die nach der Analyse mit R eine Trennung zwischen 6 Tage und 7 Tage Hungern zeigen, sind oben abgebildet. Der Teilversuch, der mit 11 gekennzeichnet ist, umfasst alle Plasmodien, die 6 Tage lang einer Hungerphase ausgesetzt waren. Die Teilversuche, die mit 15 markiert sind, beinhalten alle Plasmodien, die 7 Tage hungerten. Bei Versuch 11 wurden die Plasmodien 10 min (A), 20 min (B) oder 30 min (C) mit dunkelrotem Licht bestrahlt. Die 7 Tage gehungerten Plasmodien wurden nach der Hungerphase 5 min (A) oder 15 min (B) dunkelrotem Licht ausgesetzt. Die verschiedenen Farben zeigen, welche der Teilversuche signifikante Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Gene aufweisen. Teilversuche, die mit der gleichen Farbe markiert sind, zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Wahl der Farbe wird vom Programm festgelegt und richtet sich danach, wie viele Cluster jeweils abgebildet werden. Der p-Wert gibt die Signifikanz an zwischen den einzelnen Teilversuchen.

Ausgehend von der Clusteranalyse sind die Mittelwerte für die entsprechenden Gruppierungen in Abbildung 18 dargestellt. Die Farbauswahl entspricht hierbei den Clusterfarben aus Abbildung 17. Folgendes wird anhand der Abbildung deutlich:

Die Plasmodien haben nach einer 7-tägigen Hungerperiode für die Gene *pksA*, *pptB* und *tspA* ein höheres Expressionsniveau (blaue Kurve) als bei Plasmodien, die 6 Tage hungerten (rote und grüne Kurve, Abbildung 18A, 18D, 18E). Funktional sind diese 3 Gene am Zellzyklus beteiligt oder fungieren als Phosphatasen (NCBI-Datenbank). Beim Gen *ralA*, das für die Signaltransduktion verantwortlich ist (NCBI-Datenbank), haben ebenfalls die 7 Tage gehungerten Plasmodien (blaue Kurve) einen höheren Startexpressionswert als

die 6 Tage gehungerten (rote Kurve). Bei den letzten Probenahmen, 11h nach Belichtung, kam es zu einer Annäherung der Expressionswerte zwischen den beteiligten Gruppierungen (Abbildung 18C). Lediglich beim Gen *rgsA*, das ebenfalls für die Signaltransduktion zuständig ist (NCBI-Datenbank), ist das Expressionsniveau der 6 Tage gehungerten Plasmodien (blaue Kurve) höher als das der 7 Tage gehungerten (rote Kurve). Das Expressionsniveau in der roten Gruppe (7 Tage Hungern) steigt bereits 6h nach der Lichtstimulation stark an, während die blaue Klasse (6 Tage Hungern) erst 8h nach Belichtung einen starken Expressionszuwachs verzeichnen kann (Abbildung 18B). Im Vergleich zu den anderen Genen ist aber das Expressionsniveau nach 11h in beiden Kategorien sehr hoch.

Zusammen mit den vorherigen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern:

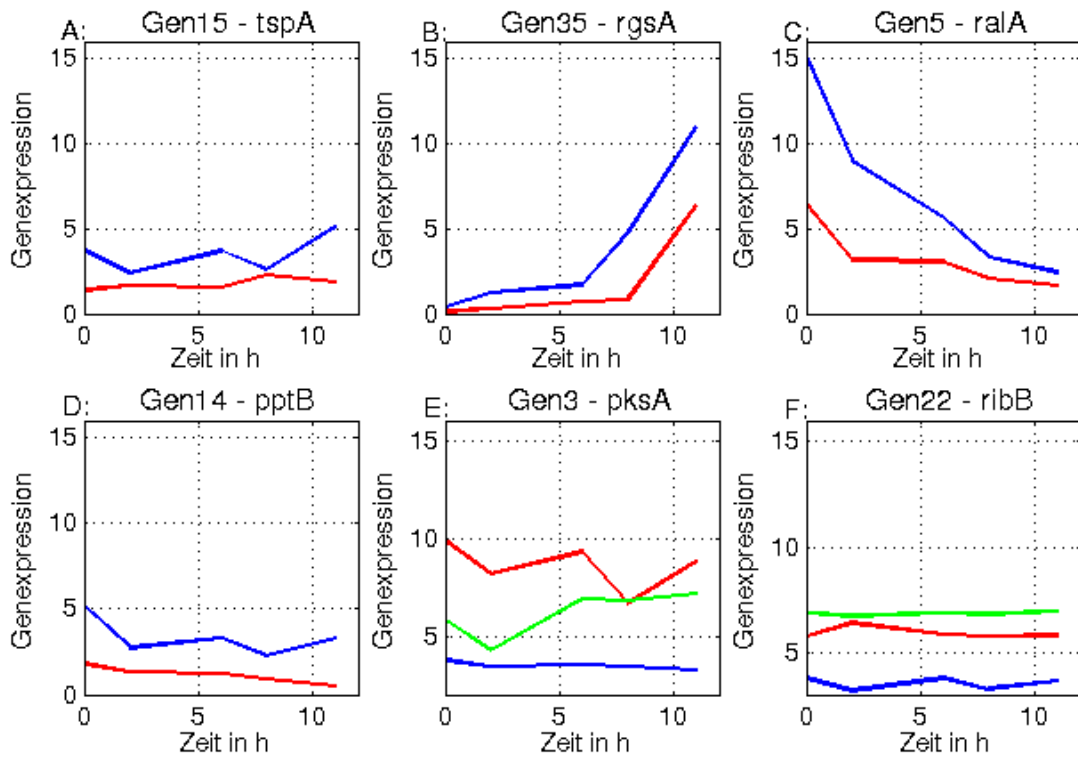
*Hungerphase und Intensität des Rotlichtimpulses haben einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Regulationsvorgänge.*

Mithilfe des Gen *ribB* konnte zudem auf das Verhältnis zwischen Hungerphase und Belichtungszeitraum geschlossen werden. 7 Tage gehungerte und 6 Tage gehungerte Plasmodien mit 30-minütiger Belichtung zeigen ein höheres Expressionsniveau als 6Tage gehungerte Plasmodien mit einer kürzeren Belichtungszeit (> 30 min).

Daraus resultiert:

*Je kürzer die Hungerphase ist, desto länger muss die Belichtungsdauer mit dunkelrotem Licht sein, um die gleiche differenzielle Regulation der Gene (*tspA*, *ralA*, *pptB*, *pksA* und *ribB*) zu erreichen.*

Diese experimentellen Ergebnisse legen nahe, dass mit steigender Hungerdauer die Lichtempfindlichkeit der Plasmodien und damit ihre Sporulationsfähigkeit steigen.



2 Cluster: Cluster1 (—), Cluster 2 (—)  
 3 Cluster: Cluster1 (—), Cluster 2 (—), Cluster 3 (—)

Abbildung 18: Expressionsverläufe in Abhängigkeit der Hungerphase

Abbildung 18 zeigt die Expressionsverläufe der für die Überprüfung der Qualität der Clustermethode interessanten Gene aus Abbildung 17. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Teilversuche über einen Zeitraum von 11h nach Belichtung. Die Farbauswahl der Kurven entspricht den Clustern aus Abbildung 17. Für eine bessere Vergleichbarkeit sind die Gene genauso wie in Abbildung 17 angeordnet.



## **5.3 Charakterisierung von Mutanten**

Zur Analyse des Sporulationsverhaltens von *Physarum polycephalum* dienen die Charakterisierung von 2 Mutanten und der Vergleich mit dem Wildtyp. Diese Mutanten sind zum einen sporulationsnegativ und zum anderen stark eingeschränkt in Bezug auf die Bildung von Fruchtkörpern (Rätzel et al. 2013). Durch einen Vergleich mit den Expressionsdaten des Wildtyps können Gene für die Sporulation auffindig gemacht werden. Dazu zählen Gene, die im Vergleich zum Wildtypstamm ein verändertes Expressionsniveau aufweisen.

Darüber hinaus sollen die Individualität von Zellen und der Einfluss von Genen auf das dynamische Verhalten des regulatorischen Netzwerkes berücksichtigt werden, da im Fokus dieser Arbeit die Analyse von Einzelzellzeitserien steht, und nur über die Charakterisierung der Einzelzellen Aussagen zum dynamischen System getroffen werden können. Zum Vergleich der Ergebnisse aus der neu etablierten Einzelzellzeitreihenstudie und der Probenahmetechnik von Hoffmann (Hoffmann et al. 2012) dient die Arbeit von Rätzel (Rätzel et al. 2013).

### **5.3.1 Identifikation des Genexpressionsprofils der Mutante PHO68**

Die sporulationsdefiziente Mutante PHO68 wurde identisch zu den vorangegangenen Experimenten mit dem Wildtyp im Fermenter kultiviert. Das Animpfvolumen liegt bei den Mutanten bei 1 % des Gesamtvolumens, wohingegen dasjenige vom Wildtyp bei 2 % liegt. Die Probenahme der Zeitreihe fanden nach einer Hungerperiode von 7 Tagen zu dem Zeitpunkt 0h (Startwert der Zeitreihe) sowie 2h, 6h, 8h und 11h nach Belichtung statt.

Die 30min Belichtung der 11 Plasmodien mit dunkelrotem Licht erfolgte nach der ersten Probenahme (Startwert der Zeitreihe). Keine der Plasmodien sporulierte. Während der Aufreinigung (vgl. Kapitel 4.2) ging Zellmaterial für einen Zeitpunkt des Plasmodiums 2 verloren, womit 10 Plasmodien für die Auswertung übrigblieben (Expressionsdaten siehe Anhang, Tabelle 47 und 50).

Die PCA der einzelnen Plasmodien in Abbildung 19 zeigt keine zeitliche und räumliche Datentrennung der einzelnen Plasmodien im Koordinatenraum. Die Daten jedes einzelnen Plasmodiums bilden ein separates Cluster. Dies ist identisch mit den Ergebnissen aus den

Kontrolluntersuchungen an Wildtyp und nicht sporulierten Wildtypplasmidien. Auffällig verhalten sich die Plasmodien 1 und 6. Während die Datenpunkte der restlichen acht Plasmodien lokal sehr eng beieinander liegen, sind die Daten dieser beiden Plasmodien weiter entfernt von den restlichen Plasmodien geclustert. Zudem ist der Abstand zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten größer. Anhand von Abbildung 19 ist zu erkennen, dass sich Plasmodium 6 zunächst im Bereich der restlichen Plasmodien aufhält und sich im Anschluss an die nach der 6. Stunde erfolgte Probenahme abspaltet. Eine signifikante Clusteranalyse der einzelnen 35 Gene soll Auskunft darüber geben, welche Gene für die Sonderstellung der Plasmodien 1 und 6 verantwortlich sind. Doch zuvor soll mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests analysiert werden, wie die 35 Gene insgesamt über die 11h reguliert sind. Das Konfidenzintervall für diesen Test liegt bei  $\alpha \geq 99\%$ .

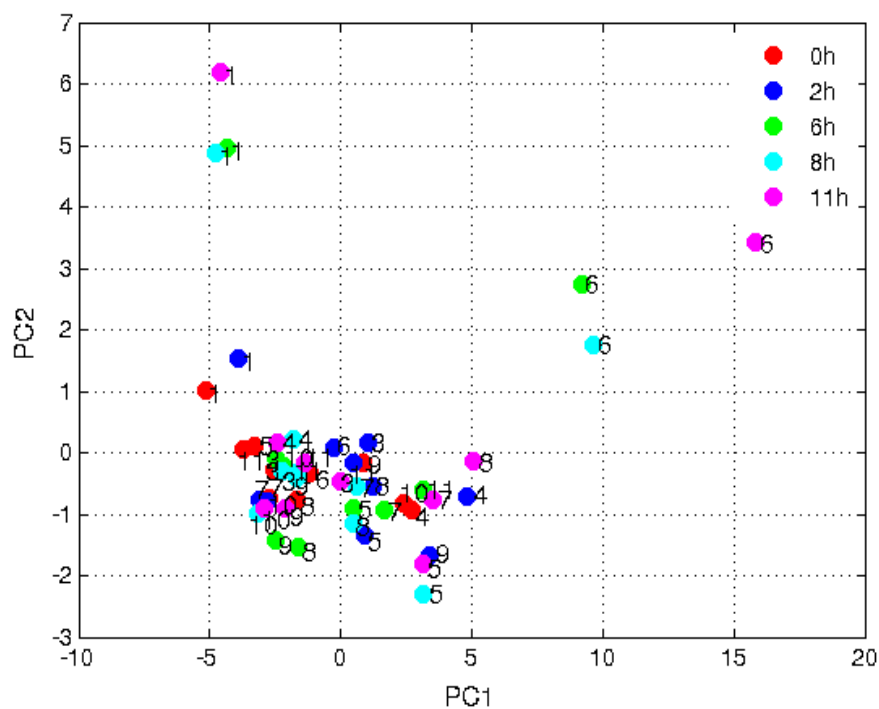


Abbildung 19: Hauptkomponentenanalyse der Mutante PHO68

Dargestellt sind nicht sporulierte PHO68 Plasmodien, die 7 Tage hungerten und 30min dunkelrotem Licht ausgesetzt waren. Die unterschiedlichen Farben der Symbole entsprechen dem Zeitpunkt der Probenahme. Die Zahlen dienen der Identifikation der Plasmodien, welche durchnummeriert sind. Eine räumliche Trennung bei den Probenahmezeitpunkten, die zur Clusterbildung führen würde, ist nicht erkennbar. Die Legende in der Grafik veranschaulicht die farbliche Zuordnung zu den einzelnen Zeitpunkten.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde für 6 verschiedene Kombinationen der einzelnen Zeitabschnitte durchgeführt. Dadurch sichert der Test die PCA-Resultate bezüglich der nicht vorhandenen räumlich-zeitlichen Entwicklung der einzelnen Plasmodien ab. Die Ergebnisse bestätigen die Erkenntnis, dass dieses Muster der Einzelzellen in der PCA

charakteristisch für nicht sporulierte Plasmodien ist. Die Tabelle 13 zeigt keine einzige signifikante Regulation in den 35 Genen.

Tabelle 13: Mann-Whitney-U-Test für PHO68

Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
0h-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0h-2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h-8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für 6 verschiedene Zeitintervalle über alle Plasmodien. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Die nicht regulierten Gene sind mit 0 gekennzeichnet.

Die Besonderheit der Plasmodien 1 und 6 wird durch die signifikanten Ergebnisse der Clusteranalyse in Abbildung 20 bestätigt. Dargestellt sind die Gene, in denen die Plasmodien 1 und 6 jeweils separat (in rot) von den anderen 9 Plasmodien (blau markiert) gruppiert wurden. Zusätzlich zu den Clustern sind gleichzeitig die Änderungen des Expressionsniveaus während der Versuchszeit aufgetragen – in einer zu den jeweiligen Gruppen identischen Farbauswahl. Plasmodium 1 ist ausschließlich bei der Analyse des Gens *cdcA* separat geclustert. Damit könnte die Regulation dieses Gens eine Rolle für die separate Anordnung des Plasmodiums in der PCA spielen. Zusätzlich scheint die Regulation von *pikC* Einfluss auf die Sonderstellung der Plasmodien 1 und 6 im Vergleich zu den anderen Plasmodien zu haben. Auch hier werden die genannten Plasmodien separat angeordnet. Für das 6 ließen sich über *simprof* folgende Gene identifizieren, in denen eine getrennte Clusterung erfolgt: *ehdA*, *pumA*, *pikB*, *gapA*, *meiB*, *arpA*, *rasA*, *cudA* und *spiA*. Diese Gene decken einen breiten funktionalen Bereich ab, z.B. als Transkriptionsfaktoren sowie als wichtige Faktoren bei der Kinase, der Signaltransduktion und der Steuerung des Zellzyklus (NCBI-Datenbank). Diese Gene sind 11h nach Belichtung beim Plasmodium 6 um ein Vielfaches stärker exprimiert als in den restlichen Plasmodien (rote Kurve der Expressionswerte). Inwieweit diese veränderte Regulation Einfluss auf die Sporulation hat, kann so allein nicht festgestellt werden, da auch Plasmodium 6 nicht sporuliert hat. Bis auf *pumA* sind alle entsprechenden Gene hochreguliert oder bleiben konstant auf einem hohen Expressionsniveau. Daraus folgt, dass diese Gene anscheinend nicht allein für die Sporulation zuständig sind. Eine andere mögliche Schlussfolgerung ist, dass das Expressionsniveau nicht ausreichend hoch genug ist.

Zudem verdeutlicht die Clusteranalyse ein insgesamt sehr ähnliches Profil der Expressionsdaten der einzelnen Plasmodien, indem diese grundsätzlich zusammengruppiert sind und untermauert somit die PCA-Ergebnisse aus Abbildung 19.

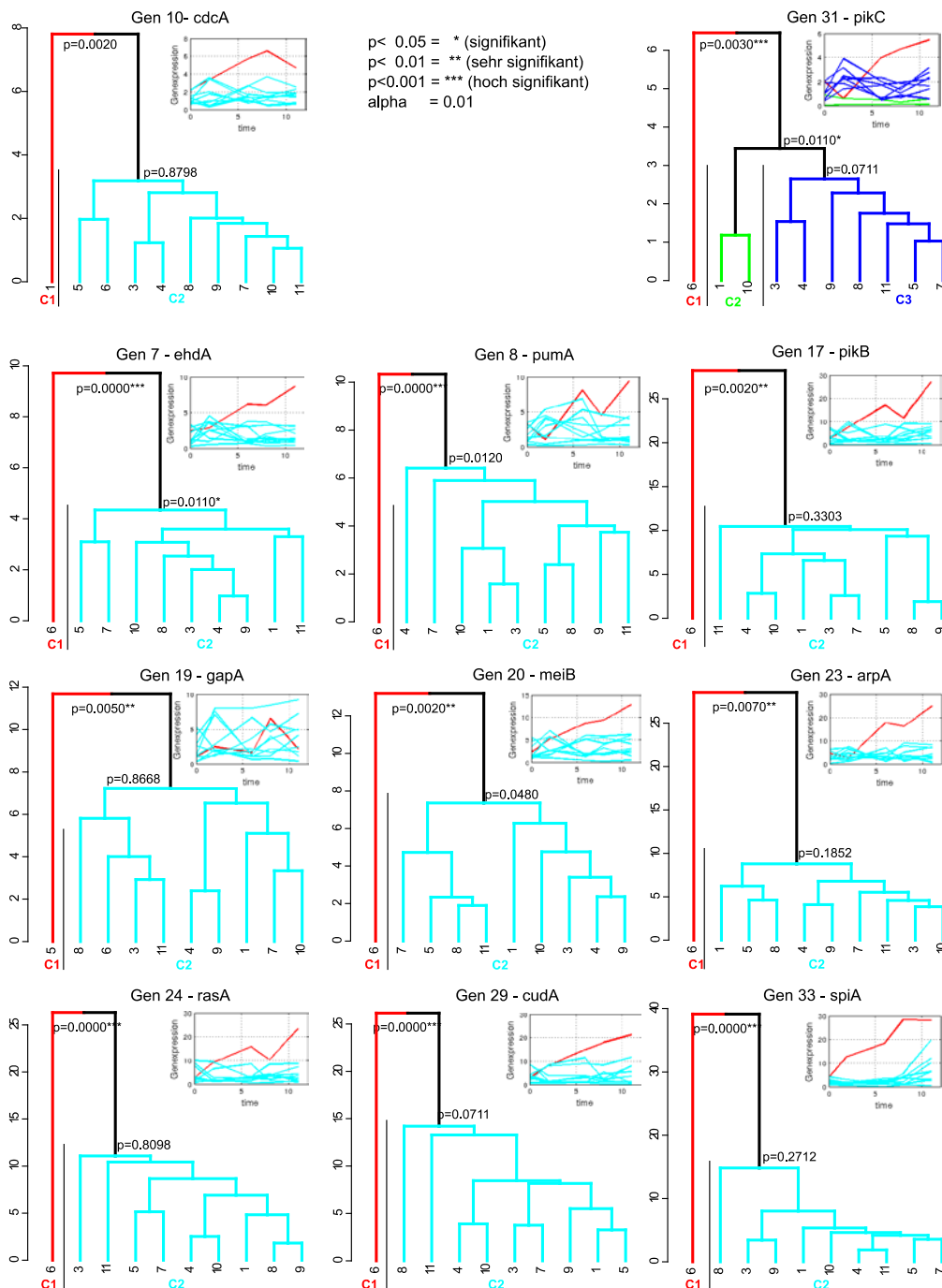


Abbildung 20: Clusteranalyse von PHO68

Die signifikante Clusteranalyse erfolgte in der Programmiersprache R mit der Toolbox simprof. Die Auswahl der Gene beschränkt sich auf Gene, in denen die Plasmodien 1 und oder 6 separat geclustert sind (rot markiert). Das Vertrauensintervall für die Analyse liegt bei  $\alpha \leq 0,01$ . Zusätzlich sind die Expressionsverläufe der einzelnen Plasmodien über die Zeit dargestellt. Die Farbwahl basiert auf der Clusteranalyse und richtet sich danach, wie viele Cluster jeweils abgebildet werden.

### 5.3.2 Identifikation des Genexpressionsprofils der Mutante PHO48

Die Analyse einer weiteren Mutante, die in ihrer Sporulation stark eingeschränkt ist, soll ebenfalls zur Beantwortung der Frage beitragen, welche Gene für die Sporulation zuständig sind. Nur über einen Vergleich zwischen sporulationsnegativen Mutanten und dem sporulierten Wildtyp können Rückschlüsse auf sporulationsverantwortliche Gene gezogen werden. Gleichzeitig wird die Mutante hinsichtlich des Verlaufs der Regulation der 35 Gene beurteilt, denn durch die chemische Mutagenisierung kann allein von ihrer Charakterisierung ausgehend nicht gefolgert werden, in welchen Genen sich die hergestellten Mutanten generell voneinander unterscheiden. Ausgangspunkt für die Untersuchung ist die Mutante PHO48, die stark in ihrer Sporulationsmöglichkeit eingeschränkt ist. Für die Analyse stehen 11 Plasmodien zur Verfügung. Die Gewinnung erfolgt analog zu den Plasmodien der Mutante PHO68. Trotz dunkelroter Belichtung sporulierte kein einziges Plasmodium (Rohdaten siehe Tabelle 48 und 50 im Anhang).

Einen ersten Überblick über den Zustand der Zelldifferenzierung der einzelnen Plasmodien während des 11-stündigen Beobachtungszeitraums liefert die PCA aus Abbildung 21. Die Komponenten 1 und 2 wurden auf die x- und y-Achse aufgetragen. Mithilfe der zwei Komponenten lassen sich mehr als 90% der Gesamtinformationen abbilden (Ergebnis PCA). Im Diagramm wird eine räumliche Trennung der Daten aus den Einzelplasmodien bei der Anordnung der 0h- und 2h-Probenahmen nach Belichtung erkennbar. In diesem Zeitraum ist der erste Probenahmezeitpunkt der Zeitreihe bei allen Plasmodien weiter links als der darauffolgende Zeitpunkt angeordnet. Die anschließenden Probenahmezeitpunkte sind wieder weiter links gruppiert als die Proben, die 2h nach Belichtung entnommen wurden. Der Anfangszustand wird also wieder hergestellt. Dies geschieht für jedes Plasmodium unterschiedlich schnell. Alleinige Ausnahme bildet als Plasmodium 3, bei der die Daten aus der Probenahme, die 11h nach dem Stimulus erfolgte, weiter entfernt vom Anfangszustand geclustert sind als bei den anderen Plasmodien. Ähnliches ist auch beim Plasmodium 10 zu beobachten. Der Unterschied zwischen beiden Plasmodien liegt in der Art und Weise, wie die Expressionsniveaus sich im Laufe der 11h verändern. Dies ist aus den unterschiedlich lokalisierten Zeitpunkten im Diagramm der PCA aus Abbildung 21 zu entnehmen. Während bei Plasmodium 3 die Distanz zwischen Anfangspunkt und Endpunkt viel größer ist, wobei eine kontinuierliche Entwicklung zu beobachten ist, sind die einzelnen Probenahmezeitpunkte des Plasmodiums 10 in einer leichten Kurve

angeordnet. Auch die Lage der beiden Plasmodien ist unterschiedlich. So befinden sich die Daten von Plasmodium 10 im oberen linken Drittel des Diagramms, während der Datenpunkt von Plasmodium 3 für den Entnahmezeitpunkt 11h nach Belichtung im unteren rechten Drittel angesiedelt ist. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests soll die Beobachtung zwischen dem Probenahmezeitpunkt 0h und 2h nach Belichtung bestätigt werden und anhand der Clusteranalyse eine Identifizierung der Gene erfolgen, die für die Sonderstellung der 2 Plasmodien ausschlaggebend sind.

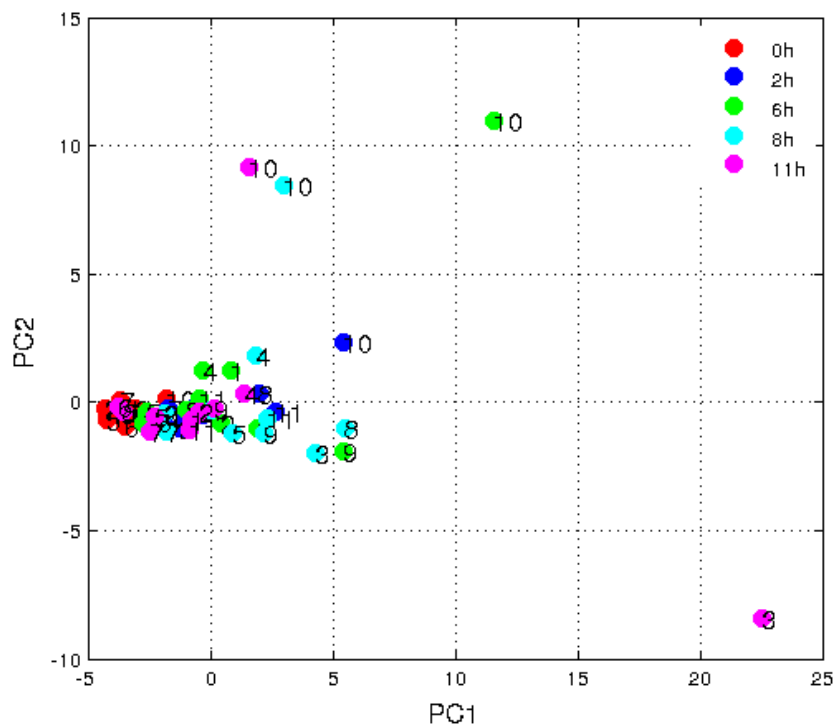


Abbildung 21: Hauptkomponentenanalyse der Mutante PHO48

Dargestellt sind nicht sporulierte PHO48 Plasmodien, die 7 Tage hungerten und 30min dunkelrotem Licht ausgesetzt waren. Die unterschiedlichen Farben der Symbole entsprechen dem Zeitpunkt der Probenahme, während die Zahlen die einzelnen Plasmodien kennzeichnen.

Als Kriterium für den Mann-Whitney-U-Test wurde ein Konfidenzintervall von  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Tabelle 14 zeigt die untersuchten 35 Gene in verschiedenen Zeitintervallen. Die mit 1 gekennzeichneten und rotgefüllten Zellen verweisen auf Gene, die hochreguliert sind. Die grün markierten Zellen präsentieren Gene, die runterreguliert sind. Alle restlichen Zellen tragen eine Null, da keine signifikanten genregulatorischen Prozesse stattfinden. In 30 von 35 Genen (85% aller Gene) findet bereits im ersten Zeitintervall eine Hochregulation statt. Eine etwas langsamere Hochregulation ist beim Gen *hcpA* zu

beobachten. Erst nach 6h ist eine signifikante Änderung zu beobachten. Bei 3 der 30 Gene erfolgt ein sofortiger Wiederabbau nach dem Probenahmezeitpunkt 2h nach Belichtung, sodass bei Betrachtung des Intervalls von der ersten Probenahme vor der Belichtung bis zum Zeitpunkt des PNRs keine signifikante Modulation auftritt. Lediglich 2 Gene, *ribA* (Nr. 1) und *nhpA* (Nr. 2), zeigen eine kurzzeitige Runterregulation zwischen 2h und 6h nach dem Lichtstimulus. Die Runterregulation ist bei *ribA* dennoch schwächer ausgeprägt als die vorangegangene Hochregulation. Die Transkriptmengen der Gene *ehdA* (Nr. 7), *pldC* (Nr. 30), *pldB* (Nr. 32), und *rgsA* (Nr. 35) bleiben über den gesamten Zeitraum konstant.

Damit bestätigt der U-Test die Ergebnisse aus der PCA hinsichtlich der räumlichen Trennung der Datenanordnung im ersten Zeitintervall (0–2h) sowie das anschließend konstante Verhalten bei den weiteren Probenahmezeitpunkten.

Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test für PHO48

Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
0h-6h	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0
6h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0h-2h	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
2h-6h	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6h-8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene gemäß Mann-Whitney-U-Test für 6 verschiedene Zeitintervalle. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 markiert, runterregulierte Gene mit -1 und nicht regulierte Gene mit 0. Der Vertrauensbereich liegt bei  $\alpha \geq 99\%$ .

Auch das Analysewerkzeug simprof unterstützt die PCA-Ergebnisse hinsichtlich der Sonderstellung der Daten von den Plasmodien 3 und 10. Die Cluster aus Abbildung 22 zeigen eine separate Anordnung für das Physarum-spezifische Gen *psgA* (Abbildung 22 oben links) und das am Signaltransduktionsprozess beteiligte Gen *rasA* (Abbildung 22 oben rechts) bei Plasmodium 3 (rot markiert). Die Ergebnisse der Analyse des Expressionsniveaus zeigen, dass beide Gene 11h nach Belichtung um ein Vielfaches stärker exprimiert sind (rote Kurve) als in den restlichen Plasmodien, die durch ein konstantes Expressionsniveau (blaue Kurven) gekennzeichnet sind. Das Expressionsmuster des Gens *psgA* von Plasmodium 3 ist im Vergleich zum Wildtyp entgegengesetzt. Plasmodium 10 ist in den Genen *pptA*, *arpA*, *anxA*, *cudA*, *pldC*, *pikC*, *hcpA* und *rgsA* separat geclustert. Wie auch das Plasmodium 3 grenzt sich das

Plasmodium 10 von den anderen Plasmodien, die ein konstantes Expressionsniveau zeigen (blaue Kurven), durch ein erhöhtes Expressionsniveau (rote Kurven) in den genannten Genen, ab. Außerdem bekräftigen die Clusterbäume der einzelnen Gene die hohe Ähnlichkeit der anderen Plasmodien zueinander, die jeweils ein Cluster bilden und in Blau dargestellt sind.

Damit ist festzuhalten, dass beide Plasmodien wegen ihres erhöhten Expressionsniveaus während des 11-stündigen Untersuchungszeitraums in der PCA separat lokalisiert sind und bei der Clusteranalyse einzeln gruppiert werden.



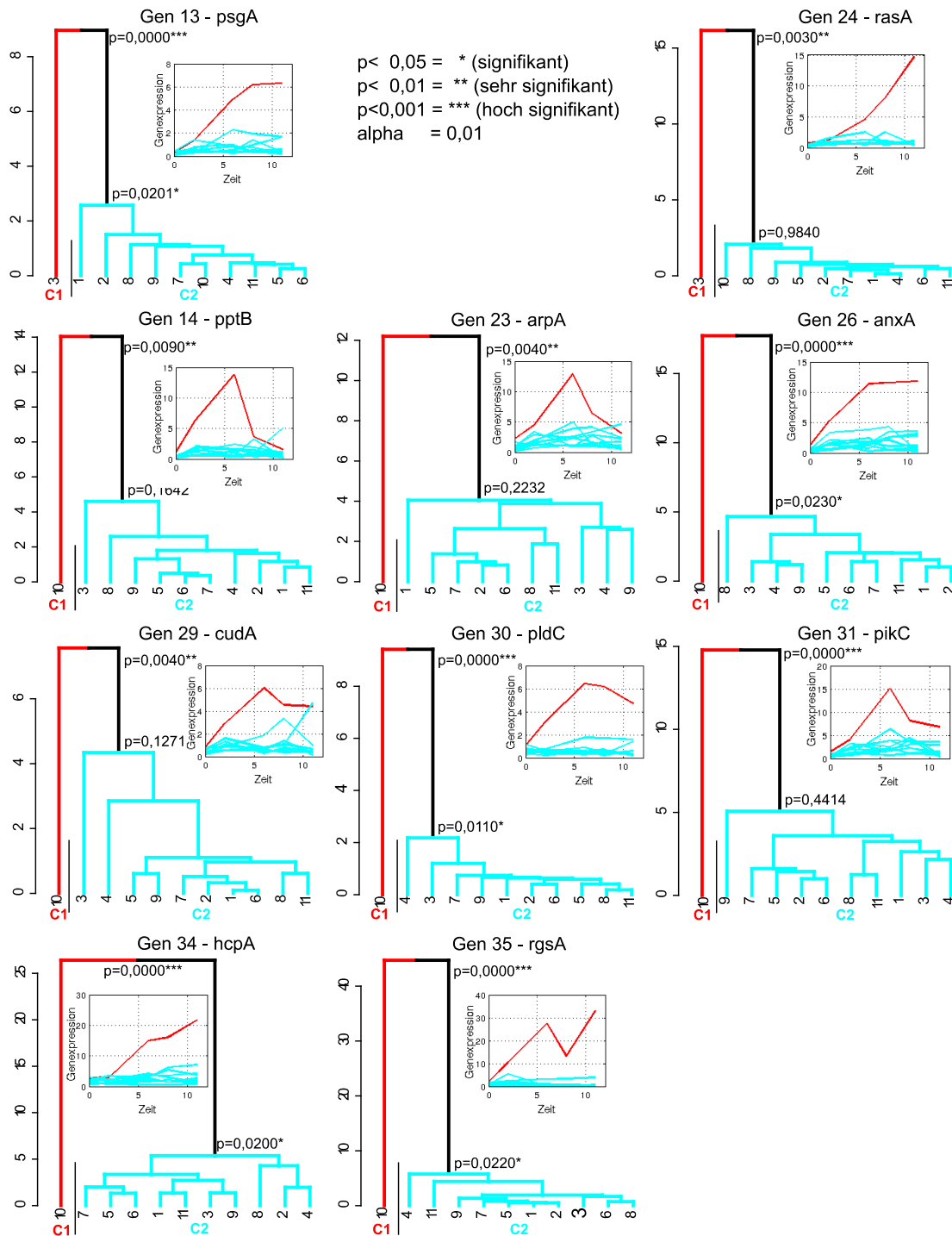


Abbildung 22: Clusteranalyse der Mutante PHO48

Die signifikante Clusteranalyse erfolgte in der Programmiersprache R mit der Toolbox simprof. Die dargestellten Gene beschränken sich auf die Auswahl bezüglich der Sonderstellung der Plasmodien 3 und 10. Das Vertrauensintervall für die Analyse liegt bei  $\alpha \leq 0,01$ . Die separaten Plasmodien sind jeweils in rot dargestellt. Der p-Wert zeigt an, wie groß der signifikante Unterschied zwischen den beiden Clustern ist. Zusätzlich sind die Expressionsverläufe der Plasmodien in den Farben der Cluster dargestellt. Die Wahl der Farbe wird vom Programm festgesetzt und richtet sich danach, wie viele Cluster jeweils abgebildet werden.

### 5.3.3 Vergleich der Mutanten untereinander und mit dem Wildtyp #31

Zur Identifizierung möglicher Gene, die für die Sporulation von *Physarum polycephalum* verantwortlich sind, ist ein Vergleich der Entwicklung des Expressionsniveaus der untersuchten 35 Gene zwischen den Mutanten und dem Wildtyp notwendig. Aber auch die Dynamik und der Einfluss von Attraktoren soll indessen betrachtet werden, da bereits Macarthur (2009) theoretisch beschrieb, dass regulatorische Prozesse dem Effekt von Attraktoren unterliegen. Er bediente sich dabei verschiedener Modelle der Genexpressionsanalyse, mithilfe derer er boolesche Netzwerke erstellte und die Attraktoren aus den Erreichbarkeitsgraphen ermittelte. Durch die Einzelzellanalyse und dem Vergleich von Plasmodien unterschiedlicher Stämme war es nun möglich, dieses zu beweisen und auch zu zeigen, unabhängig von der Gültigkeit eines zu Grunde liegenden Modells, in wieweit Mutationen im regulatorischen Netzwerk die Attraktoren und die Quasipotential-Landschaft insgesamt verändern.

Ein Blick auf die PCA (Abbildung 23) zeigt sowohl bei beiden Mutanten als auch beim Wildtyp ein jeweils unterschiedliches Datenpunktemuster. Der Vergleichsstamm Wildtyp #31 wurde 7 Tage im Dunkeln hungern gelassen und 15 min mit dunkelrotem Licht bestrahlt. Die beiden Mutanten wurden ebenfalls einer Hungerperiode von 7 Tagen unterzogen. Die Belichtungsdauer des dunkelroten Lichtes lag bei 30 min. Die Auswertung der Daten und ihre Darstellung in einem Plot (oben links) zeigt, dass der Wildtyp die Datenpunkte der Mutanten verdrängt. Die Daten der sporulationsdefizienten Plasmodien sind eng zusammen gruppiert. Rückschlüsse auf die Konzentrationsänderung der Transkriptmengen der einzelnen Plasmodien sind daher nicht möglich. Lediglich bei Plasmodium 6 der Mutante PHO68 sind die letzten beiden Probenahmezeitpunkte zu identifizieren, ebenso wie bei Plasmodium 10 der Mutante PHO48 die 11 h nach Belichtung erfolgte Probenahme erkennbar ist. Die typische Abstufung zwischen den einzelnen Zeitpunkten der Probenahmen ist dagegen im Wildtyp deutlich zu erkennen. Die Auswertung und Darstellung der Daten aller Plasmodien ergibt, dass die ersten Probenahmezeitpunkte der einzelnen Plasmodien am unteren Rand des Diagramms zu finden sind und sich im Laufe der Zeit die Anordnung der weiteren Datenpunkte in Richtung oberer Rand des Diagramms verschiebt (Abbildung 23 oben rechts). Damit ist die räumlich-zeitliche Entwicklung der Plasmodien ein charakteristisches Merkmal, um zwischen sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien unterscheiden zu können. Diese

Entwicklung und ist mithilfe der PCA schnell und einfach feststellbar. Dass sich die beide, Mutanten PHO68 und PHO48 (Abbildung 23 untere Zeile) hinsichtlich der Regulation der betrachteten 35 Gene unterscheiden, wird ebenfalls anhand des Musters der PCA ersichtlich. Während die Daten der Plasmodien von PHO68 eher diagonal im Diagramm angeordnet sind, liegen die Datenpunkte der Plasmodien von Mutante PHO48 alle sehr dicht beieinander. Lediglich 2 Zeitserien sind separat von den restlichen Plasmodien im Koordinatensystem angeordnet.

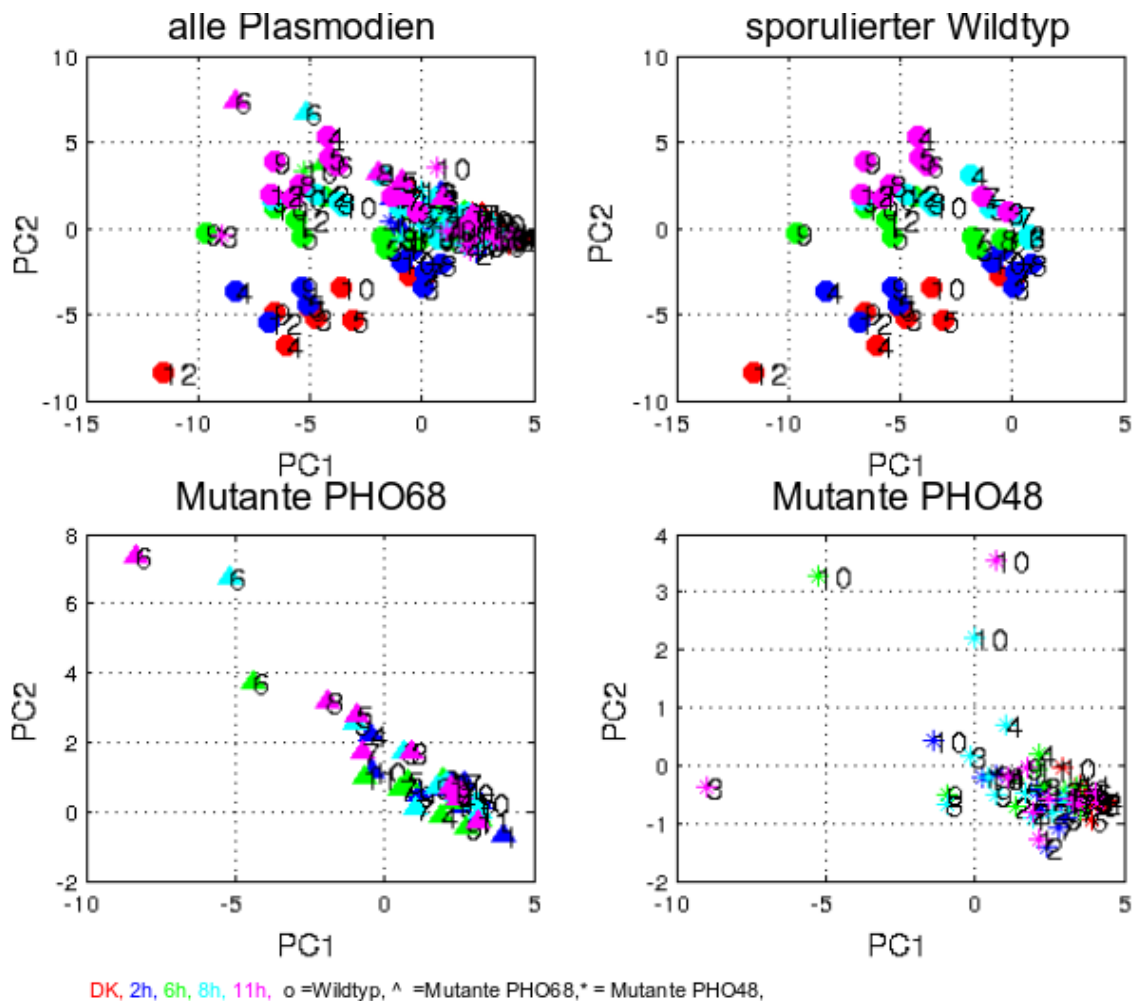


Abbildung 23: Vergleich der Mutanten und des Wildtyps mittels der Hauptkomponentenanalyse

Verglichen werden sporulierte Wildtypplasmodien und nicht sporulierte Mutantenplasmodien (PHO68 und PHO48). Die 3 verschiedenen Symbole charakterisieren die unterschiedlichen Stämme von *Physarum polycephalum*. Die Probenahmen zu den verschiedenen Zeitpunkten sind durch unterschiedliche Farbgebung gekennzeichnet.

Aus der Tabelle 15 sind die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für den Wildtyp, die Mutante PHO48 und die Mutante PHO68 für 6 verschiedene Zeitintervalle zu entnehmen. Die Anordnung der Gene erfolgte wie beim Wildtyp (Tabelle 12). Die hochregulierten Gene, in Rot dargestellt, befinden sich in der Tabelle im oberen Drittel. Demgegenüber

sind die runterregulierten Gene in Grün eingetragen. Im unteren Drittel befinden sich die nicht regulierten Gene, ohne Farbliche Kennzeichnung.

Die Gegenüberstellung von Mutante PHO68 und Mutante PHO48 in Tabelle 15 verdeutlicht die Inkongruenz in der Regulation vor dem „*Point of no return*“. Sind bei der Mutante PHO48 27 Gene im Zeitraum vor dem Umkehrpunkt hochreguliert bzw. sogar 30 Gene zwischen der ersten Probenahme vor der Belichtung und der ersten Entnahme nach dem Lichtstimulus, sind hingegen bei der Mutante PHO68 alle 35 Gene konstant exprimiert. Nach 6h findet in beiden Mutanten keine einzige Regulationsveränderung mehr statt. Folglich könnte dies eine Ursache für die nicht vorhandene Sporulation sein

Der Vergleich zwischen PHO68 und Wildtyp #31 zeigt, dass die im Wildtyp stattfindende Runterregulation von Genen in der Mutante völlig ausbleibt. Auch die hochregulierten Gene im Wildtyp, wie z. B. *ribA*, *nhpA*, *ralA*, *pumA*, *psgA*, *meiB*, *cudA*, *pldC* und *pldB*, sind im Vergleich zu den Mutanten andersartig reguliert. Die Expressionsniveaus aller Gene sind bei PHO68 im Gegensatz zum Wildtyp um ein Vielfaches niedriger. Die Expressionsdaten lassen eine Tendenz der Hochregulation in der Mutante für die Gene *pksA*, *ardA*, *psgA*, *uchA*, *anxA*, *pwiA*, *pldB* in allen Plasmodien erkennen. Im Kontrast zum Wildtyp sind diese Gene bis auf *pwiA* runterreguliert oder konstant exprimiert.

Ein ähnliches Verhalten ist beim Vergleich zwischen der Mutante PHO48 und dem Wildtyp für die Gene *ligA*, *pakA*, *cdcA*, *rasA*, *pldA*, *pptA*, *pwiA*, *spiA* nachweisbar. Diese acht Gene werden in beiden Fällen zwischen dem Zeitfenster Startwert und 6h nach Belichtung hochreguliert (Tabelle 15). Betrachtet man nur die ersten 2h, sind keine Gene identisch exprimiert. Die Runterregulation der Gene *ribA* und *nhpA* findet im Wildtyp wie auch bei der Mutante bis zum „*Point of no return*“ statt, dem geht beim Wildtyp und der Mutante PHO48 allerdings eine Hochregulation der beiden Gene voraus. Die Hochregulation ist beim Wildtyp um ein Vielfaches höher als bei der Mutante PHO48. Generell ist, wie bei der Mutante PHO48, das Expressionsniveau aller Gene bei Mutante PHO68 geringer als beim Wildtyp.

Vergleicht man die Clusteranalyse aus 5.3.1 und 5.3.2, zeigen die Datenpunkte sowohl von Mutante PHO48 als auch von Mutante PHO68 ein sehr homogenes Expressionsprofil innerhalb der untersuchten Plasmodien. In 60% der analysierten Gene können die Daten der Einzelzellen in einem Cluster gruppiert werden. Bezieht man die Gene mit ein, in denen die Plasmodien separat gruppiert sind, welche bereits in der PCA auffällig waren, können sogar 91% aller Gene mithilfe eines Clusters dargestellt werden. Jeweils 2

Plasmodien verhalten sich anders als die restlichen Plasmodien der jeweiligen Mutante. Eine mögliche Ursache in dem Verhalten der 4 Einzelzellen könnte sein, dass sie durch Mutagenisierung in Bezug auf die untersuchten Gene verändert wurden. Das Expressionsniveau aller Gene ist nach dem PNR dennoch nicht ausreichend hoch genug für die Ausbildung von Sporen.

Tabelle 15: Vergleich Mutanten und Wildtyp mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests

Gene	Wildtyp #31							Mutante PH068							Mutante PH048						
	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h	0h-11h	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h		
ligA	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
ehdA	1	0	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
pakA	1	0	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
cdcA	1	0	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
gapA	1	1*	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
arpA	1*	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pldA	1	0	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pptA	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pwiA	1	0	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
spiA	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
hcpA	1*	0	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
rgsA	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ribA	-1*	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-1	0	0		
nhpA	0	0	0	0	-1*	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0		
ralA	-1	-1*	0	-1*	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pumA	-1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
psgA	-1	-1	0	-1*	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pikB	-1*	0	0	0	-1*	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
uchA	0	-1*	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
meB	-1*	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
cudA	0	0	0	0	-1*	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
pldC	-1	0	0	-1*	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
pldB	0	0	0	0	-1*	0	-1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
pksA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
damA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
ardA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
hstA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pptB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
tspA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
dspA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pcnA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
ribB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
rasA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
anxA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
pikC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		

Die Tabelle zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene bezüglich des Mann-Whitney-U-Tests für 6 verschiedene Zeitintervalle. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 rot markiert, runterregulierte Gene mit -1 grün und nicht regulierte Gene mit einer Null markiert. Die Werte mit einem Sternchen entsprechen einem Vertrauensbereich von mindestens 95 % aber kleiner 99 %.

## **5.4 Charakterisierung der Zellfusion zweier Mutanten**

Es ist bekannt, dass dynamische Prozesse eine wichtige Rolle in den Kontrollmechanismen für die Reprogrammierung von Stammzellen und somatischen Zellen spielen (Huang 2009, Zhou und Huang 2011). Die Fusionierung zweier genetisch und physiologisch verschiedener, sporulationsdefekter Mutanten soll als experimenteller Beweis für das Vorhandensein von Komplementation dienen, denn eine Zellfusion zweier sporulationsnegativer Mutanten kann zur Aufhebung des Sporulationsdefektes führen (Marwan und Starostzik 2002, Sujatha et al. 2005).

### **5.4.1 Charakterisierung des Heterokaryont (PHO48+PHO68)**

Die Fusionierung fand mit Zellen aus 2 Einzelfermentationen von Mutante PHO48 (Mutante N) und Mutante PHO68 (Mutante L) statt. Das Material beider Mutanten wurde in je eine Spritze überführt. Sodann wurde mithilfe der eigens dafür entwickelten Plattenmaschine ein Mischungsverhältnis von 50:50 eingestellt und 1 g Zellmasse pro Platte aufgetragen. Auch die Fusionsplasmodien hungerten für 7 Tage im Dunkeln. Anschließend fand die Probenahme zum Startpunkt 0 h und zu folgenden Zeitpunkten nach Belichtung statt: 2 h–6 h–8 h–11 h. Nach der ersten Entnahme (0 h) erfolgte für alle 11 Platten die Bestrahlung mit dunkelrotem Licht für 30 min. Keines der Plasmodien zeigte am darauffolgenden Tag eine Sporulation. Während der Probenaufbereitung gingen 2 Einzelzellen von verschiedenen Platten verloren. Damit bleiben 9 Zellen für die Auswertung übrig (Rohdaten siehe Anhang, Tabelle 49 und 50).

Über die PCA-Abbildung 24 gelingt es, 90% der Gesamtinformationen darzustellen (Ergebnis PCA). Eine Betrachtung der einzelnen Probenahmezeitpunkte, die durch verschiedene Farben dargestellt sind, offenbart eine räumliche Trennung der Daten zwischen den Probenahmezeitpunkten 0 h und 6 h nach Belichtung sowie zwischen 0 h und 11 h nach dem Lichtstimulus. Dies lässt vermuten, dass regulatorische Veränderungen in einem Großteil der betrachteten Gene zwischen dem Probenahmezeitpunkt der Dunkelprobe und 6 h nach der Rotlichtbestrahlung stattfindet, die dann aufrechterhalten bleibt. Außerdem fällt das Plasmodium 5 durch seine im Vergleich zu den restlichen Einzelzellen veränderte Lage im Koordinatenraum auf. Die Identifizierung der für dieses

Expressionsprofil verantwortlichen Gene soll mithilfe von Clusteranalysen erfolgen.

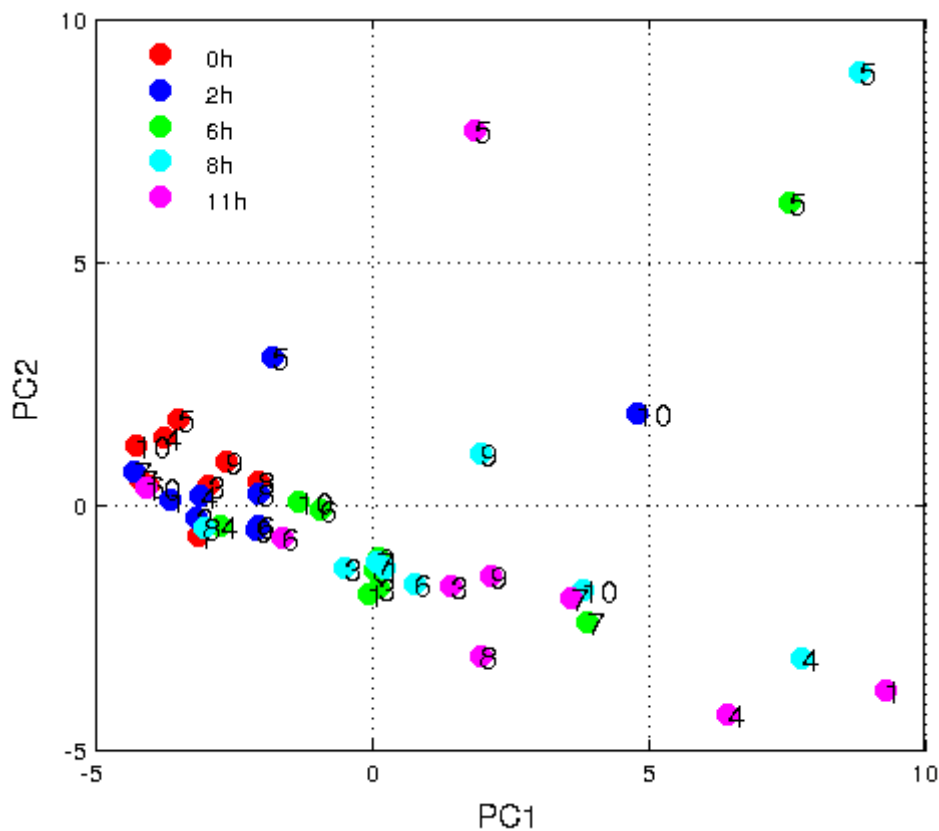


Abbildung 24: Hauptkomponentenanalyse der Fusion PHO68+PHO48

Dargestellt sind nicht sporulierte Plasmodien aus der 50:50 Fusionierung von PHO48 und PHO68, die 7 Tage hungerten und 30min dunkelrotem Licht ausgesetzt waren. Die unterschiedlichen Farben von den Symbolen entsprechen dem Zeitpunkt der Probenahme, während die Zahlen die einzelnen Plasmodien kennzeichnen.

Der im Anschluss durchgeführte Mann-Whitney-U-Test bestätigt die PCA hinsichtlich der unterschiedlichen Anordnung der Probenahmezeitpunkte 0h und 6h in Abbildung 24. Der Vertrauensbereich liegt bei  $\alpha \geq 99\%$ . Aus der Tabelle 16 ist zu entnehmen, dass lediglich Hochregulationen stattfinden und diese ausschließlich zwischen 0–2h nach Belichtung oder bis zu 6h nach dem Stimulus zu beobachten sind. 2 schnell hochregulierte Gruppen und eine langsam regulierte Gruppe sind identifizierbar. Zu den schnell regulierten Genen zwischen 0–2h nach Belichtung gehören *pakA*, *meiB* sowie *anxA* und *tspA* im Zeitraum 2h und 8h nach dem Lichtstimulus. Die langsam hochregulierten Gene sind *ribA*, *ralA*, *pumA*, *ardA*, *pcnA*, *pldA*, *anxA*, *pptA*, *pwiA* und *pikC*.

Tabelle 16: Mann-Whitney-U-Tests für den Heterokaryonten PHO68+PHO48

PHO68+PHO48																																				
Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
0h-6h	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
6h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0h-2h	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h-6h	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h-8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8h-11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für 6 verschiedene Zeitintervalle. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 markiert, runterregulierte Gene mit -1 und nicht regulierte Gene mit 0.

Zur Klärung der Sonderstellung des Plasmodiums 5 wurde eine Clusteranalyse mithilfe des simprof-Algorithmus aus der Toolbox von R durchgeführt. In Abbildung 26 sind alle Gene aufgeführt, in denen dieses Plasmodium separat gruppiert wurde. Für die verbliebenen 28 Gene erfolgte die Klassifizierung der 9 Einzelzellen jeweils in einem Cluster. Zu den auffälligen Genen zählen *anxA*, *cudA*, *pldC*, *pikC*, *pldB*, *spiA* und *rgsA*. Das Vertrauensintervall für die Clusteranalyse liegt bei  $\alpha \leq 0,01$ . Über die zusätzliche Darstellung der Rohdaten in den Farben der Cluster ist zu entnehmen, dass Plasmodium 5 aufgrund des höheren Expressionsniveaus separat in den entsprechenden Genen angeordnet wird (Abbildung 25). Im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 11) sind die 7 Gene entgegengesetzt reguliert. Schlussfolgernd könnte dies eine Ursache dafür sein, weshalb diese Einzelzelle trotz eines anderen Regulationsmechanismus im Vergleich zu den anderen acht Einzelzellen nicht sporuliert.



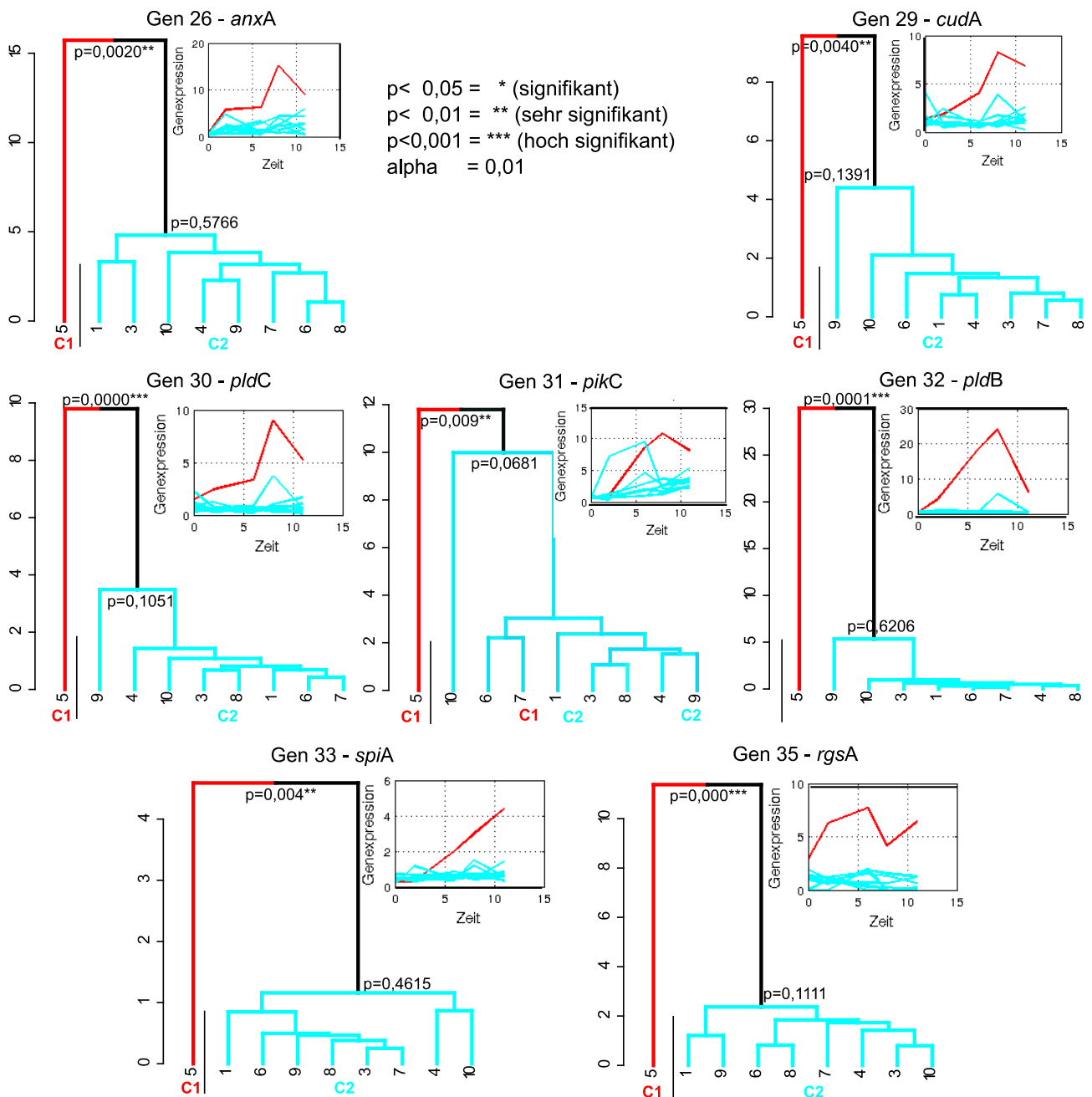


Abbildung 25: Clusteranalyse des auffälligen Fusionsplasmodiums 5

Die signifikante Clusteranalyse erfolgte mit der Programmiersprache R unter Verwendung der Toolbox *simprof*. Die Auswahl der Gene erfolgte bezüglich der Sonderstellung des Plasmodium 5. Das Vertrauensintervall für die Analyse liegt bei  $\alpha \leq 0,01$ . Die Wahl der Farbe wird vom Programm festgesetzt und richtet sich danach, wie viele Cluster jeweils abgebildet werden.

## 5.4.2 Einfluss der Mutanten auf den Heterokaryont

Der erhoffte Komplementationeffekt bezüglich der Sporulation durch die Zellfusionierung zweier sporulationsnegativer Mutanten blieb aus. Sowohl die Mutanten als auch die fusionierten Zellen sporulierten zu 100 Prozent nicht. Der Blick auf die PCA-Abbildung 26 zeigt aber eine Veränderung des Verhaltens der einzelnen Plasmodien zueinander, d. h. zwischen den Zellen der Mutante und den fusionierten Zellen. Während die Daten der Einzelzellen in den Mutanten separate Cluster bilden und kein gemeinsamer Trend innerhalb der Zeitreihe zu beobachten ist (Abbildung 26 untere Reihe), können solche Einzelcluster nicht aus den Daten der fusionierten Zellen gebildet werden (Abbildung 26 oben rechts). Eine räumliche Trennung bei den zeitlich versetzten Probenahmen von Einzelzellen wie beim Wildtyp (Abbildung 11 und 12) ist allerdings auch nicht festzustellen. Die Daten aus den Probenahmezeitpunkten Startwert und 2h nach Belichtung liegen nah beieinander. Danach entwickelt sich jede Einzelzelle unterschiedlich schnell mit unterschiedlichen Expressionsänderungen. Das hat zur Folge, dass die aus der PCA gewonnenen Datenpunkte unstrukturiert im Diagramm (Abbildung 26) angesiedelt sind.

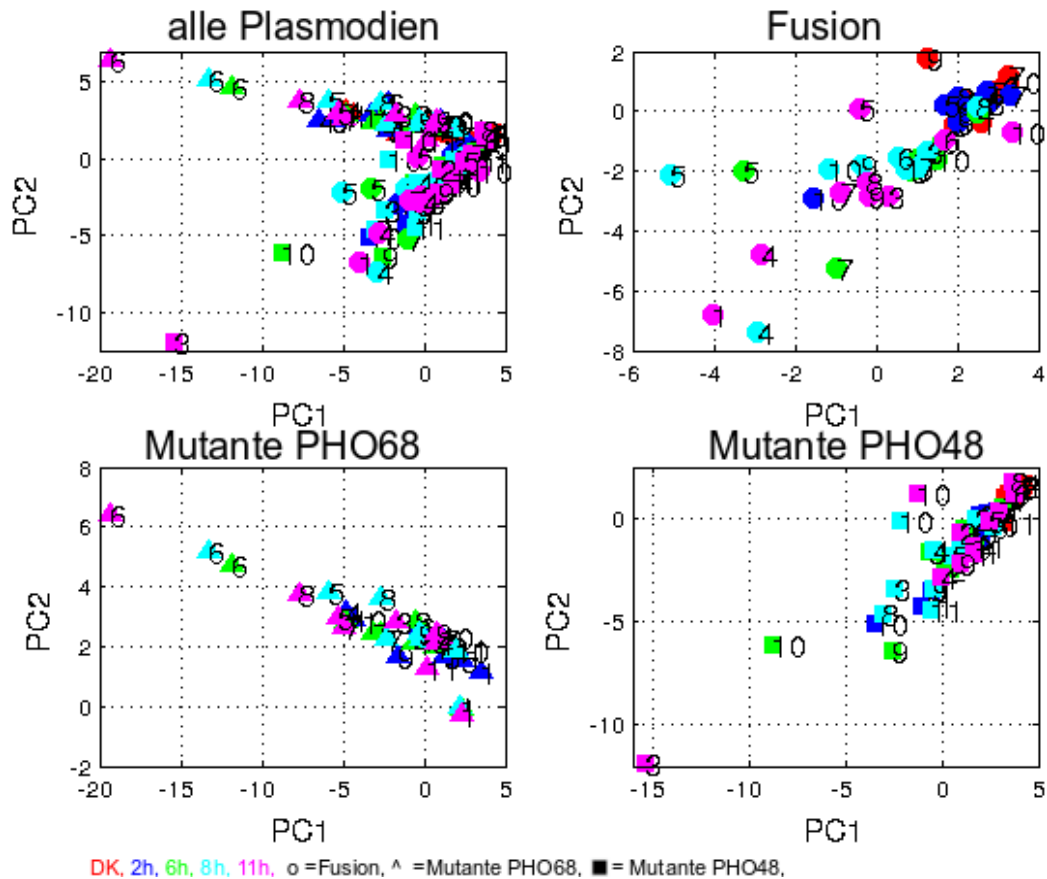


Abbildung 26: Hauptkomponentenanalyse zum Vergleich zweier Mutanten und deren Heterokaryont

Verglichen werden nicht sporulierte Fusionsplasmodien und nicht sporulierte Mutantenplasmodien (PHO68 und PHO48).

Über die signifikante Clusteranalyse mit dem simprof-Algorithmus und einem Vertrauensintervall von  $\alpha \leq 0,01$  erfolgt die Analyse der 35 Gene in Bezug auf Gene, in denen die 2 Mutanten oder der Heterokaryont separat dargestellt sind. Abgebildet sind alle Gene, in denen eine Mutante von der anderen Mutante und bzw. oder von den fusionierten Zellen der beiden Mutanten separat geclustert ist. So eine Gruppierung ist bei 8 Genen möglich. Die entstandenen Cluster lassen sich in 2 Klassen einordnen. 6 Gene formen für PHO68 (Mutante L) ein einziges Cluster getrennt von der Mutante PHO48 und den fusionierten Zellen (Abbildung 27, Teil A). Die Gene *gapA* und *pptA* hingegen spalten sich in 2 Cluster auf und schließen die Zellen der Mutante PHO48 (Mutante N) und die fusionierten Zellen (NL) ein (Abbildung 27, Teil B). Die Durchnummerierung der Cluster beginnt auf der linken Seite. Jedes neue Cluster erhält eine neue Farbe. Die p-Werte geben an, wie signifikant sich die Cluster voneinander unterscheiden. In 16 Genen erfolgt die Gruppierung aller Plasmodien zusammenhängend in einem einzigen Cluster. Für die restlichen Gene entstehen nach der Analyse zwischen 2 und 7 Gruppen, in denen die Einzelzellen aller 3 Formen durcheinander arrangiert sind.

Auffällig sind die Baumdiagramme für die Gene *gapA* und *pptA*. Beide Gene zeigen ein identisches Cluster mit kongruenter Reihenfolge in der Anordnung der Plasmodien auf der x-Achse. Ob es dennoch Unterschiede in der Regulation oder im Expressionsniveau gibt, soll die Analyse der Rohdaten veranschaulichen.

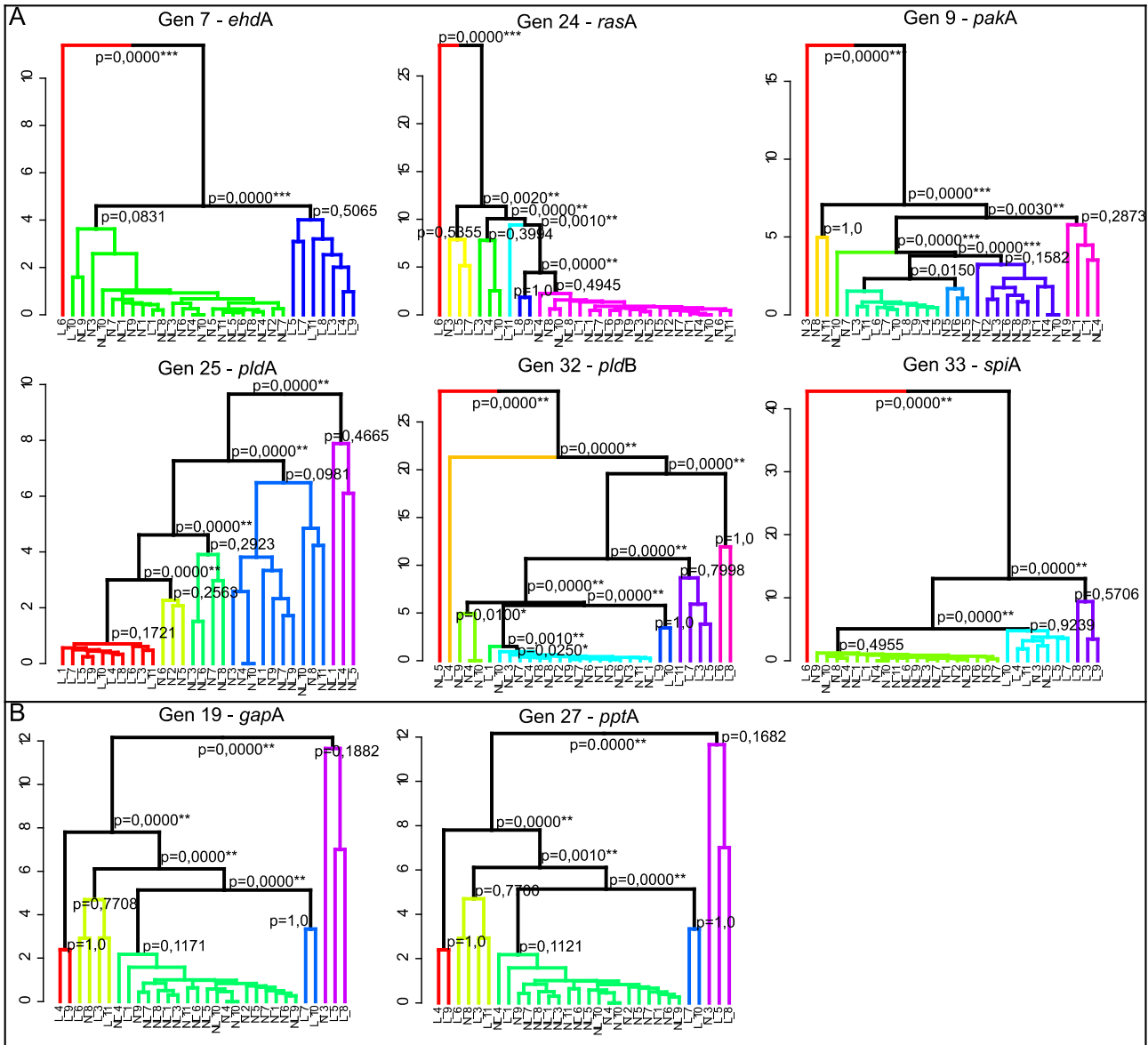


Abbildung 27: Analyse des Einflusses der Genexpression der einzelnen Mutanten auf das Fusionsexperiment mithilfe der Clusteranalyse

Die signifikante Clusteranalyse erfolgte in der Programmiersprache R mit der Toolbox simprof. Das Vertrauensintervall für die Analyse liegt bei  $\alpha \leq 0,01$ . Die Wahl der Farbe wird vom Programm festgesetzt und richtet sich danach, wie viele Cluster jeweils abgebildet werden.

Worin sich die acht Gene aus Abbildung 27 genau unterscheiden, soll der Verlauf der Genexpressionsmittelwerte aus der Clusteranalyse (Abbildung 27) zeigen. Analog zu den

Clustern wurden die dazugehörigen Mittelwerte gebildet und in der jeweiligen Clusterfarbe über die Zeit dargestellt (Abbildung 28). Das Gen *ehdA* zeigt 3 Cluster (Abbildung 28A, oben links). Die Gruppe 1, rot hervorgehoben, besteht lediglich aus einem Plasmodium. Das Cluster 2, grün markiert, enthält die Proben der Mutante PHO48 und die fusionierten Zellen. Das Expressionsniveau ist schwach und konstant. Die Plasmodien von PHO68 befinden sich im blau gekennzeichneten Cluster 3 (Abbildung 28A, oben rechts). Diese Zellen zeigen zunächst einen leichten Anstieg des Expressionsniveaus zwischen dem Probenahmestartwert und 2h nach Belichtung, gefolgt von einem leichten Abfall auf ein schwaches und konstantes Expressionsniveau (Abbildung 28, oben links). Bei *pakA* befindet sich PHO68 im grün markierten Cluster 4 und ist schwach und konstant exprimiert (Abbildung 28, oben rechts). Die vorangegangenen 3 Cluster bestehen lediglich aus ein oder zwei Einzelzellen. Das lila markierte Cluster 6 ist das zweitgrößte Cluster und besteht zur einen Hälfte aus Fusionsplasmodien und zur anderen Hälfte aus Einzelzellen der Mutante PHO48. Die Einzelzellen der Mutante PHO68 sind vollständig im rot markierten Cluster 1 für das Gen *pldA* (Abbildung 28, unten links) abgebildet und schwach reguliert (Abbildung 29, mittig links). Dieses Cluster ist über den gesamten Probenahmezeitraum von 11h signifikant verschieden von den anderen Clustern. Für die Gene *rasA* und *pldB* (Abbildung 28 A, oben und mittig) splitten sich die Zellen der Mutante PHO68 über mehrere nebeneinander liegende Cluster auf. Beim Gen *rasA* (Abbildung 28A, oben mittig) sind die Plasmodien in den Clustern 1 bis 5 verteilt. Alle 5 Clusterteile zusammengefasst sind signifikant verschieden im Vergleich zum Cluster 6, in dem die Zellen der Mutante PHO48 und die fusionierten Zellen lokalisiert sind (pink hervorgehoben). Diese Zellen sind schwach und konstant exprimiert (Abbildung 28, oben mittig). Für die Einzelzellen der Mutante PHO68 schwankt das Expressionsniveau zwischen Hoch- und Runterregulation. Beim Gen *pldB* (Abbildung 28A, unten Mitte) befinden sich die Plasmodien der Mutante PHO68 hauptsächlich in den Clustern 6 bis 8 (dunkelblau, lila und pink markiert). Zusammen zeigen diese 3 Cluster ein höheres Expressionsniveau als das hellblau hervorgehobene Cluster5 (Abbildung 28, mittig), in dem bis auf 4 Plasmodien die Zellen von der Mutante PHO48 und die fusionierten Zellen gruppiert sind. Im Schnitt ist das Expressionsniveau von Gen *spiA* schwach und konstant (Abbildung 28, mittig rechts). Die Mutante PHO68 befindet sich hauptsächlich im Cluster 3 (hellblau gekennzeichnet), wo hingegen die Plasmodien der Mutante PHO48 und des Heterokaryont bis auf 2 Ausnahmen im Cluster 2 (hellgrün markiert) gruppiert sind.

In den beiden Genen *gapA* und *pptA* (Abbildung 28B) sind die Zellen von der Mutante PHO48 und den fusionierten Zellen bis auf 2 Plasmodien zusammenhängend im Cluster 3 (grün markiert) gruppiert. Es lässt sich hier ein Unterschied in der Homogenität des Expressionsniveaus beider Genen feststellen. Während das Gen *pptA*, bis auf Cluster 2, konstant exprimiert wird (Abbildung 28, unten links), sind die Schwankungen bei *gapA* deutlich größer (Abbildung 28, unten mittig).

Allgemein lässt sich festhalten: *pakA* und *pldA* sind schwach exprimiert. Ein Anstieg der Transkriptmenge ist bei *spiA* und *ehdA* zu beobachten. Eine Unterdrückung der Mutante PHO68 in der Fusionierung beider Mutanten PHO48+PHO68 erfolgt in acht analysierten Genen.

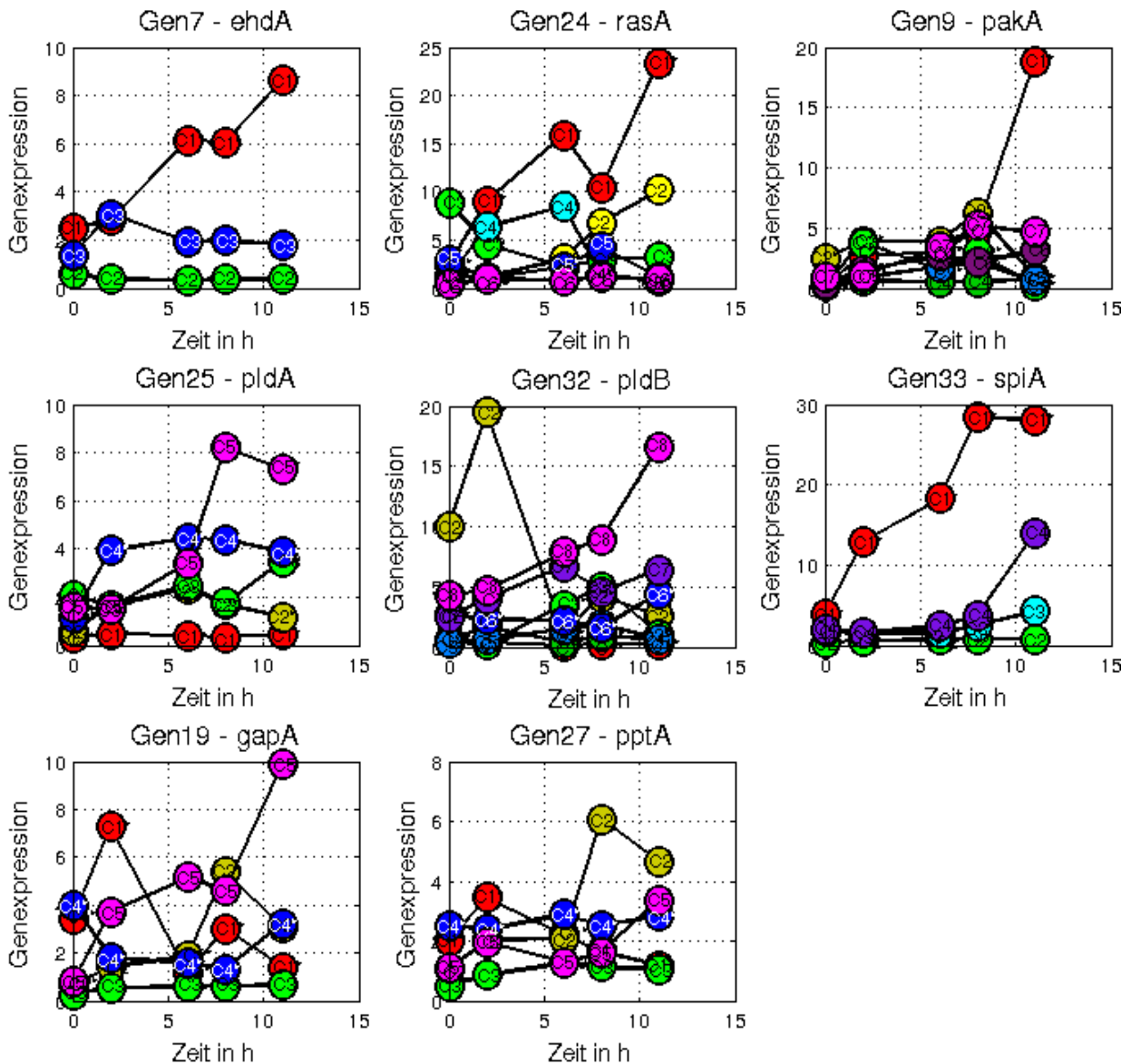


Abbildung 28: Mittelwerte der Clusteranalyse

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus der Clusteranalyse Abbildung 28 in den entsprechenden Farben aus der Abbildung. Die Abkürzung C steht für die Mittelwerte der Plasmodien aus dem jeweiligen Cluster. Diese Cluster sind mit 1 beginnend durchnummeriert.

Auf der Basis des Mann-Whitney-U-Tests gibt es zwischen dem Probenahmestartpunkt und der Probenahme 6h nach Belichtung 21 Übereinstimmungen in der Regulation bei Mutante PHO48 und den fusionierten Zellen (Tabelle 17). Im gleichen Ausmaß existieren 21 Gene mit identischer Regulation bei der Mutante PHO68 und der Fusionierung beider Mutanten. Bei 7 Genen existieren Parallelitäten in dem Expressionsprofil zwischen der Mutante PHO68, Mutante PHO48 und den fusionierten Zellen aus beiden Mutanten PHO68+PHO48. Eine weitere Parallele besteht in dem Nichtvorhandensein einer einzigen Runterregulation. Eine mögliche Komplementation ist in den Genen *pakA*, *tspA* und *meB*

zu beobachten. In allen 3 Genen ist eine signifikante Hochregulation im Probenahmezeitraum 2h bis 6h nach Belichtung analysierbar. Die Auswertung der beiden Mutanten für sich allein zeigt keine regulatorischen Vorgänge für die genannten Gene in dem besagten Zeitraum. Die ausschließliche Betrachtung der regulatorischen Veränderungen liefert keine einzige Übereinstimmung zwischen dem Heterokaryont und der Mutante PHO68. In 14 Genen (Tabelle 17) existieren signifikante Hochregulationen zwischen 0h–6h nach Belichtung bei der Mutante PHO48 und dem Heterokaryont. Diese 14 Gene werden in der Mutante PHO48 früher signifikant reguliert als in den fusionierten Zellen. Nur *pakA*, *meiB* und *anxA* zählen in dem Heterokaryont ebenfalls zu den schnell regulierten Genen. Grund für die verschiedenen Geschwindigkeiten in der Regulation könnte der Einfluss der Mutante PHO68 sein, der zu gering ist, um das Expressionsniveau von PHO48 komplett zu unterbinden, aber groß genug ist, um auf die Geschwindigkeiten Einfluss zuzunehmen. Dies ist ein Beweis für ein Durchmischen der Erbmaterialien bei der Fusionierung der Zellen, in der jede beteiligte Mutante einen unterschiedlich starken Einfluss auf den Heterokaryont ausübt.



Tabelle 17: Vergleich der Genregulationsvorgänge zwischen den Mutanten und dem Heterokaryont PHO48+PHO68

Gen	PHO68						PHO48						Fusion PHO48+PHO68					
	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h
ribA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-1	0	0	1	0	0	0	0	0
nhpA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
pksA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ligA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ralA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
damA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ehdA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pumA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pakA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
cdcA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ardA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
hstA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
psgA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pptB	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tspA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
dspA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pikB	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
uchA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gapA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
meiB	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
pcnA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ribB	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
arpA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rasA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pldA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
anxA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
pptA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pwilA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
cudA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pldC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pikC	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pldB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spiA	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hcpA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rgsA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene bezüglich des Mann-Whitney-U-Tests für 6 verschiedene Zeitintervalle. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 markiert und grau hinterlegt, runterregulierte Gene mit -1 und nicht regulierte Gene mit einer Null bezeichnet. Der Vertrauensbereich liegt bei  $\alpha \geq 99\%$ .

### 5.4.3 Vergleich der Zellfusion der beiden Mutanten PHO48 und PHO68 mit dem Wildtyp #31

Da das eigentliche Ziel der Zellfusionierung der beiden Mutanten die Aufhebung des Sporulationsdefektes war, soll als letztes ein Vergleich der Zellfusion mit dem Wildtyp erfolgen. Diese Analyse soll zeigen, in welchen Genen Ähnlichkeiten vorhanden sind und wo Unterschiede auftreten, die einen möglichen Einfluss auf die Sporulation ausüben. Die gemeinsame Hauptkomponentenanalyse bringt bereits zum Ausdruck (im linken Bild Abbildung 29), dass die Datenpunkte der gesamten 9 Fusionsplasmodien (Dreiecke) sehr eng beieinander angeordnet sind, und zwar in der Höhe der Wildtypzellen (Kreise) von 6h nach Belichtung. Diese stark variierenden Startbedingungen sind eine mögliche Ursache

für das unterschiedliche Sporulationsverhalten, da damit vermutlich bereits aufgrund des Expressionsniveaus einiger Gene bestimmte Sporulationswege nicht mehr zur Verfügung stehen. Daraus resultierend ändert sich die Abfolge von Aktivierungs- und Inaktivierungsprozessen, die den Sporulationsprozess beeinflussen.

Eine genauere Auswertung durch eine getrennte Darstellung verdeutlicht die fehlende räumliche Trennung der Zellen des Heterokaryonts (Abbildung 29, rechtes Bild) im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 29, mittleres Bild). Wenn eine Veränderung des Expressionsniveaus bei einzelnen Fusionsplasmodien vorhanden ist, so zeigt sich dies im Diagramm von Abbildung 29 in der Anordnung der Datenpunkte aus den Einzelplasmodien, welche von rechts nach links entsprechend dem Fortschreiten des Experimentes lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu verläuft die räumliche Ausdehnung der Datenpunkte der Wildtypzellen bezüglich der 11h von unten nach oben. Dies untermauert, dass mithilfe der Hauptkomponentenanalyse bereits allein über die Anordnung der Daten aus den Einzelzellen entsprechend der Probenahmezeitpunkte abgelesen werden kann,

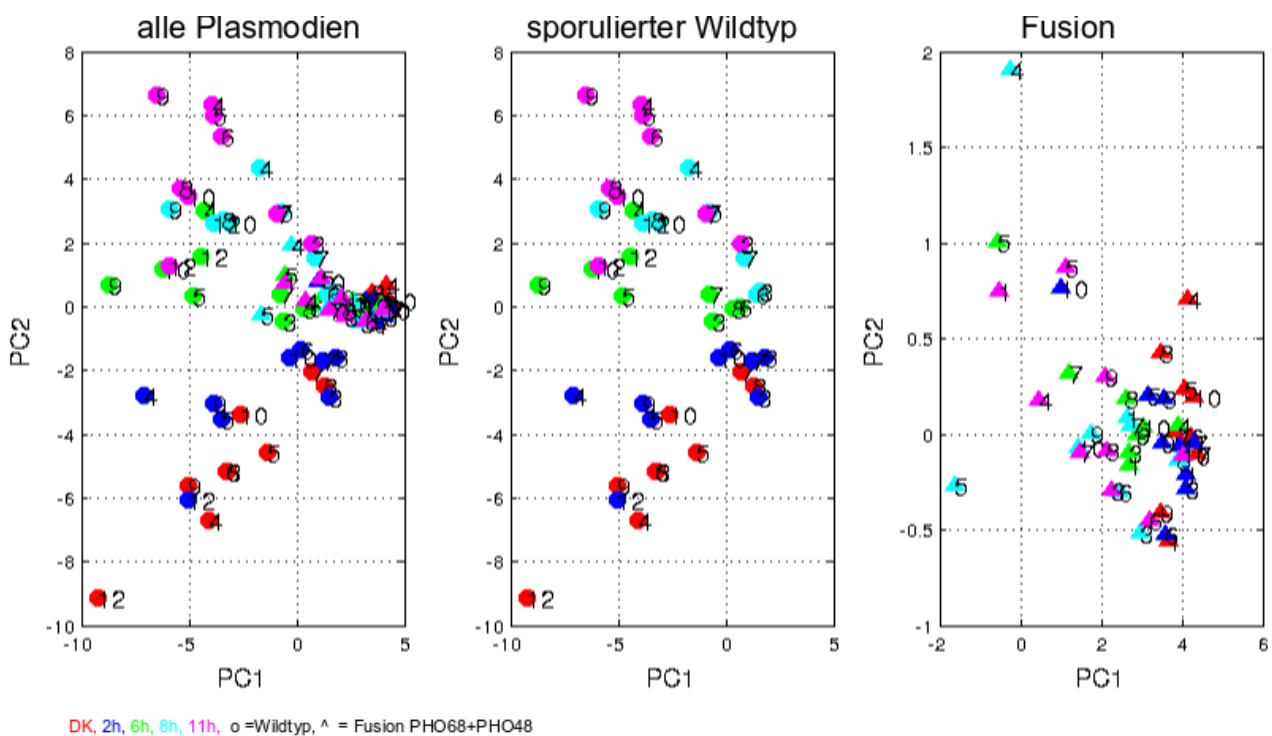


Abbildung 29: Hauptkomponentenanalyse – Vergleich des Heterokaryonts PHO48+PHO68 mit dem Wildtyp

Die signifikante Clusteranalyse erfolgte in der Programmiersprache R mit der Toolbox simprof. Das Vertrauensintervall für die Analyse liegt bei  $\alpha \leq 0,01$ . Die zeitlich verschiedenen Probenahmen sind unterschiedlich farblich markiert und der Legende zu entnehmen.

ob die Zellen Fruchtkörper bildeten oder nicht.

Der Mann-Whitney-U-Test aus Tabelle 18 enthält alle 35 Gene und deren signifikante Änderungen zu 6 verschiedenen Zeitintervallen. Hochregulationen sind mit +1, runterregulierte Gene mit -1 gekennzeichnet. Keine signifikanten Änderungen in einem Zeitintervall sind mit einer Null versehen. Die Anordnung der Gene entspricht dem Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests aus Tabelle 11. Dabei sind zunächst die eindeutig runterregulierten Gene entsprechend ihrer Größe nach aufsteigend sortiert, gefolgt von den nicht regulierten Genen und schließlich den hochregulierten Genen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Wildtyp und den fusionierten Zellen betrifft die runterregulierten Gene. In der Zellfusion findet keine einzige Runterregulation statt, im Unterschied zum Wildtypstamm, bei dem für 11 Gene eine signifikante Runterregulation erkennbar ist. In den fusionierten Zellen sind dagegen die im Wildtyp runterregulierten Gene *ralA*, *pumA*, *ribA* und *meiB* entgegengesetzt reguliert. Damit scheinen die runterregulierten Gene für die Sporulation von besonderer Bedeutung zu sein. Zu den Genen, die in beiden Stämmen ein konstantes Expressionsniveau zeigen, gehören *pksA*, *damA*, *pptB*, *ribB* und *rasA*. Außerdem gibt es Übereinstimmungen bei der Hochregulation der Gene *pakA*, *pldA*, *pptA* und *pwiA* in dem Zeitraum zwischen dem Probenahmestartwert und 6h nach dem dunkelroten Lichtimpuls.

Tabelle 18: Vergleich von Wildtyp und Heterokaryont PHO48+PHO68 mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests

Gen	Fusion PHO48+POH68						Wildtyp #31					
	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h	0h-6h	6h-11h	0h-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h
ralA	1	0	0	0	0	0	-1	-1*	0	-1*	0	0
pumA	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
psgA	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	-1*	-1	0
pldC	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1*	0	0
ribA	1	0	0	0	0	0	-1*	0	0	0	0	0
pikB	0	0	0	0	0	0	-1*	0	0	0	-1*	0
meiB	1	0	1	1	0	0	-1*	0	0	0	0	0
nhpA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1*	0
cudA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1*	0
pldB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1*	0
uchA	0	0	0	0	0	0	0	-1*	0	0	0	0
pksA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dama	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ardA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pptB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tspA	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
dspA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pcnA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ribB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rasA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
anxA	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pikC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hstA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0
ligA	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
ehdA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1*	0	0
pakA	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1*	0	0
cdcA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1*	0	0
gapA	0	0	0	0	0	0	1	1*	0	1	0	0
pldA	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1*	0	0
pptA	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
pwiA	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1*	0	0
spiA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
rgsA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
arpA	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	1	0	0
hcpA	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	1*	0	0

Die Tabelle 18 zeigt die Gruppierung der hoch- und runterregulierten Gene des sporulierten Wildtyps (rechte Spalten) und des nicht sporulierten Heterokaryont (linke Spalten) für 6 verschiedene Zeitintervalle nach Mann-Whitney-U-Test. Als Konfidenzintervall wurde  $\alpha \geq 99\%$  gewählt. Hochregulierte Gene sind mit +1 markiert und hellgrau hinterlegt, runterregulierte Gene mit -1 markiert und dunkelgrau hinterlegt und nicht regulierte Gene sind mit 0 gekennzeichnet. Die Werte mit einem Sternchen entsprechen einem Vertrauensbereich von mindestens 95% aber kleiner als 99%.

## **5.5 Charakterisierung der epigenetischen Landschaft**

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen eine hohe Individualität der Einzelplasmodien. Mithilfe des epigenetischen Landschaftsmodells von Waddington (1957) soll nun zum ersten Mal die Quasipotential-Landschaft mithilfe von experimentellen Daten erstellt werden, und die Existenz der Einflüsse von Attraktoren auf die regulatorischen Vorgänge in einer Zelle bestätigt werden. Es war zu klären, ob die Sporulation der Zelle durch einen oder mehrere Attraktoren bewirkt wird. Dies könnte einen Ansatz für die Entwicklung von Verfahren bieten, die ein gezieltes Eingreifen in den Zellmechanismus ermöglichen.

### **5.5.1 Wildtypplasmodien in der Quasipotential-Landschaft**

Anstelle der bisherigen 2 Komponenten für die PCA, die gute Ergebnisse für den Vergleich zwischen sporulierten und nicht sporulierten Zellen geliefert haben, wurden hier 3 Komponenten verwendet, um den Verlauf der einzelnen Plasmodien besser analysieren und damit entscheiden zu können, ob ein oder mehrere Attraktoren beim Sporulationsprozess aktiv sind. Die Darstellung der in der PCA gewonnenen Daten für 3 Komponenten der jeweiligen Einzelzellen (Abbildung 30) zeigt 2 generell verschiedene Verläufe. Die beiden linken Abbildungen gehören zu den sporulierten Plasmodien und zeigen einen ähnlichen Verlauf, wenn man die Zeitpunkte der Probenahme der jeweiligen Einzelzellen miteinander verbindet. Während die beiden rechten Abbildungen die Daten der nicht sporulierten Zellen wiedergeben und durch einen einheitlichen Verlauf gekennzeichnet sind, unterschieden sich diese Verläufe aus den Abbildungen 30A und 30C.

Sowohl die für 2min belichteten Zellen (Abbildung 30A) als auch die für 5min belichteten Plasmodien charakterisiert ein parabelähnlicher Verlauf. Jede dieser Trajektorien beginnt im negativen Koordinatenraum und endet im positiven Bereich. Die Kurven der jeweiligen Einzelzellen sind unterschiedlich stark gestreckt, breiter oder schmaler. Der Start- und Endpunkt variiert zwischen den untersuchten Zellen. Der Scheitelpunkt der parabelähnlichen Kurve liegt zwischen den Probenahmezeitpunkten 2h und 6h nach Belichtung. Auffällig ist das Zusammentreffen mit dem Zeitfenster des PNRs. Auch die Auswertung der Ergebnisse aus dem Mann-Whitney-U-Test (Tabelle 11) ergibt, dass einige Gene nach den 6h konstant bleiben, andere Gene nur noch langsam hoch- oder

runterreguliert werden, während wiederum andere Gene erstmalig regulatorischen Veränderungen bezüglich ihres Expressionsniveaus unterliegen. Sowohl die Plasmodien 2, 11, 13 und 18, die für 5min belichtet wurden, als auch Plasmodium 9, die für 2min belichtet wurde, zeigen hingegen einen anderen Datenverlauf.

Aus dem Vergleich der Kurvenverläufe der sporulierten Zellen mit den nicht sporulierten Plasmodien (Abbildung 30B und 30D) ist zu erkennen, dass der parabelähnliche Verlauf bei den sporulierten Zellen bei den nicht sporulierten Zellen fehlt. Der Verlauf der letzteren ist unregelmäßig ohne ein erkennbares zugrundeliegendes Muster. Untereinander scheinen sich die nicht sporulierten Plasmodien ähnlicher zu sein als der sporulierten Plasmodien, da die Daten der Einzelzellen im Diagramm sehr dicht beieinander liegen und so nur einen sehr kleinen Koordinatenraum aufspannen. Die einzelnen Datenpunkte zu den entsprechenden Einzelzellen sind schwer zu identifizieren. Bei den 2min belichteten, nicht sporulierten Einzelzellen fallen die Plasmodien Nr. 2 und Nr. 6 im Vergleich zu den restlichen Plasmodien durch eine großflächige Verteilung ihrer Datenpunkte im Koordinatenraum auf. Der Verlauf des Plasmodiums 6 ist durch eine einmalige Zick-Zackbewegung gekennzeichnet. Das Plasmodium 2 hat zudem einen anderen Startpunkt als die restlichen Zellen. Bei der nach 11h erfolgenden Probenahme sind die Expressionsniveaus aller nicht sporulierten Plasmodien wieder identisch. Für die nicht sporulierten Plasmodien ist bei der nach 5min erfolgenden Probenahme Ähnliches zu beobachten. Hier sind es die Plasmodien 3, 6 und 8, die durch eine großflächigere Verteilung der einzelnen Datenpunkte im Koordinatenraum auffallen.

Die experimentellen Daten zeigen also, dass auf dem Weg zur Sporulation qualitativ stark unterschiedliche Trajektorien vollzogen werden. Dieser experimentelle Befund ist unabhängig von der Quasipotential-Landschaft eine bedeutende Entdeckung. Das Zustandekommen der unterschiedlichen Trajektorien kann im Rahmen der Theorie zur Quasipotential-Landschaft beschrieben und erklärt werden. Die Trajektorien sind dabei als Wege durch die Quasipotential-Landschaft zu verstehen. Die experimentellen Ergebnisse stützen diese Theorie und könnten vermutlich eine weitere Ausarbeitung dieser Theorie motivieren. Ob ein oder mehrere Attraktoren für die Sporulation zuständig sind, kann zu diesem Zeitpunkt aus den vorliegenden Daten nicht geschlussfolgert werden.

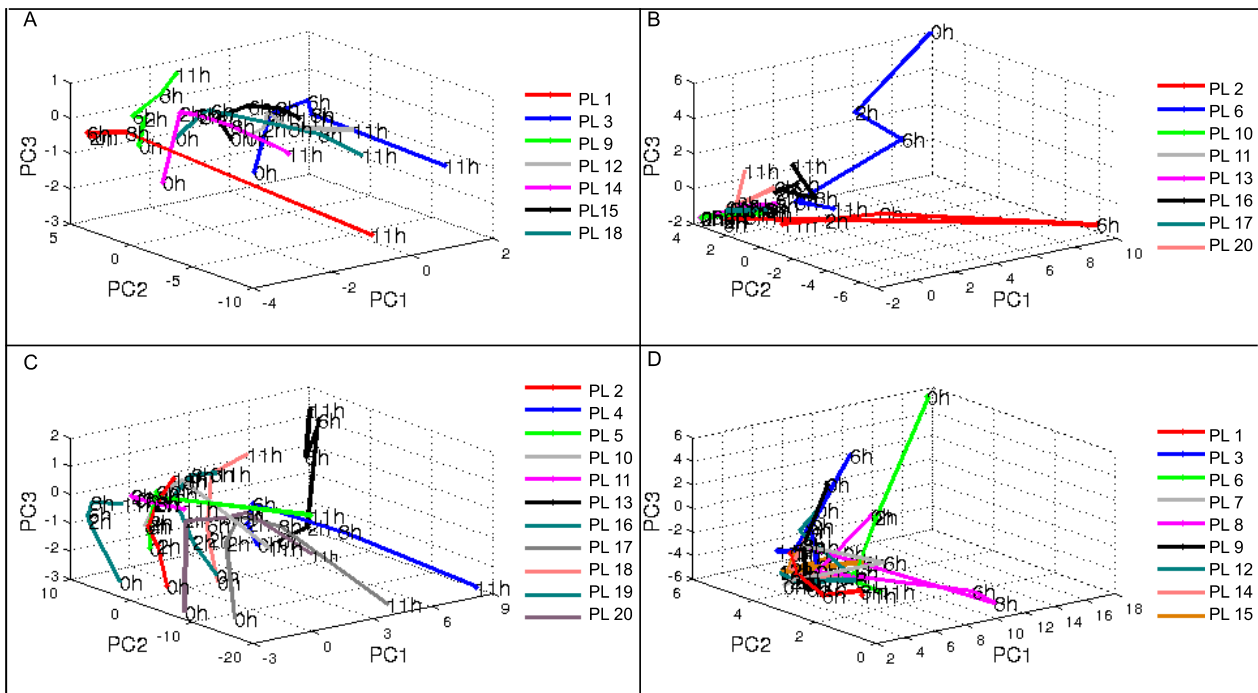


Abbildung 30: Verlauf der Wildtypplasmodien

Abgebildet sind die 3 Hauptkomponenten für die Wildtypen „7 Tage Hungern mit 2 min Belichtung (A+B)“ sowie „7 Tage Hungern mit 2 min Belichtung (C+D)“. Die sporulierten Plasmodien befinden sich jeweils in der linken Spalte der Abbildungen (A+C), die nicht sporulierten Zellen hingegen in der rechten Spalte der Abbildungen (B+D).

## 5.5.2 Plasmodien von Mutanten in der Quasipotential-Landschaft

Die Darstellung der Ergebnisse der PCA für die Mutante PHO68, Mutante PHO48 und deren Heterokaryonten in einem 3D-Raum (Abbildung 31) zeigt, dass jede Mutante durch individuelle Trajektorienverläufe gekennzeichnet ist. Gemeinsam haben die 3 Abbildungen, dass die Daten aller Einzelzellen stark zusammenhängend geclustert sind. Ein systematisches Schema des Verlaufes der Einzelzellen ist hingegen nicht erkennbar. Ähnlich zum nicht sporulierten Wildtyp gibt es lediglich unregelmäßige Anordnungen ohne erkennbares Muster, wie z.B. ein parabelförmiger Verlauf bei den Wildtypzellen. Die Dichte in der Ansammlung der Einzelzellen unterscheidet die Mutanten von dem Heterokaryonten. Basierend auf einem Vergleich von Ausdehnung und Anordnung beider ist festzustellen, dass der Heterokaryont der Mutante PHO48 ähnlicher ist als der Mutante PHO68. Das gleiche Ergebnis erbringt auch die Datenanalyse in Kapitel 5.4. Ein systematisches Schema des Verlaufes hinsichtlich der Probenahmezeitpunkte der Einzelzellen ist nicht erkennbar. Ähnlich zum nicht sporulierten Wildtyp sind hier lediglich Zickzacklinien zu beobachten, der parabelförmige Verlauf der Wildtypzellen fehlt wiederum vollständig.

Die Individualität der Einzelplasmidien ist auch an den Mutanten ersichtlich. Die Daten der einzelnen Probenahmezeitpunkte aus den Einzelzellen sind weit gestreut über den Koordinatenraum verteilt, wobei nicht eine einzige Zelle sporuliert. Damit scheinen auch hier Attraktoren das Fließgleichgewicht des Stammes zu beeinflussen. Dies führt letztlich zur Entstehung von Subpopulationen, die sich in den verschiedenen Formen der Trajektorien widerspiegeln.

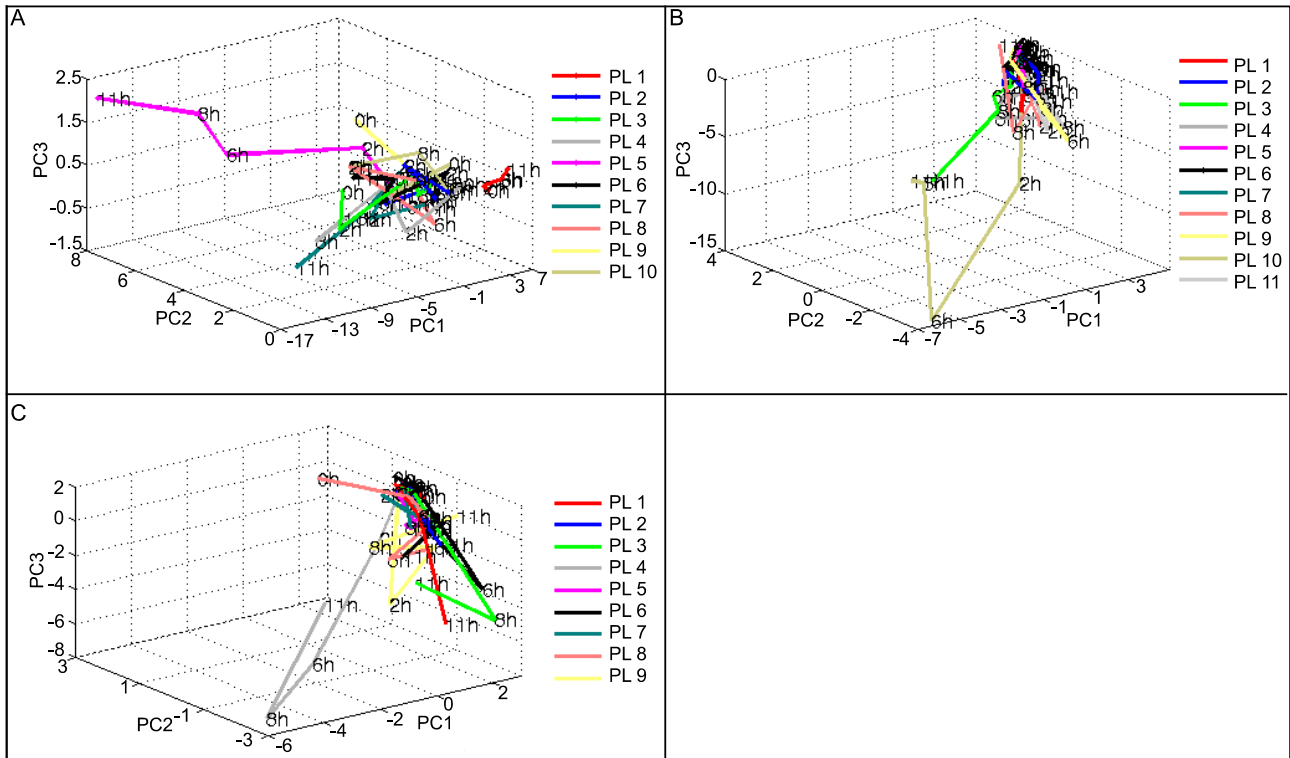


Abbildung 31: Verlauf der Plasmidien der Mutanten *PHO68*, *PHO48* und des Heterokaryonts *PHO48+PHO68*

Abgebildet sind die PCAs in 3D-Form für A: Mutante *PHO68*, B: Mutante *PHO48* und C: Heterokaryont *PHO48+PHO68*. Alle Mutanten hungerten 7 Tage und wurden 30min mit dunkelrotem Licht bestrahlt.



## **5.6 Korrelationsanalyse der Einzelplasmodien**

Aus den vorliegenden Genexpressionsdaten und der aus den vorangegangenen Kapiteln gewonnenen Erkenntnis, dass Zellen dem Einfluss von Attraktoren unterliegen und unterschiedlich schnell reguliert werden, soll mithilfe einer Analyse der regulatorischen Interaktionen zwischen den 35 Genen ein Korrelationsnetzwerk erstellt werden. Die Bestimmung der Zusammenhänge zwischen den metrischen Merkmalen erfolgt über eine Korrelationsanalyse, denn die bisherigen Daten zeigen nur, welche Gene wie reguliert sind, nicht aber die direkten Zusammenhänge zwischen einzelnen Genen. Aber genau diese Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Genen, die zu einer Signalkasade führen, sind für die Ausbildung eines bestimmten Merkmales, wie z.B. die Sporenbildung, besonders wichtig und sollen daher hier analysiert werden.

In dem folgenden Korrelationsnetzwerk sind stark korrelierende Gene über Kanten miteinander verbunden. Diese Kanten unterscheiden sich in durchgezogene Linien für gleichgerichtete und gestrichelte Linien für entgegengesetzte paarweise Korrelationen. Über einen Korrelationskoeffizienten erfolgen die Bestimmung des Ausmaßes und die Art der Verbundenheit zwischen den Merkmalen. Da die vorherigen Analysen erkennen ließen, dass die Plasmodien sehr individuell sind, erfolgt die Korrelationsanalyse für jede Einzelzelle und jeden Physarumstamm separat über einen Zeitraum von 11h. Zur Klärung möglicher Auswirkungen von fehlenden Transkriptionsfaktoren, die u.a. für die Transkription der RNA von Bedeutung sind, sollen die Experimente mit den Mutanten behilflich sein.

### **5.6.1 Korrelationsanalyse des Wildtyps**

Das Korrelationsnetzwerk (Abbildung 32) für den Wildtypstamm zeigt 11 der 35 untersuchten Gene. Die Auswahl bezieht sich auf die bereits existierenden Netzwerke (Rätzel 2013).

Nach einer Hungerphase von 7 Tagen fanden zunächst die Dunkelprobenahmen statt. Anschließend erfolgte eine Belichtung für eine Dauer von 5min mit dunkelrotem Licht. Im Anschluss folgten 4 weitere Probenahmen zu den Zeitpunkten 2h, 6h, 8h und 11h nach Belichtung. Die Kontrolle auf Sporulation am darauffolgenden Tag offenbarte, dass 5min

ausreichend waren, um ca. die Hälfte der Platten zum Sporulieren zu bringen (11 der Einzelzellen sporulierten und 8 sporulierten nicht). Die sporulierten Plasmodien sind in der oberen Hälfte, die nicht sporulierten Zellen in der unteren Hälfte von Abbildung 33 dargestellt. Die Anordnung der Gene ist identisch zur Anordnung der bereits erstellten regulatorischen Netzwerken (Rätzel 2013). Wie bereits erwähnt verbinden Kanten streng korrelierte Merkmale miteinander. Der gewählte Korrelationskoeffizient liegt bei  $\geq 0,8$ . Die rot markierten Kanten in den sporulierten Zellen zeigen wiederholt auftretende Korrelationen zwischen den einzelnen Plasmodien. Dazu zählen Häufungen mit mindestens 80%iger Wiederkehr. Besonders auffällig sind die Korrelationen zwischen *ehdA* und *cdcA*, *ehdA*, zwischen *pptA*, *rgsA*, *pptA* und *cdcA* sowie zwischen *rgsA* und *pwiA*. Die Gene *ehdA*, *cdcA* und *pptA* sind stark korreliert und werden daher vermutlich durch gemeinsame Transkriptionsfaktoren reguliert. Wenn *hstA* mit *pakA* korreliert ist, dann korrelieren laut Analyse ebenso *pakA* und *ehdA*. Auch hier scheint im Minimalmodell ein gemeinsamer Transkriptionsfaktor vorhanden zu sein.

Vergleicht man die regulatorischen Netzwerke zwischen den sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien (Abbildung 32A und 32B), zeigt sich eine extreme Reduktion der Anzahl der paarweisen Interaktionen bei den nicht sporulierten Zellen im Vergleich zu den sporulierten Einzelzellen. Eine Ausnahme bildet die nicht sporulierte Einzelzelle Nummer 7, die im Vergleich zum Wildtyp mehr Korrelationen besitzt (Abbildung 32B, obere Zeile, drittes Korrelationsnetz). Auffällig sind die häufig auftretenden paarweisen Korrelationen im sporulierten Wildtyp: *psgA* - *pcnA* und *hstA* - *nhpA*. Da diese Korrelationskombinationen in den nicht sporulierten Zellen nicht vorhanden sind, könnten sie eine Schlüsselfunktion bei der Sporulation einnehmen.

Die Individualität der Plasmodien kristallisiert sich auch in den vorhandenen regulatorischen Netzwerken heraus. Es existiert keine einzige völlig identische Netzstruktur zwischen den einzelnen Zellen (Abbildung 32A und B). Das liegt zum einen daran, dass sich bei den ersten Probenahmen nicht alle Zellen im gleichen Zustand befinden und damit eine zeitverzögerte Entwicklung der Genexpression vorliegt. Zum anderen hängt dies von der Heterogenität der Einzelplasmodien ab.

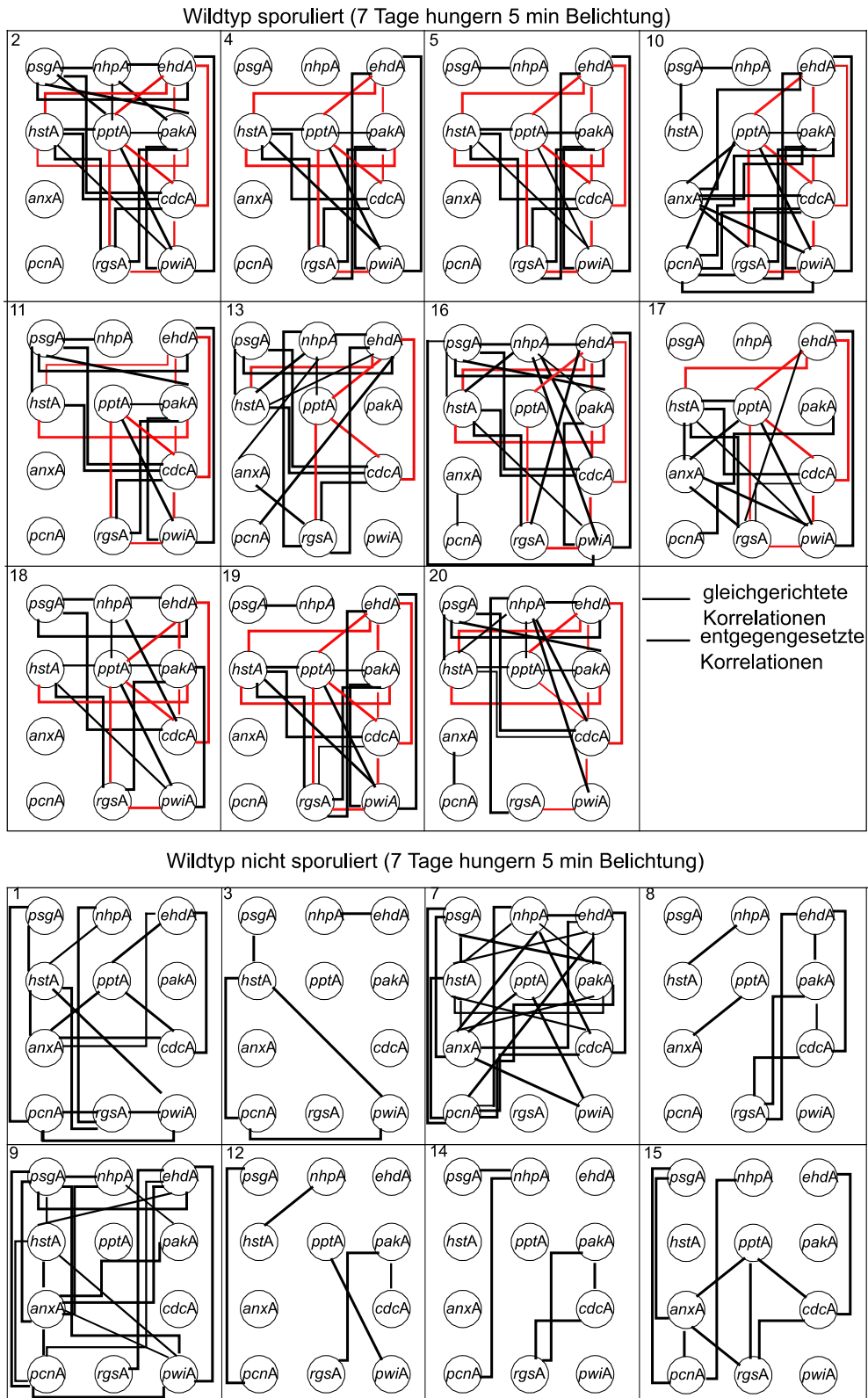


Abbildung 32: Korrelationsnetzwerk Einzelplasmodien- Wildtyp

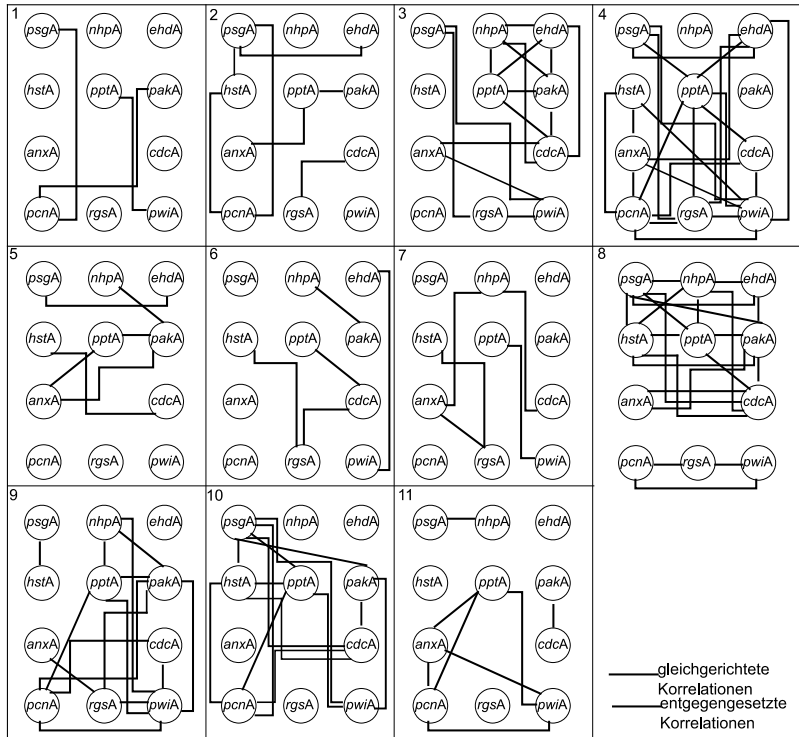
Abgebildet sind die Wildtypplasmodien, die 7 Tage hungerten und dann mit dunkelrotem Licht für 5min belichtet wurden. Die Ergebnisse sind getrennt dargestellt nach sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien. Gleichgerichtete Korrelationen sind mit einer durchgezogenen Linie dargestellt und entgegengesetzte Korrelationen mit einer gestrichelten Linie. Der Korrelationskoeffizient liegt bei  $\geq 0,8$ . Auffällige Korrelationen, die nur im Wildtyp mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 80% auftreten, sind rot markiert.

## 5.6.2 Korrelationsanalyse der Mutanten PHO48 und PHO68

Die Korrelationsnetzwerke für die Mutanten PHO48 und PHO68 (Abbildung 33) sind identisch zu denen der Wildtypplasmodien aus 5.6.1 aufgebaut. Im Gegensatz zum Wildtyp lag die Belichtungsintensität bei 30min für die untersuchten Mutanten. Auch hier beträgt der Korrelationskoeffizient, wie in 5.6.1, mindestens 0,8. Bis auf vereinzelte Einzelzellen zeigen beide Mutanten nur sehr wenige Korrelationen zwischen 2 Genen. Nur selten zeigen Plasmodien mehr als 6 Korrelationen. Diese Minimierung der paarweisen Korrelationen ist eine Folge der Mutagenisierung. Somit werden auch Gene negativ gelenkt, die Einfluss auf den Sporulationsvorgang haben. Aber auch starke Vermehrungen von Korrelationen, wie bei einzelnen Plasmodien zu beobachten ist, sind Folgen der Mutagenisierung. Der Kontrollmechanismus der zugrundeliegenden Regulation scheint hierbei beeinflusst zu sein.

Charakteristische Verbindungen für die Mutanten PHO48 und PHO68 können unter den 11 Genen nicht ausfindig gemacht werden, da nicht eine einzige Korrelation in einer der beiden Mutanten Einzelzellen wiederholt auftritt (Abbildung 33). Das bedeutet aber nicht, dass nicht dennoch mutantenspezifische Korrelationen zwischen den anderen Genen existieren.

Mutante PHO48



Mutante PHO68

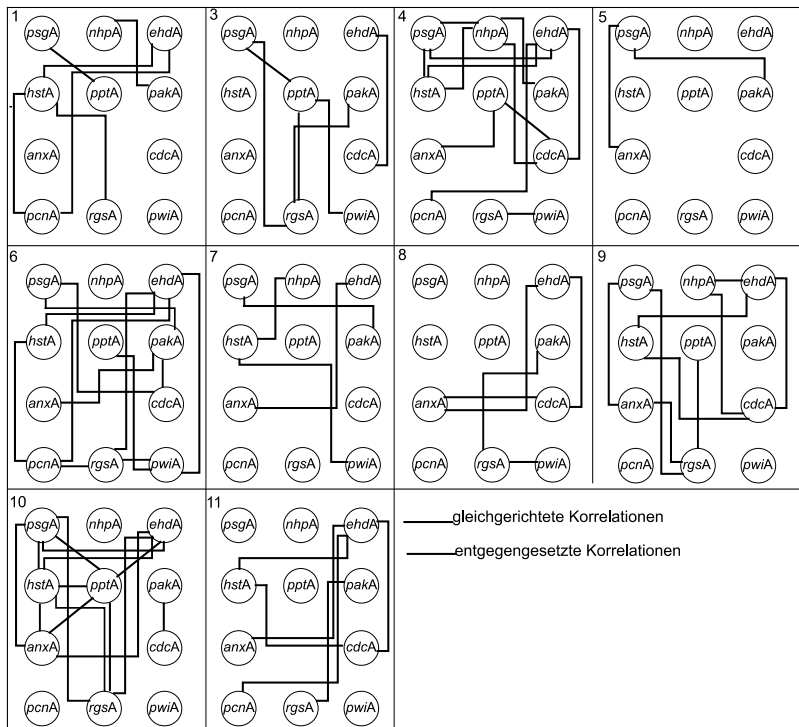


Abbildung 33: Korrelationsnetzwerk Einzelplasmidien - Mutanten

Abgebildet sind die Plasmidien von Mutanten, die 7 Tage hungerten und dann mit dunkelrotem Licht für 30 min belichtet wurden. Die Ergebnisse sind getrennt dargestellt nach Mutante PHO48 und Mutante PHO68. Gleichgerichtete Korrelationen sind mit einer durchgezogenen Linie dargestellt, entgegengesetzte Korrelationen mit einer gestrichelten Linie. Der Korrelationskoeffizient beträgt mindestens 0,8.

### 5.6.3 Vergleich der regulatorischen Netzwerke von Einzelplasmodien

Bereits die Gegenüberstellung sporulierter Wildtypen und nicht sporulierter Wildtypplasmodien enthüllt gravierende Differenzen in der Anzahl der paarweisen Korrelationen (Abbildung 32). Dieses Phänomen bleibt auch bei den 2 analysierten Mutanten erhalten (Abbildung 33) und scheint damit charakteristisch für nicht sporulierte Zellen zu sein. Kaum einer der rot markierten Zusammenhänge zwischen 2 Genen aus dem sporulierten Wildtyp (Abbildung 32) ist in den Mutanten wiederzufinden. Die analysierte Kombination der Gene *ehdA*, *cdcA* und *pptA* existiert in keinem der nicht sporulierten Plasmodien. Ebenso tritt die Kombination auf, wenn *hstA* mit *pakA* gleichgerichtet korreliert ist, so sind auch die Gene *pakA* und *ehdA* positiv verbunden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese beiden Kombinationen eine Schlüsselfunktion für den Sporulationsvorgang besitzen. Der Vergleich zu den Ergebnissen von Rätzel (2013) bestätigt die wenigen paarweisen Verbindungen in den Mutanten PHO48 und PHO68. Ebenso bestätigen sich die Korrelationen zwischen den Genen *ehdA-pakA* und *rsgA-pwiA* im sporulierten Wildtyp. Die geringe Anzahl der Verbindungen zwischen 2 Genen im Wildtyp konnte indessen nicht in der Einzelzellzeitserienanalyse nachgewiesen werden.

Allgemein bleibt festzuhalten: Nichtlineare dynamische Prozesse wirken sich auf die differenzielle Regulation von Transkriptionsfaktoren aus, was wiederum das gesamte Reaktionsnetzwerk gravierend beeinflusst.

## 6. Diskussion

### 6.1 Optimierung der Kultivierung von *Physarum polycephalum*

Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen mussten zunächst die Probenahmeprozesse von Hoffman (2012) modifiziert werden. Dabei lag der Schwerpunkt in der Etablierung eines Zeitserienexperimentes von Einzelplasmodien, das Wiederholungsmessungen an einem Plasmodium erlaubte. Bereits Hildebrandt (1986) und Starostzik (1994) führten Schneideexperimente zur Zellfusionierung zweier Plasmodien durch. Jedoch blieb ungeklärt, ob das Schneiden in der Mitte Auswirkungen auf das Expressionsniveau hat. Daher mussten Kontrollversuchsreihen durchgeführt werden, die klarstellen sollten, welchen Einfluss Manipulationen an den Zellen auf das Expressionsniveau haben. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, ob die 35 Gene homogen auf der Platte verteilt sind. Dazu fanden 2 Versuchsreihen statt, in denen zum einen Vergleiche zwischen Rand- und Innenmaterial der Riesenzelle stattfanden und zum anderen Teilstücke von bis zu 8 Proben analysiert wurden. Die Ergebnisse des Rand-Innen-Experimentes decken sich mit einer 84%igen Übereinstimmung. Ein Beweis für eine systematische Veränderung des Expressionsniveaus, welches auf der wiederholten Entnahme von Proben basiert, liegt damit allerdings nicht vor. Beide Resultate zusammen betrachtet, ermöglichen die Schlussfolgerung: Der Ort der Probenahme spielt für die untersuchten 35 Gene keine Rolle. Es ist davon auszugehen, dass auch in den anderen, nicht betrachteten Gene keine signifikanten Änderungen des Expressionsniveaus stattfinden, die auf das Schneiden zurückzuführen sind. Der Grund für diese Annahme liegt in der Funktionsvielfältigkeit der analysierten Gene.

Festzuhalten bleibt allerdings, dass Expressionsveränderungen, in denen das Expressionslevel sich nicht mindestens vervierfacht oder um das Vierfache reduziert wird kritisch betrachtet werden müssen (Vergleich Ergebnis aus 5.2.1). Die Ursache hierfür liegt in den natürlichen Schwankungen zwischen den einzelnen Teilproben eines Plasmodiums.

Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten die Durchführung eines Testversuches einer Zeitserie mit eingeschränkter Probenahme von einem Plasmodium bei 0h, 6h und 11h nach Belichtung mit dunkelrotem Licht. Ein Vergleich der gewonnenen Expressionsdaten mit den Daten aus der 454-Sequenzierung (Glöckner et al. 2008) sowie mit der bis dahin aktuellsten Probenahmetechnik (Hoffmann et al. 2012) liefert in Abhängigkeit vom jeweils

untersuchten Zeitintervall eine Übereinstimmung zwischen der etablierten Methode und der neuen Technik von 71–83%. Dies entspricht den Erwartungen an die Zeitserienprobenahme von einem Plasmodium. Es ist naheliegend, dass sich die Differenz von 15-30% dadurch erklären lässt, dass die Daten für die bereits publizierten Arbeiten an Populationen von Plasmodien gemessen wurden (was einer rechnerischen Mittelung über viele Zellen gleichkommt), während in der vorliegenden Arbeit Einzelzellen vermessen wurden. Erst die Analyse der Zeitreihe von einer Einzelzelle ermöglicht eine eindeutige Identifikation von hoch- und runterregulierten Genen. Die Ergebnisse gestatten eine Durchführung von Zeitreihen an Einzelzellen, ohne dass vorhandene Expressionsniveaus durch notwendige Schneidvorgänge signifikant gestört werden. Damit bestätigen sich die bereits von Hildebrandt (1986) und Starostzik (1994) gewonnenen Erkenntnisse, dass ein Plasmodium geteilt werden kann, ohne die Entscheidung für oder gegen die Sporulation wesentlich zu beeinflussen.

## **6.2 Der Wildtyp #31**

Die Charakterisierung des Wildtypstammes #31 verlangte sowohl die Durchführung verschiedener Versuchsreihen, die sich in der Belichtungsintensität und in der Dauer der Hungerphase unterschieden, als auch die Charakterisierung einer Kontrollgruppe, welche aus Plasmodien bestand, die nicht belichtet wurden.

Diese Kontrollgruppe verdeutlicht, dass alle in den durchgeführten Experimenten beobachtbaren Änderungen in der Häufigkeit (Konzentration) von Genen, als Folge der Synthese (Transkription) und der Stabilität der mRNAs, Reaktionen auf die Lichtinduktionen darstellen. Damit standen alle 35 Gene für die Charakterisierung zur Verfügung. Zur Beschreibung des Wildtyps wurden folgende Analyseverfahren gewählt, die in ihrem Zusammenspiel eine Charakterisierung der Einzelzellen ermöglichten und die Entwicklung der verschiedenen Probenahmen über verschiedene Zeiträume hinweg veranschaulichen konnten:

1. Hauptkomponentenanalyse (PCA) – zur Reduzierung der Datenmenge und zum Erlangen eines ersten Überblicks über die örtliche Verteilung der einzelnen Plasmodien über die Zeit
2. Mann-Whitney-U-Test – zur Identifizierung von Hoch- und Runterregulation



3. Signifikante Clusteranalyse – zur Untersuchung, wie sich die einzelnen Plasmodien zueinander verhalten, jeweils separat für das entsprechende Gen aus dem Set.

### 6.2.1 Identifizierung wichtiger regulatorischer Gene

Die Belichtung von 15 gehungerten Plasmodien mit dunkelrotem Licht und eine fortlaufende Probenahme nach Sporulationsinduktion führten zur Identifizierung von zwölf hochregulierten, 11 runterregulierten und zwölf konstanten Genen. Durch die fortlaufende Probenahme konnte die Kinetik der Genexpression beobachtet werden. Alle Einzelzellen besaßen die Fähigkeit zur Ausbildung von Fruchtkörpern. Eine Charakterisierung der Gene hinsichtlich ihrer Funktion war eindeutig nicht Ziel dieser Arbeit. Zu den runterregulierten Genen zählen: *ribA*, *nhpA*, *pumA*, *psgA*, *pikB*, *uchA*, *meiB*, *cudA*, *pldC*, *pldB*, was sich mit den Untersuchungsergebnissen von Hoffmann (2012) deckt. Darunter befinden sich 4 langsam regulierte Gene – *pumA*, *ribA*, *meiB* und *uchA* –, bei denen signifikante Änderungen erst bei einer zusammenhängenden Betrachtung von hintereinander liegenden Zeiträumen erkennbar werden. Neben langsam und schnell regulierten Genen gibt es zudem früh regulierte Gene, zu denen die hochregulierten Gene *ligA*, *ehdA*, *pakA*, *cdcA*, *gapA*, *arpA*, *pldA*, *pptA*, *pwiA*, *spiA*, *hcpA* und *rgsA* zählen – auch dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Hoffmann (2012). Bereits Kroneder (1999) identifizierte *ligA* als früh reguliertes Gen, was durch die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt wird. Zu den besonders früh regulierten Genen zählt *pptA*, welches bereits im ersten Zeitabschnitt, 0–2 h nach Belichtung, eine signifikante Änderung vollzieht. Damit scheinen dieses und die anderen früh regulierten Gene am Anfang der Signalkaskade des Sporulationsprozesses zu stehen. Nach dem Erreichen des PNRs, der bei ca. 6h nach Lichtstimulus liegt, findet keine weitere signifikante Hochregulation mehr statt. Diese klare Änderung des Expressionsniveaus im Zusammenhang mit dem PNR tritt bei den runterregulierten Genen nicht ein. So erfolgt die Runterregulation von *ralA*, *psgA* und *pldC* bereits vor dem kritischen Punkt, wohingegen die Regulationsänderung von *nhpA*, *pikB*, *pldB* und *cudA* erst im Anschluss einsetzt.

Der Zeitraum um den „Point of no return“ herum stellt damit einen wichtigen zeitlichen Bereich dar, in dem Gene in ihrer Regulation eine gravierende Änderung vollziehen. Diese Modulationen des Expressionsniveaus könnten Auswirkungen auf Gene nach sich ziehen,

welche im Zusammenhang mit der Sporulation stehen, da die Zellen als Folge auf die veränderte Umweltbedingung, die dunkelroten Lichtstrahlen, mit Aktivierung und Inaktivierung von Genen antworten. Somit haben wahrscheinlich die hoch- wie auch die runterregulierten Gene eine wichtige Bedeutung für die Ausbildung der Fruchtkörper.

Zur Klärung der Frage, welche Gene für die Sporulation besonders wichtig sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Versuch mit stark reduzierter Belichtungszeit durchgeführt, sodass ca. die Hälfte der Plasmodien sporulierte, die andere Hälfte hingegen nicht. Die Analyse über die 2 Hauptkomponenten offenbart bei den sporulierten Plasmodien eine räumliche Trennung der Datenpunkte im Koordinatenraum bezüglich der Zeitpunkte der Probenahmen. Diese Trennung nach den Probenahmezeitpunkten fehlt in der Gruppe der nicht sporulierten Zellen vollständig. Somit ist es bereits aus der Anordnung der Daten der einzelnen Plasmodien möglich, diejenigen Einzelzellen herauszufiltern, die sporulierten, und diejenigen, die keine Sporen bildeten.

Ein Vergleich der nicht sporulierten Einzelzellen mit den Kontrollplasmodien offenbart für die belichteten aber nicht sporulierten Zellen eine stärkere Ähnlichkeit unter den Plasmodien.

Die Analyse der Expressionsdaten bestätigt die Vermutung der Mitwirkung von hoch- wie auch runterregulierten Genen bei der Ausbildung von Fruchtkörpern. Lediglich für die Gene *cdcA*, *pldA* und *pptA* erfolgt eine signifikante Änderung des Expressionsniveaus der belichteten, nicht sporulierten Zellen. Identisch zu den sporulierten Zellen findet eine Hochregulation der betreffenden 3 Gene statt. Der Vergleich mit dem Expressionsniveau bei den sporulierten Zellen ergibt allerdings eine deutlich geringere Hochregulation dieser 3 Gene bei den nicht sporulierten Zellen. Das bedeutet, dass für mindestens eines dieser Gene über den gesamten Probenahmezeitraum von 11h ein konstant hohes Expressionsniveau existieren muss. Für die Identifizierung, welches dieser 3 Gene hochreguliert sein muss, oder ob möglicherweise doch alle 3 Gene ihr Expressionsmuster ändern müssen, wären Knock-Out-Experimente notwendig gewesen, die aber den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten. Damit bleibt diese Frage vorerst ungeklärt.

### **6.2.2 Identifizierung äußerer Faktoren auf das Expressionsverhalten**

Die Mittelwertbildung über alle Zeitpunkte aller Plasmodien für jedes der 35 Gene, getrennt nach den 2 Merkmalen Belichtungsintensität und Dauer der Hungerperiode, ermöglicht eine Identifizierung von 6 Genen, bei denen eine Trennung bezüglich der

äußeren Einflüsse – 6 oder 7 Tage Hungern bzw. 5min, 10min, 15min, 20min oder 30min Belichtung – vorliegt.

Grundsätzlich zusammen geclustert sind die Daten der 7 Tage hungernden Zellen mit jeweils 5min oder 15min Belichtung sowie die Daten der 6 Tage hungernden Riesenzellen mit einer Belichtungsintensität von 10min oder 20min. Für die Plasmodien mit den Merkmalen 6 Tage Hungern und 30min Belichtung kann keine eindeutige Zuordnung geschehen. Abhängig vom jeweiligen Gen erfolgt die Einteilung in eine der beiden Gruppen. In den Genen *pptB*, *tspA*, *rgsA* und *ralA* ergibt sich die Trennung der Merkmale anhand der Länge der Hungerphase. Bei den beiden Genen *pksA* und *ribB* scheint zudem die Belichtungsintensität einen Einfluss zu haben. Bei einer längeren Hungerphase (7 Tage vs. 6 Tage) weisen die Gene *pksA*, *pptB* und *tspA* ein höheres Expressionsniveau auf. Diese Gene codieren eine Phosphatase oder Genprodukte, die im Zellzyklus aktiv sind. Die Entwicklung von *ribB* lässt die Schlussfolgerung zu, dass Belichtungsintensität und Dauer der Hungerphase sich auf die Geschwindigkeit der Regulationsvorgänge auswirken und damit im direkten Zusammenhang stehen. Schon Marwan (2003) zeigte, dass in Abhängigkeit der Umweltbedingungen schon ein kurzer Lichtimpuls ausreicht, um das Plasmodium zur Sporenbildung anzuregen. Marwan macht dafür ausschließlich die Photonenbestrahlung verantwortlich. Nun kristallisiert sich heraus, dass auch die Länge der Hungerphase spezifischen Einfluss nimmt.

Je kürzer die Phase des Hungerns ist, desto länger muss die Belichtung mit dunkelrotem Licht erfolgen, damit die Zellen nach Erreichen des kompetenten Stadiums Fruchtkörper ausbilden. Oder anders formuliert: Nach einer entsprechend langen Hungerphase reicht auch ein kurzer Lichtimpuls zur Einleitung des Sporulationsprozesses aus.

### **6.3 Charakterisierung der Mutanten PHO48 und PHO68 sowie des Heterokaryonten (PHO48+PHO68)**

Die Charakterisierung der Mutanten PHO48 und PHO68 von *Physarum polycephalum* diente dem Ausfindig machen von Genen, die für die Sporulation des Eukaryonten entscheidend sind. Daher wurde der Fokus der vorliegenden Arbeit auf Mutanten gerichtet, die zum Teil stark eingeschränkt in ihrer Sporulation und zum Teil komplett sporulationsnegativ sind. Nach der Kultivierung im Dunkeln und der anschließenden Belichtung sporulierte keine der untersuchten Einzelzellen. Damit bestätigen diese Ergebnisse die bereits früher erbrachten Resultate von Rätzel (2013), in denen u. a. die identischen Mutanten charakterisiert wurden, ohne eine Zeitreihe von einem Plasmodium zu haben.

Die Analyse über die beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 erbringt im Vergleich zum Wildtyp in beiden Mutanten sowie in deren Fusion Fällen keine räumliche Trennung der zeitlich versetzten Probenahmen über 11h hinweg. Die Daten jedes einzelnen Plasmodiums bilden ihr eigenes separates Cluster, das dem Muster der nicht sporulierten Wildtypzellen entspricht. Damit zeigt sich erneut, dass die 2D-Hauptkomponentenanalyse, die über 90% der gesamten Informationen wiedergibt, eine gute Möglichkeit bietet, sporulierende Plasmodien zu identifizieren. Bei Mutante PHO48 zeigt sich eine räumliche Trennung der Trajektorien für den Zeitraum Dunkelprobe und 2h nach Belichtung in den 2D-PCA-plots. Alle Riesenzellen bewegen sich unterschiedlich schnell zurück zum Startpunkt. Im Gegensatz zur Mutante PHO48 fehlt bei Mutante PHO68 in allen 35 Genen jegliche Art von signifikanten Expressionsänderungen. Konträr dazu sind 85% der Gene von Mutante PHO48 im Zeitraum zwischen dem Start der Probenahme und der Probenahme 2h nach Lichtinduktion hochreguliert, was dem Verteilungsmuster der einzelnen Plasmodien in der PCA entspricht. Lediglich für die Gene *ribA* und *nhpA* findet eine signifikante Runterregulation zwischen den Probenahmen 2h und 6h nach Belichtung statt. Diese fällt jedoch um ein Vielfaches schwächer als die vorangegangene signifikante Hochregulation aus. Nur die Gene *ehdA*, *pldC*, *pldB* und *rgsA* sind in ihrem Expressionsniveau konstant. Beide Mutanten unterscheiden sich also völlig hinsichtlich des Expressionsmusters ihrer Gene. Dieses wurde durch chemische Mutagenisierung verursacht, da beide Mutanten aus dem Wildtypstamm entstanden. Analog zum Wildtyp werden auch bei der Mutante PHO48 die Gene *ligA*, *pakA*, *cdcA*, *rasA*, *pptA*, *pwiA* und

*spiA* hochreguliert. Zu berücksichtigen ist allerdings das Level der Hochregulation, das bei allen Einzelzellen des Wildtyps um ein Vielfaches höher liegt. Damit scheint eine Alles-oder-Nichts-Reaktion zugrunde zu liegen. Wird ein bestimmtes Grenzlevel überschritten, erlangt die Zelle die Fähigkeit zu sporulieren, wenn die Plasmodien zuvor ausreichend lange gehungert hatten und der Lichtimpuls ausreichend lang erfolgte.

Wie auch bei den beiden Einzelmutanten, detektiert der Mann-Whitney-U-Test keine einzige Runterregulation. Mithilfe der PCA kommt eine räumliche Trennung der Datenpunkte in den Zeitintervallen 0–6 h nach Belichtung sowie 0–11 h nach Lichtstimulus zustande, welche anschließend sofort wieder zerfällt. Eine Analyse der Rohdaten ergibt eine Eingrenzung des Zeitraums, in dem die regulatorische Veränderung für das Intervall der Probenahme 0 h und 6 h nach Lichtinduktion erfolgt. Die Regulationsmechanismen scheinen nach Erreichen des PNR völlig gestört zu sein, oder aber das Expressionsniveau der entsprechenden Gene ist nicht so hoch wie in Zellen, die den PNR überschreiten. Ob die untersuchten Gene tatsächlich die Wahrscheinlichkeit, den PNR zu überschreiten, kausal beeinflussen oder diese Wahrscheinlichkeit nur in der Auswertung abbilden, kann aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht entschieden werden.

Während Mutante PHO48 ausschließlich aus schnell regulierten Genen besteht, besitzt der Heterokaryont (PHO48+PHO68) auch langsam regulierte Gene, wie *ralA*, *ribA*, *pumA*, *ardA*, *pcnA*, *pldA*, *anxA*, *pptA*, *pwiA*, und *pikC*. Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der Regulation lassen vermuten, dass es sich um Komplementationseffekte handelt. Das Kräfteverhältnis beider Mutanten innerhalb des Heterokaryonten wirkt sehr unausgeglichen. Die Mutante PHO48 unterdrückt den Einfluss von PHO68 fast vollständig, sodass die Mutante PHO68 ausschließlich auf die Geschwindigkeit der Expressionsänderung einwirken kann. Damit setzten die signifikanten Änderungen in der Zellfusion im Vergleich zur Mutante PHO48 zeitverzögert ein.

Zu den schnell regulierten Genen beim Heterokaryonten gehören *pakA*, *meiB*, *anxA* und *tspA*.

Eine weitere mögliche Komplementation liegt bei den Genen *pakA*, *tspA* und *meiB* vor. Mithilfe der Clusteranalyse konnten 8 Gene detektiert werden, die zeigen, dass der Einfluss von Mutante PHO68 durch Mutante PHO48 unterdrückt wird. Das Cluster differenziert eindeutig für die Gene *ehdA*, *rasA*, *pakA*, *pldA*, *pldB*, *spiA*, *gapA* und *pptA* zwischen 2 Gruppen, zum einen den Zellen von Mutante PHO68 und zum anderen den Zellen der Mutante PHO48 und des Heterokaryonten (PHO48+PHO68). Dabei ist die Anordnung der

Plasmodien in den beiden Genen *gapA* und *pptA* zwar vollkommen identisch, jedoch weisen diese ein jeweils unterschiedliches Expressionsmuster auf. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide Gene in sehr enger Beziehung zueinander stehen, was die Ausbildung der Eigenschaften des Heterokaryonten maßgeblich beeinflusst, steht dennoch außer Frage.

Im Vergleich zum Wildtyp variieren die Expressionsniveaus bereits zu Beginn der Zeitreihe. Damit scheinen bestimmte Wege der Signalweiterleitung nicht zur Verfügung zu stehen. Die veränderten Expressionslevel in den Mutanten lösen somit eine mögliche Änderung der Abfolge der Signalkaskade für den Sporulationsprozess aus, die eine mögliche Ursache für das Ausbleiben der Sporulation sind.

Die Mutagenisierung mit ENU verursacht eine vollständige Blockierung der runterregulierten Signalwege. Dies lässt vermuten, dass die Runterregulation von bestimmten Genen sehr wichtig für den Sporulationsweg ist. Einige Zellen versuchen alternative Signalwege zu aktivieren. In diesen speziellen Fällen kommt es während der Clusteranalyse bei verschiedenen Genen zur separaten Einzelanordnung identischer Plasmodien. Diese Zellen sind im Vergleich zu den restlichen Riesenzellen durch ein höheres Expressionsniveau und durch ein häufig umgekehrtes Expressionsmuster im Vergleich zum Wildtyp gekennzeichnet. Diese Sonderstellung betrifft die Gene *cdcA*, *pikC*, *ehdA*, *pumA*, *pikB*, *gapA*, *meiB*, *arpA*, *rasA*, *cudA*, *spiA*, *psgA*, *pptA*, *anxA*, *pldC*, *hcpA*, *rgsA* und *pldB*. In der Clusteranalyse fallen besonders *pikC* und *cudA*, durch die separate Gruppierung der betreffenden Plasmodien, unabhängig von der Mutantenart und deren Fusionierung, auf. Das Gen *cudA* besitzt Sequenzähnlichkeiten zum Transkriptionsfaktor *cutative transcriptional regulator cudA*, genauso wie das Gen *pikC* zur *Phosphatidylinositol 4-kinase beta*. Im Vergleich zum Wildtyp handelt es sich hierbei um Gene, die für den Sporulationsprozess vermutlich essentiell sind. Diese Gene fungieren damit ebenfalls als Markergene für den Sporulationsprozess.

## 6.4 Die Quasipotential-Landschaft

Die Charakterisierung der verschiedenen Einzelzellen deckt gravierende Differenzen im Expressionsniveau zwischen den einzelnen Zeitreihen der Einzelzellen auf. Zur Klärung dieses Phänomens eignen sich die Ansätze der epigenetischen Landschaft von Waddington (1957). Wörtlich übersetzt bedeutet der dem Altgriechischen entlehnte Ausdruck *epigenetisch*: „auf Entwicklung aufbauend“. Waddington postuliert, dass die Entwicklungsmöglichkeiten eines Lebewesens nicht ausschließlich durch die Erbanlagen festgelegt sind. Vielmehr können diese durch Zufallsfaktoren und nicht genetische Faktoren unterschiedliche Entwicklungsmöglichkeiten bedingen, wie es auch bei den Plasmodien von *Physarum polycephalum* der Fall zu sein scheint. Alle Zellen eines Stammes gehen auf eine klonale Kultur zurück, müssten demnach also die gleichen Erbanlagen (Genotyp) besitzen, und dennoch sind ihre Expressionsniveaus verschieden. Unter Rekurs auf die Theorie von Macarthur (2009) und die hier erzielten Ergebnisse aus der Hauptkomponentenanalyse (PCA) kann geschlussfolgert werden, dass auf dem Weg zur Sporulation qualitativ stark unterschiedliche Trajektorien beschritten werden. Dieser experimentelle Befund scheint unabhängig von der Quasipotential-Landschaft eine wichtige Entdeckung zu sein. Das Zustandekommen der unterschiedlichen Trajektorien kann im Rahmen der Theorie zur Quasipotential-Landschaft beschrieben und erklärt werden. Die Zellen müssen sich demnach in unterschiedlichen Subzuständen befinden, sonst wären die unterschiedlichen Trajektorienverläufe nicht verständlich. Inwieweit aber multistationäre oder andere Attraktoren hierbei im Spiel sind, kann aufgrund der bis dato vorliegenden Ergebnisse noch nicht geklärt werden.

Abbildung 35 soll die Erklärung der unterschiedlichen Trajektorien mithilfe der Quasipotential-Landschaft verdeutlichen. Während die blauen Kugeln an einem Ort, dem sog. Bassin bleiben, bewegen sich die roten Kugeln den Berg in einem parabelähnlichen Verlauf hinab. Diese erreichen am Ende einen stabilen Zustand, der dem Prozess der Ausbildung von Fruchtkörpern entspricht. Die heterogenen Zustände zu Beginn sind durch die unterschiedlichen Anordnungen auf dem Berg dargestellt. Den Einfluss von Attraktoren auf die Plasmodien symbolisieren die beiden rechten Kurvenverläufe, welche ähnliche Wege, aber dennoch verschiedene Trajektorien durchlaufen, obwohl beide am gleichen Ort starteten. Der Scheitelpunkt der Parabel liegt zeitlich gesehen beim Erreichen des PNRs. Die analysierten Daten verwiesen bereits darauf, dass dieser Punkt ein kritischer

Punkt für hoch- und runterregulierte Gene darstellt. Der Richtungswechsel der Kurve kann so interpretiert werden, dass nun die Hochregulation endet und dafür die Runterregulation einiger Gene einsetzt. Die Anordnung des Bassins in der Nähe der Datenpunkte aus den Probenahmen 6h der sporulierten Zellen basiert auf den Beobachtungen in Abbildung 30. Die sporulierten Plasmodien laufen sehr nah am Bassin entlang, befinden sich allerdings auf dessen Rand und haben somit genug potentielle Energie, um sich unter Umwandlung potentieller in kinetische Energie aus dem Tal zu befreien und schließlich den Berg hinabzurollen (Abbildung 34).

Damit wird die Theorie bestätigt, dass Plasmodien, welche sich zu Beginn in einem monostabilen System befinden, divergierende Trajektorien durchlaufen und daraus resultierend verschiedenartige dynamische Verhaltensweisen besitzen. Jeweils an den Knoten sind lokale *steady-states* vorzufinden, die aber zeitlich begrenzt sind. Kennt man die Attraktoren, welche die regulatorischen Prozesse verändern, so kann man gezielt Zellen an den Schnittstellen in eine andere Richtung steuern und damit umprogrammieren oder sogar in ihren Ursprungszustand, eine noch nicht differenzierte Zelle, reprogrammieren. Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses veränderter Umweltbedingungen und die eben gebrachten Überlegungen zeigen Möglichkeiten auf, wie man Zellen gezielt in eine gewünschte Richtung steuern kann, nämlich z. B. durch die Variation der Belichtungszeit oder durch eine zeitlich veränderte Hungerphase. Diese Manipulationen sind einfach und gut kontrollierbar und können tiefgreifende Folgen für das Expressionsprofil einer Zelle haben.

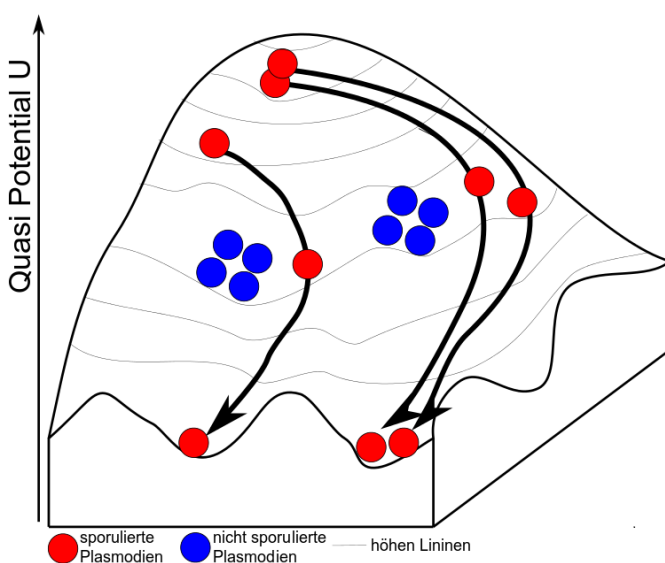


Abbildung 34: Model der epigenetischen Landschaft für *Physarum polycephalum* nach der Theorie Waddington



## **6.5 Auswirkungen der dynamischen Fließgleichgewichte auf die regulatorischen Netzwerke**

Die Übertragung der dynamischen Fließgleichgewichte in ihre regulatorischen Netzwerke erfolgte über eine Pearson-Korrelationsanalyse mit einem Vertrauensbereich von mindestens 99%. Auf der Grundlage der systematischen Analyse der Einzelzellzeitserien erfolgt die Darstellung der Korrelationen für jedes Plasmodium separat, im Gegensatz zu den bereits existierenden Korrelationsanalysen (Rätzel et al. 2013). Die bereits erwähnte hohe Individualität der Plasmodien eines Stammes spiegelt sich auch in den Netzwerken wider. Der Vergleich der Einzelplasmodien untereinander erbringt keine identischen regulatorischen Netzwerke. Die Netzwerke könnten identisch oder verschieden sein oder auch sich verschieden verhalten, je nachdem welche Gene gerade exprimiert sind. Es könnte aber auch sein, dass die regulatorischen Netzwerke identisch sind, sich aber dennoch aufgrund der Multistabilität in verschiedenen Plasmodien unterschiedlich verhalten. Natürlich könnte es auch sein, dass beide Alternativen zutreffen. Es zeigt sich also, dass die Gründe für die Individualität der Plasmodien dafür vielseitig sein können. Zum einen befinden sich während der ersten Probenahme nicht alle Zellen im gleichen Zustand, und zum anderen zeichnet sich hier der Einfluss von Attraktoren ab. Im Vergleich zu den Korrelationsnetzwerken von Rätzel (2013) bestätigt sich die Anzahl der geringen Zusammenhänge zwischen den metrischen Merkmalen bei den sporulationsdefizienten Zellen. Im Gegensatz dazu stehen die sporulierten Plasmodien, welche im Vergleich zu Rätzel (2013) eine viel größere Anzahl von Verbindungen zwischen den betrachteten Genen aufweisen. Die Ursache hier liegt in der Versuchsanordnung. Die angenommenen Verknüpfungen zwischen *ehdA-pakA* und *rgsA-pwiA* konnten wiederum bestätigt werden. Unter der Anwendung einer älteren Technik konnten sich die durch die Vermischung verschiedener Einzelzellen ergebenden Effekte noch verstärken oder auch kompensieren, was zu den Unterschieden zwischen den Netzwerken aus der früheren Studie von Rätzel (2013) und den jetzigen Korrelationsnetzwerken geführt haben dürfte. Betrachtet man nun die Netzwerke der Einzelzellzeitreihen, so sticht hervor, dass es in allen sporulierten Zellen 3 kleine Netzstrukturen gibt. Dies betrifft zum einen die beiden Verknüpfungen *ehdA-cdcA-pptA* und *rgsA-pwiA* sowie zum anderen die Kombinationsregel: Wenn *hstA* mit *pakA* korreliert, dann stehen auch *pakA* und *ehdA* in einer positiven Wechselbeziehung zueinander. Es scheint somit, dass diese Korrelationsnetze eine Schlüsselfunktion für die Ausbildung der Fruchtkörper haben. Hinweise finden sich dafür u. a. im Aufbrechen der

Verbindungen bei den nicht sporulierten Wildtypzellen. Zum anderen handelt es sich hierbei um Gene, die bereits in den einzelnen Charakterisierungen Auffälligkeiten hinsichtlich der Sonderstellung bestimmter Einzelzellen zeigten. 6 der 11 betrachteten Gene, die zur Analyse der früheren Netzwerke (Rätzel et al. 2013) herangezogen wurden, sind Gene, die dafür gesorgt haben, dass sich einzelne Zellen in den Mutanten anders verhalten haben als die rechtlichen Plasmodien.

Die hier nachgewiesenen Wechselbeziehungen einerseits zwischen *psgA* und *pcnA* sowie andererseits zwischen *hstA* und *nhpA* erlauben die Schlussfolgerung, dass bestimmte Strukturen aufbrechen müssen, damit eine Sporulation erfolgen kann. Diese beiden Verknüpfungen sind in über 80% der nicht sporulierten Wildtypzellen vorhanden, fehlen aber bei den sporulierten Plasmodien.

All diese Ergebnisse legen nahe, dass nichtlineare dynamische Prozesse auf die differenzielle Regulation von Transkriptionsfaktoren Einfluss nehmen und damit gravierend auf das regulatorische Netzwerk einwirken.

## 7. Ausblick

In dieser Arbeit konnten durch die Charakterisierung von Zeitreihen an Einzelzellen vom Wildtyp *Physarum polycephalum*, den Mutanten PHO48 und PHO68 sowie deren Heterokaryonten die individuellen Entwicklungen zwischen den einzelnen Plasmodien über die Zeit hinweg betrachtet und analysiert werden. Die Ursachen für die individuellen Entwicklungsverläufe liegen zum einen in den unterschiedlichen Stadien, in denen sich die Zellen zu Beginn der Probenahme befinden können. Zum anderen aber, das haben die Untersuchungen hier ebenfalls gezeigt, können Attraktoren dynamische Prozesse bewirken, die das System in bestimmte Zustände versetzen. Folglich unterscheiden sich auch die Korrelationsnetzwerke innerhalb eines Stammes, da Heterogenität zwischen den Einzelplasmodien vorliegt. Die hier postulierte Streuung der Transkriptmengen einzelner Gene in Einzelzellen sollte in Zukunft durch die Analyse weiterer Proben von Einzelzellen untersucht werden.

Die Einengung des Kreises von möglichen Genen, die an der Sporulation beteiligt sind, ist durch die Charakterisierung weiterer Mutantenstämme möglich.

Die verwendete Fusion erbrachte nicht das gewünschte Ziel – die Reprogrammierung des Sporulationsweges zu aktivieren. Daher sind weitere Fusionsexperimente mit anderen Mutanten notwendig. Bei diesen Fusionierungen sollten verschiedene Mischungsverhältnisse zum Einsatz gelangen, um ein besseres Verständnis des dabei zu beobachtenden Komplementationseffekts zu erlangen.

Der Zeitraum der Probenahme, ca. 6h nach Belichtung, kristallisierte sich als ein sehr kritischer Zeitraum für die Regulationsvorgänge der 35 Gene heraus. Deshalb ist es notwendig weitere Experimente durchzuführen, die den Zeitraum 4 bis 6 Stunden abdecken. Damit könnte es zur Identifizierung von Genen kommen, welche im Zusammenhang mit dem Erreichen des irreversiblen Zustandes stehen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente erlauben es mittelfristig, ein kausales genregulatorisches Netzwerk zu rekonstruieren, das die Differenzierung des Modelorganismus *Physarum polycephalum* steuert.

## Literaturverzeichnis

- Adler P.**, Holt N., Charles E: Mutation increasing asexual Plasmodium formation in *Physarum polycephalum*, *Genetics*, 1977, Vol. 87, No. 3, p. 401–420.
- Alberts B.**, Bray D., Hopkin K., Johnason A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004, 3. Auflage.
- Barrantes I.**, Glockner G., Meyer S., Marwan W.: Transcriptomic changes arising during light-induced sporulation in *Physarum polycephalum*, *BMC Genomics*, 2010, Vol. 11, No. 115.
- Beckman Coulter**: GeXP Chemistry Protocol. GenomeLab™ Genetic Analysis System, 2009, [www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/A29143AC.pdf](http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/A29143AC.pdf), letzter Zugriff am 05.04. 2014.
- Beckman Coulter Inc.** CEQ™8800 Genetik-Analyse-System – Kurzanleitung, Beckman Coulter Inc., 2003.
- Backhauser K.**, Erichson B., Plinke W., Weiber R.: Multivariate Analysemethoden, Springer Berlin, 2004, p. 12, p. 260–307, p. 500.
- Bailey J.**: Plasmodium development in the myxomycete *Physarum polycephalum*: genetic control and cellular events, *Microbiology*, 1995, Vol. 141, p. 2355–2365.
- Baldauf S.L.**: A Search for the origin of animals and fungi: Comparing and combining molecular data, *The American Naturalist*, 1999, Vol. 154, No. 6, p. 178–188.
- Baldauf S.L.**, Doolittle W.F.: Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *PNAS*, 1997, Vol. 94, No. 22, p. 12007–12012.
- Berg J.M.**, Tymoczko J.L., Stryer L.: Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg – Berlin, 2003, p. 175.
- Blumenthal F.**, Polborn K., Steffan B.: The absolute configuration of polycephalin C from the slime mold *Physarum polycephalum* (Myxomycetes), *Tetrahedron*, 2002, Volume 58, Issue 42, p. 8433–8437.
- Brandmaier A.**: Polymalatasenabhängigkeit des Transports von Polymalat in *Physarum polycephalum*, 2005 Regensburg.
- Büchs J.**: Introduction to advantages and problems of shaken cultures, *Biochemical Engineering Journal*, 2001, p. 91–98.
- Burland T.G.**, Solnica-Krezel L., Bailey J., Cunnigham D.B., Dove W.F.: Pattern of inheritance – Development and the mitotic cycle in the protist *Physarum polycephalum*, *Advances in Microbial Physiology*, 1993, Vol. 35, p. 1–69.
- Campbell N.A.**, Reece J. B.: Biologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2003, Vol. 6, p. 447–461.
- Danile, B.**: Methods of culture for plasmodial myxomycetes, *Methods in Cell Physiology*, New York, 1964, Vol. 1, p. 9–13.
- Daniel J.W.**, Rush H.P.: Method for inducing sporulation of pure cultures of the myxomycete *Physarum polycephalum*, *Journal of Bacteriology*, 1961, Vol. 83, No. 2, p. 234–240.

- Daniel** J.W., Rusch H.P.: Method for inducing sporulation of pure cultures of the myxomycete *Physarum polycephalum*, J. Bacteriol., 1962, Vol. 83, p. 234–240.
- Enriquez-Schäfer** R.: Die Multiplex Fragment-Expressionsanalyse – Eine neue Methode für die schnelle und zuverlässige Analyse der Genexpression, Biospektrum, 2005, Vol. 11, No. 5, p. 685–686.
- Ferrell** J.E.: Bistability, Bifurcations, and Waddington's Epigenetic Landscape, Current Biology, 2012, Vol. 22, p. 458–466.
- Glöckner** G., Golderer G., Werner-Felmayer G., Meyer S., Marwan W.: A first glimpse at the transcriptome of *Physarum polycephalum*, BMC Genomics, 2008, Vol. 9, p. 6.
- Golderer** G., Werner E.R., Leitner S., Gröbner P., Werner-Felmayer G.: Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*, Genes & Development, 2001, Vol. 15, No. 10, p. 1299–1309.
- Guttes** E., Guttes S., Rusch H.P.: Morphological observations on growth and differentiation of *Physarum polycephalum* grown in pure culture, Dev. Biol., 1961, Vol. 3, p. 588–614.
- Guttes** E., Guttes S.: Synchronous mitosis in starved plasmodia of the myxomycete *Physarum polycephalum*, Fed. Proc., 1961, Vol. 20, p. 419.
- Hayashi** E., Aoyama N., Wu Y., Chi H-C., Boyer S.K., Still D.W.: Multiplexed, quantitative gene expression analysis for lettuce seed germination on GenomeLab GeXP Genetic Analysis System, 2007,  
[http://www.beckmancoulter.co.jp/seminar/PDF/070717\\_sub1.pdf](http://www.beckmancoulter.co.jp/seminar/PDF/070717_sub1.pdf), letzter Zugriff am 05.04 2014.
- Hildebrandt** A.: A morphogen for sporulation of *Physarum polycephalum* detected by cell fusion experiments, Experimental Cell Research, 1986, Vol. 167, p. 453–457.
- Hoffmann** X.-K., Tesmer J., Souquet M., Marwan W.: Futile attempts to differentiate provide molecular evidence for individual differences within a population of cells during cellular reprogramming, FEMS, 2012, Vol. 329, p. 78–86.
- Hu** F.-S., Clark J., Lott T.: Recurrent senescence in axenic cultures of *Physarum polycephalum*, Journal of General Microbiology, 1985, Vol. 131, p. 811–815.
- Huang** S.: The molecular and mathematical basis of Waddington's epigenetic landscape: A framework for post-Darwinian biology? BioEssays, 2011, Vol. 34, p. 149–157.
- Huang** S., Ingber D.E.: A non-genetic Basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks, Breast disease, 2006 Vol. 26, p. 27–54.
- Huang** S., Eichler G., Bar-Yam Y., Ingber D.E.: Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. Physical Review Letters, 2005, Vol. 94, 128701-1 bis 128701-4.
- Janning** W., Knust E.: Genetik, Thieme, 2004 Stuttgart, 1. Auflage.
- Judd** B.H.: Experimental organisms used in genetics, John Wiley & Sons, 2001, Ltd.
- Junker** J.P., van Oudenaarden A.: Every cell is special: Genome-wide studies add a new dimension to single-cell biology, Cell 2014, Vol. 157, p. 8–11.
- Kroneder** R., Cashmore A.R., Marwan W.: Phytochrome-induced expression of *lig1*, a homologue of the fission yeast cell cycle checkpoint gene *hus1* is associated with the

developmental switch in *Physarum polycephalum* plasmodia, *Curr. Genet.*, 1999, Vol. 36, p. 86–93.

**Krumsiek** J., Marr C., Schroeder T., Theis F.J.: Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, e22649.

**Kumar** S., Wittmann C., Heinzle W., Heinzle E.: Minibioreactors, *Biotechnology Letters*, 2004, Vol. 26, p. 1–10.

**Langfelder** P., Zhang B., Horvath S.: Defining clusters from a hierarchical cluster tree: The dynamic tree cut package for R, *Bioinformatics*, 2008, Vol. 24, No. 5, p. 719–720.

**Logan** J., Edwards K., Saunders N.: *Real-time PCA: Current Technology and Application*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009, p. 1–5.

**Loomis** W.F.: Cell signaling during development of *Dictyostelium*, *Developmental Biology*, 2014, p. 1–6.

**Losen** M., Fröhlich B., Pohl M., Büchs J.: Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures, *Biotechnology Progress*, 2004, Vol. 20, Issue 4, p. 1062–1068.

**Macarthur** B.D., Avi Ma'ayan A., Lemischka I.R.: Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, Vol. 10, p. 672–681.

**Macarthur** B.D., Avi Ma'ayan A., Lemischka I.R.: *Toward Stem Cell Systems Biology: From Molecules to Networks and Landscapes*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.

**Mann**, H.B., Whitney, D.R.: On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other, *Ann. Math. Stat.*, 1947, Vol. 18, p. 50–60.

**Marwan** W., Starostzik C.: The sequence of regulatory events in the sporulation control network of *Physarum polycephalum* analysed by time-resolved somatic complementation of mutants, *Protist*, 2002, Vol. 153, p. 391–400.

**Marwan** W.: Theory of time-resolved somatic complementation and its use to explore the sporulation control network in *Physarum polycephalum*. *Genetics*, 2003, Vol. 164, No. 1, p. 105–115.

**Marwan** W., Sujatha A., Starostzik C.: Reconstructing the regulatory network controlling commitment and sporulation in *Physarum polycephalum* based on hierarchical petri net modelling and simulation, *Journal of Theoretical Biology*, 2005, Vol. 236, No. 4, p. 349–365.

**Marwan** W.: Photomovement and photomorphogenesis in *Physarum polycephalum*: Targeting of cytoskeleton and gene expression by light, Häder, Donat P/ Lebert, Michael (Ed.) *Photomovement*, 2001 Amsterdam, p. 561–587.

**Marwan** W., Sujatha A., Starostzik C.: Reconstructing the regulatory network controlling commitment and sporulation in *Physarum polycephalum* based in hierarchical petri net modelling and simulation, *Journal of Theoretical Biology*, 2005, Vol. 236, No. 4, p. 349–365.

**Orlando** C., Pinzani P., Pazzagli M.: Developments in quantitative PCR, *Clin Chem Lab Med*, 1998, Vol. 36, No. 5, p. 255–269.

**Pena** C., Peter C.P., Büchs J., Galindo E.: Evolution of specific power consumption and oxygen transfer rate in arginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in

shake flaks, *Biochemical Engineering Journal*, 2007, Vol. 36, No. 2, p. 73–80.

**Putzer H.**, Verfuert C., Claviez M., Schreckenbach T.: Photomorphogenesis in *Physarum*: induction of tubulins and sporulation-specific proteins and of their mRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, Vol. 81, p. 7117–7121.

**Rai A.J.**, Kamath R.M., Gerald W., Fleischer M.: Analytical validation of the GeXP analyser and design of a workflow for cancer-biomarker discovery using multiplexed gene-expression profiling, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, Vol. 393, No. 5, p. 1505–1511.

**Renzel S.**, Esselborn S., Sauer H.W., Hildebrandt A.: Calcium and malate are sporulation-promoting factors of *Physarum polycephalum*, *Journal of Bacteriology*, 2000, Vol. 182, No. 24, p. 6900–6905.

**Rätzel V.**, Ebeling B., Hoffman X.-K., Tesmer J., Marwan W.: *Physarum polycephalum* mutants in the photocontrol of sporulation display altered patterns in the correlated expression of developmentally regulated genes, *Development, Growth & Differentiation*, 2013, Vol. 55, No. 2, p. 247–259.

**Rätzel V.** und Marwan W.: Gene expression kinetics in individual plasmodial cells reveal alternative programs of differential regulation during commitment and differentiation, *Development, Growth & Differentiation*, 2015, Vol. 57, p. 408–420.

**Reddy V.N.**, Liebmann M.N., Mavrovouniotis M.L: Qualitative analysis of biochemical reaction systems, *Comput. Biol. Med.*, 1996, Vol. 26, No. 1, p. 9–24.

**Rothe M.**, Schäfer R.E., Fiedler J., Souquet M.: Genexpressionsanalyse mittels eXpress-Profiling und Kapillarelektrophorese, *Laborwelt*, 2005, Vol. 6, No. 4, p. 18–19.

**Rovine M.J.**: A 14<sup>th</sup> way to look at a correlation coefficient: correlation as the proportion of matches, *Am. Stat.*, 1997, Vol. 51, p. 42–46.

**Rusch H.P.**, Sachsenmaier W., Behrens K., Gruter V.: Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of *Physarum polycephalum*, *J. Cell Biol.*, 1966, Vol. 31, p. 204–209.

**Sachsenmaier W.**, Remy U., Plattner-Schobel R.: Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exp. Cell Res.*, 1972, Vol. 73, p. 41–48.

**Sauer H.W.**, Babcock K.L., Rusch H.P.: Sporulation in *Physarum polycephalum*. A model system for studies on differentiation, *Exp. Cell Res.*, 1969, Vol. 57, p. 319–327.

**Schlee D.**, Kleber H.P.: *Biotechnologie 2*. Jena, Gustav Fischer Verlag, 1991.

**Sujatha A.**, Balaji, S., Devi, R. & Marwan, W.: Isolation of *Physarum polycephalum* plasmodial mutants altered in sporulation by chemical mutagenesis of flagellates. *Eur. J. Protistol*, 2005, Vol. 41, p. 19–27.

**Starostzik, C.**, Marwan, W.: Functional mapping of the branched signal transduction pathway that controls sporulation in *Physarum polycephalum*, *Photochemistry and Photobiology*, 1995, Vol. 62, No. 5, p. 930–933.

**Starostzik, C.**, Marwan, W.: Kinetic analysis of somatic-transduction pathway by time-resolved somatic complementation of mutant, *The Journal of Experimental Biology*, 1998, Vol. 201, No.13, p. 1991–1999.

**Storhas W.**; *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*, Vieweg Lehrbuch Biotechnologie, Springer Berlin, 1994.

**Stöckmann C.**, Maier U., Anderlei T., Knocke C., Gellissen G., Büchs J.: The oxygen transfer rate as key parameter for the characterization of *Hanesenula polymorpha* screening cultures, *Microbial Biotechnology*, 2003, Vol. 30, p. 613–622.

**Timm N.H.**: *Applied Multivariate Analysis*, Springer, New York, 2002.

**Waddington, C.H.** 1957. *The strategy of the genes*. Allen und Unwin, London. Wales, D.J. 2003.

**Zhou J.X.**, Huang S.: Understanding gene circuits at cell-fate branch points for rational cell reprogramming. *Trends Genet*, 2011, Vol. 27, p. 55–62.



## Anhang

Tabelle 19: Zusammensetzung des Wachstumsmediums

<b>Wachstumsmedium für Mikroplasmodien</b>				
	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Firma</b>	<b>Artikel Nummer</b>	<b>1 l</b>
Bacto Trypton		OTTO NORDWAL D (Difco Lab.)	211699	10,0 g
Yeast Extract		OTTO NORDWAL D (Difco Lab.)	212750	1,5 g
D(+)-Glucose Monohydrat	≥ 99,5 % Ph.Eur.	ROTH	6780.2	11 g
Citronensäure, wasserfrei	≥ 99,5 % p.a.	ROTH	X863.3	3,24 g
Eisensulfat-Heptahydrat FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 % ACS	MERCK	1.03965.0500	0,084 g
Calciumchlorid-Dihydrat CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a., ACS	ROTH	5239.1	0,6 g
Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	≥ 99,0 % p.a., ACS	ROTH	3904.3	2,0 g

Tabelle 20: Zusammensetzung des Sporulationsmediums

<b>Sporulationsmedium, flüssig (zum Waschen der Mikroplasmodien)</b>				
	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Firma</b>	<b>Artikel Nummer</b>	<b>1 l</b>
Chlorid-Stammlösung (10 %)				6,0 ml
Sulfat-Stammlösung (10 %)				6,0 ml
Citronensäure, wasserfrei	≥99,5 % p.a.	ROTH	X863.3	3,69 g
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	99 % p.a.	MERCK	1.03861. 0250	0,06 g
in MilliQ-Wasser lösen				0,75 l

Tabelle 21: Zusammensetzung des Sporulationsagars

<b>Sporulationsagar = Lösung 1 (30 ml) + Lösung 2 (10 ml) + Lösung 3 (11 ml)</b>					
<b>Lösung 1</b>	Chemikalie	Reinheitsgrad	Firma	Artikel Nummer	Für 1l
1.1 Salz-Stock-Lösung (30 ml)	Calciumchlorid-Dihydrat CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a., ACS	ROTH	5239.1	20,0 g
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a., ACS	ROTH	P027.3	20,0 g
	Citronensäure, wasserfrei	≥ 99,5 % p.a.	ROTH	X863.3	36,6 g
	in 600 ml MilliQ-Wasser lösen, danach Zugabe von:				
	Salzsäure HCl	≥ 32 % p.a., ISO	ROTH	P0741	4,00 ml
	Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	99,00 % p.a.	MERCK	1.03861.0250	2,80 g
	Zinksulfat-Heptahydrat ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,5-103,0 % p.a.	MERCK	1.08883.0500	1,12 g
1.2 Kupfer-chlorid-Lösung (0.02 M) (7 ml)	Mangan(II)-chlorid-Dihydrat MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a.	MERCK	1.05934.0100	2,28 g
	mit MilliQ-Wasser auffüllen auf 1l				
1.3 Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (0,03 M) (10 ml)	Kupfer(II)-chlorid CuCl <sub>2</sub>	≥ 98,0 % (RT)			
	in MilliQ-Wasser lösen und auf 1l auffüllen				
1.3 Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (0,03 M) (10 ml)	Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	≥ 99,0 % p.a., ACS	ROTH	3904.3	4,083 g
	in MilliQ-Wasser lösen und auf 1l auffüllen				
<b>Lösung 2</b>	Niacin C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>		SIGMA	N-4126	0,1 g
	Niacinamide C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O		SIGMA	N-3376	0,1 g
	MilliQ-Wasser				10 ml
<b>Lösung 3</b>	Calciumcarbonat CaCO <sub>3</sub>	≥ 99,0 % p.a.(KT)	FLUKA	21060	1,1 g
	MilliQ-Wasser				11 ml

Tabelle 22: Lösungen

<b>Lösungen</b>					
		<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Firma</b>	<b>Artikel Nummer</b>	<b>1 Liter</b>
100 x MMZ Lösung	Magnesiumsulfat- Heptahydrat MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a., ACS	ROTH	P027.3	60,0 g
	Mangan(II)- chlorid-Dihydrat (MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	≥ 99,0 % p.a.,	MERCK	1.05934.0100	6,0 g
	Zinksulfat- Heptahydrat ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,5–103,0 % p.a.	MERCK	1.08883. 0500	3,4 g
	in MilliQ-Wasser lösen und mit MilliQ-Wasser auffüllen auf				
Chlorid – Stamm- lösung (10 %)	Calciumchlorid- Dihydrat CaCl <sub>2</sub> X 2 H <sub>2</sub> O	≥99,0 % p.a.,ACS	ROTH	5239.1	100,0 g
	Mangan(II)- chlorid-Dihydrat MnCl <sub>2</sub> X 2 H <sub>2</sub> O	≥99,0 % p.a.	MERCK	1.05934.0100	11,6 g
	in MilliQ-Wasser lösen und mit MilliQ-Wasser auf 1 l auffüllen				
Sulfat- Stamm- Lösung (10 %)	Magnesiumsulfat- Heptahydrat MgSO <sub>4</sub> X 7 H <sub>2</sub> O	≥99,0 % p.a.,ACS	ROTH	P027.3	100,0 g
	Zinksulfat- Heptahydrat ZnSO <sub>4</sub> X 7 H <sub>2</sub> O	≥99,5–103,0 % p.a.	MERCK	1.08883.0500	8,97 g
	in MilliQ-Wasser lösen und mit MilliQ-Wasser auf 1 l auffüllen				
Laufpuffer	TBE	20fach			1 V
	Glycerin	70 %			1 V
	Bromphenolblau				
Hemin	Hemin	≥98,0 % HPLC	Fluka	51210	0.3 (600 ml) g
in 150 ml 1 N NaOH lösen und mit MilliQ-Wasser auf 600 ml auffüllen, autoklavieren und in dunklen Flaschen lagern					
Ethanol/1M- Essigsäure	3,5 Volumenanteil Ethanol und 1 Volumenanteil 1M-Essigsäure				

Tabelle 23: Sequenz der 35 Gene: Forward-Primer

FW-Primer	Sequenz
#2167	AGGTGACACTATAGAATAGACTGCCAGAAGAAAGGACG
#2169	AGGTGACACTATAGAATACCACTGCTGCAGACAAGAAG
#2173	AGGTGACACTATAGAATAAACAACTTGGACACCCAGC
#2175	AGGTGACACTATAGAATACGAAAAACGAACACCCTTGT
#2177	AGGTGACACTATAGAATAGGAGGTTTTACCCACGAACA
#2179	AGGTGACACTATAGAATAATCGAATCAGGTCTCGCTGT
#2181	AGGTGACACTATAGAATAAAAAATGCTCGATTTGGTCG
#2183	AGGTGACACTATAGAATAGATTGCCTACGTTTGTGCCT
#2185	AGGTGACACTATAGAATAGATATGTCAACAATCGCCCC
#2187	AGGTGACACTATAGAATATGGTGTGATGGTTGGTATGG
#2189	AGGTGACACTATAGAATATCTCCAAGAAAGCGATGGTC
#2191	AGGTGACACTATAGAATAAACACATGATTGGGTGAGCA
#2193	AGGTGACACTATAGAATAGCCACCGATTAATATCCCC
#2195	AGGTGACACTATAGAATAAATCACAGCAAACGCCAATA
#2197	AGGTGACACTATAGAATAGTGGAGAGCCTGGAGTGGTA
#2199	AGGTGACACTATAGAATAGCCATTTATTTTACAGCCC
#2201	AGGTGACACTATAGAATAGATTTGGACAACCTTGAGCC
#2203	AGGTGACACTATAGAATATGAGTTGTTTTGACTGCGGA
#2205	AGGTGACACTATAGAATACCACAAGGGCACCTATGACT
#2207	AGGTGACACTATAGAATAATCAAGCCAACCTTCGACTGC
#2209	AGGTGACACTATAGAATAGTGGCTGGTGTGTCTTCCTT
#2211	AGGTGACACTATAGAATAATCGCACAACCCACTACTCC
#2213	AGGTGACACTATAGAATATGGGAACAAAACGGACTCTC
#2215	AGGTGACACTATAGAATATGGTGAGTCAGCATACCCAA
#2217	AGGTGACACTATAGAATATGAGAAAGCCGAAGAGGATG
#2219	AGGTGACACTATAGAATAAAACACAGGACTTTTTGCCG
#2221	AGGTGACACTATAGAATAAGGTTATGATGCCGTGAACC
#2223	AGGTGACACTATAGAATAGACCTCAACCACATTGCCTT
#2225	AGGTGACACTATAGAATATTGTGGGATCTGGGAACATT
#2227	AGGTGACACTATAGAATAAAGCTCACGCAGGAGTTCAT
#2229	AGGTGACACTATAGAATACTGTTTTCTGACTGGGGA
#2231	AGGTGACACTATAGAATAATGCCGATTTGTTGGAGAAG
#2233	AGGTGACACTATAGAATATTACTGGGGTACTGCGAT
#2235	AGGTGACACTATAGAATAGGTGCCCTTAAGCAAATCAA

Tabelle 24: Sequenz der 35 Gene: Reverse-Primer

RW-Primer	Sequenz
#2168	GTACGACTCACTATAGGGAATCGCACCTTGAAC TTGGTT
#2170	GTACGACTCACTATAGGGATTATGCGAGAGCAGCCTTTT
#2172	GTACGACTCACTATAGGGAGGGT GCGTAGTATCTCCCTG
#2174	GTACGACTCACTATAGGGACTGTAAAGGAACCGGGAAAA
#2176	GTACGACTCACTATAGGGACACATTCCATGTTTTTGCCA
#2178	GTACGACTCACTATAGGGATTGTCGTGTTTCAGGTCCAA
#2180	GTACGACTCACTATAGGGATTCAAGCAGGTCACAAGGTG
#2182	GTACGACTCACTATAGGGACGATAATCTTCTCGATCCGC
#2184	GTACGACTCACTATAGGGATTCCAAAATCGGCTAGCAAC
#2186	GTACGACTCACTATAGGGACTGACGGATGAGGAGCTTTC
#2188	GTACGACTCACTATAGGGAAGGTGTGGTGCCAGATTTTC
#2190	GTACGACTCACTATAGGGAAAGCTCACCAGGAAGGATCA
#2192	GTACGACTCACTATAGGGATTTACTTGCGGTGTGGAACC
#2194	GTACGACTCACTATAGGGATAGTGCTAGGGGCCAATGAG
#2196	GTACGACTCACTATAGGGACCGTGAGTTCCGAGTCCTAA
#2198	GTACGACTCACTATAGGGATTTTTGATCACATTTTCGGGC
#2200	GTACGACTCACTATAGGGATGCGCAAATAGTTGATGTCC
#2202	GTACGACTCACTATAGGGATGCTCTTTTGCCTTCGAAAT
#2204	GTACGACTCACTATAGGGATTTATGGGCAAAGAATTCGC
#2206	GTACGACTCACTATAGGGATCTGGAAGTGGGCTATGAGG
#2208	GTACGACTCACTATAGGGATGTGTCTCCGTTGTCTCTG
#2210	GTACGACTCACTATAGGGATTCTTGGTCACGACAGCTTG
#2212	GTACGACTCACTATAGGGACCTTCAAGATCCCCAACCTT
#2214	GTACGACTCACTATAGGGACGGAATTGCTGAGATTGGAT
#2216	GTACGACTCACTATAGGGAACAAACTGCGGCAGAGAGAT
#2218	GTACGACTCACTATAGGGACTCTTGGCAAAGAAGGCTTG
#2220	GTACGACTCACTATAGGGAGGTTGACTGGTGGATGGAAC
#2222	GTACGACTCACTATAGGGAAGGAAAGCCATTTTGTGTGC
#2224	GTACGACTCACTATAGGGAGGGTTTGGAGATGACCTTGA
#2226	GTACGACTCACTATAGGGACTTCCCCATATAAAGGCGCT
#2228	GTACGACTCACTATAGGGAGAAATCATACGTGCGAGTGG
#2230	GTACGACTCACTATAGGGATATCACCGCCTAAATCTGCC
#2232	GTACGACTCACTATAGGGATGTTGACCCAATAGCATCCA
#2234	GTACGACTCACTATAGGGATCATCTCTTCCGTCATGCTG
#2236	GTACGACTCACTATAGGGAGGTGCTGCAGACATCCTGTA

Tabelle 25: Mann-Whitney-U-Test für Kontrollplasmodien

**Nicht spontan sporulierender Wildtyp (Kontrollplasmodien)**

Gen	Versuch A						Versuch B					
	DK-6h	6h-11h	DK-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h	DK-6h	6h-11h	DK-2h	2h-6h	6h-8h	8h-11h
<i>ribA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>nhpA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pksA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ligA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ralA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>damA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ehdA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pumA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pakA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cdcA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ardA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>hstA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>psgA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pptB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>tspA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>dspA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pikB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>uchA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>gapA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>meiB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pcnA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ribB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>arpA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>rasA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pldA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>anxA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pptA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pwiA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cudA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pldC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pikC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>pldB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>spiA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>hcpA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>rgsA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 26: Rohdaten Homogenitätstest

Siehe csv Datei: „Rohdaten Homogenitätstest“ auf der mit gefügten CD

Tabelle 27: Grenzwerte für Rohdaten Homogenitätstest

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Homogenitätstest“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 28: Rohdaten Homogenitätstest bezüglich Achtelproben*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Homogenitätstest bezüglich Achtelproben“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 29: Grenzwerte für Homogenitätstest Achtelproben*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Homogenitätstest Achtelproben“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 30: Rohdaten für Teilungsversuch*

Siehe csv Datei: „Rohdaten für Teilungsversuch“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 31 Grenzwerte für Teilungsversuch*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Teilungsversuch“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 32: Rohdaten Wildtyp Kontrollen (7Tage hungern, nicht belichtet, Vers. Nr. 18-C)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp Kontrollen, 7Tage hungern nicht belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 33: Grenzwerte Wildtyp Kontrollen (7Tage hungern, nicht belichtet, Vers. Nr. 18-C)*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Wildtyp Kontrollen, 7Tage hungern nicht belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 34: Rohdaten Wildtyp nicht belichtet Versuch 17*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp nicht belichtet Versuch 17“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 35: Grenzwerte Wildtyp nicht belichtet Versuch 17*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Wildtyp nicht belichtet Versuch 17“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 36: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 15 min belichtet (Vers. Nr. 15-B)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 15 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 37: Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 5 bzw. 15 min belichtet (Vers. Nr. 15-B)*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 5 bzw. 15 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 38: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 2 min belichtet (Vers. Nr. 18-A)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 2 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 39: Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 2 min belichtet (Vers. Nr. 18-A)*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 2 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 40: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet (Vers. Nr. 18-B)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 41: Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet (Vers. Nr. 18-B)*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 42: Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 10 min belichtet (Vers. Nr. 11-A)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 10 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 43: Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 20 min belichtet (Vers. Nr. 11-B)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 20 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 44: Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 30 min belichtet (Vers. Nr. 11-A)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 30 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 45: Grenzwerte Wildtyp 6 Tage hungern, 10 bis 30 min belichtet*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Wildtyp 6 Tage hungern, 10 bis 30 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 46: Rohdaten Wildtyp 7 Tage hungern, 5 min belichtet (Vers. Nr. 15-A)*

Siehe csv Datei: „Rohdaten Wildtyp 6 Tage hungern, 5 min belichtet“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 47: Rohdaten der Mutante PHO48*

Siehe csv Datei: „Rohdaten der Mutante PHO48“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 48: Rohdaten der Mutante PHO68*

Siehe csv Datei: „Rohdaten der Mutante PHO68“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 49: Rohdaten des Hetrokaryont PHO48+PHO68*

Siehe csv Datei: „Rohdaten des Heterokaryont PHO48+PHO68“ auf der mit gefügten CD

*Tabelle 50: Grenzwerte für die Mutanten PHO48+PHO68 und des Heterokaryont PHO48+PHO68*

Siehe csv Datei: „Grenzwerte Mutante PHO48, PHO68 und des Heterokaryont PHO48+PHO68“ auf der mit gefügten CD



Tabelle 51: Übersicht der 35 Gene und ihre Ähnlichkeiten (Rätzel und Marwan, 2015)

Gene #	Gene	Similarity	Uniprot entry	E-value	Query coverage (%)
1	psgA	Physarum specific gene			
2	pldC	Phospholipase D	Q9LRZ5	4E-14	61
3	pptB	Protein phosphatase 2C POL	Q8RWN7	0.016	14
4	pldB	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	P80108	1E-80	83
5	pikB	Phosphatidylinositol 3-kinase 2	P54674	3E-63	68
6	ralA	Circularly permuted Ras protein 1	Q75J93.1	4E-17	58
7	nhpA	Non-histone chromosomal protein 6	Q4PBZ9	5E-17	30
8	pumA	Pumilio homolog 2	Q80U58	2E-46	80
9	anxA	Annexin-B12	P26256	6E-41	98
10	ardA	Actin, plasmodial isoform	P02576	9E-109	69
11	meiB	Meiosis protein mei2	Q64M78.1	9E-64	27
12	hstA	Probable histone H2B 4	Q27876	1E-41	43
13	pcnA	Proliferating cell nuclear antigen	Q43124	9E-76	81
14	uchA	Programmed cell death protein 2	Q2YDC9	1E-06	32
15	cudA	Putative transcriptional regulator cudA	O00841	1E-23	38
16	pikC	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	Q49GP3	8E-50	94
17	ribA	60S ribosomal protein L38	Q1HRT4	2E-17	40
18	pksA	Serine/threonine-protein kinase phg2	Q54QQ1	9E-35	89
19	dspA	Dual specificity protein phosphatase 12	Q9JIM4	1E-12	41
20	ribB	60S ribosomal protein L4-2	Q54Z69	4E-36	66
21	hcpA	Histone chaperone ASF1A	Q2KIG1	5E-62	82
22	damA	DNA damage-binding protein 1a	Q9M0V3	8E-100	87
23	arpA	Probable basic-leucine zipper transcription factor G	Q54RZ9	2E-12	29
24	tspA	Tumor suppressor p53-binding protein 1	P70399	2E-04	16
25	rasA	Ras-related protein RABD2a	P28188	3E-29	49
26	pptA	Phosphatase DCR2	Q05924	6E-19	59
27	ehdA	EH domain-containing protein 1	Q641Z6	6E-25	94
28	spiA	Protein spire	Q9U1K1	1E-04	31
29	cdcA	Cell division control protein 31	P06704	6E-27	38
30	pakA	Serine/threonine-protein kinase pakC	Q55GV3	3E-48	79
31	gapA	Probable GTPase-activating protein 8	Q8H100	3E-23	52
32	pldA	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	Q8R2H5	4E-62	91
33	ligA	Checkpoint protein hus1 homolog 1 (LigA)	Q54NC0	1E-28	94
34	pwiA	Piwi-like protein 1	Q96J94	2E-55	92
35	rgsA	Regulator of G-protein signaling 2	O08849	3E-05	31

## **Eidesstattliche Erklärung zum selbstständigen Arbeiten**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

09.11.2015, Magdeburg

Viktoria Rätzel