

Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum

Lehrstuhl für Zellmorphologie

**UNTERSUCHUNGEN ZUR DYNAMIK
UND ZUR CYTOSKELETTORGANISATION
IN RHIZOPODIALEN PROTISTEN**

Diplomarbeit

vorgelegt von

Ralf Norbert Schulz

Bochum, Oktober 1991

I Einleitung

Mit der Evolution zur Eucyte entstand für die Organismen die Notwendigkeit, zusätzlich zu den Mechanismen für die Bewegung ganzer Zellen, Strukturen zu entwickeln, die den intrazellulären Transport von Organellen und Nährstoffen gewährleisten. Zwei Systeme, die diesem Zweck dienen, sind hier in erster Linie zu nennen: Das Actinomyosinsystem, das hauptsächlich zur Bewegung des Zellkörpers eingesetzt wird, aber auch in Einzelfällen dem intrazellulären Transport einzelner Zellorganelle dient, und das Mikrotubulsystem, das vorrangig Stütz- und Transportfunktionen erfüllt, darüberhinaus aber noch zahlreiche andere Aufgaben erfüllen kann.

Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen von ca. 25 nm Durchmesser, die aus zwei globulären Untereinheiten, den sauren Proteinen α - und β -Tubulin, aufgebaut sind. In vivo kommen die Tubuline jedoch nicht frei vor, sondern es sind je ein α - und ein β -Tubulin zu einem hantelförmigen Heterodimer vereinigt. Mikrotubuli bestehen meistens aus 13 Heterodimeren, die parallel orientiert zu einem Hohlzylinder zusammengelagert sind (Amos, 1979). Die Längsreihen der Heterodimere nennt man Protofilamente. Bei der Addition von Tubulin an einen Mikrotubulus wird das an das β -Tubulin reversibel gebundene GTP zu $\text{GDP} + \text{P}_i$ hydrolysiert (Majillano et al., 1990, Bayley et al. 1989a, 1989b, Martin et al., 1990).

Dieses vergleichsweise einfache System ist zudem evolutionär hochkonservativ. Luduena (1979) konstatiert für Tubulin eine mittlere Mutationsrate von 0,45 akzeptierten Punktmutationen auf 100 Aminosäurereste pro 100 Millionen Jahre. Modifikationen der Tubuline und damit auch der daraus bestehenden Mikrotubuli erfolgen zumeist nicht auf genetischer Ebene, sondern posttranslationell (Review in: Greer und Rosenbaum, 1988) durch Tyronisierung/Detyronisierung des C-Terminus des α -Tubulins oder Acetylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins am α -Tubulin.

Durch den Aufbau aus parallel orientierten Heterodimeren ist die Grundlage für die morphologische Polarität der Mikrotubuli gelegt. An einem Ende des Mikrotubulus sind die freien α -Tubuline des Heterodimers lokalisiert, an dem entgegengesetzten Ende ist ungebundenes β -Tubulin exponiert. Diese molekulare Polarität spiegelt sich auch in der Kinetik der Additionsreaktion von freiem GTP-Tubulin an dem Mikrotubulus bzw. der Abspaltung von GDP-Tubulin vom Mikrotubulus wieder. Während das Ende des Mt, an dem die freien β -Tubuline exponiert sind, schnell durch Addition von GTP-Tubulin wächst und schnell durch Abgabe von GDP-Tubulin schrumpft, ist das Ende des Mt, an

dem die α -Tubuline exponiert sind, in beiden Reaktionen träger (Martin et al. 1991). Daher wird auch das schnell wachsende und schnell schrumpfende Ende als Plusende bezeichnet, und das andere als Minusende.

Da es sich bei Wachstum und Schrumpfung eines Mt-Endes um keine simple Gleichgewichtsreaktion handelt, sondern die Wahrscheinlichkeit eines wachsenden Endes, weiter zu wachsen, größer ist als diejenige zu schrumpfen (und umgekehrt bei schrumpfenden Enden), wird angenommen, daß neben der Polarität der Mt die Existenz (noch) nicht hydrolysierten GTPs an dem jeweiligen Mt-Ende für die Wahrscheinlichkeit, weiter zu wachsen, ausschlaggebend ist (Voter et al., 1991). Dieses Phänomen der Stabilisierung im wachsenden Zustand durch ein GTP-Cap und der Instabilität im schrumpfenden Zustand wegen des fehlenden Caps geht so weit, daß *in vitro* ganze Populationen von Mt gleichzeitig bis zum Verbrauch eines Großteils des freien GTP-Tubulins wachsen und dann gemeinsam schrumpfen (Caplow und Shanks, 1989, Mandelkow et al. 1989).

In vivo kommt zusätzlich zu der durch die innere Struktur des Mikrotubulus bedingten Polarität noch hinzu, daß das langsam wachsende Ende des Mt fast immer von Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) geschützt ist und deshalb so gut wie gar nicht schrumpft (Review in Brinkley, 1985). Das Plusende der Mt ist hingegen meist frei, eine bekannte Ausnahme von dieser Regel sind die chromosomalen Spindelfasern, deren Plusenden in die Kinetochore der Chromosomen eingebettet sind.

Zusätzlich zu den schon geschilderten Unterschieden zwischen Mikrotubuli durch posttranslationelle Modifikation der Tubuline oder Caps aus GTP kommen noch strukturelle Unterschiede zwischen Mikrotubuli vor. So unterscheidet man zwischen A- und B-Tubuli. Bei den letzteren sind die benachbarten Heterodimere homolog angeordnet, also so, daß α -Tubulin neben α -Tubulin zu liegen kommt. Bei A-Tubuli ist die Anordnung der Heterodimere heterolog, die Heterodimere sind gegeneinander versetzt. Die meisten cytoplasmatischen Mt sind B-Tubuli (Unger, Böhm und Vater, 1990), wohingegen die stabilen Mt der Cilien und Flagellen A-Tubuli sind.

Bei *in vitro* Polymerisationsversuchen von Tubulin zeigt sich, daß auch die 13-Protofilament-Anordnung der Mt keine konstante Größe ist. Je nach verwendetem Tubulin und den Reaktionsbedingungen entstehen *in vitro* Mt von 8 bis 17 Protofilamenten (Unger et al., 1990). Die Anzahl der Protofilamente bei *in vivo* erzeugten Mt wird nicht von dem Tubulin selber, sondern von dem MTOC festgelegt (Evans, Mitchison und Kirschner, 1985). Auch hier gibt es jedoch Abweichungen von der üblichen Anzahl von 13 Protofilamenten (Eichenlaub-Ritter und Tucker, 1984). Zum Teil wechselt die Anzahl der Protofilamente auch innerhalb eines Organismus von Zelle zu Zelle oder innerhalb einer Zelle in Abhängigkeit von den Stadien der Zelldifferenzierung (Tucker et al. 1986).

Die starre Organisation des Tubulins in Mikrotubuli ist nicht seine einzige Aggregationsform. Außerdem werden noch Tubulinringe und -spiralen, C- oder S-förmige Protofilamentblätter, doppelwandige Mt, Makrotubuli, helicale Filamente und die daraus bestehenden Tubulin-Parakristalle gefunden (Review in Unger, Böhm und Vater, 1990). Während viele dieser Tubulin-Aggregate reine Kunstprodukte sind, die in lebenden Zellen nicht zu finden sind, und C- und S-förmige Tubulinsheets als Intermediärprodukte beim Auf- oder Abbau von Mt aufzufassen sind (Simon und Salmon, 1990), kommt den helicalen Filamenten und Parakristallen in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da sie in einigen Organismen ständig angetroffen werden, ohne daß ihre physiologische Bedeutung oder die Entstehung ihrer Struktur hinreichend geklärt wäre (Dustin, 1978).

Mit der Funktion der Mikrotubuli als Cytoskelett und Basis für den intrazellulären Transport von Organellen untrennbar verbunden sind zahlreiche Mikrotubuli-assoziierte-Proteine (MAPs). Schliwa (1986) geht sogar so weit, alle cytoplasmatischen Strukturkomponenten, die irgendwie an der Triebkraftherzeugung beteiligt sind, zum Cytoskelett zu rechnen.

Drei MAPs, die der Bewegung von Zellorganellen dienen müssen hier genannt werden: Dynein, Kinesin und Dynamin (Review in Vallee und Shpetner, 1990).

Dynein ist das am längsten bekannte Mt-assoziierte Motorprotein. Es wurde erstmals 1963 von Gibbons in Cilien und Flagellen gefunden. Daß das dem axonemalen Dynein verwandte MAP IC auch für viele cytoplasmatische Transportvorgänge verantwortlich ist, wurde erst sehr viel später aufgeklärt (Gibbons, 1988). Beim Transport entlang von Mikrotubuli wandert cytoplasmatisches Dynein unter ATP-Verbrauch mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 1,25 $\mu\text{m/s}$ (Vallee und Shpetner, 1990) zu deren Minusende, also zum Zellkörper hin oder auch retrograd.

Die anderen beiden Mt-assoziierten Motorproteine bewirken den anterograden, vom Zellkörper fort gerichteten Transport von Zellorganellen. Das erst 1985 von Vale et al. identifizierte Kinesin ist mit seiner Wandergeschwindigkeit von 1 - 5 $\mu\text{m/s}$ unter anderem für den schnellen axonalen Transport verantwortlich (Vale, Scholey und Sheez, 1986). Das für den langsamen Transport in Axonen zuständige Dynamin wurde als letztes Protein dieser Gruppe erst 1989 (Shpetner und Vallee, 1989) isoliert und identifiziert, es wandert mit einer Geschwindigkeit von 0,2 - 1 $\mu\text{m/s}$ zum Plusende des Mikrotubulus.

Die vorangehenden Ausführungen hinsichtlich der Direktionalität der Motorproteine müssen jedoch in einem Punkt wieder eingeschränkt werden: Bei der Süßwasseramöbe *Reticulomyxa filosa* wurde bisher nur ein einziges Motorprotein gefunden (Schliwa, Euteneuer und Koonce, 1986), das sowohl für den anterograden als auch für den retrograden Transport zuständig zu sein scheint (Euteneuer et al., 1989).

Schliwa et al. (1991) haben nachgewiesen, daß die Enzymkinetiken der beiden Transportrichtungen in *Reticulomyxa* nahezu identisch sind und daß die Akzeptanz dieses vermutlich bidirektionell arbeitenden Motorproteins für verschiedene synthetische Analoga des Energielieferanten ATP ähnlich der von *Tetrahymena*-Dynein ist.

Möglicherweise liegt bei *Reticulomyxa* also eine Form des Dyneins vor, die fähig ist, Organelle in beide Richtungen entlang eines Mikrotubulus zu transportieren. Eine andere, hypothetische, Möglichkeit zur Erklärung der identischen Enzymkinetiken wäre, daß die Mikrotubuli von *Reticulomyxa filosa* nicht, wie bei anderen Organismen beobachtet, immer streng mit ihrem Plusende zur Zellperipherie gerichtet angeordnet sind. Versuche, durch Dekoration mit Dynein die Polarität von Mikrotubuli zu bestimmen, erbrachten jedoch, daß die beobachteten Mikrotubuli sehr wohl dieser Standardanordnung folgen (Euteneuer et al., 1989).

Auch aus anderen Gründen sind *Reticulomyxa filosa* (Nauss, 1949) und die phänotypisch ähnliche, jedoch nicht unmittelbar verwandte *Allogromia laticollaris* (Arnold, 1948) für die Untersuchung des Cytoskeletts wichtige Versuchsobjekte.

Beide Organismen zählen im Reich der Protisten zum Stamm der Sarcomastigophora, und innerhalb desselben zu dem Unterstamm Sarcodina, der Überklasse Rhizopoda und der Klasse Granuloreticulosea (Levine et al., 1980). Diese Klasse zeichnet sich durch den Besitz feiner, granulärer oder hyaliner Reticulopodien (selten auch Pseudopodien) aus (Levine et al., 1980). Während *Reticulomyxa filosa* jedoch zu der ersten Ordnung dieser Klasse, Athalamida, gezählt wird, gehört *Allogromia laticollaris* zur Unterordnung Allogromiina der dritten Ordnung der Granuloreticulosea, den Foraminiferida. Die Foraminiferida sind eine evolutionär sehr alte Ordnung der Protisten, die dank ihres stabilen Kalkgehäuses hervorragend petrifiziert wird und fossil seit dem Kambrium belegt ist (Travis und Bowser, 1988). Seit dieser Zeit haben sich die Foraminiferida zumindest im Habitus kaum noch verändert.

Während *Allogromia* eine marine, benthonisch lebende monothalame Foraminifere und *Reticulomyxa* im Gegensatz dazu eine unbeschaltete polyenergide Süßwasseramöbe ist, unterscheiden sich die beiden Organismen in ihrem sonstigen Habitus nur wenig. Beide bilden ein feines Netzwerk aus Reticulopodien aus, das im Fall von *Allogromia* mehrere Quadratmillimeter, im Fall von *Reticulomyxa* mehrere Quadratzentimeter bedecken kann.

Diese reticulopodialen Netzwerke (RPN) zeichnen sich durch eine hohe Formvariabilität aus. Einzelne Filopodien verlängern sich mit Geschwindigkeiten von bis zu 10 μm pro Sekunde (*Allogromia*: Travis und Bowser, 1988, *Reticulomyxa*: Koonce et al., 1987), schrumpfen mit noch größerer Geschwindigkeit (Chen und Schliwa, 1990), fusionieren miteinander oder fächern zu breiten Lamellipodien aus.

Entlang der feinen Filopodien, deren Stützgerüst aus Mikrotubuli besteht, findet bidirektionaler Transport von Organellen statt. Koonce und Schliwa (1985) beobachteten, daß sich einzelne Partikel oder Organelle mit einer Geschwindigkeit von bis zu 25 µm pro Sekunde die Filopodien entlang bewegten und dabei zu spontaner Richtungsumkehr in der Lage sind. Bidirektionaler Transport erfolgte sogar an Filopodien, in denen mit elektronenmikroskopischen Methoden nur ein einziger Mikrotubulus nachzuweisen war.

Ähnliche Bewegungen wie die Organelle können auch die Mikrotubuli selbst ausführen. Koonce et al. (1987) zeigten, daß sich die Mikrotubuli eines Filopodiums von *Reticulomyxa* unter ATP-Verbrauch sowohl axial als auch lateral gegeneinander bewegen können. Einzelne Mikrotubuli können nicht nur gegeneinander gleiten, sondern sich auch aus einem Mt-Bündel lösen und sich später mit diesem oder einem anderen Bündel wiedervereinigen.

Unterschiede zwischen dem Cytoskelett der beiden Organismen bestehen unter anderem in der Verteilung von Aktin. Während *Allogromia* lokale Häufungen von Aktinfilamenten an Haftpunkten, ähnlich den adhesion plaques kultivierter Fibroblasten aufweist (Bowser et al, 1988), zeigen die Aktinfilamente in *Reticulomyxa* eine ähnliche Verteilung wie die Mikrotubuli (Lindenblatt, 1988), bilden aber an der Front von Lamellipodien ebenfalls plaques aus (Hauser, Lindenblatt und Hülsmann, 1989).

Neben dem bereits erwähnten Phänomen, daß in *Reticulomyxa* wahrscheinlich ein bidirektionales Motorprotein entlang der Mikrotubuli wirkt, prädestinieren das reiche Vorkommen von Mikrotubuli sowie deren schneller Auf- und Abbau beide Organismen geradezu dafür, als Untersuchungsobjekte für die Erkundung der Mechanismen der Cytoskelettdynamik zu dienen.

Beiden Organismen ist zwar das Phänomen der rapiden Umorganisation des Mikrotubuli-Netzwerks gemein, über die Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) ist jedoch fast nichts bekannt. Bei *Reticulomyxa* wurden bislang überhaupt keine MTOCs gefunden (Euteneuer et al., 1989), *Allogromia* verfügt zwar während der Mitose und Meiose über Centriole (Hauser, pers. Mitteilung), jedoch scheinen diese nicht Ursprung der Ausbildung filopodialer Mikrotubuli zu sein. Die Identifikation von Zentren, die hier Mikrotubuli organisieren, wäre jedoch ein wichtiger Schritt hin zu der Beantwortung so grundlegender Fragen, wie der nach dem Anfang (und Ende) der Mikrotubuli, und welchen Anteil die Verlängerung von Mikrotubuli an der Verlängerung der Filopodien hat, und welchen die Translokation von Mikrotubuli durch Motorproteine.

Zusätzlich findet man in beiden Organismen unter physiologischen Bedingungen häufig die bereits erwähnten helicalen Filamente in den Filopodien. Die Untersuchungen von Hauser und Schwab (1974) legen nahe, daß diese helicalen Filamente bei *Allogromia* direkt aus den Mikrotubuli hervorgehen.

Bei *Reticulomyxa* fanden Hauser und Lindenblatt (1989), daß die Mikrotubuli dieses Organismus ausschließlich aus Glu-Tubulin bestehen. Glu-Tubulin ist jedoch charakteristisch für ältere Mikrotubuli, was in krassem Widerspruch zu der Tatsache steht, daß die Mt-gestützten Filopodien bei *Reticulomyxa* ständig umgebaut werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch wäre, daß die Mikrotubuli von *Reticulomyxa* bei der Umgestaltung des Cytoskeletts nicht in freies Tubulin, sondern in helicale Filamente umgebaut werden (Hauser und Lindenblatt, 1989).

Ein Verständnis des Mechanismus, der die mögliche Umwandlung von Mikrotubuli in helicale Filamente bewirken könnte, hätte nicht nur Auswirkungen auf das Verständnis des Cytoskeletts der untersuchten Organismen, sondern würde außerdem die Wirkung der *Vinca*-Alkaloide erklären helfen, die bei anderen Organismen ebenfalls die Bildung helicaler Filamente induzieren können.

In der vorliegenden Arbeit soll das Cytoskelett von *Reticulomyxa filosa* und *Allogromia laticollaris* mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden dargestellt und untersucht werden.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Interaktionen der verschiedenen Cytoskelettkomponenten zu beobachten und mögliche Faktoren, die in die rapide Umgestaltung des Cytoskeletts bei diesen Organismen involviert sind, zu ermitteln.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	7
2.1	Kulturhaltung	7
2.1.1	Kultur von <i>Reticulomyxa filosa</i>	7
	Medium 1:1	7
2.2.1	Kultur von <i>Allogromia laticollaris</i>	8
	Kulturmedium für <i>Allogromia laticollaris</i>	9
	Künstliches Seewasser (Ca ²⁺ -frei)	9
2.2	Lichtmikroskopie	10
2.2.1	DNA-Färbung mit Bisbenzimid	10
2.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz	10
	Ca ²⁺ -freie PBS für die IIF	11
	Eindeckpuffer	11
	Verwendete Erstantikörper	11
	Verwendete Zweitantikörper	11
2.3	Makroskopische Aufnahmen	12
2.3.1	Habitusaufnahmen	12
2.3.2	Aufnahme von Fusionsstadien	12
2.4	Elektronenmikroskopie	13
2.4.1	Negative Staining	13
	Formvarlösung	13
	Verwendete Lysiermedien	14
2.4.2	Reinigung von Bestandteilen des Cytoskeletts durch Zentrifugation	15
	Fixiermedium 6,8 %	16
2.4.3	Ultradünnschnitte	16
	Fixiermedium für Schnitte	16
	Entwässerung, en-bloc-staining und Epon-Einbettung	16
	Epon für Einbettungen (hart)	17
	Bleicitrat nach Reynold's	17
2.4.4	Gefriersubstitution	17
2.4.5	Tubulin-Dekoration	18
	PMEG-Puffer 0,5 M	18
	Fixiermedium für Tubulin-Dekoration:	18
2.4.6	Rotationsanalyse von Mt-Querschnitten	19

		Seite
2.4.7	Besondere Agentien	19
	DMSO	19
	Oryzalin	19
	Rutheniumrot	19
2.5	SDS - Gelelektrophorese	20
	Acrylamid/Bisacrylamid 39 + 0,8	21
	Trenngelpuffer	21
	Sammelgelpuffer	21
	Laufpuffer	21
	Probenpuffer	21
	Fixierlösung	21
	Färbelösung für Gele	21
	Entfärbelösung	22
	Lagerlösung	22
2.5.1	Standard-Gele	22
2.5.2	Gradientengele	22
	Gradientengel a	22
	Gradientengel b	23
2.6	Bezugsquellennachweis	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Cytoskelettausbildung bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	25
3.1.1	Aufbau des reticulopodialen Netzwerks	25
3.1.2	Dynamik des Cytoskeletts in kernlosen Fragmenten	26
3.1.3	Fusion von Zellen	26
3.1.4	Ernährungsweise von <i>Reticulomyxa filosa</i>	27
3.1.5	Exkretion	27
3.1.6	Oberflächenvergrößernde Strukturen in Vakuolen von <i>Reticulomyxa filosa</i>	28
3.2	Kernteilung und -gestalt bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	28
3.2.1	Struktur des Zellkerns	29
3.2.2	Kernteilung und Teilungszyklus bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	29
3.3	Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz	30
3.4	Ca ²⁺ -Nachweis durch Arsenazo III	30
3.5	Die Polarität von Mikrotubuli	31
3.5.1	Polarität der Mikrotubuli von <i>Reticulomyxa filosa</i>	32
3.5.2	Polarität der Mikrotubuli von <i>Allogromia laticollaris</i>	32
3.5.3	Protofilamentanzahl in dekorierten Mikrotubuli von <i>Allogromia laticollaris</i>	33

	Seite	
3.6	Organisation des Cytoskeletts	34
3.6.1	Querbrücken und MAPs bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	35
3.6.1.1	Struktur von Querbrücken und MAPs	35
3.6.1.2	Einfluß von Vanadat und Lysiermedien auf die Erhaltung von Mt und MAPs	36
3.6.1.3	Einfluß von Oryzalin auf das Cytoskelett	36
3.6.1.4	Einfluß von DMSO auf Cytoskelettstruktur und Querbrücken	37
	Lichtmikroskopische Beobachtungen	37
	Elektronenmikroskopische Beobachtungen	37
3.6.2	Mikrotubuliorganisierende Zentren bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	38
3.6.2.1	Mikrotubuliorganisierende Zentren im zentralen Plasma	38
3.6.2.2	Die Struktur des distalen Mikrotubulusendes	38
3.6.3	Helicale Filamente	39
3.6.3.1	<i>Allogromia laticollaris</i>	39
3.6.3.2	<i>Reticulomyxa filosa</i>	40
	Calcium	41
	Magnesium	41
	Vanadat	41
	Struktur der helicalen Filamente von <i>Reticulomyxa</i>	42
3.7	Gelelektrophorese	42
3.7.1	Proteolyse	43
3.7.2	Effekte von DMSO	43
4	Diskussion	44
4.1	Ernährung von <i>Reticulomyxa filosa</i>	44
4.2	Exkretion bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	44
4.3	Kernteilung bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	45
4.4	Bedeutung der oberflächenvergrößernden Strukturen in Vakuolen	45
4.5	Calcium-Nachweis durch Arsenazo-III	46
4.6	Die Polarität von Mikrotubuli	48
4.7	Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz	49
4.8	Querbrücken und MAPs bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	50
4.8.1	Charakterisierung der Querbrücken	50
	Cytoplasmatisches Dynein	50
	Kegelförmige Proteine an Mt	52
	Unregelmäßig geformte Querbrücken	53
4.8.2	Effekte von DMSO auf cytoplasmatisches Dynein	53

		Seite
4.9	MTOCs bei <i>Reticulomyxa filosa</i>	55
4.10	Helicale Filamente	56
4.10.1	Darstellung helicaler Filamente mit der Negative-Staining-Technik	57
4.10.2	Ultrastruktur helicaler Filamente	58
5	Zusammenfassung	61
6	Abkürzungen	62
7	Literaturverzeichnis	63
	Danksagung	75

2 Material und Methoden

2.1 Kulturhaltung

2.1.1 Kultur von *Reticulomyxa filosa*

Der kultivierte Stamm von *Reticulomyxa filosa* geht auf die von Dr. N. Hülsmann aus den Teichen im Botanischen Garten der Ruhr-Universität Bochum isolierten Individuen zurück (Hülsmann, 1984).

Die Zucht erfolgte in Petrischalen aus Kunststoff mit einem Durchmesser von ca. 9 cm. Die Schalen wurden ungefähr zur Hälfte mit folgendem Medium gefüllt:

Medium 1:1 :

1 Liter Eau de Volvic
je 1 ml der Lösungen I - II
20 ml Erdabkochung
auffüllen auf 2 l mit vollentsalztem Wasser.

Lösung 1:	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	3,68 %
Lösung 2:	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	3,70 %
Lösung 3:	NaHCO_3	1,26 %
Lösung 4:	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	1,00 %
Lösung 5:	KNO_3	7,20 %
Lösung 6:	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	2,84 %
Lösung 7:	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,20 %
Lösung 8:	$\text{CaSO}_4 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$	0,30 %
Lösung 9:	Na_2EDTA	4,36 g/l
	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g/l
Lösung 10:	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
	$\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	20 mg/l
	$\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	12 mg/l
	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	180 mg/l
	$\text{NaMoO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	6 mg/l
Lösung 11:	K_2CrO_4	4 mg/l
	VOSO_4	5 mg/l
	H_3BO_3	30 mg/l

In die mit Medium gefüllten Schalen wurden einige Exemplare von *Reticulomyxa filosa* gegeben. Als Nahrungsquelle wurden noch einige in Medium 1:1 vorgeweichte Weizenkeime zugesetzt. Alternativ konnten auch Dextrin oder gelöste Stärkekörner verwendet werden. Die Fütterung mit diese Nährstoffen war jedoch nicht unproblematisch, weil diese zu starkem Bakterienwachstum führten. Ein zu starkes Bakterienwachstum wirkte sich jedoch ungünstig auf die Lebensbedingungen von *Reticulomyxa* aus, während ein schwacher Bewuchs eher förderlich war. Eine axenische Kulturmethode für *Reticulomyxa* ist derzeit leider noch nicht bekannt.

Je nach Anzahl der überimpften Individuen brauchten diese 1 bis wenige Tage, um den Boden der Petrischale fast vollständig mit einem Geflecht feiner Filopodien zu überziehen. Danach begannen die Zellen durch feine Filopodien, die die Wände empor liefen oder direkt nach oben wuchsen, die Wasseroberfläche ebenfalls zu besiedeln.

Diese "Tochterzellen" oder auch "Schwimmer" (Froese, 1990) konnten mit einem feinen Glasstab, zum Beispiel der zugeschmolzenen Spitze einer Pasteurpipette, abgehoben und in neues Kulturmedium überführt werden. Danach wurde von der alten Kulturschale das Medium vorsichtig abgegossen und durch neues ersetzt. Das Umsetzen in neues Medium erfolgte entweder in wöchentlichem Abstand, oder die Schalen wurden bei starkem Bedarf an Versuchsorganismen alle 2 - 3 Tage kontrolliert und bei Bedarf nachgefüttert sowie die an der Wasseroberfläche hängenden Schwimmer abgenommen. Durch häufiges Kontrollieren und Umsetzen war es möglich, ein rasches Wachstum der Kulturen zu erzielen und die störenden Begleitorganismen zu dezimieren.

Die Kulturschalen wurden bei Raumtemperatur im Schatten gehalten, weil zu starke Lichteinstrahlung zu dichtem Algenwachstum und Überhitzung führen konnten.

Für Versuche wurden im allgemeinen entweder abgelöste Exemplare von *Reticulomyxa filosa* in frisches Medium überimpft und nicht gefüttert, nur bei Experimenten, die dies ausdrücklich erforderten, wurden die Amöben gefüttert.

Bei einer Reihe von Versuchen erwies es sich als sinnvoll, nicht ganze Tiere einzusetzen, sondern diese vor Versuchsbeginn durch mehrmaliges schnelles Einsaugen und Ausstossen mit einer Pipette in viele möglichst kleine Bruchstücke zu zerlegen. Diese Bruchstücke sind zum größten Teil in der Lage, innerhalb weniger Sekunden wieder Filopodien auszubilden und miteinander zu fusionieren. Binnen einer halben bis einer Stunde entstehen durch die Fusion wieder große Plasmodien, die sich äußerlich nicht von den Ausgangsorganismen unterscheiden.

2.1.2 Kultur von *Allogromia laticollaris*

Die Foraminifere *Allogromia laticollaris* wurde ursprünglich aus Algenbewuchs vor Helgoland isoliert. Am Lehrstuhl für Zellmorphologie wird sie auf *Chlorella*-Rasen gezogen.

Kulturmedium:	Helgoländer Seewasser mit:
	Erdabkochung 1 %
	NaNO ₃ 0,005 %
	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 0,001 %
	Spurenelementlösung
	nach Amrhein, 1973 0,01 %

Die Kulturhaltung erfolgte ansonsten wie bei Golz (1986) beschrieben.

Für Versuche wurden einzelne Exemplare von *Allogromia laticollaris* abgenommen und nach mehrmaligem Spülen in Seewasser in Calcium-freies Seewasser überführt, das mehrmals ausgewechselt wurde, um einen vollständigen Medienwechsel zu gewährleisten.

Die Verwendung von Ca²⁺-freiem Seewasser ist notwendig, weil Calcium bei der Fixierung zum Disassembly der Mikrotubuli führt. Allerdings schwächt Ca²⁺-freies Seewasser die Vitalität von *Allogromia*. Die Tiere konnten maximal für die Dauer eines Tages in diesem Medium aufbewahrt werden.

Es erwies sich, daß eine optimale Ausbildung des RPN am ehesten ungefähr 2 h nach Überimpfung in das Ca²⁺-freie Seewasser erzielt wurde, danach begannen die Tiere, sich wieder zusammenzuziehen.

Künstliches Seewasser (Ca²⁺-frei):

NaCl	0.39 M
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0.049 M
Na ₂ SO ₄ × 10 H ₂ O	0.026 M
KCl	0.008 M
NaHCO ₃	0.002 M

2.2 Lichtmikroskopie

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate erfolgte in allen Fällen mit einem Zeiss Photomikroskop mit Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung. Verwendet wurden die Objektive : 20 × (Neofluar, Phasenkontrast), 40 × (Neofluar, Phasenkontrast), 63 × (Planapochromat) und 100 × (Phasenkontrast). Die Belichtungsmessung erfolgte automatisch. Zur Steigerung des Kontrastes wurde bei Phasenkontrast-Aufnahmen ein Grünfilter verwendet. Die Photos wurden auf Kodak Tmax 400 (27 DIN) oder Tmax 100 (21 DIN) aufgenommen.

2.2.1 DNA-Färbung mit Bisbenzimid

Bisbenzimid wurde für die Untersuchung von Zellkernen sowie den Stadien der Mitose bei *Reticulomyxa* verwendet. Bisbenzimid wird normalerweise als Vitalfarbstoff eingesetzt. Vorversuche zeigten jedoch, daß sich *Rxf* bei Applikation von 10 µM dieses Stoffes im Kulturmedium zusammenzieht und jegliches Wachstum dauerhaft einstellt.

Stattdessen ließ man die Zellen auf Deckgläsern auswachsen, fixierte für 5 Minuten in auf -18⁰C gekühltem Methanol und gab die Deckgläser dann in Medium 1:1 mit 20 µM Bisbenzimid. Die Präparate konnten nach wenigen Minuten im Fluoreszenzmikroskop mit der Filterkombination für UV-Licht betrachtet werden.

2.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Ganze oder zerkleinerte Zellen von *Reticulomyxa filosa* wurden in mit Medium 1:1 gefüllte Petrischalen pipettiert, deren Grund zuvor mit 18 × 18 oder 24 × 32 mm großen Deckgläsern ausgelegt wurde. Die Zellen konnten dann über Nacht auswachsen.

Die Fixierung erfolgte durch schnelles Eintauchen der bewachsenen Deckgläser in auf -18⁰C abgekühltem Methanol. Nachdem der Methanol wieder auf Zimmertemperatur erwärmt war, wurden die Präparate dreimal in Ca²⁺-freiem PBS gespült und dann mit dem Erstantikörper für 60 Minuten bei 37⁰C in einer feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin wurde der Erstantikörper durch dreimaliges Spülen mit Ca²⁺-freiem PBS ausgewaschen, und der Zweitantikörper zugegeben. Mit dem Zweitantikörper wurde ebenfalls eine Stunde bei 37⁰C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden überschüssige Zweitantikörper durch dreimaliges Spülen mit Ca²⁺-freiem PBS entfernt, und die Präparate wurden in Eindeckpuffer überführt. Damit sich das Deckglas nicht verschieben konnte, wurden es mit geschmolzenem Dentalwachs umrandet.

So hergestellte Präparate konnten für mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden, wenn sie hinreichend vor Lichteinstrahlung geschützt wurden.

Ca²⁺ -freie PBS für die IIf:

BSA	10 g/l
NaCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
KCl	200 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l
MgCl ₂ × 6H ₂ O	100 mg/l
Natriumazid	100 mg/l
	pH: 6,8

Eindeckpuffer:

Para-Phenyldiamin	0,1 g
Glycerin (87 %ig)	90 ml
Ca ²⁺ -freie PBS	9 ml
	pH: 8,0 (mit 0,5 M NaHCO ₃ einstellen)

Verwendete Erstantikörper:

<u>Name:</u>	<u>Verdünnung:</u>	<u>Antigen:</u>	<u>Ursprungsorganismus:</u>
WA III	1/10	β-Tubulin aus Hirn	Maus
π	unverdünnt	α-Tubulin (Amöbe)	Maus

Beide Erstantikörper waren ein Geschenk von Herrn Dr. M. Schliwa.

Verwendete Zweitantikörper:

Als Zweitantikörper wurden in beiden Fällen FITC-konjugierte Goat-Anti-Mouse Ak von DIANOVA in einer Verdünnung von 1/30 verwendet.

Zur Betrachtung der Präparate wurde die Standard-FITC Filterkombination verwendet.

2.3 Makroskopische Aufnahmen

Zur Darstellung des Habitus von *Reticulomyxa* und zur Veranschaulichung der Fusion zweier Zellen wurden makroskopische Aufnahmen gemacht. Dazu wurde ein Carl Zeiss Tessovar mit Beleuchtungsautomatik CS-Matik und dem Kameraansatz C 35 verwendet.

Da die Belichtungsmessung bei diesem Gerät automatisch erfolgt, die Helligkeit des Objektes jedoch über das gesamte Gesichtsfeld gemessen wird, konnten bei der Photographie von *Rxf* auf schwarzem Untergrund leicht Überstrahlungseffekte durch zu lange Belichtungszeiten auftreten. Das konnte dadurch vermieden werden, daß die Empfindlichkeit des Filmmaterial eine bis zwei Stufen höher eingestellt wurde, als tatsächlich zutrif.

2.3.1 Habitusaufnahmen

Einzelne Exemplare von *Reticulomyxa filosa* wurden mit einer Pasteurpipette in eine mit Medium 1:1 gefüllte Petrischale gesetzt und über einen Zeitraum von 10 h in ca. 1-stündigen Abständen photographiert.

2.3.2 Aufnahmen von Fusionsstadien

Um die fusionierenden Zellen klarer voneinander unterscheiden zu können, wurde das Medium einer Kulturschale gegen Medium 1:1 mit geringen Mengen gelösten Neutralrots ausgetauscht. Dabei wurde soviel Neutralrot verwendet, daß eine zartrosa Färbung des Mediums erzielt wurde. In diesem Medium konnten die Zellen gefahrlos ein bis zwei Tage verbleiben, bis sie sich intensiv rot färbten. Auf diese Weise gefärbte Exemplare von *Reticulomyxa* konnten wieder in Medium ohne Farbstoff umgesetzt und darin wochenlang weiter kultiviert werden, ohne daß eine Schwächung der Vitalität der Zellen oder der Intensität der Färbung zu beobachten war.

Für die photographischen Aufnahmen wurden ungefärbte und mit Neutralrot gefärbte Exemplare von *Reticulomyxa* zusammen in eine mit Medium gefüllte Petrischale pipettiert, und der Fusionsvorgang über mehrere Stunden beobachtet und photographiert.

2.4 Elektronenmikroskopie

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden auf einem Phillips EM 300 oder einem Phillips EM 410 gemacht. Das verwendete Filmmaterial war Guilleminot EG 18, das nach den Herstellerangaben entwickelt wurde.

Die Zellen konnten meist unter ähnlichen Bedingungen auswachsen. Sie wurden auf die mit dem jeweiligen Kulturmedium überschichteten Grids oder Objektträger pipettiert und hatten dann Gelegenheit, für mehrere Stunden auszuwachsen. Im Fall von *Reticulomyxa filosa* wurden die Zellen meistens über einen Zeitraum von 4 bis 12 Stunden bis zur Weiterbehandlung auf dem Untergrund gelassen; die Exemplare von *Allogromia laticollaris* konnten aus den unter 2.1.2 geschilderten Gründen nur für ca. 2 Stunden auswachsen.

2.4.1 Negative Staining

Die Negativkontrastierung des Cytoskeletts von *Allogromia* und *Reticulomyxa* wurde auf Nickelgrids durchgeführt, die zuvor mit Formvar befilmt und dann mit Kohlenstoff stabilisiert worden waren. Bei einigen Präparaten wurden die Grids nach der Stabilisierung mit Kohle zusätzlich noch mit Pentylamin bedampft, um die Oberfläche zu hydrophilisieren. Da die Zellen im Allgemeinen auch auf nicht hydrophilisierten Grids gut hafteten und die Bedampfung mit Pentylamin zu störenden Rückständen in der Bedampfungsanlage führt, wurde auf diese Methode weitestgehend verzichtet.

Formvarlösung: 0,3 % Formvar (Polyvinylformal) in Chloroform gelöst

Die Zellen wurden nach dem Auswachsen mit einem der folgenden Lysiermedien 20 Minuten lang lysiert. Bei einem Teil der Präparate von *Reticulomyxa* wurde die Lysis aus einem Tropfen Lysiermittel schwimmend durchgeführt, um die Verschmutzung durch gelöste Plasmabestandteile zu verringern.

Daraufhin wurde das Lysiermedium mit Cacodylatpuffer ab gespült¹, und die Grids wurden auf einem Tropfen 2%igem wäßrigen Uranylacetats für wenige Sekunden kontrastiert. Das überflüssige Uranylacetat wurde durch kurzes Eintauchen in 90 %igen Ethanol entfernt. Durch die Behandlung mit Ethanol waren die Präparate ausreichend dehydriert, um sofort anschließend im EM betrachtet werden zu können.

Bei stark mit Kohle bedampften Grids trat zuweilen das Problem auf, daß das Kontrastmittel nicht ausreichend angenommen wurde. In diesen Fällen wurde die Prozedur so umgestellt, daß die Grids nach dem Spülen in Cacodylatpuffer in Ethanol eingetaucht

1: Auf eine Fixierung mit Glutaraldehyd wurde bei den meisten Präparaten verzichtet, weil Glutaraldehyd im Verdacht steht, die Struktur der Mikrotubuli zu verändern: "1% glutaraldehyde produced unusual types of microtubule morphology such as long, single protofilament strands connecting microtubules together and the loss of protofilament structure with time in fixation." (Simon, 1990) (auch: Himes, 1982). Siehe dazu auch Abschnitt 3.

und dann erst mit Uranylacetat kontrastiert wurden. Das überschüssige Uranylacetat wurde dann nicht mit Ethanol abgewaschen, sondern nur mit einem Streifen Filterpapier vom Rand des Grids her abgesaugt.

Verwendete Lysiermedien:

Lysiermedium I:	PIPES	100 mM
	HEPES	25 mM
	MgCl ₂	10 mM
	KCl	10 mM
	EGTA	10 mM
	DMSO	10 %
	Glycerin	10 %
	Nonidet	0,1 %

Lysiermedium II:	PIPES	30 mM
	HEPES	12,5 mM
	EGTA	4,0 mM
	Na ₃ VO ₄	1,0 mM
	Hexylenglykol	12 %
	Brij 58	0,1 %

Lysiermedium III:	PIPES	30 mM
(Schliwa, 1987)	HEPES	12,5 mM
	EGTA	4,0 mM
	MgCl ₂	1 mM
	Hexylenglykol	12 %
	Vanadat	1,0 mM
	Brij 58	0,01 %

(Für besondere Versuche wurde die Vanadatkonzentration zwischen 1 und 16 mM variiert.)

Lysiermedium IV:	Cacodylat	0,1 M
(Golz, 1986)	MgCl ₂	5 mM
	EGTA	1 mM
	Triton-X-100	0,5 %
	DMSO	10 %
	Glycerin	30 %

(In einzelnen Versuchen wurde die Vanadatkonzentration zwischen 1 und 16 mM variiert.)

Lysiermedium V: (Golz, 1986)	Cacodylat	0,1 M
	MgCl ₂	5 mM
	EGTA	1 mM
	Triton-X-100	0,5 %
	DMSO	10 %
	Glycerin	5 %

Lysiermedium VI:	MES	50 mM
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	MgCl ₂	1 mM
	EGTA	10 mM
	Hexylenglykol	1 M
	Triton-X-100	1 %

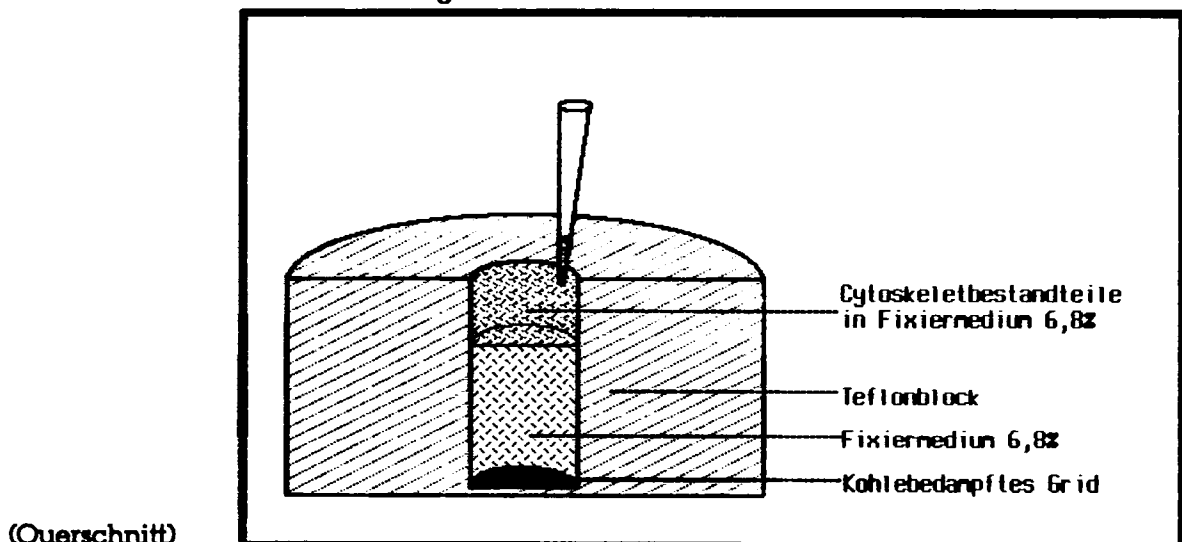
2.4.2 Reinigung von Bestandteilen des Cytoskeletts durch Zentrifugation

Um das Cytoskelett lysierter Organismen von störenden Beimengungen zu befreien, wurden zwischen Lysis und Negative Staining noch zwei reinigende Zentrifugationsstufen eingeschoben.

Die Zellen durften wie unter 2.4.1 in kleinen Petrischalen (Durchmesser 6 cm) auslaufen und wurden dann für 20 Minuten lysiert. Das Lysat wurde mit einer Pasteurpipette durch zweimaliges Einsaugen und wieder Ausstoßen zerkleinert. Die erhaltene Suspension von Zellbestandteilen wurde ohne die störenden Überreste des Zellkörpers aufgenommen und für ca. 20 Sekunden bei 10.000 U/Min in der Eppendorfszentrifuge anzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und der Bodensatz, der aus angereicherten Bestandteilen des Cytoskeletts besteht, in 300 µl Fixiermedium 6,8 % aufgenommen.

Je 80 µl der suspendierten Cytoskelettbestandteile wurden in vorbereitete Teflonblöcke, die mit Fixiermedium gefüllt waren, und auf deren Grund ein befilmtes und mit Kohle bedampftes Nickelgrid lag, gegeben.

Abb. 1: Teflonblock für Zentrifugation



Durch 10-minütige Zentrifugation bei 2000 U/Min werden die Bestandteile des Cytoskeletts auf das Grid übertragen, während die meisten anderen Zellbestandteile im Fixiermedium gelöst verbleiben.

Fixiermedium 6,8 %

6,8 g Saccharose in
70 ml H₂O lösen
4 g Paraformaldehyd zugeben und bei 70⁰C lösen

(Bei Trübung der Lösung 3 Tropfen 1N NaOH zusetzen)

Das Fixiermedium wird mit Boratpuffer auf pH 8,5 eingestellt und mit Bidest auf 100 ml aufgefüllt.

Die fertige Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert, weil die Ingredienzen bei niedrigen Temperaturen im Kühlschrank wieder ausfallen.

2.4.3 Ultradünnschnitte

Die Zellen wurden wie unter 2.4 beschrieben auf Thermanox-Plättchen (Miles Laboratories) inkubiert und für 45 Minuten mit dem folgenden Medium fixiert:

Fixiermedium für Schnitte:

PIPES	30 mM
HEPES	12,5 mM
EGTA	4 mM
MgCl ₂	1 mM
Glutaraldehyd	2,5 %

Nach der Erstfixierung erfolgte noch eine Nachfixierung für 15 Minuten mit 1% OsO₄ in 0,15 M Cacodylatpuffer im Eisbad.

Entwässerung, en-bloc-staining und Epon-Einbettung:

Die Organismen wurden nach der Fixierung in die folgenden Lösungen verbracht:

2 × für 10 Minuten in 30 % EtOH
2 × für 10 Minuten in 50 % EtOH
1 × für 45 Minuten in 2 % UAc in 70 % EtOH
2 × für 10 Minuten in 70 % EtOH
2 × für 10 Minuten in 90 % EtOH
2 × für 10 Minuten in 96 % EtOH
2 × für 10 Minuten in 100 % EtOH
2 × für 10 Minuten in Propylenoxid

1 h Epon/Propylenoxid 1:3

2 h Epon/Propylenoxid 1:1

2 h Epon/Propylenoxid 3:1

Nach der letzten Stufe der Reihe wurden die Präparate in reines Epon verbracht, in dem sie für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur belassen wurden, bevor sie für 24 h bei 100°C im Wärmeschrank ausgehärtet wurden.

Epon für Einbettungen (hart):	Epon 812	48,2l ml
	DDSA	16,66 ml
	MNA	34,60 ml
	DMP 30	2,0 ml

(Das DMP 30, das als Katalysator für die Polymerisation von Epon wirkt, wurde erst kurz vor Verwendung des Epons zu den anderen Komponenten hinzugegeben.)

Nachdem das Epon vollständig auspolymerisiert war, wurden die Eponblöcke aus den Einbettungsgefäßen gelöst, und die interessierenden Regionen des RPN ausgesägt und auf Eponklötze geklebt. Diese Klötze konnten dann direkt in den Objekthalter eines Reichert OM U2 Ultramikrotoms eingespannt und nach dem Trimmen geschnitten werden. Die meisten Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser hergestellt.

In den meisten Fällen wurden die Schnitte auf mit Formvar beschichteten Kupfer-Schlitzblenden aufgenommen und nach der Kontrastierung mit Bleicitrat im Elektronenmikroskop betrachtet.

Bleicitrat nach Reynold's

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	1,33 g
$\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Natriumcitrat)	1,76 g

Die Salze werden in 30 ml Bidest in einem 50 ml Kolben suspendiert und 30 Minuten kräftig geschüttelt. Nach dieser Zeit ist die Umwandlung in Bleicitrat und Natriumnitrat eingetreten.

1 N NaOH (frisch angesetzt)	8 ml
-----------------------------	------

hinzugeben, mit Bidest auf 50 ml auffüllen und gut schütteln.

2.4.4 Gefriersubstitution

Reticulomyxa filosa wurde wie unter 2.4. beschrieben, einzeln auf kleinen Thermanox-Plättchen inkubiert. Die Plättchen wurden aufgenommen und in der von Herrn Holger Schlierenkamp modifizierten Apparatur (Abbildung 2) mit auf -180°C gekühltem flüssigen Propan beschossen und unmittelbar darauf in flüssigen Stickstoff überführt.

Durch diese sehr schnelle Abtötung der Zellen werden die meisten Fixierungsartefakte vermieden.

Die Proben wurden daraufhin in ein Dewar-Gefäß umgelagert, das auf -80°C gekühlten Ethanol enthielt und darin für etwa 6 Tage im Gefrierfach bei -24°C dehydriert.

Zum selektiven Nachweis von proteingebundenem und eventuell auch freiem Ca^{2+} wurden bei einem Teil der Proben 3 Tage der Dehydration in Ethanol mit 0,2 mg/ml Arsenazo III (Aldrich Chemie) durchgeführt. Diese Methode zur Kontrastierung mit Arsenazo III geht auf Ortland (1990) zurück.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Präparate allmählich auf Raumtemperatur erwärmt. Die Proben wurden dann mit 1% OsO_4 in Ethanol osmiert und dann wie unter 2.4.3 beschrieben in Epon überführt und eingebettet.

2.4.5 Tubulin-Dekoration

Um die Polarität einzelner Mikrotubuli bestimmen zu können, wurde versucht, die Mikrotubuli mit Tubulin zu dekorieren. Die verwendete Methode geht auf Euteneuer und McIntosh (1980 und 1981) zurück und wurde den physiologischen Besonderheiten der Untersuchungsobjekte angepaßt und leicht verändert.

Allogromia und *Reticulomyxa* wurden getrennt auf Thermanox-Plättchen, die mit Silikon umrandet waren, gesetzt und hatten Gelegenheit, ihr RPN zu entwickeln. Danach wurden die Organismen 15 Minuten lang in dem Lysiermedium I inkubiert.

Die lysierten Organismen wurden daraufhin für 30 Minuten bei 37°C in 0,5 M PMEG-Puffer mit 4 mg Tubulin und 1,2 mg GTP pro ml inkubiert. Der Hälfte der Proben wurde außerdem noch 10 mM Taxol zugesetzt.

PMEG - Puffer 0,5M:

PIPES	0,5 M
MgCl_2	1 mM
EGTA	1 mM
DMSO	2,5%

Die Fixierung und die Tubulin-Kontrastierung mit Tannin erfolgten in einem Arbeitsschritt mit einer 30-minütigen Anwendung des folgenden Mediums.

Fixiermedium für Tubulin-Dekoration:

K_2HPO_4	2,5 mM
PIPES	100 mM
HEPES	25 mM
MgCl_2	10 mM
DMSO	10 %
Tannin	1 %
Glutaraldehyd	2,5 %

Nach der Fixierung wurde mit PIPES-Puffer 100 mM gespült und mit 1% OsO₄ nachkontrastiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.4.3 bereits beschrieben.

2.4.6 Rotationsanalyse von MT-Querschnitten

Da auch bei senkrecht geschnittenen Mt von *Allogromia* die Anzahl der Protofilamente nicht sicher bestimmt werden konnte, wurden Protofilamentzählungen nach der Rotationsmethode von Markham (1973) vorgenommen.

Dazu wurden von Negativen senkrecht geschnittener Mt mehrfachbelichtete Abzüge hergestellt. Zwischen den Belichtungen wurde das Photopapier um einen definierten Winkel von $(360^{\circ}/\text{Anzahl der Aufnahmen})$ um den Mittelpunkt des Mt gedreht. Entsprechend die Anzahl der Aufnahmen der Anzahl der Protofilamente, so verstärkte sich auf dem Abzug das Protofilamentmuster, anderenfalls überlagerten sich die Bilder und führten so zu einem verschwommeneren Abbild.

2.4.7 Besondere Agentien

DMSO

DMSO wurde in einer Konzentration von 2 % in Medium 1:1 angesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten bis eine Stunde.

Oryzalin

Oryzalin war ein Geschenk von Herrn Dr. Menzel, Ladenburg, und wurde mit Medium 1:1 auf eine Endkonzentration von 5 - 10 µM verdünnt.

Rutheniumrot

Rutheniumrot wurde nach den Angaben von Golz (1986) wie folgt gereinigt:

0,5 g Rutheniumrot wurden in 5 ml 0,5 N Ammoniaklösung bei 60°C aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert. Die gereinigte Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und filtriert. Das Sediment wurde zuerst mit kaltem Bidest, dann mit Äthanol und schließlich mit Diethyläther gewaschen. Der verbleibende Niederschlag wurde bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet.

Rutheniumrot wurde auf eine Endkonzentration von 6 µM mit dem jeweiligen Kulturmedium verdünnt.

2.5 SDS - Gelelektrophorese

Die verwendete Methode für die Elektrophorese basiert auf der von Laemmli (1970) vorgestellten Technik, die leicht modifiziert wurde.

Die Kammern, in denen die Gele gegossen wurden, bestanden aus zwei Glasplatten der Größe 18 × 12 cm, die durch einen Satz etwa 1,5 mm dicker Spacer verbunden wurden. Glasplatten und Spacer wurden vor dem Zusammensetzen mit Ethanol gereinigt.

Das Trenngel wurde wie nachstehend beschrieben, hergestellt, in die Kammern gefüllt und mit Bidest überschichtet, um eine gerade obere Abschlußkante zu erzeugen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Bidest abgegossen und das Sammelgel eingefüllt, in das noch in flüssigem Zustand die Kämme gesteckt wurden.

Die fertigen Gele wurden bis zu ihrer Verwendung in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt.

Die zu untersuchenden Organismen wurden wie unter 2.4 beschrieben, in Petrischalen angesetzt. Bei einem Teil der Versuche wurden die Zellen vor der Aufnahme im Probenpuffer noch lysiert und kurz unter Verwerfung des Überstandes bei 20.000 U/Min an zentrifugiert.

In allen Fällen wurde danach das Protein in Probenpuffer aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenisat wurde in Eppendorfkapseln gefüllt und für 2 Minuten durch Kochen inaktiviert. Die Proben wurden daraufhin für 1 Minute bei 20.000 U/Min zentrifugiert, und der Bodensatz sowie der den Probenpuffer bedeckende Lipidfilm wurden verworfen.

Da Lindenblatt (1988) von erheblichen Schwierigkeiten durch Proteolyse bei der Probenaufbereitung berichtet hatte, wurde auf eine quantitative Proteinbestimmung vor der Befüllung der Kammern verzichtet.²

Die Gele wurden in den meisten Fällen bei einer konstanten Stromstärke von 30 mV gefahren. Bei dieser Stromstärke brauchte eine Elektrophorese ungefähr 3 - 4 Stunden. Wenn die durch das Bromphenolblau im Probenpuffer markierte Laufmittelfront das untere Ende des Gels zu erreichen drohte, wurde der Strom abgestellt und die Gele wurden in Fixierlösung gelegt. Es wurde so lange fixiert, bis das Bromphenolblau nach Gelb umschlug.

Diese Gele wurden dann meist über Nacht, mindestens jedoch für 4 Stunden in die Färbelösung eingelegt und danach für mehrere Stunden in der Entfärbelösung von überflüssigem Coomassie-blue befreit. Die fertigen Gele konnten für mehrere Wochen in Lagerlösung verbleiben.

2: Dies erwies sich allerdings im Nachhinein als überflüssig, weil die abgekochten Proben ohne merkliche Veränderung bis zu 24 h im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten.

Acrylamid/Bisacrylamid 30 + 0.8

Acrylamid	30 g
Methylenbisacrylamid	0,8 g
ad 100 ml	

Trenngelbuffer

Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4 %
pH auf 8,8 einstellen	

Sammelgelbuffer

Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 %
pH auf 6,8 einstellen	

Laufpuffer

Tris/HCl	0,025 M
Glycin	0,192 M
SDS	0,1 %
pH auf 8.8 einstellen	

(Der Laufpuffer kann auch in 10-facher Konzentration angesetzt und gelagert werden und wird dann erst unmittelbar vor Gebrauch verdünnt.)

Probenpuffer

Tris/HCl	0,75 g
SDS	2 g
Glycerin	10 ml
Mercaptoäthanol	5 ml
Bromphenolblau	0,1 g
pH auf 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen	

Fixierlösung

Trichloressigsäure	12 %
Bidest	88 %

Färbelösung für Gele

Coomassie-blue R 250	0,25 %
Methanol	45 %
Eisessig	10 %
Bidest	44,75 %

Entfärbelösung

Methanol	40 %
Eisessig	10 %
Bidest	50 %

Lagerlösung

Essigsäure	10 %
Bidest	90 %

2.5.1 Standard-Gele

Einige Gele wurden nach der Methode von Lindenblatt (1988) gegossen. Ihre Zusammensetzung war wie folgt:

	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
Bidest	1,94 ml	5,15 ml
Trenngelpuffer	6,52 ml	-
Sammelgelpuffer	-	10 ml
Acrylamid 30+0.8	4,33 ml	3,3 ml
TEMED	3,26 µl	18,7 µl
APS 2%	195 µl	1,5 ml

2.5.2 Gradientengele

Außer den oben beschriebenen normalen Gelen wurden außerdem mit Hilfe eines Gradientenmischers Gradientengele gegossen. Diese Gele besitzen keine homogene, sondern eine in Laufrichtung allmählich steigende Dichte, wodurch eine bessere Trennschärfe im Bereich der Substanzen mit mittleren bis hohen Molekulargewichten erreicht wird.

Es wurden zwei verschiedene Rezepturen ausprobiert.

Gradientengel a:

	Trenngel 4 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 3 %
Acrylamid 30 + 0,8	0,94 ml	3,6 ml	1 ml
Bidest	4,29 ml	1,65 ml	6,4 ml
Trenngelpuffer	0,75 ml	0,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 ml
TEMED	6 µl	6 µl	10 µl
APS 10 %	12 µl	12 µl	100 µl

Gradientengel b:

	Trenngel 5 %	Trenngel 16 %
Acrylamid	1,15 ml	1,15 ml
Bidest	2,0 ml	0 ml
Trenngelpuffer	3,25 ml	3,0 ml
TEMED	2 μ l	2 μ l
APS 2 %	100 μ l	100 μ l

Bei diesem Gradientengel wurde das Sammelgel von 2.5.1 verwendet.

2.6 Bezugsquellennachweis

Wenn nicht besonders vermerkt, stammten die eingesetzten Chemikalien von Merk, Darmstadt.

Serva, Heidelberg lieferte Epon 812, DDSA, MNA, DMP 30, EGTA, Propylenoxyd, Glutaraldehyd, HEPES, Uranylacetat, Hexylenglykol, BSA, Brij 58, Triton X - 100, Saponin und Paraformaldehyd.

3 Ergebnisse

3.1 Cytoskelettausbildung bei *Reticulomyxa filosa*

Die polyenergide Amöbe *Reticulomyxa filosa* zieht sich beim Umsetzen in neues Medium zuerst vollkommen zu einem nahezu unstrukturierten Plasmaklumpen von wenigen Kubikmillimetern Inhalt zusammen, ist aber dann in der Lage, innerhalb weniger Stunden ein komplettes Netzwerk aus feinen (10 μm) bis feinsten (kleiner 0,1 μm) Filopodien auszubilden, das eine Fläche von mehreren Quadratzentimetern bedeckt.

3.1.1 Aufbau des reticulopodialen Netzwerks

Der Aufbau des RPN beginnt mit der Ausbildung feiner Filopodien, die an beliebiger Stelle des Zellkörpers entstehen und sich über mehrere 100 μm frei in das Medium strecken können, bis sie Kontakt mit dem Untergrund oder einem anderen Substrat aufnehmen. (Abb. 3) Die Filopodien entstehen nicht oder zumindest nicht bevorzugt an den Stellen, an denen der Zellkörper dem Substrat aufliegt.

Diesen Filopodien, die sich ständig weiter verlängern, folgt alsbald die Hauptmasse des Zellplasmas (Abb. 4). Das Plasma folgt den Bahnen der sich häufig verzweigenden und wieder verschmelzenden Filopodien, was zu einem ähnlichen Wuchsbild des Zellkörpers führen kann. (Abbildungen 5 und 6) Nach einigen Stunden bedeckt die Zelle eine Fläche von mehreren Quadratzentimetern mit ihren feinen Ausläufern.

Mit der zunehmenden Ausbildung des RPN nimmt auch die Abgrenzung des Zellplasmas gegen die Filopodien zu, bis schließlich der Zellkörper in zwei scharf abgegrenzte Bereiche unterteilt ist: Die wenigen zentralen Plasmastränge, die sämtliche Zellkerne beinhalten und in denen die Mikrotubuli in kleinen Bündeln oder dispergiert vorliegen, und die um mehrere Zehnerpotenzen dünneren Filopodien, die den Enden der Plasmastränge entspringen, keine Zellkerne mehr enthalten und zu einem wesentlichen Teil mit gebündelten Mt erfüllt sind.

Ein ähnliches Bild wie die makroskopischen Untersuchungen zeigen auch mikroskopische Beobachtungen an zerkleinerten Zellbruchstücken. Die 5 - 30 μm großen kugelförmigen Fragmente treiben fast augenblicklich ungerichtet Filopodien von ca. 1 μm Durchmesser aus (Abb. 7). Den Filopodien folgt das Zellplasma, und schon nach ungefähr einer Viertelstunde hat sich ein flächiges Netzwerk entwickelt (Abb. 8).

Die Unterschiede zwischen Filopodien und zentralem Plasma beschränken sich nicht nur auf die andere Verteilung von Mikrotubuli und Zellkernen. Im elektronenmikroskopischen Bild erkennt man noch eine Reihe anderer Differenzierungen. So kommen Dictyosomen und rauhes endoplasmatisches Reticulum nur im zentralen Plasma vor, während die fuzzy coated vesicles ein typisches Organell der feinen Filopodien sind. (Vergleiche Abbildung 17 eines quer geschnittenen zentralen Plasmastrangs mit Abb. 39 eines dickeren Filopodiums.) Des weiteren scheint es so zu sein, daß die Mitochondrien des zentralen Plasmas eine deutlichere Binnenstruktur aufweisen, als diejenigen der Filopodien. ("Mi" in Abbildung 17, Abbildung 40.)

3.1.2 Dynamik des Cytoskeletts in kernlosen Fragmenten

Die Ausbildung neuer Filopodien scheint nicht auf das Vorhandensein von Zellkernen oder anderer mikroskopisch erkennbarer Organellen angewiesen zu sein. Es wurden auch Zellfragmente bei der Ausbildung feiner Filopodien beobachtet, die aufgrund ihrer geringen Größe keine Zellkerne mehr beinhalten konnten. Die Abbildungen 9 a-d zeigen solch ein Bruchstück, das aus der abgerissenen Spitze eines Filopodiums hervorgegangen ist, in einer Serie von Aufnahmen, die in einem Zeitabstand von wenigen Minuten aufgenommen wurden.

Dieses winzige Fragment ist nicht nur in der Lage, seine Mt aufrecht zu erhalten, sondern es bildet auch noch neue Filopodien aus und verlängert diese. Die Bewegung der Organellen entlang der Mt bleibt ebenfalls für viele Stunden bestehen. Erst mehr als sechs Stunden nach der Abtrennung vom Zelleib hört die Umgestaltung des Cytoskeletts - wahrscheinlich infolge ATP-Mangels - auf, und die Plasmaströmung kommt zum Erliegen (Abb. 10 a/b, im Abstand von 20 Minuten photographiert). Ein Abbau der Filopodien scheint nicht zu erfolgen, sondern sie erstarren, was im Widerspruch zu dem Verhalten kompletter Organismen steht, die sich bei Nahrungs- bzw. Energiemangel stets zusammenziehen oder zu großen, filopodienlosen Plasmamassen fragmentieren.

3.1.3 Fusion von Zellen

Auslaufende Zellen oder Zellbruchstücke von *Reticulomyxa* fusionieren leicht. In Abbildung Nr. 8 sieht man, daß das Zellfragment in der Bildmitte mit zwei weiteren Bruchstücken fusioniert hat. Makroskopisch wird dieser Vorgang durch die Abbildungen Nr. 11 a und b veranschaulicht. Hierbei handelt es sich um zwei auslaufende komplette Zellen, von denen die auf dem Photo dunkler erscheinende mit Neutralrot angefärbt wurde. Es ist deutlich zu erkennen, daß die die Zellen verbindenden Fortsätze wesentlich kräftiger als diejenigen sind, die gegen den normalen Untergrund gerichtet sind. Durch diese Brücke strömt schließlich auch das Plasma der dunkleren Zelle in den Körper der benachbarten Zelle. (Pfeil in Abb. 11 b.)

31.4 Ernährungsweise von *Reticulomyxa filosa*

So auffällig das RPN von *Reticulomyxa* ist, so wenig weiß man über seine Funktion als ernährende Struktur. Im Gegensatz zu *Allogromia laticollaris*, bei der Ernährungs- und Lebensgewohnheiten schon länger bekannt sind, ist Rxf eher zufällig aus künstlich angelegten Teichen (Hülsmann, 1984) oder Süßwasseraquarien (Koonce und Schliwa, 1985) isoliert worden, und die natürliche Nahrungsquelle ist so im Unklaren geblieben. Die Ungewißheit über die Ernährungsbedingungen zeigt sich nicht zuletzt darin, daß Koonce und Schliwa in ihrem oben angeführten Artikel noch als Nahrung für Rxf Trockenfutter für tropische Fische empfehlen, bevor sie 1986 (Koonce und Schliwa, 1986) ebenso wie Hülsmann (1984) zur Fütterung mit Weizenkeimen übergehen.

Eigene Beobachtungen ergaben, daß die feinen Filopodien von *Reticulomyxa* ausgestreute, mit Lugolscher Lösung gefärbte, Stärkekörner schnell aufnehmen und zum Zellkörper transportieren. Das Wuchsbild der Plasmodien deutet darauf hin, daß die Zelle bevorzugt auf Ansammlungen von Stärkekörnern hinwächst (Vergleiche auch Abbildung Nr. 6). Ob der Transport der Stärke intra- oder extrazellulär erfolgt, konnte nicht eindeutig beobachtet werden.

Im Gegensatz zu der positiven Reaktion auf Stärkekörner wurden abgekochte und mit Kongorot gefärbte Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ignoriert und nicht abtransportiert. Dies deckt sich mit Beobachtungen Hausers (persönliche Mitteilung), wonach Kulturmedien, die Proteine enthalten, für *Reticulomyxa* ungeeignet sind. Ebenso konnte keine Reaktion auf die in der Kultur immer vorhandenen Bakterien und Algen beobachtet werden.

Bei der Betrachtung der in den elektronenmikroskopischen Schnitten vorhandenen Nahrungsvakuolen zeigt sich jedoch, daß die meisten von ihnen Bakterien enthielten, während Stärkekörner und Algen nur selten zu finden waren. (Beispiele für Nahrungsvakuolen in den Abbildungen 12 - 14.)

31.5 Exkretion

Wie schon Koonce & Schliwa (1985) beobachteten, hinterläßt *Reticulomyxa filosa* bei der Wanderung über den Untergrund eine zarte Schleimhülle, die nach Meinung der Autoren aus Abbaustoffen besteht oder solche beinhalten könnte. Tatsächlich befinden sich in allen, aber besonders in den alten retardierenden Bereichen des RPN zahlreiche vielkammerige Exkretionsvesikel (Abb. 16), die anscheinend dem Aufbau der Schleimhülle dienen.

Die Funktion kleiner, etwa mitochondriengroßer, aber weniger osmiophiler Granula, die ebenfalls in dieser Zone gehäuft auftreten, (Abb. 17) ist noch nicht endgültig geklärt. Es scheint jedoch so, als ob diese Granula direkt aus den Produkten des Golgi-Apparates entstehen, exkretiert werden und sich daraufhin in eine blasige Substanz auflösen. In Abbildung Nr. 17 ist besonders das Granulum, das in der Plasmatasche eingeschlossen ist, auffällig. Es trägt an seinem Rand eine Reihe deutlich stärker kontrastierter, unscharf abgegrenzter Flecken, und von diesen gehen Blasen aus.

3.1.6 Oberflächenvergrößernde Strukturen in Vakuolen von *Reticulomyxa filosa*

Bei *Reticulomyxa filosa* wurden an Vakuolen, die Nahrungspartikel enthielten, häufiger extreme Vergrößerungen der Oberfläche durch zahlreiche schlauch- bis flaschenförmige Einstülpungen gefunden. (Abb. 17.) Besonders auffällig sind diese Strukturen in Abb. 18. Hier handelt es sich um ein ganzes Feld solcher Einstülpungen, die in ein stark verzweigtes Netz von Mikrofilamenten (Abb. 19) eingebettet sind. Die Mf verbinden die Häuse dieser Einstülpungen untereinander, oder ziehen von der Membran der Nahrungsvakuole in das Zellplasma.

Auch die Oberfläche dieser Vesikel ist von Mikrofilamenten umgeben. Sowohl der Hals als auch der Bauchbereich sind spiralförmig von ungefähr 8 - 10 nm dicken Filamenten oder Filamentbündeln umwunden. Dadurch, daß diese Filamentbündel ihrerseits durch dünnere (ca. 6 nm) Filamente vernetzt sind, entsteht ein wabenförmiges Muster wie in Abb. 20.

Obwohl lichtmikroskopisch keine kontraktile Vakuole bei *Reticulomyxa filosa* beobachtet wurde, kann doch angenommen werden, daß es sich bei den beobachteten Regionen um Spongiome kontraktiler Vakuolen handelt. Auffällig wäre dann jedoch, daß dieses Organell eine für Amöben untypische Differenzierung erfahren hätte.

3.2 Kernteilung und -gestalt bei *Reticulomyxa filosa*

Die Teilungsspindel von *Reticulomyxa* ist bislang noch nicht untersucht worden. Koonce und Schliwa kündigten 1985, kurz nach der Entdeckung dieses interessanten Objekts, weitere Untersuchungen u. a. zum Zellzyklus an, Ergebnisse sind aber bisher noch nicht publiziert worden.

3.2.1 Struktur des Zellkerns

In späteren Stadien (Siehe 3.1.1) der RPN-Differenzierung liegen die Zellkerne ausschließlich im zentralen Plasma. Ihre Gestalt ist rundlich bis oval, und ihr Durchmesser schwankt innerhalb einer Zelle in weiten Grenzen von etwa 3,0 µm bis 4,5 µm (Abb. 22).

Ein einziges Plasmodium von *Reticulomyxa* kann mehrere tausend Zellkerne enthalten. Die Fluoreszenzfärbung der DNA mit Bisbenzimid zeigt (Abb. 22), daß innerhalb der Kerne ungefähr ein Dutzend ovaler bis runder heterochromatinähnlicher Bereiche liegt, die intensiv mit Bisbenzimid angefärbt werden und im elektronenmikroskopischen Schnitt keine Binnenstruktur aufweisen.

Die Betrachtung im EM macht ebenfalls deutlich, daß die Verteilung dieser Bereiche nicht zufällig ist, sondern daß sie durch zahlreiche periodische Brücken direkt an der Kernlamina verankert sind. (Abb. 24) In diesem Anheftungsbereich finden sich zahlreiche Poren in der Kernmembran. In wenigen günstigen Schnitten kann man auch den Ursprung des, aus feinen, zumeist mit Ribosomen besetzten Schläuchen bestehenden und ebenfalls nur im zentralen Plasma vorkommenden, endoplasmatischen Reticulums an der äußeren Kernmembran erkennen. (Abb. 23, Inset.)

3.2.2 Kernteilung und Teilungszyklus bei *Reticulomyxa filosa*

Die Beobachtung von Kernteilungsstadien erwies sich als unerwartet schwierig. In normal kultivierten Zellen, die nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden, fanden sich niemals Teilungsstadien. Daraufhin wurde mit verschiedenen Methoden versucht, einzelne Zelllinien zu synchronisieren.

Die Versuche, *Reticulomyxa* in Schüttlerkultur zu halten, um so die Ausbildung einer Teilungsspindel für längere Zeit zu unterbinden und durch die Beendigung des Schüttelvorgangs gezielt auszulösen, scheiterten daran, daß *Reticulomyxa* in Schüttlerkultur kein RPN mehr ausbilden kann und dadurch der Nahrungsgrundlage entzogen ist. Versuche, mit 5 µM Oryzalin im Kulturmedium die Zellen in der Metaphase zu arretieren, wie von Ramulu et al (1991) bei *Solanum tuberosum* erfolgreich praktiziert, ergaben, daß die Spindelmikrotubuli diesem Herbizid und Mikrotubuligift gegenüber nicht sensitiver sind, als die cytoplasmatischen. (Siehe auch 3.6.1.3)

Erfolgreicher waren Langzeituntersuchungen an zerkleinerten und danach neu fusionierenden Zellen. Dazu wurden entweder über 24 Stunden ununterbrochen in halbstündigen Abständen Fragmente einer Stammzelle untersucht, oder es wurde mit drei Kulturen, die gegeneinander um jeweils 8 Stunden zeitversetzt angesetzt worden waren, gearbeitet.

Bei der letzteren Methode wurde so quasi lückenlos der Zeitraum von 0 - 96 Stunden nach Inkubationsbeginn erfaßt. Bei diesen Langzeitversuchen konnten an zwei Plasmodien Kernteilungsstadien beobachtet werden (Abb. 25). Auffällig ist, daß die Kerne eines Plasmodiums untereinander nicht synchron sind. So ließen sich in einer Zelle gleichzeitig alle Stadien der Mitose sowie zahlreiche Interphasekerne finden.

Die Photos Nr. 26 a - d zeigen die verschiedenen Stadien der Mitose.

Andere Zellen, die unter identischen Bedingungen gleich lang inkubiert wurden, waren untereinander nicht synchron, so daß auf elektronenmikroskopische Untersuchungen der Spindel verzichtet werden mußte.

3.3 Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz

Bei den Organismen wurde die Reaktion des Cytoskeletts mit den monoklonalen Antikörpern WA III (gegen β -Tubulin) und π (gegen α -Tubulin) untersucht.

Das Cytoskelett von *Reticulomyxa filosa* reagiert mit dem WA III-Ak überhaupt nicht, während bei zufällig eingetragenen Fremdorganismen Flagellen und Geißelbasen deutlich gefärbt sind. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung von Herrn Dr. Schliwa (persönliche Mitteilung an Herrn Professor Hauser), daß Rxf mit dem Antikörper WA III nicht anfärbbar sei.

Die Fluoreszenzfärbung mit dem π -Ak fällt hingegen deutlich aus. Photos verbreiteter und abgeflachter Bereiche des RPN, der sogenannten Lamellipodien, (Abb. 27 und 28) zeigen zahlreiche Mt-Bündel, die aus den Filopodien austreten und in den lamellipodialen Bereichen des Netzwerks breit ausfächern.

Das Cytoskelett von *Allogromia laticollaris* hingegen reagiert mit dem π -Ak überhaupt nicht, und die Fluoreszenzfärbung mit dem Antikörper WA III ist so schwach, daß sie photographisch nicht mehr darzustellen war.

3.4 Ca^{2+} -Nachweis durch Arsenazo III

Die Kontrastierung mit Arsenazo III wurde von Ortlund (1990) als eine Methode des elektronenmikroskopischen Nachweises von Calcium eingeführt. Mit Hilfe dieser Methode gelang es Ortlund unter anderem, zu zeigen, daß im sarcoplasmatischen Reticulum der Muskelzellen von *Branchiostoma lanceolatum* größere Mengen Calcium gespeichert sind.

Die Abbildungen Nr. 29 und 30 zeigen zwei ähnliche Stellen gefriersubstituierter Exemplare von *Reticulomyxa filosa*, einmal mit und einmal ohne Applikation von Arsenazo III während der Dehydrierung.

Für alle gefriersubstituierten Präparationen von *Reticulomyxa* scheint typisch zu sein, daß im Gegensatz zu anderen Behandlungen der Membrankontrast deutlich erhöht ist. Die beiden Lipidlayer der Zellmembran sowie der Membranen der verschiedenen Zellorganellen sind deutlich voneinander zu unterscheiden. Dabei ist im allgemeinen die Seite der Membran, die dem wäßrigen Kompartiment zugewandt ist, deutlicher kontrastiert und erscheint im Schnitt dicker. Wahrscheinlich geht dieser Effekt auf die stärkere Kontrastierung der Glykokalyx zurück.

Der deutlichste Unterschied zwischen diesen Präparaten ist die höhere Affinität der mit Arsenazo III behandelten Zellen zu den anderen Kontrastierungsmitteln, wahrscheinlich insbesondere zu Uranylacetat. Die Schnitte von mit Arsenazo III kontrastierten Organismen weisen einen deutlicheren Kontrast auf, während nicht damit behandelte Zellen im elektronenmikroskopischen Bild seltsam fahl erscheinen.

Die Mitochondrien bieten bei beiden Behandlungsmethoden ein ähnliches Bild, wie auch in herkömmlich fixierten Zellen. Eine intensivere Kontrastierung der mitochondrialen Matrix, die bei manchen Organismen als Calciumspeicher dient, ist nicht zu beobachten. Auffällig bei der Betrachtung Arsenazo III-behandelter Schnitte ist der extrem ausgeprägte Kontrast der Clathrinhüllen von coated vesicles. (Abb. 31)

3.5 Die Polarität von Mikrotubuli

Die beiden Untersuchungsobjekte, *Reticulomyxa filosa* und *Allogromia laticollaris* haben im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen ein Cytoskelett, das ständig und mit einer hohen Geschwindigkeit umgebaut wird. Dies wirft die Frage auf, ob diese Organismen trotz der ständigen Umstrukturierung ihres Cytoskeletts, zum Beispiel der Fusion von Filopodien unterschiedlicher Polarität, in der Lage sind, die Polarität der Mikrotubuli, wie bei anderen Zellen bekannt, mit dem Minus-Ende im Zellkörper und dem Plus-Ende in der Zellperipherie, aufrecht zu erhalten.

Bei *Reticulomyxa filosa* ist diese Frage sehr aktuell, da offensichtlich nur ein Motorprotein, dessen Molekulargewicht und Enzymkinetik dem cytoplasmatischen Dynein anderer Organismen am nächsten kommen, sowohl für den anterograden, also von Zellkörper weg, als auch für den retrograden, zum Zellkörper hin gerichteten, Transport entlang von Mikrotubuli zuständig zu sein scheint. (Schliwa 1991, Euteneuer, Johnson und Schliwa, 1989, McIntosh und Porter, 1989)

Um die Frage der Mt-Polarität zu klären, wurden die Zellen der Tubulin-Dekoration nach Euteneuer und McIntosh (1980) unterworfen. Dabei werden an den bestehenden Mikrotubuli Tubulin-Hooks gebildet, deren Richtung Rückschlüsse auf die Polarität der Mt zuläßt.

3.5.1 Polarität der Mikrotubuli von *Reticulomyxa filosa*

Die Dekoration der Mt von *Reticulomyxa* mit Tubulin erwies sich wie erwartet als problematisch. Euteneuer, Haimo und Schliwa (1989) beobachteten, daß die Mikrotubuli-bündel von *Reticulomyxa* die hohe Salzkonzentration des Dekorationspuffers nicht überstehen und rasch ihre Struktur verlieren. Daher wurden in der hier verwendeten Präparation sowohl Lysismedium als auch Dekorationspuffer gegenüber den ursprünglichen Angaben von Euteneuer und McIntosh (1980) soweit verändert, daß in Kontrollpräparaten im Negative Staining nach der Lysis zumindest noch einige Mikrotubuli erhalten blieben.

Trotzdem bestätigte sich im Ultradünnschnitt die Diagnose von Euteneuer et al (1989). Während die Mikrotubuli von zufällig in die Präparation geratenen Fremdorganismen gut erhalten blieben (Abb. 36), waren in den Überresten des Zellkörpers von *Reticulomyxa* fast keine Mt mehr zu finden. Abbildung 39 zeigt eine der ganz seltenen Ausnahmen, in denen noch intakte Mt vorhanden sind. Die Mikrotubuli sind deutlich zu erkennen und weisen teilweise eine eindeutige Protofilamentstruktur auf, sind jedoch nicht dekoriert und somit im Rahmen dieser Fragestellung nicht verwertbar.

3.5.2 Polarität der Mikrotubuli von *Allogromia laticollaris*

Der Querschnitt durch dekorierte größere Filopodien von *Allogromia* (Abb. 32) zeigt zahlreiche gut erhaltene Bündel von Mt, die in eine flockige elektronendichte Masse eingebettet sind. Die Wände der Mikrotubuli sind gut kontrastiert, aber die typische Protofilamentstruktur tritt nur unscharf zutage. Zusätzlich erscheinen nicht alle Mikrotubuli hohl, sondern in einem großen Prozentsatz von ihnen ist das Lumen der Mt elektronendicht. (Pfeile in Abb. 32.)

Die Querschnitte dünnerer Filopodien sind im allgemeinen weniger stark (Abb. 33) oder nur einseitig (Abb. 34) mit dieser amorphen Masse erfüllt, was die Vermutung nahelegt, daß es sich nicht um eine biogene Struktur handelt, sondern um Niederschläge der Inkubationsmedien, mit denen die Dekoration der Mt durchgeführt wurde.

Die genauere Betrachtung der Mikrotubuliquerschnitte ergibt, daß sich an ihnen zahlreiche stark kontrastierte Anhänge gebildet haben. Diese Anhänge zeigen zumindest zum Teil eine Protofilamentstruktur, die auf den Aufbau aus Tubulin hinweist. Auch der Längsschnitt durch Filopodien beweist, daß eine Dekoration stattgefunden hat (Abb. 35).

Die Drehrichtung dieser Anhänge weist laut Euteneuer und McIntosh (1980) auf die Polarität von Mikrotubuli hin. Analog zur Bildung des B-Tubulus am A-Tubulus in Axonen läßt sich anhand der Rechte-Hand-Regel die Lage des Minusendes der Mikrotubuli bestimmen. Soweit sich die Drehrichtung der Tubulin-Hooks bestimmen läßt, weisen die meisten Mt gleiche Polarität auf, und zwar liegt bei Abb. 33 das -Ende der Mt oberhalb der Abbildungsebene, während es in Abb. 34 unterhalb der Abbildungsebene liegt.

Wegen der geringen Anzahl eindeutig identifizierbarer Tubulin-Hooks sind gesicherte Aussagen über die Polarität von Mt mit dem vorliegenden Material nicht möglich. Für eindeutige Aussagen müßte die Dekorationsprozedur noch verbessert werden.

3.5.3 Protofilamentanzahl in dekorierten Mikrotubuli von *Allogromia*

Wie unter 3.5.1 erwähnt, ließ sich die genaue Protofilamentanzahl der dekorierten Mt von *Allogromia laticollaris* im Ultradünnschnitt nicht identifizieren. Da aber nicht auszuschließen ist, daß die dekorierten Mt nicht von *Allogromia* selbst stammen, sondern während der Inkubation mit Tubulin neu entstanden sind, wäre die Anzahl der Protofilamente ein wichtiges Indiz dafür, ob diese Mt von einem MTOC nucleiert worden sind, oder sich de novo aus freiem Tubulin gebildet haben.

Evans et al. (1985) haben nachgewiesen, daß MTOCs Mt mit einer MTOC-spezifischen konstanten Anzahl von Protofilamenten bilden, während frei entstandene Mt in der Anzahl ihrer Protofilamente nicht konstant sind, sondern zwischen 13 und 15 Protofilamenten enthalten.

Daher wurde mit Hilfe der Markham-Rotation die Anzahl der Protofilamente der dekorierten Mt bestimmt. In allen Fällen, in denen die Ergebnisse der Rotationsanalyse eindeutig waren, betrug die Anzahl der Protofilamente 13 und deckte sich damit mit den von Hauser und Schwab (1974) für die Mt von *Allogromia* ermittelten Werten. (Abbildung 38 a - c.) Dieses Ergebnis legt nahe, daß es sich bei den dekorierten Mikrotubuli nicht um künstlich erzeugte handelt.

3.6 Organisation des Cytoskeletts

Ebenso wie die Zellkörper selber ist auch das Cytoskelett der Untersuchungsobjekte zumindest in zwei Bereiche gegliedert: In das zentrale Plasma, das vereinzelte oder in wenigzahligen Bündeln gesammelte Mikrotubuli enthält, und das periphere Filopodienetz, das größere Bündel streng geordneter Mikrotubuli enthält.

Abbildung Nr. 39 zeigt ein typisches größeres Filopodium von *Reticulomyxa* im Querschnitt. Zahlreiche 3- bis 20-zählige Bündel aus Mikrotubuli, die untereinander durch Querbrücken verbunden sind (Pfeile), wurden angeschnitten. Die Mikrotubuli eines Bündels berühren sich fast nie, meistens halten sie einen Mindestabstand von 10 - 15 nm zueinander ein.

Zwischen den einzelnen Bündeln eingestreut sieht man die Querschnitte sogenannter "fuzzy coated vesicles", die ebenfalls für *Reticulomyxa* und *Allogromia* typisch zu sein scheinen (Travis und Allen, 1981, Bowser und Rieder, 1984, Hauser, 1989). Diese Vesikel kommen meistens in den Filopodien vor und sind ungefähr 100 - 200 nm im Durchmesser bei einer Länge von bis zu 1,5 μm . In Abb. 40, einem Ausschnitt aus dem vorherigen Bild, erkennt man deutlich, daß die fuzzy vesicles von einer Elementarmembran umschlossen sind, deren äußere Schicht aus unregelmäßig strukturiertem elektronendichten Materials besteht. Die fuzzy coated vesicles sind ungefähr zur Hälfte mit einer elektronendichten Masse erfüllt (Abb. 66 und 53), so daß sie im Querschnitt an manchen Stellen des Präparats nur als dunkle Flecke ohne Binnenkontrast auszumachen sind.

Ebenfalls in Abb. 40 erkennt man ein ungefähr 300 nm langes und 6 nm dickes Filament, das zwei Mikrotubuli miteinander verbindet. Nach der Dicke des Filaments zu schließen, könnte es sich um Aktin handeln. Aktin ist ein wesentlicher Bestandteil des Cytoskeletts von *Reticulomyxa*, der sich allerdings ohne Dekoration mit dem S1-Fragment des Muskelmyosins im EM nur schwer darstellen läßt.

Durch die Behandlung mit einem Lysiermedium werden in den feinen Filopodien sämtliche plasmatischen Bestandteile entfernt, und nur noch das Cytoskelett bleibt übrig. Abbildung Nr. 41 zeigt einen Teil eines lysierten Filopodiums. An den Mikrotubuli erkennt man zahlreiche Proteine (siehe Punkt 3.6.1), die Mt untereinander verbinden oder andere Funktionen haben. Außerdem ist auch in dieser Abbildung ein Mikrofilament zu erkennen (Pfeilkopf).

3.6.1 Querbrücken und MAPs bei *Reticulomyxa filosa*

3.6.1.1 Struktur von Querbrücken und MAPs

Die auffallendsten Querbrücken zwischen den Mt von *Reticulomyxa* sind in Abb. 41 erkennbar und scheinen unter anderem der Bündelung der Mt zu dienen. Sie sind streng geordnet, haben untereinander einen mittleren Abstand von ca. 21,5 nm, ihre Länge beträgt ungefähr 17, und ihr Durchmesser ca. 10 nm (Abb. 42).

Diese Querbrücken findet man in allen Bündeln von Mikrotubuli, allerdings sind sie nie über die gesamte Länge eines Mt zu verfolgen, sondern liegen in kleinen plaques von 100 bis 500 nm Länge vor, innerhalb derer sie streng geordnet sind. Den gleichen Typus von Querbrücken kann man auch zwischen Mt und der Zellmembran (Abb. 43), sowie zwischen Mt und adhären Organellen (Abb. 44) finden.

Auffällig an diesen Querbrücken ist, daß ihre Orientierung zum Mikrotubulus nicht senkrecht oder zufällig ist, sondern daß im Ultradünnschnitt die meisten Brücken zu einem Ende des Mt weisen, wobei benachbarte Querbrücken die gleiche Polarität aufweisen, weiter entfernte jedoch entgegengesetzt orientiert sein können (mittlerer Mt. in Abb. 43). Weiterhin ist bemerkenswert, daß diese Querbrücken, die wahrscheinlich cytoplasmatisches Dynein darstellen, entlang der Mt in Längsreihen angeordnet sein müssen, weil man sie niemals gleichzeitig an einem Mt in Seiten- und in Aufsicht beobachten kann (Vgl. Abbildungen 47 und 41).

Ein zweiter Typus quervernetzender Proteine ist nur in Ultradünnschnitten zu erkennen. Es handelt sich um unregelmäßige Strukturen ohne scharfe Konturen, die entferntere Mikrotubuli untereinander (Abb. 42), Mt mit Organellen (Abb. 45), oder zuweilen auch Organelle untereinander (Abb. 40) verbinden. Diese Proteine haben einen unregelmäßigen Abstand voneinander, eine Länge von ca. 65 nm und eine Dicke von 15 nm.

Einen weiteren Typ von Proteinen findet man nur in negativkontrastierten Präparaten, und auch in diesen nur gelegentlich. (Möglicherweise werden diese aufgrund ihrer geringen Größe auch häufig übersehen.) Es handelt sich um kleine, kugel- bis kegelförmige Vorsprünge auf den Mt, deren Länge und Breite jeweils ungefähr 10 nm betragen, und deren Distanz voneinander von 210 bis 250 nm variiert, mit einem mittleren Abstand von 232 nm ($n=7$) (Abbildungen 41 und 46.). Über die mögliche Funktion dieser Proteine läßt sich wegen der Schwierigkeit ihres Auffindens in Dünnschnittpräparaten nichts aussagen.

Außer diesen durch eine Reihe konstanter Eigenschaften beschreibbaren MAPs finden sich noch zahlreiche unregelmäßig verteilte und strukturierte Proteinkörper an den Mt von *Reticulomyxa filosa*, von denen an dieser Stelle nicht entschieden werden kann, ob es sich um MAPs oder um mehr oder weniger zufällig angeheftete Strukturen oder Plasmaklumpen handelt.

3.6.1.2 Einfluß von Vanadat und Lysiermedien auf die Erhaltung von Mt und MAPs

Für die vergleichende Untersuchung der Wirkungen unterschiedlicher Lysiermedien wurden zwei sehr verschiedene Medien eingesetzt: Das Lysiermedium III, das auf Schliwa (1987) zurückgeht, und auf einem mit Hexylenglykol und Brij 58 modifizierten 30 mM PHEM-Puffer basiert, und das Lysiermedium IV, das von Golz (1986) verwendet wurde, und aus einem mit Triton, DMSO und Glycerin ergänzten 100 mM Cacodylatpuffer besteht.

In beiden Lysiermedien wurde außerdem noch in verschiedenen Versuchen die VO_4^{3-} -Konzentration zwischen 1, 2, 4 und 8 mM variiert. Die lysierten Cytoskelette wurden durch Zentrifugation gereinigt.

Am auffälligsten sind bei diesen Versuchen die Unterschiede zwischen den beiden Lysiermitteln. Während das von Schliwa (1987) angewandte Lysiermedium die Oberflächenstruktur der Mt brillanter erhält, und die nach der Zentrifugation erhaltenen Mt-Bruchstücke um den Faktor 2 bis 3 länger sind, als bei dem Medium von Golz, sind kaum noch Querbrücken zwischen den Mt zu finden (Abb. 48).

Das Lysiermedium von Golz (1986) erhält hingegen im allgemeinen die Mt schlechter, sie wirken fragiler, ihre Oberflächenstruktur ist nicht so deutlich erkennbar, und die Länge der Fragmente ist kürzer. Hingegen sind die Proteine, die die Mt bündeln, noch deutlich erhalten (Pfeile in Abb. 47).

Die Effekte der unterschiedlichen Vanadat-Konzentrationen auf die Erhaltung von Querbrücken treten demgegenüber zurück und lassen sich nicht klar beurteilen. In dem Lysiermedium von Schliwa werden sie generell nicht erhalten, und in dem von Golz erhalten sich die Querbrücken bei VO_4^{3-} -Konzentrationen von 1-2 mM am besten. Bei Vanadat-Konzentrationen über 8 mM (Abb. 49) verlieren die Mt an Integrität und fragmentieren oder brechen sehr leicht.

3.6.1.3 Einfluß von Oryzalin auf das Cytoskelett

Das Herbizid Oryzalin ist ein spezifischer Mt-Inhibitor, der bei Pflanzenzellen zum vollständigen Abbau der Mikrotubuli führt. Während Menzel et al. (1990) zum Abbau von Mt bei *Acetabularia* nur eine Oryzalin-Konzentration von 1 μM benötigten, bildete *Reti-culomyxa filosa* bei Oryzalin-Konzentrationen von bis zu 5 μM noch ein vollständig normales Cytoskelett aus (Abb. 50), das neben zahlreichen Mt auch helicale Filamente in den üblichen Mengen enthält.

Bei 10 μM dieses Herbizids im Kulturmedium werden die vorhandenen feinen Filopodien im Verlauf mehrerer Stunden allmählich abgebaut. Die Zelle bildet dabei ständig neue Filopodien, die jedoch nur wenige μm lang werden und dann in ihrem Wachstum stagnieren oder wieder eingeschmolzen werden.

Dieser Vorgang ist durch Auswaschen des Oryzalins wieder umkehrbar. Die Regeneration des RPN erfolgt wie dessen Abbau nur allmählich.

Da Oryzalin-Konzentrationen von mehr als 5 μM möglicherweise Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzt (Menzel, persönliche Mitteilung an Frau Dipl.. Biol.. Hanke-Bücker), kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, daß die Substanz in diesen Versuchen direkt den Abbau von Mt bewirkt hat.

3.6.1.4 Einfluß von DMSO auf Cytoskelettstruktur und Querbrücken

Lichtmikroskopische Beobachtungen

Bereits geringe Konzentrationen von DMSO im Kulturmedium beeinflussten das Wachstumsverhalten von *Reticulomyxa filosa* erheblich. 2 % DMSO führten zu einer deutlich schnelleren Ausbildung von Filopodien und zu einem insgesamt rascheren Auslaufen der Zellen. Dabei hat sich auch das Wachstumsmuster verändert: Es liegen mehr und stärker vernetzte feine Ausläufer vor.

Bei 4% DMSO verstärkt sich dieser Eindruck, das Netzwerk feinsten Filopodien hat sich noch stärker verzweigt. Zusätzlich beeinträchtigt diese Konzentration an DMSO jedoch ebenfalls noch die Plasmaströmung und den Transport von Organellen in den Filopodien. Während an einigen Teilen des RPN der Organellentransport nicht gehemmt erscheint, gibt es auch einzelne Orte, an denen jede Bewegung zum Erliegen gekommen ist.

Elektronenmikroskopische Beobachtung

In Ultradünnschnitten zeigt sich, daß die Effekte von DMSO über ein erleichtertes und schnelleres Auslaufen der Zellen hinaus gehen. Während feine Filopodien außer der ungewöhnlich starken Vernetzung (Abb. 51) keine weiteren Anomalien aufweisen, fällt in größeren Filopodien auf, daß sie ein außergewöhnlich "elektronendünn" Plasma aufweisen (Abb. 52).

Auch die Mikrotubuli in diesen Filopodien scheinen nicht so starr organisiert zu sein. Nur selten sind gebündelte Mt zu finden, meistens liegen sie verstreut oder weisen, wenn sie parallel liegen, keinen konstanten Abstand voneinander auf, der auf das Vorhandensein bündelnder MAPs schließen ließe. Im Extremfall (Abb. 53) erscheinen die größeren Filopodien fast plasmaleer, und es sind nur noch wenige Mikrotubuli in ihnen zu finden.

Das fast vollständige Fehlen bündelnder MAPs fällt auch an negativ kontrastierten Präparaten auf (Abb. 54). Auch parallele Mt weisen keine deutlichen Querbrücken auf. Nur sehr selten sind bündelnde, Dynein-ähnliche Querbrücken zu finden. Dies läßt darauf schließen, daß DMSO neben dem Effekt auf die Konsistenz des Zellplasmas auch noch direkt oder indirekt die Bindung der Querbrücken beeinflusst. (Zu den Effekten von DMSO siehe auch Kapitel 3.7: Gelelektrophorese.)

3.6.2 Mikrotubuliorganisierende Zentren bei *Reticulomyxa filosa*

Obwohl *Reticulomyxa filosa* über ein ausgedehntes und hochdynamisches Netzwerk cytoplasmatischer Mikrotubuli verfügt, ist nichts darüber bekannt, wie und von welchen Organellen dieses Netzwerk organisiert wird. Euteneuer et al. (1989) konstatieren, daß keine offensichtlichen MTOCs gefunden werden, die die Polarität von Mt spezifizieren könnten.

Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, wurden kurzzeitig inkubierte zerkleinerte Zellfragmente von *Reticulomyxa* verwendet, weil bei diesen die Ausbildung des Cytoskeletts noch nicht so weit fortgeschritten ist, und anhand der Filopodienenden die Wuchsrichtung der Plasmodien auch im Ultradünnschnitt noch problemlos festgestellt werden kann.

3.6.2.1 Mikrotubuliorganisierende Zentren im zentralen Plasma

Da die Mikrotubuli im zentralen Zellplasma kaum gebündelt sind, ist es schwer, Mt in Schnittserien zu verfolgen. Nur vereinzelt ist es möglich, in Längsschnitten mögliche Mt-terminierende Strukturen zu finden. (Abb. 55.) Stets handelt es sich dabei um membranöse Vesikel.

3.6.2.2 Die Struktur des distalen Mikrotubulusendes

Die Struktur der dem Zellkörper abgewandten Enden von Mt läßt sich vergleichsweise gut in Serienultradünnschnitten verfolgen. Die Abbildungen 56 a - d zeigen jeweils unmittelbar aufeinander folgende ca. 50 - 60 nm dicke Schnitte der Spitzen von Filopodien. Die Enden der Mt liegen, soweit sie klar erkannt werden können, immer in einer elektronendichten, ringförmigen Struktur von ziemlich konstanten Ausmaßen. Die insgesamt 5 vermessenen Strukturen hatten jeweils ca. 62 nm Breite und 23 nm Dicke.

Dieses "Cap" scheint das distale Ende des Mikrotubulus nicht zu verschließen (Abb. 56 d), sondern legt sich nur wie ein Kragen über die Außenwände des Mt. Vergleichbare Strukturen konnten in keinem Fall an einer anderen Stelle als am unmittelbaren Ende von Mt gefunden werden.

Daß diese Struktur kein Artefakt der in diesem Fall angewandten speziellen Behandlung sein kann, zeigt Abb. 57. Dieses Photo zeigt ein normal ausgewachsenes Exemplar von *Reticulomyxa filosa*, in dem ebenfalls ein solches Cap angeschnitten zu sehen ist.

Mt-terminierende Strukturen lassen sich auch in negativ kontrastierten Präparaten finden (Abb. 58), weisen aber nur selten die typischen Ausmaße von 62×23 nm auf, so daß es sich wahrscheinlich in den meisten dieser Fälle um artifizielle Bildungen handelt, bei denen das Cap entweder durch die Lysismethoden in der Struktur verändert oder gar ganz entfernt wurde. Eine Ausnahme, in der Größe und Form des Caps mit den Daten der Ultradünnschnitte übereinstimmen, zeigt Abb. 69.

Ähnliche Caps haben Golz und Hauser (im Druck) in negativkontrastierten Präparaten von *Allogromia* gefunden, so daß diese Struktur für beide Organismen typisch zu sein scheint.

3.6.3 Helicale Filamente

Beiden Untersuchungsobjekten ist gemeinsam, daß in ihrem Zellkörper unter natürlichen Bedingungen helicale Filamente vorkommen, wie sie von vielen höheren Lebewesen als Kunstprodukt nach der Behandlung mit Vinca-Alkaloiden bekannt sind. Hauser und Schwab (1974) haben den Nachweis geführt, daß diese helicalen Filamente bei *Allogromia* aus Mikrotubuli hervorgehen und aus Tubulin bestehen. Seitdem haben eine ganze Reihe von Arbeiten diese These weiter belegt.

3.6.3.1 *Allogromia laticollaris*

In *Allogromia laticollaris* lassen sich quasi jederzeit größere Mengen helicaler Filamente sowohl in herkömmlichen Ultradünnschnitt- als auch in negativ kontrastierten Präparaten finden. Helicale Filamente bestehen aus einer linkshändigen Wendel, haben im Negativkontrast (Abb. 60 - 62) einen Durchmesser von 37 bis 46 nm und sind somit immer deutlich dicker als Mt. Die große Variabilität des Durchmessers läßt darauf schließen, daß die Struktur der Hf nicht starr sondern in weiten Grenzen veränderbar ist. Die Höhe einer Wendel beträgt konstant um 9 nm, während der Abstand zwischen den einzelnen Umgängen zwischen 4 und 15 nm liegt.

Je nach Präparation zeigt sich, daß die Wendel, aus der das Hf besteht, noch weiter strukturiert und aus parallel orientierten hantelförmigen Bausteinen aufgebaut ist (Abb. 61, Inset). Diese hantelförmigen Bausteine haben eine Länge von ca. 9 nm, die mit der Höhe der Wendel identisch ist, und eine Breite von ca. 4 nm. Damit deckt sich die Größe der einzelnen Bausteine in etwa mit der von einzelnen Tubulin α/β Heterodimeren, und das helicale Filament kann als schraubige Aufwindung paralleler Heterodimere aufgefaßt werden. Größere Mengen helicaler Filamente lagern sich bei *Allogromia laticollaris* zu parakristallinen Aggregaten zusammen (Abb. 59).

3.6.3.2 *Reticulomyxa filosa*

Im Gegensatz zu *Allogromia* sind Hf bei *Reticulomyxa* seltener zu finden und bilden nur unter experimentellem Einfluß parakristalline Aggregate. Typische Aufnahmen von helicalen Filamenten im Ultradünnschnitt zeigen die Abbildungen Nr. 63 und 64.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, mit einer der herkömmlichen Methoden helicale Filamente im Negativkontrast darzustellen. Weder die Verwendung verschiedener Lysiermedien, noch eine der Lysis vorangehende Behandlung mit 4 mM Vanadat oder 6 μ M Rutheniumrot nach der Methode von Golz (1986) führten zum gewünschten Ergebnis. Die Präparate wiesen stets nur Mikrotubuli und Mikrofilamente, aber keine Hf auf. Auch Versuche, in denen die pH-Werte des Lysis- oder Kulturmediums (im Bereich von pH 5 - 11) verändert wurden, erzielten keinen Erfolg.

Dies änderte sich erst, als Exemplare von *Reticulomyxa filosa* vor der Lysis nicht mehr in Medium 1:1, dem normalen Kulturmedium, inkubiert wurden. Da der Verdacht bestand, daß das im Kulturmedium vorhandene Calcium einen Einfluß auf den Erhalt der helicalen Filamente haben könnte, wurden andere Inkubationsmedien eingesetzt. In Präparationen, in denen die Organismen statt in Medium 1:1 in normalem vollentsalztem Wasser auswachsen konnten, fanden sich stets zahlreiche helicale Filamente (Abbildungen 66 und 67). Da die Amöben in reinem vollentsalztem Wasser zu schlecht auswachsen, wurde außerdem mit getrockneten Weizenkeimen gefüttert. Reines bidestilliertes Wasser erwies sich auch bei ergänzender Fütterung als ungeeignet, denn die Zellen bildeten darin kein RPN aus.

Calcium

Calcium (als CaCl_2) im VE-Wasser hatte folgende Wirkung auf die Darstellbarkeit von helicalen Filamenten:

<u>Ca^{2+}-Konzentration:</u>	<u>10^{-2}M</u>	<u>10^{-4}M</u>	<u>10^{-6}M</u>
Helicale Filamente:	keine	viele	viele

(Bei 10^{-2}M Calcium flockt das Zellplasma aus, so daß keine genaue Beobachtung mehr möglich ist.)

Magnesium

Der Einsatz von 10 mM Magnesium (als MgCl_2) im Inkubationsmedium führte zu einer deutlich erhöhten Anzahl von Hfs in den Präparationen.

Bei 100 mM Magnesium bildeten die Zellen kein reticulopodiales Netzwerk mehr aus. Wenn nach erfolgtem Auswachsen in VE-Wasser dieses Medium gegen VE-Wasser mit 100 mM Magnesium vorsichtig ausgetauscht wurde, hörte binnen einer Minute sämtlicher Transport im Zellplasma auf. Nach fünfminütiger Inkubation platzte die Zelle schon bei kleinsten Erschütterungen und gab ihren Inhalt frei. Dies war von keiner merkbaren Volumenveränderung der Organismen begleitet. Daher kann angenommen werden, daß nicht osmotischen Effekte zur Zerstörung der Zellmembran geführt haben, sondern daß sich möglicherweise die Konsistenz der Zellmembran selber dahingehend geändert hat, daß ihre Integrität stark in Mitleidenschaft gezogen worden ist. Der freigesetzte Zellinhalt enthielt große Mengen helicaler Filamente in lockeren Aggregaten (Abb. 65), während nur noch wenige Mikrotubuli zu finden waren.

Vanadat

Wurde das Inkubationsmedium gegen VE mit 4 mM VO_4^{3-} ausgetauscht, kam innerhalb von 90 Sekunden der intrazelluläre Transport zum Erliegen. Dies führte ebenfalls zu einer Erhöhung des Anteils helicaler Filamente.

Struktur der helicalen Filamente von *Reticulomyxa filosa*

Der Aufbau der helicalen Filamente von *Reticulomyxa* ist mit dem von *Allogromia* prinzipiell identisch. Unterschiedlich ist lediglich, daß auch Hf mit einem Durchmesser von nur 25 nm beobachtet werden konnten (Abb. 66). Außerdem scheinen die Hf von *Reticulomyxa* generell fragiler zu sein und brechen leichter.

Eine einheitliche Länge der Hf von *Reticulomyxa* konnte nicht festgestellt werden. Die kürzesten noch als Hf erkennbaren Fragmente waren um 100 nm, das größte beobachtete Exemplar (Abb. 67) war mehr als 2 µm lang.

Besonders interessant erscheint Abb. 69. Aus einem Bündel von Mikrotubuli ragt das Ende eines einzelnen Mikrotubulus, das offensichtlich gecapt ist. Form und Größe des Caps (ca. 55 × 36 nm) decken sich mit denen der in 3.6.2 identifizierten Mt-terminierenden Strukturen. Selbst unter den herrschenden Versuchsbedingungen (das Photo stammt von einem mit Vanadat inkubierten Exemplar), die den rapiden Abbau von Mt förderten, hat sich das Cap nicht von der Spitze des Mt gelöst, es erscheint vielmehr so, als entspringe an der Seite des Caps ein dünner Protofilamentstrang, der zu dem dahinter liegenden helicalen Filament führt.

3.7 Gelelektrophorese

Wie schon im Kapitel "Material und Methoden" in Abschnitt 2.5.2 vermerkt, wurden zwei verschiedene Gradientengele auf ihre Tauglichkeit für die Untersuchungsobjekte getestet. Beim Vergleich der beiden Gradientengele fiel auf, daß bei gleicher Stromstärke (30 mA) die Spannung zwischen Kathode und Anode bei dem Gradientengel b im Verlauf der Proteintrennung 100 V nicht überschritt, während sie beim Gel a über 200 V lag. Wohl infolge der hohen Spannung gelang mit den Gelen vom Typus a keine saubere Auftrennung der Proteinfractionen. Das änderte sich tendenziell, wenn diese Gele mit wesentlich geringeren Stromstärken (10 mA) bearbeitet wurden, aber auch dann ließ die Trennschärfe, verglichen mit den Ergebnissen des anderen Gradientengels, stark zu wünschen übrig (Abb. 70).

Ein Vergleich der Rezepturen für die beiden Gele legt die Vermutung nahe, daß das Gel a durch den wesentlich geringeren Anteil an Trenngelpuffer nicht leitfähig genug ist, und die Proteine durch die daraus resultierende hohen Stromspannungen beschädigt werden.

3.7.1 Proteolyse

Die Beobachtung von Lindenblatt (1988), daß das Proteinextrakt von *Reticulomyxa filosa* eine starke proteolytische Aktivität aufweist, konnte nicht bestätigt werden. Auch ohne den Zusatz von Protease-Inhibitoren zeigte sich nach 24stündiger Lagerung von Proben im Probenpuffer bei 6⁰C keine Änderung in der Proteinzusammensetzung. (Vgl. auch Abb. 71)

3.7.2 Effekte von DMSO

Im Vergleich zu Proteinextrakten von für 45 Minuten mit 2% DMSO inkubierten Exemplaren von *Reticulomyxa filosa* mit unbehandelten Organismen zeigen sich einige markante Unterschiede. Im Bereich hoher bis mittlerer Molekulargewichte sind einige prominente Banden in den Extrakten DMSO-behandelter Zellen zu finden, die in normale inkubierten Zellen nicht anzutreffen sind. (Pfeile a - d in Abb. 71.) Zusätzlich scheint es so, als ob die Bande auf der ungefähren Höhe des Aktin-Markers an Intensität verloren habe, während die unmittelbar darüberliegende Bande (e in Abb. 71) an Intensität hinzugewonnen habe. Zusätzlich tauchen auch in dem Bereich niedrigen Molekulargewichts eine ganze Reihe neuer Banden auf (f - h in Abb. 71).

Da leider keine Proteinmengenbestimmung durchgeführt wurde, können diese Ergebnisse nur als Anhaltspunkt dafür dienen, daß DMSO offensichtlich auf die Proteinzusammensetzung oder -mobilität einen großen Einfluß hat. So könnte vermutet werden, daß es sich bei den hochmolekularen Proteinen um mobilisierte MAPs handelt, deren Bindung zu den Mt gelöst worden ist.

4 Diskussion

4.1 Ernährung von *Reticulomyxa filosa*

Im Gegensatz zu *Allogromia laticollaris*, als deren natürliche Nahrungsgrundlage marine Algenrasen angesehen werden, ist über die natürliche Nahrungsquelle von *Reticulomyxa filosa* wenig bekannt. Koonce und Schliwa (1986) empfahlen sogar noch die Ernährung mit Fischfutter. Mittlerweile hat sich jedoch die Fütterung mit Weizenkeimen, die in erster Linie Stärkekörner enthalten, durchgesetzt (Euteneuer et al., 1989, Hauser und Lindenblatt, 1989).

Eigene Untersuchungen zeigen, daß Stärkekörner von *Reticulomyxa* aufgenommen und zum Zellkörper hin abtransportiert werden. Da andere Partikel der gleichen Größenordnung, z. B. Hefezellen, nicht angenommen werden, scheint dieser Vorgang selektiv zu sein. Das Fehlen von Nahrungsvakuolen in den feinen Filopodien deutet darauf hin, daß zumindest in den feinen Zellausläufern der Transport von Nahrungspartikeln wie bei *Allogromia* (Bowser und Rieder, 1984) beobachtet, extrazellulär erfolgt.

Bei der Betrachtung der in *Reticulomyxa* vorkommenden Vakuolen ergeben sich jedoch einige Widersprüche zu diesen Beobachtungen. Vakuolen, die Stärkekörner enthalten, wie in Abb. 14, sind eine rare Ausnahme, während man mit viel größerer Wahrscheinlichkeit solche findet, die Bakterien enthalten (Abbildungen 12, 15, 55 (angeschnitten) und 18). Teilweise (Abbildungen 15 und 18) scheinen die Bakterien den Aufenthalt in diesen Vakuolen sogar unbeschädigt zu überstehen. Lindenblatt (1988) beobachtete, daß Antibiotikakonzentrationen, die normalerweise ausreichend sind, die in den Kulturen stets vorhandenen Bakterien abzutöten, auch *Reticulomyxa* zum absterben bringen. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, daß die in den Vakuolen enthaltenen Bakterien nicht nur ein wesentlicher Bestandteil der Nahrung sind, sondern möglicherweise auch beim Aufschluß der Stärkenahrung eine Rolle als Endosymbionten spielen.

4.2 Exkretion bei *Reticulomyxa filosa*

Wie die Abbildungen Nr. 16 und 17 zeigen, werden neben alten Nahrungsvakuolen noch mindestens zwei andere Typen von Exkretionsvesikeln gefunden: Große, mit zahlreichen Blasen einer unbekanntes Substanz gefüllte Vakuolen (Pfeile in Abb. 16) und homogene, mitochondriengroße Granula, die bei Kontakt mit dem umgebenden Medium eine blasige Substanz absondern. Die Betrachtung der in Abb. 17 markierten Vakuole legt nahe, daß die mit Blasen gefüllten Vakuolen aus der Verschmelzung der Granula mit einer Vakuole entstehen.

Auch die in feinen Filopodien häufig anzutreffenden vielkammerigen Vesikel, die Lindenblatt (1988) als "myelinartig" beschreibt, haben einen ähnlichen Aufbau wie die bereits beschriebenen großen, mit Blasen erfüllten Vesikel (Abb. 50 und 51) und sind wohl ebenfalls als Produkte der Granula aufzufassen. Der direkte Vergleich mit der Zellmembran, wie er in Abb. 52 möglich ist, zeigt daß die Wände der in den "myelinartigen" Vesikel eingeschlossenen Blasen teilweise fast die doppelte Dicke des Membranbilayers haben und deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit keine Membranreserven darstellen, wie Lindenblatt (1988) vermutete.

Vielmehr ist anzunehmen, daß die Granula selber, wie auch die aus ihrer Verschmelzung mit einer Vakuole entstehenden "myelinartigen" Vesikel Lindenblatts dem Aufbau der für *Reticulomyxa* charakteristischen Schleimhülle (Koonce und Schliwa, 1985) dienen.

4.3 Kernteilung bei *Reticulomyxa filosa*

Aus den Beobachtungen, daß sowohl Zellfragmente, die aus einer einzigen Stammzelle gewonnen wurden, als auch die Kerne einer Zelle bzw. eines Zellfragments untereinander nicht oder in etwa synchron sind, (vgl. Abb. 25) läßt sich folgern, daß die Organisation der Kernteilung nicht von plasmatischen Faktoren sondern im wesentlichen von den einzelnen Zellkernen gesteuert werden könnte. Die extremen Größenunterschiede zwischen den Kernen einer Zelle (Abb. 22) bekräftigen diese Hypothese, können aber nicht als eindeutiger Beweis gewertet werden, weil die Synchronisation der Zellteilung in niederen Organismen wie *Schizosaccharomyces pombe* und *Physarum* nicht wie bei höheren Organismen in der G₁-Phase sondern in der frühen Mitose erfolgt (Alberts et al., 1986). Aus der unterschiedlichen Größe von Interphasekernen kann daher nicht zwangsläufig gefolgert werden, daß die Mitose asynchron verläuft.

Da der Mitoseindex (also das Verhältnis teilende Kerne/Gesamtheit der Zellkerne) sehr niedrig ist, muß auch das Verhältnis der Dauer der M-Phase zu der Dauer des restlichen Kernzyklus sehr niedrig sein (Alberts et al., 1986), entweder weil die Mitose sehr schnell abläuft, oder weil der Kernzyklus sehr lange dauert. Da die Kernteilung nur an fixierten und gefärbten Organismen beobachtet werden konnte, kann über die Dauer von Mitose und Kernzyklus jedoch keine Aussage gemacht werden.

4.4 Bedeutung der oberflächenvergrößernden Strukturen in Vakuolen

Immer wieder konnten an den Membranen von Vakuolen, die zumindest teilweise Nahrungspartikel enthalten, charakteristische schlauch- bis flaschenförmige Einstülpungen der Vakuolenmembran gefunden werden (Abb. 14, 17 und 18 - 21), die in eine, von sonstigen Zellorganellen freie, aus Mikrofilamenten bestehende Matrix eingebettet sind.

Die Mikrofilamente dieser Matrix scheinen mit ihrem einen Ende an der Vakuolenmembran verankert zu sein, während das andere Ende Hals- und Bauchbereich der Einstülpungen spiralig umwindet. Zumindest im Bauchbereich der Einstülpungen sind die schraubigen Windungen der Mikrofilamente miteinander vernetzt.

Alles an dem Aufbau dieser Strukturen deutet darauf hin, daß es sich um kontraktile Organelle handelt, die mit der Osmoregulation befasst sind. An lebenden Exemplaren von *Reticulomyxa* wurden zwar niemals kontraktile Vakuolen beobachtet, die charakteristische schraubige Anordnung der Mikrofilamente läßt jedoch eine andere mögliche Aufgabe solcher Oberflächenvergrößerungen, so wie etwa die Resorption von Nahrungstoffen, unwahrscheinlich erscheinen.

Eigentümlich ist der Aufbau dieses Organells. Patterson (1980) beschreibt das Spongiom rhizopodiale Amöben (*Amoeba proteus*, *Chaos carolinense*) als aus kleinen Vesikeln bestehend, die Flüssigkeit aufnehmen, dann fusionieren und die kontraktile Vakuole bilden. Der Wasserausstoß erfolge dann am Uroid, wobei die Membran der Vakuole fragmentiere und das Spongiom bilde. Patterson vermutet, daß diese Struktur der kontraktilen Vakuole Zellen ohne feste Außenwand und mit reger Plasmabewegung besonders angemessen sei.

Im Gegensatz zu den von Patterson bei rhizopodialen Amöben beschriebenen Strukturen deutet nichts an dem Aufbau des Spongioms von *Reticulomyxa* darauf hin, daß es sich hier um kurzlebige Vesikel handeln könnte. Weitaus größer scheinen die Ähnlichkeiten mit der kontraktilen Vakuole von Flagellaten oder Ciliaten zu sein, die von einem Spongiom weitverzweigter Röhren gespeist wird (Patterson, 1980).

Zusammenfassend kann man sagen, daß es sich bei diesen Strukturen höchstwahrscheinlich um das Spongiom eines osmoregulatorischen Organells handelt, dessen Differenzierung ungewöhnlich ist. Dies läßt sich daraus erklären, daß die für Amöben typische kriechende Fortbewegung des gesamten Zellkörpers bei *Reticulomyxa* zugunsten der Ausbildung des RPN in den Hintergrund getreten ist. Dadurch ist wahrscheinlich das zentrale Zellplasma einer weniger intensiven Bewegung unterworfen und ermöglicht so die Ausbildung eines stabileren osmoregulatorischen Organells.

4.5 Calcium-Nachweis durch Arsenazo-III

Der Grundgedanke dieses Versuchs war die Fragestellung, ob intrazelluläre Speicher in *Reticulomyxa* vorhanden sind, die eventuell durch Freisetzung oder Resorption von Calcium den Auf- und Abbau von Mikrotubuli steuern könnten. Durch in vitro Versuche wurde festgestellt, daß bereits mikromolekulare Mengen von Calcium die Bildung von Mikrotubuli blockieren und bereits vorhandene abbauen, sofern Calmodulin vorhanden ist (Alberts et al., 1986). Zu der Beantwortung dieser Frage wurde versucht, bei *Reticulomyxa filosa* intrazelluläres Calcium nachzuweisen.

Nach Probst (1986) ist Calcium in der Zelle in drei Formen anzutreffen: Als freies Ca^{2+} , das bei der Fixierung ausgewaschen wird, als maskiertes Ca^{2+} , wie es in calcifiziertem Gewebe zu finden ist und als locker gebundene ionische Form. Mit histochemischen Methoden wird hauptsächlich die letztgenannte Form bestimmt.

Normalerweise wird bei lichtmikroskopischen Untersuchungen Arsenazo-III als metallochromer Indikator für Ca^{2+} verwendet, da in Calcium-Gegenwart eine charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums dieses Stoffes stattfindet. (Kleinig und Sitte, 1986). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode des Ca^{2+} -Nachweises beruht jedoch darauf, daß Arsenazo-III mit Calciumionen in alkoholischer Lösung einen unlöslichen Niederschlag bildet. Da Arsen mit der Ordnungszahl 33 den Elektronenstrahl stärker ablenkt, als die meisten Elemente in physiologisch relevanten Verbindungen, die hauptsächlich aus Elementen niedrigerer Ordnungszahl bestehen, ergeben die Arsenniederschläge im elektronenmikroskopischen Bild einen gesteigerten Strukturkontrast.

Bei Ortland (1990) reichte der Niederschlag von Arsenazo-III aus, um in Kontrollversuchen mit ansonsten unkontrastierten Schnitten im sarcoplasmatischen Reticulum der Muskelzellen von *Branchiostoma* Niederschläge erkennen zu können. Zusätzlich bindet Arsen jedoch bei der Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte noch Uranylionen, so daß sich auf diese Weise der Kontrast noch weiter steigert (Hauser, pers.. Mitteilung).

In den eigenen Versuchen mit *Reticulomyxa* konnte jedoch außer einer allgemeinen Steigerung des Kontrastes keine auffallenden Kontrastveränderung bei der Gefriersubstitution durch Arsenazo-III beobachtet werden. Da Gefriersubstitutionen auch nicht in allen Fällen gleich ausfallen, kann noch nicht einmal definitiv behauptet werden, daß die Kontraststeigerung auf die Wirkung von Arsenazo-III zurückgeht.

Dieses Phänomen kann zwei mögliche Ursachen haben: Es ist mit dieser Methode nicht möglich, Calcium bei *Reticulomyxa filosa* nachzuweisen, oder es sind keine größeren intrazellulären Calcium-Speicher vorhanden bzw. das Calcium liegt in ihnen in einer nicht nachweisbaren Form vor (s.o.). Denkbar wäre auch, daß bei *Reticulomyxa* Calcium direkt über die Plasmamembran über besondere Ca^{2+} -Kanäle eingeschleust wird, so daß keine intrazellulären Speicher notwendig sind. Der starke Kontrast der Plasmamembran könnte möglicherweise darin seine Erklärung finden.

Der Calciumnachweis wird zusätzlich dadurch erschwert, daß die Diffusion bei den niedrigen Temperaturen während der Gefriersubstitution so stark eingeschränkt ist, daß schon das Aneinanderhaften der Proben in dem auf -24°C abgekühlten Ethanol ausreicht, die Durchdringung mit dem Substitutionsmedium zu behindern.

Die Ergebnisse des Versuchs sind nicht eindeutig interpretierbar, können jedoch als ein Indiz gegen das Vorkommen bedeutenderer intracellulärer Ca^{2+} -Speicher gedeutet werden.

4.6 Die Polarität von Mikrotubuli

Während bei den meisten Zellen die Polarität der Mikrotubuli bekannt ist oder zumindest aus der Lage des MTOCs indirekt geschlossen werden kann, ist bei den untersuchten Organismen allein aufgrund der riesigen Ausdehnung des Cytoskeletts und seiner ständigen und lebhaften Umgestaltung eine Richtungsbestimmung schwierig. Außerdem fehlen *Reticulomyxa* und *Allogromia* die ausgeprägten MTOCs anderer Organismen, wie sie z. B. Brinkley (1985) beschreibt.

Andererseits ist gerade die Polarität der Mt von *Reticulomyxa* ein Kernpunkt des momentanen Interesses an diesem Organismus, weil in diesem nur ein einziges Mt-abhängiges Motorprotein gefunden werden kann (Schliwa et al., 1987), das für anterograden und retrograden Organellentransport gleichermaßen zuständig zu sein scheint (Schliwa et al., 1991). Die einfachste Erklärung für dieses Phänomen wäre, daß die Mt von *Reticulomyxa* teilweise antiparallel sind, ihr Plusende also teilweise im zentralen Plasma und teilweise in der Peripherie haben.

Tatsächlich scheint es schwer, sich vorzustellen, wie die reticulopodialen Protisten die starre Orientierung: Minusende im Zellkörper, Plusende in der Peripherie, aufrechterhalten können sollten. Schon Travis und Allen beschrieben 1981, wie die feinen Filopodien von *Allogromia* verzweigen und wieder miteinander verschmelzen, und Chen und Schliwa konnten 1991 mit der Technik des video-verstärkten Differentialinterferenzkontrastes beobachten, wie einzelne Mikrotubuli sich an einem Mt anderen Ursprungs anlagerten und auf ihm entlangglitten. Aus eigenen Beobachtungen fusionierender Zellen (Abbildung 8 und 11 a/b) folgert zwangsläufig, daß auch Filopodien mit Mikrotubuli entgegengesetzter Polarität miteinander verschmelzen müssen, um die Zellfusion einzuleiten. Wie das Plasmodium von *Reticulomyxa* in diesem Fall überhaupt in der Lage ist, eine gleichgerichtete Polarität der Mikrotubuli in einem Filopodium aufrecht zu erhalten, erscheint merkwürdig.

Andererseits beobachteten Koonce und Schliwa schon 1985, daß für den bidirektionalen Transport entlang eines Filopodiums ein einziger in den Filopodium enthaltener Mikrotubulus ausreichte. Daraus folgert im Licht der später gewonnenen Erkenntnis, daß für beide Transportrichtungen nur ein Motorprotein verantwortlich ist, daß dieses Protein selber in der Lage sein muß, in beiden Richtungen entlang eines Mt zu wandern. In weiteren Versuchen stellten Euteneuer et al. (1989) mit der Technik der Dynein-Dekoration fest, daß die meisten Mt eines Filopodiums tatsächlich identisch orientiert sind, und zwar, wie von anderen Organismen bekannt, mit dem Minusende im Zellzentrum.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Ergebnisse von Euteneuer et al. (1989) mit einer Technik zu überprüfen, die von diesen selber verworfen worden ist: Der Dekoration der Mt mit Tubulin-hooks in einem 0,5 M PIPES-Puffer. Diese Methode, die von

Euteneuer und McIntosh bei anderen Organismen (PtK₁-Zellen, 1981 und *Haemanthus*, 1980) und ebenfalls von Heidemann (*Eimeria*, Fischmelanophoren, Fischretina, Insektenovarien, Hühnerneuronen, *Lilia*, Heliozoen; Zusammenfassung in Heidemann, 1991) verwendet wurde, beruht darauf, daß unter geeigneten Bedingungen freies Tubulin an bestehende Mt anpolymerisiert und dabei typische links- oder rechtsdrehende Haken bildet, die die Polarität des Mt anzeigen.

Euteneuer et al. berichten in ihrer Arbeit von 1989, daß die hohen Salzkonzentrationen des von ihnen verwendeten Puffers die Mt von *Reticulomyxa* zerstöre. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Puffer hat jedoch bei gleicher Konzentration an Salzen zumindest einen geringen Prozentsatz der Mt von *Reticulomyxa filosa* erhalten können (Abb. 37), auch wenn die Tubulin-Dekoration bei diesem Objekt fehlgeschlagen ist. Die erst nach Abschluß des praktischen Teils dieser Arbeit von Heidemann (1991) publizierten verfeinerten Methoden der Tubulin-Dekoration könnten helfen, die Technik bis zu einem erfolgreichen Ergebnis weiter zu verbessern.

Erstaunlich ist hingegen, wie problemlos die gleiche Dekorationsprozedur bei *Allogromia laticollaris* gelungen ist (Abb. 32 - 35). Die Mt sind gut erhalten, und die an ihnen befindlichen Anhänge weisen tatsächlich größtenteils in die gleiche Richtung. Aufgrund der geringen Menge verfügbaren Materials wurde jedoch auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Dieser Befund deutet darauf hin, daß *Allogromia* trotz des ständigen Umbaus ihres RPN in der Lage ist, eine einheitliche Orientierung der cytoplasmatischen Mt aufrecht zu erhalten. Ein anderer Aspekt dieses Ergebnisses ist jedoch, daß die Unterschiede zwischen den Mt von *Allogromia* und *Reticulomyxa* größer sind, als aufgrund der ähnlichen Lebensbedingungen und Verhaltensweisen zu erwarten wäre (Vergleiche dazu auch den folgenden Abschnitt). Dies stimmt überein mit den Beobachtungen Lindenblatts (1988), der feststellte, daß es erhebliche Unterschiede im Molekulargewicht von *Reticulomyxa*- und *Allogromia*-Tubulin gibt. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß der unterschiedliche Aufbau des Tubulins auch ein unterschiedliches physikalisches Verhalten bewirken könnte.

4.7 Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz

Auch die unterschiedlichen Reaktionen von *Reticulomyxa* und *Allogromia* auf die beiden monoklonalen Antikörper WA III und π sind ein weiteres Indiz für die unerwartet großen Unterschiede zwischen den Tubulinen beider Organismen. Daß nur *Reticulomyxa*-Tubulin überhaupt einen der beiden Antikörper bindet, und zwar den π -Ak, der gegen das α -Tubulin von Amöben gerichtet ist, zeigt überdies, daß die Unterschiede zwischen den Tubulinen beider Organismen und "normalem" Tubulin erheblich sein könnten (vgl. auch Lindenblatt, 1988).

Natürlich ist die Aussagekraft monoklonaler Antikörper über den Verwandtschaftsgrad von Proteinen nur eingeschränkt tauglich, da diese Antikörper nur ein einziges spezifisches Epitop dieses Proteins erkennen, und somit eine Punktmutation ausreicht, die Bindung an dieses Epitop zu verhindern (vgl. Alberts et al., Kleinig und Sitte, beide 1986).

Lindenblatt (1988) und Hauser und Lindenblatt (1989) berichten hingegen, daß sowohl *Allogromia* als auch *Reticulomyxa* mit den monoklonalen Antikörpern YOL 34 gegen fixiertes Tubulin, 1D5 gegen detyrosiniertes α -Tubulin und (eingeschränkt) YL 1/2 gegen tyrosiniertes α -Tubulin reagieren. Die Bindung dieser monoklonalen Antikörper zeigt, daß nicht alle Epitope der α -Tubuline von *Reticulomyxa* und *Allogromia* unterschiedlich sind.

Die negative Reaktivität beider Organismen gegen den Antikörper WA III (monoklonaler Ak gegen β -Tubulin aus Gehirn) bietet eine interessante Perspektive, die nicht unerwähnt bleiben soll: Da für die Dekorationsversuche zur Bestimmung der Mt-Polarität gereinigtes Hirntubulin verwendet wurde (Vgl. Punkt 4.6), dessen β -Tubulin also mit dem Ak WA III reagiert, bietet sich die Inkubation mit diesem Ak als Schnelltest an, um in weiteren Versuchen optimale Bedingungen für die hook-Bildung bei *Reticulomyxa* und *Allogromia* zu finden. Bei einer gelungenen Dekoration sollte sich ein Fluoreszenzmuster zeigen, das der Verteilung der Mt in den Organismen entspricht, aus der Intensität der Fluoreszenz ließe sich das Ausmaß der Dekoration messen. Sowohl die Versuchsdurchführung als auch die -auswertung wäre mit einem Bruchteil des bisherigen Arbeitsaufwands durchführbar.

4.8 Querbrücken und MAPs bei *Reticulomyxa*

4.8.1 Charakterisierung der Querbrücken

In Abschnitt 3.6.1.1 wurden drei unterschiedliche Typen mit Mikrotubuli verbundener Proteine charakterisiert: Periodische Querbrücken von 17 nm Länge, 10 nm Dicke und einem mittleren Abstand von 21,5 nm, unregelmäßig verteilte kegelförmige Proteinkörper mit einer Länge und Breite von jeweils ungefähr 10 nm und unregelmäßig geformte Querbrücken von 65 nm Länge und 15 nm Dicke.

Cytoplasmatisches Dynein

Die Abstände und Ausmaße der periodisch angeordneten Querbrücken erinnern stark an die Anordnung axonemaler Dyneine. Auch Hauser und Golz beschrieben 1985 bei *Allogromia* sehr ähnlich angeordnete globuläre Querbrücken und äußerten die Vermutung, daß es sich um cytoplasmatisches Dynein handle. Die scheinbare Unstimmigkeit, daß die in der vorliegenden Arbeit bei *Reticulomyxa* beschriebenen Querbrücken stiftförmig

sind, während Golz und Hauser (1985) globuläre Querbrücken beschrieben haben, klärt sich, wenn man beachtet, daß Golz und Hauser lysierte Filopodien untersucht hatten. Tatsächlich zeigen auch die Querbrücken von *Reticulomyxa* nach der Lysis ein globuläres Erscheinungsbild (Abb. 41 und 47). Es ist wahrscheinlich, daß die globulären Strukturen an lysierten Mikrotubuli den Köpfen des cytoplasmatischen Dyneins entsprechen, während die "Füße" durch mechanische Beanspruchung deformiert werden (zur Ultrastruktur cytoplasmatischen Dyneins vgl. McIntosh und Porter, 1989).

Filamentöse Querbrücken von 10 nm Durchmesser, 18 nm Länge und 23 nm mittlerem Abstand wurden bei *Allogromia* ebenfalls noch von Kachar et al (1987) beschrieben und als Ursache der Organellenbewegung identifiziert.

Da außerdem ein Dynein-ähnliches Protein als ausschließlicher Motor des Organellentransports in *Reticulomyxa filosa* identifiziert wurde (Schliwa et al., 1991), und identische Querbrücken nicht nur zwischen Mt, sondern auch als Verbindung zwischen Mt und Organell gefunden wurden (Abb. 44), kann davon ausgegangen werden, daß diese Querbrücken cytoplasmatisches Dynein darstellen.

Wie Abb. 42, 43 und 45 zeigen, stehen die Dyneinarne meistens nicht senkrecht vom Mikrotubulus ab, sondern weisen zu einem der beiden Mt-Enden. Dies legt die Vermutung nahe, daß das cytoplasmatische Dynein von *Reticulomyxa* einen ähnlichen Querbrückenzyklus wie das axonemale Dynein aufweist. Diese Annahme wird gestützt durch Gibbons (1988), der die größten Homologien zwischen axonemalem und cytoplasmatischem Dynein in dem Bereich der Energieübertragung durch die zyklischen Interaktionen der Dyneinköpfe mit den Mikrotubuli vermutet. Eine ähnliche Reaktion cytoplasmatischen und axonemalen Dyneins auf Vanadat und gleichzeitige Belichtung mit UV-Strahlung, die zu einer photolytischen Spaltung der Dyneinköpfe führen (Vallee und Shpetner, 1990) sowie eine ähnliche Spezifität der beiden Motorproteine für synthetische hydrolysierbare Basenanaloga (Schliwa, 1991) unterstützen diese Hypothese.

Bei axonemalem Dynein sind Existenz und Ablauf des Querbrückenzyklus weitgehend geklärt: Bei Vorhandensein von ATP zeigt das Dynein zum Minusende des Mikrotubulus, nimmt mit diesem Kontakt auf und bewegt sich dann unter Kraftentwicklung bei gleichzeitiger Hydrolyse des ATP in eine Stellung senkrecht zum Mt (Satir, 1988). Im Gegensatz zum Querbrückenzyklus des Myosins führt die Verwendung nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga nicht zu einer Lösung der Bindung zwischen Dynein und Mikrotubulus, sondern die Querbrücken werden in der zum Minusende zeigenden, mit dem Mt verbundenen Konfiguration stabilisiert (Gibbons, 1988). Der Arm verharrt bis zur Aufnahme eines neuen ATP-Moleküls in der senkrechten Orientierung zum Mikrotubulus (Rigor), wobei die Bindung zum Mikrotubulus nicht gelöst wird.

Unter der Grundannahme, daß sich die Querbrückenzyklen axonemalen und cytoplasmatischen Dyneins weitgehend ähnlich seien, verwundert die Beobachtung, daß die Querbrücken zwischen zwei Mt nicht zwangsläufig alle in die gleiche Richtung weisen (Brücken zwischen dem 2. und 3. Mt von links in Abb. 45), wie es in Axonemen die Regel ist. Für dieses Phänomen gibt es zwei mögliche Erklärungen:

a) Die Brücken gehen nicht alle von einem Mikrotubulus aus; die Querbrücken, die von links oben nach rechts unten weisen, gehen vom Mt Nr. 2 aus, während die von rechts oben nach links unten laufenden Brücken vom Mt Nr. 3 ausgehen.

b) es handelt sich um Querbrücken, die nur von einem Mt ausgehen, aber um zwei verschiedene dyneinartige Proteine bzw. zwei verschiedene Aktivitätszustände des in *Reticulomyxa* anzutreffenden bidirektional arbeitenden dyneinartigen Motorproteins (Schliwa, 1991).

Welche der beiden möglichen Erklärungen zutreffend ist, kann leider mit dem vorliegenden Material nicht beantwortet werden. Eine eindeutige Klärung könnten in vitro Versuche mit isolierten *Reticulomyxa*-Mt und nicht hydrolysierbaren Basenanaloga (AMP-PNP) erbringen. Wenn es gelänge, auf mechanischem Weg oder durch längerfristige ATP-Zugabe nach der Methode von Euteneuer (1987) die Mt-Bündel von *Reticulomyxa* in einzelne Mt zu zerlegen, und die Dyneine dieser Mikrotubuli dann durch AMP-PNP im aktivierten Zustand zu arretieren, müßte sich im elektronenmikroskopischen Bild feststellen lassen, ob die von einem Mt ausgehenden Dyneine alle in dieselbe Richtung weisen.

Kegelförmige Proteine an Mt

Diese vereinzelt anzufindenden Proteine (Abbildungen 41 Inset und 46) ähneln den von Golz (1986) bei *Allogromia* beschriebenen globulären Strukturen von 7-10 nm Durchmesser. Golz interpretiert diese Strukturen als hochmolekulares MAP 2.

Der Terminus MAP 2 ist ein Sammelbegriff für 3 Proteine: MAP 2 a (288 kDa), MAP 2 b (280 kDa) und MAP 2 c (70 kDa) (Matus (1988) und Nunez (1988), zitiert nach Goedert et al., 1991), die mittlerweile als ubiquitär bei cytoplasmatischen Mt angesehen werden (Wiche, 1989). Da aus Gehirn isoliertes MAP 2 sich ungefähr 100 nm von der Mt-Oberfläche hinweg ausdehnt und Querverbindungen zu dem umgebenden Cytoskelett formt (Goedert et al., 1991, Feick et al., 1991) oder Bindungen zu Mitochondrien (Rendon et al., 1990, Letierrier et al., 1990) und möglicherweise anderen Zellorganellen ausbildet, und alle diese Struktureigenschaften auf das beschriebene Protein bei *Reticulomyxa filosa* nicht zutreffen, erscheint die Klassifizierung als MAP 2 hier jedoch als unwahrscheinlich.

Unregelmäßig geformte Querbrücken

Obwohl diese Strukturen, die besonders an den fuzzy coated vesicles, aber auch als Verbindung zwischen anderen Cytoskelettkomponenten zu finden sind (Abb. 39, 40, 42, 45), in ihrem Abstand voneinander und in ihrer Form variabel sind, scheinen sie doch zu einem einheitlichen Typus zu gehören. An freien, einseitig ungebundenen Querbrücken lassen sich eine flexible Halsregion und ein globuläres Köpfchen, das möglicherweise der Bindung an andere Cytoskelettkomponenten dient, unterscheiden (vgl. Abb. 40).

Diese Querbrücken sind grundsätzlich größer dimensioniert als die regelmäßigen Querbrücken, die als Dynein identifiziert wurden (direkter Vergleich in Abb. 42). Dies legt nahe, daß es sich um ein Polypeptid handelt, dessen Molekulargewicht um ein Vielfaches größer ist, als die von cytoplasmatischem Dynein. Größe und Struktur dieser Querbrücke lassen sich jedoch mit keinem bekannten MAP oder einer anderen Komponente des Cytoskeletts in Übereinstimmung bringen. Das häufige Auftreten dieser Proteine, insbesondere in den Filopodien, legt jedoch nahe, daß sie eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle erfüllen, möglicherweise dienen sie der statischen Verankerung von Zellorganellen.

4.8.2 Effekte von DMSO auf cytoplasmatisches Dynein

DMSO greift auf vielfältige Weise in zelluläre Regulationsmechanismen ein. Unter anderem hemmt es die Anheftung von Leukocyten (Sekizuka et al., 1989), fördert den Abbau von Aktinfasern und fördert die Einlagerung von Aktin in den Zellkern (Sanger et al., 1980), wirkt je nach Konzentration hemmend oder fördernd auf die Genexpression (Liotti et al., 1989; Goldstein und Magnano, 1988) und setzt in vitro die kritische Konzentration bei der Polymerisation von Tubulin herab (Algaier und Himes, 1987). Viele dieser Mechanismen scheinen damit verknüpft zu sein, daß DMSO als starker Akzeptor für Wasserstoffbrücken dient, was zur Folge hat, daß sich die Membranstruktur durch den Austausch des in ihr eingelagerten Wassers durch DMSO lockert (Kharasch und Thyagarajan, 1983, zitiert nach Goldstein und Magnano, 1988). Die veränderte Membranstruktur hat zur Folge, daß die Membranpermeabilität zunimmt (De la Torre, 1983).

In den durchgeführten Versuchen mit *Reticulomyxa* zeigten sich mehrere Effekte: Das Cytoplasma der Organismen schien außergewöhnlich "inhaltsleer" zu sein (Abbildungen 52 und 53), das Wachstum der Zellen erfolgte schneller, die Mikrotubuli schienen weitestgehend Dynein-frei zu sein, und in der Gelelektrophorese derartig behandelter Organismen zeigten sich einige Banden hochmolekularer Proteine (Abb. 71, Pfeile a-d), die in Kontrollversuchen nicht oder wesentlich schwächer vorhanden sind.

In Anlehnung an De la Torre (1983) ist zu vermuten, daß das Auftreten "inhaltsleeren" Zellplasmas ein Effekt der gesteigerten Membranpermeabilität ist. Wahrscheinlich führt die geänderte Membranstruktur zu einem erhöhten Einstrom von Wasser in die Zelle. Da bei Zellen, die 30 Minuten mit DMSO inkubiert waren, das Plasma "dünner" aussieht (Abb. 53) als bei für 90 Minuten inkubierten Zellen (Abb. 52), kann vermutet werden, daß die Zelle dem erhöhten Wassereinstrom mit einer erhöhten osmoregulatorischen Aktivität begegnet.

Nach Agaier und Himes (1987) wirkt DMSO auf zweierlei Weise fördernd auf die Polymerisation von Tubulin: Es erleichtert die Bildung von Polymerisationskeimen (Nucleation) und es beschleunigt die Verlängerungsreaktion (Elongation). Auf diese Weise erfüllt es bei in vitro Versuchen eine ähnliche Funktion wie die MAPs (Himes, Burton und Gaito, 1977).

Die Tatsache, daß in 2% DMSO inkubierte Organismen schneller ein RPN ausbilden, legt nahe, daß DMSO auch in vivo eine polymerisationsfördernde Wirkung auf die Mt von *Reticulomyxa* hat.

Bei für 45 Minuten in 2% DMSO ausgewachsenen Organismen zeigt sich außerdem an lysierten Filopodien, daß die in diesem Medium gebildeten Mt weitestgehend MAP- und Dynein-frei sind (Abb. 54). Das Fehlen bündelnder MAPs wird indirekt auch durch das "atypische", stark verzweigte Wachstum des RPN belegt. Zusammen mit der Beobachtung, daß in Medien mit 10% DMSO lysierte Organismen jedoch noch zahlreiche Dyneinbrücken aufweisen (Abb. 47) führt dies zu der Vermutung, daß DMSO nicht nur, wie von Himes et al. (1977) bemerkt, die polymerisationsfördernde Wirkung von MAPs ersetzt, sondern auch die Bindung von MAPs verhindern könnte, indem es möglicherweise deren Bindungsstellen besetzt hält. Eine nach der Mikrotubulusbildung erfolgende Applikation von DMSO scheint jedoch keine beeinträchtigende Wirkung auf die Bindung von MAPs zu haben und diese nicht von ihren Bindungsstellen abzulösen.

Mit dieser These übereinstimmend lassen sich auch die Ergebnisse der Gelelektrophorese dahingehend interpretieren, daß die bei 2% DMSO neu aufgetretenen Banden im hochmolekularen Bereich (Banden a - d in Abb. 71) ungebundene MAPs (unter anderem auch cytoplasmatisches Dynein) darstellen. Ein eindeutiger Beweis dafür, daß es sich bei diesen Banden tatsächlich um MAPs handelt, wäre jedoch nur mit immunologischen Methoden zu führen.

Zwei weitere Schlußfolgerungen erwachsen noch aus den geschilderten Beobachtungen:

a) In welcher Aggregationsform nicht polymerisiertes Tubulin auch immer in *Reticulomyxa* vorliegen mag, es kann nicht bereits an MAPs gebunden sein (oder diese Bindung wird während der Polymerisationsreaktion gelöst). (Freies Tubulin, aber auch helicale Filamente erfüllen diese Bedingung anscheinend.) Wahrscheinlich existiert bei Organismen mit einem abgebauten Cytoskelett ein Pool nicht Mt-gebundener MAPs bzw. nicht Mt-gebundenen Dyneins.

b) Da das Wachstum mit DMSO inkubierter Organismen schneller als bei unbehandelten Organismen erfolgt, ist es wahrscheinlich, daß die Verlängerung der filopodialen Mt primär durch Polymerisation und nicht durch das Aneinandergleiten der Mt eines Bündels ermöglicht wird. Durch das Fehlen von Dynein bei mit DMSO inkubierten Organismen ist diesen ja die Möglichkeit für diese Form der Filopodienverlängerung genommen.

Daher böte DMSO in zukünftigen Versuchen wahrscheinlich die Möglichkeit, den Auf- und Abbau der Mt ohne die störende Überlagerung von Gleitbewegungen zwischen ihnen zu beobachten.

4.9 MTOCs bei *Reticulomyxa filosa*

Im Gegensatz zu der von Euteneuer et al. (1989) geäußerten Ansicht, daß *Reticulomyxa filosa* keine offensichtlichen MTOCs besitze, die die Polarität der Mikrotubuli erkennen lassen, scheint es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen zu sein, anhand von Schnittserien nachzuweisen, daß ein hoher Prozentsatz - wenn nicht sogar alle - der in den feinen Filopodien endenden Mt an diesem Ende von einem elektronendichten Cap charakteristischer Ausmaße umgeben sind (Abbildungen 56 a - e). Ein vergleichbares Cap wurde ebenfalls an dem Ende eines einzelnen Mt in einem Mikrotubulusbündel gefunden (Abb. 57). Ähnliche Strukturen sind kürzlich auch von Hauser und Golz (im Druck) an den Enden der Mt von *Allogromia* identifiziert worden.

Da Euteneuer et al. (1989) mit Dekorationsversuchen nachgewiesen haben, daß die Mt von *Reticulomyxa* wie die der meisten anderen Organismen mit dem Plusende gegen die Zellperipherie gerichtet sind, handelt es sich bei den beobachteten gecapten Enden wahrscheinlich um die Plusenden der Mt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß an den Minusenden der Mikrotubuli ähnliche Strukturen existieren könnten.

Nach der Definition von Pickett-Heaps et al. (1982) (zitiert nach Brinkley, 1985), sind MTOCs nicht nur die Orte, an denen wahrscheinlich der Aufbau von Mt stattfindet, sondern sie können ebenso Stellen sein, an denen die freien Enden von Mt angezogen oder eingefangen werden. Diese Definition trifft auch auf die bei *Reticulomyxa* beobachteten Mt-terminierenden Strukturen zu. Die Maskierung von Mt-Plusenden ist bislang nur von den Kinetochoren der Chromosomen in der Zellteilung bekannt.

Da sowohl unter Wachstums- oder Gleichgewichtsbedingungen (Abbildungen 56 und 57) als auch unter Bedingungen, die den rapiden Abbau des Cytoskeletts fördern, identisch geformte Caps an den Enden von Mt gefunden werden können (Abb. 69), kann vermutet werden, daß die Caps sich entsprechend dem Auf- oder Abbau der Mt mit deren Enden mitbewegen.

Ein Phänomen, das *Reticulomyxa* zu einem beliebten Objekt der Cytoskelettforschung macht, ist die außerordentliche Geschwindigkeit, mit der die Mt dieses Organismus wachsen. Während die Wachstumsrate von Mt bei Verwendung von gereinigtem Hirntubulin bei einer Konzentration von 1,5 mg/ml bei 4 $\mu\text{m}/\text{Min}$ liegt (Walker et al., 1988), und Mt in menschlichen Fibroblasten mit 3,5 $\mu\text{m}/\text{Min}$ (Schulze und Kirschner, 1986), in den Epithelzellen der Lunge von Molchen mit 7,2 $\mu\text{m}/\text{Min}$ (Cassimeris et al. 1988) und in den Axopodien von Heliozoen mit 6 $\mu\text{m}/\text{Min}$ (Schliwa, 1976) wachsen, wurde als maximale Aufbaugeschwindigkeit der Mt von *Reticulomyxa filosa* 210 $\mu\text{m}/\text{Min}$ bestimmt (Chen und Schliwa, 1990). Wenn die Kinetik der Tubulinpolymerisation bei *Reticulomyxa* nicht vollkommen anders ist, als bei allen anderen bisher untersuchten Tubulinen, bedingt eine Wachstumsrate von 100 $\mu\text{m}/\text{Min}$ eine freie Tubulinkonzentration von 15 mg/ml. Die Gesamtkonzentration von Tubulin in *Reticulomyxa* wurde jedoch von Chen und Schliwa (1990) mit 2 - 4 mg/ml bestimmt und liegt damit in der gleichen Größenordnung, wie bei vielen anderen Zellen (Hiller und Weber, 1978). Eine mögliche Aufgabe dieser MTOCs ist also wahrscheinlich die Erhöhung der lokalen Tubulinkonzentration an den Plusenden der Mt.

Wie Abbildung 69 nahelegt, könnte eine weitere Aufgabe dieser Caps der Umbau der Mt zu helicalen Filamenten (siehe den folgenden Abschnitt) sein.

4.10 Helicale Filamente

Helicale Filamente und Tubulin-Parakristalle sind Aggregationsformen von Tubulin, die unter dem Einfluß von Vinca-Alkaloiden in einer Vielzahl von Zellen aus Mikrotubuli entstehen können (Review in: Unger, Böhm und Vater, 1990). Andere Methoden, um helicale Filamente zu erzeugen, sind die Abkühlung der Zellen oder die Behandlung mit Colchizin oder Halothan (Unger, Böhm und Vater, 1990).

Unter physiologischen Bedingungen wurden helicale Filamente und die daraus bestehenden Parakristalle bisher nur in *Allogromia laticollaris* und *Reticulomyxa filosa* beobachtet. Es ist jedoch anzunehmen, daß noch mehrere andere Arten der Klasse der Granuloreticulosea diese Besonderheit der Cytoskelettorganisation mit *Allogromia* und *Reticulomyxa* teilen, da die Ausbildung eines reticulopodialen Netzwerks ein klassentypisches Merkmal ist und die systematische Einteilung innerhalb der Klasse in erster Linie nach Vorhandensein und Form des Gehäuses erfolgt (Vgl. Levine et al., 1980).

Da es sich bei den helicalen Filamenten nicht um eine unter Agentieneinwirkung entstehende - mehr oder weniger beliebige - Sonderform handelt, sondern um eine Struktur, die physiologisch bei Organismen auftritt, die fossil seit dem Altpaläozoikum belegt sind, kann gehofft werden, daß eine Aufklärung dieser Struktur und ihrer Entstehung zugleich auch Rückschlüsse auf die Cytoskelettorganisation "höherer" Organismen zulassen wird.

4.10.1 Darstellung helicaler Filamente mit der Negative Staining-Technik

Während die Darstellung der helicalen Filamente von *Allogromia laticollaris* im Negative Staining keinerlei Schwierigkeiten bereitete (Abb. 60 - 62), kam es bei *Reticulomyxa filosa* zu dem Problem, daß in lysierten und negativ kontrastierten Präparaten niemals helicale Filamente zu finden waren. Auch die Literaturangaben zu der Darstellbarkeit helicaler Filamente in lysierten Zellen von *Reticulomyxa* sind widersprüchlich. Während Hauser et al. (1989) von keinen besonderen Schwierigkeiten bei der Präparation berichten, protokolliert Froese (1990), daß nach einer Lysis in den Zellkörpern von *Reticulomyxa filosa* keine helicalen Filamente oder parakristallinen Aggregate mehr zu finden waren.

Die Tatsache, daß unter identischen Inkubationsbedingungen im elektronenmikroskopischen Bild stets helicale Filamente zu finden sind, während lysierte und negativ kontrastierte Cytoskelette Hf-frei waren, führt zu der Vermutung, daß ein nicht näher bekannter Bestandteil des Kulturmediums, der zusammen mit dem Lysismedium in die Zelle eindringt, die Erhaltung helicaler Filamente verhindert. Da die Darstellung helicaler Filamente mit dem gleichen Lysismedium bei *Allogromia* problemlos gelingt, scheint die Möglichkeit, daß das Lysismedium selber die Auflösung der helicalen Filamente bewirken könnte, relativ unwahrscheinlich.

Da die Inkubation in vollentsalztem Wasser zusammen mit dem bereits bei *Allogromia* bewährten Lysiermedium von Golz zu dem gewünschten Erfolg führt, scheint tatsächlich ein Bestandteil des Kulturmediums für die Zerstörung der helicalen Filamente bei *Reticulomyxa filosa* verantwortlich zu sein. Versuche mit dem den Mt-Abbau fördernden (Alberts et al, 1986) Agens Ca^{2+} in VE-Wasser zeigten, daß dieses bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M, die weit über der Ca^{2+} -Konzentration im Medium 1:1 liegt, keinen Einfluß auf die Erhaltung von Hf in der Lysis hat. Auch andere Versuche führten zu keinem Ergebnis, so daß die Frage nach der Natur des unbekanntem Faktors, der zur Zerstörung der Hf führt, weiterhin unbeantwortet bleiben muß.

Erstaunlich ist ebenfalls, daß Mg^{2+} in Konzentrationen von 10 - 100 mM die Entstehung von Hf bei *Reticulomyxa* fördert. Eine Mg^{2+} -induzierte Bildung von Tubulin-Parakristallen in den Axopodien von Heliozoen wird ebenfalls von Shigenaka et al. (1975) berichtet. Mg^{2+} , das zur Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli essentiell benötigt wird (Alberts et al, 1986), ist auch Bestandteil vieler Mt-stabilisierender Medien (z.B.: Simon und Salmon, 1990, Bayley et al., 1989a).

Ähnliche Effekte, daß ein Mt-Stabilisator gleichzeitig die Entstehung helicaler Filamente fördert, zeigt sich bei der Inkubation mit Vanadat. Hauser et al. (1989) berichten, daß die kurzzeitige Applikation von 2 - 4 mM VO_4^{3-} bei *Reticulomyxa* die Umwandlung großer Teile des RPN in helicale Filamente bewirkt. Koonce und Schliwa (1986) beschreiben Vanadat dagegen als einen essentiellen Faktor bei der Mt-Stabilisierung in Lysisversuchen.

Die Wirkung schweren Wassers auf die Entstehung von Hf ist hingegen nicht eindeutig. Während D_2O wohl eindeutig eine Mt-stabilisierende Wirkung hat, da es das Polymerisationsgleichgewicht in Richtung Mt-Bildung verschiebt (Hauser, 1974, Itoh und Sato, 1984), beschreibt Froese (1990) für *Reticulomyxa filosa* eher eine Förderung der Hf-Bildung, während Hauser und Schwab (1974) bei *Allogromia laticollaris* nach Applikation von 75% D_2O keine helicalen Filamente mehr beobachtet haben. Dustin (1978) berichtet hingegen, daß schweres Wasser die Bildung von helicalen Filamenten fördere.

Eine plausible Erklärung für die chemisch-physikalischen Umstände, die die Umwandlung von Mt in Hf fördern, steht somit zur Zeit wohl noch aus. Die aus der Verallgemeinerung der Versuche mit Vinca-Alkaloiden, Kälte und Colchizin zu ziehende Schlußfolgerung, daß Agenzien, die die Bildung helicaler Filamente fördern, ebenfalls den Abbau von Mt bewirken, scheint eine unzulässige Vereinfachung der komplizierteren Verhältnisse zu sein.

4.10.2 Ultrastruktur helicaler Filamente

Da bis auf die außergewöhnlich dünnen Hf bei *Reticulomyxa* (Abb. 66), die wahrscheinlich durch die enge Packung in einem Filopodium bedingt war, keine auffälligen ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den Hf von *Reticulomyxa* und *Allogromia* vorhanden sind, erübrigt sich eine vergleichende Gegenüberstellung der helicalen Filamente beider Organismen.

Interessant ist Abb. 69, in der ein Protofilamentstrang, der dem Cap des distalen Mt-Endes bei *Reticulomyxa* entspringt, die Vermutung nahe legt, daß an diesem Ort - möglicherweise unter Mitwirkung des Caps - eine Umwandlung des Mikrotubulus in ein helicales Filament erfolgt. Dies würde sich mit den Beobachtungen von Chen und Schliwa (1990) decken, die im videoverstärkten Differential-Interferenzkontrast schrumpfende Mt-Enden fotografierten, die unbekannte Partikel hinter sich zurückließen, von denen die

Autoren vermuteten, daß es sich um helicale Filamente handeln könnte. Auch Lindenblatt (1988) und Froese (1990) haben in ihren Arbeiten Strukturen abgebildet, die ihrer Meinung nach den Übergang zwischen Mikrotubuli und helicalen Filamenten darstellen. Den indirekten Nachweis, daß Mt direkt in helicale Filamente übergehen, haben Golz und Hauser (1985) bei der Inkubation von *Allogromia laticollaris* mit 6 μM Rutheniumrot geführt. Sie zeigten, daß schon eine zehnssekündige Inkubation mit Rutheniumrot unmittelbar vor der Fixierung zu einer Umwandlung sämtlicher Mt zu helicalen Filamenten führt. Diese Zeit ist entschieden zu kurz, um eine komplette Depolymerisation der Mt mit anschließender Kristallisation des freigesetzten Tubulins in der Form von helicalen Filamenten zu ermöglichen. Bestärkt wird die Theorie des direkten Übergangs zwischen Mt und Hf ebenfalls durch den Nachweis von Hauser et al. (1989), daß die Mt von *Reticulomyxa filosa* aus "physiologisch altem" Glu-Tubulin bestehen.

Trotzdem ist der direkte Übergang von Mikrotubuli in helicale Filamente ohne den Umweg über freies Tubulin umstritten. Wie auch die Abbildungen 61 (Inset) und 68 (Inset) verdeutlichen, bestehen helicale Filamente höchstwahrscheinlich aus schraubig aufgewundenen parallel orientierten Tubulin α/β -Heterodimeren, wie bereits Hauser und Schwab (1974) aus Kippserien von Schnitten durch Tubulin-Parakristalle von *Allogromia* schlossen. Das Modell für den Übergang zwischen Mt und Hf, das die beiden Autoren aus ihren Beobachtungen entwickelten, hat jedoch einige Widersprüche zu den heutigen Erkenntnissen über die Ultrastruktur von Mikrotubuli.

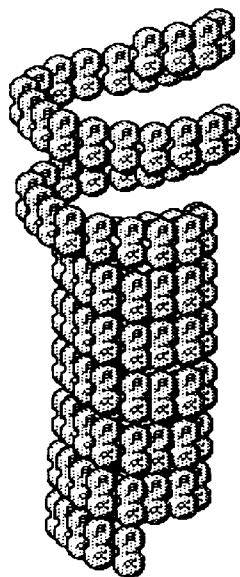


Abb. 72: Transformation von Mt in Hf (verändert, nach Hauser und Schwab, 1974)

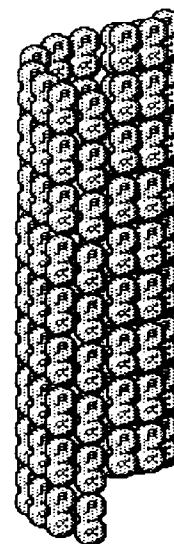


Abb. 73: 3-Start linkshändiger Mt (nach Mandelkow et al, 1986)

Während das Modell von Hauser und Schwab von einem linkshändigen 2-Start Mt ausgeht, aus dem durch die Lösung longitudinaler Bindungen ein helicales Filament hervorgehen kann, und der umgekehrt durch das Knüpfen longitudinaler Bindungen aus einem solchen wieder entstehen kann, zeigen Untersuchungen an in vitro erzeugten Mt

(Mandelkowitz et al., 1986; Simon und Salmon, 1990; Wade et al., 1990), daß die in vitro erzeugten 13 Protofilamente Mt stets 3-Start Mt mit einem parallel zur Längsachse verlaufenden Saum zwischen den heterolog gepaarten Protofilamenten sind. Die Beobachtungen von Simon und Salmon (1990) legen nahe, daß dieser Saum die schwächste Stelle des Mt ist, und daß wachsende oder schrumpfende Mt an dieser Stelle in C-förmige Mt übergehen.

Die Beobachtung von C-förmigen Mt und Protofilamentsheets in *Reticulomyxa* durch Hauser et al. (1989) lassen vermuten, daß dieser Saum auch bei den Mikrotubuli dieses Organismus existiert. Andererseits fehlen den helicalen Filamenten von *Reticulomyxa* und *Allogromia* im elektronenmikroskopischen Bild alle Anzeichen des 1-Protofilament-Sprungs, der durch die heterologe Paarung der Protofilamente entlang des Saumes hervorgerufen werden sollte (vgl. die Abbildungen 60 - 62, 66 und 68). Im helicalen Filament sind also wahrscheinlich alle Tubuline homolog gepaart.

Eine eindeutige Klärung der Frage, ob die Mt von *Reticulomyxa* und *Allogromia* tatsächlich dem in vitro Modell von Mandelkowitz et al. (1986) folgen, oder ob das von Hauser und Schwab (1974) vorgeschlagene Modell des Mt-Aufbaus doch in vollem Umfang zutrifft, könnten wohl nur Röntgenbeugungsanalysen liefern.

5. Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, wie und auf welchem Weg *Reticulomyxa filosa* die arttypische Schleimhülle aufbaut, und daß die vielkammerigen Vesikel in den Filopodien wahrscheinlich nicht Membranreserven sondern Schleimstoffe enthalten.

Es gelang erstmals, die Stadien der Mitose von *Reticulomyxa filosa* darzustellen, und es wurden Indizien dafür erbracht, daß die Teilung der Zellkerne in diesem Plasmodium nur grob synchron abläuft.

Im Zellkörper von *Reticulomyxa filosa* wurde ein osmoregulatorisches Organell entdeckt, das eine für Amöben untypische Differenzierung aufweist.

Mit Hilfe des elektronenmikroskopischen Ca^{2+} -Nachweises durch Arsenazo-III wurden Hinweise dafür erbracht, daß in den Filopodien von *Reticulomyxa filosa* keine umfangreicheren Calciumspeicher vorhanden sind, die den Abbau von Mikrotubuli steuern könnten.

Durch eine Verbesserung der Methoden zur Tubulin-Dekoration von Mikrotubuli gelang es, Indizien dafür zu erbringen, daß die Mikrotubuli in den Filopodien von *Allogromia laticollaris* die gleiche Polarität aufweisen.

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden weitere Unterschiede zwischen den Tubulinen von *Allogromia laticollaris* und *Reticulomyxa filosa* aufgedeckt.

Es wurde nachgewiesen, daß DMSO bei *Reticulomyxa filosa* in vivo die Bildung Dynein-freier Mikrotubuli fördert. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden bei DMSO-inkubierten Organismen Proteine dargestellt, die wahrscheinlich ungebundenes Dynein und andere MAPs darstellen.

Mit Hilfe von Serienultradünnschnitten gelang der Nachweis, daß die distalen Enden der Mikrotubuli von *Reticulomyxa filosa* mit einem wahrscheinlich als MTOC anzusprechenden elektronendichten Cap bedeckt sind.

Durch die Anwendung veränderter Inkubationsmedien gelang die Darstellung der helicalen Filamente von *Reticulomyxa filosa* im Negative Staining. Die Förderung der Entstehung von helicalen Filamenten durch Mg^{2+} wurde nachgewiesen.

6. Abkürzungen

Die folgenden Abkürzungen kommen in der Arbeit vor:

Ak	Antikörper
Al	<i>Allogromia laticollaris</i>
AMP-PNP	5'-Adenylylimidodiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovine serume albumine
DDSA	2.Dodecylbernsteinsäureanhydrid
DMP 30	2. 4. 6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
DMSO	Dimethylsulfoxyd
Dy	Dictyosom
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylenitrilo)] tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fv	fuzzy coated vesicle
GTP	Guanosintri-phosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
Hf	Helikales Filament
IG	Immunglobulin
Iif	Indirekte Immunfluoreszenz
MAP	Mikrotubuli-Assoziiertes Protein
MCA	β -Mercaptoäthanol
Mf	Mikrofilamente
Mi	Mitochondrien
MNA	Methylenedomethylentetrahydroptal-anhydrid
Mt	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-Organisierendes Zentrum
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PIPES	(Piperazin-1.4-bis-[2-aethansulfonsäure])
Rxf	<i>Reticulomyxa filosa</i>
RPN	Reticulopodiales Netzwerk
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Danksagung

Folgenden Personen schulde ich noch meinen ausdrücklichen Dank:

Herrn Professor Dr. M. Hauser für seine vorbildliche Betreuungsarbeit, sein großes Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit, die zahlreichen Anregungen, die ich von ihm empfangen habe und für sein großes Engagement.

Herrn Holger Schlierenkamp für die Anleitung und Hilfestellung in vielen praktischen Fragen sowie zahlreiche Diskussionen und daraus resultierende Denkanstöße.

Den beiden Doktorandinnen Frau Dipl. Biol. Gudrun Hanke-Bücker und Frau Dipl. Biol. Sybille Winkelhaus für ihre Hilfe bei einer Fülle von Fragen und Problemen, sowie für die anregenden fachlichen Diskussionen. Bei Frau Sybille Winkelhaus bedanke ich mich besonders noch für ihre hervorragende Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Den anderen Mitgliedern des Lehrstuhls für die vielen kleinen Hilfen bei Problemen sowie ein hervorragendes Arbeitsklima.

Frau Andrea Hahn, dafür, daß sie mir in den "heißen Phasen" meiner Arbeit den Rücken frei gehalten hat und immer ein ermutigendes Wort für mich fand.

Herrn Axel Krämer (Techniker) für die Anfertigung der Zeichnung des Geräts für die Gefriersubstitution (Abbildung 2).

Herrn Thorsten Lock für seine technische Unterstützung.

Last but not least meinen Eltern, die mich über lange Jahre des Studiums finanziell und - wichtiger noch - ideell unterstützt haben.

Bochum / Witten, im Oktober 1991



7 Literaturverzeichnis

- Algaier, J., Himes, R. H. (1988): The Effects of Dimethyl-Sulfoxide on the Kinetics of Tubulin Assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **954** 235-243
- Albets, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1986): *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlag, Weinheim
- Allen, R. D., Allen, N. S., Travis, J. L. (1981): Video-enhanced Contrast Differential Interference Contrast (AVEC-DIC) Microscopy: A New Method Capable of Analyzing Microtubule-Related Motility in the Reticulopodial Network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil. Cytoskel.* **1** 291-302
- Allen, R. D., Weiss, D., Hayden, J. H., Brown, D. T., Fujiwake, H. (1986): Gliding Movement and Bidirectional Transport along Single Native Microtubules from Squid Axoplasm: Evidence for an Active Role of Microtubules in Cytoplasmatic Transport. *J. Cell Biol.* **100** 1736-1752
- Alonso, A.C., Arce, C.A. Barra, H.S. (1988): Relationship Between The Tyrosination State of Tubulin and the Activities of Tubulin: Tyrosine Ligase and Tubulin Carboxypeptidase in Rat Muscle during Development. *Eur. J. Biochem.* **177** 517-522
- Amos, L. A. (1979) in: *Microtubules* (Roberts, K., Hyams, S., eds.) Academic Press, London, 1 - 64
- Anastasi, A., Hunt, C., Stebbings, H. (1990): Isolation of Microtubule Motors from an Insect Ovarian System: Characterization Using a Novel Motility Substratum. *J. Cell Sci.* **96** 63-71
- Arce, C. A., Barra, H. S. (1985): Release of C-terminal Tyrosine from Tubulin and Microtubules at Steady State. *Biochem. J.* **226** 311-317
- Arregui, C., Barra, H. S. (1989): Tyrosination State of Tubulin and the Activity of Tubulin: Tyrosine Ligase and Tubulin Carboxypeptidase in the Developing Retina of the Chick. *J. Neurochem.* **52** 1708-1713
- Arregui, C., Barra, H. S. (1990): Specific Antibodies for Tyrosinated and Detyrosinated Tubulin Recognize Retina Tubulin Subpopulations that do not Participate in the Posttranslational Tyrosination/Detyrosination Cycle. *J. Neurosc. Res.* **27** 256-263
- Barra, H.S. Arce, C.A. Argarana, C.E. (1988): Posttranslational Tyrosination/Detyrosination of Tubulin. *Molecular Neurobiology* **2** 133-153
- Bayley, P. M., Schilstra, M. J., Marten, S. R. (1989a): A Simple Formulation of Microtubule Dynamics: Quantitative Implications of the Dynamic Instability of Microtubule Populations in Vivo and in Vitro. *J. Cell Sci.* **93** 241-254

- Bayley, P., Schilstra, M., Martin, S. (1989b): A Lateral Cap Model of Microtubule Dynamic Instability FEBS J. **259** 181 - 184
- Beese, L., Stubbs, G., Cohen, C. (1987): Microtubule Structure at 18 Å Resolution. J. Mol. Biol. **194** 257-264
- Beltramo, D. M., Arce, C. A., Barra, H. S. (1987): Tubulin, but not Microtubules, is the Substrate for Tubulin:Tyrosine Ligase in Mature Avian Erythrocytes. J. Biol. Chem. **262** 15673-15677
- Bloodgood, R. A. (1989): Gliding Motility: Can Regulated Protein Movements in the Plasma Membrane Drive whole Cell Locomotion? Cell Mot. Cytoskel. **14** 340-344
- Bohm, K. J., Vater, W., Steinmetzer, P., Kusnetsov, S. A., Rodionov, (1991): Effect of MAP-1, MAP-2, and Tau-Proteins on Structural Parameters of Tubulin Assemblies. Acta Histochem. **39** 357-364
- Bohm, K. J., Vater, W., Steinmetzer, P., Unger, E. (1991): Effect of Sodium Chloride on the Structure of Tubulin Assemblies. Acta Histochem. **39** 365- 372
- Bowser, S. S. (1985): Invasive Activity of Allogromia Pseudopodial Networks: Skyllocytosis of a Gelatin/Agar Gel. J. Protozool. **32** 9-12
- Bowser, S. S., Rieder, C. L. (1985): Evidence that Cell Surface Motility in Allogromia is Mediated by Cytoplasmic Microtubules. Can. J. Biochem. Cell Biol. **63** 608-620
- Bowser, S. S., Travis, J. L., Rieder, C. L. (1988): Microtubules Associate with Actin-Containing Filaments at Discrete Sites along the Ventral Surface of Allogromia Reticulopods. J. Cell Sci. **89** 297-307
- Brady, S. T., Allen, R. D. (1982): Fast Axonal Transport in Extruded Axoplasm from Squid Giant Axon. Science **218** 1129-1130
- Brady, S. T., Lasek, R. J., Allen, R. D., Yin, H. L., Stossel, T. P. (1984): Gelsolin Inhibition of Fast Axonal Transport Indicates a Requirement for Actin Filaments. Nature **310** 56-58
- Brady, S. T. (1985): A Novel Brain ATPase with Properties Expected for the Axonal Transport Motor. Nature **317** 73-75
- Brinkley, B. R. (1985): Microtubule Organizing Centers. Annu. Rev. Cell Biol. **1** 145-172
- Brunner, M., Alberini, S., Wurgler, F. E. (1991): Effects of Ten Known or Suspected Spindle Poisons in the Invitro Porcine Brain Tubulin Assembly Assay. Mutagenesis **6** 65-70
- Bulinski, J. C., Gundersen, G. G. (1987): A Function for Tubulin Tyrosination? Nature **328** 676-
- Bulinski, J. C., Richards, J. E., Piperno, G. (1988): Posttranslational Modifications of Alpha-Tubulin: Detyrosylation and Acetylation Differentiate Populations of Interphase Microtubules in Cultured Cells. J. Cell Biol. **106** 1213-1220

- Cambray-Deakin, M. A., Burgoyne, R. D. (1987): Tyrosinated and Detyrosinated Alpha-Tubulins are Colocalized in Stable Microtubules in Rat Meningeal Fibroblasts. *Cell Motility Cytoskel.* **8** 284-291
- Caplow, Michael, Shanke, John (1990): Mechanism for Oscillatory Assembly of Microtubules. *J. Biol. Chem.* **265** 1414-1418
- Cassimeris, L., Pryer, N. K., Salmon, E. D. (1988): Real-Time Observations of Microtubule Dynamic Instability in Living Cells. *J. Cell Biol.* **107** 2223 - 2231
- Chan, M. M., Triemer, R. E., Fong, D. (1991): Effect of the Anti-Microtubule Drug Oryzalin on Growth and Differentiation of the Parasitic Protozoan *Leishmania Mexicana*. *Differentiation* **48** 15-22
- Chen, Y. T., Schliwa, M. (1990): Direct Observation of Microtubule Dynamics in *Reticulomyxa* - Unusually Rapid Length Changes and Microtubule Sliding. *Cell Motility Cytoskel.* **17** 214-226
- Dahlström, A. B., Pfister, K. K. Brady, S. T. (1991): The Axonal Transport Motor 'Kinesin' is Bound to Anterogradely Transported Organelles: Quantitative Cytofluorimetric Studies of Fast Axonal Transport in the Rat. *Acta Physiol. Scand.* **141** 469-476
- De la Torre, J. C. (1983): Biological Actions and Medical Applications of Dimethyl Sulfoxide. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **411** 404
- Denoulet, P., Edde, B., Pinto-Henrique, D., Koulakoff, A., Gros, F. (1988): The Increase of Tubulin Heterogeneity during Differentiation of Neurons in Primary Culture is Controlled Mainly at the Post-Translational Level. *Structure and Function of the Cytoskeleton* **171** 231-237
- Dominguez, J. E., Padilla, R., Avila, J., Carrascosa, J. L. (1990): Removal of the Carboxy Terminus of Beta-Tubulin Subunit Produces Lateral Annealing of Microtubules with Different Orientations. *Int. J. Biochem* **22** 1419-1426
- Dustin, P. (1978): *Microtubules*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Eichenlaub-Ritter, U., Tucker, J. B. (1984): Microtubules with more than 13 Protofilaments in the Dividing Nuclei of Ciliates. *Nature* **307** 60-62
- Euteneuer, U., McIntosh, R. (1980): Polarity of Midbody and Phragmoplast Microtubules. *J. Cell Biol.* **87** 509-515
- Euteneuer, U., McIntosh, J. R. (1981): Structural Polarity of Kinetochore Microtubules. *J. Cell Biol.* **89** 338-345
- Euteneuer, U., Schliwa, M. (1984): Persistent, Directional Motility of Cells and Cytoplasmic Fragments in the Absence of Microtubules. *Nature* **310** 58- 60

- Euteneuer, U., Haimo, L. T., Schliwa, M. (1989): Microtubule Bundles of Reticulomyxa Networks are of Uniform Polarity. *Eur. J. Cell Biol.* **49** 373-376
- Euteneuer, U., Johnson, K. B., Schliwa, M. (1989): Photolytic Cleavage of Cytoplasmic Dynein Inhibits Organelle Transport in Reticulomyxa. *Eur. J. Cell Biol.* **50** 34-40
- Evans, L., Mitchinson, T., Kirschner, M. (1985): Influence of the Centrosome on the Structure of Nucleated Microtubules. *J. Cell Biol.* **100** 1185-1191
- Feick, P., Foisner, R., Wiche, G. (1991): Immunolocalization and Molecular Properties of a High Molecular Weight Microtubule-Bundling Protein (Syncholin) from Chicken Erythrocytes. *J. Cell Biol.* **112** 689-700
- Froese, W. W. (1990): Das Mikrotubulisystem von *Reticulomyxa filosa* mit Vergleichen zu *Allogromia laticollaris* Arnold. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- Geuens, G., Gunderson, G. D., Nuydens, R., Cornelissen, F., Bulinski, (1986): Ultrastructural Colocalization of Tyrosinated and Detyrosinated Alpha-Tubulin in Interphase and Mitotic Cells. *J. Cell Biol.* **103** 1883-1893
- Gibbons, I. R. (1988): Dynein ATPases as Microtubules Motors. *J. Biol. Chem.* **263** 15837-15840
- Goedert, M., Crowther, R. A., Garner, C. C. (1991): Molecular Characterization of Microtubule-Associated Proteins Tau and MAP2. *Trends in Neurosciences* **14** 193-198
- Goedert, M., Jakes, R. (1990): Expression of Separate Isoforms of Human Tau-Protein - Correlation with the Tau-Pattern in Brain and Effects on Tubulin -Polymerization. *EMBO J.* **9** 4225-4230
- Goldstein, P., Magnano, L. (1988): Effects of Dimethyl Sulfoxide on Early Gametogenesis in *Caenorhabditis Elegans*: Ultrastructural Abberations and Mass of Synaptonemal Complexes from Pachytene Nuclei. *Cytobios* **56** 45-57
- Golz, R., Jockusch, B. M., Hauser, M. (1984): Studies on the Cytoskeleton and the Motility of the Reticulopodial Network of *Allogromia Laticollaris* (Arnold). *Eur. J. Cell Biol.* **33** 14-
- Golz, R., Hauser, M. (1986): Polymorphic Assembly States of *Allogromia* Tubulin under Physiological Conditions. *Eur. J. Cell Biol.* **40** 124-129
- Greer, K., Rosenbaum, J.L. (1989): Post-Translational Modifications of Tubulin. *Cell Movement* **2** 46-66
- Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H., Bulinski, J.C. (1984): Distinct Populations of Microtubules: Tyrosinated and Nontyrosinated Alpha-Tubulin are Distributed Differently in Vitro. *Cell* **38** 779-789

- Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. (1986): Microtubule Arrays in Differentiated Cells Contain Elevated Levels of a Post-Translationally Modified Form of Tubulin. *Eur. J. Cell Biol.* **42** 288-294
- Gundersen, G. G., Khawaja, S., Bulinski, J. C. (1987): Postpolymerization Detyrosination of Alpha-Tubulin: A Mechanism for Subcellular Differentiation of Microtubules. *J. Cell Biol.* **105** 251-264
- Hahne, G., Hoffmann, F. (1984): Dimethyl Sulfoxide Can Initiate Cell Divisions of Arrested Callus Protoplasts by Promoting Cortical Microtubule Assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** 5449-5453
- Hamel, E., Lin, C. M., Kenney, S., Skehan, P. (1991): Highly Variable Effects of Beryllium and Beryllium Fluoride on Tubulin Polymerization Under Different Reaction Conditions - Comparison of Assembly Reactions Dependent on Microtubule-Associated-Proteins, Glycerol, Dimethyl-Sulfoxide, and Glutamate. *Arch. biochem. Biophys.* **286** 57-70
- Hauser, M., Schwab, D. (1974): Mikrotubuli und helikale Mikrofilamente im Cytoplasma der Foraminifere *Allogromia laticollaris* Arnold. Untersuchungen mit Vinblastin und Deuteriumoxid zum Nachweis einer engen Wechselbeziehung. *Cytobiologie* **9** 263-279
- Hauser, M., Lindenblatt, J., Hülsmann, N. (1989): The Cytoskeleton of *Reticulomyxa Filosa* Reticulopodia Contains Glu-Tubulin as a Main Component. *Eur. J. Protistology* **25** 145-157
- Heidemann, S. R. (1991): Microtubule Polarity Determination Based on Formation of Protofilament Hooks. *Meth. Enzymol.* **196** 469-477
- Heins, S., Song, Y. H., Wille, H., Mandelkow, E., Mandelkow, E. M. (1991): Effect of MAP2, MAP2c, and Tau on Kinesin-Dependent Microtubule Motility. *J. Cell. Sci.* **14** 121-124
- Hiller, G., Weber, K. (1978): Radioimmune Assay for Tubulin: A Quantitative Comparison of the Tubulin Content of Different Established Tissue Culture Cells and Tissues. *Cell* **14** 795 - 804
- Himes, R. H., Burton, P. R., Gaito, J. M. (1977): Dimethyl Sulfoxide-Induced Self-Assembly of Tubulin Lacking Associated Proteins. *J. Biol. Chem.* **262** 6222-6228
- Hollenbeck, P. J. (1988): Kinesin: Its Properties and Possible Functions. *Protoplasma* **145** 145-152
- Holwill, M. E., Satir, P. (1990): A Physical Model of Microtubule Sliding in Ciliary Axonemes. *Biophys. J.* **58** 905-918
- Hülsmann, N. (1984): Biology of the Genus *Reticulomyxa* (Rhizopoda). *J. Protozool.* **34** 55-
- Hyman, A. A. (1991): Preparation of Marked Microtubules for the Assay of the Polarity of Microtubule-Based Motors by Fluorescence. *J. Cell Sci.* **14** 12 5-127

- Jensen, C. G., Bollard, S. M., Jensen, L. C., Travis, J. L., Bowser, S (1990): Microdensitometer-Computer Correlation Analysis of Two Distinct, Spatially Segregated Classes of Microtubule Bridges in *Allogromia* Pseudopodia. *J. Struct. Biol.* **105** 1-10
- Johnson, G. V., Litersky, J. M., Jope, R. S. (1991): Degradation of Microtubule-Associated Protein-2 and Brain Spectrin by Calpain - A Comparative Study. *J. Neurochem.* **56** 1630-1638
- Kachar, B., Bridgman, P. C., Reese, T. S. (1987): Dynamic Shape Changes of Cytoplasmic Organelles Translocating along Microtubules. *J. Cell Biol.* **105** 1267-1271
- Katsuda, S., Okada, Y., Nakanishi, I. (1987): Dimethyl Sulfoxide Induces Microtubule Formation in Cultured Arterial Smooth Muscle Cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **11** 103-110
- Keates, R. A. (1990): Traces of Brain Microtubule-Associated Proteins Affect Dynamic Properties of Microtubules. *Biochemistry and Cell* **68** 1202-1209
- Khawaja, S., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. (1988): Enhanced Stability of Microtubules Enriched in Detyrosinated Tubulin is not a Direct Function of Detyrosination Level. *J. Cell Biol.* **106** 141-149
- Kindler, S., Schulz, B., Goedert, M., Garner, C. C. (1990): Molecular Structure of Microtubule-Associated Protein-2B and Protein-2C from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* **265** 19679-19684
- King, S. M., Witman, G. B. (1990): Localization of an Intermediate Chain of Outer Arm Dynein by Immunoelectron Microscopy. *J. Biol. Chem.* **265** 19807-19811
- King, S. M., Wilkerson, C. G., Witman, G. B. (1991): The Mr 78,000 Intermediate Chain of *Chlamydomonas* Outer Arm Dynein Interacts with Alpha-Tubulin In situ. *J. Biol. Chem.* **266** 8401-8407
- Kleinig, H., Sitte, P. (1986): *Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Koike, H., Matsumoto, H., Umitsu, Y. (1989): Selective Axonal Transport in a Single Cholinergic Axon of *Aplysia* - Role of Colchicine-Resistant Microtubules. *Neuroscience* **32** 539
- Koonce, M. P., Schliwa, M. (1985): Bidirectional Organelle Transport Can Occur in Cell Processes that Contain Single Microtubules. *J. Cell Biol.* **100** 322-326
- Koonce, M. P., Euteneuer, U., McDonald, K. L., Menzel, D., Schliwa, M. (1986): Cytoskeletal Architecture and Motility in a Giant Freshwater Amoeba, *Reticulomyxa*. *Cell Mot. Cytoskel.* **6** 521-533
- Koonce, M. P., Schliwa, M. (1986): Directionality of Organelle Movements in *Reticulomyxa* may be Mediated by Phosphorylation. *J. Cell Biol.* **3** 275-
- Koonce, M. P., Schliwa, M. (1986): Reactivation of Organelle Movements along the Cytoskeletal Framework of a Freshwater Amoeba. *J. Cell Biol.* **103** 605-612

- Koonce, M. P., Tong, J., Euteneuer, U., Schliwa, M. (1987): Active Sliding between Microtubules. *Nature* **328** 737-739
- L'Hernault, S.W., Rosenbaum, J.L. (1983): Chlamydomonas Alpha-Tubulin is Posttranslationally Modified in the Flagella during Flagellar Assembly. *J. Cell Biol.* **97** 258-263
- Letierrier, J. F., Linden, M., Nelson, B. D. (1990): How do Microtubules Interact in Vitro with Purified Subcellular Organelles? *Biochem. J.* **269** 556- 558
- Levine, N. D., Corliss, I. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J. (1980): A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* **27** 37-58
- Lim, S. S., Edson, K. J., Letourneau, P. C., Borisy, G. G. (1990): A Test of Microtubule Translocation during Neurite Elongation. *J. Cell Biol.* **111** 123-131
- Lindenblatt, J. (1988): Ultrastrukturelle und immunologische Untersuchungen des Cytoskeletts von *Reticulomyxa filosa*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum .
- Liotti, F. S., Menghini, A. R., Guerrieri, P., Bianchi, R. (1989): Effects of Dimethylsulfoxide on Fried Erythroleukemic Cell Proliferation and on the Activity of Enzymes Involved in This Process. *Int. J. Cancer* **43** 1145-1148
- Luduena, R. F. (1979) in: *Microtubules* (Roberts, K., Hyams, S., eds.) Academic Press, London, 65 - 117
- Lye, R. J., Porter, M. E., Scholey, J. M., McIntosh, J. R. (1987): Identification of a Microtubule-Based Cytoplasmic Motor in the Nematode *Coenorhabditis Elegans*. *Cell* **51** 309-318
- Maekawa, T., Ogihara, S., Murofushi, H., Nagai, R. (1990): Green Algal Microtubule-Associated Protein with a Molecular Weight of 90 kDa which Bundles Microtubules. *Protoplasma* **158** 10-18
- Malik, F., Vale, R. (1990): A New Direction for Kinesin. *Nature* **347** 713-714
- Mandelkow, E. M., Schulthesis, R., Rapp, R., Muller, M., Mandelkow, M. (1986): On the Surface Lattice of Microtubules: Helix Starts, Protofilament Number, Seam, and Handedness. *J. Cell Biol.* **102** 1067-1073
- Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Hotani, H., Hess, B., Müller, S.C. (1989): Spatial Patterns from Oscillating Microtubules. *Science* **246** 1291-1293
- Martin, S., Bayley, P. M., Schilstra, M. (1989): A Lateral Cap Model of Microtubule Dynamic Instability. *FEBS Letters* **259** 181-185
- Martin, C. R., Vancýke, L. S., Cai, Z. H., Liang, W. B. (1990): Template Synthesis of Organic Microtubules. *J. Amer. Chem. Soc.* **112** 8976-8976
- Martin, S. R., Schilstra, M. J., Bayley, P. M. (1991): Opposite-End Behaviour of Dynamic Microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* **1073** 555-561

- Martinez, R., Gillies, R. J. (1989): Dimethylsulfoxide Modifies the Sensitivity of BALB/C-3T3 Cells to the Activation of Na⁺ / H⁺ Exchange by Phorbol Esters. *J. Cell. Phys.* **139** 131-135
- Maruta, H., Greer, K., Rosenbaum, J. L. (1986): The Acetylation of Alpha-Tubulin and its Relationship to the Assembly and Disassembly of Microtubules. *J. Cell Biol.* **103** 571-579
- Marya, P. K., Fraylich, P. E., Flood, C. R., Rao, R., Eagles, P. A. (1991): Studies Using a Fluorescent Analogue of Kinesin. *J. Cell. Sci.* **14** 139-142
- McDonald, H. B., Stewart, R. J., Goldstein, L. S. (1990): The Kinesin-Like *ncd* Protein of *Drosophila* is a Minus End- Directed Microtubule Motor. *Cell* **63** 1159-1166
- McIntosh, J. R., Porter, M. E. (1989): Enzymes for Microtubule-Dependent Motility. *J. Biol. Chem.* **264** 6001-6004
- Menzel, D., Elsner-Menzel, C. (1990): The Microtubule Cytoskeleton in Developing Cysts of the Green Alga *Acetabularia* - Involvement in Cell Wall Differentiation. *Protoplasma* **157** 52-63
- Mitchison, T., Kirschner, M. (1984): Microtubule Assembly Nucleated by Isolated Centrosomes. *Nature* **312** 232-237
- Mitchison, T. J. (1987): Good Things from Slime. *Nature* **328** 665
- Murphey, D. B. (1988): Tubulin Subunits Sorting: Analysis of the Mechanisms Involved in the Segregation of Unique Tubulin Isoforms within Microtubule Copolymers. *Protoplasma* **145** 176-181
- Nevalainen, L. T., Makarow, M. (1989): Post-Translational Modifications in Mitotic Yeast Cells. *Eur. J. Biochem.* **184** 165-172
- Nuss, R. N. (1949): *Reticulomyxa filosa* gen. et sp. nov., a New Primitive Plasmodium. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **76** 161-173
- Obar, R. A., Collins, C. A., Hammarback, J. A., Shpetner, H. S., (1990): Molecular Cloning of the Microtubule-Associated Mechanochemical Enzyme Dynamin Reveals Homology with a New Family of GTP-Binding Proteins. *Nature* **347** 256-260
- Obar, R. A., Shpetner, H. S., Vallee, R. B. (1991): Dynamin a Microtubule-Associated GTP-Binding Protein. *J. Cell Sci.* **14** 143-146
- Oka, M. T., Arai, T., Hamaguchi, Y. (1990): Heterogeneity of Microtubules in Dividing Sea Urchin Eggs Revealed by Immunofluorescence Microscopy: Spindle Microtubules are Composed of Tubulin Isoforms Different From Those of Astral Microtubules. *Cell Motility Cytoskel.* **16** 239-251
- Ortland, C. (1990): Untersuchungen zum elektronenmikroskopischen Calciumnachweis mit Arsenazo III an Muskelzellen von *Branchiostoma lanceolatum*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

- Pal, M., Roychaudhury, A., Pal, A., Biswas, S. (1990): A Novel Tubulin from *Mimosa Pudica* - Purification and Characterization. *Eur. J. Biochem.* **192** 329-335
- Patterson, D. J. (1980): Contractile Vacuoles and Associated Structures: Their Organization and Function. *Biol. Rev.* **55** 1-46
- Pennart, de, H., Houlston, E., Maro, B. (1988): Post-translational Modifications of Tubulin and the Dynamics of Microtubules in Mouse Oocytes and Zygotes. *Biology of the Cell* **64** 375-378
- Penque, D., Galego, L., Rodriguespousada, C. (1991): Multiple Alpha-Tubulin Isoforms in Cilia and Cytoskeleton of *Tetrahymena Pyriformis* Generated by Post-Translational Modifications - Studies During Reciliation. *Eur. J. Biochem.* **195** 487-494
- Piperno, G., Fuller, M. T. (1985): Monoclonal Antibodies Specific for an Acetylated Form of Alpha-Tubulin Recognize the Antigens in Cilia and Flagella from a Variety of Organisms. *J. Cell Biol.* **101** 2085-2094
- Ramulu, K. S., Verhoeven, H. A., Dijkhuis, P. (1991): Mitotic Blocking, Micronucleation, and Chromosome Doubling by Oryzalin, Amiprophos-Methyl, and Colchicine in Potato. *Protoplasma* **160** 65-72
- Raybin, D., Flavin, M. (1977): Modification of Tubulin by Tyrosylation in Cells and Extracts and its Effect on Assembly in Vitro. *J. Cell Biol.* **73** 4 92-504
- Rendon, A., Jungk, D., Jancsik, V. (1990): Interaction of Microtubules and Microtubule-Associated Proteins (MAPS) with Rat Brain Mitochondria. *Biochem. J.* **269** 555-559
- Robert, C., Bouchiba, M., Robert, R., Margolis, R. L., Job, D. (1990): Self Organization of the Microtubule Network. A Diffusion Based Model. *Biology of the Cell* **68** 177-183
- Sale, W. S., Besharse, J. C., Piperno, G. (1988): Distribution of Acetylated Alpha-Tubulin in Retina and in In Vitro- Assembled Microtubules. *Cell Motility Cytoskel.* **9** 243-253
- Salitz, A., Schmitz, K. (1989): Influence of Microfilament and Microtubule Inhibitors Applied by Immersion and Microinjection on Circulation Streaming in the Staminal Hairs of *Tradescantia Blossfeldiana*. *Protoplasma* **153** 37-45
- Sanger, J. W., Sanger, J. M., Kreis, T. E., Jockusch, B. M. (1980): Reversible Translocation of Cytoplasmic Actin into the Nucleus Caused by Dimethyl Sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** 5268-5272
- Sasse, R., Glyn, M. C., Birkett, C. R., Gull, K. (1987): Acetylated Alpha-Tubulin in *Physarum*: Immunological Characterization of the Isotype and its Usage in Particular Microtubular Organelles. *J. Cell Biol.* **104** 41-49
- Sasse, R., Gull, K. (1988): Tubulin Post-Translational Modifications and the Construction of Microtubular Organelles in *Trypanosoma Brucei*. *J. Cell Sci.* **90** 577-589

- Satir, P. (1988): Dynein as a Microtubule Translocator in Ciliary Motility: Current Studies of Arm Structure and Activity Pattern. *Cell Mot. Cytoskel.* **10** 263-270
- Scaife, R., Margolis, R. L. (1990): Biochemical and Immunochemical Analysis of Rat Brain Dynamin Interaction with Microtubules and Organelles *In Vivo* and *In Vitro*. *J. Cell Biol.* **111** 3023-3034
- Schang, S., Flavin, M. (1988): Tubulin Tyrosination in Crithidia: Modifying Enzymes and Modification States of Tubulin. *Cell Motility Cytoskel.* **10** 4 00-409
- Schatten, G., Simerly, C., Asal, D. J., Szöke, E., Cooke, P., Schatten (1988): Acetylated Alpha-Tubulin in Microtubules during Mouse Fertilization and Early Development. *Developmental Biol.* **130** 74-86
- Schliwa, M. (1976): The Role of Divalent Cations in the Regulation of Microtubule Assembly. *In Vitro Studies on Microtubules of the Heliozoan Axopodium Using the Ionophore A 23187.* *J. Cell Biol.* **70** 527 - 540
- Schliwa, M., Euteneuer, U., Koonce, M. P. (1987): Identification of a Protein Involved in Microtubule-Dependent Organelle Movements of the Giant Amoeba, *Reticulomyxa*. *Fortschr. d. Zoologie* **34** 157-169
- Schliwa, M., Shimizu, T., Vale, R. D., Euteneuer, U. (1991): Nucleotide Specificities of Anterograde and Retrograde Organelle Transport in *Reticulomyxa* are Indistinguishable. *J. Cell Biol.* **112** 1199-1203
- Scholey, J. M., Porter, M. E., Lye, R. J., McIntosh, J. R. (1989): Cytoplasmic Microtubule-Associated Motors. *The Cell Biology of Fertilization* 13 9-163
- Schröder, H. C., Wehland, J., Weber, K. (1985): Purification of Brain Tubulin-Tyrosine Ligase by Biochemical and Immunological Methods. *J. Cell Biol.* **100** 276-281
- Schroeder, C. C., Fok, A. K., Allen, R. D. (1990): Vesicle Transport Along Microtubular Ribbons and Isolation of Cytoplasmic Dynein from *Paramecium*. *J. Cell Biol.* **111** 2553-2562
- Schulze, E., Kirschner, M. (1986): Microtubule Dynamics in Interphase Cells. *J. Cell Biol.* **102** 1020 - 1031
- Sekizuka, E., Benoit, J. N., Grisham, M. B., Granger, D. N. (1989): Dimethylsulfoxide Prevents Chemoattractant-Induced Leukocyte Adherence. 594-597
- Shigenaka, Y., Tadokoro, Y., Kaneda, M. (1975): Microtubules in Protozoan Cells. I. Effects of Light Metal Ions on the Heliozoan Microtubules and their Kinetic Analysis. *Annot. Zool. Jpn.* **48** 227 - 241
- Shpetner, H. S., Vallee, R. B. (1989): Identification of Dynamin, a Novel Mechanochemical Enzyme that Mediates Interactions between Microtubules. *Cell* **59** 421-432

- Simon, J. R., Salmon, E. D. (1990): The Structure of Microtubule Ends During the Elongation and Shortening Phases of Dynamic Instability Examined by Negative-Stain Electron Microscopy. *J. Cell Sci.* **96** 571-582
- Stebbing, H., Hunt, C., Anastasi, A. (1991): MAPS and Motors in Insect Ovaries. *J. Cell. Sci.* **14** 151-156
- Sugrue, P., Avolio, J., Satir, P., Holwill, M. E. (1991): Computer Modelling of Tetrahymena Axonemes at Macromolecular Resolution - Interpretation of Electron Micrographs. *J. Cell. Sci.* **98** 5-16
- Takanari, H., Yosida, T., Morita, J., Izutsu, K., Ito, T. (1990): Instability of Pleomorphic Tubulin Paracrystals Artificially Induced by Vinca Alkaloids in Tissue-Cultured Cells. *Biology of the Cell* **70** 83-90
- Travis, J. L., Allen, R. D. (1981): Studies on Motility of the Foraminifera. 1. Ultrastructure of the Reticulopodial Network of *Allogromia laticollaris* (Arnold). *J. Cell Biol.* **90** 211-221
- Travis, J. L., Kenealy, J. F. X., Allen, R. D. (1983): Studies on the Motility of the Foraminifera II The Dynamic Microtubular Cytoskeleton of the Reticulopodial Network of *Allogromia laticollaris*. *J. Cell Biol.* **97** 1668-1676
- Travis, J. L., Bowser, S. S. (1988): Optimal Approaches to the Study of Foraminiferan Motility. *Cell Motil. Cytoskel.* **10** 126-136
- Unger, E., Bohm, K.J., Vater, W. (1990): Structural Diversity and Dynamics of Microtubules and Polymorphic Tubulin Assemblies. *Electron Microscopy Rev.* **3** 355-
- Vale, R. D., Reese, T. S., Sheetz, M. P. (1985): Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility. *Cell* **42** 39-50
- Vale, R. D., Scholey, J. M., Sheetz, M. P. (1986): Kinesin: Possible Biological Roles for a New Microtubule Motor. *TIBS* **11** 464-468
- Vallee, R. B., Shpetner, H. S. (1990): Motor Proteins of Cytoplasmic Microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* **59** 909-932
- Vater, W., Bohm, K. J., Steinmetz, P., Unger, E. (1991): Determination of the Protofilament Number in Microtubules by Templates. *Acta Histochem.* **39** 3 47-356
- Walker, R. A., Inoue, S., Salmon, E. D. (1989): Asymmetric Behaviour of Severed Microtubule Ends After Ultraviolet-Microbeam Irradiation of Individual Microtubules in Vitro. *J. Cell Biol.* **108** 931 - 937
- Wade, R. D., Chretien, D. (1990): Characterization of Microtubule Protofilament Numbers How does the Surface Lattice Accomodate? *J. Mol. Biol.* **212** 7 75-786
- Wandosell, F., Serrano, L., Avila, J. (1987): Phosphorylation of Alpha-Tubulin Carboxyl-terminal Tyrosine Prevents its Incorporation into Microtubules. *J. Biol. Chem.* **262** 8268-8273

- Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C., Borisy, G. G. (1987): Assembly and Turnover of Detyrosinated Tubulin in Vivo. *J. Cell Biol.* **105** 2 65-276
- Webster, D.R., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C., Borisy, G.G. (1987): Differential Turnover of Tyrosinated and Detyrosinated Microtubules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84** 9040-9044
- Wehland, J., Willingham, MC (1983): A Rat Monoclonal Antibody Reacting Specifically with the Tyrosinated Form of Alpha-Tubulin. II. Effects on Cell Movement, Organization of Microtubules, and Intermediate Filaments, and Arrangement of Golgi Elements. *J. Cell Biol.* **97** 1474-1490
- Wehland, J., Willingham, M. C., Sandoval, I. V. (1983): A Rat Monoclonal Antibody Reacting Specifically with the Tyrosylated Form of Alpha-Tubulin. I. Biochemical Characterization, Effects on Microtubule Polymerization In Vitro, and Microtubule Polymerization and Organization In Vivo. *J. Cell Biol.* **97** 1467-1475
- Wehland, J., Schröder, H. C., Weber, K. (1984): Amino Acid Sequence Requirements in the Epitope Recognized by the Alpha-Tubulin-Specific Rat Monoclonal Antibody YL 1/2. *EMBO J.* **3** 1295-1300
- Wehland, J. Weber, K. (1987): Turnover of the Carboxyl-Terminal Tyrosine of Alpha-Tubulin and Means of Reaching Elevated Levels of Detyrosination in Living Cells. *J. Cell Sci.* **88** 185-203
- Wilson, P. J., Forer, A. (1989): Acetylated Alpha-Tubulin in Spermatogenic Cells of the Crane Fly *Nephrotoma suturalis*: Kinetochore Microtubules are Selectively Acetylated. *Cell Motility Cytoskel.* **14** 237-250
- Zylberberg, L., Bereiterhahn, J. (1991): The Distribution of Tyr-Microtubules and Glu-Microtubules during Fish Scale Regeneration. *Eur. J. Cell Biol.* **54** 132-139