



UPPSALA
UNIVERSITET

Dictyostelium discoideum

på makro- och mikronivå

Magnus Andreasson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Slemsvampar är märkliga organismer som lever både encelligt och multicellulärt. Den mest kända arten är modellorganismen *Dictyostelium discoideum*. Denna art av slemsvamp lever främst som en amöba men även i skepnaden av en snigel när en koloni av arten migrerar till en mer gynnsam miljö och slutligen som en svamps fruktkropp som används till spridning med hjälp av sporer. Syftet med uppsatsen och undersökningen är att studera hur olika mekanismer fungerar i olika stadier av slemsvampens livscykel på cell- och molekylnivå. Av dessa mekanismer studeras främst signalering mellan celler och celldifferentiering. Som amöba förökar sig cellen genom delning eller i vissa fall i en sexuell cykel där två celler smälter samman till en diploid zygot som livnär sig genom kannibalism. När slemsvamparna svälter måste de migrera till en ny miljö med hjälp av ett fasbyte till snigelformen. Som en signal att cellerna ska gå samman till sin snigelliknande skepnad och därmed påbörja migrationen utsöndrar de signalsubstansen cykliskt adenin-3-5-monofosfat (cAMP). Samlingsprocessen kallas aggregering och cAMP används till att signalera till varandra att det är dags att aggregera för att därefter migrera. Signalsubstansen tas upp genom en positiv feedback där slemsvampen stimuleras att producera mer cAMP för att signalera vidare. Produktionen är resultatet av en kaskad av reaktioner som sker som en direkt följd av stimuli. I snigelfasen differentierar cellerna till skaft- och sporceller vilka spelar en viktig roll i svampfasen. Differentieringen beror på vilken av faserna i cellcykeln amöban befinner sig i under aggregeringen. Som namnet antyder bildar skaftcellerna ett skaft för att höja sporkapseln ovan marken för att skydda de dyrbara sporer från predatorer och samtidigt förbättra möjligheten till spridning. Skaftcellerna dör efter bildandet av skaftet medan sporcellerna som utgör 80 % av populationen, kan spridas vidare. I olika delar av slemsvampens liv måste den tampas med både predatorer och parasiter, bland annat nematoder, mutanter och andra arter av slemsvampar. I celldifferentieringen finns det en viss risk för att cheaters uppstår. Dessa är mutanter som alltid bildar sporceller men inte skaftceller och därmed aldrig gynnar kolonin av slemsvampar. När *D. discoideum*:s genom för första gången sekvenserades öppnades nya dörrar för framtida forskning kring denna slemsvamp. Med hjälp av kunskapen om hur artens hela genom ser ut är det möjligt att studera hur pass besläktad *D. discoideum* är med människor och andra livsformer. Detta kan i sin tur användas inom forskning av exempelvis genetiskt relaterade sjukdomar. Vid studier av pseudopoder och patogener används *D. discoideum* flitigt. I diskussionen presenteras hypoteser som ställts innan skrivningsprocessen påbörjades. Trots att majoriteten av hypoteserna visade sig vara felaktiga utgjorde dessa ändå en stor del i formuleringen av frågeställningen. Diskussionen behandlar även *D. discoideum*:s potentiella egenskaper inom forskning samt jämför likheterna mellan denna organism och människoceller. Organismens evolutionära ursprung och potentiella utveckling behandlas också. Artens genetiska likheter med djur och svampar gör att den med tiden mest sannolikt kommer att utvecklas till något av dessa två riken. Organismens ljuskänsliga förmåga diskuteras och ett experiment för att studera en kolonis förmåga att navigera efter ljus presenteras.

Inledning

Bakgrund och syfte

Slemsvampen *Dictyostelium discoideum* är egentligen inte alls en svamp trots att namnet kanske antyder detta. I själva verket är det en sorts amöba som har både encellig och flercellig livscykel. Denna amöba lever vanligtvis i jorden i sitt encelliga stadium och livnär sig på bakterier. Om det börjar råda ogynnsamma förhållanden för *D. discoideum*, främst om födan

tar slut, kommer organismen utsöndra signalsubstanser (Bonner, 1959) i form av cykliskt adenin-3-5-monofosfat (cAMP) (Dao *et al.*, 2000). Detta gör att individer i närheten som är av samma art söker sig mot signalsubstansen och går samman till en multicellulär skepnad av en snigel för att enklare kunna förflytta sig. Snigelskepnaden kan därefter omvandlas till en svampliknande struktur som bildar sporer för att sprida populationen (Bonner, 1959).

D. discoideum används som en modellorganism och har fördelaktiga egenskaper för cancerforskning och studier om det humana immunförsvaret (Müller-Taubenbergera *et al.*, 2012) samt studier av vissa patogener och fagocytos (Hasselbring *et al.*, 2011). Artens fylogeni är också av intresse då det är en eukaryot livsform vars celler påminner om både djur- och svampceller (Eichinger *et al.*, 2005; Williams, 2010).

Syftet med den här rapporten är att studera hur *D. discoideum* fungerar i olika delar av dess livscykel samt hur övergångarna till snigel- och svampfas faktiskt går till. Uppsatsen fokuserar på processer både på makronivå (cellnivå) och mikronivå (biokemisk nivå). Hur celler kommunicerar med varandra på dessa båda nivåer och vad som avgör hur celldifferentieringen i snigelfasen skall gå till samt hur arten förhåller sig till mutanter och andra arter/organismer är också något som studeras. Min primära frågeställning i uppsatsen är hur signaleringen fungerar inom och mellan celler av *D. discoideum*. Fokus har dessutom legat på vilka viktiga steg och processer i organismens livscykel som regleras av signalering och inte. Dessutom hur arten kan användas inom forskning.

Vid arbetets start ställde jag fyra övergripande hypoteser. Under skrivandets gång har fokus legat på att besvara dessa. Hypoteserna följer nedan.

1. ”*D. discoideum* blir sporceller respektive skaftceller genom påverkan från andra celler”
2. ”*D. discoideum* kan återgå till amöbafas från snigelfas”
3. ”Cheaters kan inte kulminera själva.”
4. ”En signalsubstans skickas genom snigeln för att signalera för kulminering”

Amöbafas

Slemsvampen *D. discoideum* lever självständigt som amöba i jorden och livnär sig på bakterier och reproducerar sig vanligtvis med celldelning (Bonner 1959). I cellcykeln har amöban ingen tydlig G₁-fas och befinner sig därför oftast i G₂ då denna fas utgör majoriteten av tiden i delningen (Jang *et al.* 2011). G₁-fasen är en initierande fas i cellcykeln där cellen förbereder sig för att gå in i S-fasen där den syntetiserar nytt DNA. G₂-fasen är istället en sorts kontrollfas som avgör om cellen är redo för att genomgå mitos. På något sätt kan alltså *D. discoideum* initiera S-fasen utan en G₁-fas.

Amöban förflyttar sig i ett sicksackmönster genom att forma pseudopoder. Varför cellerna rör sig just efter detta mönster är ännu inte känt. (Cooper *et al.*, 2012). Pseudopoder är ett vanligt sätt för amöbor att förflytta sig på och är en utsträckning av cellmembranet som skulle kunna jämföras med en arm med vilken cellen kan dra sig framåt mot sitt mål.

Sexuell cykel

En lite mindre uppmärksam del i *D. discoideum*:s liv är att den precis som de allra flesta eukaryoter kan fortplanta sig sexuellt. Amöban är vanligtvis haploid och har tre olika mating

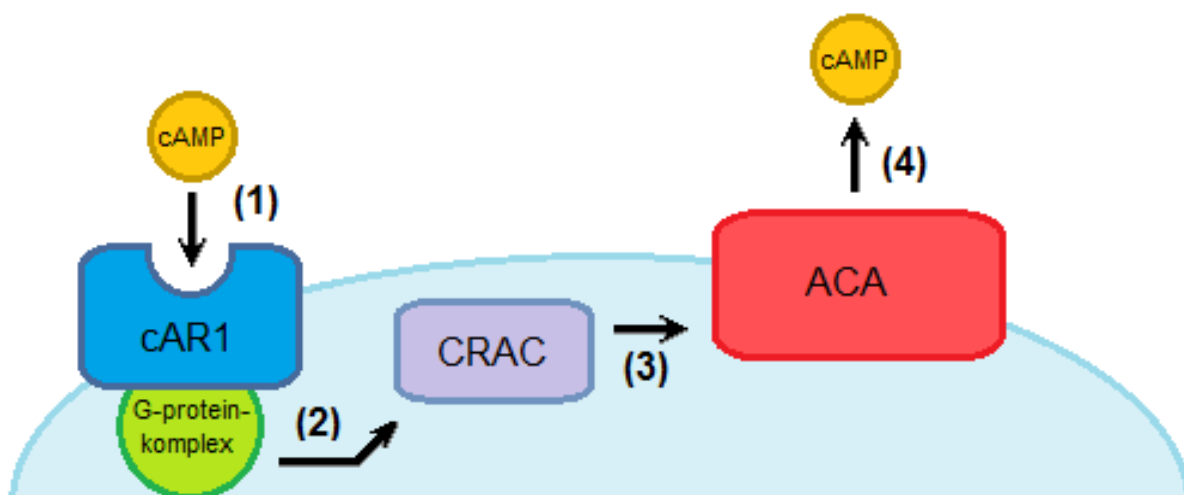
types (kön). Den sexuella cykeln induceras av brist på föda och börjar med att två individer av olika mating types smälter samman och bildar en diploid zygot. Denna utsöndrar cAMP för att locka till sig närlevande slemsvampar av samma art. De utomstående cellerna bildar ett cellulosskall runt zygoten och äts därefter upp av den. Zygoten utvecklas sedan till en så kallad makrocysta där nya haploida celler produceras. Dessa nyligen bildade celler äter sig till sist igenom cellulossaväggen för att leva som frilevande individer (Bloomfield *et al.*, 2010). Varför *D. discoideum* har en sexuell cykel är idag inte känt. Makrocystorna är svåra att återskapa *in vitro* då slemsvamparna av någon anledning oftast ger upphov till snigel- och svampfas under laborativa förhållanden (Flowers *et al.*, 2010).

Aggregering

Om det råder dåliga förhållanden för *D. discoideum*, det vill säga att maten tagit slut, kommer dessa att behöva migrera till en mer gynnsam (näringsrik) miljö för att sedan kunna sprida sig där. Under dessa omständigheter aggregerar individerna, det vill säga att de går samman och bildar en multicellulär kropp (Bonner, 1959). Efter ungefär fyra timmars svält börjar individerna i populationen utsöndra cAMP för att sammankalla alla slemsvampar som finns i omgivningen och därefter aggregera. Efter ytterligare sex timmar kan upp till 10^5 celler ha aggregerat för att migrera (Bonner, 1959; Parent och Devreotes, 1996).

Signalering

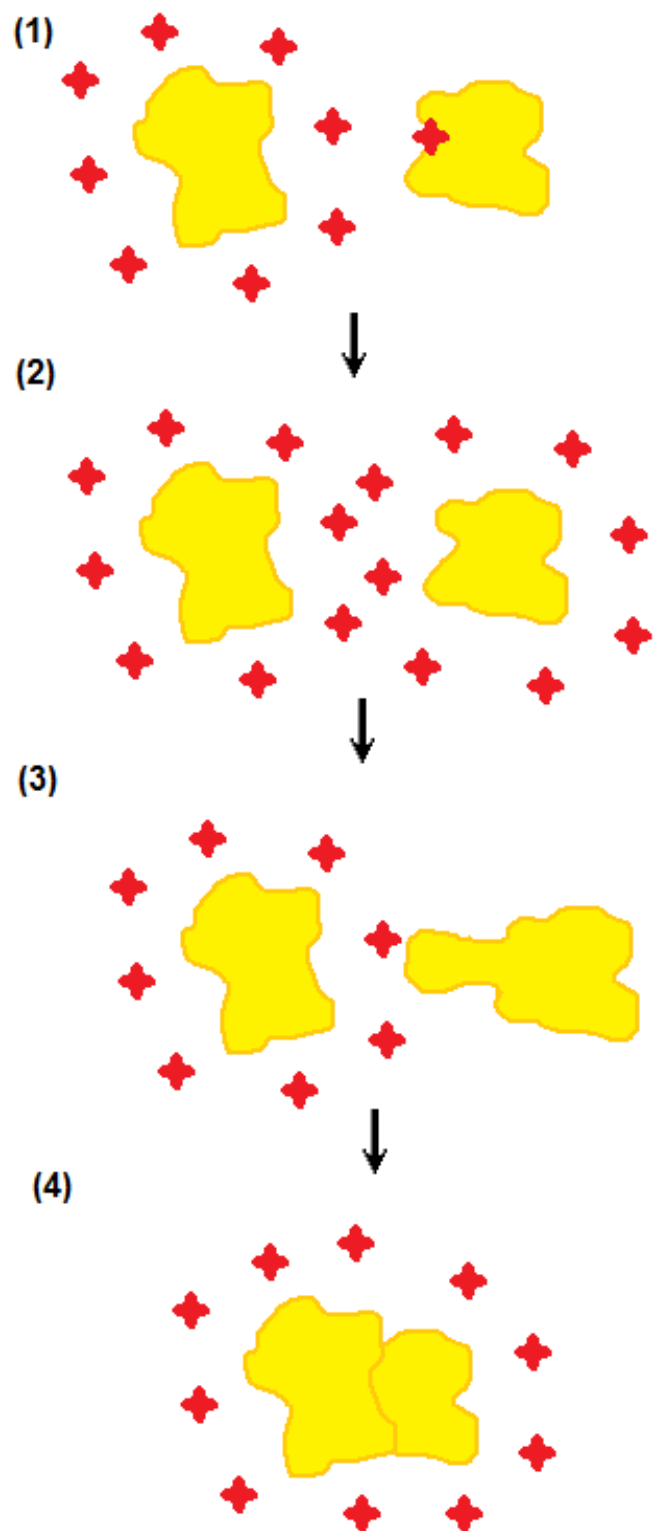
Vid svält utsöndrar *D. discoideum* ett protein som kallas PDI. Molekylen är en inhibitor till proteinet fosfodiesteras (PDE) vars funktion är att bryta ned cAMP. När PDE inhiberas ökar halterna av cAMP eftersom att nedbrytningen minskar. Amöban kommer då utsöndra en puls av cAMP i ett cirkulärt mönster omkring sig (Pålsson *et al.*, 1997). Andra individer i närheten uppfattar denna puls genom en kaskadeffekt enligt följande. cAMP binder till receptorn cAR1 (Sakurai *et al.*, 2012) som aktiverar ett tillhörande G-proteinkomplex. En subenhet av detta G-proteinkomplex aktiverar i sin tur proteinet CRAC (cytosol regulator of adenylyl cyclase) som aktiverar adenylylcyclas (ACA) (Chen *et al.*, 2005), som sin tur producerar mer cAMP (Sakurai *et al.*, 2012) (se figur 1).



Figur 1. En schematisk illustration av signaleringsprocessen vid aggregering hos *D. discoideum*. (1) cAMP binder till receptorn cAR1. (2) cAR1 aktiverar G-proteinkomplexet som i sin tur aktiverar CRAC. (3) CRAC aktiverar ACA (4) ACA producerar och utsöndrar nytt cAMP som i sin tur signalerar till andra individer. Illustrerad av författaren. Baserad på fakta från Pålsson *et al.*, (1997); Sakurai *et al.*, (2012).

Utsöndringen av cAMP reglerar genom denna kaskadeffekt därmed produktionen av samma ämne och fungerar alltså som en positiv feedback. Detta cAMP produceras i pulser med sex minuters mellanrum. Intervallen regleras av PDE som bryter ner signalsubstansen (Parent och Devreotes, 1996).

Utöver att cellerna börjar producera och utsöndra signalerande cAMP kommer de också att kemotaxiskt förflytta sig mot de förhöjda koncentrationerna av det utsöndrade ämnet (Pålsson *et al.*, 1997). Kemotaxis är ett vanligt sätt för encelliga organismer att förflytta sig på. Hos exempelvis en bakterie är kemotaxis kopplat till dess flagell som kommer rotera åt olika håll beroende på vilken stimuli bakterien utsätts för. För att kemotaxis mot den förhöjda gradienten av cAMP i detta fall skall fungera krävs assistans från glykoproteinet CMF (conditioned medium factor). CMF syntetiseras i cellen och utsöndras bara vid svält. Utan detta protein kan inte G-proteinkomplexet i cAR1 aktiveras. CMF verkar som en quorum sensing-mekanism (en funktion som gör att cellerna kan känna av varandra med hjälp av kemiska signaler) mellan svältande celler då det bara är dessa som utsöndrar proteinet (Chen *et al.*, 2005). För att förflytta sig mot de förhöjda halterna av cAMP använder *D. discoideum* sig av pseudopoder. När slemsvampen känt av gradienten av signalsubstansen kommer en pseudopod bildas mot de högre halterna av cAMP vilket gör att amöban kan röra sig mot denna förhöjda koncentration (Driscoll *et al.*, 2012). Man kan dra slutsatsen att alla individer i närheten som lyckats uppfatta signalen kommer att samlas på en och samma plats då alla kommer förflytta sig mot de förhöjda koncentrationerna av cAMP, alltså mot varandra (se figur 2).



Figur 2. Illustrering av signalering under aggregering på makronivå. (1) Cellen till vänster svälter och utsöndrar en puls av cAMP som cellen till höger uppfattar. (2) Cellen till höger utsöndrar själv en puls av cAMP. (3) Samma cell till höger rör sig kemotaxiskt mot den högre koncentrationen av cAMP med hjälp av pseudopoder. (4) Cellerna har aggregerat och fortsätter utsöndra cAMP. Illustrerad av författaren. Baserad på fakta från Bonner, (1959); Driscoll *et al.*, (2012); Pålsson *et al.*, (1997).

Cellsammansättning

Efter aggregeringen bildar amöborna ett gemensamt slemlager bestående av cellulosa och protein. Detta lager omger samlingen av celler och ser till att ingen cell varken kan ta sig in eller ut. Därigenom kan kolonin dessutom bibehålla den nyligen bildade snigelformen (Grant *et al.*, 1983). Slemlagret utgör också skydd mot predatorer, exempelvis nematoder (Kessin, 2001) (detta tas upp senare i uppsatsen under rubriken Fiender och hot). När cellerna väl etablerat snigelskepnaden delas de tydligt in i en främre och bakre del (Bonner, 1959). De slemsvampar som hamnar i den främre delen är individer som påbörjade aggregeringen (uppfattade cAMP-signaleringen) när de befann sig i ett tidigt stadium i cellcykeln, alternativt levt i glukosfattiga miljöer.

Hur respektive cell hittar vilken del av snigeln den skall vara i är ännu inte helt känt. Även detta verkar dock vara reglerat av kemotaxis mot cAMP precis som aggregeringen. Indelningen kan bero på att vissa celler attraheras mer av cAMP eller att celler i den främre och bakre delen har olika rörelseförmågor när de befinner sig inne i snigeln. Varför de båda skulle ha olika förmågor till rörlighet kan bero på skillnader i cellernas cytoskelett som utvecklas i snigeln alternativt på sammanlänknings mellan celler. Den kan alltså tänkas att cellerna i bakre delen av snigeln ”håller fast” varandra till skillnad från de som hamnar i den främre delen (Dormann *et al.*, 1998). Bonner studerade enskilda cellers förmåga att flytta sig inom snigelfasen. Genom att märka den främre delen med ett rött färgämne och därefter placera dess celler i fel ände av snigeln kunde han studera hur de rörde sig tillbaka till sin ursprungliga position (Bonner, 1959).

Snigelfas

I snigelfasen migrerar populationen av slemsvampar och letar efter en mer gynnsam miljö, det vill säga en miljö med bakterier som kolonin kan livnära sig på, detta för att kunna genomgå kulminering och sprida sig. En koloni av slemsvampar som befinner sig i snigelfasen är mellan 0,1 och 2 centimeter lång. Dessa lämnar precis som en riktig snigel ett slemspår efter sig (Bonner, 1959). Slemspåret utgörs av det skyddande slemlagret som omger cellerna vilket innebär att cellerna hela tiden måste producera nytt slem (Grant *et al.*, 1983). Snigeln söker sig mot ljus och värme och reagerar mycket starkt på dessa. Bonner visade i ett experiment att slemsvampar i snigelfasen kan navigera mot en klocka med självlysande visare om rummet i övrigt är helt mörkt vilket alltså innebär att de har en förvånansvärt utvecklad förmåga att navigera efter ljus (Bonner, 1959).

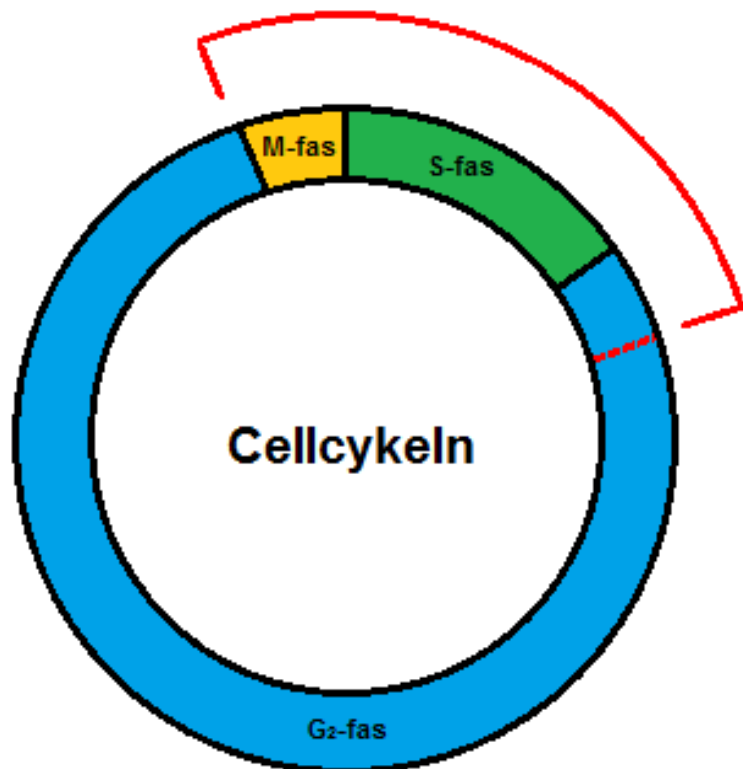
Cellerna som utgör snigelskepnaden förflyttar sig inom kroppen. De skafbildande cellerna rör sig i ett roterande mönster till skillnad från de sporbildande cellerna som endast rör sig i en rak linje i den riktning som snigeln rör sig. Anledningen till varför cellerna rör sig på just detta sätt är ännu inte helt känt (Dormann *et al.*, 1998).

Celltyper

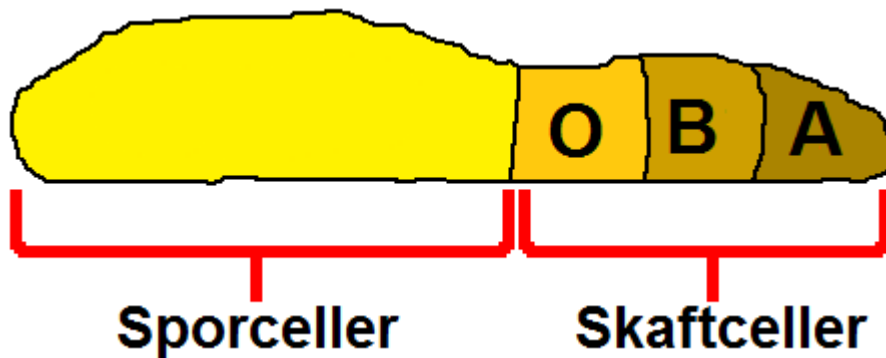
Som ovan nämns delas snigeln in i en främre och en bakre del baserat på vilket stadium i cellcykeln cellerna befinner sig vid aggregering. Indelningen ger upphov till celldifferentiering, vilket är viktigt då är det detta som avgör huruvida cellerna skall utvecklas till att bilda skaft eller sporer (Devreotes, 1989) De celler som befann sig i M-, S- eller tidiga G₂-fasen (och därmed hamnade i den främre delen av snigeln) utvecklas till att bilda skaftet under kulmineringen (dessa celler kallas i fortsättningen för skaftceller). Till skillnad från dessa kommer de som befann sig i sena och mellan-G₂-fasen utvecklas till att bilda sporer (dessa kallas i fortsättningen för sporceller) (Jang *et al.* 2011) (se figur 3).

Skaftcellerna dör vid kulmineringen men utgör bara 20 % av den totala populationen vilket får till följd att 80 % av populationen kan föröka sig (Dao *et al.*, 2000). Skaftcellerna differentierar dessutom ytterligare till A-celler som bildar den apikala (övre) delen av skaftet och O-celler som bildar den undre (Singleton *et al.*, 2006). Utöver dessa två finns det även skaftbildande B-celler vars funktion inte är riktigt lika känd. De olika skaftcellerna lokaliseras i olika delar av den främre änden av snigeln. A-celler håller sig till den allra främsta delen, O-celler finns vid avgränsningen mellan spor- och skaftceller och B-celler befinner sig mellan A och O (Dormann *et al.*, 1998) (se Figur 4).

Förutom vilket stadium i cellcykeln individerna befinner sig i (eller vilken glukoshalt de levt i före aggregeringen) spelar även vissa morfogena ämnen in vid differentieringen av skaftcellerna. Dessa är adenosin, ammoniak och DIF (differentiation inducing factor) (Parent & Devreotes, 1996). DIF aktiverar transkriptionen av *emcA*-genen som uttrycks i A- och O-celler (Yamadana *et al.*, 2010). Halten av cAMP är dessutom viktig då de olika celltyperna reagerar annorlunda jämfört med varandra på olika koncentrationer. Sporceller behöver cAMP vid induceringen av sporbildningen, A-celler kräver höga koncentrationer av cAMP för att kunna uttrycka genen *emcA* samtidigt som B-cellers specifika gen *emcB* inhiberas av cAMP (Dormann *et al.*, 1998).



Figur 3. Den röda klammern visar vilka delar av cellcykeln som ger upphov till sporceller. Den del som inte är markerad resulterar i sporceller. Notera att den röda klammern markerar ungefär 20 % av cellcykeln. Illustrerad av författaren. Baserad på fakta från Devreotes, (1989); Jang *et al.* (2011); Dao *et al.*, (2000).



Figur 4. Differentiering av celler i snigelfasen. Den främre (högra) delen innehåller tre sorters skaftceller (A, B och O) och den bakre (vänstra) innehåller sporceller. Illustrerad av Magnus Andreasson. Baserad på fakta från Devreotes, (1989); Bonner, (1959); Jang *et al.*, (2011); Singleton *et al.*, (2006); Dormann *et al.*, (1998).

Kulminering

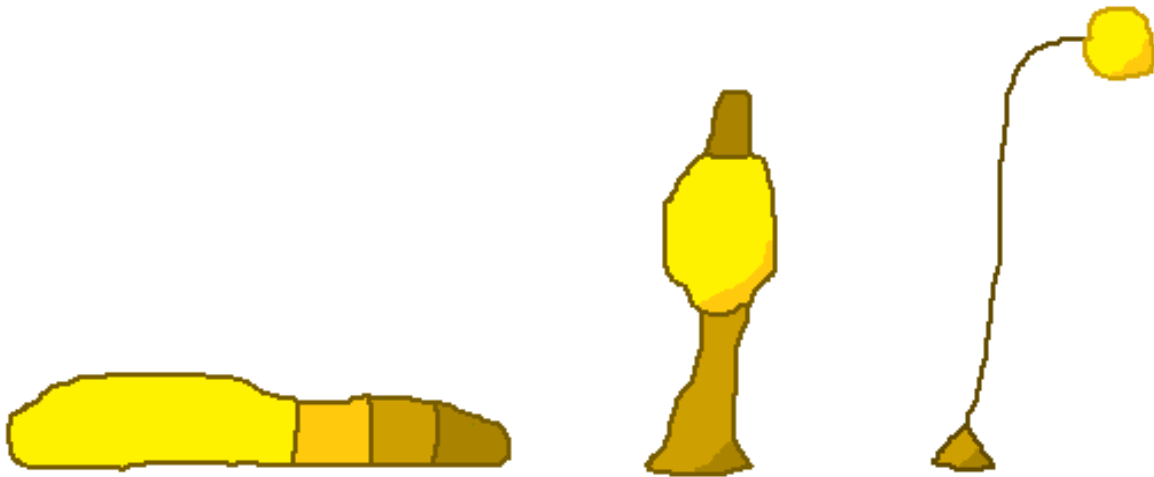
Kulminering innebär att slemsvamparna övergår från snigelfas till svampfas (Bonner, 1959). Vid induceringen av kulmineringen är det de främre cellerna, alltså de skaftbildande, i snigeln som avgör om miljön är passande för kulminering. En miljö som är fattig på ammoniak är en bra spridningsplats medan höga halter av ammoniak gör att snigeln kryper vidare för att hitta en bättre omgivning (Singleton *et al.*, 2006). En tänkbar förklaring till varför slemsvamparna kulminerar i miljöer som är fattiga på ammoniak är att de bakterier som de livnär sig på reglerar nivån av detta ämne.

Svampfas

Cellstruktur

När snigeln hittat en miljö lämplig för kulminering upphör migreringen och kolonin övergår från snigelformen till en rundare form (Durstun *et al.*, 1976). Vid bildningen av skaftet omges skaftcellerna av ett cylinderformat cellulosalager och fylls med vatten (Bonner, 1959). Det skyddande slemlagret som omger cellerna i snigelfasen omger även svampen i dess tidiga stadium men syntesen av detta upphör i samband med den färdiga svampen. Skaftet fortsätter därefter att bildas av att fler skaftceller producerar cellulosa och fylls med vatten. Sporcellerna lyfts därefter till toppen av det växande skaftet (Durstun *et al.*, 1976) (se figur 5). Det lite ironiska i skaftbildningen är att de celler som bildar skaftet först söker sig uppåt innan de pressar sig igenom massan av celler för att nå marken. Hela svampen bildas alltså upp och ner (Bonner, 1959).

Skaftcellerna dör vid övergången till det färdiga skaftet och cellulosa skalet i kombination med den ökade mängden vatten i cellerna gör att de kan öka sin volym upp till fem gånger så mycket (Durstun *et al.*, 1976). Även sporcellerna kapslar sedan in sig i ett cellulosa skalet och omvandlas helt till färdiga sporer men dessa dör inte av inkapslingen till skillnad från skaftcellerna. När toppen av svampstrukturen brister (exempelvis med hjälp av ett förbipasserande djur eller spontant) kan sporer spridas med vinden (Bonner, 1959).



Figur 5. En illustration av hur snigelfasen övergår till svampfasen. De klargula delarna symboliserar sporceller och de mörkare områdena markerar skaftcellerna. Skaftet bildas först varpå skaftcellerna lyfter upp sporena till toppen av svampen där de sedan kan spridas. Illustrerad av författaren. Baserad på fakta från Fets *et al.*, (2010); Bonner, (1959).

En spor som ”gror”

Processen bakom att en spor blir en ny slemsvamp består av ett antal olika steg: aktiveringsfas, svällfas och framträdandefas. Först av allt aktiveras sporen till att börja gro och börjar därefter svälla. Till slut framträder en amöba som tar sig igenom det tjocka cellulosaskalet som tidigare omgivit denna. Amöban kan nu leva fritt och bilda en ny klonpopulation (David & Raper, 1966).

Aktiveringsfas

Aktiveringsfasen är tiden från och med att sporen utsätts för de nödvändiga faktorerna som krävs för att den ska kunna gro fram till att den börjar svälla (det blir alltså en sorts lagfas) (David & Raper, 1966). Aktivering av sporen kan induceras av en värmechock (som mest effektiv vid 45°C) eller av hydrofobiska aminosyror (David & Raper, 1966; Cotter, 1973).

Svällfas

I svällfasen sväller knölar på sporen tills hela kroppen har svullnat. Efter ett tag framträder små gryn och vakuoler i cellulosaskalet innan det slutligen spricker. Då spornväggen är förhållandevis tjock kan det tänkas krävas cellulasa (ett enzym som bryter ner cellulosa som spornväggen består av) för att sporen skall kunna öppnas. När svällfasen väl har börjat krävs det inga fler aktiveringsfaktorer för att mognaden av sporen skall fortsätta. Anledningen till att detta kan fungera kan vara att den finns en inre energikälla i sporen. Troligtvis rör det sig om disackariden trehalos som förekommer i jäst och vissa sorters svamp. Enzymet trehalas ökar sin aktivitet vid 45°C vilket föreslår att det kan finnas ett samband mellan detta och den inducerande faktorn värmechock (David & Raper, 1966).

Framträdandefas

I framträdandefasen ”kryper” amöban ut genom det spruckna skalet som orsakades av svällfasen. Amöban är då fullt utvecklad och redo att fortsätta sitt liv i amöbafasen. (David & Raper, 1966; Cotter, 1973). Detta steg avslutar och påbörjar *D. discoideum*s mycket speciella livscykel.

Fiender och hot

Nematoder

Även om *D. discoideum* i amöbafas själv är en predator då den livnär sig på andra organismer via fagocytos, lever slemsvampen inte ett liv utan fiender. Nematoder är ett exempel på en organism som äter *D. discoideum* och dessutom konkurrerar om dess föda, då nematoder också äter bakterier. *D. discoideum* kan dock leva bland nematoder och klara sig då dessa predatorer verkar föredra att äta bakterier framför slemsvampar. *D. discoideum* kan också klara sig undan nematoder genom att utsöndra en substans som avleder dem. Sekretet de utsöndrar skulle kunna vara anledningen till att nematoder föredrar bakterier framför slemsvampar (Kessin, 2001).

När *D. discoideum* aggregerar och övergår till snigelfasen utgör nematoder inte längre något hot, detta tack vare det skyddande slemlagret som då produceras av cellerna. Slemlagret fungerar som en barriär mellan cellerna och omvärden och är ogenomträngligt för nematoder (Kessin, 2001).

I svampfasen är *D. discoideum* höjda över marken och därmed skyddade från nematoder som då inte når upp till dem. Endast en så kallad dauerlarv kan klättra upp längst skaftet och äta fruktkroppens sporer (Kessin, 2001). Dauerlarven är en tidig fas i nematoden *Caenorhabditis elegans* livscykel (Cassada & Russell, 1975). De sporer som äts upp, antingen från svampen eller från marken, kan dock inte brytas ner av nematoder utan passerar oskadade genom predatorns matsmältningssystem. Nematoden fortsätter att förflytta sig samtidigt som den förgäves försöker bryta ner sporerna. Detta gör att nematoderna i själva verket utgör en spridningsmekanism för slemsvamparna då de transporterar sporerna relativt långa avstånd (Kessin, 2001).

Cheaters

Ett problem som kan uppstå mellan de olika celltyperna är mutanter som i kulmineringen alltid utvecklas till sporceller och aldrig till skaftceller oavsett vilken del i cellcykeln de befinner sig i vid aggregering. Sådana mutanter kallas för cheaters. Om dessa skulle bli normen inom populationen skulle det medföra en stor nackdel för slemsvamparna då få eller inga celler skulle kunna bilda skaftet vid kulminering.

På kort sikt kan det verka som att cheaters har en mutation som gynnar den enskilda individen men själva verket höjs inte deras fitness då mutationen kan missgynna cheaters nästa gång de behöver genomgå kulminering. Varje spor som sprids från fruktkroppen ger upphov till en ny population av kloner, så när en cheater bildar en klonpopulation kommer ingen av cellerna i en cheaterpopulation ha förmågan att bilda skaftet vid kulminering och kan därför inte sprida sig vidare. Dessa är alltså beroende av wild-typeceller (icke-mutanter) och kan inte komma att dominera då de inte kan kulminera själva (Dao *et al.*, 2000).

Trots att cheatermutationen kan verka ogynnsam finns det olika typer av cheaters. Den ovan nämnda är det mest klassiska och dessutom det första identifierade exemplet vilket kallas för *chtA*. Ett annat exempel är *chtC* som är en starkare cheater jämfört med *chtA*. Till skillnad från en *chtA*-mutant kan denna cheater manipulera wild-typecellers förmåga att bilda skaftet. *chtC* tar alltså inte bara alltid platsen som sporceller utan lyckas dessutom kontrollera wild-typeceller att inte bilda sporer. *chtC*-genen uttrycks starkast under aggregeringen men i väldigt låg utsträckning in snigel- och svampfasen (Khare *et al.*, 2010). Precis om *chtA* kan dessa cheaters dock inte kulminera själva utan hjälp från wild-typeceller (Dao *et al.*, 2000; Khare *et al.*, 2010).

Dictyostelium caveatum

Något som skulle kunna anses vara steget bortom en cheater är *Dictyostelium caveatum*. Till skillnad från en cheater som är en mutant av *D. discoideum* är detta en helt egen art som kan leva självständigt eller agera som en predator på andra arter av slemsvampar. *D. caveatum* kan aggregera och bilda fullständiga fruktkroppar utan att behöva någon hjälp från andra arter av slemsvampar. När denna däremot bebländar sig med exempelvis *D. discoideum* tar den helt över sporproduktionen i kulmineringen, till och med i låga antal. Deras dominans i svampfasen börjar redan i aggregeringen (Kessin, 2001).

Till skillnad från en cheater som helt enkelt alltid tar platsen som en sporcell (Dao *et al.*, 2000) tar *D. caveatum* över hela kolonin. Om *D. caveatum* aggregerar med exempelvis *D. discoideum* kommer den mest sannolikt agera som en predator. Istället för att samarbeta med *D. discoideum* kommer *D. caveatum* att äta upp den andra arten av slemsvampar. Detta görs genom en form av fagocytos som kallas nibbling som innebär att cellen ”gnager” av små bitar i taget från sitt offer. När cellerna aggregerar börjar *D. caveatum* äta upp andra arter genom fagocytos och tar därefter helt över bildandet av fruktkroppen. En klonpopulation av *D. caveatum* kan därefter till skillnad från en klonpopulation av cheaters kulminera självständigt men även utnyttja andra arter om de korsar deras väg (Kessin, 2001).

Slemsvampar och forskning

Fylogeni

År 2005 blev *D. discoideum*:s genom för första gången kartlagt. Detta genombrott öppnade upp möjligheter att studera organismens släktskap med andra livsformer. Slemsvampar är en speciell undergrupp av amoebozoa och därmed alltså en eukaryot livsform. Man skulle kunna säga att *D. discoideum* befinner sig på gränsen mellan att vara en encellig och flercellig organism och sekvenseringen av artens genom visar att den är ungefär lika mycket släkt med jäst som den är med människor. Sekvenseringen tyder också på att *D. discoideum* verkar ha utvecklat multicelluläritet oberoende av växter och djur. Processen för att uppnå detta kan dock ha varit densamma för växter och djur som för *D. discoideum* då celler måste differentieras för att kunna bilda de olika vävnader som krävs för att kunna etablera sig som multicellulär. Organismens förmåga att syntetisera cellulosa liknar däremot svampars mer än växters eller bakteriers.

Sekvenseringen av *D. discoideum*:s genom gav även en inblick i hur arten liknar människor. *Dictyostelium discoideum* erbjuder en förmåga att kunna studera gemensamma sjukdomsrelaterade gener hos slemsvampar och människor. *D. discoideum* är alltså mycket av ett mellanting av ett flertal organismer vilket gör att den kan passa in i diverse olika studier (Eichinger *et al.*, 2005).

Möjligheter inom medicin

Inom modern biomedicinsk forskning ökar slemsvampars inflytande i nuläget hela tiden, särskilt gällande studier av mänskliga sjukdomar. Exempelvis har de en enastående förmåga att orientera sig kemotaxiskt vilket kan ge ökad förståelse för mänskliga processer som också behöver navigera efter kemotaxis, såsom blodkärlsbildning, nervtillväxt, inflammationsrespons, sårhäkning och metastatisk tillväxt (som ofta har en obalanserad förmåga till kemotaxis). Rörelseförmågan hos *D. discoideum* påminner dessutom om rörelsen hos mänskliga makrofager (vita blodkroppar) liksom den hos tumörceller och kan därför ge en inblick i hur dessa fungerar (Müller-Taubenbergera *et al.*, 2012).

D. discoideum har använts inom forskning som kan komma att vara av betydelse för studier av människans immunförsvar. I ett experiment av Hasselbring analyserades det hur en bakterie kan utveckla resistens mot fagocytos. Fagocytos är sättet som *D. discoideum* äter på och samma process används av människans vita blodkroppar när de bekämpar patogener (exempelvis bakterier). I studien användes bakterien *Burkholderia pseudomallei* som orsakar sjukdomen melioidos. När bakterien utvecklat resistens mot fagocytosen kommer dessa inte längre att brytas ner inne i amöban utan istället fortsätta reproducera sig inne i cellen. Celldelningen fortlöper ända tills slemsvampen slutligen lyserar (spricker) av att antalet bakterier blir för stort i förhållande till amöbans storlek (Hasselbring *et al.*, 2011).

Diskussion

Under skrivningsprocessen har jag lärt mig mycket om den fascinerande organismen *D. discoideum*. Det är en organism som fortfarande har mycket potential inom forskning då mycket om den ännu inte är känt. Dess förmåga att agera både som encellig och multicellulär gör att den kan betraktas och klassas som ett mellanting av dessa två. I grova drag skulle man kunna säga att *D. discoideum* lever som frilevande cell, djur samt svamp. Den skulle alltså med tiden kunna evolvera till vilket som helst av dessa tre riken. Förmågan att producera cellulosa är något som kan anses vara märkligt då organismen är rörlig och inte har någon cellvägg. Detta väcker funderingar om huruvida egenskapen är en evolutionär rest som slemsvampar fortfarande använder sig av eller om det är något de själva evolverat fram.

Tänkarna kring cellulossyntesens ursprung väcks då *D. discoideum*:s förmåga till detta är mer lik svampars än växters och bakteriers. I och med denna kunskap skulle man kunna tänka sig att *D. discoideum* med tiden mest sannolikt antingen utvecklas till ett djur som tappat förmågan att producera cellulosa eller till en svampliknande organism. Att *D. discoideum* skulle utvecklas till en växt är däremot (baserat på informationen ovan) högst osannolikt på grund av skillnader i cellulossyntes men också på grund av att den inte är autotrof utan är beroende av att livnära sig på andra organismer för att överleva. Det är då mer sannolikt att den skulle vidareutveckla sin redan befintliga heterotrofa livsstil istället för att utveckla fotosyntetiserande egenskaper från grunden. Dessutom har *D. discoideum* redan en välfungerande svamp- och snigelfas vilket gör att den mer sannolikt vidareutvecklar en av dessa.

Det som framförallt är fascinerande med denna enastående organism är dess mycket speciella signalsystem samt dess förmåga till celldifferentiering. Uppsatsens huvudsakliga fokus var ursprungligen just *D. discoideum*:s signaleringssystem. Jag trodde ursprungligen att celldifferentiering var beroende av någon form av signalering, därför hamnade även detta

ämne i fokus. Detta trots att det i själva verket är en process som inte alls är beroende av signalering.

Under hela skrivningsprocessen har det varit svårt att undvika att jämföra *D. discoideum* i amöbafas med mänskliga stamceller. Detta på grund av att man kan se paralleller mellan hur en cell av *D. discoideum* differentierar till antingen sporcell eller skaftcell med undergrupper (A, B och O) och hur en stamcell differentierar till exempelvis en nervcell eller en röd blodkropp. Likheterna mellan dessa multicellulära system är bland annat att det i båda krävs apoptos (programmerad celledöd) för att systemet skall fungera korrekt. Hos slemsvampar dör skaftcellerna, precis som att stamceller som utvecklas till röda blodkroppar dör. Båda av dessa apoptoser är viktiga för att det multicellulära systemet skall kunna fungera korrekt. En cheatercell gör inte det den ursprungligen är menad att göra och skulle kunna jämföras med en tumörcell som delar sig okontrollerat. Cheaterceller skulle alltså kunna anses vara slemsvampens cancer. Det finns många fler paralleller att dra mellan människoceller och slemsvampar än de ovan nämnda. Detta gör att dessa är intressanta att studera ur ett flertal perspektiv, främst inom medicinsk forskning då de både skiljer sig från och liknar människans egna celler.

Organismens speciella signalsystem ger en inblick i hur eukaryota celler kan tänkas kommunicera med varandra. Om denna kunskap på rätt sätt kan appliceras på mänskliga celler (i och med att *D. discoideum*:s celler på många sätt liknar mänskliga celler) skulle detta i sådana fall kunna resultera i ökad kunskap om cellkommunikation i mänsklig vävnad. Det skulle i sin tur, i teorin, kunna vara användbart vid cancerforskning för att se hur normala celler förhåller sig till cancerceller. Detta är dock bara spekulationer och betyder inte att *D. discoideum* inte ens kommer kunna bota en större del av världens alla sjukdomar. Oavsett om *D. discoideum* kan påverka forskningen mycket eller inte alls är det fortfarande en enastående organism i sig och studierna på denna bör definitivt fortsätta.

Som ovan nämnt har *D. discoideum* en förvånansvärt utvecklad förmåga att navigera efter ljus när den befinner sig i snigelfasen. Man skulle kunna tänka sig att ljuset samordnar hela kolonins rörelse. Om man liknar *D. discoideum* med ett fiskstim eller en flock med fåglar kan man tänka sig att någon individ tar ett initiativ till att exempelvis svänga vänster och resten av kolonin följer efter. Till skillnad från fiskar och fåglar saknar slemsvampar syn vilket gör att de inte kan se varandra. Då de däremot starkt verkar kunna registrera ljus kan detta tänkas vara just ett sätt för organismen att koordinera en hel kolonis rörelser.

Ett enkelt experiment att utföra för att studera organismens ljusolkande förmåga vore att jämföra vad kolonier av *D. discoideum* enklast navigerar mot. Exempelvis skulle man kunna använda sig av fem stycken kolonier som alla får navigera mot olika saker. Koloni 1 kan navigera mot ljus, koloni 2 kan navigera mot pH-förändringar, koloni 3 kan navigera mot föda i form av bakterier, koloni 4 kan navigera mot cAMP och koloni 5 kan navigera mot värme. Detta experiment skulle kunna tänkas visa vad som attraherar en koloni av *D. discoideum* som befinner sig i snigelfasen mest.

Hypoteser och slutsatser

Som tidigare nämndes ställde jag vid arbetets start för mig själv upp ett antal hypoteser om hur vissa processer skulle kunna tänkas gå till. Svaren på dessa hypoteser har däremot främst väckt nya frågor.

1. ”*D. discoideum* blir sporceller respektive skaftceller genom påverkan från andra celler”

Detta visade sig inte alls stämma. I hypotesen antogs det att cellerna påverkade varandra vid denna differentiering, till exempel att de svagare cellerna ”knuffas” fram till den främre delen av snigeln och därmed tvingas bilda skaft. Det visade sig i själva verket endast vara den enskilda cellen som avgör om den skall utvecklas till spor- eller skaftcell beroende på var den befinner sig i cellcykeln vid aggregering. Detta väckte frågan om varför det är just 20 % som blir skaft (antalet procent verkar variera beroende på vilken studie man läser). Den nya hypotesen om detta är att de tidiga stadierna av cellcykeln (som leder till att cellen utvecklas till skaftceller) utgör 20 % av cykelns totala tid. Om man då antar att alla celler utövar celldelning vid tillfället för aggregering är det 20 % sannolikhet att de befinner sig i de tidiga stadierna av cellcykeln och därmed utvecklas till skaftceller.

2. ”*D. discoideum* kan återgå till amöbafas från snigelfas”

I teorin skulle man kunna tänka sig att *D. discoideum* i själva verket inte skulle behöva genomgå kulminering när de funnit den miljö de söker. Istället skulle de kunna återgå till amöbafasen och därmed inte behöva offra 20 % av populationen. Inga konkreta bevis har hittats som tyder på att detta faktiskt skulle kunna ske. Alla studier som jag har läst tyder på att snigelfasen är irreversibel när den väl har påbörjats. Denna typ av evolution verkar högst opraktisk för organismen. En reversibel snigelfas kan tyckas vara en mer effektiv lösning då detta borde vara mer energisnålt och dessutom skulle eliminera problemet med cheaters.

En teori om varför kulminering används så frekvent är att själva spridningen i svampfasen gynnar arten markant. Detta i och med att varje enskild individ kan spridas längre avstånd som sporer och därför börja en klonpopulation i en miljö som är fattig på konkurrens om föda. På sätt och vis kan man säga att själva spridningen via sporer delvis eliminerar problemet med cheaters då dessa sprids bort från resten av populationen. Om en wild-typepopulation däremot skulle råka spridas till att hamna nära en cheaterpopulation skulle den påverkas mycket negativt om dessa två populationer skulle aggregera.

3. ”Cheaters kan inte kulminera själva.”

Detta visade sig vara helt riktigt och gör därför cheatermutationen ogynnsam. En annan teori om cheaters var att wild-typeceller på något sätt kan upptäcka och bekämpa cheaters. Det vill säga att det skulle finnas någon form av immunceller som i sådana fall skulle påminna om människans vita blodkroppar. Om cheaters skulle ha förmågan att själva kunna kulminera skulle ett immunförsvar bland wild-typeceller antagligen vara nödvändigt för att undvika att cheaters skulle bli dominanta. Vissa studier som jag har läst under skrivningsprocessen föreslår att ett sådant system kan finnas men tillräckligt konkreta bevis har inte hittats.

4. ”En signalsubstans skickas genom snigeln för att signalera för kulminering”

Inga publicerade data visar tecken som tyder på att *D. discoideum* signalerar till varandra vid induceringen av kulminering. Däremot är exempelvis halten av cAMP en viktig faktor vid bildningen av fruktkroppen då olika celler påverkas annorlunda av denna substans. Utöver signalering genom DIF borde det förekomma signalering genom cAMP-utsöndring men inga studier tyder på detta. Cellerna verkar själva lyckas koordinera sig att kulminera förmodligen

med hjälp av kemotaxis mot ämnen i marken nödvändiga för kulminering. Detta gör att de då inte behöver signalera till varandra via exempelvis cAMP.

Tack!

Emma Högberg, Fredrik Norrström, Martin Rosén och Frida Wennerholm för återkoppling och råd under skrivandets gång. Anders Ödeen för handledning, återkoppling och hjälp. Anna Thorell Stårsta för korrekturläsning, hjälp och stöd. Uppsala universitetsbibliotek/Biologibiblioteket för tillgång till material. Alla föreläsare, lärare och andra som hjälpt till att skapa mitt intresse för slemsvampar. Tack till dig som har läst denna uppsats!

Referenser

- Bloomfield G, Skelton J, Ivens A, Tanaka Y, Kay RR. 2010. Sex determination in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science* **330**: 1533-1536.
- Bonner JT. 1959. Differentiation in social amoebae. I: Kennedy D (red.). Cellular and organismal biology, ss. 64-72. Freeman and Company, San Francisco.
- Cassada RC, Russell RL. 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **46**: 326-342.
- Chen Y, Rodrick V, Yan Y, Brazill D. 2005. PldB, a putative phospholipase D homologue in *Dictyostelium discoideum* mediates quorums sensing during development. *Eukaryot Cell*, doi 10.1128/EC.4.4.694-702.2005.
- Cooper RM, Wingreen NS, Cox EC. 2012. An excitable cortex and memory model successfully predicts new pseudopod dynamics. *Public Library of Science One*, doi 10.1371/journal.pone.0033528.
- Cotter DA. 1973. Spore germination in *Dictyostelium discoideum*: I. The thermodynamics of reversible activation. *Journal of Theoretical Biology* **41**: 41-51.
- Dao DN, Kessin RH, Ennis HL. 2000. Developmental cheating and the evolutionary biology of *Dictyostelium* and *Myxococcus*. *Microbiology* **146**: 1505-1512.
- David A, Raper KB, 1966. Spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **56**: 880-884.
- Devreotes P. 1989. *Dictyostelium discoideum*: A model system for cell-cell interactions in development. *Science* **245**: 1054-1058.
- Dormann D, Vasiev B, Weijer CJ. 1998. Propagating waves control *Dictyostelium discoideum* morphogenesis. *Biophysical Chemistry* **72**: -21-35.
- Driscoll MK, McCann C, Kopace R, Homan T, Fourkas JT, Parent C, Losert W. 2012. Cell shape dynamics: from waves to migration. *Public Library of Science 2012 Computational Biology*, doi 10.1371/journal.pcbi.1002392.
- Durston AJ, Cohen MH, Drage DJ, Potel MJ, Robertson A, Wonio D. 1976. Periodic movements of *Dictyostelium discoideum* sorocarps. *Developmental Biology* **52**: 173-180.
- Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream M-A, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser

- C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabbinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 2005 **435**: 43-57.
- Fets L, Kay R & Velazquez F. 2010. *Dictyostelium*. *Current Biology* **20**: 1008–1010.
- Flowers JM, Li SI, Stathos A, Saxer G, Ostrowski EA, Queller DC, Strassmann JE, Purugganan MD. 2010. Variation, sex, and social cooperation: molecular population genetics of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Public Library of Science Genet*, doi 10.1371/journal.pgen.1001013.
- Grant WN, Williams KL. 1983. Monoclonal antibody characterisation of slime sheath: the extracellular matrix of *Dictyostelium discoideum*. *The European Molecular Biology Organization Journal* **2**: 935-940.
- Hasselbring BM, Patel MK, Schell MA. 2011. *Dictyostelium discoideum* as a model system for identification of *Burkholderia pseudomallei* virulence factors. *Infection and Immunity* **79**: 2079-2088.
- Jang W, Gomer RH. 2011. Initial cell type choice in *Dictyostelium*. *Eukaryotic Cell* **10**: 150-155.
- Kessin, RH. 2001. *Dictyostelium*: evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Cambridge University Press, Cambridge.
- Khare A, Shaulsky G. 2010. Cheating by exploitation of developmental prestalk patterning in *Dictyostelium discoideum*. *Public Library of Science Genet*, doi 10.1371/journal.pgen.1000854.
- Müller-Taubenberger A, Kortholtb A, Eichinger L. 2012. Simple system – substantial share: The use of *Dictyostelium* in cell biology and molecular medicine. *European Journal of Cell Biology*, doi 10.1016/j.ejcb.2012.10.003.
- Pálsson E, Lee KJ, Goldstein RE, Franke J, Kessin RH, Cox EC. 1997. Selection for spiral waves in the social amoebae *Dictyostelium*. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **94**: 13719-13723.
- Parent CA, Devreotes PN. 1996. Molecular genetics of signal transduction in *Dictyostelium*. *Annual Review of Biochemistry* **65**: 411-440.
- Sakuraia S, Naganob S. 2012. A molecular network underlying spontaneous cAMP oscillation and synchronization in *Dictyostelium*. *Journal of Theoretical Biology* **307**: 37–41.
- Singleton CK, Kirsten JH, Dinsmore CJ. 2006. Function of ammonium transporter A in the initiation of culmination of development in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, doi 10.1128/EC.00058-06.
- Williams JG. 2010. *Dictyostelium* finds new roles to model. *Genetics* **185**: 717-726.
- Yamadaa Y, Kayc RR, Bloomfield G, Rossa S, Ivensb A, Williams JG. 2010. A new *Dictyostelium* prestalk cell sub-type. *Developmental Biology* **339**: 390–397.