

In jeder Sekunde entstehen 10 Millionen Zellen

Über die Geheimnisse der Zellteilung / Von Günter Cleffmann

Eine der wichtigen Fragen der Biologie, auf die es noch keine ausreichenden Antworten gibt, ist die nach den Mechanismen und Ursachen der Zellteilung. Seit Rudolf Virchow 1858 erkannte, daß Zellen nur aus Zellen entstehen, hat die Forschung viele Ergebnisse über den Ablauf der Zellteilung erbracht.

Aber die Fragen, warum eine Zelle sich teilt und wann sie sich teilt, sind bis heute auch nicht annähernd befriedigend zu beantworten. Die Arbeitsgruppe Zell- und Stoffwechselphysiologie im Institut für Tierphysiologie des Fachbereichs Biologie versucht, auf mehreren Ebenen Einblick in die Kausalzusammenhänge zu gewinnen, die zur Zellteilung führen. Untersucht wird ein einzelliges Tier mit Namen Tetrahymena, das aufgrund vieler Eigenschaften zu einem wichtigen Modellorganismus in der Zellbiologie wurde und insbesondere geeignet ist für Forschungen über die Zellvermehrung. Tetrahymena gehört zur Klasse der Ciliaten, von denen z. B. das sogenannte Pantoffeltierchen auch dem Laien bekannt ist.

Zellteilung: Voraussetzung für Leben

Der Mangel an wirklicher Einsicht in das Phänomen Zellteilung steht in krassem Ge-

Protozoologie

Tagung der Gesellschaft für Protozoologie auf Schloß Rauschholzhausen

Die Deutsche Gesellschaft für Protozoologie wurde 1981 in Münster gegründet. Sie ist der Zusammenschluß derjenigen Wissenschaftler, deren Forschungsobjekt Protozoen sind – das sind die einzelligen tierischen Organismen. Protozoen haben auf folgenden Gebieten der modernen Biologie besondere Bedeutung gewonnen: als Erreger parasitärer Erkrankungen von Mensch und Tier, als Bioindikatoren in der Ökologie von Böden und Gewässern und in der Zellbiologie. Ein Beispiel für die Bedeutung der Protozoen in der zellbiologischen Forschung gibt der nebenstehende Artikel. – Die Gesellschaft für Protozoologie hat ihre erste wissenschaftliche Tagung vom 25. 3. bis 27. 3. 1982 auf Schloß Rauschholzhausen abgehalten. In 40 Beiträgen wurden die neueren Ergebnisse auf den oben umrissenen Gebieten vorgetragen und diskutiert. Zwei international renommierte Protozoologen wurden zu Ehrenmitgliedern der Gesellschaft gewählt: Prof. Dr. K. G. Grell, Tübingen, und Prof. Dr. G. Piekarski, Bonn.

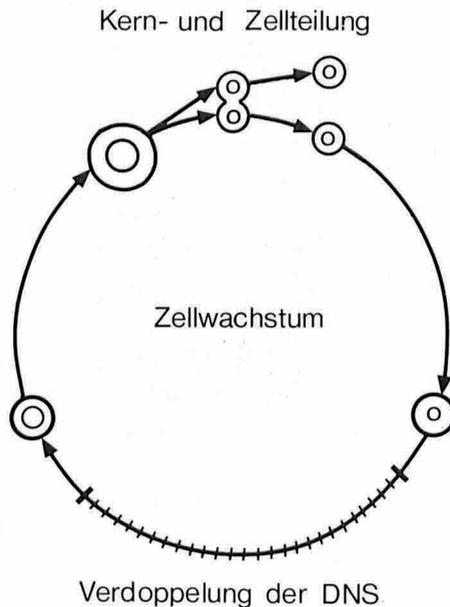


Bild 1: Repräsentation des Zellzyklus und seiner Abschnitte, in deren Verlauf eine Zelle auf die doppelte Größe heranwächst und sich dann in zwei gleiche Zellen teilt. Wachstum und Teilung sind die beiden einander bedingenden Vorgänge, die sich ohne äußere Anstöße rhythmisch abwechselnd wiederholen.

gensatz zu seiner Bedeutung für alle Bereiche der Biologie. Zellteilung ist die unerläßliche Voraussetzung für die folgenden Lebenserscheinungen:

Wachstum: Die Zellgröße ist begrenzt, weil ein Zellkern nur eine begrenzte Menge Cytoplasma steuern kann. Darum ist sowohl jede Größenzunahme eines Organismus wie auch die Erneuerung von Gewebe und die Regeneration von Organen an Zellteilung gebunden. In jedem Organismus laufen ständig zahlreiche Zellteilungen ab. Im menschlichen Körper, der aus ca. 10^{14} Zellen besteht, entstehen in jeder Sekunde etwa 10 Millionen Zellen durch Teilung.

Differenzierung: Die Gliederung eines komplex strukturierten Organismus in verschiedenen Zellsorten wie Leberzellen, Epidermiszellen oder Netzhautzellen entsteht schrittweise in der Embryonalentwicklung durch den Vorgang der Differenzierung der Zellen. Dieser ist an Zellteilung gebunden, indem aus einer Mutterzelle zwei Tochterzellen werden, die untereinander verschieden sind. Die sogenannte differentielle Zellteilung ist einer der eindrucksvollsten Prozesse in der Entwicklung.

Fortpflanzung: Jedes Lebewesen beginnt mit einem einzelligen Stadium, der befruchteten Eizelle. Die Voraussetzung für die Entstehung eines neuen Individuums ist also die Bildung gegensätzlich geschlechtlich determinierter Keimzellen durch Zellteilung.

Zellteilung: Geordnete Kontrolle

Aus diesen Tatsachen könnte man schließen, daß es für den Einzelorganismus und für die belebte Welt insgesamt „wünschenswert“ wäre, daß sich möglichst viele Zellen möglichst rasch teilen. Das Gegenteil ist richtig. Zwar ist die Zellvermehrung für die Entwicklung der Organismen Voraussetzung, aber die eigentlich erfolgreiche „Erfindung“ in der Evolution ist die geordnete Kontrolle und strenge Begrenzung der Zellteilungstätigkeit. Hierzu einige Illustrationen:

Sonderforschungsbereich 103

Gießener Forschungen

im Rahmen des Sonderforschungsbereichs „Zellenergetik und Zelldifferenzierung“

Der Sonderforschungsbereich 103 „Zellenergetik und Zelldifferenzierung“ hat seinen Sitz in Marburg. An ihm sind zwei Gießener Arbeitsgruppen des Fachbereichs Biologie beteiligt, nämlich die aus dem Genetischen Institut unter Leitung von Prof. Dr. Fritz Anders und die Arbeitsgruppe Zell- und Stoffwechselphysiologie aus dem Institut für Tierphysiologie unter Prof. Günter Cleffmann. Wie der Titel sagt, ist das wissenschaftliche Ziel des SFB 103, die Molekularbiologie der energieliefernden Prozesse und der Differenzierungsvorgänge in der Zelle aufzuklären. Besonderes Gewicht wird auf die Verknüpfung von Energiestoffwechsel und Differenzierung gelegt. Innerhalb dieses Rahmens untersucht die Arbeitsgruppe Anders die Genetik und Molekularbiologie von Tumoren und ihr Verhältnis zur Zelldifferenzierung, während dem Teilprojekt Cleffmann die Verbindung von Zelldifferenzierung und Zellvermehrung Gegenstand der Forschung ist. – Die Arbeit des SFB 103 wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch beträchtliche Mittel gefördert. Ein neuer Förderantrag für den Zeitraum 1983–1984 ist in Vorbereitung.

In einem Gedankenexperiment kann man errechnen, was entstehen würde, falls man es einer Zelle aus einem frühen Säugetierkeim erlauben würde, sich mit gleichbleibender Geschwindigkeit zu vermehren. Wir wollen annehmen, es sei möglich, in einer Gewebekultur den sich vermehrenden Zellen immer genügend Nahrung zuzuführen. Die erste Stammzelle einer solchen Kultur würde sich in einem Tag etwa zweimal teilen, so daß vier Zellen entstanden wären. Nach fünf Tagen hätten wir 1000 Zellen, nach 15 Tagen 1 g Gewebe und nach 22 Tagen die lebende Masse, die der eines Menschen entspricht. Das Weitere gleicht einer Horrorvision: Nach 2 Monaten wäre die lebende Masse vom Volumen der Erdkugel entstanden. Die Beendigung der Zellvermehrung ist demnach genauso wichtig wie die Zellteilung selbst.

Ungebremste Zellvermehrung ist nicht nur als Fiktion, sondern auch in der Realität ein Schrecken der Menschheit: Ein gemeinsames Kennzeichen aller verschiedenen Sorten von Krebs ist die ungehemmte Zellvermehrung. Wenn es auch heute sicher scheint, daß der Verlust der Kontrolle über die Zellteilung nicht die allererste oder einzige Ursache für das Entstehen bösartiger Tumoren ist, so ist es doch sicher, daß wir dem Phänomen „Krebs“ ein entscheidendes Stück nähergekommen wären, wenn wir verstehen würden, welche zellulären Konstellationen Teilung auslösen oder sie verhindern. Gerade unter diesem Gesichtspunkt ist Tetrahymena als Untersuchungsobjekt besonders geeignet, denn mit allen Sorten von Tumorzellen hat Tetrahymena im Gegensatz zu den meisten anderen tierischen Zellen die Eigenschaft der unbeschränkten Vermehrungsfähigkeit gemeinsam.

Die Untersuchungen von Leonard Hayflick und anderen haben gezeigt, daß die Beendigung der Teilungstätigkeit eine reguläre Eigenschaft von Körperzellen ist. Für einige Gewebe konnte er nachweisen, daß die Zellen sich etwa 50 mal teilen und dann nicht mehr. Die Beendigung der Teilung wird nicht durch mangelhafte Umweltbedingungen, sei es im Körper, sei es in der Gewebekultur, hervorgerufen, sondern ist in den Zellen vorprogrammiert.

Zellteilung und Zellzyklus

Die Vorgänge im Zusammenhang mit der Zellteilung werden repräsentiert durch den sogenannten Zellzyklus (Bild 1): Eine teilungsbereite Zelle teilt zunächst ihren Kern – im allgemeinen durch Mitose – und dann das Cytoplasma. Diese Teilung ist in der Regel äqual, d. h. die beiden entstandenen Zellen sind untereinander gleich. Diese Zellen wachsen nun heran, bis sie wieder die Größe der Mutterzelle erreicht haben und sich erneut teilen. Im Verlauf des Wachstums muß

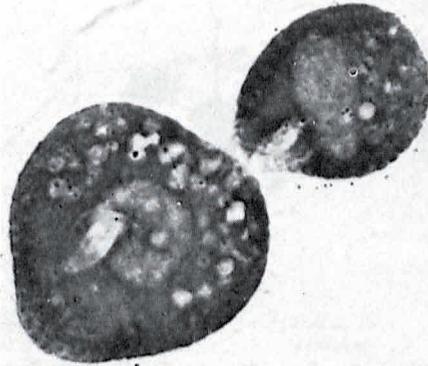


Bild 2: Bei der Mutante „conical“ von Tetrahymena thermophila ist durch Mutation ein Organismus entstanden, der sich nicht in zwei gleiche Zellen teilt, sondern hier ist die vordere Tochterzelle größer als die hintere. Trotzdem werden beide wieder auf die durchschnittliche Größe zurückgeführt, indem sich die große Zelle früher teilt und die hintere später, d. h. mehr Zeit für das Zellwachstum hat.

dafür gesorgt werden, daß alle notwendigen Bestandteile der Zelle verdoppelt werden. Dieses Zellwachstum vollzieht sich in einem komplexen Muster und beinhaltet auch diejenigen Synthesen, die zur Zellteilung führen. Man hat eine Zeitlang angenommen, es gebe eine bestimmte Substanz, den „Auslöser“, der die Teilung einleitet, wenn er in einer bestimmten Menge vorliegt. In der Tat sind Faktoren gefunden und isoliert worden, die die Geschwindigkeit der Zellteilung bestimmter Zellsorten beeinflussen. Es gibt Substanzen, die die Zellteilungen stimulieren z. B. für Nervenzellen (nerv growth factor) und Epidermiszellen (epidermal growth factor), und es gibt andere, die Zellteilungen hemmen, z. B. von Nieren- und Leberzellen (Chalone). Das Konzept eines allgemeinen Auslösers wurde jedoch verlassen zugunsten der Auffassung, daß es eine Serie von Faktoren und Prozessen gibt, die in einer geordneten Kausalkette die Teilung vorbereiten, einleiten und durchführen.

Die Zunahme der Zellbestandteile erfolgt nicht stetig. Insbesondere gibt es einen zeitlich begrenzten Abschnitt im Zellzyklus, in dem das Erbmateriale, die DNS, vermehrt wird. Diese Synthesephase ist deswegen bemerkenswert, weil sie zu einem bestimmten Zeitpunkt beginnt und genau dann beendet wird, wenn jedes Stück der DNS verdoppelt ist.

Die Forschungen über das Problem der Zellvermehrung kann man in zwei Fragestellungen, die natürlich miteinander verknüpft sind, zusammenfassen:

1. Warum teilt sich eine Zelle: Welche Prozesse müssen mindestens abgelaufen sein, damit Teilung stattfindet? Wodurch unterscheiden sich teilungsfähige von „ruhenden“ Zellen?
2. Wann teilt sich eine Zelle: Wie sind Zellwachstum, Dauer des Zellzyklus, Syntheseprozesse und Zellgröße quantitativ aufeinander abgestimmt?

Bei der zweiten Frage ist zu prüfen, ob die Zellgröße, die für eine gegebene Zellsorte recht konstant ist, dadurch kontrolliert wird, daß bei konstanter Dauer des Zellzyklus die Wachstumsrate variabel ist, oder ob bei konstanter Wachstumsrate der Teilungszeitpunkt so gewählt wird, daß eine bestimmte Größe resultiert. Durch Untersuchung einer Teilungsmutante konnte die Frage bei Tetrahymena zugunsten der zweiten Alternative entschieden werden. In dieser Mutante, die als „conical“ bezeichnet wird, sind die beiden aus der Teilung hervorgehenden Zellen verschieden groß (Bild 2, vgl. auch Titelseite). In beiden Zellen wird die durchschnittliche Zellgröße dadurch wieder hergestellt, daß die große Zelle sich früher teilt und die kleine später, während die Wachstumsgeschwindigkeit in beiden etwa gleich ist.

Untersuchung von Zellzyklus-Mutanten

Die gezielte Herstellung von Mutanten und deren Untersuchung hat in der Zellzyklusforschung, wie in der Zellbiologie überhaupt, eine große Bedeutung erlangt. Dabei werden in einer Zellpopulation durch Mutagene künstlich Mutationen erzeugt. Durch geeignete Selektionsverfahren werden diejenigen Zellen isoliert, in denen sich eine für das Forschungsziel geeignete Mutation ereignet hat. Die Schwierigkeit besteht darin, aus der Vielzahl von nicht mutierten und ungeeignet mutierten Zellen die für die Fragestellung gesuchte Mutante herauszufinden. Aus diesen Zellen wird ein Stamm gezüchtet und untersucht.

Auf diese Weise haben wir Mutanten von Tetrahymena gesucht, die uns weiteren Aufschluß über die Steuerung der Zellgröße geben können und eine gefunden, die eine 6–8 mal größere Zellmasse hat wie die Wildform (Bild 3). Zum Vergleich auf die Größenverhältnisse des Menschen übertragen, ist hier durch eine Mutation ein Organismus entstanden, der einer Körpermasse des Menschen von 500 kg entspricht. Diese Mutante ist deshalb besonders geeignet, weil es sich um eine temperatursensitive Mutante handelt, d. h. sie nimmt die abnorme Größe nur an, wenn man sie bei 34 °C züchtet und ist bei der Normaltemperatur von 28 °C

normal groß. Erste Ergebnisse der Untersuchung dieser Mutante zeigen, daß die Größenzunahme dadurch erfolgt, daß bei fortgesetztem Wachstum der Zelle die Teilung für eine Zeit ausgesetzt wird. Dies bestätigt, daß die Zellgröße vornehmlich durch den Teilungszeitpunkt festgesetzt wird.

Cytophotometrische Verfahren

Alle diese Untersuchungen setzen voraus, daß man in der Lage ist, das Wachstum von Einzelzellen quantitativ zu erfassen und damit die Wachstumsrate in Beziehung zu setzen zu der Geschichte der individuellen Zelle. Denn die Mechanismen, die den Zellzyklus kontrollieren, kann man nur verstehen, wenn man Untersuchungen an der Einzelzelle mit einbezieht. Der Grund liegt darin, daß die Prozesse der Teilungskontrolle natürlich in der einzelnen Zelle ablaufen und das es zwischen den Individuen einer Zellpopulation systematische und voraussagbare Unterschiede im Ablauf des Zellzyklus gibt. So konnten wir nachweisen, daß die Zellzyklen nicht alle nach dem gleichen Muster erfolgen, sondern daß es rhythmische Schwankungen in aufeinanderfolgenden Zellzyklen gibt. Das betrifft z. B. den Gehalt an RNS pro Zelle und die DNS Synthese. Das bedeutet, daß die Parameter des Zellzyklus in benachbarten Zellen nicht gleich sind und daß die Kontrolle des Zellzyklus auf der Ebene der Einzelzelle komplexer ist, als man es durch Untersuchung einer Massenkultur,

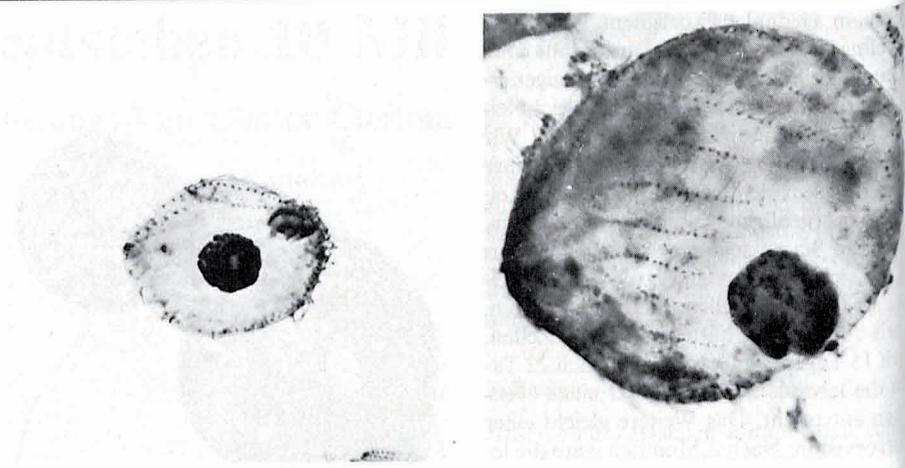


Bild 3: Bei dieser Mutante ist die Zellmasse auf das 6–8fache gesteigert. Man sieht links die nicht mutierte Zelle („Wildtyp“) und rechts die Mutante mit der Arbeitsbezeichnung D 9. Die gewaltige Zellgröße kommt u. a. dadurch zustande, daß die Zelle sich längere Zeit nicht teilt. Die Untersuchung solcher Mutanten und der Vergleich mit der „Normalzelle“ kann Aufschluß über die Prozesse geben, die spezifisch für die Auslösung der Zellteilung sind.

die ja immer nur Durchschnittswerte von vielen Zellen liefert, erfolgen kann. Die Zunahme an Zellmasse oder an Protein und DNS wird durch sogenannte cytophotometrische Verfahren bestimmt. Dabei wird in einem Mikroskop die Zelle mit einem Lichtbündel von einem Tausendstel Millimeter Durchmesser abgesehen. Die Stärke der Absorption ist ein Maß für die Zellmasse oder die Menge einer untersuchten Komponente, z. B. DNS oder Protein.

Pro Sekunde wird 50 mal die Absorption an verschiedenen Stellen gemessen und die Einzelwerte aufsummiert. Diese cytophotometrischen Verfahren sind in verschiedenen Richtungen entwickelt und vervollkommen worden und sind nicht nur zur Analyse des Zellwachstums, sondern in allen Gebieten der Zellbiologie wichtige und erfolgreich eingesetzte Techniken geworden. Das Institut für Tierphysiologie verfügt aus Mitteln des Landes Hessen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft über eine leistungsfähige Ausrüstung mit cytophotometrischen Geräten (Bild 4) und einschlägige Erfahrung, die auch von auswärtigen Arbeitsgruppen genutzt werden.

Mit cytophotometrischen und biochemischen Techniken wird auch einer der entscheidenden Vorgänge im Zellzyklus untersucht: die Auslösung der oben beschriebenen DNS-Synthesephase. Dieser Prozeß ist erstens allgemein als geordnete Vermehrung des Erbmaterials wichtig und zweitens deswegen, weil mit ihm die Zellteilung eingeleitet wird. Der Zeitpunkt der DNS-Replikationsauslösung bestimmt also die Vermehrungsgeschwindigkeit von Zellen. Über diesen wichtigen Vorgang ist fast nichts bekannt. Er ist deswegen einmalig im biologischen Bereich, weil hier abrupt eine Synthesetätigkeit von Null auf die volle Syntheseleistung angeschaltet wird und ebenso rasch wieder endet, wenn der gesamte DNA-Verdopplungsstand in allen Einzelteilen genau verdoppelt ist. So wird an der Frage, wann und unter welchen Bedingungen die DNS-Synthese beginnt, an vielen Forschungsinstituten intensiv gearbeitet. In unserer Arbeitsgruppe wurde bei Tetrahymena der Zeitpunkt des Beginns der Replikation und sein Zusammenhang mit der Zellvermehrung näher

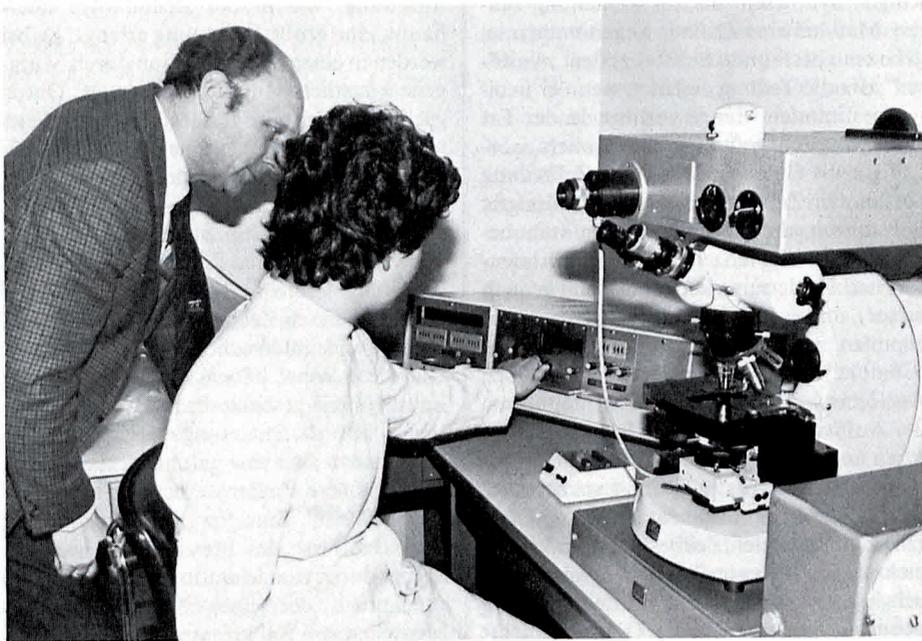


Bild 4: Absorptions-cytophotometrische Einrichtung im Institut für Tierphysiologie. Mit Hilfe dieses und ähnlicher Geräte ist es möglich, die Zellmasse, den Gehalt von Zellen an einzelnen Bestandteilen (z. B. Protein, DNS, RNS) und die Lokalisation solcher Bestandteile innerhalb der Zelle quantitativ zu bestimmen. UB-Photo: Müller

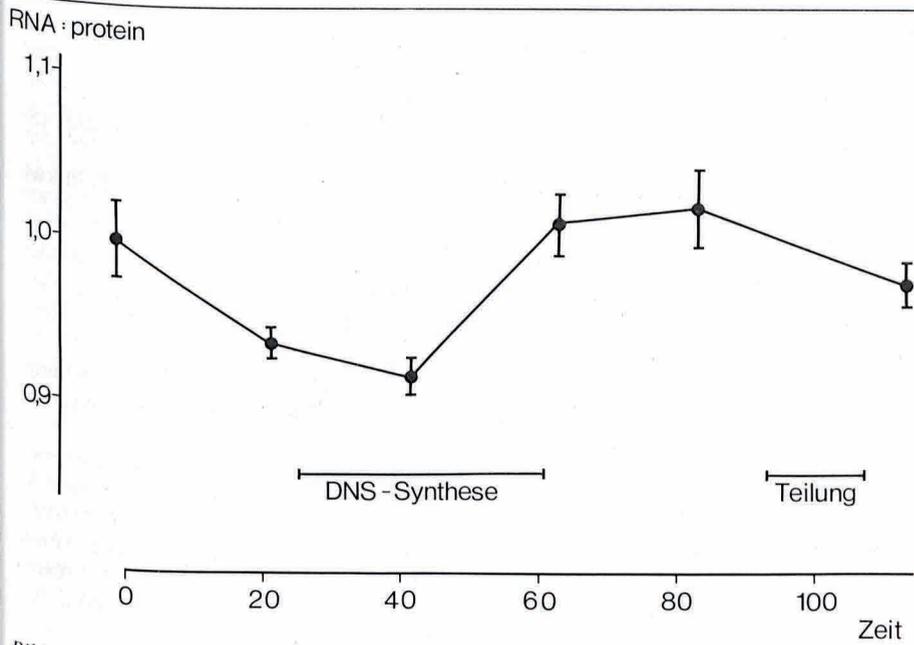


Bild 5: Das Verhältnis von RNS zu Protein im Verlauf eines Zellzyklus. Zu Beginn der DNS-Synthesephase ist der Wert dieses Verhältnisses besonders gering. Es wurde gefunden, daß dies unter allen untersuchten Bedingungen der Fall ist, so daß in einem relativ geringen RNS-Gehalt eine der Ursachen für den Beginn der DNS-Vermehrung gesucht werden muß.

tersucht. Es stellte sich heraus, daß er durch ein bestimmtes Verhältnis der Zellbestandteile zueinander gekennzeichnet ist. Im Verlauf des Zellwachstums nehmen nämlich Protein und RNS nicht gleichmäßig zu. Die stärkste Zunahme für Protein liegt im ersten Teil des Zellzyklus, die für RNS im zweiten Teil. Das führt dazu, daß der Beginn der S-Phase immer durch ein niedriges RNS/Protein-Verhältnis gekennzeichnet ist (Bild 5). Diese beiden Ereignisse, niedriges RNS/Protein-Verhältnis und Beginn der S-Phase, fallen jedoch nicht zufällig zusammen. Es konnte nachgewiesen werden, daß unter allen experimentellen Bedingungen dieser Zusammenhang gewahrt bleibt, unabhängig davon, ob die DNS-Synthese früh oder spät begonnen wird. Der Beweis für den gesetzmäßigen Zusammenhang wurde dadurch erbracht, daß das RNS/Protein-Verhältnis experimentell durch Hemmung der RNS-Synthese gesenkt wurde. Als Folge ergab sich eine vorzeitige Einleitung der DNS-Synthese. Die Zelle beginnt also dann die DNS-Synthese und damit die Teilung, wenn sie an RNS relativ verarmt ist und vermehrt damit den DNS-Bestand, der ja für die RNS-Nachlieferung verantwortlich ist. Wie die quantitativen Beziehungen zwischen den verschiedenen RNS-, DNS- und Proteinmolekülen sind, ist Gegenstand weiterer Arbeiten.

Unterschied zwischen wachsenden und ruhenden Zellen

Insbesondere muß man nach Molekülen suchen, durch die sich Zellkulturen, die in star-

ker Vermehrung sind, von Kulturen unterscheiden, in denen Zellvermehrung nicht

stattfindet. Dies ist bei Tetrahymena leicht dadurch zu erreichen, daß man die Kulturen bis zu einer maximalen Zelldichte heranwachsen läßt.

Solche Kulturen, die man als stationär bezeichnet, sind ein geeignetes Vergleichsmaterial zur Analyse der Zellvermehrungsprozesse. Man kann aus den Tetrahymena-Kulturen die sogenannten messenger-RNS isolieren und im Reagenzglas ihre Information in Protein überschreiben lassen.

Man erhält dann eine Aussage darüber, welche Informationen des Erbguts jeweils in den verschiedenen Kulturstadien in Protein überschrieben wird. Es zeigt sich, daß es deutliche Unterschiede zwischen wachsenden und ruhenden Zellen gibt. Bestimmte Proteine werden nur in wachsenden, andere nur in ruhenden und wieder andere in beiden Stadien, aber in unterschiedlichen Mengen synthetisiert (Bild 6).

Es gibt also biochemische Informationen, die typisch für sich vermehrende Zellen und andere Informationen, die typisch für Zellen in Teilungsrufe sind. Es handelt sich nun darum, die jeweiligen Proteine zu isolieren und zu charakterisieren und wenn möglich die Aussagen über ihre Funktion im Zellgeschehen zu machen.

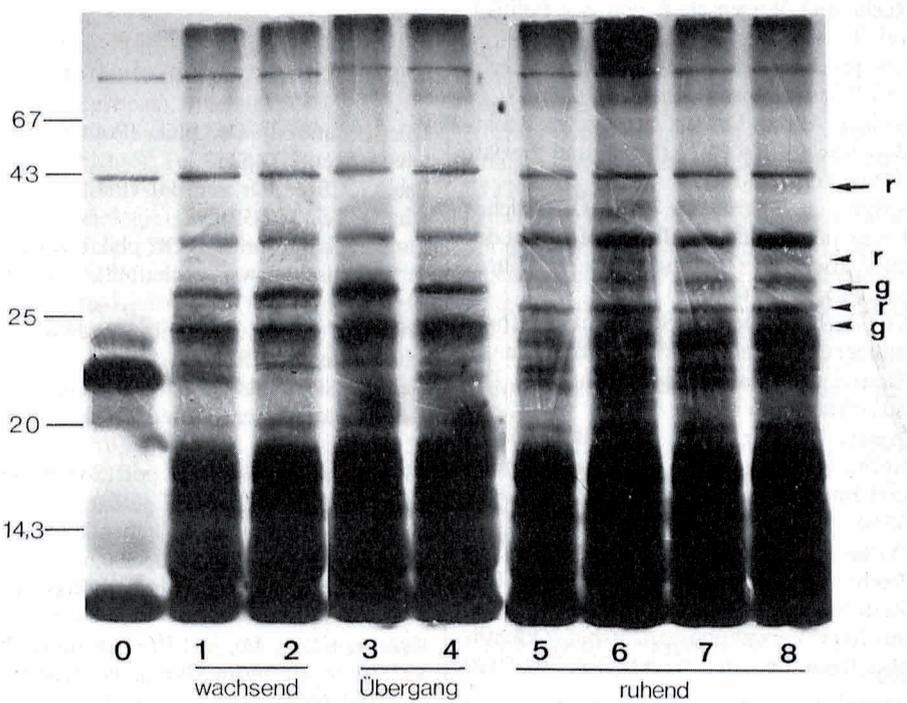


Bild 6: Auf dem Bild sind Proteine dargestellt, die im Reagenzglas unter dem Einfluß von messenger-RNS aus schnell wachsenden (links) und aus ruhenden (rechts) Kulturen synthetisiert wurden. Die Proteine sind in der Elektrophorese getrennt worden und erscheinen als waagerechte Banden. Teilungsfähige Zellen haben die Information für einige Proteine (\leftarrow g), die den ruhenden Zellen fehlt. Umgekehrt gibt es Proteine, die typisch für ruhende Zellen sind (\leftarrow r). Die Pfeilspitzen weisen auf Proteine hin, die in wachsenden und ruhenden Zellen mit unterschiedlicher Intensität synthetisiert werden.