

Kapitel 6: ZELLZYKLUS

Inhalt:

EINFÜHRUNG.....	67
ZELLWACHSTUM	67
WACHSTUMSKURVE.....	70
ZELLZYKLUS	72
ALTERSVERTEILUNG EINER ZELLKULTUR.....	74
DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	75
LITERATUR	76
LINKS	76

Einführung

Ein Mensch besteht aus etwa 6×10^{13} Zellen, die sich in 200 verschiedene Zelltypen unterteilen. Pro Minute verliert ein Erwachsener etwa 144×10^6 Erythrozyten und dazu noch zahlreiche Zellen anderer Organe, von denen die meisten wieder ersetzt werden.

Während Bakterien sich schon nach 20 Minuten wieder teilen können, beträgt die Spanne zwischen zwei Teilungen bei Eukaryoten – etwa bei menschlichen Zellen – mehr als 10 Stunden. Das heißt aber nicht, dass sich alle Zellen in einem Tier ständig teilen. Die meisten befinden sich in einem nicht-proliferierenden Zustand.

Zellwachstum

Breibt man Zellkultur, dann möchte man im Allgemeinen Zellen vermehren, um sie in einem bestimmten Stadium für Experimente zu verwenden. Betrachten wir also zunächst nur wachsende Zellen. Die Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen nennt man die **Verdopplungszeit** t_d . Teilt sich eine Zelle in einer Kultur, dann wächst die Gesamtzahl um 1, es werden aber zwei junge Zellen in die Kultur hinein "geboren". Man muss daher zwischen der **Wachstumsrate** W und der **Geburtsrate** G unterscheiden.

Die Wachstumsrate W gibt an, wie viel Zellen pro Zeiteinheit zur Kultur hinzukommen:

$$W = \left(\frac{dN}{dt} \right)$$

Die Geburtsrate G gibt die Anzahl neuer Zellen an und ist doppelt so groß wie die Wachstumsrate:

$$G = 2 W$$

Jede Zelle hat ein individuelles **Zellalter** τ , welches nach der Mitose beginnt ($\tau = 0$) und vor der erneuten Teilung seinen Maximalwert erreicht, welcher der Verdopplungszeit entspricht ($\tau = t_d$). Mit diesen wenigen Angaben können wir bereits eine Vorhersage über das Wachstumsverhalten machen: Aus einer Zelle werden zwei, die teilen sich zu vier, usw. Wir haben es also mit einer geometrischen Reihe oder einem **exponentiellem Wachstum** zu tun.

Ableitung der Wachstumsgleichung

Annahme: Population gleicher Zellen in einem unendlich großen Milieu. Die Zunahme der Individuen dN pro Zeitintervall dt hängt ab von der Startzellzahl N_0 und der in einem Proportionalitätsfaktor μ enthaltenen Verdopplungszeit t_d .

$$dN = \mu N dt$$

$$\frac{dN}{N} = \mu dt$$

Daraus ergibt sich:

$$N = N_0 \times e^{\frac{\ln 2}{t_d} t}$$

Die genaue Ableitung dieser Gleichung findet sich im 00

Logistische Wachstumsgleichung nach Verhulst-Pearl

Im realen Fall ist die Proliferation auch von der Anzahl N der Zellen und damit vom Angebot an Nährsubstanzen abhängig:

$$\mu = \mu_1 - \mu_2 \times N$$

In μ_1 ist die Verdopplungszeit während des logarithmischen Wachstums enthalten. In der stationären Phase findet praktisch kein Wachstum mehr statt, daher ist in μ_2 eine erheblich größere Verdopplungszeit enthalten.

$$dN = (\mu_1 - \mu_2 N) N dt = (\mu_1 N - \mu_2 N^2) dt$$

Integrieren nach der Formel:

$$\int \frac{dx}{x(ax+b)} = -\frac{1}{b} \ln \frac{ax+b}{x}$$

$$\int \frac{dN}{N(-\mu_2 N + \mu_1)} = \int dt$$

$$-\frac{1}{\mu_1} \ln \frac{\mu - \mu_2 N}{N} = t + \text{const}$$

$$\ln \frac{\mu_1 - \mu_2 N}{N} = -\mu_1 t + \text{const}$$

Randbedingung 1: $t = 0, N = N_0$

$$\text{const} = \ln \frac{\mu_1 - \mu_2 N_0}{N_0}$$

$$\ln \frac{\mu_1 - \mu_2 N_0}{N_0} - \ln \frac{\mu_1 - \mu_2 N}{N} = \mu_1 t$$

$$\ln \frac{(\mu_1 - \mu_2 N_0) N}{(\mu_1 - \mu_2 N) N_0} = \mu_1 t$$

$$N = \frac{(\mu_1 - \mu_2 N) N_0}{\mu_1 - \mu_2 N_0} \times e^{\mu_1 t}$$

$$N = \frac{\mu_1 N_0 \times e^{\mu_1 t} - \mu_2 N N_0 \times e^{\mu_1 t}}{\mu_1 - \mu_2 N_0}$$

Gesetz von Verhulst-Pearl

$$N = \frac{\mu_1 N_0 \times e^{\mu_1 t}}{\mu_1 + \mu_2 N_0 (e^{\mu_1 t} - 1)}$$

Bei **kleiner Individuenzahl** und/oder ausreichendem Nährstoffangebot ist μ unabhängig von N :

$$\mu = \mu_1$$

und man erhält die einfache exponentielle Wachstumsgleichung:

$$N = N_0 \times e^{\mu_1 t}$$

Bei **großer Individuenzahl** und/oder Nährstoffmangel, also auch nach langer Versuchsdauer, werden die Exponentialausdrücke groß und mit $\mu_2 \gg \mu_1$ folgt daraus

$$\lim_{x \rightarrow 0} N = \frac{\mu_1}{\mu_2} = \text{const}$$

Die Zellzahl bleibt somit konstant, die **Absterbephase** wird von dieser Gleichung also nicht erfasst. Sie kann rechnerisch berücksichtigt werden, wenn in μ die Geburtsrate G und die Sterberate S enthalten sind:

$$\mu = G - S$$

Wachstumskurve

Exponentielles Wachstum kann man in Zellkulturen nur dann beobachten, wenn man optimale Bedingungen in der Kultur hat und alle Zellen mit der gleichen Verdopplungszeit proliferieren.

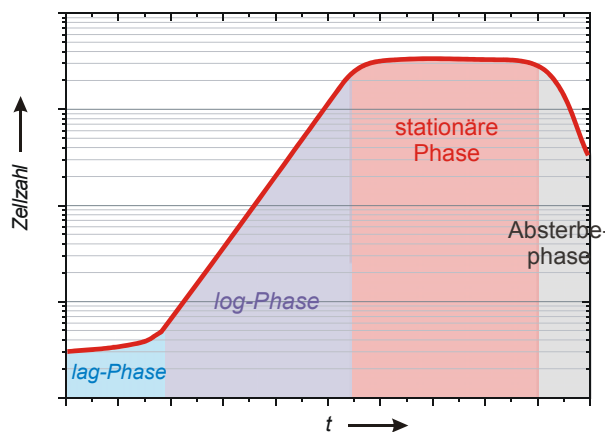


Abb. 33: Wachstumskurve

Man unterscheidet 4 Phasen:

lag-Phase:

Wenn die vereinzelt Zellen in ein neues Medium überführt werden, so müssen sie sich zunächst von einer eventuellen Trypsinierung erholen und an die neuen Bedingungen gewöhnen. Monolayer-Zellen werden mit dem proteolytischen Enzym Trypsin behandelt, um Zell-Zell-Verbindungen und Anheftung am Substrat zu lösen. Danach ist zunächst kein Wachstum zu beobachten.

log-Phase:

Dies ist die Phase des exponentiellen (oder auch logarithmischen Wachstums), in dem die Zellen sich "gesetzmäßig" verhalten.

Stationäre Phase:

Bei einer bestimmten Zelldichte oder bei Nährstoffmangel hören Zellen auf zu proliferieren. In dieser Phase wächst die Kultur effektiv nicht mehr, es sterben genauso viele Zellen ab, wie durch Teilung neu entstehen.

Absterbephase:

Besonders bei Oberflächenkulturen hält diese stationäre Phase nicht lange an, die Zellen beginnen abzusterben. Die absolute Zellzahl nimmt ab, die Kultur wird kleiner. Bei anderen Kulturbedingungen (z.B. 3D Wachstum) oder bei differenzierbaren Zellen (Embryonalzellen, Stammzellen) kann die stationäre Phase länger dauern als bei Monolayer-Zellkulturen.

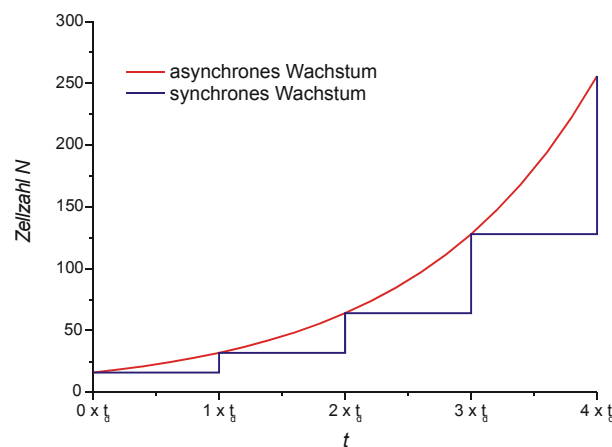


Abb. 34: Auf der Abbildung ist synchrones und asynchrones Wachstum zu sehen. Die blaue Linie zeigt synchrones Wachstum: alle Zellen verdoppeln sich nach einer bestimmten Zeit. Die rote Linie zeigt das natürlich vorkommende asynchrone Wachstum.

Synchronisation

Selektion natürlich synchroner Populationen:

Zellen, die sich in der Mitose befinden, unterscheiden sich in ihrer Form von Zellen in anderen Stadien, sie sind kugelig. Deshalb haften sie nicht so gut an ihrer Auflagefläche, man kann sie durch einen Stoss an die Petrischale "abschütteln", und erhält dadurch eine natürlich synchrone Population, die allerdings nicht unbegrenzt lange synchron bleibt. Außerdem sedimentieren sie anders als Zellen in anderen Stadien, da sie neben ihrer abweichenden Struktur auch eine andere Dichte aufweisen. Man kann also auch durch Zentrifugation diese Zellen von den anderen trennen.

Addition inhibierender Substanzen: (Cytostatika, z. B. Hydroxyharnstoff)

Entzug von essentiellen Substanzen: (Serum)

Zellzyklus

Zwischen zwei Zellteilungen synthetisiert eine Zelle alles, was ihr durch ihren genetischen Code vorgegeben ist. Dies haben HOWARD & PELC 1953 erstmals für die DNA mit Hilfe von Tritium-Thymidin Markierung und Autoradiographie nachgewiesen. Hierbei wird den Zelle radioaktiv markiertes Thymidin für die Synthese von DNA zur Verfügung gestellt, und zwar für einen definierten kurzen Zeitraum (Pulsmarkierung). Die DNA, die innerhalb dieses Zeitraums neu gebildet wurde, ist durch ihre radioaktive Markierung klar von der vorher und nachher synthetisierten DNA zu unterscheiden. QUASTLER & SHERMAN haben 1959 diese Methode benutzt, um über die Auszählung von markierten Mitosen im Autoradiogramm zu zeigen, dass die Zellen dabei mehrere Zellzyklusphasen durchlaufen. Wendet man eine zeitversetzte Doppelmarkierung an, beispielsweise mit ^3H und ^{14}C , dann erhält man zusätzlich zwei kleine Fenster am Anfang und am Ende der S-Phase.

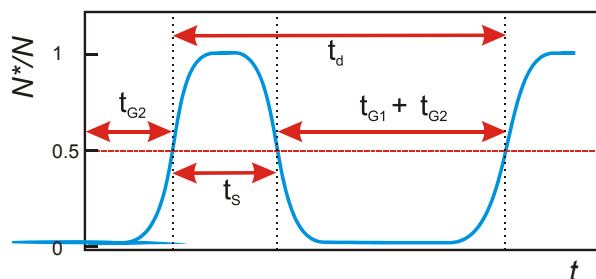


Abb. 35: Markierte Mitosen-Kurve

Wir unterteilen die Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen in mehrere **Zellzyklusphasen**:

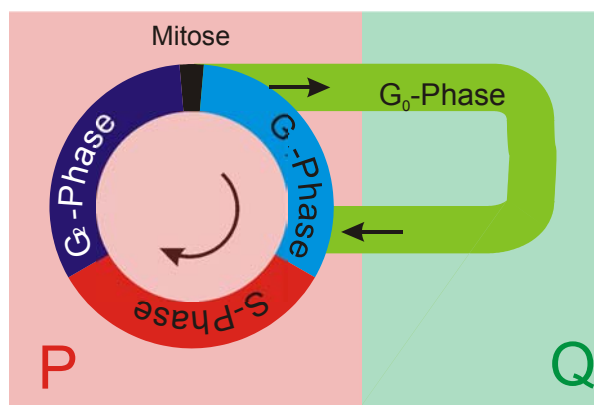


Abb. 36: Zellzyklusphasen. Das System befindet sich in einem Gleichgewichtszustand (steady state). P: Proliferatives Kompartiment; Q: Ruhendes (quiescent) Kompartiment.

M Mitose: Teilung des Zellkerns, anschließende Teilung der Zelle

G₁ Synthese aller Zellbestandteile außer DNA

S Synthese der DNA und anderer Zellbestandteile

G₂ Synthese aller Zellbestandteile außer DNA

Zellzyklusdauer = G1-Phase + S-Phase + G2-Phase + Mitose-Dauer

Die DNA-Synthese erfolgt also nicht kontinuierlich zwischen zwei Teilungen sondern nur während einer bestimmten Zeitspanne (S-Phase). Es gibt je eine Lücke (engl. gap) in der DNA-Synthese nach und vor der Mitose, die zur Benennung der Zyklusphasen führten (M, G₁, S, G₂). Die Zellen können nach der Mitose aus der proliferativen Phase auch in eine sog. Ruhephase (G₀-Phase) übergehen, in der sie entweder irreversibel differenzieren oder bei Bedarf wieder in den Teilungszyklus zurückkehren. Zellen können sowohl in der Ruhe- als auch in der proliferierenden Phase absterben (Nekrose, Apoptose) Die Regulation des Zellzyklus unterliegt einer fein abgestimmten Kontrolle durch zytoplasmatische Proteine:

Cycline:

G1 Cycline

S-Phasen Cycline

M-Phasen Cycline

Ihre Konzentration verändert sich während des Durchlaufens einer Zyklusphase.

Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs)

G1 CDKs

S-Phasen CDKs

M-Phasen CDKs

Außerdem werden zum Abbau der mitotischen Proteine proteolytische Enzyme benötigt, z. B. der anaphase promoting complex APC.

Für ihre Arbeiten über den Zellzyklus wurden im Jahre 2001 die Wissenschaftler Leland H. Hartwell, R. Timothy (Tim) Hunt und Paul M. Nurse mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Siehe:

<http://www.nobel.se/medicine/laureates/2001/press-ge.html>

Altersverteilung einer Zellkultur

Das individuelle Alter τ ist unabhängig von der Gesamtzahl der Zellen N . Um zu ermitteln, wie viele Zellen zu einem Zeitpunkt t ein bestimmtes Alter τ haben, kann man auch fragen wie viele Zellen vor τ Stunden geboren wurden. Dazu nehmen wir an, dass die Zahl der Zellen, die gerade aus der Mitose gekommen sind $2K$ entspricht.

$$\begin{aligned} N(t - \tau) &= N_0 \times e^{\mu(t-\tau)} = N_0 \times e^{\mu t} \times e^{-\mu \tau} \\ N_t - N(\tau) &= N_t \times e^{-\mu \tau} \\ 1 - \frac{N(\tau)}{N_t} &= e^{-\mu \tau} \end{aligned}$$

Formal entspricht das einer Wahrscheinlichkeit p , die den Anteil der Zellen des individuellen Alters τ in der Gesamtpopulation N_t angibt.

$$\begin{aligned} p(\tau) &\cong 1 - \frac{N(\tau)}{N_t} = e^{-\left(\frac{\ln 2}{t_d}\right)\tau} \\ \tau = 0 &\Rightarrow N(\tau) = 0 \quad (\text{da } e^{-0} = 1) \\ \tau = t_d &\Rightarrow N(\tau) = \frac{N(t)}{2} \Rightarrow 1 - \frac{N(t)}{2N(t)} = 1 - \frac{1}{2} = \frac{1}{2} \quad (\text{da } e^{-\ln 2} = \frac{1}{2}) \end{aligned}$$

In einer asynchron wachsenden Kultur ist die Häufigkeit der Zellen mit $t = 0$ (Geburt) **doppelt** so hoch wie für $t = t_d$ (Tod).

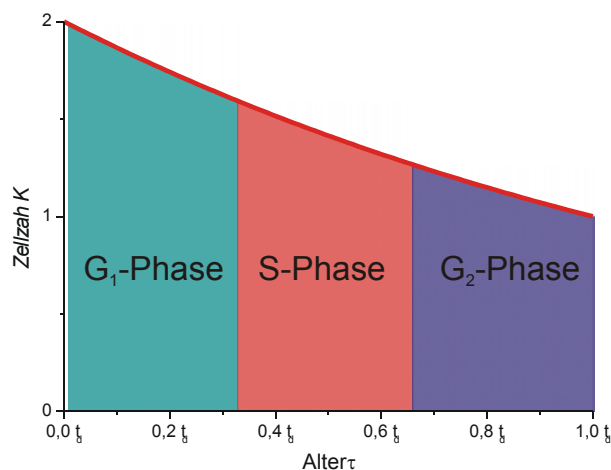
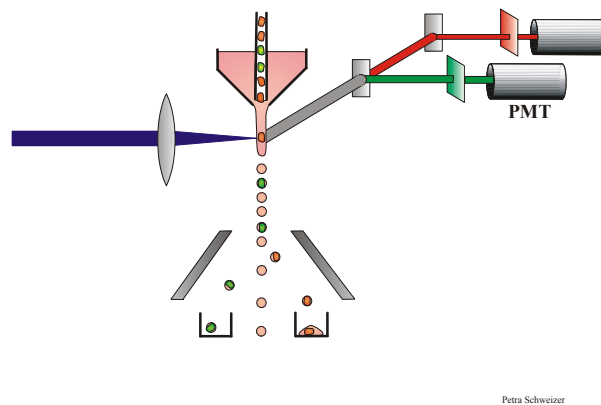


Abb. 37 Altersverteilung in einer asynchron wachsenden Zellkultur.

Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer kann Eigenschaften von Zellen auf optischem Wege messen. Beispielsweise kann der DNA Gehalt von Zellen über spezifische Fluoreszenzmarkierung ermittelt werden und damit Angaben über die Zellzyklusverteilung gewonnen werden. Als Lichtquellen werden Laser (Argonionenlaser, Laserdioden) verwendet, die monochromatisches kohärentes Licht liefern. Dieses wird mittels Linsensystemen in eine elliptische Form gebracht, deren Durchmesser eine einzelne Zelle vollständig und gleichmäßig beleuchtet. Das Licht wird von der Zelle gestreut, im Winkel von 90° aufgefangen (sideward scatter) ist es ein Maß für die Granularität der Zelle, im kleinen Winkel um die Strahlrichtung (foreward scatter) ist es ein Maß für die Größe und den Brechungsindex der Zelle. Da tote Zellen kleiner erscheinen als lebendige, kann damit auch eine Aussage über die Vitalität der Zelle gemacht werden. Zellen mit Autofluoreszenz oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen werden vom Laserlicht angeregt und senden Fluoreszenzlicht aus, das im rechten Winkel nach Wellenlängen gefiltert in Photomultiplerröhren gemessen wird.



Petra Schweizer

Abb. 38: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Diese Messungen erfolgen simultan während die Zelle in einem Flüssigkeitsstrahl durch eine Messkapillare fließt. Der Durchmesser des Anregungslichts muss größer als die Zelle sein, welche mittig hindurch fließt, so dass die Fluorochrome maximal angeregt werden und das gebeugte Licht (Streulicht) rein Partikel-abhängig ist. Dies erfordert eine exakte hydrodynamische Fokussierung, die durch zwei Flüssigkeitsströme, dem Hüll- und dem Probenstrom erzielt wird. Beide sollten den gleichen Brechungsindex haben. Durch den höheren Druck des äußeren Hüllstroms (sheath) wird der innere Probenstrom zu einem dünnen Faden ausgezogen, in dem die Zelle wie in einer Perlenkette aufgereiht den Laserstrahl im rechten Winkel kreuzen. Wichtig sind dabei laminare Strömungsverhältnisse. Diese setzen nicht verwirbelte Strömung durch glatte Oberflächen (Küvette und Schläuche) voraus.

Bei der Mehrfarbanalyse, z.B. bei der gleichzeitigen Verwendung mehrerer unterschiedlich fluorochromierter Antikörper, ist eine Auftrennung in Fluoreszenzspektren notwendig. Diese

wird durch sog. dichromatische Teilerspiegel und Bandpaßfilter erreicht. Das Ausmaß der Überlappung der Signale unterschiedlicher Fluorochrome (z.B. Fluorescein, Propidiumjodid, Dapi) hängt von deren Fluoreszenzspektren und von der Qualität der Filter ab. Je schmalbandiger die Filter umso geringer die vermeidbare Überlappung aber auch umso geringer die Fluoreszenzausbeute.

Die abgestrahlten Photonen werden im Hochspannungsfeld der Photomultiplerröhren (PMTs) als Strom gemessen und in Spannungsimpulse gewandelt, die vom Computer verarbeitet werden können. Die Messgeschwindigkeit hängt von der räumlichen Dichte der Zellen und von der Verarbeitungsgeschwindigkeit der Elektronik ab. Liegen die Ereignisse zu dicht beieinander, so werden während einer Vermessung (ca. 10.000 bilden die Messung einer Probe) zwei oder mehr Zellen beleuchtet und auf dem Bildschirm als ein Messpunkt registriert. Dies ist je nach Gerät und Zelldichte der Probe ab 2000-3000 Ereignisse pro Sekunde der Fall.

Manche Durchflusszytometer verfügen auch über eine Ausrüstung, mit der sie benutzerspezifizierte einzelne Zellen einer Probe trennen und sammeln können. Bei diesen Instrumenten wird das Durchflusszytometerrohr durch hohe Frequenzen eines piezoelektrischen Umwandlers zum Vibrieren gebracht, wodurch der mikroskopische Flüssigkeitsstrom beim Verlassen der Flüssigkeitskammer in einzelne Tröpfchen zerbricht. Wenn eine Zelle von Interesse den Punkt erreicht, wo das Tröpfchen abgespalten wird, wird es positiv oder negativ geladen. Während die Tröpfchen Stück für Stück zwei vertikale Deflektionsplatten passieren, leitet das elektrische Feld, das diese Platten abstrahlen, sie zu den richtigen benutzerspezifizierten Sammelbehältern. Ungeladene Tröpfchen fließen in den Abfallbehälter.

Literatur

1. Molecular Biology of the Cell
B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson
Garland Publishing Inc., New York & London, 1994 (3. Auflage)
(auch auf deutsch bei VCH)

Links

- [Cell-Cycle](#)