

Tab. 1.3 Zusammenfassung der wichtigsten lichtmikroskopisch beobachtbaren Veränderungen, die die unterschiedlichen Mitosephasen charakterisieren

Mitosephase	Charakteristische Merkmale und Veränderungen		
Prophase	Positionierung der Centrosomen an gegenüberliegenden Kernpolen	Kernhülle intakt	Chromatin Kondensation wird sichtbar
Prometaphase	Auflösung der Kernmembran	Chromosomen liegen ungeordnet im Cytoplasma	Aufbau der Mitosespindel
Metaphase	Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene		
Anaphase	Chromosomentransport zu den Centrosomen bzw. den Zellpolen		Ausbildung des kontraktilen Rings und anschließende Cytokinese
Telophase	Dekondensation der Chromosomen	Ausbildung neuer Kernhüllen	

Innenraum des Zellkerns. Dies ist Ausdruck der Chromatinkondensation und der Ausbildung von Metaphasechromosomen. Die Kernhülle ist noch intakt.

Prometaphase

Diese Phase beginnt, wenn die Kernhülle in kleine Vesikel zerfällt, an denen ein Teil der Lamine gebunden bleiben. Diese stellen eine Markierung dar, sodass bei der späteren Rekonstitution des Kerns die entsprechenden Vesikel verwendet werden. Hat sich die Kernhülle aufgelöst, liegen die Chromosomen zunächst ungeordnet im Raum zwischen den Centrosomen. Einige Mikrotubuli der beiden Centrosomen binden nun direkt an die Chromosomen und zwar an die Kinetochore am Centromer. Diese Mikrotubuli, es sind beim Menschen etwa 30 pro Kinetochor, nennt man Kinetochormikrotubuli. Sie verschieben die Chromosomen in die Äquatorialebene, die genau zwischen den Centrosomen liegt.

Metaphase

Neben den Kinetochormikrotubuli, die als einzige direkten Kontakt zu den Chromosomen haben, gibt es noch die Polar- oder Polmikrotubuli und die Aster- oder Astralmikrotubuli. Die Polarmikrotubuli ziehen vom Centrosom bis zur Äquatorialplatte, wo sie mit Polarmikrotubuli des anderen Centrosoms überlappen (Abb. 1.11). Die Astermikrotubuli verlaufen von der Äquatorialebene weg in Richtung Plasmamembran und werden dort verankert. Alle drei Mikrotubulusarten zusammen bilden die Mitosespindel. In der Metaphase wird die Spindel aufgebaut und die Chromosomen werden mithilfe der Kinetochormikrotubuli in der Äquatorialebene zur Metaphaseplatte sortiert und ausgerichtet. Hierbei ist wichtig, dass die Mikrotubuli, die an ein Kinetochor binden, alle von einem Centrosom kommen. Schaut man von der Position

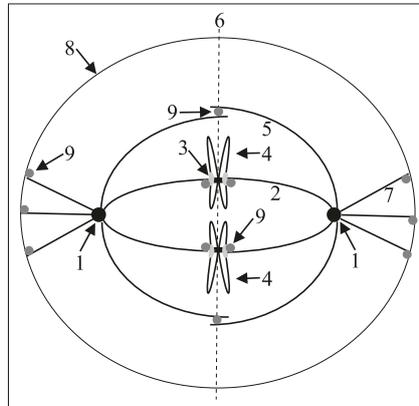


Abb. 1.11 Schematische Darstellung der aus Mikrotubuli aufgebauten Mitosespindel. Ausgehend von den Centrosomen (1) werden drei Arten von Mikrotubuli organisiert: die Kinetochormikrotubuli (2), die an das Kinetochor (3) der Chromosomen (4) binden, die Polarmikrotubuli (5), die sich im Bereich der Äquatorialebene (6) überlappen, und die Astermikrotubuli (7), die zur Plasmamembran (8) hin ausgerichtet sind. 9: verschiedene Motorproteine, auf deren Aktivität die Verteilung der Chromatiden während der Anaphase beruht

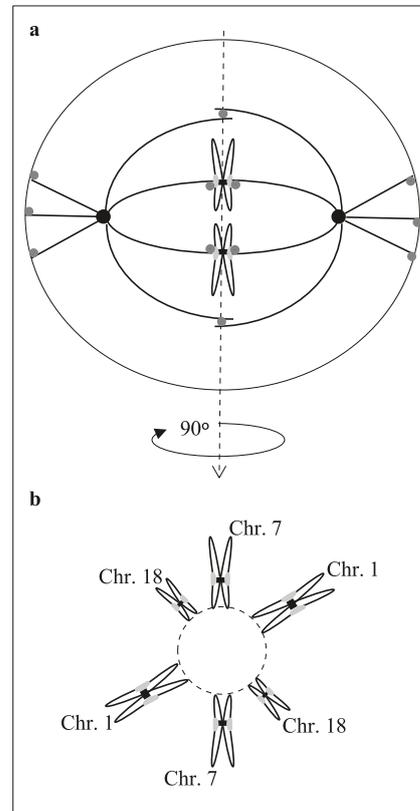
des Centrosoms auf die Äquatorialebene, sieht man, dass die Chromosomen im Kreis angeordnet sind, wobei sich die beiden homologen Chromosomen jeweils gegenüberliegen (Abb. 1.12b). Die Sortierung nimmt einige Zeit in Anspruch und ist mit einer dynamischen Längenänderung der Kinetochormikrotubuli verbunden. Die Metaphase ist in der Regel die längste Mitosephase.

Anaphase

Ist die Sortierung beendet, wird über den APC (*anaphase promoting complex*) ein Enzym, die Separase, aktiviert. Dieses Enzym spaltet die Cohesinkomplexe, sodass die Bindung der Chromatiden eines Metaphasechromosoms aufgehoben wird. In diesem Moment sieht man die Chromosomen, wie sie im Interphasekern in dekondensierter Form vorliegen, nämlich als einzelne Chromatiden.

An der Verbindung zwischen Kinetochormikrotubuli und Kinetochor des Chromatids sind Motorproteine beteiligt, die nun das Chromatid in Richtung Centrosom transportieren, während die entsprechenden Kinetochormikrotubuli depolymerisieren. Diesen Transportvorgang nennt man Anaphase A. Etwas zeitversetzt dazu werden die Centrosomen voneinander wegbewegt. Hierbei verlängern sich die Polarmikrotubuli, wobei Motorproteine im Überlappungsbereich dafür sorgen, dass diese jeweils in Richtung Centrosom verschoben werden. Gleichzeitig werden die Centrosomen durch weitere Motorproteine an den Astermikrotubuli zur Plasmamembran gezogen, wobei die Astermikrotubuli ebenfalls depolymerisieren. Die Bewegung der Centrosomen durch die Polar- und Astermikrotubuli nennt man Anaphase B.

Abb. 1.12 Schematische Ansicht der Äquatorialebene von der Seite (a) und nach Drehung der Spindel um 90° , sodass man vom Centrosom aus auf die Äquatorialebene schaut (b). Die Chromosomen (Chr.) sind in einem Kreis angeordnet und die homologen Chromosomen liegen sich gegenüber



Telophase

Am Ende der Verteilung des genetischen Materials werden die Chromosomen wieder mit einer Kernhülle umgeben, wobei Vesikel aus dem ursprünglichen Kern verwendet werden. Mit der Rekonstitution des Kerns ist die Kernteilung abgeschlossen.

1.8 Die Cytokinese

Während die Ana- bzw. Telophase abläuft, wird die Plasmamembran über der ehemaligen Äquatorialebene, also genau in der Mitte zwischen den Centrosomen, nach innen gezogen, sodass die Zelle allmählich eine sanduhrähnliche Gestalt annimmt. Auf der Innenseite der Plasmamembran sieht man an dieser Stelle im Elektronenmikroskop eine Proteinverdichtung, den sogenannten kontraktilen Ring. Mit entsprechenden Antikörpern kann man zeigen, dass dieser Ring hauptsächlich aus den beiden Proteinen Actin und Myosin besteht. Wie wir in Kap. 4 sehen werden, können diese beiden Moleküle zusammen eine Bewegung erzeugen. Am Ende trennen sich die beiden Zellhälften im Bereich des kontraktilen Rings und die beiden Tochterzellen werden freigesetzt. Damit ist die Zellteilung dann abgeschlossen.

1.9 Mikroskopie der Zellteilung

Zunächst ist es wichtig, dass man sich Zellkerne von Zellen, die nicht in der Mitose sind, lichtmikroskopisch anschaut. Hierzu eignet sich zum Beispiel ein mit Hämatoxylin und Eosin gefärbter Schnitt (HE-Färbung) durch die Leber (Abb. 1.13a–c'). Die Kerne sind in der Regel gut sichtbar und haben eine runde Form. In der hohen Vergrößerung sieht man Eu- und Heterochromatin, ein Nucleolus ist oft nur schlecht bzw. gar nicht zu erkennen.

In den meisten HE-Färbungen lassen sich die Zellgrenzen in der Leber gut ausmachen, sodass man auch beurteilen kann, wie viele Zellkerne es pro Zelle gibt. In den meisten Fällen sieht man, wie erwartet, einen Kern pro Zelle, doch in der Leber gibt es tatsächlich eine größere Anzahl zweikerniger Zellen. Im Prinzip können mehrkernige Zellen auf zwei Arten entstehen. Zum einen können mehrere Einzelzellen fusionieren. Beispiele hierfür sind die Skelettmuskelzellen oder die Osteoklasten. Allgemein spricht man dann von einem Syncytium. Zum anderen können sie durch eine Kernteilung ohne Cytokinese entstehen. Diesen Vorgang, durch den die zweikernigen Leberzellen entstehen, nennt man Amitose.

Mustert man 20–30 Leberzellkerne durch, beobachtet man einzelne Kerne, die besonders groß sind. Die normale Leberzelle hat einen diploiden Chromosomensatz, aber einige Zellen, die durch den Zellzyklus laufen, brechen ihn nach der S-Phase ab, sodass es weder zu einer Karyokinese noch zu einer Cytokinese kommt. Dieser als Endoreduplikation bezeichnete Prozess führt dazu, dass der Kern dann z. B. den vierfachen Chromosomensatz enthält (tetraploid) oder auch weitere Vielfache davon. Allgemein spricht man dann von polyploiden Zellen, die in der Leber meist als Reaktion von Organschädigungen auftreten. Polyploide Zellen kommen aber auch physiologisch vor, z. B. in Form der Megakaryocyten, die die Blutplättchen (Thrombocyten) produzieren. In Knochenmarkpräparaten oder Präparaten der Milz von Maus oder Ratte, in der ebenfalls Blutneubildung (Hämatopoese) stattfindet, sind diese Zellen gut zu sehen (Abb. 1.13d–f).

Zellen, die im Zellzyklus sind, aber die Mitose noch nicht erreicht haben, lassen sich rein morphologisch nicht identifizieren. Hierzu muss man spezielle Methoden einsetzen. Dazu gehört z. B. die Immunfärbung von Proteinen wie Ki67 oder PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), die sich bereits früh im Zellzyklus im Zellkern anreichern und dort bis zum Ende der G2-Phase nachweisbar bleiben (Abb. 1.14c, c'), oder die oben beschriebene Autoradiographie nach ³H-Thymidin Gabe, bei der spezifisch Zellen in der S-Phase dargestellt werden (Abb. 1.7 und 1.14a, b, b'). Diese Methoden werden auch vielfältig eingesetzt, um proliferative Zellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu erfassen.

Am Ende des Zellzyklus steht die Mitose, die aufgrund der Auflösung der Kernhülle und der Kondensation des Chromatins meist gut sichtbar ist. Die Mitose und ihre verschiedenen Stadien kann man sehr gut an Zwiebelwurzelspitzen beobachten, die in der Länge geschnitten und entsprechend gefärbt sind (Abb. 1.15a). Der Grund ist, dass die Äquatorialplatte hier im 90°-Winkel zur Längsachse der Zwiebelwurzel ausgerichtet

ist, sodass man die einzelnen Mitosefiguren praktisch immer von der Seite sieht, also so, wie sie auch im Schema gezeichnet werden. Die Zellteilung findet in der Wurzelspitze statt, wo die Zellen relativ klein sind und die Kerne und Mitosefiguren dicht beieinander lokalisiert sind, sodass dieser Bereich dunkler gefärbt erscheint. Oberhalb dieser Proliferationszone strecken sich die Zellen und differenzieren, sodass die Kerne weiter auseinanderliegen und die Struktur heller erscheint. Schaut man sich zunächst die Interphasekerne an, sieht man besonders deutlich die Nucleoli, wobei hier meist mehrere pro Kern vorkommen (Abb. 1.15b), was beim Mensch eher unüblich ist und nur bei einigen Tumoren beobachtet wird. Das übrige Chromatin sieht sehr homogen aus, eine Gliederung in Eu- und Heterochromatin ist praktisch nicht zu erkennen. Setzt mit Beginn der Prophase die Kondensation des Chromatins ein, sieht man dies an einem scholligen oder fädigen Chromatin bei intakter Kernhülle (Abb. 1.15c–c"). Wird der Moment eingefangen, in dem gerade die Kernhülle zerfallen ist und die Zelle so in die Prometaphase übergeht, sieht man ein Knäuel von Chromatinfäden ungeordnet in der Zelle liegen (Abb. 1.15d). Befindet sich die Zelle in der Metaphase, sieht man eine Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialplatte, wobei die einzelnen Chromatiden in Richtung der Centrosomen zeigen (Abb. 1.15e, e'). Trennen sich die Chromatiden in der Anaphase, werden sie aus der Äquatorialebene hin zu den Spindelpolen verschoben. Typisch sind zwei büschelartige Strukturen, die symmetrisch zur Äquatorialebene angeordnet sind und deren Chromatiden nun auf diese Ebene hin ausgerichtet sind (Abb. 1.15f–f"). Dies ist der Moment, in dem man auch ohne einen experimentellen Trick die Interphasechromosomen in ihrer Form als einzelne Chromatiden sehen kann. Die Telophase deutet sich an durch eine größere Distanz der Chromatidbüschel sowie eine undeutlicher werdende Darstellung der Chromatiden, die sich eher zu einer kleinen, kompakten Masse verdichten (Abb. 1.15g). Späte Anaphase und frühe Telophase gehen fließend ineinander über und überlappen sich mit der Cytokinese (Abb. 1.15h, h').

Etwas schwieriger als bei Zellen der Zwiebelwurzel lassen sich Mitosen in kultivierten Zellen beobachten, wie z. B. bei Explantatkulturen. Für solche Kulturen wird ein kleines Stück einer Hautbiopsie auf einen Objektträger gesetzt und über mehrere Tage in einem entsprechenden Medium kultiviert (Abb. 1.16a). Aus dem Gewebestück bewegen sich Zellen auf die Oberfläche des Objektträgers (Migration), um sich dort dann durch Proliferation zu vermehren. Auf diese Weise bildet sich um das ursprüngliche, explantierte Gewebestück ein Kranz von Zellen, die weiter migrieren und proliferieren. Nicht immer sind die Zellen gleich ausgerichtet und die Mitosefiguren sind auch nicht so prominent zu sehen, wie bei der Zwiebelwurzelspitze. Dennoch lassen sich Zellen in Mitose in relativ großer Zahl finden. Dabei macht man eine weitere interessante Beobachtung: Die in Mitose befindlichen Zellen sind abgerundet, während Zellen in der Interphase spindelförmig sind (Abb. 1.16b, b'). Tatsächlich runden sich Zellen auch im Gewebe kurz vor der Mitose ab, nicht zuletzt aufgrund der massiven Veränderungen des Cytoskeletts. Nach Abschluss der Mitose nehmen die Tochterzellen wieder die ursprüngliche Form der Ausgangszelle an und gliedern sich in den Zellverband, zu dem sie gehören, ein.

Abb. 1.13 **a** HE-Übersichtspräparat der Leber. Der markierte Ausschnitt enthält Anschnitte von Gefäßen und Gallengängen. Die Sternchen (*) markieren die Bereiche, in denen nach Leberzellen geschaut werden kann, die hier in Form von Leberläppchen organisiert sind. **b** Bei hoher Vergrößerung sieht man in den Kernen helle (Euchromatin) und dunkle (Heterochromatin) Bereiche, während Nucleoli nicht zu sehen sind. **c** In der mittleren Vergrößerung überblickt man eine größere Schar an Kernen, ebenso sieht man die Zellgrenzen oft sehr gut (gestrichelte Linie in **c**). **c** und **c'** geben den gleichen Ausschnitt wieder, aber mit unterschiedlichen Ebenen, auf die scharf gestellt wurde. Der Doppelpfeil in den beiden Bildern zeigt auf zwei Kerne, die zwar in zwei verschiedenen Ebenen aber in einer Zelle liegen, d. h., diese Zelle besitzt zwei Kerne, die durch Amitose entstanden sind. Vergleicht man die Größe der Kerne, stechen einige größere heraus (Pfeilspitzen in **c**). Hier handelt es sich um polyploide Zellkerne, die durch Endoreduplikation entstehen. **d** HE-Übersichtspräparat der Milz einer Maus. 1: weiße Pulpa. 2: rote Pulpa. **e** In der mittleren Vergrößerung sieht man in der roten Pulpa ausgedehnte Nester dicht gepackter, kleiner Zellen. Hier findet bei Nagern ebenfalls Blutbildung (Hämatopoese) statt. In diese Nester eingestreut erkennt man ungewöhnlich große Zellen (Pfeile), die Megakaryocyten, die für die Bildung der Blutplättchen (Thrombocyten) verantwortlich sind. **f** In der hohen Vergrößerung erkennt man den gelappten und ungewöhnlich großen Kern, der auf eine Polyploidie verweist (vgl. Zellkerne benachbarter hämatopoetischer Zellen (*))

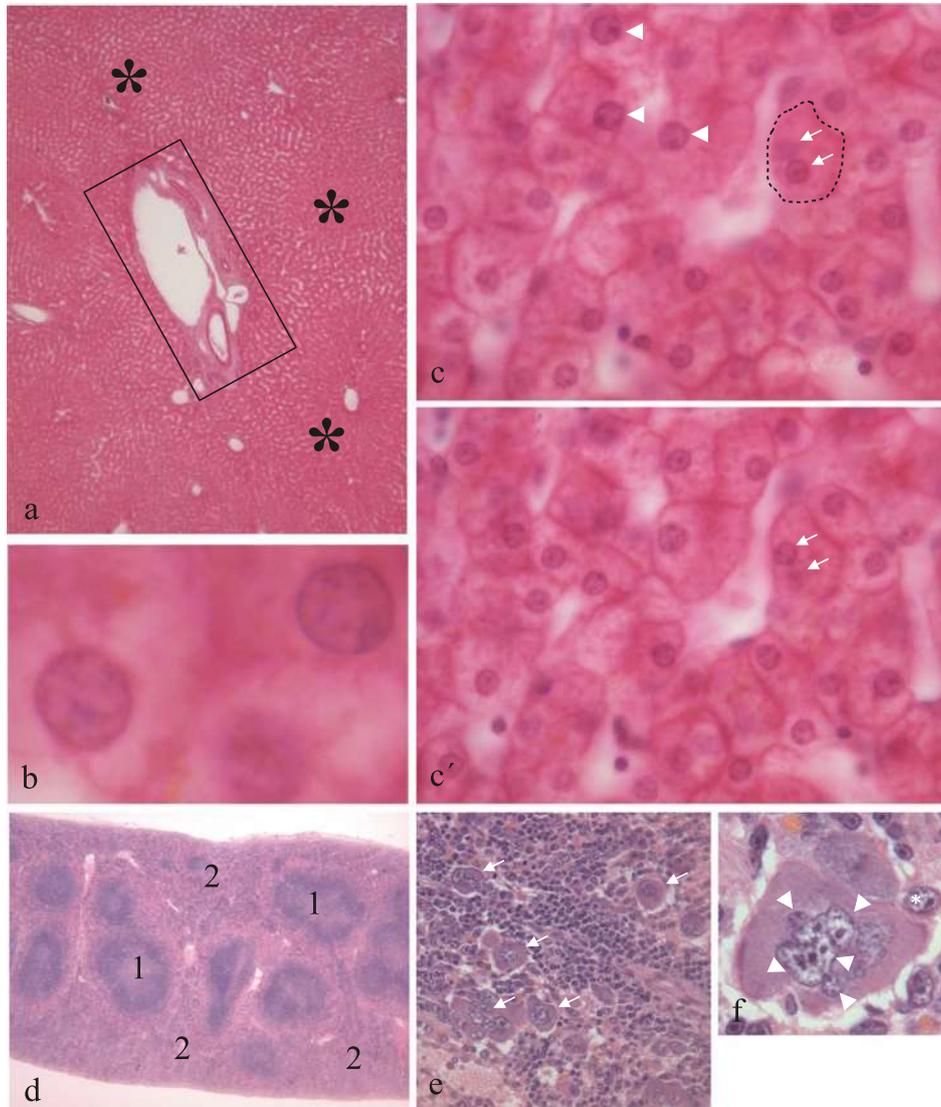


Abb. 1.14 Proliferierende Zellen im Darm nach Markierung mit ^3H -Thymidin für eine Stunde und anschließender Autoradiographie (Abb. 1.7) (**a–b'**) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen zellzyklusspezifische Kernproteine (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*) (**c, c'**). **a** HE-Übersichtspräparat des Dünndarms im Bereich des Duodenums. Die gestrichelte Linie markiert den Bereich, von dem aus das Epithel nach oben hin zu Zotten aufgefaltet und nach unten hin zu Krypten eingestülpt ist. Die Pfeile zeigen auf die Spitze einiger Zotten, die in ganzer Länge angeschnitten zu sehen sind. **b** Mittlere Vergrößerung, die den Übergang von Krypten und Zotten (gestrichelte Linie) deutlicher zeigt. Bereits in dieser Vergrößerung sieht man über einigen Kernen im Kryptenbereich schwarze Niederschläge, die sich bei hoher Vergrößerung (**b'** zeigt den in **b** markierten Ausschnitt) als Ansammlungen von Silberkörnchen darstellen. Diese Ansammlungen wurden durch die radioaktive Strahlung des in die darunterliegenden Zellkerne eingebauten ^3H -Thymidins induziert und zeigen an, dass diese Zellen sich während der Markierung in der S-Phase befanden. Außerhalb der Krypten finden sich im Epithel keine markierten Zellen, was zeigt, dass die Zellproliferation auf die Krypten, die eine Stammzellnische darstellen, beschränkt ist. Ein Teil der neu gebildeten Zellen verlässt die Krypte, bildet den epithelialen Überzug der Zotte und wandert bis zur Zottenspitze, wo die Zellen durch Apoptose zugrundegehen und so aus dem Epithel entfernt werden. Die Lebenszeit einer Darmzelle beträgt 72 h, sodass in den Krypten permanent Zellteilung stattfinden muss, um die abgestorbenen Zellen zu ersetzen. **c** Ein mit **b** vergleichbarer Ausschnitt, gefärbt mit einem Antikörper gegen PCNA und einer leichten Färbung der Kerne mit Hämatoxylin. PCNA erscheint im Zellkern von Zellen, die im Zellzyklus sind. Deshalb sind mehr Zellen gefärbt, als nach der Darstellung der Zellen in der S-Phase mit ^3H -Thymidin. **c'** In **c** markierter Ausschnitt. Einige positive Zellen können auch noch an der Zottenbasis beobachtet werden. Pfeile in **b'** zeigen auf eine Zelle in Mitose (späte Anaphase oder frühe Telophase). Da sich die Zelle abgerundet hat und aus dem Zellverband ausgeschert ist, liegen die Chromatiden nicht in der gleichen Reihe wie die übrigen Zellkerne

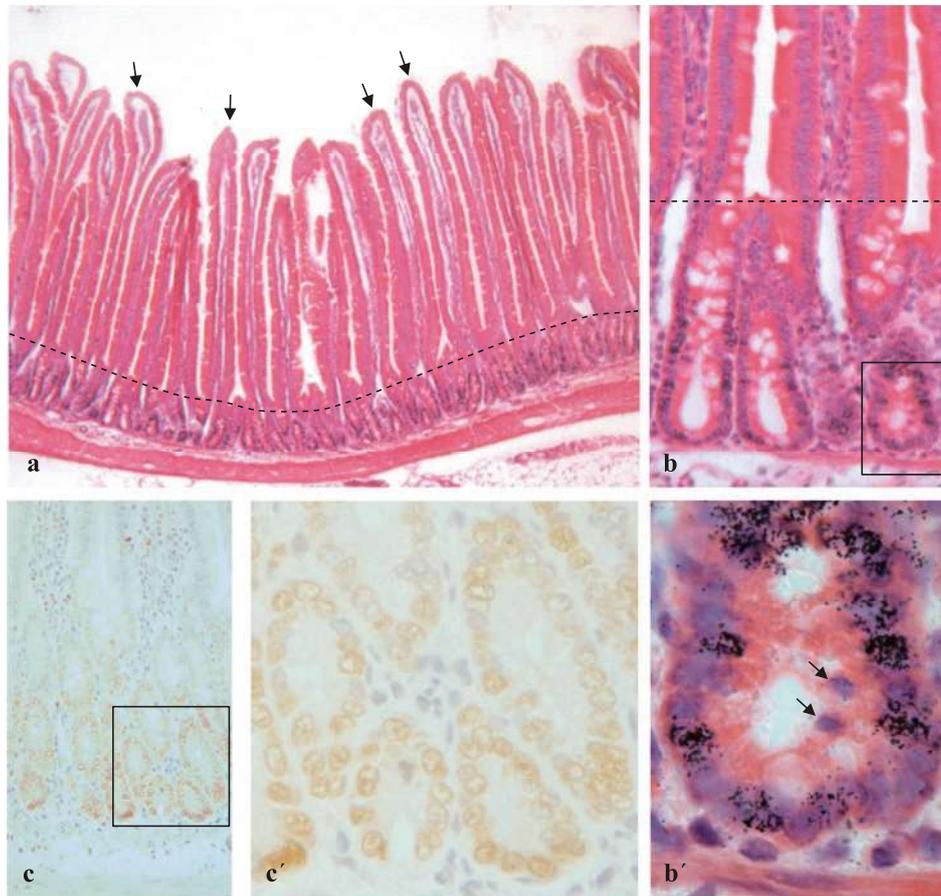


Abb. 1.15 Mitosestadien aus der Proliferation einer Zwiebelwurzelspitze, gefärbt mit Eisenhämatoxylin. **a** Übersicht, in der man an der Dichte der Kerne sieht, wo die Proliferationszone der Wurzelspitze in die Zone mit den differenzierten Zellen übergeht (gestrichelte Linie). **b** Interphasekerne. **c–h'** Die verschiedenen Mitosestadien (s. Text), zum Teil in mehreren Beispielen. Die Interphasekerne zeigen deutliche Nucleoli, meist mehr als einen pro Kern. In der frühen Prophase bleibt der Nucleolus teilweise noch sichtbar (**c**, **c'**), in der späten Prophase verschwindet er (**c''**). Die gestrichelte Linie in **e** und **e'** markiert die Position der Äquatorialebene. Alle Bilder haben dieselbe Vergrößerung, sodass man leicht sehen kann, dass die gerade entstandenen Tochterzellen (**h**, **h'**) deutlich kleiner sind als die differenzierte Zelle (**i**)