

# De celdeling; enige nieuwe en oude feiten en problemen

DOOR DR. J. JAMES\*

Het fenomeen van de celdeling, een naar het morfologisch gebeuren reeds tegen het einde van de vorige eeuw nauwkeurig beschreven verschijnsel, is nog in vele opzichten in mysteriën gehuld. De explosieve ontwikkelingen van de laatste twintig jaar in de frontgebieden van de microscopische celbiologie en de moleculaire biologie hebben nochtans het inzicht grondig verdiept omtrent deze voor het voortbestaan van één- en meercellige organismen essentiële processen. Doel van dit artikel is een kort overzicht te geven van de mede op grond van de genoemde ontwikkelingen ontstane fundamentele opvattingen begin 1970. Gezien de uitgebreidheid van het onderwerp (een monografisch overzicht van achttien jaar terug besloeg al meer dan 200 bladzijden, *Hughes*, 1952) kunnen niet meer dan enkele grepen worden gedaan.

Bij elk proces van deling bij de cellen van hoger ontwikkelde organismen onderscheidt men een kerndeling (*karyokinesis*) en een deling van het cytoplasma (*cytokinesis*). Deze twee processen zijn niet onverbrekelijk aan elkander gekoppeld, zoals blijkt uit het ontstaan van tweekernige cellen (bijvoorbeeld van de lever) uit eenkernige door karyokinesis zonder aansluitende cytokinesis. Bij de deling van het cytoplasma gaat het bij dierlijke cellen steeds om een insnoeringsproces; de starre wand van plantecellen maakt dit onmogelijk, de deling vindt hier plaats door het ontstaan van een scheidingswand tussen de dochterkernen.

Een kerndeling kan op drie verschillende manieren plaatsgrijpen, elk met een geheel ander verloop. Behalve de *amitose* of directe kerndeling — waarvan de betekenis en zelfs het vóórkomen bij zoogdieren op zijn minst een omstrede probleem vormt — en de specifiek aan de rijping van geslachtscellen gebonden *meiose* (het Griekse woord *meiósisis* betekent vermindering, namelijk de reductie tot een haploïde kern) is het vooral de *mitose* of indirecte kerndeling die voor de overgrote meerderheid van de delingen verantwoordelijk is bij meercellige organismen. De laatstgenoemde delingsvorm wordt vooral gekenmerkt (evenals die door middel van de *meiose*), doordat *chromosomen* zich als duidelijk afzonderlijke elementen in de kern gaan manifesteren. De mitose dankt hieraan ook zijn door *Flemming* gegeven naam (het Griekse woord

mitos betekent draad) iets dergelijks doet zich bij de amitose niet voor. In dat geval vindt een directe doorsnoering van de kern plaats via een „wespentaille”, waarbij een gelijkelijke verdeling van het genetische materiaal over de dochterkernen niet is gewaarborgd. De meer complexe gang van zaken bij de mitose, door *Mazia* (1961) schertsenderwijs eens met het libretto van een Italiaanse opera vergeleken, is vooral daarop gericht dat een dergelijke gelijkelijke verdeling zoveel mogelijk is gewaarborgd. Elke afwijking hiervan, vooral ook bij een jong embryo, zal immers, wanneer levensvatbare dochtercellen ontstaan, een sneeuwbal effect veroorzaken.

De grote lijnen van het gebeuren bij de mitose mogen bekend worden verondersteld, enkele essentiële details worden aan de hand van *figuur 1* kort samengevat.

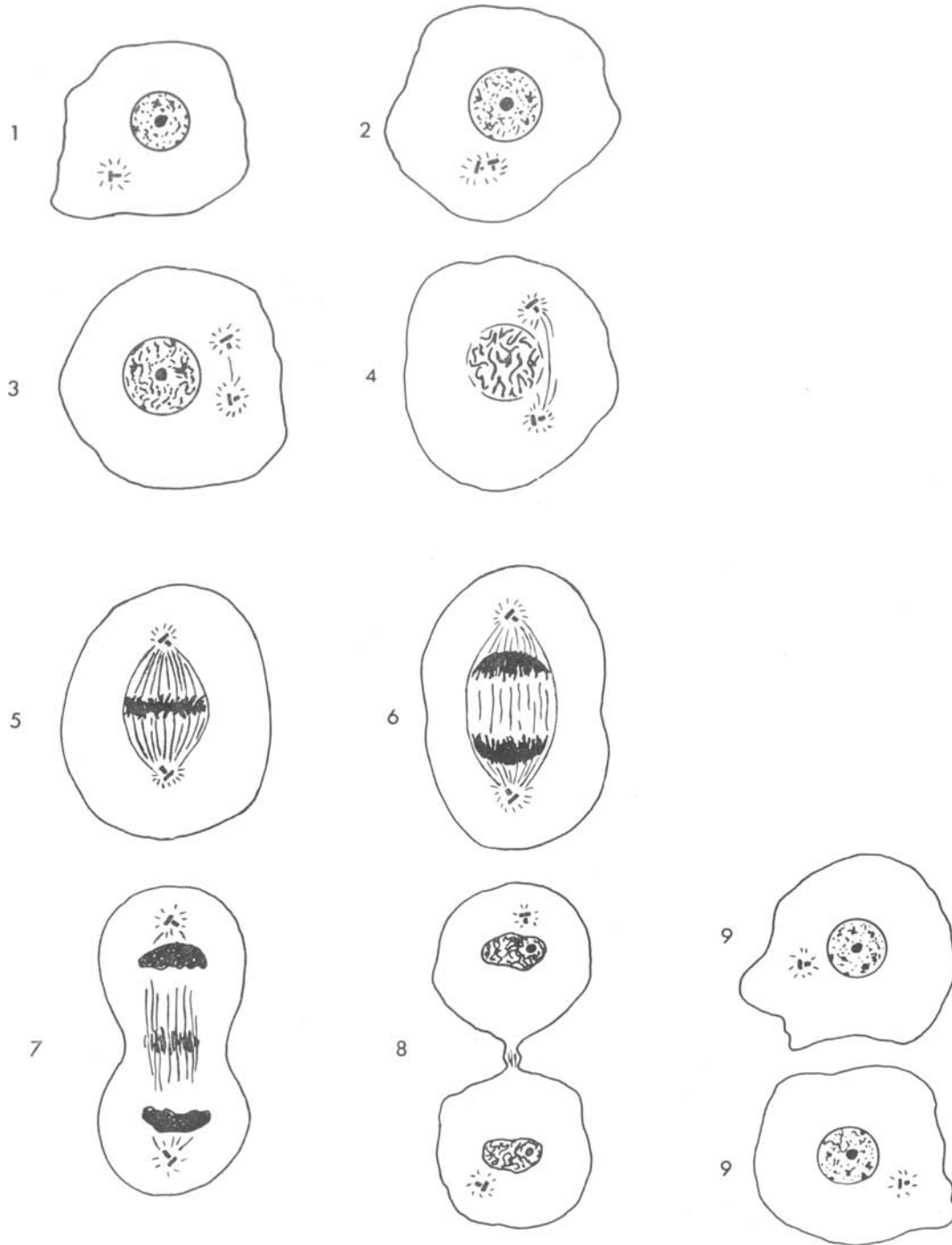
Het eerste teken van een beginnende mitose is de *profase*, waarbij in het chromatine van de kern een granulaar beeld ontstaat dat duidelijk is vergrofd ten opzichte van de niet-delende of interfasekernen (*figuur 1 : 3*). De rijen van puntjes voegen zich in het verdere verloop van de profase aanen tot chromosomen die zich steeds duidelijker als afzonderlijke elementen gaan aftekenen; aan het einde van de profase verdwijnt de kernmembraan. In gunstig materiaal (vooral bij grote plantechromosomen) is in de kern in een wat verder voortgeschreden profase te zien dat elk chromosoom uit twee helften of *chromatiden* bestaat die, aanvankelijk om elkander heengedraaid, geleidelijk een meer parallel stand gaan innemen.

Via de *prometafase*, een korte tussenfase waarin de nucleolus als zodanig verdwijnt (het materiaal van dit kernlichaampje wordt gedeeltelijk over de chromosomen uitgesmeerd) terwijl de chromosomen zich steeds verder verkorten en verdikken, komt het tot de *metafase* (*figuur 1 : 5*). In dit stadium rangschikken de chromosomen, nu in maximale contractietoestand, zich kransvormig in het equatoriale gebied van de cel. Behalve in het gebied van de zogenaamde *centromeren* (op een vaste plaats in elk chromosoom) zijn de nu geheel parallel gerichte chromatiden vrij van elkaar.

In de metafase-platen met geheel vrijliggende chromosomen, zoals men deze thans vaak ziet afgebeeld in medische tijdschriften om de een of andere chromosomale afwijking te illustreren, wijken de armen vanuit het centromeer ook nog uiteen,

\* Lector in de Algemene Cytologie, Universiteit van Amsterdam.

Figuur 1. Schematisch overzicht van de mitose: 1 cel (in de  $G_1$ -fase) met centriolenpaar; 2 cel (in  $G_2$ -fase, dus na de S-fase) met dubbel stel centriolen; 3 cel in vroege profase, uiteengaan van de centriolen; 4 eind profase, de nucleolus is nog aanwezig; 5 metafase met spoelfiguur; 6 anafase (spoelfiguur is iets verlengd); 7 vroege telofase: „midbody” in het interzonale gebied; 8 late telofase, onmiddellijk vóór het uiteengaan van de beide dochtercellen; 9 twee dochtercellen als bij 1.



zodat de chromosomen enigszins de vorm van een X verkrijgen (figuur 2c). Dit is echter een kunstmatig effect, optredend bij speciale behandeling van huid- of bloedcultures die voor cytogenetisch onderzoek worden gebruikt. Wanneer een dergelijke behandeling met *colchicine* (voor het tot stilstand brengen van de mitose in de metafase) en een hypotone zoutoplossing (om de cellen te doen opzwellen waardoor de chromosomen worden uiteengedreven) niet plaatsvindt, liggen de chromatiden dichter bijeen en zijn de chromosomen niet goed afzonderlijk waar te nemen (figuur 2b).

In coupes van niet-gekweekte delende cellen is de situatie nog veel ongunstiger, dan zijn de chromosomen slechts als één kransvormig bijeenliggende massa te zien (figuur 2a). Hierin is dan ook een van de redenen gelegen dat pas omstreeks 1960, toen deze nieuwe cytologische technieken tot ontwikkeling kwamen, het karyotype („chromosomenportret”) van de mens definitief is komen vast te staan. Het vóór 1960 algemeen aanvaarde aantal van 48 voor een diploide kern (teruggaande op waarnemingen van Painter uit de jaren twintig in door platdrukken van cellen uiteengedreven metafasen uit de testis) berust op een dwaling: het zijn er 46.

De *anafase* begint per definitie wanneer de chromatiden ook in het centromeer-gebied van elkan- der losraken en de nu als dochter-chromosomen aan te duiden helften van de metafase-chromosomen met de centromeren voorop uiteen bewegen met een snelheid van circa 1 tot 2 micron per minuut.

Het mechanisme van de anafase-beweging is nog steeds een zeer omstreden kwestie, waaromtrent meer speculatieve theorieën dan nuchtere feiten bestaan. Zeker zijn hier drie factoren in het spel, namelijk 1: de uiteendrijvende krachten grijpen in het centromeergebied van de chromosomen aan; 2: de vezels van de spoelfiguur spelen een nog niet geheel duidelijke rol (de anafase treedt niet op wanneer bijvoorbeeld door *colchicine* de vorming van de spoelfiguur wordt tegengegaan) en 3: de krachten die de anafase-beweging veroorzaken zijn waarschijnlijk ook verantwoordelijk voor de evenwichtstoestand in de metafase. Wat betreft dit laatste punt zou het geheel dan zijn te vergelijken met touwtrekken tussen gelijkwaardige partijen, waarbij op een gegeven moment het touw in het midden wordt doorgesneden.

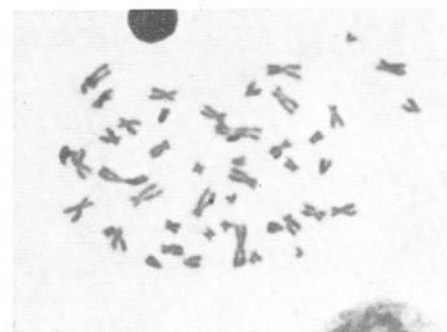
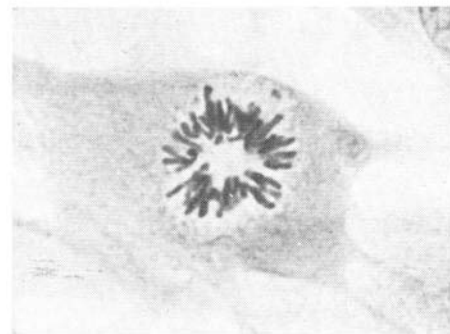
De vrij langdurige (bij de mens 30 tot 40 minuten durende) *telofase* (figuur 1: 7 en 8) leidt dan uiteindelijk tot het ontstaan van twee dochtercellen waarbij, al gaat dit niet in detail op, in omgekeerde volgorde geschiedt wat in de profase is gebeurd: opnieuw ontstaan van kernmembraan en nucleoli, decondensatie van de chromosomen. De in de loop van de prometafase tot ontwikkeling gekomen spoelfiguur gaat nu geleidelijk in regressie. Deze spoelfiguur, lichtmicroscopisch in vivo aan te tonen met het polarisatiemicroscop, bestaat uit in de

profase ontstane, alleen met het elektronen- microscop waarneembare microtubuli: fijne cilindervormige strengen met een doorsnede van circa 200 Å, uit kleinere eenheden van één bepaald eiwit- type opgebouwd.

Zeer recent zijn tussen deze microtubuli voor- komende dwarsverbindingen beschreven die door *McIntosh en medewerkers* (1969) een rol worden toebedeeld bij de anafase-beweging van de spoel- figuur, op een wijze vergelijkbaar met de moderne

*Figuur 2a, b en c. Microfoto's van metafase-figuren in cellen van de mens, gefixeerd in Darlington en gekleurd met de Feulgen-techniek (bij a en b met lichtgroen nagekleurd); vergroting ongeveer 1.000-maal.*

- Schuin onder-aanzicht van een metafase in een crypte van het jejunum-epitheel.*
- Metafase (gezien langs de as door de polen) in een weefselculture van menselijke fibroblasten.*
- Als b, doch na behandeling vóór de fixatie met een hypotone zoutoplossing (tot een derde met aqua destillata verdund zoutmengsel volgens Hanks), waardoor de celmatrix tussen de chromosomen opzwellt.*



voorstelling over het mechanisme van de spiercontractie.

Van het vóór het ontstaan van de spoelfiguur reeds verdubbelde centriolenpaar blijft één bijeengelegen stel van deze grotere, buisvormige elementen (waarvan de wanden ook weer uit op een bepaalde wijze gerangschikte elementen zijn opgebouwd) in elke dochtercel achter (*figuur 1:8 en 9*). Dit centriolenpaar zal zich bij een volgende deling opnieuw gaan delen en, na uiteengaan in twee paren weer de centra vormen voor een nieuwe spoelfiguur; er kan derhalve worden gesproken van een cyclus van de centriolen (*Robbins en medewerkers, 1968*).

Door een progressieve insnoering vanuit het equatoriale gebied komt nu de cytokineses tot stand, bij welk proces de tussen de dochterkernen gelegen resten van de spoelfiguur een nog niet geheel duidelijke rol spelen. Bij plantecellen, die door hun rigide cellulose-wanden een dergelijke insnoering niet kunnen ondergaan, ontstaat een scheidingslaag in het gebied van de zogenaamde celplaat, midden in het interzonale gebied, door nieuwvorming van een stel plasma-membranen.

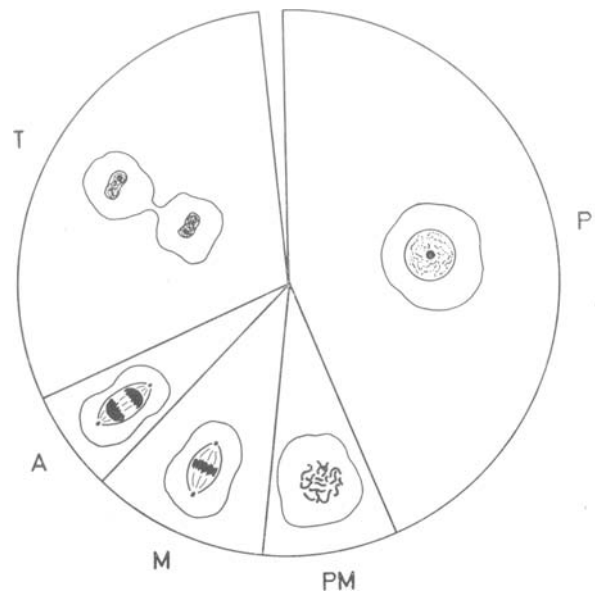
Door de insnoering van het cellichaam bij de dierlijke cytokineses (*figuur 1:7*) worden in het equatoriale gebied verzamelde organellen zoals mitochondria, in min of meer gelijke aantallen over de dochtercellen verdeeld. De beide dochtercellen verschillen na afloop van de telofase in zoverre van de moedercel, dat zij aanzienlijk kleiner zijn. Zij kunnen, voorzien van organellen voor synthese en energie-omzetting en het volledige genetische informatie-apparaat, snel in deze achterstand voorzien. Tenslotte valt nog op te merken, dat — ook bij tot een aanengesloten formatie gerangschikte cellen zoals in epitheel — vanaf de late profase tot de telofase de cel als geheel tijdelijk een meer afgeronde vorm krijgt (*figuur 1*).

Verskillende fenomenen rondom de mitose beginnen zich in de tegenwoordige tijd duidelijker af te tekenen.

In tegenstelling tot wat ongeveer twintig jaren terug werd aangenomen, wordt de celdeling niet meer als een op zichzelf staand gebeuren gezien, maar als een onderdeel van een cyclus, waarin elke cel van het lichaam zich bevindt. Naar gelang het om een zich snel delende populatie gaat, zoals in embryonaal weefsel, dan wel om een traag delend celtype, zoals in het leverparenchym van een volwassene, bestaan er aanzienlijke verschillen in de lengte van de gehele kringloop, de zogenaamde *generatiecyclus*, uiteenlopend van 16 tot 18 uur tot maanden of jaren.

Door middel van enkele ingenieuze technieken, die nog terloops zullen worden besproken, is gebleken dat in deze cyclus een aantal fasen voorkomen in een vaste volgorde. De meeste van deze fasen hebben daarbij een in de tijd zeer beperkte variatieduur, terwijl er één periode is die zeer grote variaties in het tijdsverloop heeft. Wanneer men deze cyclus beschouwt als een cirkelgang, waarvan

*Figuur 3. Overzicht van de relatieve tijdsduur van de verschillende mitosefasen. P: profase; PM: pro-metafase; M: metafase; A: anafase; T: telofase.*



de omloopsduur van geval tot geval kan variëren, is aan de hand van *figuur 3* hieromtrent het volgende vast te stellen.

De eigenlijke mitose of M-fase is een proces dat van profase tot en met telofase één tot enkele uren kan duren: ziet men af van de situatie bij bepaalde primitieve eencelligen met een van die bij de hogere planten en dieren afwijkende bouw van kern en cytoplasm, dan kan men zeggen dat deze tijdsduur in de gehele levende natuur vrij constant is. Bij een gemiddelde cel in een menselijk orgaan kan worden gerekend dat deze M-fase  $1\frac{1}{2}$  tot  $2\frac{1}{2}$  uur duurt; bij de tuinboon *Vicia faba* neemt de mitose — die, afgezien van een afwijkend verloop van de cytokineses en het ontbreken van centriolen, op analoge wijze plaatsvindt — een tijdsduur van ruim twee uur in beslag bij  $20^{\circ}$  Celsius.

Daar de technieken, noodzakelijk om dit nauwkeurig te bepalen bij de mens alleen in gekweekte cellen kunnen worden toegepast, moet men hier met meer grove schattingen genoegen nemen. Er zijn echter geen redenen om aan te nemen dat de situatie bij de mens in dit opzicht aanzienlijk zou verschillen van die bij andere grote zoogdieren. In beide genoemde gevallen, en in vrijwel alle daartussen gelegen, neemt de profase meer dan de helft van de tijd in beslag en de telofase een kwart tot een derde (*figuur 3*). De andere fasen duren derhalve maar kort, de anafase bijvoorbeeld slechts 5 tot 10 minuten, waarbij de pakketten dochterchromosomen over een afstand van 5 tot 10 micron uiteen bewegen. Al deze tijds- en ruimterelaties zijn, met een zekere mate van variatie, in de levende natuur vrij constant (*Brown en Bertke, 1969*).

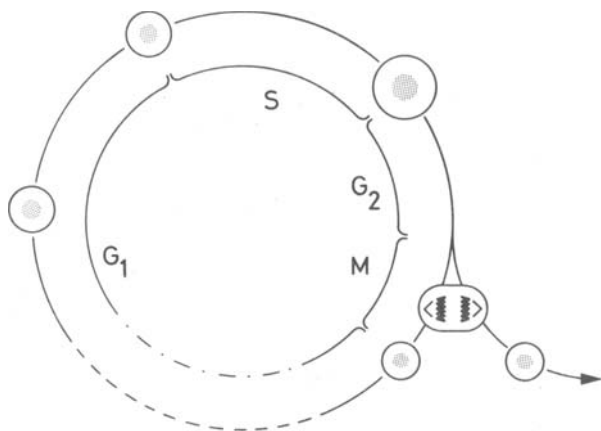
Zoals blijkt uit *figuur 4* is de mitose als fase waarin het delingsproces zich afspeelt een in de tijd korte schakel in het geheel van de cyclus; de voorbereidingen voor de mitose hebben tevoren in de interfase plaatsgehad. Deze aan de mitose obligaat voorafgaande processen zijn niet zonder meer aan een bepaalde kern in de interfase — waarmede niet meer wordt bedoeld dan een kern die niet de direct waarneembare veranderingen van de mitose ondergaat — af te lezen.

Wanneer in een celkern op generlei wijze voorbereidingen voor een komende deling kunnen worden aangetoond (men zou kunnen zeggen gedurende de interfase in engere zin) spreekt men van de  $G_1$ -fase (*figuur 4*). Deze fase is de grote variabele in de gehele cyclus; bij een minimum duur van enkele uren (bijvoorbeeld in snel groeiende cultures) is de maximale duur van deze fase vrijwel onbeperkt. Bij cellen met een geheel verdwenen delingsvermogen, zoals de neuronen van het zenuwstelsel (waarbij zelfs de centriolen zijn verloren gegaan) duurt deze fase, na de laatste delingen in de embryonale periode eigenlijk even lang als het gehele verdere leven. In dergelijke gevallen, waar de straal van de cirkel van *figuur 4* eigenlijk als oneindig groot is te beschouwen, spreekt men in plaats van over de  $G_1$ -fase (wat dus een vervolg impliceert) liever van de  $G_0$ -fase. Afgezien van dit speciale voorbeeld, is er als regel wel sprake van een vervolg en is dus de  $G_1$ -fase inderdaad een „gap”, waarvan de letter G dan ook is afgeleid.

Het teken par excellence van een naderende celdeling is het begin van de verdubbeling van het genetische materiaal, het desoxyribonucleïnezuur, bij internationale conventie afgekort tot DNA, in de chromosomen.

De synthese van het DNA (eigenlijk: replicatie, dat wil zeggen verdubbeling, met behoud van de in de structuur van het DNA-molecule opgeslagen er-

*Figuur 4. De generatiecyclus van een eukaryotische cel; uitleg van de symbolen in de tekst.*



felijke informatie) in de chromosomen vindt *uitsluitend* plaats in de scherp af te grenzen syntheseperiode of S-fase, tezamen met de vorming van bepaalde basische eiwitten (histonen) die met nog weer andere, minder scherp te karakteriseren eiwitten het chromosoomskelet opbouwen. Synthese van het voor de transmissie en transcriptie van de in het DNA besloten informatie essentiële ribonucleïnezuur of RNA, alsmede van andere eiwitten dan die van het histontype worden in alle fasen gevonden, met een dieptepunt gedurende de mitose.

De synthetische activiteit van de kern is tijdens de S-fase overigens wel groot; de kern neemt tijdens deze periode ook duidelijk in grootte toe (*figuur 4*), al is er geen sprake van verdubbeling. Deze S-fase neemt bij de meer complex georganiseerde kernen van zogenaamde *eukaryotische* cellen een tijdsduur van 6 tot 9 uur in, onafhankelijk van het aantal chromosomen. Voor een fibroblast van het onderhuidse bindweefsel duurt deze fase circa 8½ uur, bij de reeds eerder vermelde tuinboon *Vicia faba* 7½ uur bij 20° Celsius.

Na deze periode stopt de synthese volkomen, in tegenstelling tot de situatie bij vele zogenaamde *prokaryotische* cellen (bepaalde eencellige organismen met een primitieve bouw van kern en cellichaam, zoals bacteria), waar de kortdurende S-fase en deling elkander in snel tempo opvolgen. Bij de eukaryotische cel volgt na de S-fase een korte rustfase, de  $G_2$ -fase, voordat de mitose begint. Deze fase heeft meestal een duur van 2 tot 5 uur; zo bedraagt in een snel groeiende haarbulbus deze periode 1 uur (*Bullough, 1963*), in een weefselculture van menselijke fibroblasten circa 2 uur, in een worteltop van de boon *Vicia faba* 4 tot 5 uur. In sommige gevallen kan een cel langer in deze periode blijven „hangen”, een situatie die goed moet worden onderscheiden van de toestand van *polyploidie*, waarbij een permanente verdubbeling van het aantal chromosomen optreedt, zoals bij vele celkernen in de zoogdierlever (*Meinders-Groeneveld, 1969*).

In de  $G_2$ -fase van een diploïde kern is wel het DNA verdubbeld, het aantal chromosomen (weliswaar uit twee identieke helften bestaande) is echter niet vergroot. Na de  $G_2$ -periode zet de mitose in en wordt een nieuwe fase van de generatiecyclus ingeleid die, afhankelijk van de positie van de cel in het weefsel, orgaan en organisme, na korte of lange tijd (in *figuur 4* door een stippellijn gesymboliseerd) in de  $G_1$ -periode, weer tot een nieuwe S-,  $G_2$ - en M-fase leidt.

\* \* \*

Bij de in het eerste gedeelte van dit globale overzicht beschreven processen die tezamen de generatiecyclus vormen, bleken S-fase en  $G_2$ -fase aan zekere grenzen binnen de tijd gebonden. Afgezien van bijzondere situaties, zoals bij het ontstaan van chromosomen die uit vele parallele filamenten zijn

opgebouwd (polytene chromosomen, zoals in de speekselklieren van bepaalde insecten) en de reeds besproken polyplöide kernen, wil dit dus zeggen dat als regel een aangevangen S-fase binnen een bepaald tijdsbestek tot een mitose zal leiden. Daar bij het begin van de mitose het DNA-histon complex (en vele andere hoedanigheden van de cel eveneens) reeds is verdubbeld, verkrijgt de mitose meer het karakter van een opgewonden uurwerk dat afloopt dan dat van een autonoom proces. Daarbij komt dat de energie die een cel nodig heeft tijdens de deling reeds vóór die deling in een gemakkelijk te verbruiken vorm aanwezig moet zijn (*Bullough, 1962*).

Wanneer men spreekt over mitose-bevorderende stoffen kan men deze gedachtengang thans niet meer loslaten: zonder S-fase geen mitose! Met het zoeken naar de factoren, die van invloed zijn op de mitose is de aandacht hierbij dan ook gedeeltelijk verschoven naar het begin van de S-fase, waarbij als het ware de gehele machinerie op gang komt. Al te star moet men deze koppeling inmiddels ook niet zien; zo zijn er — waarschijnlijk onder hormonale invloed tot stand komende — schommelingen in de duur van de G<sub>2</sub>-fase, waardoor ritmische variaties in de mitotische activiteit van een weefsel mede kunnen worden bepaald.

Hoezeer het eigenlijke begin van de mitose nog afhankelijk is van tal van andere — grotendeels nog onbekende — factoren die de cel als geheel betreffen, leert onder meer het experiment van *Prescott (1956)* bij amoeben. Hierbij werd aangetoond dat een op handen zijnde celdeling vrijwel ongelimiteerd kon worden uitgesteld door steeds een stukje van het cytoplasma af te halen. Wat betreft het inzetten van de S-fase, is gebleken dat dit bij een gegeven toeneming in massa van een cel, op een zeker moment plaatsvindt zonder dat op grond van de thans bekende gegevens hiervoor circumscrip te veranderingen verantwoordelijk kunnen worden gesteld. Het toenemen in massa (dat wil zeggen dus vooral eiwitmassa) lijkt essentieel: remming van de eiwitsynthese voorkomt het inzetten van de S-fase en deling treedt niet op (*Verbin en medewerkers, 1969*). Dit is overigens zelfs in een weefselculture, waar de omstandigheden wel veel gunstiger zijn dan bij een celpopulatie in een organisme, zeer moeilijk te analyseren. Er zijn op dit gebied pas de eerste bescheiden vorderingen gemaakt, toen het gelukte de cellen van een culture door verschillende ingrepen vrijwel gelijktijdig in de M-fase te krijgen. Helaas gelukt deze zogenaamde synchronisatie bij eukaryotische cellen zelden volkomen of voor een lange tijd; het is echter een vruchtbaar werkterrein (vgl. *Sinclair, 1969*).

Uit het voorafgaande zal duidelijk zijn geworden hoezeer gemakkelijk gehanteerde begrippen als mitose-bevordering of mitose-remming in feite uitermate complexe verschijnselen betreffen. Toch is dit een bijzonder belangrijk gebied, waarmede met name ook het geneeskundige onderzoek zich

heeft bezig te houden bij de bestudering van fenomenen als groei, wondgenezing of gezwellgroei. In het laatste decennium zijn enkele hierbij in het geding zijnde factoren iets duidelijker geworden.

In de eerste plaats blijkt meer en meer dat alle cellen die in staat zijn tot deling (de neuronen van het zenuwstelsel vallen dus hierbuiten) eigenlijk *geen* specifieke stimulans nodig hebben om dit proces te kunnen volvoeren. Verwant hiermede is de stelling dat groei en deling basale celfuncties zijn, waarvan zou kunnen worden verwacht dat zij — mits de metabole omstandigheden dit toelaten — zich ononderbroken zouden voltrekken in de kortst mogelijke tijd. Dit is wat inderdaad voorkomt bij vele eencellige organismen in een adequaat voedingsmedium en bij cultures in een gunstige fase van de groei. Wanneer, zoals bij de meeste cellen van een volwassen organisme, de generatietijd aanzienlijk langer is dan de minimale tijd van circa 16 tot 18 uur, moeten er remmende factoren zijn die dit bepalen en gaat het bij een „mitosestimulatie”, zoals bij de wondgenezing, dus in feite om een ontremmingseffect.

Door *Srinivasan (1964)* werd aangetoond, dat een deblokkering van het begin van de DNA-synthese in lensepitheelcellen bij konijnen na een lokaal aangebrachte verwonding zich als een concentrische golf over het lensepitheel voortplantte met een snelheid van 17 micron per uur. Wat ook de aard van dit stimulerende, of liever ontremmende factorencomplex moge zijn, het gaat hier dus wel degelijk om een aantoonbaar effect, waarvan het belang met name ook voor de pathologie (gezwellen!) niet gauw zal worden overschat. De complexiteit van het geheel wordt verder onderstreept door het feit, dat de factoren die blijkbaar van invloed zijn op generatie-periode en mitosefrequentie weefsel-specifiek zijn: wat betreft de huid zijn er zelfs argumenten om aan te nemen dat de mitose-remmende en -bevorderende factoren verschillen, naar gelang het de epidermis, de haarfollikels dan wel het dermale bindweefsel betreft (*Bullough en Laurence, 1960*).

Een ander nieuw aspect, dat aan dit geheel is toegevoegd, is de wederzijdse beïnvloeding van cellen onderling in een weefsel: het contact tussen cellen onderling oefent via de zogenaamde contactinhibitie ook een remmend effect uit op de delingsactiviteit, een factor die bijvoorbeeld kan wegvallen bij explantatie van een celgroep en mogelijk ook bij het ontstaan van gezwellen. Enige jaren geleden zijn voor dit laatste verschillende goede argumenten aangevoerd: de normaliter optredende remming in cellulaire activiteit bij het ontstaan van contactpunten tussen cellen in een fibroblast-culture wordt niet gevonden bij bepaalde gekweekte sarcoomcellen (*Abercrombie en Ambrose, 1962*).

Voor zover momenteel kan worden overzien, oefenen diverse de mitose remmende factoren hun invloed vooral uit vóórdat dit proces begint; mits

de noodzakelijke energie in de juiste vorm voorhanden is en de voorbereidingen zijn voltooid, lijkt een eenmaal begonnen mitose steeds te worden afgemaakt. Hoewel spontane stoornissen in de mitose voorkomen, is dit een vrij zeldzame gebeurtenis; het kan bij het jonge embryo leiden tot sneeuwbal-effecten wanneer bijvoorbeeld doordat twee chromatiden niet uiteengaan bij de anafase en beide chromosomen in één van beide dochterkernen terecht komen, hierbij een cel met een abnormaal chromosomengarnituur ontstaat, welke cel dan tot verdere delingen in staat blijkt.

De uit één dergelijke cel voortgekomen kloon kan — indien dit verschijnsel in een vroeg embryonaal stadium plaatsvindt — aanleiding geven tot een opbouw van het latere organisme uit velden van cellen met verschillende genetische constitutie: het *mosaïcisme*. Delingen met grovere afwijkingen van de meest uiteenlopende aard, zoals multipolaire mitosen, brugvorming met gestoorde anafase-beweging enzovoort komen spontaan slechts uiterst zelden voor; bij door ioniserende stralingen getroffen weefsels en ook bij tumoren worden al deze afwijkingen veel vaker aangetroffen (een overzicht hierover werd bijvoorbeeld door Venema, 1962, opgesteld).

Hoezeer ook een mitose kan „mislukken”, waarbij het eindproduct kan bestaan uit ongelijkwaardige dochterkernen of weer één kern, de contractiecyclus van de chromosomen wordt als regel afgemaakt. Geheel andere effecten dan deze „spontane” storingen van de mitose worden verkregen met behulp van de *mitose-vergiften*, een uiterst complexe groep van stoffen, die op zeer verschillende wijzen in het proces van de mitose kunnen ingrijpen (overzicht bij Kihlman, 1966).

Men kan deze celvergiften grofweg indelen in:

- a: stoffen die de S-fase blokkeren (bijvoorbeeld 5-fluorodioxuryridine);
- b: stoffen die de vorming van de spoelfiguur remmen (colchicine, urethaanderivaten) of de verdubbeling van de centriolen voorkómen (mercaptoethanol);
- c: stoffen die op andere wijze de totstandkoming van een anafase-beweging verhinderen (stikstofmosterd, methaansulfonaten, Myleran).

Hoewel sommige van deze agentia een plaats hebben gevonden bij de behandeling van gezwellen en leukemie, blijft steeds het probleem bestaan, dat het om farmacologische effecten gaat waarvoor ook normale mitosen gevoelig zijn. Bij de geringste dosering boven een bepaald niveau dreigt dus blokkade van de voor het leven van dag tot dag noodzakelijke mitotische activiteit, bijvoorbeeld in het beenmerg en in het darmkanaal, terwijl een lagere dosis dan weinig of geen effect heeft. Het vroeger bij jicht toegepaste alkaloid colchicine gaf bij overdosering aanleiding tot het ontstaan van darmbloedingen; mogelijk houdt dit verband met het feit dat in de epitheelcellen van het darmkanaal

bij de mens een zo hoge vervangingssnelheid wordt onderhouden, dat de generatiecyclus van deze cellen circa 24 uur moet bedragen (Lipkin, 1965). Bij de muis is de produktie van epitheelcellen van het darmkanaal voldoende om de gehele bekleding van de dunne darm in 1½ tot 2 dagen te vervangen.

Colchicine en andere stoffen met soortgelijke effecten op de celdeling (dat wil zeggen blokkade van de deling in de metafase doordat een spoelfiguur niet is gevormd of niet functioneert en derhalve geen anafase-beweging optreedt) worden in de cytologie en histologie dagelijks gebruikt. Doordat men gedurende een bepaalde periode — zolang de bloedspiegel hoog genoeg is en de cel niet de brui eraan geeft en één (polyploide!) dochterkern formeert — alle delende cellen die tot aan de metafase zijn gekomen als voor een stuwdam kan ophopen, is het aantal metafase-figuren in een weefsel van een proefdier dat bijvoorbeeld vier uur voor het doden met colchicine is behandeld, veel groter dan bij onbehandelde dieren. Men doet aldus immers de metafase veel langer duren dan de 5 tot 10 minuten die er normaliter voor staan en waardoor in een delend weefsel vooral de profasen en telofasen domineren (*figuur 4*).

Van dit effect wordt gebruik gemaakt zowel om metafasen op te hopen, bijvoorbeeld voor de analyse van de chromosomen in een bloedcelculture van patiënten voor cytogenetisch onderzoek (*figuur 2*), alsook om een beter beeld te verkrijgen van de mitose-frequentie op een bepaald moment in een weefsel. Door de verlenging van de metafase-duur met behulp van colchicine verkrijgt men een beeld van alle kernen die, in het hierboven gegeven voorbeeld, de laatste vier uur vóór de fixatie tot aan de metafase zijn geraakt. Door het aantal — door sterke contractie van het chromosomenpakket herkenbare — zogenaamde C-mitosen te tellen, verkrijgt men een veel nauwkeuriger beeld van de mitosefrequentie dan met de klassieke mitotische index (aantal delingsfiguren per 1.000 cellen).

De aldus met colchicine of hiermee verwante stoffen (Tannock, 1967) verkregen zogenaamde *stathmokinetische index* van een weefsel moge een goede maat geven voor de delingsfrequentie ter plaatse op een gegeven moment, het geeft geen directe informatie over de generatietijd en de afzonderlijke fasen hiervan, al is over de vervangingssnelheid wel een en ander af te leiden. Daar de G<sub>1</sub>-, S- en G<sub>2</sub>-fasen zich in de interfase afspelen en niet tot enigerlei morfologische verandering aanleiding geven, moet nog worden uiteengezet, hoe gegevens kunnen worden verkregen over de duur van deze fasen en ook van de eigenlijke mitose (voor zover het gaat om niet direct te vervolgen delingen), waarover in het voorafgaande allerlei waarden zonder meer zijn vermeld. De vraag is nu, waar in de cyclus men als het ware „vat” op een cel kan krijgen om het verdere lot van zulk een cel te vervolgen.

Hiervoor kan men in de eerste plaats gebruik

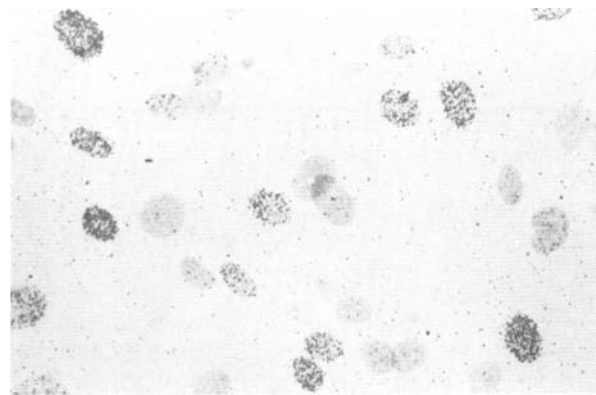
maken van het feit, dat het kern-DNA in de S-fase juist wordt verdubbeld. Sedert enige tijd is het in bepaalde celpopulaties mogelijk de hoeveelheid DNA in gehele celkernen met behulp van de zogenaamde microfotometrie vrij nauwkeurig te meten. In de G<sub>2</sub>-fase zal dus een tweemaal zo grote hoeveelheid DNA in de kern aanwezig zijn als in de G<sub>1</sub>-fase, terwijl — naar gelang het voortschrijden van de synthese - tijdens de S-fase waarden tussen die van G<sub>1</sub> en G<sub>2</sub> zullen worden gevonden (James, 1964). Ook andere parameters van de cel, zoals de grootte en het totale eiwitgehalte van cel en kern, veranderen gedurende de S-fase (figuur 1), doch er is niet van een zo exacte verdubbeling sprake.

Om enkele redenen zijn echter deze metingen alléén niet bruikbaar voor het vervolgen van het gedrag van de cel in zijn generatiecyclus, al was het maar omdat met deze methode slechts één momentopname kan worden gemaakt. De enige methode om het verdere lot van een cel in een populatie nauwkeurig na te gaan is om deze cel op een bepaald punt in de cyclus te merken zonder hem te doden en dan na korte of lange tijd zijn verder lot te bezien. Deze merking kan men „blind” verrichten door inspuiting bij een proefdier (of toediening aan het medium bij een culture) van het nucleotide thymidine, radioactief gemaakt door een ingebouwd H<sub>3</sub> (tritium)-aatom. Dit gemerkte thymidine wordt door een celkern in de S-fase als het ware in dank aanvaard en als organische base thymine in de nieuwe half-ketens van de beide dochterchromatiden ingebouwd.

Daar de halveringstijd van het tritium veertien jaar bedraagt, zal deze kern, zolang het radioactieve thymidine niet wordt gehalveerd door het optreden van een nieuwe S-fase zonder aanwezigheid van radioactief thymidine, zich blijven „verraden” door radioactieve straling, temidden van kernen die tijdens het toedienen van het H<sub>3</sub>-thymidine niet in de S-fase verkeerden. De radioactiviteit kan worden opgespoord door een dunne fotografische emulsie over het microscopische preparaat aan te brengen. Na een zekere inwerkings-tijd („belichting”) kan, na ontwikkeling van de emulsie, met het microscoop op het preparaat worden ingesteld, waarbij de radioactieve celkernen zich aftekenen doordat hierover een korreling is gelegen (figuur 5). Deze techniek heet *autoradiografie*, ook wel radioautografie.

Behalve voor het nagaan van incorporatie van H<sub>3</sub>-thymidine, kan de autoradiografie ook voor de incorporatie van gemerkte aminozuren in eiwitten worden gebruikt. Wat betreft de situatie van *figuur 5*, hier is gefixeerd na een kortdurende toediening („flash-labelling”) van H<sub>3</sub>-thymidine; de gemerkte kernen verkeren derhalve alle in de S-fase of in het eerste begin van de G<sub>2</sub>-periode. Zonder dat wordt ingegaan op allerlei details hieromtrent (voor een uitvoerige discussie zie *Baserga*, 1965) is in te zien dat, indien men niet tien minuten doch

*Figuur 5. Autoradiogram van een weefselcultuur van menselijke fibroblasten, gefixeerd na een incubatie van 10 minuten met H<sub>3</sub>-thymidine; Feulgen, 120 x.*



langere perioden wacht na inspuiting (respectievelijk toediening aan de kweekvloeistof) van H<sub>3</sub>-thymidine en telling van de aantallen kernen met en zonder radioactiviteit in en buiten de mitose, bepaling van de tijdsduur van S-, G<sub>2</sub>- en M-periode mogelijk wordt en op den duur de gehele generatiecyclus kan worden beschreven in de tijd. Op deze wijze zijn ook de in het eerste gedeelte genoemde gegevens over generatiecycli zonder uitzondering bepaald. Ook is een combinatie van DNA-meting en H<sub>3</sub>-thymidine incorporatie zeer efficiënt.

Wat betreft de beschrijving in de tijd van de verschillende fasen van de mitose, hierbij is de situatie in zoverre geheel anders, dat het gaat om veranderingen die bij bepaalde cellen onder het microscoop kunnen worden vervolgd. De kennis hierover wortelt dan ook in veel vroegere tijden; bij plantaardige weefsels werd de mitose omstreeks 1850 in principe al nauwkeurig beschreven op grond van het vervolgen van delingen in worteltoppen door W. Hofmeister, een boekhandelaar uit Leipzig, later hoogleraar in de plantkunde in Heidelberg. *Flemming* publiceerde in 1882 met een inmiddels al weer verbeterde microscoop en op grond van waarnemingen in gefixeerd en gekleurd materiaal een nauwkeurige analyse van de mitose in dierlijke cellen.

De vervolging per continuïtatem van een deling, bijvoorbeeld met fasecontrast- of polarisatiemicroscoop heeft in de tegenwoordige tijd een optimale registratie gevonden bij de tijdsprongfilm, waarbij bijvoorbeeld één beeldje per minuut wordt gefotografeerd en de filmstrook later met een snelheid van 22 beeldjes per seconde afgedraaid. Het overzichtelijke analyseren van het gebeuren dat op deze wijze mogelijk is, heeft onschatbare wetenschappelijke waarde; daarnaast is het ook zeer instructief. Het enige nadeel is dat de niet uitdrukkelijk hiervoor gewaarschuwde toeschouwer van de



ze (enkele honderden malen versnelde!) opnamen de indruk overhoudt, dat chromosomen zich door elkaar bewegen als de leden van een Bulgaarse dansgroep. Wie het dan in werkelijkheid ziet, merkt pas bij zorgvuldige fixering van de blik, dat er trage bewegingen plaatsvinden, zoals men ervaart bij beschouwing van de wijzers van een klok.

Een vraag die tenslotte nog zal worden gezien is wat er nu eigenlijk gebeurt bij het proces van de mitose ten aanzien van de optredende veranderingen in de chromosomen. Op dit gebied zijn de laatste vijf jaar belangrijke vorderingen gemaakt, die in het kort zullen worden aangeduid.

In de eerste plaats moet worden ingegaan op de structuur van de chromosomen in de interfasekern, het chromatine dus. Anders dan in vroegere jaren, beschouwt men het chromosoom thans als te zijn opgebouwd uit op zichzelf niet met het lichtmicroscopisch aantoonbare (doorsnede 200-230 Å = 0.020-0.023 μ) filamenten die, ordeloos dooreenliggend als niet afzonderlijk waarneembare elementen de kern doorkruisen. Deze filamenten, die doorgaans vele malen langer zijn dan de diameter van een kern (de lengte van deze draden kan gaan tot honderden micra, afhankelijk van de grootte van het chromosoom) hebben op sommige plaatsen een dicht ineengeslingerde structuur (figuur 6), wat overigens in het geheel niet een regelmatige spiralisatie behoeft te zijn.

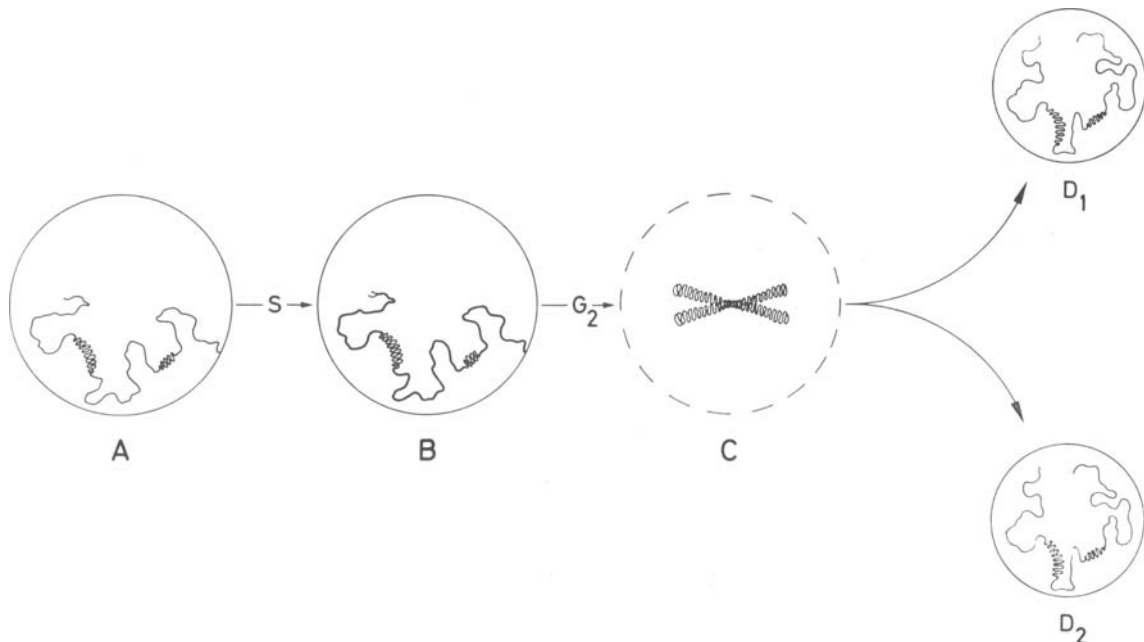
Deze zogenaamde heterochromatische gebieden zijn licht- en elektronenmicroscopisch als homo-

geen donker kleurende, respectievelijk elektronenstrooiende, grote of kleine gebieden te herkennen. Een bekend voorbeeld is het totaal heterochromatische gedrag van één van beide X-chromosomen bij de vrouw, het geslachtschromatine of lichaampje van Barr, dat bij alle zoogdieren voorkomt. Veelal gaat het echter om kleinere gedeelten van chromosomen; door de fixatie wordt het beeld nog verder vergrofd, zodat grotere chromatineklompjes ontstaan. Wanneer een kern in de S-fase gaat, verdubbelt zich — zoals in het voorafgaande werd besproken — de dubbele helix van het DNA tegelijkertijd met bepaalde eiwitten in het chromosoomfilament.

In figuur 6 is het filament na de S-fase dikker getekend; het gaat hier om een schematische weergave, daar de componenten van het filament (DNA en minstens twee types eiwitten) niet alle in de S-fase worden gesynthetiseerd. Ook om andere redenen kan men (nog) niet een duidelijk morfologisch onderscheid maken tussen chromosoomfilamenten vóór en ná de S-fase.

Bij het begin van de mitose worden de filamenten van alle afzonderlijke chromosomen synchroon samengetrokken tot steeds dichtere, kortere en bredere elementen, die nu ook lichtmicroscopisch duidelijk als afzonderlijke lichamen kunnen worden waargenomen. De opbouw van een metafase-chromosoom uit dicht opeengepakte lissen en lussen van een dun filament is thans ook elektronenmicroscopisch onomstotelijk bevestigd. Men heeft

Figuur 6. Schematische voorstelling van de meest recente opvatting over de verhoudingen rondom het chromosoom-filament in en om de mitose. De bij A, B en D zichtbare sterk ineengedraaide gebieden betreffen heterochromatische chromosoomdelen. Alle verhoudingen ten aanzien van lengte en dikte van de filamenten zijn sterk geschematiseerd. A: celkern in de G<sub>1</sub>-fase; B: aan het eind van de S-fase; C: maximale contractietoestand (rond de metafase); D<sub>1</sub> en D<sub>2</sub>: dochterkernen in de G<sub>1</sub>-fase na de deling.



hierbij wel van de coupe-techniek moeten afstapen (*DuPraw*, 1968).

Voor zover momenteel bekend, heeft het filament (in theorie is het niet zeker te stellen dat het één filament is; dit is echter wel waarschijnlijk) hier meestal ook geen strikt ordelijke ligging met 1e, 2e en 3e orde spiralen enzovoort. Dit is vroeger wel in incidentele gevallen bij sommige planten aangetoond met lichtmicroscopische methoden, hetgeen overigens betekent dat men hierbij reeds heeft te maken met een gecontraheerd filament; men heeft in het verleden deze streng geordende spiraliserie te zeer als het ideale model beschouwd. Naar verschillende nieuwe onderzoeken (onder meer met röntgendiffractie) hebben aangetoond, bestaat een dergelijke rigoreuze ordening wel op moleculair niveau in de structuur van het DNA-eiwitcomplex; voor de microscopische dimensies behoeft dit echter geenszins op te gaan.

Na scheiding van de chromatiden in de anafase, waarbij de dochterchromosomen ontstaan, zullen in de telofase de filamenten zich weer ontwarren en ontspannen en als individuele elementen in het chromatine opgaan. Alleen die gebieden waar heterochromasie optreedt, welke eigenschap voor bepaalde chromosomen of chromosoomdelen genetisch strikt is vastgelegd, blijven als het ware achter bij dit decompensatieproces. Zij treden nu weer als grotere of kleinere afzonderlijke chromocentra als de bekende donker kleurende klompjes in het chromatine naar voren, waardoor dit weer het onregelmatig-gekorrelde aspect verkrijgt dat zo typisch is voor de interfase-kern.

Abercombie, M. en E. J. Ambrose (1962) The surface properties of cancer cells: a review. *Cancer Res.* 22, 525-548.

Baserga, R. (1965) The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: a review. *Cancer Res.* 25, 581-595.

Brown, W. V. en E. M. Bentke. *Textbook of Cytology*. The

- C. V. Mosby Co, Saint Louis, 1969.
- Bullough, W. S. (1962) The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* 37, 307-342.
- Bullough, W. S. (1963) Analysis of the life-cycle on mammalian cells. *Nature* 199, 859-862.
- Bullough, W. S. en E. B. Laurence (1959/60) The control of epidermal mitotic activity in the mouse. *Proc. Roy. Soc. B* 151, 517-536.
- DuPraw, E. J. *Cell and molecular biology*. Academic Press, New York - London, 1969.
- Flemming, W. *Zellsubstanz, Kern- und Zelltheilung*. Verlag F. C. W. Vogel, Leipzig, 1882.
- Hughes, A. *The mitotic cycle*. Butterworths, London, 1952.
- James, J. (1964) Intermitotic transformation of the Barr body in cultured cells of the human female. *Z. Zellforsch.* 64, 178-188.
- Kihlman, B. *Actions of chemicals on dividing cells*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1966.
- Lipkin, M. (1965) Cell replication in the gastrointestinal tract of man. *Gastroenterology* 48, 616-624.
- Mazia, D. Mitosis and the physiology of cell division. In: *The Cell*, vol. III. Ed. J. Brachet and A. E. Mirsky, Academic Press, New York - London, 1961.
- McIntosh, J. R., P. K. Hepler, D. G. van Wie (1969) Model for Mitosis. *Nature* 224, 659-663.
- Meinders-Groeneveld, J. Enige kwantitatieve aspecten der polyploidie. *Academisch proefschrift*, Amsterdam, 1969.
- Prescott, D. M. (1956) III. Changes in nuclear volume and growth rate and prevention of cell division in *Amoeba proteus* resulting from cytoplasmic amputations. *Exp. Cell Res.* 11, 94-98.
- Robbins, E., G. Jentzsch en A. Micali (1968) The centriole cycle in synchronized hela cells. *J. Cell Biol.* 36, 329-339.
- Sinclair, W. K. Methods and criteria of mammalian cell synchrony. In: *Normal and malignant cell growth*. Ed. R. J. M. Fry, M. L. Griem and W. H. Kirsten, Springer Verlag, Heidelberg - New York, 1969.
- Srinivasan, B. D. Chromosome duplication and the cell cycle in lens epithelium. (1964) *Nature* 203, 100-101.
- Tannock, I. F. A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. (1967) *Exp. Cell Res.* 47, 345-356.
- Venema, G. An experimental study in the origin of abnormal mitosis in tumours. *Academisch proefschrift*, Groningen, 1962.
- Verbin, R. S., R. J. Sullivan and E. Farber (1969) The effects of cycloheximide on the cell cycle of the regenerating rat. liver. *Lab. Invest.* 21, 179-182.