

# Apoptose: Kontrolle des Zellsterbens ist lebenswichtig

Der programmierte Zelltod, Apoptose genannt, gehört momentan zu den am intensivsten bearbeiteten Themen der Medizin und modernen Biologie. Diese Entwicklung spiegelt sich in den bisher über 50 000 Publikationen (Quelle: ISI – Web of Science) wider. Einige der neuesten Fortschritte in diesem sich schnell entwickelnden Feld werden im Folgenden zusammengefasst.

## Zellsterben gehört zum Leben

Der Begriff Apoptose beschreibt das koordinierte Absterben einer Zelle. Dieser Prozess beginnt mit dem Schrumpfen der Zelle, dem Ausbilden von Ausstülpungen der Cytoplasmamembran (membrane blebbing), der Fragmentierung von Proteinen sowie der genomischen DNA, und schließlich kommt es zum Auflösen der Zelle in membranumschlossene Vesikel, apoptotische Körperchen genannt. Diese werden rasch von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen, so dass zelluläre Inhaltsstoffe der absterbenden Zelle nicht dem Immunsystem präsentiert werden und es im Allgemeinen nicht, wie bei dem ungeplanten Zelltod durch Nekrose, zu Entzündungsreaktionen kommt. Apoptose wird daher auch der „leise“ Zelltod genannt (Abbildung 1).

Der Enthusiasmus über diese Entdeckungen verstärkte sich, als offensichtlich wurde, dass Apoptose, neben Zellteilung und -differenzierung, einen essentiellen Bestandteil des Lebens für jeden multizellulären Organismus darstellt, und dass zugrunde liegende Mechanismen vom Wurm bis zum Menschen konserviert sind. So erfolgt während der Embryonalentwicklung die Formgebung von Körper und Organen durch Apoptose, beispielsweise werden die Häute zwischen Zehen und Fingern apoptotisch entfernt. Sowohl das Nervensystem als auch das Immunsystem entstehen durch eine enorme Überproduktion von Zellen, gefolgt vom Tod solcher Zellen, die keine funktionellen synaptischen Verbindungen etablieren oder die keine Antigen-spezifität aufweisen.

Apoptose ist notwendig, um unseren Körper von geschädigten oder mit Pathogenen befallenen Zellen zu befreien; sie ist aber auch erforderlich, um eine Immunantwort wieder herunterzuregulieren oder autoaggressive Immunzellen zu beseitigen. Um die Größe von Organen konstant zu halten (Homöostase), muss die durch Proliferation verursachte Zunahme der Zellzahl durch das parallele Absterben von Zellen ausgeglichen werden. So kommt es, dass in Ihrem Körper Millionen von Zellen absterben, während Sie diesen Artikel lesen. Jeden Tag werden ca. 10 Milliarden Zellen im Menschen unter kontrollierten Bedingungen eliminiert. Diese Beispiele verdeutlichen eindrucksvoll die Bedeutung des programmierten Zelltodes für das (Über-)Leben.

Obwohl der spontane Zelltod bereits Ende des 19. Jahrhunderts als eine physiologische Funktion der Zelle beschrieben wurde, ist es erst in den letzten Jahren gelungen, die genetische Steuerung dieses Programms zu beleuchten. Das Vernichten von solch großen Mengen an Zellen, wie oben beschrieben, muss strikt überwacht werden und ist zweischneidig, da sowohl zu wenig als auch zu viel Zelltod pathologische Konsequenzen wie Entwicklungsstörungen, Autoimmunerkrankungen, Neurodegeneration oder Krebs mit sich bringen. Es ist also nicht überraschend, dass man eifrig forscht, um zu verstehen, warum welche Zelle wann wie stirbt, und wie man mit Pharmaka bestimmte Schritte in diesem Prozess manipulieren kann.

## Die Regulation der Apoptose ist komplex und vielschichtig

In Abhängigkeit von der Art des Zelltyps, des auslösenden Reizes und den Wachstumsbedingungen werden verschiedene Mechanismen, die das Apoptose-Programm auslösen, initiiert. Letztendlich führen alle Signale zur Aktivierung einer Familie von Proteasen, den Caspasen (cystein-specific aspartate proteases). Diese Enzyme spielen sowohl bei der Weiterleitung des Zelltod-auslösenden Stimulus (Initiator-Caspasen) als auch bei der Auflösung der Zelle (Effektor-Caspasen) eine entscheidende Rolle.

Man unterscheidet heute zwischen drei unterschiedlichen Signalwegen. Bei dem extrinsischen oder Typ I-Weg werden Zellmembranrezeptoren, die Todesrezeptoren, aktiviert. Die Bindung von Liganden (Apo/Fas/CD95-Ligand, Trail, TNF) an diese Rezeptoren führt zur Bildung des multimeren Komplexes Disc (death inducing signaling complex) und zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10.

Für einen alternativen Weg, den intrinsischen oder Typ II-Weg, sind die Mitochondrien der Zellen die zentralen Schaltstellen. Bis vor kurzem waren Mitochondrien ausschließlich als „Kraftwerke“ der Zelle bekannt. Es wird nun immer deutlicher, dass diese Organellen auch in der Apoptose entscheidende Funktionen erfüllen. Ein zentrales Protein der Atmungskette in den Mitochondrien, das Cytochrom C, ist auch ein elementarer Faktor für das Auslösen der Apoptose.<sup>1)</sup> Bei Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Weges öffnen sich Membranporen der äußeren Mitochondrienmembran und setzen pro-apoptotische Faktoren (Cytochrom C u. a.), die sich zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran befinden, ins Cytoplasma frei. Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie beeinflussen die Freisetzung positiv oder negativ. Die exakten molekularen Mechanismen sind bis heute wenig bekannt. Man weiß allerdings, dass die Freisetzung von

Cytochrom C sowohl mit als auch ohne eine gleichzeitige Depolarisation der Mitochondrienmembran stattfinden kann (Abbildung 2).<sup>2)</sup>

Im Cytoplasma bindet Cytochrom C an Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) und aktiviert zusammen mit dATP (desoxy-ATP) die Caspase-9. Eine Vielzahl weitere Proteine reguliert diesen Komplex, Apoptosom genannt. Auch der extrinsische Apoptoseweg über die Todesrezeptoren kann durch das Protein Bid die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien initiieren und damit den Prozess der Apoptose amplifizieren. Bid wiederum wird durch Caspase-8 gespalten und aktiviert.

Im vorigen Jahr wurde ein dritter, durch Stress ausgelöster Signalweg identifiziert. Dabei wird Calcium aus dem intrazellulären Speicher, dem Endoplasmatischen Retikulum, freigesetzt und die Caspase-12 aktiviert.<sup>3)</sup> Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose auslösenden Wege ist schließlich die Aktivierung der Caspase-Kaskade, denn das verursacht die Fragmentierung der genomischen DNA, die Zerstörung des Zytoskeletts und das Verpacken der Zelle in apoptotische Körperchen, die durch benachbarte oder einwandernde Makrophagen phagozytiert werden.

## Regulation des Apoptosoms

Die Freisetzung von Apoptose fördernden Molekülen aus den Mitochondrien ist ein kritischer Schritt für die Weiterleitung apoptotischer Signale. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Liste der Substanzen, die die Mitochondrienmembran permeabilisieren können, immer länger wird. So wirken Ceramide, die Apoptose in neuronalen Vorläuferzellen auslösen,<sup>4)</sup> auf Mitochondrien. Proteine der Bcl-2-Genfamilie löchern die Mitochondrienmembran entweder, indem sie mit einem Porenkomplex (permeability transition pore complex) interagieren (z. B. Bax) oder aber unabhängig von solch einer Interaktion wirken (z. B. Bid).<sup>5)</sup> Die pro-apoptotische Proteinkinase C $\delta$  wandert ebenfalls im Cytoplasma zu den Mitochondrien<sup>6)</sup> und löst Apoptose aus.

Überraschend ist jedoch die Entdeckung, dass auch die beiden Transkriptionsfaktoren TR3 und p53 aus dem Zellkern zu den Mitochondrien diffundieren. Wie andere Mitglieder der Steroid-/Thyroid-Rezeptor-Supergenfamilie ist TR3 ein Transkriptionsfaktor mit einer zentralen Zinkfinger-DNA-bindenden Domäne flankiert von Transaktivator-Domänen. Da sein Ligand noch nicht identifiziert ist, gehört TR3, auch Nur77 oder NGFIB genannt, zu den Orphan-Rezeptoren. TR3 kann sowohl Homodimere als auch mit anderen Rezeptoren dieser Familie, besonders mit dem 9-*cis*-Retinsäure-Rezeptor (RXR), Heterodimere ausbilden.

Gewöhnlich werden TR3 und RXR nach ihrer Synthese in den Zellkern transportiert. Unter bestimmten Bedingungen jedoch kann TR3 wieder ins Cytoplasma gelangen. Das beendet die Transaktivator-Funktion von TR3 und auch von RXR, welches zusammen mit TR3 den Zellkern verlässt. Wie John Reed und Kollegen jetzt zeigen konnten, transloziert TR3 zu den Mitochondrien, permeabilisiert die äußere Membran und verursacht so die Freisetzung von Cytochrom C und damit Apoptose.<sup>7)</sup>

Ein weiterer Transkriptionsfaktor (p53), von dem man annimmt, dass er Apoptose durch die Expression von pro-apoptotischen Genen auslöst, wandert ebenfalls vom Zellkern zu den Mitochondrien, wo es mit Hsp 70, einem Hitzeschockprotein, interagiert.<sup>8)</sup> Obwohl der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wurde bisher schon demonstriert, dass p53 wie TR3 die Mitochondrienmembran löchert und dadurch Apoptose auslösen kann. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 kann den Effekt dieser Proteine hemmen. Die überraschenden Ergebnisse, zusammengefasst in der Abbildung 2, zeigen also, dass Transkriptionsfaktoren wie TR3 und p53 keine Fremden für Mitochondrien sind, zumindest, wenn es um die Weiterleitung letaler Signale geht. Die subzelluläre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren fügt also eine weitere Ebene der Regulation von Apoptose hinzu.

## Hsps unterdrücken Apoptose

Einer anderen Klasse von Proteinen, den Hitzeschockproteinen (Hsps), konnte nun ebenfalls eine Funktion bei der Kontrolle apoptotischer Prozesse zugeordnet werden. Die Expression von Hsps dient dem Schutz der Zelle und wird durch eine große Anzahl von Stressfaktoren wie Temperaturerhöhung induziert. Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass Hsps die Aggregation von Proteinen inhibieren oder Proteine für den proteolytischen Abbau markieren. Gleich mehrere Gruppen zeigten im letzten Jahr, dass Hsps auch Apoptose unterdrücken können. Hsp 27,<sup>9)</sup> Hsp 70,<sup>10)</sup> und Hsp 90<sup>11)</sup> binden an Apaf-1 und verhindern dadurch die Aktivierung von Caspase-9. Dies ist das erste Beispiel, dass ein cytosolischer Faktor den Cytochrom C-abhängigen Apoptose-Weg negativ reguliert.

## Smac/Diablo unterstützt Zelltod

Wissenschaftliche Publikationen sind manchmal wie das Warten auf einen Bus: lange wartet man vergebens und dann kommen zwei zur gleichen Zeit. Dies war der Fall im Juli des letzten Jahres, als die Gruppen von Xiadong Wang (Dallas, USA) und David Vaux (Melbourne, Australien) unabhängig voneinander ein neues Protein, welches an der Kontrolle von Apoptose beteiligt ist, beschrieben. Dieses Protein, „Smac“ von Wangs Gruppe<sup>12)</sup> und „Diablo“ von Vaux Gruppe<sup>13)</sup> titulierte, unterstützt Apoptose durch seine Bindung an Mitglieder der IAP (inhibitor of apoptosis protein)-Familie. IAPs besitzen anti-apoptotische Eigenschaften, weil sie Caspase-Vorläufermoleküle (Pro-Caspasen) und aktivierte Caspasen binden und inaktivieren können.<sup>1,14)</sup>

IAPs wurden zunächst bei Viren entdeckt. Virale IAPs unterdrücken das durch die Infektion ausgelöste Apoptose-Programm der Wirtszelle und ermöglichen dadurch die Replikation des Virus. Es ist noch nicht geklärt, welche Funktionen die inzwischen identifizierten zellulären IAPs haben, doch scheinen sie der Zelle zu erlauben, den Ablauf des Apoptose-Programms vorübergehend anhalten zu können (Abbildung 2).

In der Taufliege *Drosophila* werden IAPs ihrerseits wieder durch Proteine gebunden und inhibiert, die solche phantasievollen Namen wie Reaper, Grim oder Hid tragen.<sup>15)</sup> Diese Interaktionen verhindern, dass IAPs an die Caspasen binden und sie hemmen; die Caspasen werden aktiviert und das Apoptose-Programm kann normal ablaufen. Bisher war ein vergleichbarer Mechanismus in Vertebraten unbekannt. Erst jetzt fand man mit Smac/Diablo ein funktionelles Analogon von Reaper, Grim und Hid in Säugerzellen.<sup>12,13)</sup> Transfiziert man dieses Protein in menschliche Zelllinien, so werden die Zellen empfindlicher gegenüber UV-Licht. Denn Smac/Diablo bindet an IAPs und inhibiert diese, die Caspase-Kaskade kann aktiviert werden.

Zwischen Reaper, Grim und Hid aus *Drosophila* und Smac/Diablo aus Säugern bestehen aber auch Unterschiede, die zweifeln lassen, dass es sich um identische Proteine verschiedener Spezies handelt. So ist Smac/Diablo in den Mitochondrien lokalisiert und wird erst durch einen apoptotischen Stimulus zusammen mit Cytochrom C ins Cytoplasma transloziert. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass Smac/Diablo Apoptose nicht wie die cytoplasmatischen Proteine Reaper, Grim und Hid direkt induzieren, sondern die Zellen nur dafür sensibilisieren.

## Steuerung des Apoptosoms ist komplexer als erwartet

Aber wie bindet und inaktiviert Smac/Diablo die IAPs und verhindert dadurch deren inhibitorische Wirkung auf Caspasen? Xiadong Wang und Kollegen veröffentlichten Kristallstrukturen von Smac/Diablo mit einer Auflösung von 2,2 Å.<sup>16)</sup> Die Strukturanalysen ergaben, dass Smac/Diablo als Dimer in Lösung vorliegt. Stört man die Dimerisierung durch das Einführen von Mutationen, unterdrückt das tatsächlich die Bindung an ein IAP (XIAP). Weiter stellten die Autoren fest, dass Smac/Diablo sowohl die proteolytische Aktivierung von Pro-Caspase-3 als auch die enzymatische Aktivität reifer Caspase-3 direkt steigert. Beim Vergleich von Smac/Diablo mit Reaper, Grim und Hid stellten sie fest, dass in beiden Fällen die aminoterminalen Sequenzen für die Funktionen essentiell sind. Lediglich sieben Aminosäuren von Smac/Diablo und 14 von Reaper, Grim und Hid sind für die Aktivierung von Caspase-3 notwendig. Die strukturellen und biochemischen Voraussetzungen für den Mechanismus, durch den Smac/Diablo Apoptose fördert, scheinen daher während der Evolution streng konserviert zu sein.

Neben der weiteren Aufklärung dieses Mechanismus stellen sich Fragen, die in Bezug zu pathologischen Veränderungen stehen. So entstehen Tumorzellen dadurch, dass durch Genveränderungen die Zellteilung über die Apoptose dominiert. Könnte der Verlust der Smac/Diablo-Funktion auch für neoplastische Veränderungen oder Resistenz von Krebszellen gegenüber Zytostatika verantwortlich sein, so wie es gerade für Bax, einem Mitglied der Bcl-2-Genfamilie, gezeigt werden konnte?<sup>17)</sup>

Die Entdeckung von Reaper, Grim, Hid und Smac/Diablo verdeutlichen, dass die Steuerung des Apoptosoms viel komplexer ist, als ursprünglich vermutet. Dadurch werden der Zelle mehr Möglichkeiten der Regulation gegeben und dem Forscher mehr Chancen, in das Programm des Zelltods einzugreifen.

## Möglichkeiten der Therapie?

Krankheit oder Tod des Gesamtorganismus können daraus resultieren, dass Zellen, die sterben sollen, überleben und solche, die überleben sollen, sterben. Besonders Viren können das Apoptose-Programm der Wirtszelle zu ihren Gunsten in vielfältiger Weise manipulieren, wie das *Kaposi Sarcoma Herpesvirus* (HHV8) eindrucksvoll beweist.<sup>18)</sup> Virale Proteine verhindern die Aktivierung des Apoptose-Programms der Wirtszelle solange, bis sich das Virus in der Zelle repliziert hat. Man versucht nun, diesen Block zu eliminieren, so dass infizierte Zellen apoptotisch sterben, bevor sich die Viren vermehren können.

In der Krebstherapie werden bereits viele Zytostatika angewendet, die Apoptose auslösen. Da es Hinweise darauf gibt, dass die Regulatoren der Apoptose gewebespezifisch exprimiert werden, besteht die Aussicht, selektiv auf Tumorzellen wirkende Medikamente auf den Markt bringen zu können.

Neue therapeutische Ideen für die Behandlung einer breiten Palette von Erkrankungen (Infektionen, Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, u. a.) zielen gegenwärtig auf das präzise Eingreifen in apoptotische Vorgänge. Ob die damit verbundenen Hoffnungen auf Heilung gerechtfertigt sind, bleibt allerdings noch abzuwarten.

Thomas Herget, Axxima Pharmaceuticals, München E-Mail herget@axxima.com

- 1) D. R. Green, *Cell* 2000, 102, 1–4.
- 2) M. Loeffler, G. Kroemer, *Exp. Cell Res.* 2000, 256, 19–26.
- 3) T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner, J. Yuan, *Nature* 2000, 403, 98–103.
- 4) T. Herget, C. Esdar, S. A. Oehrlein, M. Heinrich, S. Schütze, A. Maelicke, G. van Echten-Deckert, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 30344–30354.
- 5) G. Kroemer, J. C. Reed, *Nat. Med.* 2000, 6, 513–519.
- 6) P. K. Majumder, P. Pandey, X. Sun, K. Cheng, R. Datta, S. Saxena, S. Kharbanda, D. Kufe, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21793–21796.
- 7) H. Li, S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed, X. Zhang, *Science* 2000, 289, 1159–1164.
- 8) N. D. Marchenko, A. Zaika, U. M. Moll, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 16202–16212.
- 9) J. M. Bruey, C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S. A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A. P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary, C. Garrido, *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, 645–652.
- 10) H. M. Beere, B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, D. R. Green, *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, 469–475.
- 11) P. Pandey, A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S. M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E. S. Alnemri, D. Kufe, S. Kharbanda, *EMBO J.* 2000, 19, 4310–4322.
- 12) C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, X. Wang, *Cell* 2000, 102, 33–42.
- 13) A. M. Verhagen, P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, D. L. Vaux, *Cell* 2000, 102, 43–53.
- 14) P. G. Ekert, J. Silke, D. L. Vaux, *Cell Death Differ* 1999, 6, 1081–1086.
- 15) L. Goyal, K. McCall, J. Agapite, E. Hartwig, H. Steller, *EMBO J.* 2000, 19, 589–597.
- 16) J. Chai, C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang, Y. Shi, *Nature* 2000, 406, 855–862.
- 17) L. Zhang, J. Yu, B. H. Park, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Science* 2000, 290, 989–992.
- 18) P. M. Ojala, K. Yamamoto, E. Castanos-Velez, P. Biberfeld, S. J. Korsmeyer, T. P. Makela, *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, 819–825.

Abb. 1. **Morphologie einer sterbenden Zelle: Der Prozess der Apoptose kann in definierte Schritte unterteilt werden. Initiiert wird der Vorgang durch das Auftreten eines Todessignals (z. B. UV-Licht, Toxine, Entzug von Wachstumsfaktoren, Glucocorticoide, CD95/Apo/Fas, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Zytostatika) (A). Zunächst schrumpft die Zelle (B), und morphologische Veränderungen wie Kondensation des Zellkerns (dunkle Strukturen) (C), und Fragmentierung und Auflösen der Zelle in apoptotische Körperchen werden sichtbar (D, E). Diese werden schließlich durch Nachbarzellen oder Macrophagen aufgenommen und in den Lysosomen weiter zerlegt (F).**

Abb. 2. **Spiel mit dem Tod: Eine Vielzahl pro-apoptotischer Stimuli induziert die Translokation von bestimmten Proteinen (in Kästchen) aus dem Cytoplasma oder dem Zellkern zu den Mitochondrien. Dort interagieren sie mit bekannten (Kreise) oder unbekanntem (?) Rezeptoren und verändern die Eigenschaften der äußeren Mitochondrienmembran. Dies führt u. a. zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Zwischenraum. Cytochrom C, Apaf-1 und die Pro-Caspase-9 bilden das Apoptosom, wodurch die Caspase-9 und die Caspase-Kaskade aktiviert wird. IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) inhibieren die Aktivierung von Pro-Caspasen und aktiven Caspasen. Smac/Diablo wird ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt und inhibiert IAPs und aktiviert auch direkt Caspasen (für weitere Details, siehe Text). PTPC = permeability transition pore complex, JNK/SAPK= c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/stress-activated protein kinase, hsp= heat shock protein.**