

Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz

Hubert Hug

Gefährliche oder nicht mehr benötigte Zellen bringen sich in einem gesunden Organismus selbst um. Sie aktivieren ein endogenes Selbstmordprogramm. In tierischen Zellen zeichnet sich programmierter Zelltod durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen aus. Er wird zur Unterscheidung von Nekrose, der pathophysiologischen Form des Zelltodes, als Apoptose bezeichnet. Störungen in Apoptoseprogrammen sind bei einer Vielzahl von Krankheiten wie zum Beispiel der Tumorentstehung beteiligt.

Es klingt paradox, aber der Zelltod ist für das Überleben eines vielzelligen Organismus genauso wichtig wie die Zellteilung. Überflüssig gewordene, infizierte, transformierte oder verletzte Zellen müssen eliminiert werden. So wie bei der Stimulierung einer Zelle zur Teilung eine Sequenz biochemischer Schritte im Zellinneren angeschaltet werden muss, existieren auch für das Sterben einer Zelle feststehende und definierte intrazelluläre Signalwege. Die Aufgabe, potenziell gefährliche Zellen rechtzeitig zu entfernen, wird von einer komplexen Maschinerie, dem programmierten Zelltod, übernommen. Eine Form des programmierten Zelltods ist die Apoptose bei Tieren. Sie ist durch die Erhaltung der Zellmembranen charakterisiert. Dies erlaubt benachbarten Zellen mit phagozytischer Aktivität, die Zellrümpfe zu beseitigen, sodass - im Gegensatz zur Nekrose - keine Entzündung auftritt. Vielseitige Signale können Apoptose auslösen oder blockieren. Apoptose ist für eine normale Entwicklung und für die Erhaltung der Gewebshomöostase essenziell.

Bereits einzellige Organismen besitzen ein endogenes Selbstmordprogramm. Eine virale Infektion kann es auslösen. Die infizierte Zelle stirbt, bevor sich das infektiöse Agens vermehren und ausbreiten kann. Die Signalwege dieser Selbstmordmaschinerien der Einzeller sind wahrscheinlich die Ursprünge des programmierten Zelltods und damit auch der Apoptose [1].

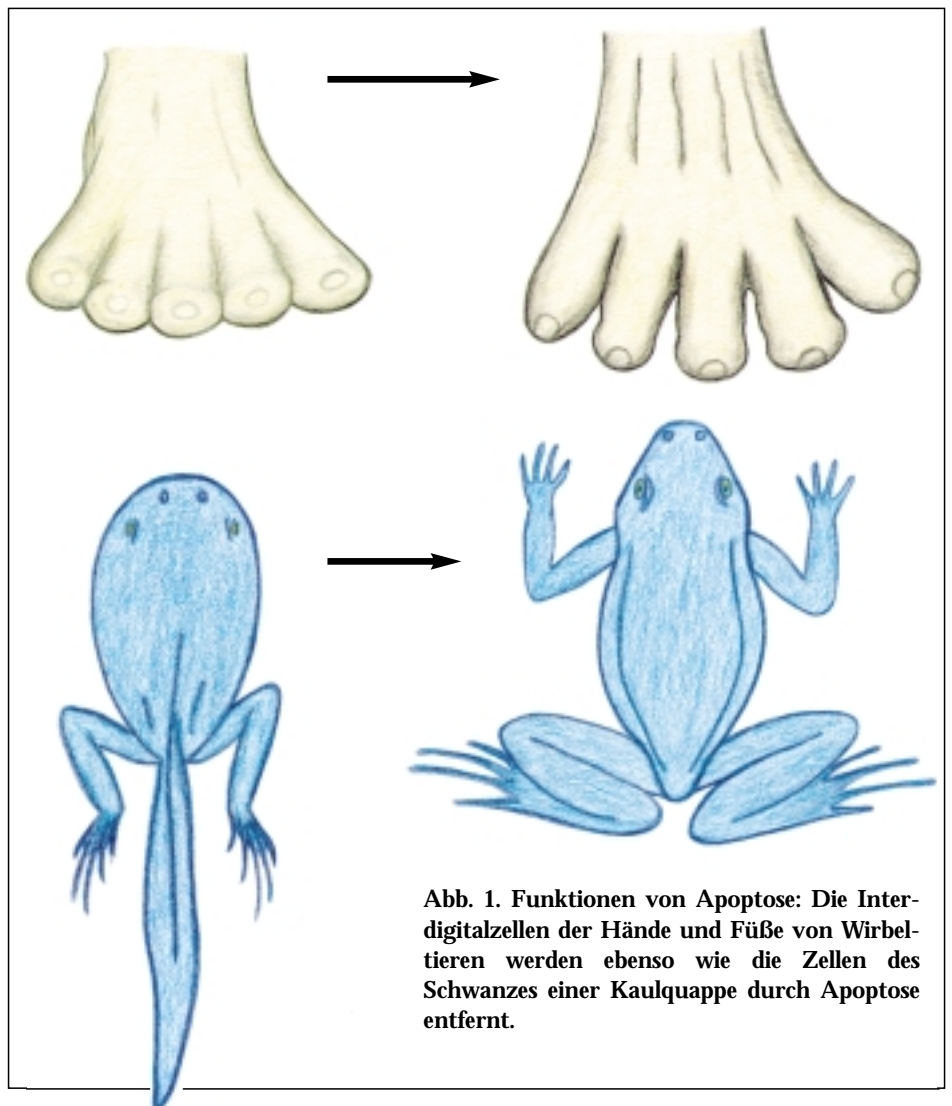


Abb. 1. Funktionen von Apoptose: Die Interdigitalzellen der Hände und Füße von Wirbeltieren werden ebenso wie die Zellen des Schwanzes einer Kaulquappe durch Apoptose entfernt.

Die an der Auslösung von Apoptose beteiligten Moleküle blieben während der Evolution konserviert. Die zentralen Moleküle der Todesmaschinerie sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die „Caspasen“ [9]. Sind Caspasen aktiviert, so hat die Zelle kaum eine Möglichkeit, dem Tod zu entrichten.

Warum sterben manche Zellen frühzeitig?

Die ursprüngliche Funktion des programmierten Zelltods liegt vermutlich in der Beseitigung von Zellen, die mit Pathogenen infiziert sind. Die infizierte Zelle tötet sich rechtzeitig, um die Zellen in der Nachbarschaft vor einer Infektion zu schützen. Das Verhalten gleicht einem zellulären Altruismus. Diese Methode der Verteidigung gegen Infektionen findet man sowohl bei einzelligen als auch bei vielzelligen Organismen. Der altruistische Selbstmord von Einzellern wird als der Beginn des programmierten Zelltods angesehen. So kann sich ein mit Bakteriophagen infiziertes Bakterium umbringen, bevor Nachkommen der Bakteriophagen produziert werden [13]. Die für die Selbstzerstörung kodierenden Allele werden von den Verwandten, die ihr Überleben der selbstmörderischen Zelle verdanken, weitergetragen. Man schätzt, dass ein programmierter Zelltod bereits vor zwei Millionen Jahren existierte [1].

Durch die enge Beziehung von Virus und Wirtszelle wurden in einem evolutionären Wechselspiel neue und verfeinerte Abwehrstrategien gebildet. So versuchen tierische Zellen bei viralen Infektionen, Apoptoseprogramme zu aktivieren, um die Vermehrung der Viren zu stoppen. Viren haben aber auch hier wie bei anderen zellulären Verteidigungsmechanismen Gegenstrategien entwickelt. Viele Viren können die Apoptose der Wirtszelle an verschiedenen Stellen innerhalb der Apoptosewege blockieren und anschließend ungehindert Nachkommen produzieren. Ohne diese Gegenmaßnahmen wären sie bereits ausgestorben.

Differenzierungen bleiben ohne Apoptose aus

Später hat der programmierte Zelltod bei Metazoen auch andere Funktionen übernommen [11]. Wie beim Hausbau ein Gerüst erstellt wird, das nach Fertigstellung der Grundmauern und des Daches wieder entfernt werden

muss, so müssen Zellen des Embryos, die vorübergehend Stütz- oder andere Hilfsfunktionen ausübten, später wieder beseitigt werden. Diese Funktion übernimmt der programmierte Zelltod. Ohne ihn könnten nur kugelförmige Organismen entstehen. So werden bei Wirbeltieren während der Embryonalentwicklung durch Apoptose die Interdigitalzellen der Finger und Zehen entfernt (Abbildung 1) oder die Nasenlöcher gebildet. Die Formen werden sozusagen wie bei einem Kunstwerk herausgeschnitten. Nach dem gleichen Mechanismus verschwindet der Schwanz der Kaulquappe bei der Reifung zum erwachsenen Froschlurch (Abbildung 1).

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Steuerung durch Apoptose ist die Entwicklung des Nervensystems der Vertebraten. Ohne Nervenwachstumsfaktor sterben etwa die Hälfte der Neuronen. Funktionierende neuronale Verbindungen im Gehirn werden gewissermaßen aus einer Zellmasse herausmodelliert.

Zellteilungen erfordern Zellsterben

In Geweben besteht ein regulierendes Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zellsterben. Gut zu beobachten ist dies in sich ständig erneuernden Geweben, wie dem Darmepithel und den oberen Hautschichten. Apoptose spielt dabei die komplementäre Rolle zur Mitose in der Regulation der Zellzahl. Störungen innerhalb dieses Gleichgewichts führen zu Missbildungen und Erkrankungen. Beim erwachsenen Menschen entstehen jede Sekunde etwa 10.000 Zellen durch Mitose, und eine ähnliche Anzahl wird durch Apoptose entfernt.

Lymphozyten werden durch Apoptose reguliert

Apoptose spielt auch eine zentrale Rolle bei der Entwicklung eines effektiven Immunsystems. Sich entwickelnde Lymphozyten rearrangieren ihre Antigen-Rezeptor-Gene. Nur Rezeptoren, die von funktionell rearrangierten Genen kodiert werden, gelangen an die Zelloberfläche. Lymphozyten, die fremde Antigene erkennen können, müssen erhalten werden (positive Selektion), während solche, die körpereigene Strukturen erkennen, eliminiert werden müssen (negative Selektion). So werden nur Lymphozyten mit geeigneter Antigenspezifität am Leben erhalten. Die Mehrheit der Lymphozyten, etwa 75 % der B-Lymphozyten-Vorläufer und 95 % der T-

Lymphozyten-Vorläufer, werden während der Entwicklung durch Apoptose eliminiert.

Apoptose tritt aber nicht nur bei der Entwicklung des Immunsystems auf, sie ist auch für seine optimale Funktion unerlässlich. Bei einer Infektion regen Moleküle des Erregers (Fremdantigene) die Lymphozyten zur Reifung an, um das infektiöse Agens zu bekämpfen. Aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten töten Virus-infizierte Zellen, indem sie in diesen spezifisch Apoptose induzieren. Wenn die Erreger schließlich beseitigt sind, muss die Immunantwort abgeschaltet werden, da die stimulierten Lymphozyten weiterhin für den Organismus potenziell gefährliche Zytokine produzieren und sezernieren würden.

Auch dies geschieht durch Apoptose. Am Ende einer Immunreaktion bringen sich die aktivierten T-Lymphozyten entweder selbst oder gegenseitig um, sodass die Zellzahl der peripheren Lymphgewebe so wieder in den Ausgangszustand kommt.

„Zellirrläufer“ werden durch Apoptose eliminiert

Das Schicksal einer Vertebratenzelle wird von den Nachbarzellen bestimmt. Die Zellen würden sterben, wenn sie nicht dauernd aus der Nachbarschaft Signale erhalten würden, dies nicht zu tun. Ohne äußere Stimuli ist die Zelle eines Vertebraten also auf Sterben eingestellt. Werden gesunde Zellen aus ihrem natürlichen Verband genommen und kultiviert, so sterben sie. Gibt man Serum dazu, so können manche Zellen überleben oder sogar wachsen. Das Serum enthält Proteine, die entweder das Sterben einer Zelle inhibieren oder Wachstum stimulieren oder beides tun.

Zellkulturmedium muss daher mit Serum oder mit spezifischen Überlebens- und Wachstumsfaktoren ergänzt werden. Da im Normalfall der Schalter einer Zelle eines Vielzellers auf Sterben steht, stirbt eine aus Versehen aus ihrer natürlichen Umgebung herausgerissene Zelle. Denn in der fremden Nachbarschaft wird sie wahrscheinlich nicht die für ihr Überleben benötigten Faktoren finden. Der „Irrläufer“ wird nicht unterstützt. Wächst die Zelle aber trotzdem in dem fremden Gewebe, so entsteht ein Tumor. Man spricht in diesem Zusammenhang von sozialer Kontrolle des zellulären Zusammenlebens [8]. Zellen überleben normalerweise nur dort, wo sie gebraucht werden und wo sie sich koordiniert verhalten.

Auch pflanzliche Zellen sterben programmiert

Bei Pflanzen spielt der programmierte Zelltod bei der Differenzierung von Phloem und Xylem, beim Abfallen der Blätter und Früchte, bei der hypersensitiven Antwort und beim Altern (zum Beispiel beim Sterben der Pflanzen im Winter) eine Rolle. Auch hier treten zwar apoptotische Merkmale, wie das Schrumpfen der Zelle und die Aktivierung spezifischer Endonukleasen auf (siehe unten). Der Hauptunterschied zur tierischen Apoptose besteht jedoch darin, dass bei Pflanzen keine Phagozytose auftritt. So kann sich der pflanzliche programmierte Zelltod über Monate hinziehen. In vielen Fällen differenziert sich die Zellwand und bleibt erhalten [2].

Was unterscheidet Apoptose von Nekrose?

Zelltod, wie er unter anderem bei mechanischen Verletzungen, Verlust der Blutzufuhr oder manchen Infektionen auftritt, zeigt das Bild einer Nekrose (Abbildung 2). Die Membranen werden zerstört. Dabei fallen die Ionenpumpen aus, sodass Kalzium- und Natriumionen in die Zellen einfließen und sie infolge von Osmose zum Platzen bringen. Der Zellinhalt, der nun auch freie lysosomale Enzyme enthält, läuft in die Umgebung und lockt Zellen des Immunsystems an, sodass eine Entzündungsreaktion folgt.

In tierischen Geweben unterscheidet man von der Nekrose den natürlich auftretenden Zelltod (Apoptose) anhand seiner Morphologie. Apoptose tritt in gesunden Geweben auf und wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben [5]. Der Begriff setzt sich aus zwei griechischen Wörtern, apo (weg) und ptosis (Fall), zusammen und soll an das Herabfallen des Herbstlaubes erinnern. Über das vorhersehbare Zellsterben bei Entwicklungsprozessen liegen jedoch noch frühere Berichte vor [11].

Bei der Apoptose schrumpfen das Zytoplasma und der Zellkern. Das Chromatin kondensiert; es bilden sich Ausstülpungen der Plasma- und der Kernmembran, die sich später als sogenannte „apoptotische Körperchen“ abschnüren (Abbildung 2). Im Gegensatz dazu schwellen die Zellen bei der Nekrose an und platzen schließlich. Das Auftreten der apoptotischen Körperchen (Abbildung 3) ist das morphologische Merkmal, das zur Definition und anfänglich auch mit zur Auf-

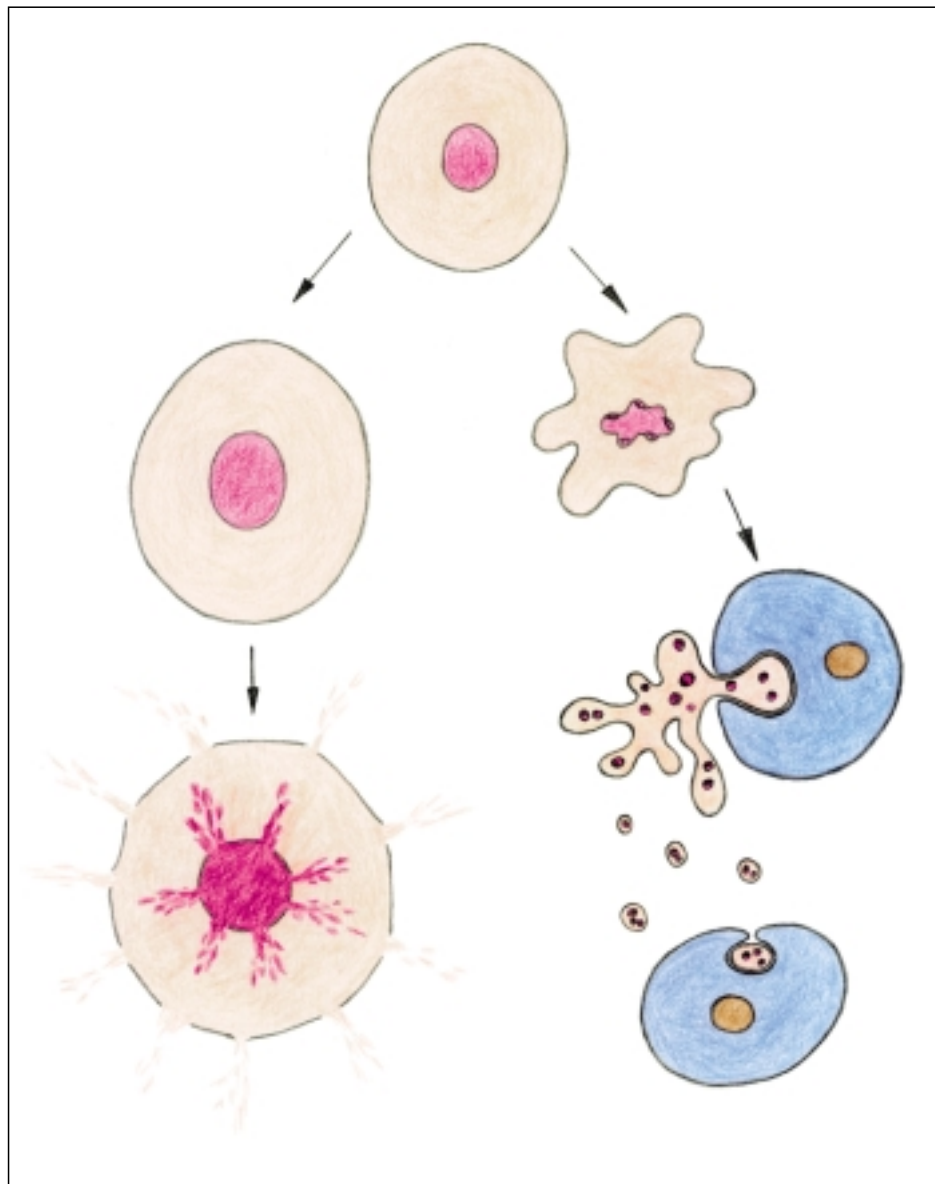


Abb. 2. Morphologische Unterschiede von Apoptose und Nekrose. Bei der Nekrose (links) schwellen das Zytoplasma (orange) und der Zellkern (rot). Bei der Apoptose (rechts) schrumpfen Zytoplasma und Zellkern. Phagozyten (blau) verschlingen die entstehenden apoptotischen Körperchen.

klärung der Funktionen der Apoptose beigetragen hat. Die wesentlichen Unterschiede von Apoptose und Nekrose sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Besonders muss darauf hingewiesen werden, dass bei einer normal ablaufenden Apoptose keine Entzündungen auftreten. Die schrumpfende Zelle und die apoptotischen Körperchen werden von Phagozyten an Membranveränderungen, wie zum Beispiel der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran, erkannt und beseitigt. Dabei werden die Zellfragmente innerhalb von Vesikeln einer anderen, gesunden Zelle, den Phago lysosomen, abgebaut. Um die Phagozytose zu erleichtern, reduzieren apoptotische Zellen

ihr Volumen. Sie pumpen Ionen, vor allem K^+ , nach außen und kontrahieren ihr Zytoskelett. Diese Volumenverringerung macht die apoptotischen Zellen und Körperchen zusätzlich zu den neuen Eigenschaften der Plasmamembran „schmackhafter“ für Phagozyten. Apoptose hinterlässt keine Spuren.

Apoptose kann leicht nachgewiesen werden

In der Regel erscheint als spätes Merkmal der Apoptose eine Spaltung der chromosomalen DNA in zuerst große Fragmente von etwa 50 bis 300 kbp (Kilobasenpaaren) und darauf in kleinere Fragmente bestehend aus Multime-

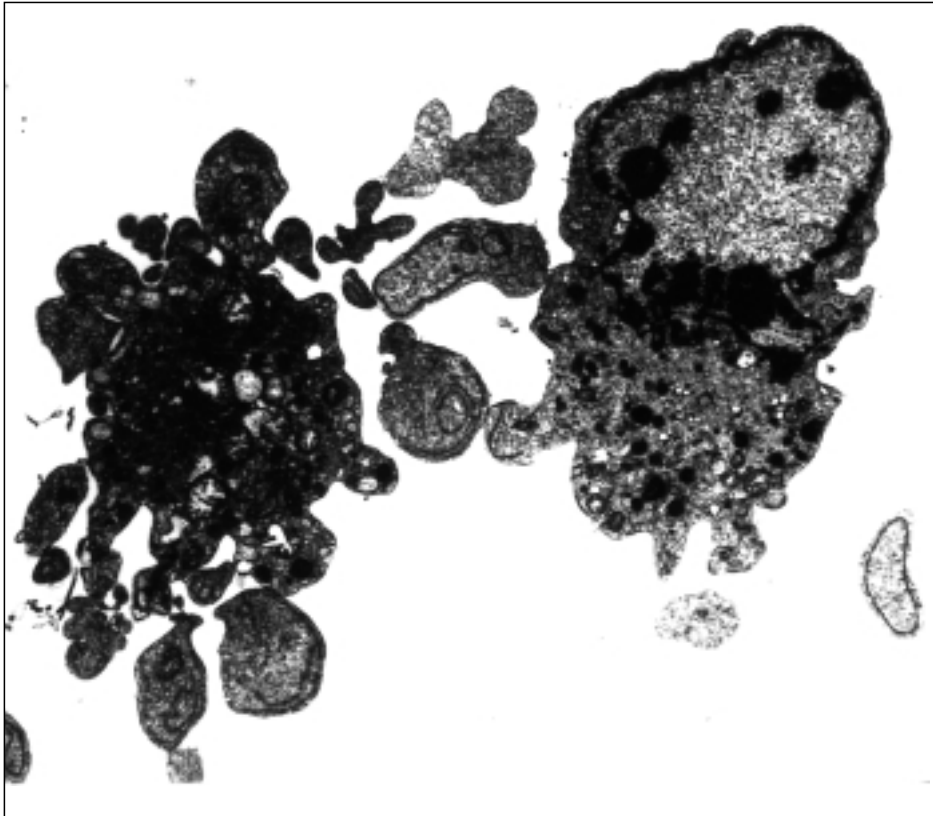


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme apoptotischer Zellen. Dargestellt sind Mausfibroblasten, in denen mit einem agonistischen monoklonalen Antikörper gegen den CD95-Todesrezeptor Apoptose induziert wurde. Die Membranen der rechten Zelle beginnen sich gerade auszustülpfen. Die linke Zelle beginnt in apoptotische Körperchen zu zerfallen. (Vergrößerung: etwa 10000 fach. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff, Universität Münster, zur Verfügung gestellt.)

ren von ungefähr 180 bp [12]. Bei der Apoptose werden spezifische Endonukleasen aktiviert, welche die DNA zwischen den Nukleosomen schneiden. Methodisch kann Apoptose daher leicht anhand einer charakteristischen DNA-Leiter bestimmt und von Nekrose unterschieden werden (Abbildung 4). Möglicherweise werden durch das Zerschneiden der DNA Proviren inaktiviert.

An allen bekannten Apoptosewegen sind Enzyme aus einer Familie von Cystein-Proteasen, die Caspasen (siehe unten), beteiligt. Sie sind die Hauptkomponenten einer kaskadenartig wirkenden Todesmaschinerie, welche für die apoptotischen Veränderungen verantwortlich ist und die Zelle irreversibel in den Tod treibt. Der Nachweis der Aktivierung der Caspasen ist somit ein weiteres wichtiges biochemisches Merkmal für die Bestimmung von Apoptose. Die Caspasen-Aktivierung tritt vor den morphologisch nachweisbaren Veränderungen auf.

Sehr eindrucksvoll sind die Merkmale der Apoptose bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* untersucht worden. Von den 1090 somatischen Zellen von *C. elegans* werden während der Ontogenese genau 131 durch Apoptose entfernt. Genetische Analysen haben in 14 Genen Apoptose beeinflussende Mutationen identifiziert. Dabei treten alle in Tabelle 1 aufgeführten Apoptosemerkmale auf [11].

Tabelle 1. Merkmale, die Apoptose von Nekrose unterscheiden.

	Apoptose	Nekrose
Stimuli	physiologisch oder pathologisch	pathologisch
Erscheinung	Einzelzelle	Zellgruppe
Verlust der Adhäsion	früh	spät
Schädigung der Organellen	spät	früh
Freisetzung lysosomaler Enzyme	-	+
Kerne	schrumpfen und zerfallen	verschwinden
Chromatinverdichtung	+	-
DNA-Doppelstrangbrüche	zwischen den Nukleosomen („Leiter“ auf Agarosegel)	zufällig (Schmier auf Agarosegel)
Phospholipid-Asymmetrie	Phosphatidylserin-Verlagerung auf die äußere Seite der Plasmamembran	bleibt erhalten?
Caspasenaktivierung	+	-
Ergebnis	apoptotische Körperchen	Schwellung und Zerfall
Phagozytose	+	-
Entzündung	-	+

Apoptose und Nekrose sind keine starren Phänomene, sondern Extremformen des Zelltods. Zwischen ihnen gibt es fließende Übergänge. So kann das Sterben einer Zelle mehr dem Bild einer Apoptose oder dem einer Nekrose ähneln. Tumornekrosefaktor- α kann, wie der Name andeutet, Nekrose induzieren. In vielen Zelltypen aktiviert er aber Apoptoseprogramme. Ähnlich führen hohe Dosen von Wasserstoffperoxid zu Nekrose, niedrige Dosen dagegen zu Apoptose. Auch hier ist die Todesart wieder abhängig vom Zelltyp.

Wie wird der programmierte Zelltod ausgelöst?

Verschiedene Stimuli, physiologische und unphysiologische, aktivieren Apoptose (Tabelle 2). Die Vielzahl der Stimuli könnte durch die Diversifizierung des programmierten Zelltods zu den verschiedenen Funktionen erklärt werden. Je nach Stimulus lassen sich apoptotische Veränderungen bereits nach

wenigen Minuten oder erst nach Stunden nachweisen. Nicht alle Zelltypen sterben als Antwort auf denselben Stimulus. Ob eine Zelle apoptotisch wird, hängt zusätzlich von inneren Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Differenzierungszustand, der Position im Zellzyklus oder der Genaktivierung.

Je nach Konzentration und Zelltyp aktivieren viele Chemikalien Apoptose (Tabelle 2). Glukocorticoide binden an intrazelluläre Rezeptoren und induzieren in Thymozyten Apoptose. Eine Schädigung der DNA, die als Antwort auf Strahlung oder Zytostatika auftritt, führt in vielen Fällen zu apoptotischem Zelltod. Die Zelle bringt sich um und wird entfernt, bevor Zelltrümmer Entzündungen hervorrufen oder sich Mutationen ansammeln könnten.

Überlebens-, Wachstumsfaktoren und Zytokine können Signale zum Überleben geben. Sie binden an zelluläre Oberflächenrezeptoren und verhindern die Aktivierung der Apoptose, die ohne ihre Anwesenheit zwangsweise eintreten würde. Todesfaktoren bewirken das Gegenteil. Wenn sie an ihre Rezeptoren binden, lösen sie Apoptose aus [7]. Beispiele sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Auslöser aktivieren mehrere Signalwege

Im Folgenden sollen die intrazellulär ablaufenden Signalwege nach der Aktivierung von Apoptose beschrieben werden (Abbildung 5). Die Teile der zellulären Todesmaschinerie müssen in der Regel nicht neu synthetisiert werden, sondern liegen in einer inaktiven Form im Zytoplasma vor. So besitzen enterkernte Zellen die Fähigkeit zur Apoptose. In manchen Zellen fehlen einzelne Komponenten der Apoptosesignalwege. Wird deren Synthese induziert, so werden diese Zellen Apoptose-sensitiv.

Nach neueren Erkenntnissen führen die meisten Apoptosestimuli zum Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Abbildung 5) [6]. Dieselben Apoptosestimuli bewirken einen Verlust des Transmembranpotentials der inneren Mitochondrienmembran. Es bildet sich daraufhin im Zytosol ein Komplex aus Cytochrom C, Caspase-9 und anderen Faktoren, den man als Apoptosom bezeichnet. Im Apoptosom wird Caspase-9 aktiviert. Todesfaktoren aktivieren zusätzlich einen von den Mitochondrien unabhängigen Apoptosesignalweg.

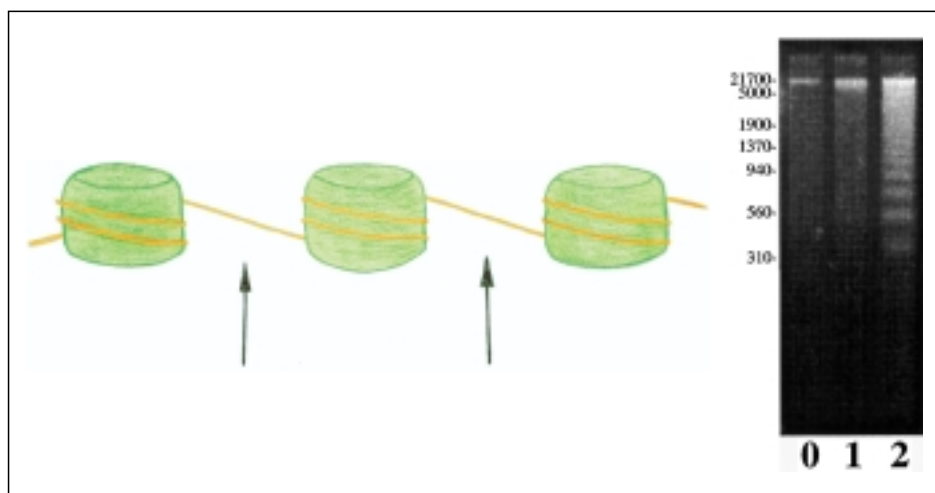


Abb. 4. Spaltung der chromosomalen DNA bei der Apoptose. (links) Apoptotische Stimuli aktivieren spezifische Endonukleasen. Diese spalten (Pfeile) die chromosomale DNA (orange) zwischen den Nucleosomen. Die entstehenden DNA-Fragmente sind somit Multimere von etwa 180 bp. Grün dargestellt ist der innere Histonkomplex der Nucleosomen. (rechts) Beispiel für eine apoptotische DNA-Leiter. In myeloiden Mauszellen, die den CD95-Todesrezeptor des Menschen überexprimieren, wurde mit einem agonistischen anti-CD95 Antikörper Apoptose induziert. Sofort (Spur 0), nach 1 h (Spur 1) und nach 2 h (Spur 2) wurde die DNA aus den Zellen extrahiert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. DNA-Größenstandards (in Basenpaaren) sind jeweils links angegeben. 2 h nach Induktion der Apoptose ist die DNA-Leiter (Multimere von etwa 180 bp) deutlich sichtbar.

Alle bisher bekannten Apoptosewege laufen auf der Ebene der Caspasen („C“ steht für Cystein und „aspase“ für Aspartat-spaltend) zusammen [6, 9]. Caspasen sind Cysteinproteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Sie spalten ihre Substrate hinter einem Aspartatrest.

Die Caspasen stellen eine Klasse von Enzymen dar, die nicht nur Funktionen bei der

Apoptose besitzen. Beim Menschen sind bereits 15 verschiedene Caspasen beschrieben worden.

In der Zelle liegen die Caspasen als Vorläuferproteine (Procaspasen) vor. Diese werden nach der Induktion von Apoptose gespalten. Zwei Fragmente, die zusammen die Sequenz für das katalytische Zentrum besitzen, lassen sich abtrennen. Die aktive Form aller Caspa-

Tabelle 2. Signale, die Apoptose induzieren.

Chemikalien	Glukocorticoide, freie Radikale, H ₂ O ₂ , Zytostatika, Glutamat
Physikalische Schädigung	UV-Strahlung, Röntgenstrahlen, γ - und β -Strahlen, Hitzeschock
Zellen	zytotoxische T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen
Entzug von Überlebensfaktoren	Interleukin-2, -3, -10, -13, Nervenwachstumsfaktor
Todesfaktoren	CD95 (Fas/APO-1)-Ligand, Tumornekrosefaktor- α , TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)

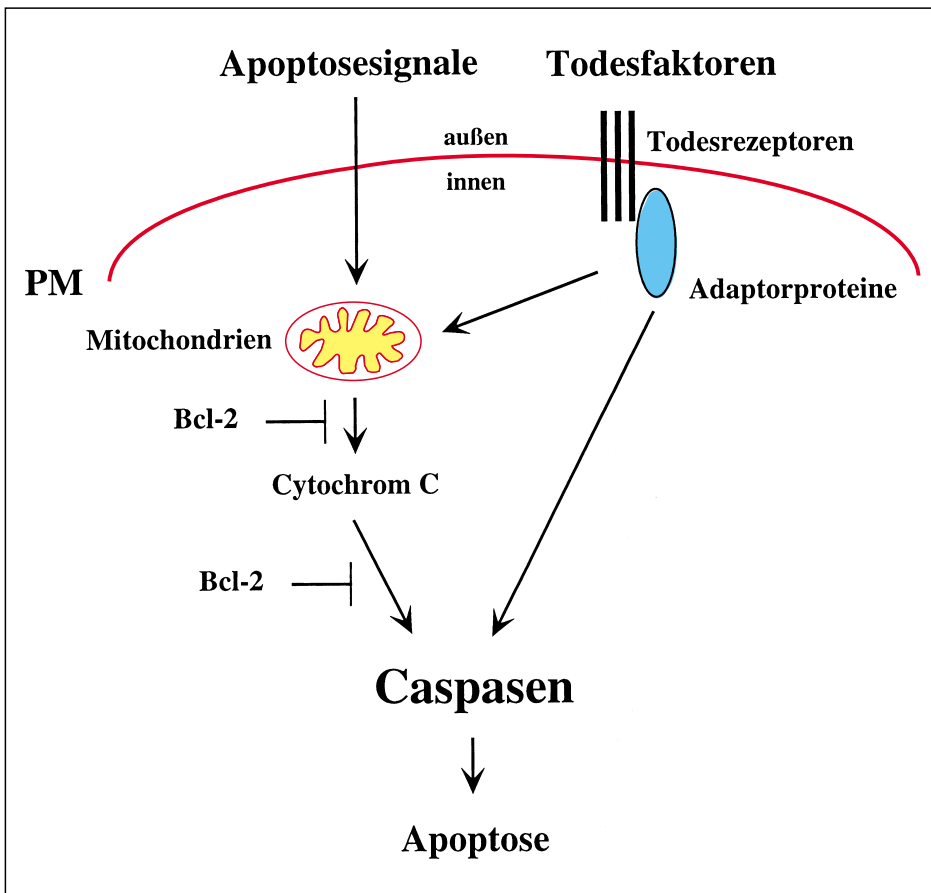


Abb. 5. Zur Apoptose führende intrazelluläre Signalwege. Viele apoptotische Stimuli bewirken den Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol. Cytochrom C bindet dort an verschiedene Faktoren und aktiviert dadurch die Caspasen-Kaskade. Dieser Weg kann durch Bcl-2 blockiert werden [11]. Bcl-2 ist eines der am besten untersuchten Proteine, die Apoptose hemmen können. Todesfaktoren binden an spezifische Todesrezeptoren. Über Adaptorproteine wird direkt eine Caspasen-Kaskade aktiviert. Daneben existiert aber auch ein Weg, über den Todesrezeptoren ebenfalls die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirken. Die hier dargestellten Wege und Moleküle sind nur ein kleiner Ausschnitt der bekanntesten. PM – Plasmamembran.

sen ist schließlich ein Heterotetramer. Die Caspasen aktivieren sich gegenseitig in einer komplexen Hierarchie, ähnlich dem Blutgerinnungs- und Komplementsystem. Am Endpunkt der Kaskade stehende Caspasen zerlegen das Zellgerüst und die Kernmatrix. Sie aktivieren die Endonukleasen, die zur Entstehung der charakteristischen apoptischen DNA-Leiter führen (Abbildung 4). Sie spalten Proteine, die bei der intrazellulären Signalübertragung entscheidende Funktionen übernehmen und Proteine, welche die Reparatur der DNA verhindern. Durch die Zerstörung lebenswichtiger Strukturproteine und Enzyme sind die Caspasen für die morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose verantwortlich.

Einer der potentesten Auslöser von Apoptose ist die Stimulierung des Todesrezeptors CD95, der auch unter dem Namen Fas oder

APO-1 bekannt ist [7]. Eine Bindung des CD95-Liganden an den Rezeptor kann innerhalb weniger Minuten Apoptose irreversibel stimulieren. Der Hauptsignalweg läuft über ein Adaptormolekül zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Abbildung 6).

Apoptosestörungen führen zu Krankheiten

Viele Krankheiten, wie Krebs, AIDS, Alzheimer, Parkinsonkrankheit, Herz- und Gehirnschlag haben unter anderem ihre Ursachen in der Fehlregulation von Apoptose [6]. Zum Beispiel haben sich in Krebszellen Mutationen angesammelt, die Mechanismen der Wachstums- und Apoptosekontrolle außer Gang setzen. Eine Inhibierung der Apoptose in Zellen, die im gesunden Organismus sterben, kann zu Tumorwachstum beitragen. In diesen unerwünschten Zellen Apoptose zu

induzieren, ist ein theoretischer Ansatz, Tumorzellen zu beseitigen.

Mutagene Agenzien induzieren DNA-Schäden. Als Antwort auf DNA-Schäden wird ein Protein, p53, aktiviert. Das *p53*-Gen ist in vielen menschlichen Tumoren mutiert und kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Das normale p53-Protein übt eine Kontrollfunktion in der geschädigten Zelle aus [6]. Wenn der DNA-Schaden gering ist, sorgt p53 dafür, dass die Zelle Zeit gewinnt, den Schaden zu reparieren. Ist der Schaden aber irreparabel, treibt p53 die Zelle in den Tod, es induziert Apoptose. So wird sichergestellt, dass sich mutierte Zellen nicht vermehren. Ist p53 defekt, so sammeln sich Mutationen an, die zur Tumorentstehung beitragen können. Welche physiologischen Vorgänge diesem Kontrollmechanismus zugrunde liegen, ist noch ein Rätsel.

Tumorzellen tragen an ihrer Oberfläche oft Proteine, die bei der gesunden Vorläuferzelle nicht vorhanden sind. Zytotoxische T-Lymphozyten können in der Regel die Tumorzelle an diesen zusätzlichen Oberflächenproteinen erkennen und töten die Tumorzelle durch Induktion von Apoptose. Ein Mechanismus dabei ist die Aktivierung des CD95-Todesrezeptors, falls die Zielzelle diesen exprimiert. Der CD95-Ligand des zytotoxischen T-Lymphozyten induziert durch Bindung an das CD95-Molekül der Tumorzelle den in Abbildung 6 beschriebenen Signalweg [7].

Es gibt nun Hinweise für Fälle, wo die Tumorzelle selbst Apoptose induzieren kann. Sie exprimiert Todesfaktoren wie zum Beispiel den CD95-Liganden. Die Tumorzelle hat damit die Fähigkeit gewonnen, zytotoxische T-Lymphozyten, die im Normalfall die Tumorzelle vernichten würden, zu töten [3]. Der Tumor geht zum Gegenangriff über. Er vernichtet das Verteidigungssystem des Körpers mit seinen eigenen Waffen.

Viren blockieren die Apoptose der Wirtszelle. Adeno-, Herpes- und Pockenviren besitzen Proteine, deren Hauptfunktion in der Hemmung der Apoptose besteht. Fehlen diese Proteine oder sind sie defekt, so kann sich das Virus nicht mehr vermehren. Man vermutet, dass auch andere Viren ähnliche anti-apoptotische Mechanismen besitzen. HIV kann zusätzlich in nicht infizierten Zellen Apoptose induzieren. Betroffen sind dabei die an der Immunabwehr beteiligten T-Lymphozyten [10].

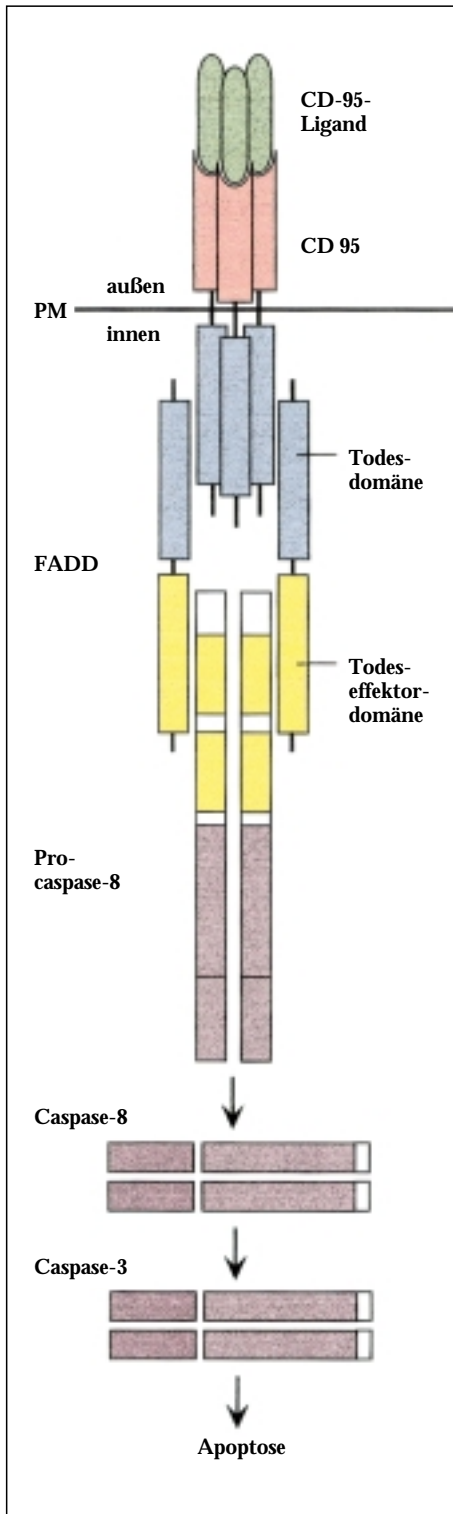


Abb. 6. Der Signalweg des CD95-Todesrezeptors. Der CD95-Todesrezeptor ist ein Transmembranprotein. Der CD95-Ligand (grün) ist ein Trimer, das an die extrazelluläre Domäne des CD95-Moleküls (rot) bindet und dabei zur Trimerisierung von CD95 führt. Im Zytoplasma kann nun FADD (Fas-associated death domain) an den als Trimer vorliegenden CD95-Todesrezeptor binden. Im intrazellulären Teil besitzen sowohl CD95 als auch FADD eine Todesdomäne (blau). Die Todesdomänen interagieren durch elektrostatische Wechselwirkungen. An das an CD95 assoziierte FADD kann nun wiederum Procaspase-8 binden. FADD und Procaspase-8 interagieren über ihre Todeseffektordomäne (gelb), die strukturelle Ähnlichkeit zur Todesdomäne besitzt. Dabei werden von einem Procaspase-8-Molekül zwei Fragmente mit den Caspase-Domänen (violett) abgespalten, die aneinander binden. Zwei Heterodimere bilden schließlich das proteolytisch aktive Heterotetramer der Caspase-8. In einer typischen proteolytischen Caspasenkaskade spaltet Caspase-8 den Vorläufer der Caspase-3 (Procaspase-3). Es entsteht ebenfalls ein proteolytisch aktives Heterotetramer (violett). Die Spaltung der Caspase-3-Substrate führt schließlich zum charakteristischen Bild der Apoptose. PM – Plasmamembran.

Glossar

Apoptose: In Abgrenzung zur Nekrose eine Form des programmierten Zelltods bei Tieren mit charakteristischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften. Die Plasmamembran bleibt als Barriere erhalten. Die sterbenden Zellen werden von Phagozyten erkannt und beseitigt.

Caspasen: Cystein-Proteasen, die ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten.

Endonukleasen: Deoxyribonukleasen (DNasen), die DNA durch Spaltung interner Phosphodiesterbindungen abbauen.

FADD: Abkürzung für Fas-associated death domain. Es ist das Adaptorprotein vieler Todesrezeptoren zu den Caspasen.

Homöostase: die Tendenz zu einem relativ konstanten Zustand. Die Eigenschaften und das innere Milieu eines Organismus müssen in definierten Bereichen gehalten werden.

Nekrose: der Tod von einigen oder allen Zellen in einem Gewebe infolge von Verletzung, manchen Infektionen oder Verlust der Blutzufuhr. Es treten Entzündungsreaktionen auf.

Nukleosom: Struktureinheit des Chromatins. Ein 146 Basenpaare langes DNA-Fragment windet sich um einen zylinderförmigen Histonkomplex (Abbildung 4a).

Phagozytose: die Aufnahme von Partikeln durch eine Zelle.

Phosphatidylserin: negativ geladenes Phospholipid. Es ist auf der Zytosolseite der Plasmamembran lokalisiert.

Tumornekrosefaktor- α : ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, das auch unter dem Namen Cachectin bekannt ist. Es wurde zuerst als Tumor-inhibierendes Agens aus Blut von Tieren, die mit bakteriellem Lipopolysaccharid behandelt wurden, beschrieben. Es kann Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* töten.

Überlebensfaktoren: extrazelluläre Proteine, die an spezifische Zelloberflächenrezeptoren binden und zum Überleben der Zellen von Vertebraten nötig sind.

Wachstumsfaktoren: extrazelluläre Proteine, die an spezifische Zelloberflächenrezeptoren binden und dadurch in der Zielzelle Zellteilungen und manchmal in Verbindung damit Differenzierung induzieren.

Zytokine: kleine Proteine (5 – 20 kDa; Dalton – Masseneinheit, die der Masse des Wasserstoffatoms sehr nahe kommt), die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden und das Verhalten anderer Zellen des Immunsystems beeinflussen. Der Begriff ist nicht präzise, da sich Zytokine nicht unbedingt von Hormonen unterscheiden. Zu den Zytokinen zählt man Interleukine, Lymphokine, Interferone, Mitglieder der Tumornekrosefaktorfamilie und Chemokine.

Ein *In-vivo*-Nachweis ist schwierig

Dass eine fehlerhafte Apoptose bei vielen Krankheitsprozessen eine Rolle spielt, ist noch nicht lange bekannt. Dies liegt vor allem daran, dass Apoptose *in vivo* sehr schwer nachzuweisen ist. Die apoptotischen Zellen

werden schon bei der Bildung der apoptotischen Körperchen vom Monozyten-Makrophagen-System erkannt und relativ schnell beseitigt. Eine direkte Apoptosediagnose ist daher nur möglich, wenn man in noch lebenden Zellen Apoptosemarker nachweist, die sehr früh - also bevor die apoptotischen Zellen von Makrophagen erkannt und entfernt werden - angeschaltet werden. Gegenwärtige Nachweismethoden basieren vor allem auf der Messung der Externalisierung von Phosphatidylserin und des Auftretens der DNA-Doppelstrangbrüche. Die Aktivierung der Caspasen geht diesen nachweisbaren apoptotischen Veränderungen voraus und kann in Kulturzellen bereits in intakten Zellen gemessen werden [4]. Mit diesem Caspasen-Assay sollte es in Zukunft möglich sein, eine Apoptoseaktivierung in intakten Zellen aus Patienten nachzuweisen. Es könnte zum Beispiel festgestellt werden, wann und unter welchen Bedingungen Zytostatika in welchen Zellen Apoptose auslösen.

Ausblick

Die Fortschritte in der Apoptoseforschung sollen zur medizinischen Anwendung kommen. Langfristiges Ziel ist es:

- in Tumorzellen, in Virus-infizierten Zellen und in autoreaktiven Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen gezielt Apoptose zu induzieren,
- in Neuronen bei neurodegenerativen Erkrankungen und in sterbenden T-Lymphozyten von AIDS-Patienten Apoptose zu inhibieren. Dies erfordert die Kenntnis der an der Apoptose beteiligten Komponenten und deren Wirkmechanismen, um in Zukunft gezielter eingreifen zu können.

Viele Zytostatika töten Zellen in bestimmten Konzentrationen durch die Induktion von Apoptose [3]. Wenn man nun eine Chemotherapie durchführt und bemerkt, dass der Tumor Apoptose-resistent ist, so wird man nur den Patienten vergiften. Um zu entscheiden, ob Zytostatika wirken, muss es möglich sein, den Beginn der Apoptose in noch lebenden Zellen des Patienten nachzuweisen. Eine zentrale Frage ist aber auch, warum manche Tumorzellen gegen Zytostatika resistent sind oder werden.

Je genauer man die Vorgänge bei der Apoptose versteht, desto eher lassen sich Apoptose-beeinflussende Medikamente entwickeln. In

Apoptosewege eingreifende Substanzen müssen sehr spezifisch wirken, da sie mit zentralen zellulären Signalwegen interferieren. Es muss ein therapeutisches Fenster gefunden werden, innerhalb dessen bei Therapien möglichst wenige gesunde Zellen geschädigt werden. Die Erkenntnisse der letzten Jahre lassen dazu Hoffnungen aufkommen.

Apoptosis – cellular self destruction as protection for survival

Potentially dangerous or unwanted cells undergo suicide in a healthy organism. They activate an endogenous suicide program. A special form of programmed cell death is apoptosis that is characterized by specific morphologic and biochemical properties. During apoptosis no cellular constituents leak out from dying cells and no inflammatory response occurs. This cardinal feature of apoptosis distinguishes it from necrosis, which usually results from trauma that causes injured cells to swell and lyse, releasing cytoplasmic material that stimulates an inflammatory response. Normal metazoan development and health require the precise regulation of cell number. Apoptosis plays a critical role in morphogenesis, tissue homeostasis, the elimination of damaged or virally infected cells, and elimination of self-reactive lymphocytes from the immune system. Failures in apoptotic programs contribute to a number of diseases like tumors, autoimmune diseases, AIDS, neurodegenerative disorders and ischemic injury. Among the inducers of apoptosis are radiation, drugs, the removal of growth or survival factors, and specific death factors. The central molecules in all apoptotic signal transduction pathways are caspases, a family of cysteine proteases that cleave their substrates after aspartate residues.

Literatur

- [1] J. C. Ameisen (1996) The origin of programmed cell death. *Science* **272**, 1278-1279.
- [2] J. T. Greenberg (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094-12097.
- [3] H. Hug (1997) Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defense. *Biol. Chem.* **378**, 1045-1413.
- [4] H. Hug, M. Los, W. Hirt, K.-M. Debatin (1999) Rhodamine 110-linked amino acids

and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells. *Biochemistry* **38**, 13906-13911.

- [5] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- [6] L. J. Miller, J. Marx (1998) Apoptosis. *Science* **281**, 1301.
- [7] S. Nagata (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
- [8] M. C. Raff (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397-400.
- [9] H. R. Stennicke, G. S. Salvesen (1998) Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**, 17-31.
- [10] J. G. Teodoro, P. E. Branton (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* **71**, 1739-1746.

[11] D. L. Vaux, S. J. Korsmeyer (1999) Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.

[12] A. H. Wyllie (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556.

[13] M. B. Yarmolinsky (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* **267**, 836-837.

Zum Autor

Der Autor ist den BIUZ-Lesern bereits aus den Heften 6/92 und 4/93 bekannt.

Anschrift

Priv. Doz. Dr. Hubert Hug, Universitätskinderklinik Ulm, Prittwitzstraße 43, D-89075 Ulm, Tel: 0731-503-3250, Fax: 0731-502-6765, E-mail: hubert.hug@medizin.uni-ulm.de