

## 1. Einleitung

"Nur ein dreijähriger Urlaub auf dem Mond kann einen Biologen dafür entschuldigen, noch nicht gehört zu haben, daß die Apoptose, ein angeborenes Programm, nach dem Zellen Selbstmord begehen, eines der aktuellsten Themen der derzeitigen biologischen Forschung darstellt" (Whyte & Evan, 1995). Mit diesem Satz beginnt ein Artikel, der 1995 in der Zeitschrift *Nature* erschienen ist. In der Tat kann man insbesondere seit Beginn der neunziger Jahre ein wachsendes Interesse an dem Thema Apoptose feststellen, das sich auch an einem deutlichen Anstieg an Veröffentlichungen zeigt. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind allerdings bis heute noch viele Mechanismen dieses komplexen Prozesses ungeklärt.

### *Apoptose und Nekrose*

Grundsätzlich lassen sich zwei Arten des Zelltodes voneinander unterscheiden, die Apoptose und die Nekrose. Die Nekrose ist der einfachere der beiden Prozesse und daher weitgehend verstanden (Wyllie, 1997). Der Begriff leitet sich von dem griechischen Wort "nekros" (= der Tod) ab. Es handelt sich um einen Zelltod, bei dem die Zelle passiv, häufig infolge einer mechanischen Verletzung oder durch Kontakt mit einer toxischen Substanz zugrunde geht. Eine Nekrose geht oft mit einer durch ATP-Mangel verursachten Störung des osmotischen Gleichgewichtes einher (Silbernagl & Lang, 1998). Ionen, wie beispielsweise  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ , gelangen ungehindert in das Zellinnere und Wasser strömt nach (Samali et al., 1996). Die Zelle schwillt an, bis sie platzt und die freiwerdenden Zellinhaltsstoffe führen im umliegenden Gewebe zu Entzündungsreaktionen (Wyllie et al., 1980).

Im Gegensatz zur Nekrose steht die Apoptose. Auch diese Bezeichnung stammt aus dem Griechischen. Sie steht ursprünglich für das Abfallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das selbstlose Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus. Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie zur Beschreibung charakteristischer morphologischer Veränderungen der Zelle eingeführt, die beim sogenannten programmierten Zelltod beobachtet werden (Kerr et al., 1972). Daher werden die Begriffe "programmierter Zelltod" und "Apoptose" in der Literatur häufig gleichgesetzt. Jedoch ist ihre synonyme Verwendung nicht ganz korrekt. So stammt der Begriff "programmierter Zelltod" ursprünglich aus der Entwicklungsbiologie und beschreibt

die koordinierte Abfolge von Ereignissen, die während der Entwicklung eines Organismus zum Absterben bestimmter Zellen führen (Leist & Nicotera, 1997). "Apoptose" dagegen beschreibt nach seiner ursprünglichen Definition einen Zelltod, der durch ganz bestimmte morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert ist (Wyllie, 1997). Da ein programmierter Zelltod meistens von apoptotischer Morphologie begleitet ist, wird auch in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen den beiden Begriffen gemacht.

Die Apoptose ist ein genetisch festgelegter Prozeß, in dessen Verlauf die Zelle selbst aktiv zu ihrem Untergang beiträgt. Er findet unter physiologischen Bedingungen bei allen mehrzelligen Organismen statt, wenn überflüssige, geschädigte oder potentiell gefährliche Zellen eliminiert werden sollen. Die Apoptose dient somit in erster Linie der Regulation und Aufrechterhaltung einer Gewebemöostase. Desweiteren spielt sie eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung, der Abwehr von schädigenden Einflüssen oder bei Alterungsprozessen (Vaux & Strasser, 1996).

Die Unterschiede, die sich auf morphologischer Ebene zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod beobachten lassen, betreffen sowohl die Zelle als Ganzes als auch ihre Organellen. Während eine nekrotische Zelle infolge eines gestörten Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes anschwillt und schließlich platzt, schrumpft eine apoptotische Zelle, weil ihr Cytoplasma kondensiert. Gleichzeitig bilden sich blasenartige Ausstülpungen der Plasmamembran. Dieser Vorgang wird auch als "blebbing" bezeichnet. Die apoptotische Zelle zerfällt schließlich in viele membranumhüllte Teile, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. *In vivo* werden diese Zellreste von Makrophagen oder anderen Zellen entsorgt. Somit wird das umliegende Gewebe nur minimal in Mitleidenschaft gezogen. In Zellkulturen dagegen, in denen phagozytierende Zellen fehlen, wird auch die Membran apoptotischer Zellen irgendwann zerstört. Man spricht dann von "sekundärer Nekrose" (Bredesen, 1996; Wyllie, 1997).

Während des apoptotischen Zellsterbens lassen sich einige charakteristische Merkmale auf Ebene der Zellkerne beobachten. Das Chromatin apoptotischer Zellen verdichtet sich zunächst im Bereich der Kernperipherie und zerfällt schließlich in mehrere Teile, was als typische Zellkernfragmentierung sichtbar wird. Zusätzlich findet eine Fragmentierung genomischer DNA in oligonukleosomale Bruchstücke statt. Hierfür ist die Aktivität einer Endonuklease verantwortlich, welche die DNA an ganz bestimmten Stellen zwischen den Nukleosomen

spaltet (Enari et al., 1998). Die Frage, ob diese Nuklease auch für die anfängliche Chromatinkondensation verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert. So wiesen Liu et al. (1998) nach, daß die Nuklease während der Apoptose sowohl in der Lage ist, DNA zu fragmentieren als auch Chromatin zu kondensieren. Oberhammer et al. (1993) dagegen sehen keinen Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen, zumal es Beispiele gibt, bei denen zwar eine apoptotische Chromatinkondensation, jedoch keine DNA-Fragmentierung beobachtet wird (Oberhammer et al., 1993). Bei der Nekrose kann man ebenfalls eine Verdichtung des Chromatins beobachten, allerdings wird die Kernhülle sehr früh zerstört, und es findet eine einfache Degradierung der DNA statt.

Nicht nur die nekrotische Zelle selbst, sondern auch ihre Organellen zeigen eine Schwellung, wohingegen sie in apoptotischen Zellen optisch intakt erscheinen (McCarthy & Evan, 1998). Aufgrund dieser optischen Unversehrtheit war man solange der Ansicht, daß die Mitochondrien nur eine untergeordnete Rolle bei der Apoptose spielen (Mignotte & Vayssiere, 1998), bis genauere Untersuchungen das Gegenteil belegten (Kannan & Jain, 2000). So finden während des apoptotischen Zellsterbens verschiedene mitochondriale Veränderungen statt, die anscheinend für das Zellsterben von Bedeutung sind. Es werden vermehrt Radikale generiert, das Membranpotential wird zerstört, die sogenannte Megapore wird gebildet und proapoptische Faktoren, wie Cytochrom c, werden aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt (Susin et al., 1998). Einige dieser Veränderungen, insbesondere das freigesetzte Cytochrom c, tragen über die Aktivierung spezieller Enzyme, der sogenannten Caspasen (siehe unten) wesentlich zum Sterbeprozess der Zelle bei (Mignotte & Vayssiere, 1998).

In der folgenden Tabelle sind noch einmal einige morphologische Merkmale aufgeführt, die allgemein als charakteristisch für einen nekrotischen bzw. apoptotischen Zelltod angesehen werden. Neuere Befunde deuten allerdings darauf hin, daß nicht in allen Fällen eine hundertprozentig sichere Unterscheidung zwischen den beiden Formen des Zelltodes möglich ist. So stellen Apoptose und Nekrose nach Leist & Nicotera (1997) die zwei Extreme einer Vielzahl möglicher Formen des Zelltodes dar. Desweiteren wurden auch Zelltode beschrieben, in deren Verlauf einige klassische Merkmale der Apoptose auftraten, andere dagegen ausblieben (Sakahira et al., 1999). Daher ist zu beachten, daß zur Charakterisierung eines Zelltodes immer das parallele Auftreten mehrerer Merkmale untersucht werden sollte (Samali et al., 1999).

**Tabelle 1.1:** Einige morphologische Merkmale zur Unterscheidung von Nekrose und Apoptose

	Nekrose	Apoptose
Zellvolumen	Zellschwellung	Zellschrumpfung
Membran	Integrität frühzeitig zerstört	Integrität lange erhalten
Zellkern	frühzeitig zerstört	Chromatinmargination, -kondensation und -fragmentierung
Mitochondrien / ER	Schwellung	Ultrastrukturell intakt
DNA	zufällige Degradation	Fragmentierung in oligonukleosomale Bruchstücke

Neben diesen morphologischen Charakteristika gibt es weitere Merkmale, die nekrotischen und apoptotischen Zelltod voneinander unterscheiden. Hierzu gehört der Zeitgang des Absterbens. In der nekrotischen Zelle ist der zeitliche Abstand zwischen schädigendem Auslöser und ihrer Lyse relativ kurz. Folglich ist diese Art des Zelltodes durch äußeres Eingreifen so gut wie nicht aufhaltbar.

Die apoptotische Zelle dagegen verhält sich anders. Der Prozeß von der Entstehung des Signals bis hin zum Zelltod kann sich über mehrere Stunden bis Tage erstrecken. Man spricht daher auch von "verzögertem Zelltod". Während der Apoptose finden verschiedene hintereinander geschaltete Ereignisse statt. Offenbar gibt es mehrere verschiedene Signaltransduktionswege, über die der apoptotische Zelltod vonstatten gehen kann. Als apoptoseauslösendes Signal können z.B. die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, der Entzug von Wachstumsfaktoren, toxische Substanzen, Bestrahlung oder oxidativer Streß wirken. Welchen Signalweg diese Faktoren anstoßen, hängt von den Faktoren selbst, dem Zelltyp oder dessen physiologischem Zustand ab. Sämtliche Signalwege münden vermutlich in eine gemeinsame Endstrecke, wobei die einzelnen Teilprozesse zum Teil voneinander unabhängig, zum Teil hintereinander geschaltet ablaufen können. Sie führen letztendlich zum Zelltod mit den in Tabelle 1.1 aufgeführten Merkmalen.

Eine ausführliche Beschreibung sämtlicher bislang bekannter Prozesse würde zu weit führen. Daher sollen sich die nachfolgenden Erläuterungen auf zwei Besonderheiten des apoptotischen Zelltodes beschränken. Die eine Besonderheit bilden die sogenannten Caspasen. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe proteolytischer Enzyme, die als Proenzyme synthetisiert werden und sich im Verlauf der Apoptose gegenseitig kaskadenartig aktivieren. Caspasen, die am Ende dieser Kaskade stehen, sind letztendlich für die Zerstörung der Zelle verantwortlich, da sie wichtige Zellproteine hydrolysieren. Zu ihren Substraten gehören unter anderem Strukturproteine wie Aktin, Lamin und Spektrin, Proteine der Kernmatrix, Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturenzyme (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998). Die zweite Besonderheit der Apoptose liegt in dem genetischen Programm, das ihr, zumindest in den meisten Fällen, zugrunde liegt. Obwohl die Gesamtsynthese von RNA und Protein während des Zellsterbens abnimmt (Deckwerth & Johnson, 1993), können einzelne Genprodukte spezifisch neu synthetisiert bzw. auf mRNA- oder Proteinebene an- oder abgeschaltet werden. Ein Teil der neusynthetisierten Genprodukte ist entscheidend an der Regulation der apoptotischen Ereigniskaskade beteiligt. Die Funktionen, welche die Proteine ausüben, können sowohl pro- als auch antiapoptotisch sein.

### *Caspasen*

Caspasen sind **Cystein-Proteasen**, die ihre Substrate hinter **Aspartatresten** spalten. Ihre Entdeckung geht auf Untersuchungen zurück, die an dem genetisch gut charakterisierten Nematoden *Caenorhabditis elegans* durchgeführt wurden (Ellis et al., 1991). Während der Entwicklung des zwittrigen Wurmes sterben genau 131 der insgesamt 1090 Zellen über ein apoptotisches Selbstmordprogramm ab. Dieser Zelltod wird von einer Gruppe von Genen kontrolliert, die als ced-Gene (von "**cell death**") bezeichnet werden. Yuan et al. (1993) fanden heraus, daß das Protein, das durch eines dieser ced-Gene, nämlich des ced-3 Gens, codiert wird, eine ~ 30 % ige Sequenzhomologie zu dem Interleukin-1 $\beta$ -konvertierenden Enzym (ICE) der Säugetiere aufweist. Die bis dahin bekannte Aufgabe dieses Enzyms bestand in der Spaltung des Interleukin-1 $\beta$ -Vorläufer-Moleküls, welches dadurch aktiviert wird. Zusammen mit anderen Zytokinen ist aktiviertes Interleukin-1 $\beta$  an Entzündungsreaktionen beteiligt (Ibelgaufts, 1992).