

Filamentsysteme

Wirkstoffe an der Schnittstelle zwischen Autophagie und Cytoskelettdynamik

THERESIA E. B. STRADAL, MARCO KIRCHENWITZ, ANIKA STEFFEN
 ABTEILUNG ZELLBIOLOGIE, HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG –
 HZI, BRAUNSCHWEIG

The cytoskeleton is a primarily dynamic network of protein filaments, such as actin filaments and microtubules, which reach throughout the cell's interior. All motile processes of the cell depend on the finely tuned turnover of the cytoskeleton. Interference consequently leads to failure of e.g. migration, cytokinesis, or autophagy. We here discuss compounds that specifically affect aspects of actin assembly, microtubule stability and autophagy by targeting the central signaling axis on which they converge.

DOI: 10.1007/s12268-023-1921-z
 © Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Das Cytoskelett ist ein hochdynamisches Geflecht aus Proteinfasern, die das gesamte Zellinnere durchziehen. Die Form der Zelle, ihre Struktur und innere Organisation mit allen Bewegungsprozessen hängen essenziell vom fein regulierten Umsatz dieser Filamente ab. Viele Prozesse, z. B. Zellteilung, Autophagie, aber auch Aspekte der Signaltransduktion, kommen zum Erliegen wenn die Cytoskelettdynamik gestört ist. Die wichtigsten dynamischen Elemente des Cytoskeletts sind Aktinfilamente und Mikrotubuli. Das zeitlich und räumlich fein koordinierte Zusammenspiel beider Filamentsysteme ist notwendig, damit diese zellulären Prozesse korrekt ablaufen können. Diese Koordination erfordert zwingend, dass Aktinregulierende Signalkaskaden mit den Signalwegen der Mikrotubulidynamik abgestimmt sind und umgekehrt. Die Forschung an Modulatoren bestimmter Prozesse, wie Autophagie oder Zellteilung, hat aufgezeigt, in welchem Ausmaß die verschiedenen Cytoskelettelemente und Signalkaskaden miteinander vernetzt sind: Wirkstoffe, die bestimmte Prozesse angreifen, haben oft spezifische Effekte auf das Cytoskelett und Wirkstoffe, die direkt Aktin- oder Mikrotubulidynamik verändern, zeigen dementsprechend Auswirkungen auf bestimmte Zellprozesse.

Aktin

Aktin wird in der Zelle als globuläres Aktin (G-Aktin) hergestellt. Das ATP-gebundene G-Aktin kann sich spontan zu polaren Filamenten (F-Aktin) zusammenlagern, die wiederum spontan zerfallen können. Die Aktinfilamente sind einem stetigen dynamischen Umbau unterworfen. Da die Aktindynamik fundamental wichtig für die Zellform und Stabilität der Membranen ist, sind diese Prozesse sehr streng reguliert und involvieren spezifische Signalkaskaden und molekulare Maschinen, die den lokalen Aufbau von Aktinfilamenten steuern. Nicht zuletzt vermitteln Aktinfilamente gemeinsam mit dem Motorprotein Myosin Kontraktilität, was in allen Zellen zum Zusammenhalt im Gewebe und zur Bewegung beiträgt.

Mikrotubuli

Mikrotubuli werden aus Dimeren von α - und β -Tubulin zusammengelagert und bilden polare hohle Röhren, die nur an einem Ende, dem Plus-Ende, wachsen. Startpunkt ihrer Polymerisation ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum in der Nähe des Kerns. Das wachsende Ende der Mikrotubuli ist mit einem +TIP-Komplex dekoriert, der mit den wachsenden Mikrotubuli verhaftet bleibt und

die Wachstumsgeschwindigkeit reguliert. Mikrotubuli haben neben ihrer weithin bekannten Rolle in der Zellteilung, bei der sie den Spindelapparat aufbauen und die Chromosomen in die Tochterzellen verteilen, eine äußerst wichtige Rolle beim Transport von Organellen, Vesikeln, Proteinen und RNAs. Diese Transportrolle von Interphasemikrotubuli (Interphase = Ruhephase zwischen den Zellteilungen) ist besonders wichtig in Neuronen. Ihre langen Fortsätze, die Axone, versorgen zellkernferne Kompartimente mit lebenswichtigen Bausteinen, transportieren aber auch Zellabfälle zurück ins Zentrum zu deren Abbau. Neurodegenerative Erkrankungen gehen oft mit einem Transportdefekt und gestörter Mikrotubuli-Dynamik in den Axonen einher. Zudem werden diese Transportprozesse von richtungsspezifischen Motorproteinen, den Dyneinen und Kinesinen, vermittelt.

Autophagie

Autophagie ist ein zellulärer Recycling- und Abbaumechanismus von Zellkomponenten, z. B. Proteinen, Lipiden und ganzen Organellen. Der Abbau in wiederverwertbare Grundbausteine sichert die Homöostase der Zelle. Autophagie wird durch komplexe Signalketten der Zelle gesteuert, die durch Stressreize – wie Nährstoffmangel oder Hypoxie – ausgelöst werden. In Säugetieren wird zwischen verschiedenen Autophagozytose-Gruppen unterschieden, der Makroautophagozytose, der Mikroautophagozytose und der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA). Bei der Makroautophagozytose, die in der Regel einfach als „Autophagie“ bezeichnet wird, wird zelluläres Material unselektiv mit einer Doppelmembran zu einem Autophagosom umschlossen. Dieses fusioniert im Laufe des Prozesses mit Lysosomen, wonach lysosomale Enzyme den Inhalt abbauen. Störungen des Autophagieprozesses stehen mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung, wie Krebs, neurodegenerativen Krankheiten, Stoffwechselstörungen und Infektionen.

Regulation von Signalwegen zur Autophagie

Auf molekularer Ebene ist Autophagie über die Serin/Threonin-Kinase mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) und die 5'-AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) reguliert. Diese zentralen Signalschaltstellen verarbeiten zelluläre Reize und initiieren oder hemmen den Autophagieprozess über die Phosphorylierung von ULK1 (*uncoordinated 51-like kinase 1*). mTORC1 reguliert neben Autophagie etliche weitere Signalwege [1]. mTORC1 selbst wird über den Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Proteinkinase-B(Akt)-Signalweg reguliert. Im Detail werden extrazelluläre Signale von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) über die Zellmembran weitergeleitet. Dabei wird Klasse-I-PI3K, zusammengesetzt aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110, aktiviert und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) erzeugt. Als Signalmolekül aktiviert PIP3 weitere Kinasen und in Folge Akt. Die Signalweiterleitung von Akt zu mTORC1 erfolgt über weitere Signalkomponenten, die den mTORC1-Komplex letztendlich aktivieren [2]. Ein aktiver mTORC1 hemmt ULK1 und somit Autophagie. Die Signalweiterleitung über PI3K-AKT-mTORC1 ist ein zentraler Mechanismus zur Regulation von Autophagie und damit einhergehend von Zellwachstum und -metabolismus. Fehlsteuerungen dieses Signalwegs können zu verschiedenen Krankheiten führen, wie Krebs oder Stoffwechselerkrankungen. Es wurden bereits mehrere Inhibitoren beschrieben, die Autophagie hemmen (z. B. Chloroquine) oder aktivieren (z. B. Rapamycin). Als mTORC1-spezifischer Inhibitor bildet Rapamycin (*aka* Sirolimus) mit FKBP12 einen Komplex, der mTORC1 allosterisch inhibiert und so Autophagie induziert. Darüber hinaus gibt es auch eine Reihe an Inhibitoren, die auf verschiedene Komponenten des PI3K-AKT-mTORC1-Signalwegs abzielen, einschließlich verschiedener pharmakologischer PI3K-Inhibitoren (z. B. Idelalisib, Copanlisib), AKT-Inhibitoren (z. B. Capivasertib, Ipatasertib) und mTOR-Inhibitoren (z. B. Everolimus, Sirolimus). Alle genannten Inhibitoren zeigen pharmakologische Relevanz zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten und/oder führen zu einer Erhöhung des Autophagieprozesses. Zudem zeigen sie Zellzyklus-hemmende und zellprotektive

Effekte oder wirken im Falle von mTOR-Inhibitoren immunsuppressiv [3].

Die Erforschung weiterer Autophagiemodulierender Substanzen ist von entsprechend großem Interesse. Eine dieser Substanzen ist das Molekül *small molecule enhancer of rapamycin 28* (SMER28), welches Autophagie fördert, aber nicht direkt auf die Kinase mTOR einwirkt. Obwohl SMER28 ein pharmakologisch interessantes Wirkungsspektrum zeigte, wie beispielsweise neuroprotektive Eigenschaften in *in vivo*-Krankheitsmodellen von Chorea Huntington und Morbus Alzheimer [4], cytoprotektive Effekte im Knochenmark während Strahlentherapie [5] und Verhinderung des cytopathischen Effekts und der Vermehrung von Cytomegaloviren [6], blieb der molekulare Mechanismus von SMER28 jedoch bis vor Kurzem unbekannt.

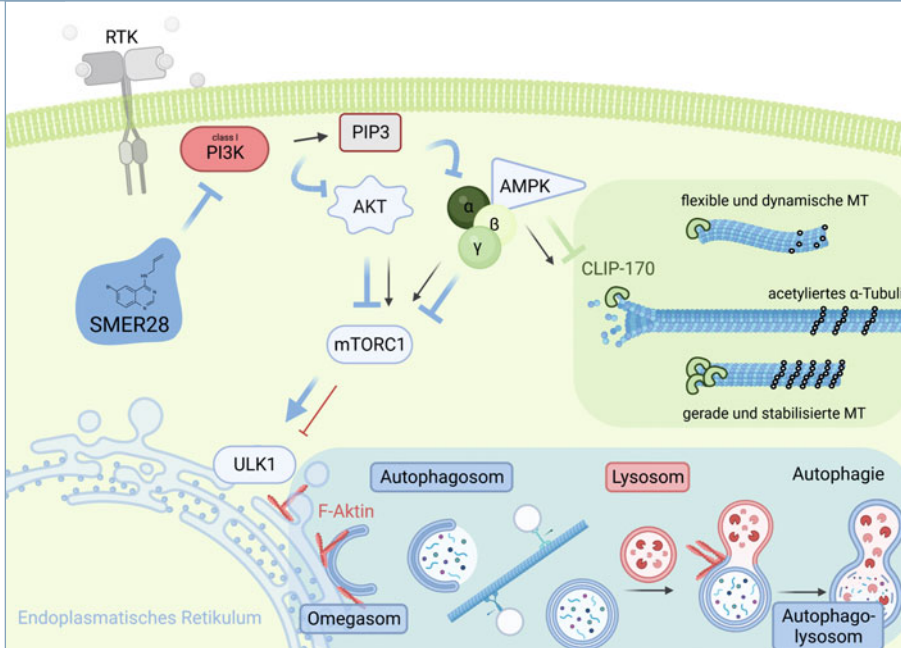
Small molecule enhancer of rapamycin 28 (SMER28)

Kürzlich konnten wir den zellulären Wirkmechanismus und das molekulare Target von SMER28 genauer beschreiben: SMER28 wirkt entlang des RTK-Signalwegs, indem es die katalytische Aktivität der PI3K, im Besonderen die Isoform PI3K δ , inhibiert (**Abb. 1**). Dies führt zu einer Hemmung der Signalweiterleitung über die PI3K-AKT-mTORC1-Signalachse und hemmt Prozesse wie Zellzyklusregulation und Zellmigration, wobei gleichzeitig die resultierende Aktivierung der Kinase Ulk1 zu einer erhöhten Autophagierate führt [7]. Neben diesem direkten Effekt auf Klasse-I-PI3Kinasen, besonders auf PI3K δ , zeigten sich weitere indirekte Effekte.

SMER28 beeinflusst indirekt das Cytoskelett und dessen dynamische Reorganisation: Aktin-gesteuerte Prozesse, wie die Bildung von Membranvorschüben bei Zellbewegungen, werden durch SMER28 signifikant reduziert, was einen Einfluss auf die RTK-induzierte Aufnahme von z. B. Listerien [7] oder auch Cytomegalie-Viren hat [6]. Neben dem Aktincytoskelett wirkt sich SMER28 außerdem auf Mikrotubuli aus: Über die Hemmung der AMPK inhibiert SMER28 die Phosphorylierung von *cytoplasmic linker protein 170* (CLIP-170), einer Komponente des +TIP-Komplexes an den wachsenden Mikrotubuli-Enden. Dadurch wird der Mikrotubuliaufbau verlangsamt und die Acetylierung der resultierenden Mikrotubuli gefördert, wodurch diese wiederum stabilisiert und gradlinig ausgerich-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 1:** Wirkungsweise des *small molecule* SMER28 auf die Signalwege und das Cytoskelettgerüst der Zelle. Die Wirkweise von SMER28 ist mit blauen Linien angezeigt, entweder inhibierend (T) oder aktivierend (→), die homöostatische Signaltransduktion ist mit schwarzen Pfeilen (→) bzw. roten Linien (T) angedeutet. SMER28 wirkt inhibierend auf PI3K [7]. Hierdurch kommt es zu einer indirekten Repression von mTORC1, einem für Autophagie wichtigen Molekülkomplex, der im aktiven Zustand zentral für die Steuerung vieler Stoffwechselprozesse ist. Aktives mTORC1 unterdrückt den katabolischen Prozess der Autophagie durch eine inhibierende Phosphorylierung der Autophagie-spezifischen Kinase ULK. Aktives ULK initiiert Autophagie. Der Autophagieprozess beginnt mit der Entstehung von Omegasomen am ER, welche abzubauen Bestandteile des Cytoplasmas umschließen. Die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen ermöglicht die Ansäuerung und somit den Abbau des Inhalts in den Autophagolysosomen. Bei diesen sequenziellen Schritten sind sowohl F-Aktin als auch Mikrotubuli (MT) nachweislich beteiligt. Der Wirkstoff SMER28 hat neben seiner Autophagie-induzierenden Wirkung auch einen stabilisierenden Effekt auf MT durch vermehrte Acetylierung und die Regulierung des Mikrotubuli-Plus(+) -Endenbindenden Proteins CLIP-170 [8]. Die Abbildung wurde mit BioRender.com generiert.

- [3] Popova NV, Jucker M (2021) The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer. *Int J Mol Sci* 22: 1743
 [4] Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S et al. (2007) Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol* 3: 331–338
 [5] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Fylaktakidou K et al. (2018) SMER28 is a mTOR-independent small molecule enhancer of autophagy that protects mouse bone marrow and liver against radiotherapy. *Invest New Drugs* 3: 773–781
 [6] Clark AE, Sabalza M, Gordts P, Spector DH (2018) Human Cytomegalovirus Replication Is Inhibited by the Autophagy-Inducing Compounds Trehalose and SMER28 through Distinctly Different Mechanisms. *J Virol* 92: e02015-17
 [7] Kirchenwitz M, Stahnke S, Prettin S et al. (2022) SMER28 Attenuates PI3K/mTOR Signaling by Direct Inhibition of PI3K p110 Delta. *Cells* 11: 1648
 [8] Kirchenwitz M, Stahnke S, Grunau K. et al. (2022) The autophagy inducer SMER28 attenuates microtubule dynamics mediating neuroprotection. *Sci Rep* 12: 17805
 [9] Dubois F, Bergot E, Zalcan G, Levallet G (2019) RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis-an updated review. *Cell Death Dis* 10: 928

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Theresia Stradal
 Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
 Inhoffenstraße 7
 D-38124 Braunschweig
 Theresia.Stradal@helmholtz-hzi.de

tet werden. Zusammen führen diese Eigenschaften von SMER28 zu einem zellprotektiven und insbesondere neuroprotektiven Effekt gegenüber experimentell induzierter Degradation von primären Neuronen. Im Gegensatz zu anderen direkten Mikrotubuli-stabilisierenden und neuroprotektiven Substanzen, z. B. Epothilon B, erhöht SMER28 zusätzlich die Autophagie [8], was den neuroprotektiven Effekt weiter unterstützt.

Interessanterweise gibt es auch zelleigene Proteine, z. B. Rassf1A, die generell den Tumorsuppressoren zugeordnet werden [9], die ähnliche Effekte wie SMER28 auf Zellen haben. Das unterstreicht die Relevanz der Forschung an Wirkstoffen mit ähnlichen Wirkmechanismen und etabliert SMER28 als potenzielle Leitstruktur zur Weiterentwicklung. ■

Literatur

- [1] Liu GY, Sabatini DM (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 183–203
 [2] Dibble CC, Cantley LC (2015) Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* 25: 545–555

AUTORINNEN UND AUTOREN



Marco Kirchenwitz

2013–2019 Biologiestudium an der TU Braunschweig. Seit 2019 Doktorand in der Abteilung Zellbiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in der Abteilung von Prof. Dr. T. Stradal.



Anika Steffen

1996–2001 Studium der Biologie an der TU Braunschweig. 2001–2005 Promotion am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (damals GBF) in Braunschweig unter Anleitung von Prof. Dr. J. Wehland. 2006–2008 Postdoc/EMBO LTF am Institut Curie, Paris, Frankreich und 2008–2010 Universitätsklinikum Köln. 2010–2014 Habilitandin im Institut für Genetik, Universität Bonn. Seit 2014 Wissenschaftlerin in der Abteilung Zellbiologie bei Prof. Dr. T. Stradal.



Theresia Stradal

Biologiestudium. 1997–2000 Promotion am Institut für Molekularbiologie der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. 2001–2009 erst Postdoktorandin im Labor von Prof. Dr. J. Wehland, dann Gruppenleiterin Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. 2009–2013 Professorin für Zellbiologie an der Universität Münster. Seit 2014 Leiterin der Abteilung Zellbiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.