

РОЛЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ И ЭСТРАДИОЛА В НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ БЕТА-АМИЛОИДОМ

© 2015 г. Н. Л. Рендаков, Л. А. Лысенко, Ю. В. Люпина, Н. П. Шарова,
Н. Б. Сельверова, член-корреспондент РАН Н. Н. Немова

Поступило 15.10.2014 г.

DOI: 10.7868/S086956521519024X

Лизосомальные протеиназы (катепсины) играют ведущую роль в процессе деградации внутриклеточных структур — аутофагии. Нарушения процесса аутофагии, приводящие к накоплению аномальных белковых агрегатов, вносят значительный вклад в развитие нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), особенно болезни Альцгеймера (БА) [1]. Накопление в нейронах аутофагических вакуолей (АВ) и увеличение количества дистрофических нейритов, содержащих такие вакуоли, при БА происходит гораздо интенсивнее, чем при других возрастных НДЗ. Нейроны при этом вынуждены фактически “нести бремя” большого количества неразрушенных или частично разрушенных белков в аутофагическом компартменте.

Одной из причин сбоя процесса аутофагии при БА является, по всей видимости, дефицит протеолитической (катептической) активности в лизосомах. Показано, что ингибирование активности катепсинов вызывает быстрое накопление АВ в первичной культуре нейронов [2]. Сходным образом, накопление АВ и дистрофия нейритов наблюдаются при делеции генов одного или нескольких катепсинов или при введении ингибиторов лизосомальных протеиназ *in vivo*.

Возможными регуляторами экспрессии катепсинов являются женские половые гормоны эстрогены. Так, имеются сведения о повышении экспрессии катепсина D в клетках эстрогензависимых опухолей. Известно также, что эстрогены стимулируют транскрипцию гена катепсина D через элементы эстрогенового ответа, расположенные вблизи промоторной области гена [3].

Повышенный риск БА у женщин в постменопаузе в сравнении с мужчинами того же возраста связывают с дефицитом эстрогенов [4]. Один из основных эстрогенов, 17 β -эстрадиол (E_2), проявляет выраженный нейропротективный эффект за счет своего антиоксидантного и антиапоптотического действия [5]. В то же время влияние E_2 на аутофагическую утилизацию белковых агрегатов, в частности, бета-амилоидного пептида (А β , основного цитотоксического агента при БА), представляется малоизученным.

В связи с этим целью наших экспериментов явилось выяснение роли лизосомальных протеиназ в нейропротективном эффекте E_2 в условиях модели БА с интрацеребральным введением А β .

Эксперимент по моделированию БА был проведен на 48 однолетних крысах (24 самки и 24 самца) популяции Wistar. Самки и самцы случайным образом были разделены на три группы: контрольную (“К”) и две опытные (“А β ” и “А β + E_2 ”). Крысам группы “К” в область правого гиппокампа вводили 2 мкл физиологического раствора. Крысам группы “А β ” в область правого гиппокампа вводили 2 мкл раствора А β_{1-40} (5 мкг пептида). Крысам группы “А β + E_2 ” после аналогичной инъекции раствора А β_{1-40} в течение 10 дней вводили по 100 мкг E_2 в виде водной эмульсии. До и после операции с крысами каждой группы проводили поведенческие тесты в водном лабиринте Морриса, оценивая время поиска подводной платформы. Забой животных проводили на 14-й день после операции, головной мозг немедленно извлекали, отделяли гиппокамп, лобную и височную доли большого мозга и замораживали их в жидком азоте. Две особи из каждой группы были подвергнуты перфузии параформальдегидом с целью получения материала для флуоресцентной иммуногистохимии. Экспрессию генов катепсинов B, L, D, актина и GAPDH оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с помощью амплификатора iQ5 (“Bio-Rad”, США) с использованием геноспецифических праймеров [6].

Институт биологии Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск

E-mail: nlrend@mail.ru

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской Академии наук, Москва

Институт возрастной физиологии
Российской академии образования, Москва

Полученные нами данные продемонстрировали значительное влияние $A\beta$ и E_2 на когнитивные функции крыс, оцененные с помощью водного лабиринта Морриса. У заранее обученных самок и самцов крыс после введения в гиппокамп $A\beta$ достоверно ($p < 0.05$) увеличилось время прохождения теста. Введение E_2 привело к уменьшению времени поиска подводной платформы у животных обоего пола по сравнению с таковыми, получившими только $A\beta$. При этом влияние E_2 на сохранность когнитивных функций оказалось более выраженным у самок ($p < 0.01$), чем у самцов ($p < 0.05$). Таким образом, результаты поведенческих тестов подтверждают нейродегенеративное воздействие пептида $A\beta_{1-40}$, а также снижение его повреждающего воздействия при введении эстрогена.

Половые различия в изменении когнитивных функций связаны, вероятнее всего, с разной эффективностью действия E_2 на пути деградации $A\beta$ в мозге самок и самцов. Имеются данные о том, что у самцов мышей E_2 вызывает только ограниченное, локальное снижение количества $A\beta$ по сравнению с овариэктомированными самками [7]. Таким образом, более выраженный характер воздействия E_2 на когнитивные показатели самок, обнаруженный в нашем эксперименте, вполне соответствует представлению о том, что этот гормон более эффективен для снижения уровня $A\beta$ в мозге самок [8].

Интрацеребральное введение $A\beta$ привело в нашем эксперименте к повышению экспрессии гена катепсина D в области правого гиппокампа приблизительно в 2.4 раза ($p < 0.05$) у самок и в 8.2 раза ($p < 0.01$) у самцов (рис. 1). Мы предполагаем, что данное изменение может являться адаптивной реакцией на введение токсичного пептида. Известно, что активность некоторых $A\beta$ -деградирующих ферментов увеличивается с возрастом и повышается еще больше при БА, что расценивается как физиологическая реакция, направленная на нейтрализацию амилоида [9]. Вероятнее всего, усиление экспрессии лизосомальных гидролаз, которое наблюдалось и другими исследователями при БА и в ее моделях, оказывается недостаточным для того, чтобы компенсировать накопление β -амилоида.

Введение E_2 привело к еще большему возрастанию относительной экспрессии гена катепсина D, а именно в 5 раз ($p < 0.01$) у самок и в 17 раз ($p < 0.001$) у самцов. Интересно также отметить, что в обеих опытных группах у самцов мы наблюдали более высокую экспрессию гена катепсина D, чем у самок. В обеих опытных группах экспрессия гена данной протеиназы у самцов была приблизительно в 3.5 раза ($p < 0.01$) выше, чем у самок. Возможно, это связано с тем, что на фоне более низкого содержания эстрогенов индукция катепсина D происходит наиболее интенсивно.

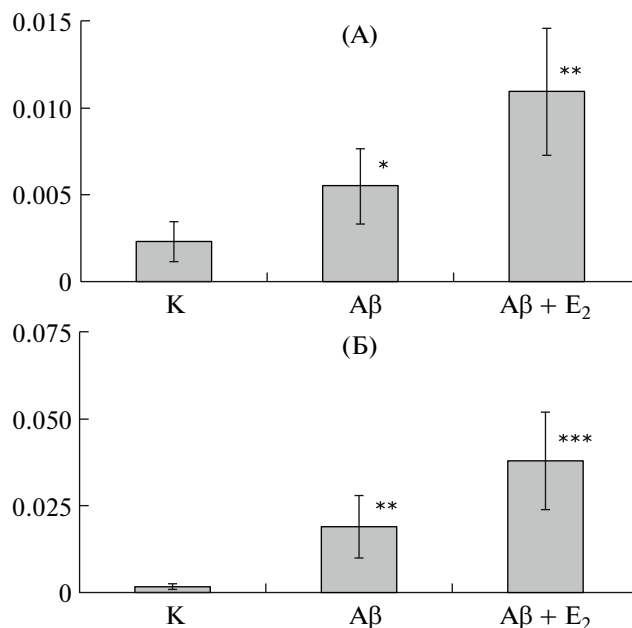


Рис. 1. Экспрессия гена катепсина D в гиппокампе самок (А) и самцов (Б) крыс в контрольной группе ("К"), при введении β -амилоидного пептида ("A β ") и совместном введении -амилоидного пептида и эстрадиола ("A β + E2"); *, **, *** — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно.

В коре головного мозга как самок, так и самцов крыс введение $A\beta$ привело к повышению ($p < 0.05$) экспрессии гена катепсина D по сравнению с животными контрольной группы. В неокортексе крыс, которые после введения $A\beta$ получали E_2 , относительный уровень экспрессии данного гена не отличался от контрольных значений. Можно предположить, что введение E_2 приводило к восстановлению нормального уровня экспрессии катепсина D. Имеющиеся в литературе данные указывают на нарушение протеолиза в аутолизосомах как на основной механизм, лежащий в основе срыва аутофагии при БА. Например, прижизненное окрашивание кортикальных нейронов показало, что ингибирование лизосомального протеолиза нарушает аксонный транспорт аутофагических вакуолей, приводя к появлению дистрофических аксонов, характерных для болезни Альцгеймера [1]. Поскольку эти и многие другие данные говорят о нейропротективной роли лизосомального протеолиза, полученные нами результаты могут свидетельствовать об адаптивной реакции нервной ткани на введение токсичного амилоидного пептида. Можно предположить, что фармакологическая активация лизосомальной функции может способствовать удалению $A\beta$ при БА.

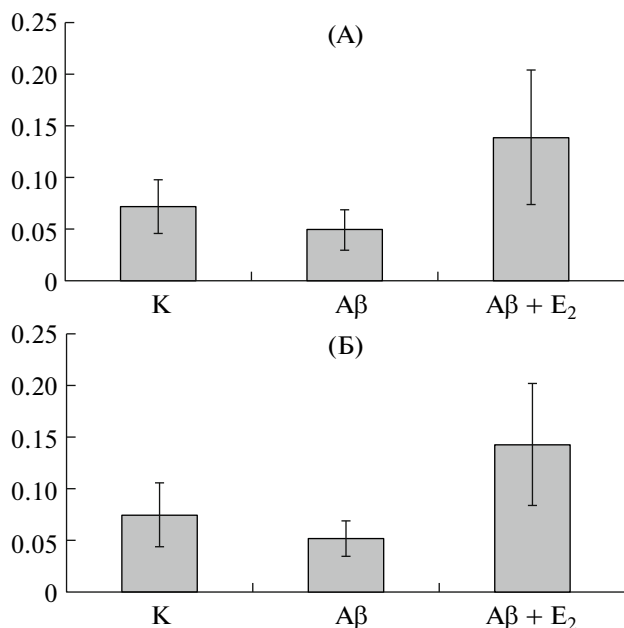


Рис. 2. Экспрессия гена катепсина В в гиппокампе самок (А) и самцов (Б) крыс в контрольной группе ("К"), при введении β-амилоидного пептида ("Аβ") и совместном введении β-амилоидного пептида и эстрадиола ("Аβ + Е₂").

Различие в реакции на введение Е₂ между гиппокампом и корой больших полушарий объясняется, вероятнее всего, различием в распределении эстрогеновых рецепторов в этих областях мозга.

Влияние экспериментальных воздействий на экспрессию гена катепсина В было не столь выраженным (рис. 2). Значения уровня экспрессии данного гена в гиппокампе крыс группы "Аβ + Е₂" превосходили контрольные показатели на 94% у самок и на 90% у самцов, хотя высокая дисперсия значений не позволила выявить статистически значимых различий. Известно, что катепсин В может выполнять антиамилоидогенные и нейропротективные функции, с чем и могут быть связаны высокие значения экспрессии гена этой протеиназы у крыс группы "Аβ + Е₂".

Данные флуоресцентной иммуногистохимии показывают, что введение Аβ привело к увеличению уровня его иммунореактивности в тканях как правого, так и левого (в меньшей степени) полушария головного мозга. Введение Е₂ вызвало снижение количества Аβ в мозге крыс почти до контрольного уровня. Мы предполагаем, что механизм нейропротективного действия Е₂ обусловлен, в частности, повышением уровня экспрессии гена катепсина D в гиппокампе крыс, которое обнаружено в нашем эксперименте при введении Е₂. Известно, что гиперактивация аутофагии может приводить к аутофагической клеточной гибели. Однако в случае усиления образо-

вания АВ активация катепсинов с большей вероятностью будет способствовать выживанию, а не гибели нейронов. Известно, что здоровые нейроны в культуре способны переживать индукцию очень активной аутофагии [10], которая обычно оказывает нейропротективный эффект.

Следует заметить, что способностью к расщеплению Аβ обладают многие ферменты [9]. Основными Аβ-деградирующими ферментами считаются неприлизин и инсулиндеградирующий фермент, экспрессия которых зависит от половых стероидов [11]. Тем не менее имеются исследования, указывающие на роль катепсинов В и D в разрушении Аβ, амилоидных бляшек, а также тау-протеина [12–14]. Показано, например, что в культуре микроглии ингибирование катепсина В предотвращало деградацию олигомерной формы Аβ, тогда как ингибиторы неприлизина, матриксных металлопротеиназ и инсулиндеградирующего фермента не оказывали данного эффекта [14, 15].

Интересно, что антиамилоидная активность микроглии подавлена у эстрогендефицитных мышей с нокаутом гена ароматазы [11]. Эти результаты, наряду с данными об участии микроглиальных катепсинов в деградации амилоида, позволяют предполагать значение Е₂ в регуляции амилоидолитической активности катепсинов. Это также согласуется с полученными нами результатами об увеличении экспрессии катепсина D в мозговой ткани при введении Е₂ и о предположительно связанном с ним уменьшении количества β-амилоида.

Таким образом, нами показано, что после интрацеребрального введения Аβ в гиппокампе и коре головного мозга крыс значительно повышалась экспрессия катепсина D. Введение Е₂ на фоне β-амилоидной интоксикации привело к еще более значительному повышению экспрессии гена катепсина D в области гиппокампа и к снижению ее до контрольного уровня в коре головного мозга. Впервые получены данные, указывающие на то, что нейропротективный эффект Е₂ может быть обусловлен увеличением экспрессии катепсина D.

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН. Работа поддержана грантами Федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 гг. (госконтракт 14.740.11.1034), НШ-1410.2014.4 и РФФИ № 12–04–01597_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nixon R.A., Yang D.-S. Autophagy Failure in Alzheimer's Disease – Locating the Primary Defect // *Neurobiol. Dis.* 2011. V. 43. № 1. P. 38–45.
2. Boland B., Kumar A., Lee S., Platt F.M., Wegiel J., Yu W.H., Nixon R.A. Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to

- Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease // J. Neurosci. 2008. V. 28. № 27. P. 6926–6937.
3. *Cavaillès V., Augereau P., Rochefort H.* Cathepsin D Gene of Human MCF7 Cells Contains Estrogen-Responsive Sequences in Its 5' Proximal Flanking Region // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1991. V. 174. № 2. P. 816–824.
 4. *Henderson V.W., Rocca W.A.* Estrogens and Alzheimer Disease Risk: Is There a Window of Opportunity? // Neurology. 2012. V. 79. № 18. P. 1840–1841.
 5. *Bailey M.E., Wang A.C., Hao J., Janssen W.G., Hara Y., Dumitriu D., Hof P.R., Morrison J.H.* Interactive Effects of Age and Estrogen on Cortical Neurons: Implications for Cognitive Aging // Neuroscience. 2011. V. 191. P. 148–158.
 6. *Рендаков Н.Л., Топчиева Л.В., Виноградова И.А., Немова Н.Н.* Изменение экспрессии генов катепсинов и актина в мозге крыс при старении // ДАН. 2011. Т. 436. № 5. С. 712–714.
 7. *Carroll J.C., Pike C.J.* Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Alzheimer-Like Changes in Female 3xTg-AD Mice // Endocrinology. 2008. V. 149. № 5. P. 2607–2611.
 8. *Rosario E.R., Carroll J., Pike C.J.* Testosterone Regulation of Alzheimer-Like Neuropathology in Male 3xTg-AD Mice Involves Both Estrogen and Androgen Pathways // Brain Res. 2010. V. 1359. P. 281–290.
 9. *Miners J.S., Barua N., Kehoe P.G., Gill S., Love S.* A β -Degrading Enzymes: Potential for Treatment of Alzheimer Disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2011. V. 70. № 11. P. 944–959.
 10. *Lee S., Sato Y., Nixon R.A.* Lysosomal Proteolysis Inhibition Selectively Disrupts Axonal Transport of Degradative Organelles and Causes an Alzheimer's-Like Axonal Dystrophy // J. Neurosci. 2011. V. 31. № 21. P. 7817–7830.
 11. *Yue X., Lu M., Lancaster T., Cao P., Honda S., Staufenbiel M., Harada N., Zhong Z., Shen Y., Li R.* Brain Estrogen Deficiency Accelerates A β Plaque Formation in an Alzheimer's Disease Animal Model // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 52. P. 19198–19203.
 12. *Khurana V., Eslon-Schwab I., Fulga T.A., Sharp K.A., Loewen C.A., Mulkearns E., Tyynelä J., Scherzer C.R., Feany M.B.* Lysosomal Dysfunction Promotes Cleavage and Neurotoxicity of Tau in Vivo // PLoS Genet. 2010. V. 6. № 7. P. e1001026.
 13. *Malik M., Fenko M.D., Sheikh A.M., Wen G., Li X.* A Novel Approach for Characterization of Cathepsin D Protease and Its Effect on Tau and β -Amyloid Proteins // Neurochem. Res. 2011. V. 36. № 5. P. 754–760.
 14. *Wang C., Sun B., Zhou Y., Grubb A., Gan L.* Cathepsin B Degrades Amyloid- β in Mice Expressing Wild-Type Human Amyloid Precursor Protein // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 47. P. 39834–39841.
 15. *Yang C.-N., Shiao Y.J., Shie F.S., Guo B.S., Chen P.H., Cho C.Y., Chen Y.J., Huang F.L., Tsay H.J.* Mechanism Mediating Oligomeric A β Clearance by Naïve Primary Microglia // Neurobiol. Dis. 2011. V. 42. № 3. P. 221–230.