

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND
FARMAKOLOOGIA INSTITUUT

TIINA RIKK

SEERUM-KAALIUMDEPRIVATSIOONIGA VÄIKEAJU GRANULAARRAKKUDE
KULTUURIS INDUTSEERITUD NEURONAALNE SURM ON SEOTUD AUTOFAAGIA JA
KATEPSIIN L AKTIIVSUSE TÕUSUGA

MAGISTRIVÄITEKIRI
BIOMEDITSIINI ERIALAL

JUHENDAJAD: PROF. DR.MED. ALEKSANDER ZARKOVSKI,
DR.MED. ALLEN KAASIK

TARTU 2007

SISUKORD

PUBLIKATSIOONID	4
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
I KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1. Programeeritud rakusurma tüübid	7
1.1. Autofaagia klassifikatsioon	10
1.1.1. Autofagosoomi formeerumine ja liitumine vakuooli/lüsosoomiga	12
1.2. Autofaagia regulatsioon	13
1.3. Autofaagiaga ja neurodegeneratiivsed haigused	15
2. Katepsiinid	17
2.1. Katepsiin L	19
2.2. Katepsiinide roll neurodegeneratsioonis	20
3. Seerum-kaaliumdeprivatsioon kui <i>in vitro</i> neuronalse surma mudel	21
4. Neuroprotektiivsed tsüsteiiniproteaasi inhibiitorid ja nende võimalik kasutamine neuronalse surma pidurdamiseks	22
II TÖÖ EESMÄRGID	25
III METOODIKA	26
1. Kemikaalid	26
2. Rakukultuur	26
3. Lüsosoomide visualiseerimine	27
4. Katepsiin L aktiivsuse määramine (CBZ-Phe-Arg) ₂ -R110 substraadi abil	27

5. Katepsiin L immunohistokeemiline analüüs	28
6. Neurotoksilisuse hindamine	28
7. Elektronmikroskoopia	29
8. Statistiline analüüs	29
 IV TULEMUSED	 30
1. SKD-ile järgnev neuronaalne surm väikeaju granulaarrakkude kultuuris	30
2. SKD mõju katepsiin L aktiivsusele <i>in vitro</i>	30
3. Lüsosomaalsete membraanide terviklikkus	31
4. Katepsiin L immunotsütokeemiline analüüs	32
5. SKD katse neuronite ultrastruktuuranalüüs	32
6. Autofaagia-, kaspasi- ja katepsiiniinhibiitorite mõju SKD poolt indutseeritud neuronaalse surma protsessile	33
 V JOONISED JA TABELID	 35
 VI ARUTELU	 46
 VII JÄRELDUSED	 48
 KOKKUVÕTE	 49
 SUMMARY	 50
 KASUTATUD KIRJANDUS	 51
 TÄNUAVALDUSED	 60

PUBLIKATSIOONID

1. Kaasik, A., Rikk, T., Piirsoo, A., Zharkovsky, T. & Zharkovsky, A. (2005) Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 5, 1023-1031.

KASUTATUD LÜHENDID

ALLM	<i>N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methional</i>
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
CA-074Me	<i>L-trans-epoxysuccinyl-Ile-Pro-OMe propylamide</i>
CA-074	<i>L-trans-epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH-propylamide</i>
(CBZ-Phe-Arg) ₂ -R110	<i>dipeptidyl rhodamine diamide substrate</i>
CGC	<i>väikeaju granulaarrakud (cerebellar granule cells)</i>
CMA	<i>tsaperonsõltuv autofaagia (chaperone-mediated autophagy)</i>
DIV	<i>day in vitro</i>
E-64	<i>[L-3-trans-Carboxyoxyran-2-Carbonyl]-L-Leucyl-Agmatine</i>
ER	<i>endoplasmaatiline retiikulum (endoplasmatic reticulum)</i>
rER	<i>kare endoplasmaatiline retiikulum (rough ER)</i>
FBS	<i>veise seerum (foetal bovine serum)</i>
FY-CHO	<i>N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenyl-alanyl-L-tyrosinal</i>
hsc70	<i>70 kDa heat shock protein</i>
Lamp2a	<i>lysosome-associated membrane protein type 2a</i>
LC3	<i>protein 1 light chain 3</i>
ly-hsc70	<i>lysosomal hsc70</i>
3-MA	<i>3-metüüladeniin (3-methyladenin)</i>
NMDA	<i>N-metüül-D-aspartaat (N-methyl-D-aspartate)</i>
PAS	<i>pre-autophagosomal structure</i>
PND	<i>postnatal day</i>
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TUNEL	<i>in situ terminal deoxytransferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling</i>

SISSEJUHATUS

”Despise no one and do not discard anything, for there is no one whose hour does not come and no thing without its place.”

Eliot, T.S.

Neurodegeneratiivsed haigused kuuluvad aeglaselt progresseeruvate heterogeensete haiguste gruppi, mis üldjuhul avalduvad vanemaealistel, kuid tänase elutempo ja elukvaliteedi juures ohustavad need haigused järjest nooremaelisi. Inimeste vaimset tervist kipuvad ohustama mitmed akuutsed (insult, trauma) ja neurodegeneratiivsed haigused (Alzheimeri tõbi, Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi, tserebellaarne degeneratsioon jne.) mõjutades nii iga üksiku patsiendi, kui lõppkokkuvõttes ka tema perekonna elukvaliteeti. Neurodegeneratiivsete haigustega kaasneb neuronite massiline suremine ning kuigi erinevate vanusega seotud neurodegeneratiivsete haiguste korral on mõned spetsiifilised ajupiirkonnad tugevamini kahjustatud (näiteks *hippocampus* Alzheimeri tõve ja *substantia nigra* Parkinsoni tõve korral), iseloomustab iga haigust suhteliselt sarnane biokeemiline ja tsellulaarne kaskaad, mis kutsub esile mitmete neuronpopulatsioonide düsfunktsiooni ja surma ning lõpptulemusena olemasolevate funktsionaalsete neuronaalsete võrgustike lagunemise. Selliste kaskaadide spetsiifilised komponendid tekitavad makromolekulides (valgud, lipiidid, DNA) oksüdatiivseid kahjustusi; rikuvad metaboolset kompromissi, mis omakorda põhjustab häireid glükoosi metabolismis ning kutsub esile mitokondriaalse düsfunktsiooni; tekitavad glutamaadireseptorite üleaktivatsiooni ja rikuvad kaltsiumi homöostaasi neuronites. Selline kaskaad on seotud nii akuutsete kui krooniliste neurodegeneratiivsete haiguste patogeneesiga. Tänapäeval tehtud katse tulemused viitavad sellele, et Wylle poolt omal ajal välja pakutud neuronaalse surma dihhotoomne käsitus (Wyllie, *et al.*, 1980), mille kohaselt rakud saavad surra kas apoptoosi või nekroosi läbi, pole tõene aga närvisüsteemis, kus neuronaalse surma protsess on siiski keerukam. Värskemate kirjandusandmete põhjal võib siiski eristada peamiselt 3 tüüpi rakusurma: (1) apoptoosisarnane surm, (2) autofaagiline neuronaalne surm ja (3) tsütoplasmaatiline neuronaalne surm ehk nekroos (Koliatsos & Ratan, 1997).

Paljude neurodegeneratiivsete haigustega nagu Parkinsoni tõbi, Alzheimeri tõbi ja Huntingtoni tõbi kaasneb autofaagia (Larsen & Sulzer, 2002). Autofaagia olemasolu on kinnitust leidnud ka

mitmetes erinevates *in vitro* haigusmodelites, näiteks inimese neuroblastoomi kultuuri neurodegeneratsioonimudel, kus rakke indutseeriti dopamiiniga (Gomez-Santos *et al.*, 2003), sümpaatiliste neuronite kultuuri degeneratsioonimudel, kuhu jäeti lisamata rakkude normaalseks arenguks vajalik närvikasvufaktor (Xue *et al.*, 1999) ja keskaju dopaminergiliste neuronite degeneratsioonimudel, kus rakke indutseeriti metamfetamiiniga (Larsen *et al.*, 2002). Hiljutiste uuringute tulemused on kinnitanud, et apoptootiline ja autofaagiline surmarada võivad mõnes punktis kattuda, kuid mõlemal surmarajal on siiski ka mõned neile iseloomulikud etapid, mis võivad üksteisele eelneda või ühes rakus samaaegselt käivituda (Lemasters *et al.*, 1998; Bursch, 2001). Mõnedes neuronaalse surma *in vitro* mudelites on samaaegselt nii autofaagia aktivatsiooni kui apoptoosiga täheldatud ka lüsosomaalsete katepsiinide aktiivsuse tõusu (Cataldo & Nixon, 1990; Bever & Garver, 1995; Uchiyama, 2001; Boland & Campbell, 2004) ning seepärast arvatakse, et surmaradade mõnes etapis osalevad ka lüsosomaalsed hüdrolaasid. Sageli on märgitud, et ka normaalsetel küpsetel neuronitel esineb segatüüpi neuronaalset surma, kus on olemas nii autofaagiale, apoptoosile kui ka nekroosile iseloomulikud elemendid (Koliatsos & Ratan, 1997). Lisaks sellele võivad esimesed surmailmingud esineda neuroni erinevates osades või erinevate neuronaalse surma vormidena, mis teeb üldpildi surma mehhanismidest veelgi komplitseeritumaks ja neurodegeneratiivsete haiguste ravimiseks sobivate ravistrateegiade väljaarendamiseks on oluline mõista neuronaalse surma pisemaidki detaile.

I KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Programeeritud rakusurma tüübid

Morfoloogiliste tunnuste alusel võib rakusurma jagada kolmeks: apoptoos, nekroos ja autofaagia (Tabel 1.) (Clarke, 1990).

Tänapäeval mõistetakse apoptoosi all geneetiliselt reguleeritud surmamehhanismi rakkudes, mille käigus elimineeritakse organismile mittevajalikud või kahjulikud rakud, et säilitada homöostaas kudedes ja kindlustada organismi kui terviku normaalne funktsioneerimine (Wyllie *et al.*, 1980). Apoptoosiga kaasnevad rakus mitmed iseloomulikud morfoloogilised muutused, nagu plasmamembraani sopistumine (*blebbing*), kromatiini kondenseerumine ja fragmenteerumine ning

lõpuks kogu rakumaterjali apoptootilistesse kehakestesse pakkimine. Sellele järgneb apoptootiliste kehakeste fagotsüteerimine naaberrakkude poolt. Samuti kareda endoplasmaatilise võrgustiku (rER) ribosoomide kadumine ja polüribosomaalsete komplekside lagunemine (Pilar & Landmesser, 1976). Detailsemad uuringud apoptoosi molekulaarsete mehhanismide vallas täheldavad ka apoptoosispetsiifiliste biokeemiliste markerite, nagu erinevate kaspaaside aktivatsioon ning apoptootiliste nukleaside poolt tuuma DNA fragmentatsioon kindla suurusega oligonukleosoomseteks fragmentideks, ilmumist.

Apoptoosi reguleerimatust peetakse arvukate patoloogiate, nagu vähkkasvajad ja neurodegeneratsioon, tekkepõhjuseks (White, 1996). Kaugemas perspektiivis võib apoptoosi molekulaarsete mehhanismide tundmaõppimisel olla terapeutiline väärtust, kuna apoptoosiprotsessi võivad vallandada erinevad ekstra- ja intratsellulaarsed signaalid.

Autofaagilise masinavärgi abil lagundavad rakud vajadusel omaenda organelle ja tsütoplasmat ning suunavad tekkinud produktid taaskasutusse. Protsessi alguses formeeruvad ER-is kahekordse membraani ja tsütoplasмага täidetud vakuoolid ehk autofagosoomid. Autofagosoomid võivad ühineda endosoomide, lüsoosoomide või Golgi elementidega ning moodustada ühekordse membraaniga happelisi hüdrolaase sisaldavad degradeerivaid vakuole ehk autolüsoosome (Guimarã & Linden, 2004). On täheldatud, et vahel toimub surevates neuronites intensiivne endotsütoos, mille tagajärjel väheneb oluliselt plasmamembraani pindala (Clarke, 1982) ning ka autofaagia tõttu surevate neuronite tuumad on mõnikord püknootilised, kuigi mitte nii tugevalt, kui apoptoosi korral. Autofaagias osalevate valkude geenid on evolutsiooniliselt konserveerunud ning protsess ise geneetiliselt hästi kontrollitud. Seega võib autofaagia kindlustada ellujäämisfunktsioonide lühiajalise säilimise ka näljaperioodil, kus iseenese apoptootilise lagundamisega varustab rakk ennast alternatiivse energiaallikaga ning lihtsustab struktuuri ja funktsionaalsuse kaotanud valkude likvideerimist stressi tingimustes (Kamatsu *et al.*, 2005; Kuma *et al.*, 2004). Autofaagilist protsessi kontrollitakse mTOR signaalmolekulide abil, mis asuvad rajal enne PI-3 kinaas/AKT ja reguleerivad rakkude kasvu ning valgusünteesi, vastavalt toitelistele ja kasvufaktoritele olemasolule. Autofaagilised kataboolsed funktsioonid on alla surutud juhul, kui toitainete vool tsellulaarse metabolismi kindlustamiseks väljastpoolt rakku on piisav. Autofaagiaprotsessi defektid mõjutavad organismide arengut põhjalikult ja kuigi defektid (*haploinsufficiency*) ühes autofaagiale olulises geenis *beclin 1* aktiveerivad tumorigeneesi, pole detailne rada teada (Liang *et al.*, 1999; Qu *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2003). Näiteks geeni *beclin 1* ühe

alleeli kadu suurendab genoomset ebastabiilsust metaboolse stressi korral apoptoosidefektiga rakkudes (Degenhardt, *et al.*, 2006). Lüsosomaalsete valkude degradatsioonis eristatakse 3 erinevat rada: tsütosoolist vakuooli kulgevat rada - Cvt (*cytosol to vacuol targeting*), vakuolaarse impordi ja degradatsiooni rada – Vid (*vacuolar import and degradation*) ning autofaagilist rada (Yang *et al.*, 2005). Viimasel ajal arvatakse, et autofaagia võib olla ka normaalseid arengulisi protsesse mõjutav lühiajaline taktikaline vastus, mille abil juhitakse näiteks pärmi sporulatsiooni või *Drosophila melanogaster* nuku formeerumist (Melendez *et al.*, 2003). Autofaagia võib olla kaitsevahendiks erinevate viiruste ja bakterite invasiooni vastu ning on kinnitust leidnud faktid autofaagia seoste kohta erinevate haigustega. Näiteks vähi, kardiomüopaatia ja neurodegeneratiivsete haiguste – Alzheimeri tõve, Parkinsoni tõve ja Huntingtoni tõve, kuid ka amüotroofse lateraalskleroosi ning prioonhaiguste korral on täheldatud rakkudes autofaagilise aktiivsuse tõusu (Yang *et al.*, 2005). Kuigi autofaagiline programmeeritud raku surm näib olevat fülogeneetiliselt vanem fenomen võib rakk selle raja käivitada vaid organismi teatud füsioloogilises või haiguslikus seisundis. Arvatakse, et autofaagial võib surma varase staadiumina olla hoopis rakku kaitsev roll.

Nekroos vastupidiselt apoptoosile ja autofaagiale on raku kiire ja võimas surmaprotsess, mis haarab korraga tervet rakupopulatsiooni. Seda iseloomustab tsütoplasma paisumine, organellide kiire hävimine ning plasmamembraani purunemine koos rakusisaldiste valgumisega intertsellulaarsesse ruumi, mille tagajärjel käivitub koes põletikuline protsess. Nekroosi võib omakorda jagada kaheks: alatüüp 3A ja 3B (*Tabel 1.*) (Clarke, 1990). 3A tüüpi nekroosi esineb harva ja neuronites mitte kunagi. 3B tüüpi nekroosi nimetasid Pilar ja Landmesser (Pilar & Landmesser, 1976) tsütoplasmaatilist tüüpi rakusurmaks. Esmalt laienevad rER tsisternid, kuid erinevalt apoptoosist kinnituvad ribosoomid endiselt tsisternide külge ning ka polüsoomid jäävad terveks. Mõnikord võib laieneda ka Golgi kompleks ning paisuda mitokondrid, seega sarnaneb 3B tüüpi rakusurm osaliselt nekroosile just iseloomuliku organellide paisumise-laienemise tõttu. Nekroosi alatüüpide kaks põhierinevust on järgmised: tsütoplasmaatilist tüüpi neuronaalse surma korral on mitokondrite paisumine tagasihoidlikum, samuti ei ole täheldatud kromatiini kondenseerumist. Enamasti mõjutab ka neuronite küpsemine mõningal määral raku surma tüüpi ning on teada, et väga noored neuronid surevad apoptoosi, samal ajal kui sama tüüpi küpsed neuronid tsütoplasmaatilist tüüpi surma tagajärjel (Cunningham, 1982). Kuigi viimane ei ole põhireegel, sest ka küpsed neuronid võivad surra apoptoosi läbi (Sloviter *et al.*, 1996). Varem peeti nekroosi vaid rakkude juhuslikuks ja kontrollimatuks degeneratsiooniks ning apoptoosi vastupidi

defineeritud parameetrite järgi toimuvaks surmaprogrammiks (Formigli *et al.*, 2000). Nekroosiprotsess saab võimalikuks, kui inaktiveeritakse apoptoosi ja autofaagia geneetilised tegurid, samuti on teada, et tuumori korral indutseerib põletikuline protsess nekroosi (Degenhardt, *et al.*, 2006). Tänapäevaks on kogunenud hulgaliselt tõendusmaterjali mitmesugustest alternatiivsetest surmaradadest ja apoptoosi kõrval võivad nii autofaagiline kui ka nekrootiline degeneratsioon olla rakus programmeeritavad ning algatada surmaprotsessi nii iseseisvalt, kui kombineerituna apoptoosimehhanismidega.

1.1. Autofaagia klassifikatsioon

Sõna *autophagy* pärineb kreeka keelest ja tähendab iseenese söömist. Autofaagia abil degradeeritakse rakus pika elueaga stabiilseid valke, samuti terveid organelle-mitokondrid ja peroksüsoome (Larsen & Sulzer, 2002). Membraanidega sekvesteeritud materjali degradatsioon genereerib hulgaliselt nukleotiide, aminohappeid ja vabu rasvhappeid, mida rakk saab taaskasutada makromolekulaarseks sünteesiks ja ATP genereerimiseks. Kuna autofaagiast hakati esmakordselt rääkima seoses näljaga, siis on autofaagia üks tähtsamaid ülesandeid kindlustada rakk vajalike aminohapetega, mis võimaldaksid jätkata valgusünteesi ka nälja tingimustes. Aminohapete taseme langusega võib aktiveerida autofaagilise protsessi rakkudes (Mortimore & Poso, 1988), mis on omakorda allutatud hormonaalse süsteemi kontrollile. Näiteks glükageen aktiveerib, kuid insuliin inhibeerib autofaagiat (Blommaert *et al.*, 1997). Üldiselt on autofaagia eukarüootidel reguleeritav paljude faktorite, näiteks puriinide (Kovacs *et al.*, 1981), erinevate kasvufaktorite (Ballard *et al.*, 1980; Xue. *et al.*, 1999), seerumi (Amenta *et al.*, 1978), adrenergiliste agonistide (Seglen *et al.*, 1990) ja mitmete sekundaarsete signaalmolekulide abil (Codogno *et al.*, 1997). Autofaagilis-lüsosoomaalse raja kõrgematel eukarüootidel võib jagada kolmeks protsessiks: makroautofaagia, mikroautofaagia ja tsaperonidega seotud autofaagia (CMA) (Klionsky & Ohsumi, 1999).

Makroautofaagia on kõige levinum autofaagia vorm. See hõlmab mitmeid tsütoplasmas toimuvaid ja üksteisele järgnevaid protsesse: C kujuliste kaksikmembraansete struktuuride moodustumist, mille mõlemad otsad pikenevad ning lõpuks sulguvad kaksikmembraanseteks vakuoolideks ehk autofagosoomideks, kuhu võib vajadusel sulgeda üleliigseks osutunud organelid

või osa tsütoplasmast. Autofagosoomide välismembraanid liituvad lüsoosoomide/vakuoolide membraanidega nii, et nende sisemembraanid koos autofaagiliste kehakestega jäävad lüsoosoomide või vakuoolide luumenisse, kus nad degradeeritakse. Autofagosoomide membraanide allikateks võivad olla nii rER-i ribosoomivaba regioon kui ka Golgi kompleks (Dunn *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1990), kus moodustuvad ka omapärased, seni vähe kirjeldatud organellid - fagofoorid, millest võivad hiljem formeeruda fagosoomide membraanid ja nendega seotud struktuurid (Fengsrud *et al.*, 1995).

Ka mikroautofaagiat iseloomustab lüsoosoomi- või vakuoolimembraanide sissesopistumine ning sisemiste vesikulaarsete põiekeste moodustumine, mis sarnaselt autofaagilistele kehakestele sisaldavad samuti tsütoplasmaatilise päritoluga materjali. Ainsaks erinevuseks makro- ja mikroautofaagia vahel on see, et mikroautofaagia korral liigub tsütoplasmaatiline materjal lüsoosoomi või vakuooli otse ilma vahendajateta (Yang *et al.*, 2005).

Eelpoolnimetatud radadele alternatiiviks on lüsoosomaalne proteolüütiline rada, mida kutsutakse ka tsaperonsõltuvaks autofaagiaks (CMA), mida kirjeldati esmakordselt seerumipuuduses kasvanud, kuid konfluentsel fibroblastide kultuuril (Dice *et al.*, 1990). See rada erineb teistest lüsoosomaalse degradatsiooni radadest selle poolest, et puudub vesikulaarne dünaamika, kuid molekulaarsete tsaperonide kompleksil tuleb ära tunda tsütosoolsete valkude peptiidsed järjestusmotiivid enne kompleksi moodustumist lüsoosoomimembraanis paikneva Lamp2a (*lysosome-associated membrane protein type 2a*) retseptorvalguga (Majeski & Dice, 2004).

Molekulaartsaperonide kompleksi poolt, mille peamiseks koostisosaks on 70 kDa-ne *heat shock* valk (hsc70), tuntakse ära vaid need tsütosoolsed valgud, millel on KFERQ-ga seotud pentapeptiidne järjestusmotiiv (Agarraberes & Dice, 2001). Substraatvalgu ja molekulaarse tsaperoni kompleks seostub lüsoosomaalse membraaniga ning interakteerub Lamp2a-ga. Enne importi lüsoosoomidesse pakitakse valgud molekulaarse tsaperonkompleksi poolt lahti ning tõmmatakse lüsoosoomiluumenisse lüsoosomaalse hsc70 (ly-hsc70) abil (Majeski & Dice, 2004). Samuti on teada, et Lamp2a ekspressioonitaseme suurus määrab CMA tempo. *LAMP2a knockout* hiirtel, kellel puudusid ka kõik Lamp2 isovormid, vähenes valkude degradatsioonivõime, kuid suurenes autofaagiliste vakuoolide akumulatsioon südame-, skeletilihase või teiste kudede rakkudes (Tanaka *et al.*, 2000). Lamp2a hulka lüsoosoomimembraanis reguleeritakse osaliselt muutustega tema degradatsioonimääras. Näiteks nälja korral tõuseb Lamp2a tase tänu Lamp2a degradatsiooni vähenemisele. CMA rada aktiveeritakse füsioloogiliste stressorite (ka pikaaegne nälginine) poolt,

kusjuures esmalt aktiveerub põgusalt makroautofaagia ja alles viimase vaibudes lõpuks CMA. Tänapäevani pole teada täpsed mehhanismid, mille abil need 2 lüsoosomaalset degradatsioonirada interakteeruvad, teada on vaid, et tsütosoolseid valke degradeeritakse CMA-ga roti maksa-, neeru-, südamerakkudes, kuid ka teiste kudede rakkudes. Pärirakkudel pole CMA-le sarnast füsioloogilist fenomeni seni täheldatud.

1.1.1. Autofagosoomi formeerumine ja liitumine vakuooli/lüsoosoomiga

Kuigi kirjanduse andmetel lülitatakse päriraku kasvustaadiumis autofaagia täielikult välja, kinnitavad biokeemilised ja molekulaarbioloogilised andmed, et jätkuvad nii autofaagiaga seotud geenide (*ATG*) ekspressioon, kui ka küpsete geeniproduktide (*Atg* valkude) omavahelised interaktsioonid. Pärirakus on olemas 2 ubikvitiini-taolise konjugatsioonisüsteemi-*Atg12-Atg5* ja *Atg8*-fosfatidüül-etanolamiin (*PE*). Vähemalt pooled autofaagias osalevatest *ATG* geenidest osalevad selles kahes konjugatsioonisüsteemis. Sarnane süsteem on ka eukarüootidel arenguliselt hästi konserveerunud.

Atg12-Atg5 moodustavad stabiilse pöördumatu konjugaadi vahetult peale sünteesi ning selle kompleksi valkude vabu vorme pole seni detekteeritud, kusjuures nälgimine ei mõjuta selle kompleksi formeerumist (Mizushima *et al.*, 2001).

Autofagosoomide formeerumisega on seotud ka üks membraanseostuv 117 aminohappeline valk *Atg8* (*Aut7/Apg8*), mida on leitud varastest isolatsioonimembraanidest, autofagosoomidest ja autofaagilistest kehakestest, mis teeb temast omakorda hea membraanidünaamika uurimise markeri (Yang *et al.*, 2005). *Atg8* ortoloogiks imetajarakkudes on mikrotoobulitega seotud valk *LC3* (*protein 1 light chain 3*). Normaalsetest rakkudest on leitud selle valgu kahte vormi: 18 kDa *LC3-I* ja 16 kDa *LC3-II* (Yoshimori *et al.*, 2004).

Autofagosoomide moodustumisega on seotud ka teine imetajarakkudes esinev valk *PI3K*, millel on leitud 3 vormi - I *PI3K*, mis on autofaagia inhibiitoriks (Arico *et al.*, 2001); III *PI3K*, mis on formeerumise varastes etappides autofaagia aktivaatoriks; ning lõpuks II *PI3K*, mille aktiivsuse muutus pole seotud autofaagia kontrolliga (Tassa *et al.*, 2003). 1982 aastal leiti, et *PI3K* inhibiitor 3-MA (3-metüüladeniin) inhibeerib autofagosoomide formeerumist (Seglen *et al.*, 1982).

Autofaagiaga on seotud ka üks transmembraanseid domeene sisaldav membraanivalk, Atg9, mille fraktsioon on lokaliseerunud autofaagia eelsesse struktuuri (PAS) ning puudub küpsete autofagosoomide membraanides (Kim *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2000) ja ilma milleta ei käivitu rakkudes ei Cvt rada ega autofaagia. Kuna kõik eelnevalt nimetatud Atg valgud funktsioneerivad enne autofagosoomi formeerumist või formeerumise ajal on oluline nende valkude paiknemine ja ajaline kulgemine tsütoplasmas. Näiteka Atg valguga liidetud fluorestseeruva valgu abil on välja selgitatud, et Atg8 seostub autofagosoomide, vakuoolide, autofaagiliste kehakeste ning isolatsioonimembraanide vahevormidega ja et kõik Atg valgud on kolokaliseerunud PAS-i, mis on autofagosoomi formeerumise korralduskeskuseks (Yang *et al.*, 2005).

Autofagosoomide liitumine lüsoosoomidega on imetajarakkudes keeruline protsess ja enne liitumist peavad autofagosoomid läbima mitmeid küpsemisetappe, mis nõuavad mõnede GTPaaside (Rab22, Rab24), SNARE valguperekonna ortoloogide ning Nfs valkude (Mesa *et al.*, 2001) olemasolu. Kuid enne liitumist lüsoosoomidega liituvad autofagosoomid endosoomide või endosoomset päritolu põiekestega. Teada on, et autofagosoomide küpsemises ja lüsoosoomidega liitumises osalevad alati tsütoskeleti elemendid ning rakkude töötlemine mikrotuubuleid destabiliseerivate ainetega blokeerib autofagosoomide küpsemist. Näiteks rakkude töötlemisel *cytochalasin D*-ga, mis lõhub aktiinifilamente, vähenes autofagosoomide formeerumine märgatavalt, kuid vastupidiselt rakkude töötlemine *taxol*-iga, mis stabiliseerib mikrotuubuleid, suurenes amfisosoomide liitumine lüsoosoomidega (Yang *et al.*, 2005).

1.2. Autofaagia regulatsioon

Autofaagiline vastus moduleeritakse suure hulga ekstratsellulaarsete (nälg, hormoonid või erinevad ravimid) ja intratsellulaarsetest ärritajate (valestipakitud valkude akumulatsioon, mikroorganismide invasioon) vastu. Nii pärmi- kui ka imetajarakkudes on autofaagia fundamentaalne bioloogiline sündmus, mis toimub raku alati, ka normaalsete kasvutingimuste korral (Yang *et al.*, 2005), kuid seda protsessi on võimalik kiiresti vastavalt raku vajadusele võimendada, et kindlustada rakk nälja või troofiliste faktorite vähesuse korral toitainete ja energiaga organismi suurte struktuursete ümberkorralduste ajal (arengulised ümberkorraldused) või vabastada rakud kahjustatud tsütoplasmaatilistest komponentidest (oksüdatiivne stress, infektsioonid ja

valgusisaldiste kogunemine). Autofaagilise protsessi kontrollis on oluline tähtsus toitainete hulgal, hormonaalsetel faktoritel ja keemilis-füüsikalistel tingimustel nagu temperatuur, hapnikuioonide kontsentratsioon. Selle regulatsioonil mängivad olulist rolli 2 evolutsiooniliselt konserveerunud ja raku toitelist olukorda kontrollivat sensorit:

- a) rapamütsiin kinaasne märklaud TOR, kui põhiline inhibitsioonisignaali modulaator, mis toitainetekülluse korral lülitab autofaagilise raja välja ning
- b) eukarüootse initsiatsioonifaktori 2 alfa (eIF2alfa) kinaas Gcn2 ja temale eelnev Gcn4, autofaagiaga seotud geenide transkriptsiooniline transaktivaator, mis toitainete puudusel lülitab autofaagilise raja sisse (Talloczy *et al.*, 2002).

Klass I PI3K/Akt signaalmolekulid seostuvad TOR aktivatsiooniks türosiinkinaasi retseptormolekuliga ning seeläbi suruvad maha insuliinisarnase ja teiste kasvufaktorite signaalide poolt esilekutsutud autofaagia (Levine & Yuan, 2005). Enne TOR kinaasi käivitub pärmil ligikaudu 17 ATG geeniga autofaagia jaoks oluline 5 produktiga rada. Enamikul pärmis ATG geenil on ortoloogid imetajarakkudes, kuna nad kodeerivad valke, mis on vajalikud autofaagia induktsiooniks, autofagosoomide moodustumiseks, küpsemiseks ja ja pidevaks käigushoidmiseks ning nad võib jagada 4 funktsionaalsesse gruppi:

- 1) valgu seriin/treoniinkinaasne regulatoorne kompleks, mis vastutab toitainete vähesuse korral näiteks ühe rapamütsiini märklaua TOR-kinaasse (Atg1, Atg13, Atg14) signaali eest,
- 2) lipiidkinaasne signaalkompleks, mis vastutab vesiikulite keskme (Atg6, Atg14, Vps34 ja Vps15) moodustamise eest,
- 3) 2 ubikvitiinitaolist konjugatsioonirada, mis vahendavad vesiikulite laienemist (Atg8 ja Atg12) ja küpsemist ning
- 4) taaskasutusrada, mis vahendab Atg valkude lahtimonteerimist küpsetelt autofagosoomidelt (Atg2, Atg9, Atg18) (Levine & Yuan, 2005).

Autofaagilise protsessi biokeemilisteks inhibiitoriteks (negatiivse tagasiside regulaatoriteks) on autofaagilise valgudegradatsiooni lõpp-produktid, aminohapped. Näiteks on leutsiini ja mõnede aminohapete kombinatsioon väga efektiivseks autofaagia inhibiitoriks peaaegu kõikides rakutüüpides, eriti hepatotsüütides (Beugnet *et al.*, 2003). Autofaagiline sekvestreerimine on alati ATP sõltuv ning ATP ammendumine inhibeerib autofaagilist sekvestreerimist (Plomp *et al.*, 1989).

Adenülaatkinaasse tasakaalu tõttu rakus on ATP taseme langus sageli seotud AMP taseme tõusuga ning AMP kaudu AMPK-d aktiveerides võib autofaagiat alla suruda. Autofaagia sõltub ka Ca^{2+} hulgast mõnedes intratsellulaarsetes ladustamiskohtades ja Ca^{2+} kontsentratsiooni mõjutatavatest ainetest (Gordon *et al.*, 1993). Näiteks kaltsium/ATPaasi inhibeeriv *thapsigargin* soodustab intratsellulaarse kaltsiumi vabanemist ER-st ja alandab kaltsiumi taset ER-is (ER on intratsellulaarse Ca^{2+} peamine reservuaar), mis inhibeerib autofaagiat märgatavalt. On teada, et üksnes valgusünteesi inhibeerimine ei vallanda autofaagiat. Näiteks, kui inhibeerida translatsioon tsükloheksimiidiga, siis ei indutseerita autofaagiat, kuigi on märgata väikeste autofagosoomide moodustumist. Valgusünteesi vajatakse preautofagosoomsete vesiikulite laiendamiseks (Abeliovich *et al.*, 2000) ja samuti pärast sekvesteerimisetappi autofagosoomide küpsemisprotsessi läbiviimiseks. Üldiselt on autofaagia regulatsioon keeruline protsess ja lisaks eelpool nimetatud protsessidele osalevad seal ka mikrotuubulitega seotud valk integriin ja mõned kinaasid nagu türosiin-proteiinkinaas II, naringin-tundlik proteiinkinaas, surmaga seotud proteiinkinaas- 1 (DRP-1) ning surmaga seotud proteiinkinaas (DARK) (Petiot *et al.*, 2002). Rakkudes on olemas suur hulk vajalikke mehhanisme, mille abil saab vastu võtta ja regulaarsetele faktoritele üle kanda erinevaid ekstra- ja intratsellulaarseid signaale, et vastavalt vajadusele autofaagiat indutseerida või inhibeerida.

1.3 Autofaagia ja neurodegeneratiivsed haigused

On olemas morfoloogilised tõendid, et selliste haigustega nagu Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi, Alzheimeri tõbi ja spongioformne entsefalopaatia (*transmissible spongiform encephalopathies*) kaasneb autofaagia (Qin *et al.*, 2003; Anglade *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2004; Liberski *et al.*, 2004). On võimalik, et autofaagiline aktivatsioon soodustab neurodegeneratsiooni (Shintani & Klionsky 2004; Yue, Z. *et al.*, 2002), kuid see väide vajab veel täpsustamist. Mutantsete või toksiliste valkude akumulatsioonil on oluline osa krooniliste neurodegeneratiivsete haiguste kujunemisel (Grune *et al.*, 2004). Samas võib autofaagia olla kaitsemehhanismiks, mille abil degradeeritakse mutantseid või toksilisi valke ja defektid autofaagiaga seotud radades soodustavad neurotoksiliste valkude akumulatsiooni ja sellele järgnevat neuronaalset surma. Autofaagia täpset rolli

neurodegeneratiivsete haiguste kujunemisel pole üksikasjalikult veel määratletud, kuid hiljutiste uuringutega on selgunud mitmeidki huvitavaid fakte. Nii Parkinsoni tõbe, kui ka teisi neurodegeneratiivseid haigusi iseloomustav valk α -sünukleiin on peamiseks neuronaalsete tsütoplasmaatiliste inklusioonide komponendiks (Maries *et al.*, 2003) ning varasemates uurimistöödes on leidnud kinnitust, et α -sünukleiini degradeeritakse proteasoomides ja klassikalistes autofaagilistes radades (Webb *et al.*, 2003). Hiljutised uuringud näitavad aga, et α -sünukleiini ringlust reguleeritakse CMA kompleksiga, kus märklauvalk peab sisaldama kompleksi jaoks äratuntavat pentapeptiidset järjestusmotiivi (Cuervo *et al.*, 2004). Parkinsoni tõve perekondlike autosomaal-dominantsete vormidega seotud patogeensete α -sünukleiini mutantide degradeerimine CMA kompleksi abil on ebaefektiivne (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kruger *et al.*, 1998). Kuna tavaliselt akumulereub *wild type* α -sünukleiin täiskasvanutel neurodegeneratiivsete haiguste korral neuronaalsete inklusioonidena, siis näitasid katsed seda, et defektid autofaagiaga seotud radades võivad soodustada mitmeid neurodegegeratiivseid haigusi. Autofaagia osaleb ka Huntingtoni tõvega seotud valgu huntingtiini ringluse regulatsioonis. Huntingtoni tõbi on samuti autosomaal-dominantne neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustab huntinkiini polüglutamiinrakti suurenemine. Kuigi nerotoksilisuse mehhanismid, mis on seotud suurenenud polüglutamiiniga on vastuolulised, on alust arvata, et suurenenud polüglutamiin võimendab neurotoksilisust, hoolimata sellest, missuguses valgumolekuli piirkonnas ta paikneb. Suurenenud polüglutamiiniraktiga valkude lahustumatute agregaatide akumulatsioon kahjustatud neuronites on Huntingtoni tõve ja teiste polüglutamiinrakti suurenemisega seotud haiguste üheks iseloomulikuks tunnusjooneks (DiFiglia *et al.*, 1997). Ehkki neuronaalne huntingtiin on inklusioonides tugevalt ubikvitineeritud on polüglutamiin proteasoomidele kehvaks substraadiks (Venkatraman *et al.*, 2004). Seega huntinkiini kõrge ubikvitineerituse tase inklusioonides võib viidata hoopis proteasoomide võimetusele lagundada kahjustatud neuronite proteasoomides ebanormaalse struktuuriga huntinkiini. Vastupidiselt eelnevale on leitud farmakoloogilist tõendusmaterjali, mis vihjab autofaagia rollile huntinkiini N-terminuse degradatsioonis. Näiteks 3-MA suurendab suurenenud polüglutamiiniga huntinkiini agregatsiooni klonaalsetes striatumi rakkude (*clonal striatal cells*) (Qin *et al.*, 2003). Autofaagia indutseerija rapamütsiini aga alandab suurenenud glutamiiniga huntingtiini agregatsiooni transfekteeeritud rakkudes (Ravikumar *et al.*, 2002), kaitstes Huntingtoni tõve mudeliga kärbsed neurodegeneratsiooni vastu ning parandades Huntingtoni tõve mudeliga hiirtel käitumiskatses jõudlust ning alandades valguagregaatide moodustumist (Ravikumar *et al.*, 2004). Need faktid

vihjavad autofaagia võimalikule rollile suurenenud poüglutamiinraktiga valkude ringluses ning toksiliste valkude vastu neuronitele kaitse pakkumises. On uuritud mutantse huntingtiini degradatsiooni autofaagilises protsessis ja leitud, et autofaagiat reguleeritakse katepsiinide aktivatsiooniga kiirendades huntingtiinifragmentide koristamist. Mutantne huntingtiin on katepsiin D degradatsioonile suhteliselt resistentne (Qin *et al.*, 2003) ja mutantse huntingtiiniga ülestimuleeritud autofaagia põhjustab mitokondrite mislokatsiooni (valesti paiknemist) ja düsfunktsiooni (Qin *et al.*, 2005). On tõendeid, et ka eksitotoksiline protsess on seotud autofaagiaga. Nii NMDA (N-metüül-D-aspartaat) kui ka kainehappe-tüüpi glutamaadireseptorite aktivatsioon stimuleerisid autofaagiat ja lüsoomaalsete ensüümide aktivatsiooni. Striaatumi neuronite autofaagilise surma blokeerimine 3-MA ja katepsiin B inhibiitoritega vihjas sellele, et ka eksitotoksilisusega kaasneb autofaagia aktivatsioon (Wang *et al.*, 2005).

2. Katepsiinid

Lüsoomaalseid katepsiine peetakse proteiinidegradatsiooni terminaalseteks mediaatoriteks, mille esmaseks ülesandeks lüsoosoomides on mitteselektiivselt lagundada valke. Neid tsüsteiiniproteaase võib leida ka väljaspool lüsoosoomi, kuigi nad vajavad aktivatsiooniks spetsiaalseid tingimusi, mis kinnitab oletust nende osalemise kohta ka spetsiifilisemate ülesannete täitmisel (Turk *et al.*, 2000). Inimesel on identifitseeritud 11 katepsiini, mis jagunevad vastavalt oma järjestushomoloogiale 2-ks perekonnaks: katepsiin L sarnased (L, V, S, K, F, H, W) ja katepsiin B-sarnased (B, C, O ja X) (Berti & Storer, 1995; Barret *et al.*, 1998). Nendes perekondadesse kuuluvate ensüümide küpsed vormid on üsna sarnased, kuid nende ensüümide proregioonid erinevad oma pikkuse poolest märgatavalt (Berti & Storer, 1995). Üldiselt on lüsoomaalsed tsüsteiiniproteaasid väikesed 20-30 kDa valgud (välja arvatud katepsiin C, mis on 200 kDa valk) (Turk *et al.*, 2000). Katepsiinid on aktiivsed nõrgalt happelises keskkonnas ja nad on enamasti endopeptidaasid, ehkki mõned neist võivad käituda kui dipeptidüül karboksüpeptidaasid (katepsiin B), aminopeptidaasid (katepsiin H) või dipeptidüül aminopeptidaasid (katepsiin C) (Barrett *et al.*, 1998). Katepsiinid sünteesitakse inaktiivsete preproensüümidenä, mis translokeeritakse ER-sse ja protsessitakse proteolüütiliselt aktiivseks vormiks alles happelise keskkonnaga hilistes endosoomides või lüsoosoomides.

Lüsosomaalsete katepsiinide küpsemine toimub autoaktivatsiooniprotsessis või proteaaside nagu pepsiin, neutrofiili elastaas, kuid ka teiste tsüsteiiniproteaaside kaasabil (Nishimura *et al.*, 1988).

Katepsiinide aktiivsust reguleeritakse erinevalt, näiteks:

1) pH abil. Suurem osa lüsosomaalseid tsüsteiiniproteaase on neutraalse pH juures ebastabiilsed või nõrgalt aktiivsed (katepsiinid L, B, H, K, V, F), nende aktivatsiooni optimum on pH 5,5 juures. Lüsosoomide küpsemisel langeb nende sisemine pH 3,8-ni, mille juures katepsiinid B, S ja L denatureeruvad (Turk *et al.*, 1999). Madala pH väärtuse juures seostuvad kõik ligandid, kaasa arvatud substraadid, inhibiitorid ja propeptiidid katepsiinidega nõrgalt (Turk *et al.*, 2000). Denatureeritud katepsiin L-i degradeeritakse proteolüütiliselt ühe aspartaadi proteinaasi, katepsiin D poolt, mis on vastupidi aga väga aktiivne happelise pH juures (Turk *et al.*, 1999);

2) redokspotentsiaaliga. Tsüsteiini aktiivsait on kergesti oksüdeeritav ja ensüüm on enamasti aktiivne redutseerivas keskkonnas;

3) ensüümidega endosoomides ja lüsosoomides. Lüsosoomides kasutamiseks peab katepsiinid mannosüleerima ning järgnevalt peavad fosfomannosüüljäägid interakteeruma mannoos-6-fosfaadi lüsosomaalsete retseptoritega;

4) tsüsteiiniproteaasi inhibiitoritega. Peamised looduslikud lüsosomaalsete tsüsteiiniproteaaside inhibiitorid on tsüstatiinide suurperekonna liikmed, kuhu kuuluvad rakusisesed steffiinid tsüstatiinid A ja B (tüüp I), ekstratsellulaarne tsüstatiin C (tüüp II) ja kininogeenid (tüüp III) (Chapman *et al.*, 1997), türopiinid ja peamine proteaasi inhibiitor alfa2-makroglobuliin (Turk *et al.*, 2000). Teine komplekt inhibiitoreid on *serpin squamous* raku kartsinoomi antigeen 1 (Suminami *et al.*, 1991) ja tsütotoksiliste T-lümfotsüütide antigeen-2beeta (Delaria *et al.*, 1994). Nad võivad inhibeerida aktiivseid ensüüme ja vältida seega degradeeritava materjali kompartmentalisatsiooni.

Lisaks oma degradeerivale iseloomule protsessivad katepsiinid paljusid valke ka lüsosoomiväliselt. Nad osalevad samuti immuunvastuse väljakujundamisel ja luustumisprotsessiga kaasneval ekstratsellulaarse matrikis remodelleerimisel ning on seotud paljude haigusprotsessidega, nagu vähkkasvajad, reumatoidartriit, sklerosis multipleks ja Alzheimeri tõbi (Chapman *et al.*, 1997; Mort *et al.*, 1984; Cataldo & Nixon, 1990). Arvatakse, et katepsiinid on apoptoosi positiivseteks mediaatoriteks ja seda tõestavad ka teaduslikud faktid. Üks osa kaudsetest tõenditest lüsosomaalsete tsüsteiiniproteaaside osaluse kohta neuronaalses apoptoosis oli saadud katsetega, mis viidi läbi steffiin B knockout hiirtel, kellel steffiin B puudus põhjustas tserebellaarset apoptoosi (Pennacchio *et al.*, 1998). Katseliselt on demonstreeritud ka katepsiinide võimet protsessida kaspaase. Näiteks

HeLa ja L929 rakkudes on katepsiin B kaspasid-1 ja -11 protsessingu proteinaasiks (Vancompernelle *et al.*, 1998) ning katepsiin G võib samal viisil genereerida aktiivset kaspas-7 (Zhou & Salvesen, 1997). Katepsiinid B ja L on kaspas-3 potentsiaalsed protsessinguproteinaasid apoptoosi induktsiooniprotsessis erütroidsetel eellasrakkudel (Gregoli & Bondurant, 1999). Kui roti maksa digitoniiniga töödeldud lüsoosoomide fraktsioonist eraldati katepsiin L, aktiveerus tsütosoolis prokatepsiin-3 (Ishisaka *et al.*, 1999). Teadaolevalt osaleb ka katepsiin C kaudselt kaspaside aktivatsioonis. Üldiselt osalevad katepsiinid ka apoptoosiprotsessis nii enne kui pärast kaspase (Bezvenyuk *et al.*, 2000).

2.1. Katepsiin L

Katepsiin L on laia ekspressioonispektriga tsüsteiiniproteaas, mis on seotud nii intratsellulaarse proteolüüsi, kui ka ekstratsellulaarse matriksi remodelleerimisega (Felbor *et al.*, 2002) ning inimese katepsiin L geen on lokaliseerunud kromosoomilookusesse 9q21-q22 (Chauhan *et al.*, 1993). Ta on peamine ekskreetitav lüsoosomaalne tsüsteiiniproteaas, tuntud ka nimetustega MEP ja CATL. Katepsiin L-il on võrreldes teiste katepsiinidega *in vitro* kõige suurema kollagenolüütiline ja elastinolüütiline aktiivsus. Teadaolevalt inhibeerib ta ühte α -1 proteaasi, mis omakorda kontrollib inimese neutrofiilide (leukotsüütide) elastaasi aktiivsust *in vivo* (MEROPS-the Protease Database). Katepsiin L puudusega loomadel arenes välja perioodiline karvade kaotus, epidermaalne hüperplaasia (*hyperplasia*), akantoos (*acanthosis*) ja hüperkeratoos (*hyperkeratosis*). Katepsiin L-i aktiivsus on võrreldes vanade rottidega suhteliselt kõrge noorte rottide tserebraalse korteksi, hipokampuse, neostriatumi ja tserebellumi rakkudes.

Katepsiin L-i on seostatud erinevate patoloogiate, nagu reumatoidartriidi, glomerulonefriidi (*glomerulonephritis*), Alzheimeri tõve, kasvaja invasiooni ja metastaasidega ning ta degradeerib põhiliselt ekstratsellulaarse matriksi valke. Samuti on teada, et *ras*-onkogeeni transfektsiooniga roti-hiire fibroblastidesse kaasneb ka katepsiin L aktiivsuse tõus. Rea erinevate kartsinoomide, samuti rinnavähi korral on täheldatud ensüümi üleekspressiooni ja rinnavähi raviprognosil on üheks diagnostiliseks faktoriks katepsiin L-i aktiivsuse määramine.

2.2. Katepsiinide roll neurodegeneratsioonis

Neuronite lüsoosoomid sisaldavad nii katepsiin L-i kui B-d ning nende aktiivsus suureneb 3-5 päeva jooksul pärast isheemilist atakki hipokampuses märgatavalt (Yamashima *et al.*, 1998). 1998-l aastal uuris Yamashima koos kaastöötajatega katepsiinide B ja L immunolokalisatsiooni CA1 piirkonna neuronites ning märkas, et 3 päeva jooksul pärast isheemiat suurenes nende katepsiinide immunoreaktiivsus isheemiaresistentsetes hipokampuse neuronites märkimisväärselt, kuid oli lokaliseerunud vaid lüsoosoomidesse. Võrdlusena isheemiatundlikes CA1 neuronites lokaliseerus katepsiin B immunoreaktiivsus nii lüsoosoomide maatriksis kui ka tuumaümbruses ning viimane viitab katepsiin B ekstralüsoosomaalsele lekkele. Lüsoosoomimembraanide purunemine näitas süsteemi staatilisust ja katepsiinse immunoreaktiivsuse ekstralüsoosomaalne lokalisatsioon CA1 sektoris, et dünaamilised muutused lüsoosoomimembraanide stabiilsuses või läbilaskvuses on põhjustatud aktiveeritud kalpaiinist, millel on arvatavasti tähtis osa postisheemiliste neuronite degeneratsioonis. Ilmselt pole lüsoosoomide purunemine mitte neuronaalse surma sekundaarne vaid primaarne põhjus, mis jõuab lõpule isheemiajärgseks 5.-ks päevaks. Samuti peegeldab katepsiinide B ja L aktiivsuse suurenemine läbi hipokampaalsektore 3. ja 5. päevani neuronite katset elada insult üle, lagundades mittevajalikud või kahjustatud rakuosised. Uuringutes on kinnitust leidnud fakt, et spetsiifilised katepsiin B ja L inhibiitorid alandavad neuronaalse surma ulatust märgatavalt. Kalpaiin-katepsiin hüpoteesiga (Yamashima *et al.*, 1998) püüti selgitada, et kalpaiinsõltuv lüsoosoomide purunemine koos katepsiinide B ja L-i vabanemisega võib vähehaaval esile kutsuda mõningate rakuliste koostisosade degradatsiooni. Edasilükatud sündmused CA1 neuronaalses surmas pärast isheemilist insulti võivad vahetult tuleneda nõrgast proteolüütilisest protsessingust nõrgalt happelises ajukoes (pH 7,34 $\pm$ 0,03 leiab aset 2-3 päeval peale isheemiat) (Chopp *et al.*, 1990), kuna optimaalne pH katepsiinide B ja L jaoks on vastavalt 6,2 ja 5,5.

3. Seerum-kaaliumdeprivatsioon kui *in vitro* neuronaalse surma mudel

Väikeaju granulaarneuronid ehk interneuronid on imetajate kesknärvisüsteemis üheks levinumaks neuronaalseks fenotüübiks (Ito, 1984a). Need neuronid sisaldavad primaarse neurotransmitterina glutamaati ja ekspresseerivad oma dendriitides ja tuumaümbruses nii NMDA kui mitte-NMDA glutamaatreseptoreid (Garthwaite *et al.*, 1986). Väikeaju arengu jooksul genereeritakse granulaarneuroneid postnataalselt välimises idukihis (*external germinal layer*), kus nad diferentseeruvad ja migreeruvad umbes 3.-ndal päeval granulaarneuronite kihti ning innerveeritakse mossy kiudude aksonitega (Altman, 1972). Granulaarneuroneid innerveeritakse vaheldumisi nii Purkinje rakkude dendriitide, kui nendega paralleelsete pikkade fiiberaksonitega (Ito, 1984a,b). Postmitootilisi granulaarneuroneid saab kasvatada mõned nädalad *in vitro* diferentseerumata olekus juhul, kui tekitada kultuurisöötmes füsioloogilisest kõrgem K⁺ ionide kontsentratsioon (25mM) (Gallo *et al.*, 1987) või mõjutada rakke glutamaadi või NMDA-ga (Balázs *et al.*, 1988). Väikeaju granulaarneuronite kasvatamisel söötmes K⁺ füsioloogilisel kontsentratsioonil ehk mittedepolariseerivatel tingimustel (K⁺ 5mM) surevad neuronid 3-11 päeva jooksul apoptoosi (Yan *et al.*, 1994; D'Mello *et al.*, 1993). Kui roti väikeaju granulaarneuronite kultuur valmistati organist 8.-ndal postnataalsel päeval (PND8) ja kultiveeriti 25 mM K⁺ lisandiga söötmes (Gallo *et al.*, 1987), siis kohanesid rakude kasvutingimustega hästi. Katsete jaoks kultiveeriti neuroneid 7 päeva depolariseerivates tingimustes kõrge K⁺ kontsentratsiooniga söötmes (25 mM K⁺), seejärel alandati K⁺ kontsentratsiooni 5mM-ni, kusjuures eemaldati söötimest ka seerum, mis kutsus esile autofaagilise protsessi, millele hiljem lisandusid apoptootilised muutused (D'Mello *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1994). Kuna roti väikeaju granulaarrakkude kultuur (CGC) on suhteliselt homogeenne primaarne gliiaga segakultuur on sellest saanud ajapikku hea *in vitro* mudelsüsteem nii neuronaalse apoptoosi kui autofaagia uurimiseks (Yan & Paul, 1997).

4. Neuroprotektiivsed tsüsteiiniproteaasi inhibiitorid ja nende võimalik kasutamine neuronaalse surma pidurdamiseks

Rakukultuuris ja katseloomadega tehtud neuroprotektiivsete ainete mitmete katsetega on saadud lootustandvaid tulemusi. Kuid siiani ei ole tõestust leidnud *in vivo* efekt inimesel isheemilise kahjustuse korral, kus potentsiaalselt protektiivsete ainete kasutamine mõjutab eksitotoksilisust ning neuronaalse Ca^{2+} ülekoormust sarnaselt glutamaadi antagonistide, voltaazlülüsiga Ca^{2+} kanali antagonistide, voltaazist sõltuvate K^{+} kanali agonistide, Na^{+} kanali antagonistide, GABA agonistide ja vabade radikaalide püüdjate jne mudelkatsetega (Lee *et al.*, 1999). Perspektiivis on laiendada terapeutilisi sihtrühmi kaugemale, kui eksitotoksilisus ja neuronaalse Ca^{2+} ülekoormus, mida on kirjeldatud kõige efektiivsemate, arengujärgus olevate neuroprotektiivsete teraapiate korral (Lee *et al.*, 1999). Kui kalpaiiniga toimub tsütoskeleti valkude tugev proteolüüs transientse isheemilise insuldi ajal ajus minutitega, siis seriiniproteaasi inhibiitori leupeptiini intraventrikulaarne infusioon 3 päeva enne isheemilist episoodi võiks esile kutsuda efektiivse neuroproteksiooni (Lee *et al.*, 1991). On teada, et leupeptiin põhjustab ka vastupidist efekti - seroidset lipofustsiooni, tihedate kehakeste akumulatsiooni ning Purkinjee rakkude degeneratsiooni (Nixon & Cataldo, 1993). Markgraf koos kaastöötajatega demonstreeris 6-tunnise teraapiaga membraani läbiva kalpaiini inhibiitori MDL 28,170e toimet rotil fokaalse insuldi korral ning veendus, et MDL 28,170 inhibeerib mitte ainult kalpaiini vaid ka katepsiin B-d (Mehdi, 1991; Markgraf *et al.*, 1998). See on kaudne tõendus kalpaiini ja katepsiin B rolli seose kohta neuronaalse surma ja insuldi ulatuse mõjutamisel keskmise tserebraalarteri oklusioonimudelil rotil. Kuna terapeutilised strateegiad baseeruvad aktiveeritud kalpaiinist sõltuvate katepsiinide ekstralüüsosomaalsel vabanemisel, siis seda asjaolu on põhjust arvestada insuldi ja ägedate neurodegeneratiivsete haiguste raviskeemi planeerimisel.

Näiteks E-64 (eraldati *Aspergillus japonicus* vedelkultuurist kui tsüsteiiniproteaaside inhibiitor) ning E-64c (millel E-64 terminaalne agmatiin asendati isoalrülamiidiga) on tuntud kui katepsiinide B, H ja L, kalpaiini ja papaiini selektiivsed inhibiitorid. Ka Ca-074 on katepsiin B aktiivsaidiga sobiv selektiivne inhibiitor ning Ca-074 Ki katepsiin B-le on Dixon ploti järgi 2.0×10^{-9} M, katepsiin H ja L-le aga vastavalt 75,000 ja 233,000. E-64c Ki katepsiinidele B, H ja L on vastavalt 8.1, 111 ja 3.5×10^{-9} M (Murata *et al.*, 1991; Towatari *et al.*, 1991; Katunuma & Kominami, 1995). Kui ahvidele

vahetult pärast isheemilist insulti manustati intravenoosselt neid katepsiini inhibiitoreid, siis CA-074-ga säästeti 5 päevaks postisheemilisest neuronaalsest surmast ligikaudu 67% (Yamashima *et al.*, 1998), kuid E-64c-ga juba ligikaudu 84% CA1 neuronitest (Tsuchiya *et al.*, 1999), kasutades ühekordset postisheemilist doosi 4 mg/kg kohta. Nimetatud inhibiitoritega blokeeriti mitmete rakusisaldiste patoloogiline proteolüüs, mis säästis postisheemilisi CA1 neuroneid ja lükkas rakusurma edasi. Katseandmed näitasid, et mitte ainult katepsiin B vaid ka katepsiin L võib osa võtta postisheemilisest neuronaalsest degeneratsioonist. Kaskaadi alguses toimuvate sündmuste farmakoloogiliste sihtrühmade mõjutamisel inhibiitoritega saab ehk tõsta ravi efektiivsust ja rakke surmast säästva ajavahemiku pikkust. Teadaolevalt on kalpaiini aktiveerumine pärast isheemilist insulti letaalse kaskaadi varane ja katepsiinide aktiveerumine hiline sündmus. Kuigi katepsiiniinhibiitoritel CA-074 ja E-64c oli märgatav trapeutiline toime ning katepsiinide ekstrasüosomaalne vallandumine kestis kolmanda päevani, suurenes ensüümide aktiivsus just ajavahemikus kolmandast viienda päevani enne neuronaalset surma (Yamashima *et al.*, 1998).

Isheemilise ajukahjustuse mehhanismid muutuvad alates glutamaadi eksitotoksilisusest tsüsteiini proteaaside asjasse sekkumiseni ja sellega arvestavad uued ravimid osutuksid vägagi vajalikeks. Siiski kui iseloomustada eksperimentaalse tserebraalse isheemia korral efektiivset neuroproteksiooni, siis histoloogiline hindamine, mis on lihtsam neuronaalse kao või infarkti ulatuse määra kvantifitseerimisest, võib osutuda mitteküllaldaseks. Samuti on vajalik täiendavalt läbi viia alternatiivne funktsionaalne hindamine koos käitumusliku, neurofüsioloogilise ja histoloogilise hindamisega (Corbett & Nurse, 1998). Üldiselt võib kinnitada, et isheemiline kahjustus ei ole veel staatiliseks muutunud peale rakkude 1-2 nädalast ellujäämisperioodi ja arvukad neuroprotektiivsed ravimid koos erinevate ravivõtetega, nagu hüpotermia ja *ischemic preconditioning* võivad neuronaalset surma siiski vaid edasi lükata (Corbett & Nurse, 1998), mitte ära hoida. On võimalik, et mitmed komponendid kindlustavad CA1 neuronite säilumise 7 päeva jooksul pärast isheemiat, kuid selline kaitse ei kesta üle kuu aja (Li & Bunchan, 1995). Kui neuronid isegi jääksid histoloogiliste parameetrite järgi ellu, on võimalik, et nende endine funktsionaalsus on kadunud, kuna kahjustus dendriitides või närviterminalides võib olla maskeerunud. CA1 neuronite surm ahvil, mis leidis aset 5. päeval pärast täielikku 20 minutilist isheemilist atakki võis olla osaliselt vahendatud apoptoosi regulaatorgeenide produktide induktsioonist, kuid põhilikaskaadi sündmused olid enamasti nekrootilised. Kalpaiin ise on arvatavasti vaid patoloogiliste protsesside mediaatoriks, mitte neuronite hävitajaks. Lüsosoomide ebastabiilsus ja sellele järgnev rakuline

degeneratsioon olid diskussiooni teemaks kuni De Duve ja Wattiaux avastuseni, millega näidati, et postisheemilistes tingimustes vallanduvad kahjustunud lüsoosoomidest tsütoplasmasse hüdrolüütilised ensüümid, katepsiin B ja L, mille tagajärjel CA1 neuronid surevad (De Duve & Wattiaux, 1996). Vahetult peale isheemilist atakki toimuvad kohe nii Ca^{2+} mobilisatsioon ja sellele järgnev kalpaiini aktivatsioon. Atakijärgselt on parimaks neuroprotektiivseks strateegiaks atakieelsete Ca^{2+} seotud protsesside taaskäivitamine. Transientse ajuisheemia korral vallanduvad ahvi ajukoes paralleelselt nii nekrootiline kui apoptootiline kaskaad, kuid mõned antiapoptootilised interventsioonid koos katepsiinide ekstralüsoosomaalse vabanemisega võidakse pöörata apoptoosiks, ilma nekrootilist rada mõjutamata (Yamashima, 2000).

II TÖÖ EESMÄRGID

Oma katsetega püüdsime:

1. selgitada, kas seerum-kaaliumdeprivatsiooni korral kaasneb väikeaju granulaarrakude kultuuris rakkude surmaga ka katepsiin L-i aktiivsuse tõus ja autofaagia ning kui kaasneb, siis kui ulatuslik on autofaagia.
2. leida tõendusmaterjali, kas seerum-kaaliumdeprivatsiooni poolt indutseeritud lüso somaalse katepsiin L aktiivsuse tõus ja autofaagia võiksid neuronaalse surma protsessis omavahel seotud olla.
3. testida katepsiini L-i inhibiitorite ALLM ja FY-CHO neuroprotektiivset toimet seerum-kaaliumdeprivatsiooni poolt indutseeritud neuronaalse surma mudelis *in vitro* ning leida võimalikult sobiv inhibiitor või inhibiitorite kompleks neuronaalse surma pärssimiseks või peatamiseks.

III METOODIKA

1. Kemikaalid

Veise seerum (FBS), koekultuurisööde BME Earle's komponentidega, kuid L-glutamiinita (GIBCOTM Invitrogen Corporation, Taani); DNAas I, trüpsiin, trüpsiini inhibiitor (Roche); polü-L-lüsiin hüdrobromiid Mw 70 000 – 150 000, tsütosiin β -D- arabinofuranosiid hüdrokloriid (Ara-C), L-glutamiin, gentamütsiinsulfaat, trüpaansinine (Sigma, USA); katepsiin L selektiivne inhibiitor Ac-Leu-Leu-Mal (ALLM ehk N-Atsetüül-L-leutsüül-L-leutsüül-L-methionaal) (TocrisTM UK); katepsiin L inhibiitor Z-Phe-Tyr-CHO (FY-CHO ehk N-(bensüüloksükarbonüül)-L-fenüül-alanüül-L-türosinaal) ja pöördumatu kaspaas-3 inhibiitor DEVD-fmk (Merck/Calbiochem, Saksamaa); katepsiin B inhibiitor CA-074Me (L-trans-epoksüsuktsinüül-Ile-Pro-OMe propüülamiid) (Peptides International, USA); autofaagia inhibiitor 3-metüüladeniin (3-MA) (Sigma, USA); dipeptidüül-rodamiin diamiidsubstraat (CBZ-Phe-Arg)2-R110 ja lüsoosomaalne marker LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, USA).

2. Rakukultuur

Väikeaju granulaarrakkude kultuur (CGC) valmistati väikeste modifikatsioonidega meetodil, mida kirjeldasid Gallo *et al.*. Katseloomad pärinesid Scanburi katseloomade keskusest (Taanist) ja neid hooldati kohalikus Biomedikumi vivaariumis sobivatel tingimustel (ööpäevase tsükliga 12 tundi valgust - 12 tundi pimedust, 22°C temperatuuri ja 45-55% õhuniiskusega ruumis sobiva suurusega puuris). Kaheksa päeva vanustelt loomadelt eraldati väikeajud. Ajukudet trüpsiniseeriti 15 min 35°C 0.025 % trüpsiiniga ning ensüümi toime inhibeeriti 0.05% trüpsiini inhibiitoriga. Homogeense kultuuri saamiseks tehti täiendav DNAas I (0.004%) töötlus. Saadud rakususpensioon külvati polü-L-lüsiiniga kaetud 35-mm diameetriga koekultuuritassidele seerum-kaaliumdeprivatsioonikatsete (SKD) ja 8 kambrilistesse Lab-TekTM II klaaspõhjaga kambersüsteemidesse (Nunc, Taani) fluorestsentsuuringute tarbeks. Rakke kultiveeriti BME söötmes, kuhu oli täiendavalt lisatud 10% (vol/vol) FBS ning 25mM KCl, 2mM glutamiini ja 100µg/ml gentamütsiinilahust, 7 päeva CO₂-

inkubaatoris tingimustel: 95% õhuniiskuse, 5% CO₂. 24 tundi pärast külvi lisati rakusöötmesse 10µM Ara-C mitteneuronaalsete rakkude proliferatsiooni peatamiseks. Rakkude tihedus kultuuris oli 1.3-1.4 x 10⁶ rakku/ml ja kõik katsed viidi läbi 8-ndal kultuuripäeva (8 DIV). SKD katseks asendati vana rakusööde seerumivaba BME söötmega, kus KCl kontsentratsioon oli 5.3mM. Iga 2, 4, 8 või 12 tunni möödumisel SKD algusest hinnati surnud rakkude protsenti ning mõõdeti katepsiin L aktiivsust. Kõik uuritavad ained lisati katsekeskkonda SKD söötmega.

3. Lüsosoomide visualiseerimine

Katsetes kasutati lüsosomaalset markerit LysoTracker Red DND-99, mis on rakumembraani läbiv nõrgalt aluseline amiin ning võimeline akumuleeruma madala pH-ga rakulistesse kompartmentidesse. SKD katse erinevate ajapunktidega kambritesse lisati lüsosomaalset markerit kontsentratsiooniga 50nM, seejärel inkubeeriti rakke 60 minutit 37°C ja mõõdeti emissiooni konfokaalmikroskoobi registreerimisseadme abil lainepikkusel 568/605nm. Paraleelsed mõõtmiskatsed tehti akridiin-oranziga ja määrati värvi akumulendumist happelises rakulises kompartmentis ning rakutuumas. Akridiin-oranži katses lisati neuronitele värvi kontsentratsioonis 5µg/ml ja inkubeeriti 10 minutit 37°C juures. Pärast proovi pesemist uuriti emissiooni samas proovis lainepikkusel 488/585 nm.

4. Katepsiin L aktiivsuse määramine (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 substraadi abil

Lüsosmaalse katepsiin L-i aktiivsust mõõdeti (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 substraadiga *in situ*. See ise mittefluorestseeruv substraat on võimeline penetreeruma läbi lüsosoomimembraani lüsosoomi ja seostuma aktiivse katepsiin L-ga. Tekkiva roheline fluorestsentssignaali intensiivsuse järgi on võimalik tuvastada aktiivse katepsiin L-i hulka uuritavas rakus. Ensüümi poolt lõigatav substraat on 800x rohkem katepsiin L kui katepsiin B spetsiifiline ja võimaldab kindlalt ja selektiivselt detekteerida katepsiin L-i aktiivsust katepsiin B kõrge aktiivsuse foonil (Assfalg-Machleidt *et al.*, 1992). Rakukultuurile lisati 10µM (CBZ-Phe-Arg)₂-R110, eksponeeriti 60 minutit, seejärel loputati PBS-ga ja mõõdeti emissiooni lainepikkusel 488nm ning rehkendati pildipikselite keskmine intensiivsus. Kultuuritassidelt valiti 200x suurendusega pildiväljad juhuslikkuse põhimõttel.

5. Katepsiin L immunohistokeemiline analüüs

Koekultuurirakke fikseeriti 20 minutit toatemperatuuril paraformaldehüüdi 4%-se lahusega ja pesti paar korda 0.1M fosfaatpuhvriga ning permeabiliseeriti seejärel 10 minutit 0.1M fosfaatpuhveriga, millele oli lisatud 0.1% Triton X-100-i. Lõpuks inkubeeriti proove 30 minutit hiire monoklonaalsete antikehadega (ALEXIS Corporation, Šveits; lahjendusega 1:250), mis tunnevad ära roti katepsiin L struktuuri. Seejärel lisati biotinüleeritud sekundaarseid antikehi (anti-mouse IgG lahjendusega 1:100) ja inkubeeriti 60 minutit ning visualiseeriti streptavidiin-biotiin-peroksüdaas meetodiga (diaminobensidiin kromogeeniga ABC süsteem, Vector Laboratories, UK). Kõik antikehad olid lahustatud 3% kitseseerumit, 0.25% Triton X-100, 0.5% Tween-20 sisaldavas PBS-is. Katepsiin L ekspressioonitaseme ulatus määrati MicroImage 1.0 (Olympus, Jaapan) tarkvara abil pildipiksli keskmise aktiivsuse kaudu igal üksikul rakul eraldi.

6. Neurotoksilisuse hindamine

Neurotoksilisuse hindamine rakukultuuris toimus kvantitatiivselt, trüpaansinise testi abil järgnevalt: kultuuritassile kinnitunud rakke pesti fosfaatpuhvriga (PBS: 145mM NaCl, 3mM KCl, 0.4mM Na₂HPO₄, 2.4mM KH₂PO₄, pH 7.4) ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit 0.4% trüpaansinise lahusega. Pärast värvimist pesti rakke paar korda PBS puhvriga. Mõnede katsete puhul määrati neuronaalse surma ulatus *in vitro* võrdlevalt ka TUNEL meetodiga, kasutades testkomplekti “ApopTag Plus peroxidase kit-i” (Chemicon International, UK), mida on varem kirjeldatud artiklis (Kaasik *et al.*, 2001). Eelnevalt fikseeritud ja permeabiliseeritud rakke inkubeeriti 60 minutit 37°C juures seguga, mis sisaldas 40µM biotin-16-dUTP, 0.5 U/µL terminaalse deoksütransferaasi, 25mM Tris HCl, 200mM naatriumkakodülaati pH 6.6, 2.5mM koobalkloriidi. Biotinüleeritud DNA seoti ekstravidiin-aluselisfosfataasse konjugaadina ja visualiseeriti 5-bromo-4-klooro-3-indolüülfosfaadi, 4-toluidiinsoola ja nitro-tetrasoolkloriid reaktsiooniga. Spetsiifilist DNA fragmentatsiooni sisaldavad rakud identifitseeriti morfoloogiliselt tumedate tuumade olemasolu järgi. Kultuuritassile kinnitunud ja eespool kirjeldatud meetodiga värvitud rakupreparaadid asetati mikroskoobi (BX51, Olympus) motoriseeritud esemelauale, mis oli ühendatud videokaameraga ning salvestati igalt tassilt

5-8 juhuslikult valitud pildivälja (305 x 232 μm), á 100-200 neuronit. Arvutifailina salvestatud pilte analüüsiti “pimemeetodil” CAST programmiga (Olympus, Taani). Iga tassi (1000-1500 rakku tassi kohta) juhuslikult valitud 8-lt väljalt loeti esmalt trüpaansinisega värvunud või TUNEL-positiivsed rakud ja seejärel värvumata rakud või TUNEL-negatiivsed rakud, mida vastavalt katsele (TUNEL või trüpaansinise katse) summeerimides saadi väljal olevate rakkude hulk. Iga andmepunkti saamiseks oli ühes katses kasutatud paralleelselt 3 rakutassi ja andmete usaldusväärsuse mõttes oli kõiki katseid korratud. Erinevates katsetes kasutatud katepsiin L inhibiitoreid FY-CHO ja ALLM, katepsiin B inhibiitorit CA-074Me, kaspaas-3 pöördumatut inhibiitorit DEVD-fmk ning autofaagia inhibiitorit 3-MA oli eelnevalt *in vitro* testitud CGC kultuurikatses neurotoksilisuse suhtes.

7. Elektronmikroskoopia

Rakukultuurid fikseeriti 2.5% glutaaraldehüüd-kakodülaatpuhvris (pH 7.4) 60 min 4°C juures, seejärel koguti tassidel olnud rakud ning tsentrifuugiti 300g 5 minutit. Pärast rakusademe pesemist fikseeriti rakke 2% osmium tetraoksiidiga 60 min. Seejärel dehüdreeriti rakuproovid alkoholiga ning sisestati Epon 812-sse. Eelpool nimetatud meetodil ettevalmistatud rakuproovidest valmistati õhukesed lõigud, mis värviti pliitsitraadi ja uranüülatsetaadiga ning uuriti värviülekanne elektronmikroskoobiga EM Tecnai 10 (FEI Co., Eindhoven, Holland). Kvantitatiivseks analüüsiks kasutati juhuslikult valitud rakke, mida pildistati 10 000x ja 20 000x suurenduse juures. Pilte analüüsiti *Adobe Photoshop*-iga ning elektrontihedaid heterogeenset materjali sisaldavaid vakuoole identifitseeriti autofagosoomidena. Neid vakuoole uuriti edasi suurema suurendusega (32 000x).

8. Statistiline analüüs

Andmeid analüüsiti ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga (ANOVA; *Analysis of Variance*.) ja saadud tulemusi võrreldi Bonferroni katseviisilise (multiple) võrdlustestiga. Kõikidel juhtudel on statistiliselt kaalutud katseviisilise vea suurus $p < 0.05$.

IV TULEMUSED

1. SKD-ile järgnev neuronaalne surm väikeaju granulaarrakkude kultuuris

Roti väikeaju granulaarrakkude kultuuri inkubeeriti seerumilisandiga kultuurisöötmes, depolariseerivatel tingimustel (25mM KCl). Seejärel asendati rakkudel olev kultuurisööde söötmega, kus puudus seerum ning kaaliumioonide kontsentratsioon oli alandatud 5mM-le. 4 tundi pärast deprivatsiooni algust võis kultuuritassidel märgata üksikuid surnud rakke ja aja jooksul surnud rakkude hulk kasvas (*Joonis 1.*). 12 tunni möödumisel deprivatsiooni algusest võis trüpaansinise testi alusel lugeda neuronpopulatsiooni rakkudest surnuks 20% ning 24 tunni pärast juba 70%-i. TUNEL test, mille abil on võimalik tuvastada apoptoosispetsiifilist tuumasisesest DNA fragmenteerumist rakkudes, kinnitas et 12 tundi pärast deprivatsiooni algust oli rakupopulatsiooni surnud neuronitest 47%-l apoptoosile iseloomulik morfoloogiline pilt, mida iseloomustasid tumedad ebakorrapärase kujuga rakutuumad.

2. SKD mõju neuronite katepsiin L aktiivsusele *in vitro*

Katepsiin L aktiivsust intaktsetes neuronites mõõdeti (CBZ-Phe-Arg)²-R110 substraadiga ning fluorestsentsi intensiivsust väljendati pikselite keskmisena. Kui kontrollkultuuris oli katepsiin L aktiivsus normaaltingimustes väga madal, siis seda kinnitas ka väheintensiivne fluorestsentssignaal (*Joonis 2.A*). SKD põhjustas katserakkudel katepsiin L-i aktiivsuse kahesuunalisi muutusi. 2 tunni jooksul, alates deprivatsiooni algusest, oli katepsiin L aktiivsuse tase katsekultuuri neuronitel isegi langenud, kuid kahe tunni möödudes tõusis siiski märgatavalt. Sellise esmase väikese, kuid siiski tähelepanuväärse aktiivsuse taseme languse põhjust pole suudetud lõplikult selgitada, kuid arvame, et see võib olla põhjustatud proovi aeglasest akumulierumisest rakkude lüsosomaalsetesse kompartmentidesse. Katepsiin L aktiivsuse tõus jätkus 8 tunnini (*Joonis 2.B*), kuid 12 tunniks oli see

juba langenud normaaltasemeni (*Joonis 2.C*). Et saada rohkem informatsiooni aktiivse katepsiin L-i subtsellulaarse paiknemise kohta, lisati katserakkude kultuurile aktiivse katepsiin L-ga seostuvat ja fluorestseeruvat (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 substraati ning uuriti kindlatel ajapunktidel (konfokaalmikroskoobi suure suurendusega) võrdlevalt nii kontroll-, kui SKD-i katses signaali lokalisatsiooni raku sees. Joonisel 3 on näha, et peale fluorestseeruva substraadi lisamist täheldati 4 tunni pärast signaali intensiivsuse tõusu nii neuriitide kui ka tuumaümbruse lüsoosoomides. 12 tunni pärast aga oli katepsiin L-i aktiivsus ümber paiknenud neuriitidest tuumaümbrusesse nii, et vastavalt signaali intensiivsuse kasvuga tuumaümbruse lüsoosoomides vähenes sama kiiresti signaali intensiivsus neuriitide lüsoosoomides. Kui neuriitide lüsoosoomide signaal moodustab suurema osa kogu signaali intensiivsusest, siis see selgitaks Joonisel 2 kujutatud suurt intensiivsuse langust. Kontrollkatse rakkude tsütoplasmas uuritava 12 tunni jooksul detekteeritavat fluorestsentssignaali ei täheldatud.

3. Lüsoosomaalsete membraanide terviklikkus

Varasemates uuringutes on näidatud, et katepsiinid võivad tsütosoolis translokeerudes või katkestest lüsoosoomidest tsütosooli lekkides vallandada seal erinevad raku surma mehhanismid (Jäättelä & Tschopp, 2003). Et kindlaks teha, kas SKD indutseerib neuronites lüsoosomaalsete membraanide purunemist, mis omakorda võimaldab katepsiinide valgumist tsütosooli, kasutasime LysoTracker Red värvitesti. LysoTracker Red-ga täidetud lüsoosoomide purunemine muudaks prootongradienti teiselpool lüsoosoomimembraani ning värv valguks koheselt tsütosooli. Joonisel 4E on näidatud lüsoosoomi pärast protoionofooriga (karbonüülsüaniid p-trifluoro-metoksü-fenüül-hüdrasooniga) töötlemist, kus värv hakkas lüsoosoomidest lekkima loetud minutite jooksul. 2-12 tundi pärast SKD-i püüdsime leida mõnd märki lüsoosoomide lekkest enne detekteeritava neuronaaalse surma algust (*Joonis 4.*), kuid SKD katse rakkudes osutus LysoTracker Red signaal siiski tugevamaks, kui kontrollkatse rakkudes. Seda võib seletada nii lüsoosomaalse aktiivsuse suurenemise kui ka LysoTracker Red-i akumulatsiooniga lüsoosomaalsest pH-st. Ainult mõnedes neuronites, millel oli selgelt märgatav tuumakondensatsioon, kadus LysoTracker Red fluorestsentssignaal

lüsosoomidest kiiresti, mis viitas lüsosoomimembraanide purunemisele. Lüsosomaalse kompartmendi lekkimist ei täheldatud ka akridiin-oranži võrdluskatses.

4. Katepsiin L immunotsütokeemiline analüüs

SKD tingimustes testisime CGC rakkudes erinevate katseseeriatega katepsiin L ekspressiooni. Rakukultuurile lisasime monokloonseid antikehi, mis on võimelised seostuma roti katepsiin L-i, kuid mitta prokatepsiin L-i ega teiste katepsiinidega (Weber *et al.*, 1997). Katepsiin L immunoreaktiivsuse kvantitatiivne analüüs näitas, et morfoloogiliselt jagunevad rakud üldjoontes kaheks - normaalse morfoloogiaga intensiivselt värvunud rakud ning kokku tõmbunud, ebakorrapärase kujuga “kahvatud” rakud, mis iseloomustavad pigem surnud rakke (Joonis 5.). Kontrollrühma “kahvatute” rakkude fraktsiooni suurus oli 3%, SKD-i katse grupil 4 tunni pärast aga vastavalt 5%, 12 tunni pärast suurenes “kahvatute” rakkude fraktsiooni suurus juba ligi 20%-ni. Andmed viitavad sellele, et surevad või surnud rakud lihtsalt kaotasid oma katepsiin L immunoreaktiivsuse, seetõttu loobusime “kahvatute” rakkude fraktsiooni edasisest analüüsist. Elujõuliste neuronite populatsioonis tõusis võrreldes kontrollrühma rakkudega 4-tunnise SKD katsegrupi rakkudel katepsiin L immunoreaktiivsus 23%. 12-tunnise SKD katse korral tõusu ei täheldatud. (Joonis 5.D).

5. SKD katse neuronite ultrastruktuuranalüüs

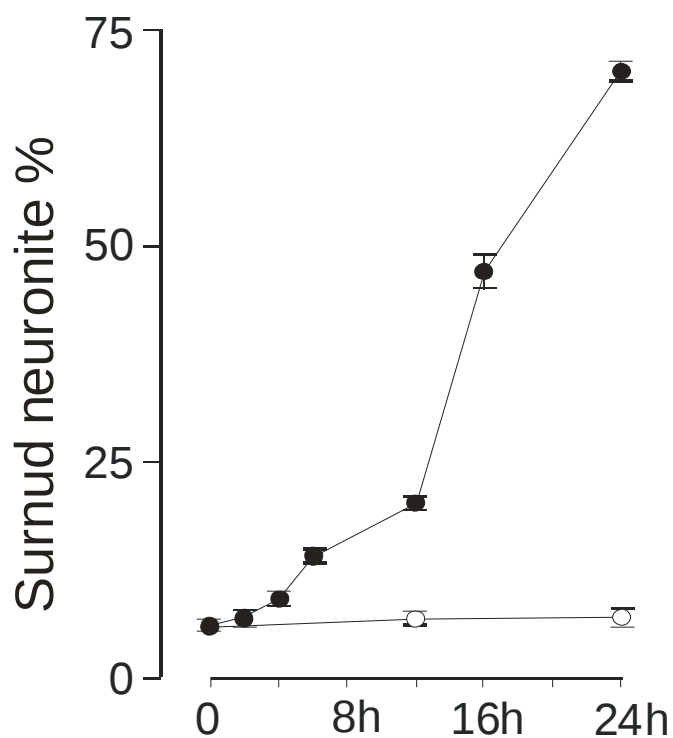
Kuna lüsosomaalsete ensüümide aktiveerumist on sageli seostatud autofaagia aktivatsiooniga, uurisime SKD katse neuronites autofagosoomide võimalikku esinemist. Kvantitatiivne elektronmikroskoopiline ultrastruktuuranalüüs näitas autofaagiliste vakuoolide arvu ja pindala suurenemist neuronites 12 tundi pärast SKD-i (Joonis 6., tähekesed). Autofaagiliste vakuoolide arv suurenes 3.9 korda ja pindala 2.5 korda võrreldes kontrollväärtustega (Tabel 2.).

6. Autofaagia-, kaspasi- ja katepsiiniinhibiitorite mõju SKD poolt indutseeritud neuronalse surma protsessile

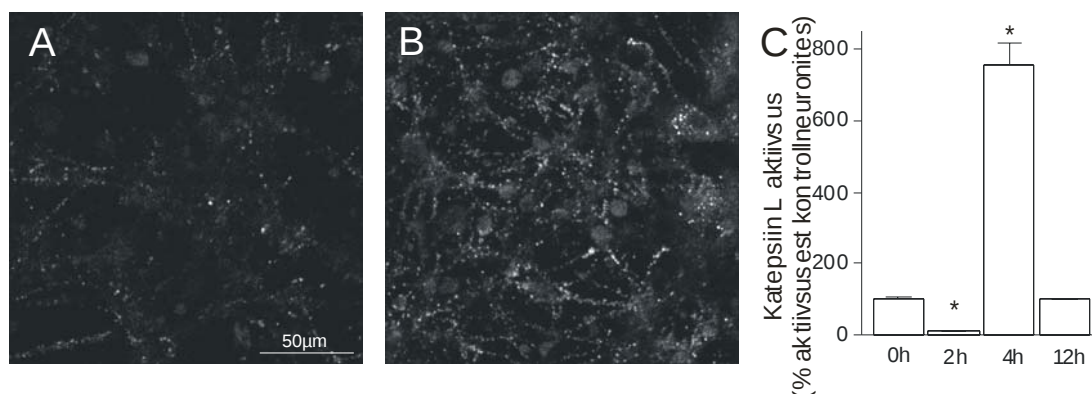
Kuna rakkude morfoloogilised uuringud tõid esile autofagosoomide olemasolu ja biokeemilised analüüsid kinnitasid lüso-somaalse katepsiin L aktiivsuse tõusu, püüdsime selgitada, kas autofaagiline aktivatsioon võiks soodustada neuronite surma SKD katses. Sellel eesmärgil testisime autofaagia inhibiitori 3-metüüladeniini (3-MA), mis inhibeerib autofaagiat sekvesteerimisfaasis, neuroprotektiivset toimet SKD tingimustes. Mikromolaarsetel kontsentratsioonidel ei ilmutanud 3-MA erilist neuroprotektiivset toimet, kuid 5 mM kontsentratsioonil oli märgatav 59% neuroproteksioon (*Joonis 7*). Sellist 3-MA protektiivset efekti ei saa põhjendada ainult apoptootilise rakusurma inhibeerimisega, kuna kaspas-3 inhibiitorit 100 μ M DEVD-fmk kasutades säästeti surmast vaid 31% neuronitest (*Joonis 7*). Testisime oma katsetes ka selektiivsete katepsiin L inhibiitorite efektiivsust, et supresseerida SKD poolt indutseeritud katepsiinisarnast aktiivsust. Maksimaalse aktivatsiooni saamiseks inkubeerisime SKD katsekultuuri rakke 4 tundi ning seejärel lisasime kultuurisöötmesse katepsiin L selektiivseid inhibiitoreid ALLM või FY-CHO-d ja inkubeerisime veel ühe tunni. Mõlema valitud inhibiitori töökonsentratsioonid ning võime nendel kontsentratsioonidel inhibeerida katepsiin L-i aktiivsust on näidatud *Joonisel 8.A*, kuigi aktiivsuse inhibeerimine on siiski vaid osaline. 100 μ M FY-CHO puhul oli näha 70% ja 100 μ M ALLM puhul 53% inhibitsiooni. Kuigi kontrollisime fluorestsentssignaali spetsiifilisust just katepsiin L-le, testisime võrdluseks ka katepsiin B spetsiifilise inhibiitori Ca-074Me toimet. Katepsiin L sarnase aktiivsuse muutust ei täheldatud peale 100 μ M katepsiin B spetsiifilise inhibiitori Ca-074Me kasutamist. FY-CHO ja ALLM olid samuti vaid osaliselt efektiivsed SKD poolt indutseeritud neuronalse surma korral. 50 μ M FY-CHO-ga inhibeeriti 49% ja 50 μ M ALLM-ga vastavalt 23% rakkude surma (*Joonis 8.B*). Need numbrid iseloomustavad ilmekalt inhibiitorite toimet katsekultuuri neuronpopulatsiooni rakkude katepsiin L aktiivsusele (*Joonis 8.A*): 50 μ M FY-CHO inhibeeris katepsiin L aktiivsust 60%, kuid 50 μ M ALLM 25% (ehkki viimasel polnud statistilist tähtsust). Kuna katepsiin L inhibiitorite kõrgemad kontsentratsioonid avaldasid katsekultuuri rakkudele toksilist mõju, siis selliseid kontsentratsioone järgnevates katsetes ei kasutatud. Kuigi

meie üheski katses katepsiin B inhibiitori Ca-074Me erinevate kontsentratsioonide kasutamisel neuroprotektiivset efekti rakkudel ei täheldanud, peaks siiski ära märkima, et kirjanduse andmetel Ca-074Me siiski lükkab neuronaalset surma edasi: 6 tundi pärast SKD algust oli toksilisus Ca-074Me-ga töödeldud katsegrupis madalam, kui inhibiitorita grupis. Testisime ka hüpoteesi, kas katepsiin L inhibiitorid kombineerituna kaspas-3 inhibiitoriga suurendavad katsekultuuri neuronite vastupidavust SKD-ile. Nagu jooniselt 9 näha säästis katepsiin L ühe inhibiitori 50 μ M FY-CHO ja kaspas-3 inhibiitori 50 μ M DEVD-fmk kooskasutamine surmast 79% SKD neuronitest (*Joonis 9A*). Protsent oli märgatavalt suurem kui siis, mil inhibiitoreid kasutasime eraldi. Kui kasutasime katses kombineerituna koos 50 μ M FY-CHO-d ja 5 mM 3-MA-d, sarnast efekti ei esinenud (*Joonis 9B*).

V JOONISED JA TABELID



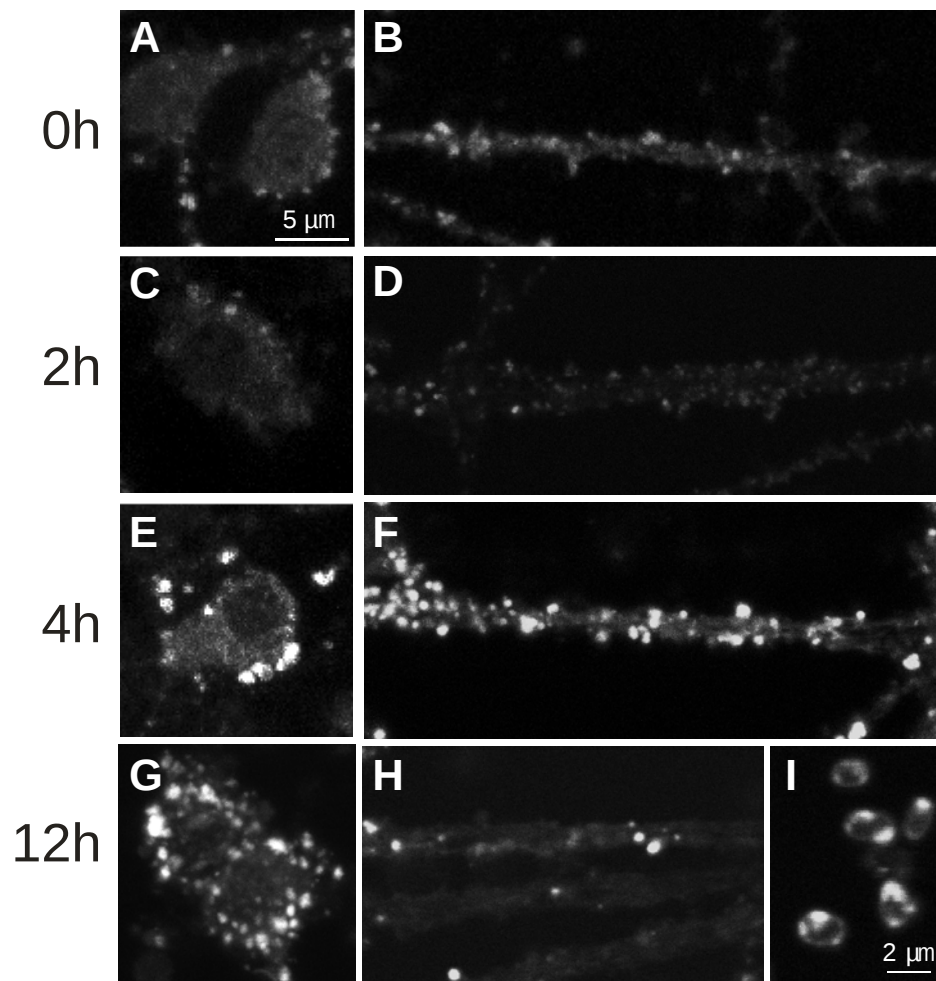
Joonis 1. SKD-iga indutseeritud väikeaju granulaarrakkude surevus *in vitro* katse erinevates ajapunktides. Täidetud ringid märgivad toksilisuse määra SKD katsekultuuris, tühjad kontrollkultuuris. Rakkude surma või elulemust hinnati trüpaansinise testiga ja katsetulemused märgivad vähemalt kolme tassi keskmist $\pm$ SEM iga andmepunkti kohta eraldi.



Joonis 2. Katepsin L aktiivsuse muutus väikeaju granulaarrakkude neuronites SKD katsele järgnevatel ajaetappidel. **A:** SKD katsekultuuri neuronitele on katse algul lisatud 10 μ M (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 ja inkubeeritud 60 min ning seejärel uuritud konfokaalmikroskoobi registreerimisseadmega emissiooni lainepikkusel 488/522nm kultuuritassi juhuslikult valitud katseväljas. **B:** Sama värvitest SKD katsekultuurist 4 tunni pärast. **C:** Fluorestsentsi keskmine intensiivsus (keskmine pikselite intensiivsus pildil) peegeldab katepsin L aktiivsuse muutust SKD katse erinevatel ajaetappidel. Andmed on saadud kolme eraldi katse keskmisena $\pm$ SEM.

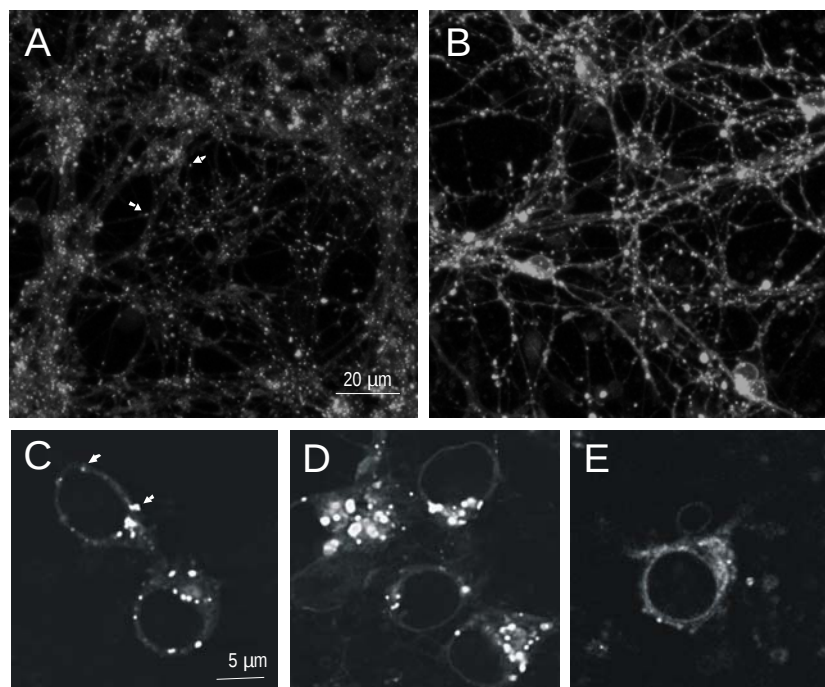
* $p < 0,05$ (ühefaktoriline ANOVA Bonferroni testiga).

176x54mm (pildi resolutsioon 150x150 DPI)



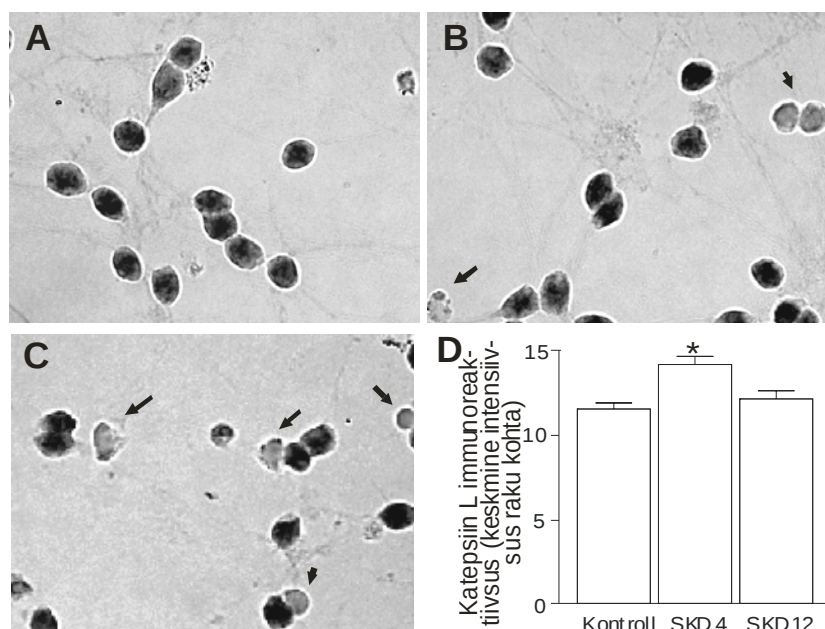
Joonis 3. Mikrofotodel on näidatud SKD katsekultuuri neuronite katepsiin L aktiivsuse lokalistsiooni tuumaümbrusesse (vasakpoolne kolonn: **A, C, E, G**) ja neuriitidesse (parempoolne kolonn: **B, D, F, H**) vastavalt 0 (kontroll), 2, 4, 12 tundi pärast katse algust. Paneelil **I** on kujutatud söötmekeskkonnas olevate vabade vakuoolide katepsiin L aktiivsust.

145x152mm (pildi resolutsioon 150x150 DPI)



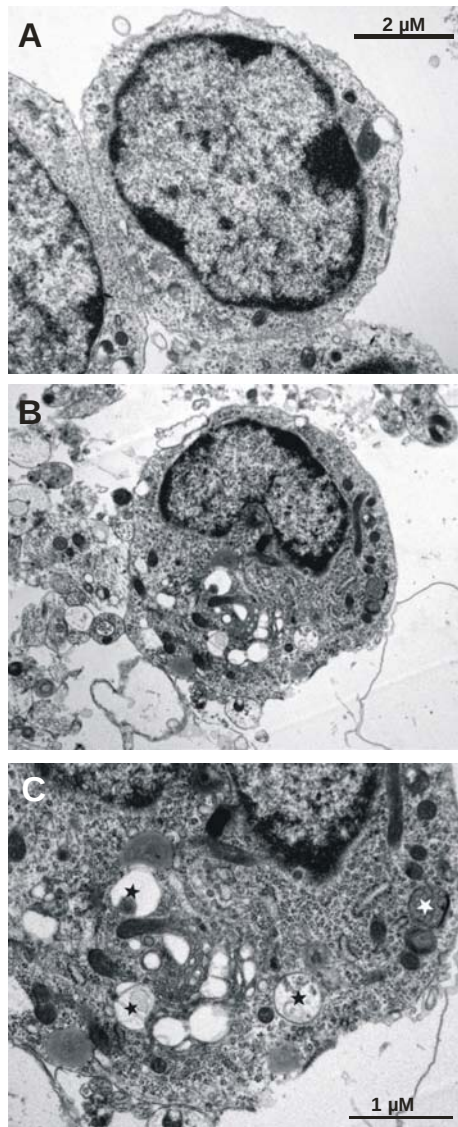
Joonis 4. Mikrofotodel on näidatud lüsoosoomimembraanide terviklikkust SKD katsekultuuri neuronitel 0 tunni möödumisel (**A**) ja 12 tunni möödumisel katse algusest (**B**), väikese (**A, B**) ja suure (**C, D, E**) suurenduse juures. SKD katsekultuuri rakkudele on lisatud markerit LysoTracker Red ja inkubeeritud 60 min ning seejärel on pilt visualiseeritud laser-konfokaal skaneeriva mikroskoobiga, vastavalt meetodites kirjeldatule. Paneelil **E** on kujutatud karbonüülsüaniid *p*-trifluoro-metoksü-fenüülhüdrasooniga (*carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*) töödeldud neuronite lüsoosoomidest vabanenud värvi liikumist läbi prootonionofoori. Mõned iseloomulikumat lüsoosoomid on fotodel märgitud noolekestega.

140x115mm (pildi resolutsioon 150 x 150 DPI).



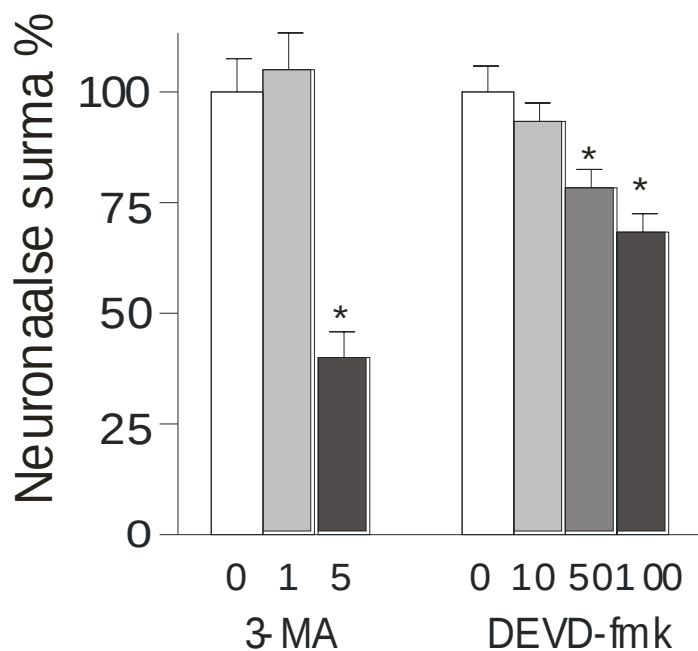
Joonis 5. Katepsiin L immunoreaktiivsus väikeaju granulaarrakkude kontrollkultuuris **(A)** ja SKD katsekultuuris 4 **(B)** ja 12 tunni **(C)** möödumisel katse algusest. Paneelil **D** kujutatud katepsiin L immunoreaktiivsuse kvantitatiivne analüüs näitab pikselite intensiivsuse keskmist ühe raku kohta (rakkude arv on n=100-110 kolmelt erinevalt rakutassilt). Andmed on antud keskmisena±SEM. Surnud rakud on näidatud noolekestega. *p<0.05

126x95mm (pildi resolutsioon 150x150 DPI)



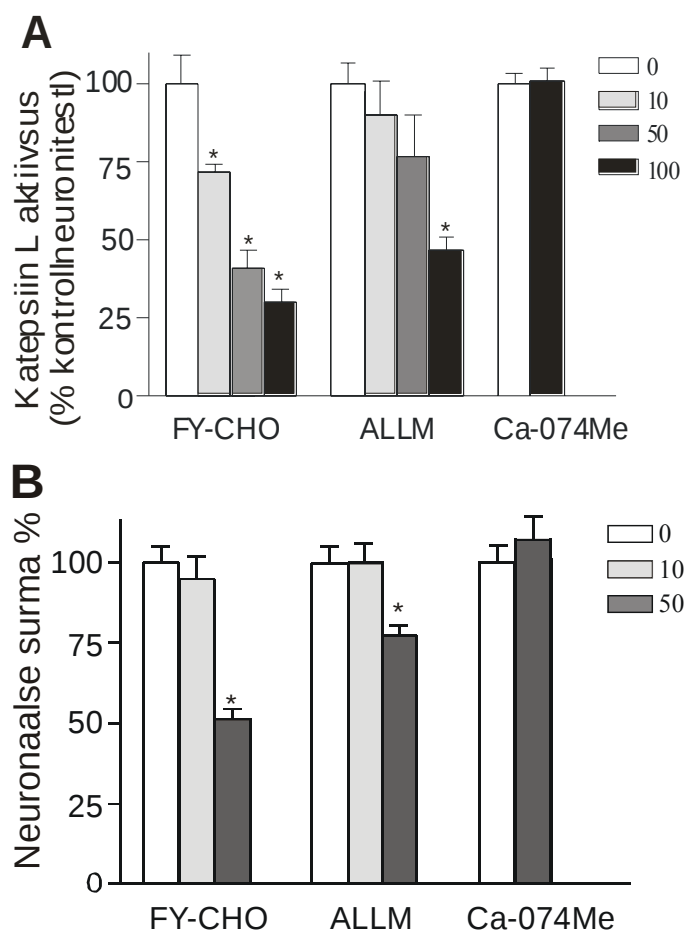
Joonis 6. Elektronmikroskoopiline pilt väikeaju granulaarrakkude kontrollkultuurist (**A**, suurendus 10 000x) ja SKD katsekultuurist 12 tunni möödumisel katse algusest (**B**, suurendus 10 000x ja **C**, suurendus 20 000x). Neuronite tsütoplasmas olevad autofaagilised vakuoolid on joonisel märgitud tähekestega.

101x247 mm (pildi resolutsioon 150x150 DPI).



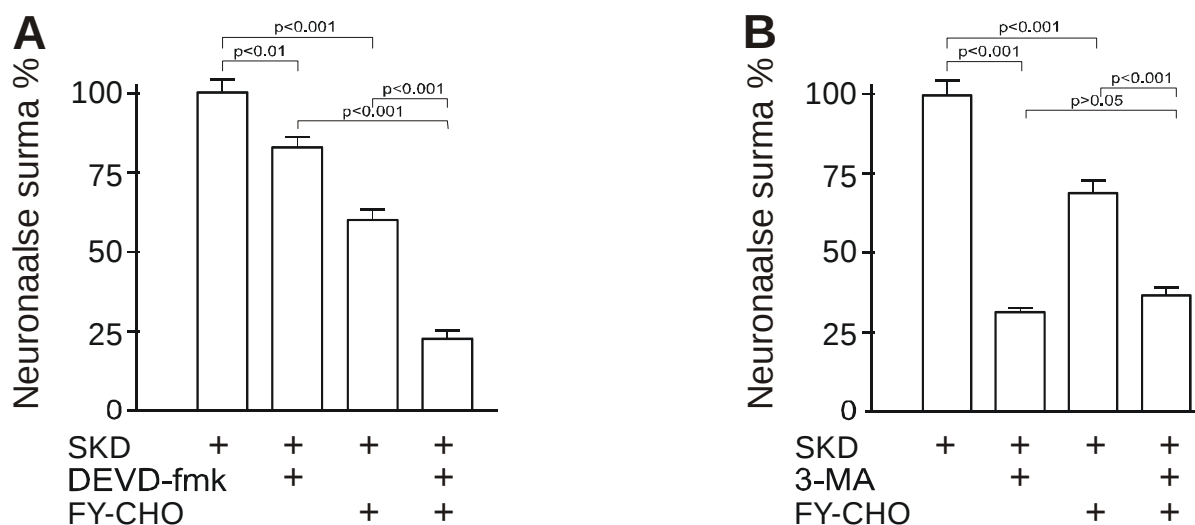
Joonis 7. Autofaagia inhibiitori 3-MA (1, 5mM) ja apoptoosi inhibiitori DEVD-fmk (10, 50, 100μM) mõju SKD katsekultuuri rakkudele. Mõlemad ained on lisatud kohe SKD-i katse alguses ja neuronite elulemuse hindamiseks tehti trüpaansinise test 12 tundi pärast katse algusest. Andmed on saadud vähemalt kolme tassi keskmisena±SEM iga kontsentratsioonipunkti kohta eraldi.

*p<0.05



Joonis 8. Katepsiin L aktiivsust ja neuronaalset elulemust mõjutavate katepsiini inhibiitorite toime. **A.** Katepsiin L aktiivsus SKD katsekultuuri neuronitel, millele on lisatud järgmisi katepsiin L inhibiitoreid: FY-CHO, ALLM (10, 50, 100 μ M) ja katepsiin B inhibiitorit Ca-074Me (100 μ M). Visualiseerimiseks on neuronitele lisatud 10 μ M markerit (CBZ-Phe-Arg)2-R110 ja inkubeeritud 60 minutit. Katepsiin L aktiivsust peegeldav keskmine fluorestsents on rehkendatud mõõtes konfokaalmikroskoobiga emissiooni lainepikkusel 488/522 nm. **B.** FY-CHO, ALLM (10, 50 μ M) ja Ca-074Me (50 μ M) mõju SKD katsekultuuri neuronitele. Ained lisati kohe SKD-i katse alguses ja 12 tunni möödudes määrati trüpaansisnise testiga rakkude elulemus kultuuris. Andmed on esitatud keskmisena $\pm$ SEM.

* $p < 0.05$



Joonis 9. Katepsiin L inhibiitori FY-CHO ja kaspaas-3 inhibiitori DEVD-fmk (**A**) või autofaagia inhibiitori 3-MA (**B**) aditiivne efekt SKD poolt põhjustatud neurotoksilisuse korral *in vitro*. SKD katsekultuuri neuronitele lisati 50 μ M katepsiin L inhibiitorit FY-CHO ja kas 50 μ M kaspaas-3 inhibiitorit DEVD-fmk või 5 mM autofaagia inhibiitorit 3-MA. Ained lisati kohe SKD-i katse alguses ja 12 tunni pärast määrati trüpaansinise testiga rakkude elulemus kultuuris. Andmed on esitatud keskmisena $\pm$ SEM. Statistilises analüüsis kasutati ühefaktorilist ANOVA Bonferroni testiga.

Tabel 2. Väikeaju granulaarrakkude kontrollkultuuri ja 12-tunnise SKD katsekultuuri elektronmikrofotode kvantifitseerimine. * $p < 0.0001$ (t-test)

	kontroll (n=124 rakku)	SKD (n=100 rakku)
autofaagiliste vakuoolide arv rakulõigu kohta	0.61 ± 0.07	$2.36 \pm 0.15^*$
autofaagiliste vakuoolide keskmine pindala rakulõigu kohta	4130 ± 570	$10470 \pm 830^*$
autofaagiliste vakuoolide fraktsiooni pindala tsütoplasmas	0.012 ± 0.002	$0.034 \pm 0.002^*$

VI ARUTELU

Meie uuringutulemused näitasid, et SKD on seotud lüsoomaalse katepsiin L-i transientse aktivatsiooniga, kusjuures aktiivsuse maksimum saavutati katsekultuuri neuronpopulatsiooni rakkudes ligikaudu 4-8 tundi pärast SKD. Katepsiin L inhibiitorid ALLM ja FY-CHO inhibeerisid meie katsetes katepsiin L aktiivsust ning säästsid 12 deprivatsioonitunni jooksul umbes pooled neuronid surmast, kuid samasuguse kontsentratsiooniga katepsiin B inhibiitoril Ca-074Me puudus SKD katses püsiv efekt. Siit võib järeldada, et katepsiin L on osaline SKD poolt põhjustatud neuronaalse surma mehhanismides, mida aga ei saa väita katepsiin B kohta. Lüsoomaalse katepsiin L-i aktiivsuse tõus ja sellele järgnev neuronaalne surm SKD katsekultuuris võivad olla seotud ulatusliku autofaagiaga. Seerum-kaaliumi puuduses olevatel neuronitel täheldati tsütosoolsete autofaagiliste vesiikulite arvu suurenemist, mis viitas autofaagilise aktiivsuse tõusule rakkudes. Autofaagia korral liituvad lüsoosoomid autofagosoomidega ning seeläbi suurenenud lüsoomaalse katepsiin L-i aktiivsuse tõus on omakorda vajalik autofaagia efektiivseks läbiviimiseks. Samaaegset autofaagia ja lüsoomaalse süsteemi aktivatsiooni võib leida mitmete teiste *in vitro* neuronaalse degeneratsiooni mudelite (Xue *et al.*, 1999; Kägedal *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002; Boland & Campbell, 2004) ja mitmete neurodegeneratiivsete haiguste korral (Larsen & Sulzer, 2002). SKD katsekultuuri neuronpopulatsiooni rakkude ultrastruktuuranalüüs kinnitas arvukate autofagosoomide olemasolu neuronites ning 3-MA katse tulemused kinnitasid autofaagia osalust SKD poolt indutseeritud neuronaalses surmamehhanismis. Varasemates töödes on märgitud, et 3-MA inhibeerib klass III fosfatidüülinoositol 3-kinaasi, mis teadaolevalt osaleb autofagosoomide moodustumisel sekvesteerimisfaasis (Petiot *et al.*, 2000). Meie katsetes ilmnes see 60%-lise neuroproteksioonina SKD poolt indutseeritud neuronaalse surma vastu. Kirjanduse andmetel võib katepsiin L-i aktivatsiooni tõus rakkudes aktiveerida nende apoptootilise surmaraja, siiski on sellist katepsiin L-i võimet indutseerida apoptoosi varasemates töödes näidatud mudeliga, kus lüsoosoomimembraanid olid purunenud ning katepsiin L oli translokeerunud tsütoplasmaatilisse kompartmenti (Boland & Campbell, 2004; Ishisaka *et al.*, 1999). Meil ei olnud meie kasutuses oleva aparatuuri ja meetoditega võimalik mõõta ühtki katepsiin L aktiivsusega seotud fluorestsenssignaali

otse tsütosoolist või teistest tsellulaarsetest kompartmentidest esimese 12 tunni jooksul pärast SKD. Samamoodi ebaõnnestus katse LysoTracker Red-iga demonstreerida lüsoosomimembraanide purunemist esimese 12 tunni jooksul pärast SKD-i. Need andmed räägivad katepsiin L-i tsütosooli translokatsiooni vastu. Siiski ei ole välistatud, et osa katepsiin L-ist võib dislotseeruda tsütosooli vahetult enne surmahetke, kuid seda polnud meil võimalik kasutatud meetoditega detekteerida. Meie katsete tulemused kinnitasid, et SKD mudelis on katepsiin L-iga seotud neuronaalne surmamehhanism rakkudes vähemalt osaliselt kaspaas-3 sõltumatu. Neuronite mõjutamine kas kaspaas-3 või katepsiin L inhibiitoriga eraldi, säästis surmast ainult 20-40% SKD katsemudeli neuronitest, kuid kui kasutasime nimetatud inhibiitoreid koos, säästisime surmast kuni 80% neuronitest. Samas ei suurendanud meie katsetes katepsiin L inhibiitor autofaagia inhibiitori 3-MA neuroprotektiivset toimet ning kahe erineva, kuid samaaegselt apoptoosi või autofaagia läbi sureva rakupopulatsiooni olemasolu on aga ebatõenäoline. Arvatavasti on väikeaju granulaarrakkude kultuuri neuronpopulatsiooni kõigis rakkudes olemas samaaegselt mõlemad rajad ning need mõjutavad üksteist vastastikku ja neid võidakse aktiveerida paralleelselt. See võiks seletada, miks ühe raja inhibeerimine kahest ei kindlusta katsekultuuri neuronpopulatsiooni rakkudele täielikku neuroproteksiooni, kuna teine rada võib jääda üleaktiveerituks. On lootustandev, et rakkude lüsoosomaal/autofaagiliste radade inhibeerimine koos apoptootiliste radadega võiks ka mitmete teiste neuronaalse surma mudelite korral, kus osalevad lüsoosomid, kindlustada täielikuma neuroproteksiooni. Siiski vajavad need hüpoteesid veel edasist uurimist.

Kokkuvõttes, kinnitasime oma töödega, et lüsoosomaalse katepsiin L-i aktivatsiooni tõus ja autofaagia suurenemine on peamisteks tunnusjoonteks SKD poolt indutseeritud roti väikeaju granulaarrakkude primaarkultuuri neuronaalses surmas. Meie katseandmete põhjal võib järeldada, et katepsiin L-i aktiivsuse ja/või autofaagia inhibeerimine säästavad neuroneid SKD poolt indutseeritud neuronaalsest surmast. Meie andmed näitasid kaspaas-3 ja katepsiin L inhibiitori positiivset koostoimet SKD korral. Seega võiks lüsoosomaal/autofaagilist neuronaalse surma rada käsitleda kui olulist uute neuroprotektiivsete toimainete väljaarendamise sihtmärki.

VII JÄRELDUSED

1. Seerum-kaaliumdeprivatsiooni korral meie katsetes eelnes väikeaju granulaarrakkude kultuuris rakkude surmale põgus intralüsoosomaalne katepsiin L-i aktiivsuse tõus ning me ei täheldanud katepsiin L lekkimist tsütosooli. Rakkude elektronmikroskoopiline ultrastruktuuranalüüs kinnitas arvukate vakuoolide ja autofagosoomide ilmumist SKD poolt kahjustatud neuronite tsütoplasmaatilistesse kompartmentidesse.

2. Kuna 3-MA kasutamisel SKD katses ilmnas 60% neuroproteksioon, siis kinnitasid meie katsetulemused autofaagia osalust SKD poolt indutseeritud neuronaaalse surma protsessis. Meie katsetes ei võimendanud katepsiin L-i inhibiitor FY-CHO autofaagia inhibiitori 3-MA neuroprotektiivset toimet. Samuti kinnitasid meie katsete tulemused, et katepsiin L-iga seotud neuronaalne surnamehhanism on SKD mudeli rakkudes vähemalt osaliselt kaspas-3 sõltumatu, kuid katepsiin L inhibiitori FY-CHO ja kaspas-3 inhibiitori DEVD-fmk kooskasutamisel avaldus nende märgatav neuroprotektiivne toime kahjustuse vastu.

3. Katepsiin L inhibiitorid ALLM ja FY-CHO koos ja üksikult inhibeerisid meie katsetes *in vitro* katepsiin L aktiivsust tagasihoidlikult, kuid katepsiin L inhibiitor FY-CHO kasutamine koos kaspas-3 inhibiitori DEVD-fmk-ga säästis surmast 12-tunni SKD kahjustuse korral 79% neuronitest.

KOKKUVÕTE

Seerum-kaaliumdeprivatsiooniga (SKD) roti väikeaju granulaarrakkude primaarkultuuris (CGC) indutseeritud neuronaalse surma mudelkatset kasutatakse laialdaselt nii neurodegeneratsiooni kui ka neuronaalse apoptoosi *in vitro* uurimiseks. 12-tunnine SKD põhjustas surma ligikaudu 20% rakupopulatsiooni neuronitest ja rakkude surmale eelnes põgus intralüsosomaalne katepsiin L-i aktiivsuse tõus. Säilus lüsosomaalsete membraanide terviklikkus ning ei täheldatud katepsiin L-lekkimist tsütosooli. Rakkude elektronmikroskoopiline ultrastruktuuranalüüs näitas arvukate vakuoolide ja autofagosoomide ilmumist SKD poolt kahjustatud neuronite tsütoplasmaatilistesse kompartmentidesse. Katepsiin L inhibiitorid ALLM ja FT-CHO ning autofaagia inhibiitor 3-MA koos ja üksikult inhibeerisid *in vitro* katepsiin L aktiivsust 12-tunni SKD katses tagasihoidlikult, kuid katepsiin L inhibiitori FY-CHO ja kaspas-3 inhibiitori DEVD-fmk kooskasutamine säästis surmast 79% neuronitest. Viimase uuringu tulemused lubavad järeldada, et autosomaallüsosomaalse kompartmenti aktiveerumine mängib tähtsat osas SKD poolt indutseeritud neuronaalses surmas väikeaju granulaarrakkude kultuuris.

SUMMARY

Serum and potassium deprivation-induced neuronal death on the primary culture of rat cerebellar granule neurons is being widely used as an *in vitro* model of neurodegeneration and neuronal apoptosis. In our experiments, serum and potassium deprivation for 12 hours induced neuronal death in approximately 20% of cerebellar granule neurons as demonstrated by Trypan Blue assay. Neuronal death was accompanied by a transient increase in the intralysosomal cathepsin L activity, which preceded neuronal death. During this time, the lysosomal membrane integrity remained preserved and no leakage of cathepsin L into the cytosol was seen. Ultrastructural analysis revealed the appearance of multiple vacuoles and autophagosomes in the cytoplasmic compartment of serum- and potassium-deprived granule neurons. Addition of selective cathepsin L inhibitors or of the autophagy inhibitor 3-methyladenine provided partial protection against serum and potassium deprivation-induced death. Our data also show that combining cathepsin L inhibitors and caspase-3 inhibitors leads to a synergistic neuroprotective effect against serum and potassium deprivation. The results of the current study suggest that activation of the autophagosomal-lysosomal compartment plays an important role in neuronal death induced by serum and potassium deprivation in the cultured cerebellar granule cells.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abeliovich, H., Dunn, W.A. Jr., Kim, J., & Klionsky, D.J. (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J. Cell Biol.*, **151**, 1025-1034.
- Agarraberes, F.A. & Dice, J.F. (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell Sci.*, **114**, 2491-2499.
- Altman, J. (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3 maturation of the components of the granule layer. *J. Comp.Neurol.*, **145**, 465- 513
- Amenta J.S., Hlivko T.J., McBee A.G., Shinozuka H. & Brocher S. (1978) Specific inhibition by NH₄Cl of autophagy-associated proteolysis in cultured fibroblasts. *Exp.Cell Res.*, **115**, 357-366.
- Anglade, P. *et al.* (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.*, **12**, 25-31.
- Assfalg-Machleidt, I., Rothe, G., Klingel, S., Banati, R., Mangel, W.F., Valet, G. & Machleidt, W. (1992) Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of cathepsin L. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*, **373**, 433-440.
- Balázs, R., Jorgensen, O.S. & Hack, N. (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*, **27**, 437-451.
- Ballard F.J., Knowles S.E., Wong S.S., Bodner J.B. & Wood J.M. (1980). Inhibition of protein breakdown in cultured cells is a consistent response to growth factors. *FEBS Lett.*, **114**, 209-212.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner J.F. Jr. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, UK.
- Berti, P.J. & Storer, A.C. (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.*, **246**, 273-283.
- Beugnet, A., Tee, A.R., Taylor, P.M., & Proud, C.G. (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling by intracellular amino acid availability. *Biochem. J.*, **372**, 555-566.
- Bever, C.T. Jr. & Garver, D.W. (1995) Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain. *J. Neuro.l Sc.*, **131**, 71-73.
- Bezvenyuk, Z., Suuronen, T., Salminen, A. & Solovyan, V. (2000) Protective effect of suramin against cell death in rat cerebellar granule neurons and mouse neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.*, **292**, 111-114.

- Blommaert E.F.C., Luiken J.J.F.P. & Mijer A.J. (1997) Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem. J.*, **29**, 365-385.
- Boland, B. & Campbell, V. (2004) A-mediated activation of the apoptotic cascade in cultured cortical neurones: a role for cathepsin L. *Neurobiol. Aging*, **25**, 83-91.
- Bursch, W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death. Differ.*, **8**, 569-581.
- Cataldo, A.M. & Nixon, R.A. (1990) Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **10**, 3861-3865.
- Chapman, H.A., Riese, R.J. & Shi, G.-P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63-88.
- Chauhan, S.S., Popescu, N.C., Ray, D., Fleischmann, R., Gottesman, M.M. & Troen, B.R. (1993) Cloning, genomic organisation and chromosomal localization of human cathepsin L. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1039-1045.
- Chopp, M., Vande, L.A., Chen, H., Knight, R., Helpert, J.A. & Welch, K.M. (1990) Chronic cerebral intracellular alkalosis following forebrain ischemic insult in rats. *Stroke*, **21**, 463-466.
- Clarke, P.G.H. (1990) Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, **181**, 195-213.
- Codogno P., Ogier-Denis E. & Houri J. (1997) Signal transduction pathways in macroautophagy. *Cell. Signal.*, **9**, 125-130.
- Corbett, D. & Nurse, S. (1998) The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog. Neurobiol.*, **54**, 531-548.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T. & Sulzer, D. (2004) Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.*, **305**, 1292-1295.
- Cunningham, T.J. (1982) Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neuronal pathways. *Int. Rev. Cytol.*, **74**, 163-186.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen *et al.* (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell*, **10**, 51-64.
- De Duve, C. & Wattiaux, R. (1996) Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.*, **28**, 435-492

- Delaria, K., Fiorentino, L., Wallace, L., Tamburini, P., Brownell, E. & Muller D. (1994) Inhibition of cathepsin L-like cysteine proteases by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 beta. *J. Biol. Chem.* **269**, 25172-25177.
- Dice J.F., Terlecky S.R., Chiang H.-L., Olson T.S., Isenman L.D., Short-Russell S.R., Freundlieb S. & Terlecky L.J. (1990) A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Sem. Cell. Biol.*, **1**, 449-455.
- DiFiglia, M. *et al.* (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, **277**, 1990-1993.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T. & Callisano, P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by lowering of extracellular potassium: inhibition of death by IGF-I and camp. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **90**, 10989-10993.
- Dunn, W.A. Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.*, **110**, 1923-1933.
- Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J.W. & Seglen, P.O. (1995) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp. Cell Res.*, **221**, 504-519.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S. & Orlandini, S.Z. (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.*, **182**, 41-49.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R. & Jorgensen, O.S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J.Neurosci.*, **7**, 2203-2213.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G. & Hajos, F. (1986) Amino acid neurotoxicity: relationship to neuronal depolarization in rat cerebellar slices. *Neuroscience* **18**, 449-460.
- Gomez-Santos, C., Santidrian, F.I., Barrachina, A.F., Gil, J. & Ambrosio, S. (2003) Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.*, **73**, 341-350.
- Gordon, P.B., Holen, I., Fosse, M., Rotnes, J.S. & Seglen, P.O. (1993) Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26107-26112.
- Gregoli, P.A. & Bondurant, M.C. (1999) Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell Physiol.* **178**, 133-143.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K. & Davies, K.J. (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and "aggresomes" during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2519-2530.

Guimarães, C.A. & Linden R. (2004) Programmed cell death, apoptosis and alternative deathstyles. *Eur.J.Biochem.*, **271**, 1638-1650.

Ishisaka, R., Utsumi, T., Kanno, T., Arita, K., Katunuma, N., Akiyama, J. & Utsumi, K. (1999) Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase 3. *Cell Struct. Funct.*, **24**, 465-470.

Ito, M. (1984a) Granule cells, in *The Cerebellum and Neural Control* (Ito, M. ed.), Raven, New York, pp. 74-85.

Ito, M. (1984b) Mossy fiber system, reticular and pontine nuclei, in *The Cerebellum and Neural Control* (Ito, M. ed.), Raven, New York, pp. 235-255.

Jäättelä, M. & Tschopp, J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.*, **4**, 416-423.

Kaasik, A., Kalda, A., Jaako, K. & Zharkovsky, A. (2001) Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neurosci.* **102**, 427-432.

Kamatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murato, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., *et al.* (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J.Cell Biol.* **169**, 425-434.

Katunuma, N. & Kominami, E. (1995) Structure, properties, mechanisms and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods. Enzymol.*, **251**, 382-397.

Kim, J., Huang, W.P., Stromhaug, P.E. & Klionsky, D.J. (2002) Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 763-773.

Klionsky, J.D. & Ohsumi Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 1-32.

Koliatsos, V. E. & Ratan, R. R. (1997) Cell Death and Diseases of the Nervous System. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp.3-28.

Kovacs A.L., Molnar K. & Seglen P.O. (1981) Inhibition of autophagic sequestration and endogenous protein degradation in isolated rat hepatocytes by methylated adenosine derivatives. *FEBS Lett.* **134**, 194-196.

Kruger, R. *et al.* (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, **18**, 106-108.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A. *et al.* (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**, 1032-1036.

- Kägedal, K., Zhao, M., Svensson, I. & Brunk, U. (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.*, **359**, 335-343.
- Larsen, K.E., Fon, E.A., Hastings, T.G., Edwards, R.H. & Sulzer, D. (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J. Neurosci.*, **22**, 8951-8960.
- Larsen, K.E. & Sulzer, D. (2002) Autophagy in neurons: a review. *Histol.Histopathol.*, **17**, 1-12.
- Lee, K.S., Frank, S., Vanderklish, P., Arai, A. & Lynch, G. (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 7233-7237.
- Lee, J.M., Zipfel, G.J & Choi, D.W. (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, **399** (6738 Suppl), A7-A14.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P. & Nishimura, Y. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 177-196.
- Levine, B. & Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.*, **115**, 2679-2688.
- Li, H. & Buncham, A.M. (1995) Delayed treatment with NBQX or SNX-111 following transient forebrain ischemia in rats. *Can.J. Neurol. Sci.*, **22**, S47.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. & Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, **402**, 672-676.
- Liberski, P.P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D.C. & Brown, P. (2004) Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2473-2490.
- Majeski, A.E. & Dice, J.F. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2435-2444.
- Maries, E., Dass, B., Collier, T.J., Kordower, J.H. & Steece-Collier, K. (2003) The role of alpha-synuclein in Parkinson's diseases: insights from animal models. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 727-738.
- Markgraf, C.G., Velayo, N.L., Johanson, M.P., McCarty, D.R., Medhi, S., Koehl, J.R., Chmielewski, P.A. & Linnik, M.D. (1998) Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, **29**, 152-158.
- Mehdi, S. (1991) Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends. Biochem. Sci.*, **16**, 150-153.

Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H. & Levine, B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*; **301**, 1387-1391.

MEROPS-the Protease Database <http://merops.sanger.ac.uk/>

Mesa, R., Salomon, C., Roggero, M., Stahl, P.D. & Mayorga, L.S. (2001) Rab22a affects the morphology and function of the endocytic pathway. *J. Cell Sci.*, **114**, 4041-4049.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., *et al.* (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, **152**, 657-667.

Mort, J.S., Recklies, A.D. & Poole, A.R. (1984) Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arth. Rheum.* **27**, 509-515.

Mortimore, G.E. & Poso, A.R. (1988) Amino acid control of intracellular protein degradation. *Methods Enzymol.*, **166**, 461-476.

Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T, Nikawa, T, & Katunuma, N. (1991) Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, *in vitro*. *FEBS Lett.*, **280**, 307-310.

Nixon, R.A. & Cataldo, A.M. (1993) The lysosomal system in neuronal cell death: a review. *Ann. NY Acad. Sci.*, **679**, 87-109.

Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., *et al.* (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.*, **148**, 465-480.

OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez>

Pennacchio, L.A., Bouley, D.M., Higgins, K.M., Scott, M.P., Noebels, J.L. & Myers R.M. (1998) Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat. Genet.* **20**, 251-258.

Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F.C., Meijers, A.J. & Codogno, P. (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signalling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 992-998.

Petiot, A., Pattingre, S., Arico, S., Meley, D., & Codogno, P. (2002) Diversity of signaling control of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.*, **27**, 431-441.

Pilar, G. & Landmesser, L. (1976) Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. *J. Cell Biol.*, **68**, 339-356.

Plomp, P.J., Gordon, P.B., Meijer, A.J., Hoyvik, H., & Seglen, P.O. (1989) Energy dependence of different steps in the autophagic-lysosomal pathway. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6699-6704.

Polymeropoulos, M.H. *et al.* (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.*, **276**, 2045-2047.

Qin, Z.H., Wang, Y., Kegel, K.B., Kazantsev, A., Apostol, B.L., Thompson, L.M., *et al.* (2003) Autophagy regulates processing amino terminus huntingtin fragments. *Hum. Mol. Gen.*, **12**, 3231-3244.

Qin, Z.H., Wang, Y. & Gu, Z.L. (2005) Development of novel therapies for Huntington's disease: hope and challenge. *Acta Pharmacol. Sin.*, **26**, 129-142.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112**, 1809-1820.

Ravikumar, B., Duden, R. & Rubinsztein, D.C. (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1107-1117.

Ravikumar, B. *et al.* (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.*, **36**, 585-595.

Seglen, P.O. & Gordon, P.B. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 1889-1892.

Seglen P.O., Gordon P.B. & Holen I. (1990) Non-selective autophagy. *Sem. Cell Biol.*, **1**, 441-448.

Shintani, T. & Klionsky, D.J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. **306**, 990-995.

Sloviter, R. S., Dean, E., Sollas, A. L. & Goodman, J. H. (1996) Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **366**, 516-533.

Suminami, Y., Kishi, F., Sekiguchi, K., & Kato, H. (1991) Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 51-58.

Talloczy, Z. *et al.* (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 190-195.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., *et al.* (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in Lamp-2-deficient mice. *Nature*, **406**, 902-906.

Tassa, A., Roux, M.P., Attaix, D. & Bechet, D.M. (2003) Class III phosphoinositide 3-kinase-Becn1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem. J.* **376**, 577-586.

Towatari, T., Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K. & Katunuma, N. (1991) Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, *in vivo*. *FEBS Lett.*, **280**, 311-315.

Tsuchiya, K., Kohda, Y., Yoshida, M., Zhao, L., Ueno, T., Yamashita, J., Yoshioka, T. Kominam, E. & Yamashita T. (1999) Postictal blockade of ischemic hippocampal neuronal death in primates using selective cathepsin inhibitors. *Exp. Neurol.*, **155**, 187-194.

Turk, B., Turk, D. & Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 98-111.

Turk, B., Dolenc, I., Leneric, B., Krizaj, I., Turk, V., Bieth, J. G & Bjork I. (1999) Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur. J. Biochem.*, **259**, 926-932.

Uchiyama, U. (2001) Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.*, **64**, 233-246.

Vancompernelle, K., Van Herreweghe, F., Pynaert, G. *et al.* (1997) Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* **438**, 150-158.

Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. & Goldberg, A.L. (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol. Cell.*, **14**, 95-104.

Wang, Y., Gu, Z.L., Cao, Y., Liang, Z.Q., Rong, H., Bennett, M.C., *et al.* (2005) Lysosomal enzyme cathepsin B is involved in kainic acid-induced excitotoxicity in rat striatum. *Brain. Res.*, **1039**, 203-206.

Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N. & Rubinstein, D.C. (2003) Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 25009-25013.

Weber, E., Bahn, H & Gunther, D. (1997) Monoclonal antibodies against cathepsin L and procathepsin L of different species. *Hybridoma.*, **16**, 159-166.

White E. (1996) Life, death and pursuit of apoptosis. *Gen. Develop.* **10**, 1-15.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.

Xue, L., Fletcher, G.C. & Tolkovsky, A.M. (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons. An alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell Neurosci.*, **14**, 180-198.

Yamamoto, A., Masaki, R. & Tashiro, Y. (1990) Characterization of the isolation membranes and the limiting membranes of autophagosomes in rat hepatocytes by lectin cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 573-580.

Yamashima, T., Saido, T.C., Takita, M., Miyazawa, A. *et al* (1996) Transient brain ischaemia provokes Ca²⁺, PIP₂ and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 1932-1944.

Yamashima, T., Kohda, Y., Tsuchiya, K., Ueno, T., Yamashita, J., Yoshioka, T. & Kominami, E. (1998) Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 1723-1733.

Yan, G.-M., Ni, B., Weller, M., Wood, K.A. & Paul, S.M. (1994) Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **656**, 43-51.

Yan, G.-M. & Paul, S.M. (1997) Cultured cerebellar granule neurons as a model of neuronal apoptosis. In Poirier, J. (ed), *Apoptosis Techniques and Protocols, Neuromethods 29*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 47-66.

Yang, Y., Liang, Z., Gu, Z. & Qin, Z. (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, **26**, 1421-1434.

Yoshimori, T. (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 453-458.

Yu, W.H. *et al.* (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2531-2540.

Yue, Z. *et al.* (2002) A novel protein complex linking the $\alpha 2$ glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*. **35**, 921-933.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. & Heintz, N. (2003) Beclin 1 an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15077-15082.

Zhou, Q. & Salvesen, G.S. (1997) Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a noncanonical specificity. *Biochem. J.* **324**, 361-364.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid prof. dr.med. Aleksander Zarkovskit ja dr.med. Allen Kaasikut, tänu kelle juhendamisele antud töö teoks sai.

Samuti soovin tänada dr.med. Anti Kaldat abi ja nõuannete eest CGC-katsekultuuridega töötamisel, dots. dr.med. Tamara Zarkovskajat immunohistokeemilise analüüsi ning dr.med. Andres Piirsood rakupreparaatide elektronmikroskoopilise analüüsi teostamise eest.

Minu eriti suured tänusõnad kuuluvad rakukultuuride valmistajale Ulla Petersonile ja Oili Suvile ning suured tänusõnad kõikidele teistele toredatele kolleegidele Tartu Ülikooli Farmakoloogia Instituudist.

Käesoleva töö aluseks olevad uuringud on läbi viidud Tartu Ülikooli Farmakoloogia Instituudis aastatel 2001-2004 ning uurimistöö tegemist on toetanud Eesti Teadusfondi grantid 5326, 6504 (Aleksander Zarkovski.), 5219, 6227 (Allen Kaasik), 5499 (Andres Piirsoo) ning Eesti Teadus- ja Haridusministeeriumi ja Euroopa Ühenduse 5 RP (QLG3-CT-2000-01405).

Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium

Allen Kaasik,¹ Tiina Rikk,¹ Andres Piirsoo,² Tamara Zharkovsky¹ and Alexander Zharkovsky¹

¹Department of Pharmacology, Centre of Excellence for Molecular and Clinical Medicine, University of Tartu, Ravila 19, 51014 Tartu, Estonia

²Department of General and Molecular Pathology, Centre of Excellence for Molecular and Clinical Medicine, University of Tartu, Ravila 19, 51014 Tartu, Estonia

Keywords: apoptosis, cerebellar granule cells, rat, serum and potassium deprivation

Abstract

Serum and potassium deprivation-induced neuronal death on the primary culture of rat cerebellar granule neurons is being widely used as an *in vitro* model of neurodegeneration and neuronal apoptosis. In our experiments, serum and potassium deprivation for 12 h induced neuronal death in $\approx 20\%$ of cerebellar granule neurons as demonstrated by Trypan Blue assay. Neuronal death was accompanied by a transient increase in the intralysosomal cathepsin L activity, which preceded neuronal death. During this time, the lysosomal membrane integrity remained preserved and no leakage of cathepsin L into the cytosol was seen. Ultrastructural analysis revealed the appearance of multiple vacuoles and autophagosomes in the cytoplasmic compartment of serum- and potassium-deprived granule neurons. Addition of selective cathepsin L inhibitors or of the autophagy inhibitor 3-methyladenine provided partial protection against serum and potassium deprivation-induced death. Our data also show that combining cathepsin L inhibitors and caspase-3 inhibitors leads to a synergistic neuroprotective effect against serum and potassium deprivation. The results of the current study suggest that activation of the autophagosomal–lysosomal compartment plays an important role in neuronal death induced by serum and potassium deprivation in cultured cerebellar granule cells.

Introduction

Cerebellar granule cells, the most abundant neuronal type in the mammalian brain, have been widely used in culture-based studies of the mechanisms of neuronal death (Yan & Paul, 1997). The survival of the cerebellar granule cells *in vitro* is dependent on the presence of trophic factors and depolarizing conditions provided by the conditioned serum and high potassium concentrations. Removal of serum and potassium (serum and potassium deprivation; SPD) from the culture medium results in delayed neuronal death with the features of neuronal apoptosis such as nuclear condensation and DNA fragmentation as well as activation of caspase-3 (D'Mello *et al.*, 1993; Miller & Johnson, 1996; Yan & Paul, 1997; Marks *et al.*, 1998; Villalba, 1998). Other studies suggest, however, that SPD also leads to activation of caspase-3-independent death pathways. Indeed, caspase-3 inhibitors demonstrate only partial protection in this model of neuronal death (D'Mello *et al.*, 1998).

In the last decade, accumulating evidence suggests that programmed cell death is not confined to apoptosis but that cells use different pathways for active self-destruction. Characterizing several examples of physiological cell death, Clarke (1990) suggested that programmed cell death might involve classical apoptotic death, which is caspase-dependent (Type 1) and apoptotic-like or autophagic death (Type 2), which recruits lysosomal proteases in the execution of death. Autophagy

is a process that results in the degradation of cytosolic components inside lysosomes (Cuervo, 2004). It involves the formation of double-membrane structures, called autophagosomes or autophagic vacuoles, which fuse with the primary lysosomes where their contents are degraded. Autophagic activity is induced by nutrient starvation and seems to be crucial for cell adaptation and survival under extreme conditions (for review see Cuervo, 2004). Once a certain level of intracellular damage is reached, autophagy might become an effective trigger of the neuronal death (Bursch, 2001). Recent studies have demonstrated that many neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Huntington's disease are accompanied by autophagy (for review see Larsen & Sulzer, 2002). An excessive autophagy has also been demonstrated in *in vitro* models of neurotoxicity such as dopamine-induced death in human neuroblastoma cells (Gomez-Santos *et al.*, 2003), nerve growth factor deprivation-induced death in cultured sympathetic neurons (Xue *et al.*, 1999) and methamphetamine-induced degeneration of cultured midbrain dopaminergic neurons (Larsen *et al.*, 2002). Recent studies have demonstrated an abundant overlap between apoptotic and autophagic cell death and suggest that forms of death have common aspects and might precede each other or even coexist in the same cell (Lemasters *et al.*, 1998; Bursch, 2001; Shimizu *et al.*, 2004; Canu *et al.*, 2005; Lum *et al.*, 2005).

In some models of neurodegeneration, activation of autophagy and apoptosis were accompanied by an increase in the activity of lysosomal cathepsins (Cataldo & Nixon, 1990; Bever & Garver, 1995; Uchiyama, 2001; Boland & Campbell, 2004), suggesting the involvement of lysosomal hydrolases in the death pathways.

Correspondence: Dr Alexander Zharkovsky, as above.
E-mail: alex@ut.ee

Received 2 June 2004, revised 25 May 2005, accepted 16 June 2005

In the present study, we provide evidence that SPD induces activation of lysosomal cathepsin L and abundant autophagy, which participate in the execution of neuronal death in this model of neurodegeneration.

Materials and methods

Cerebellar granule cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule cells were prepared according to the method described previously (Gallo *et al.*, 1982) with minor modifications. Wistar rats were obtained from Scanbur (Denmark) and maintained and bred in the local animal facility (12-h light : 12-h dark cycles, temperature 22 °C and humidity 45–55%). Eight-day-old Wistar rats were decapitated and cerebelli were dissected from the brains. Experiments conformed to local (Animal Protection Act 01.07. 2001) and international legislation (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes; Council of Europe, European Treaties ETS no. 123, Strasbourg, 18.03. 1986) guidelines on the ethical use of animals, and all efforts were made to minimize the number of animals used.

Cells were dissociated by mild trypsinization (0.025% trypsin) at 35 °C for 15 min, followed by trituration in a 0.004% DNase solution containing 0.05% soybean trypsin inhibitor. The cells were re-suspended in basal Eagle's medium with Earle's salts containing 10% foetal bovine serum, 25 mM KCl, 2 mM glutamine and 100 ng/mL gentamicin. The cell suspension was seeded in 35-mm dishes for toxicity experiments or in 8-well Laboratory-Tek™ II Chambered Coverglass (Nunc, Denmark) for fluorescence imaging, both precoated with 10 µg/mL of poly L-lysine (Sigma, USA). The cells were grown in a basal minimal Eagle's medium containing 25 mM KCl and 10% (v/v) fetal calf serum (Gibco-Invitrogen, Denmark) at a density of $1.3\text{--}1.4 \times 10^6$ cells/mL for 7 days in a humidified 5% CO₂–95% air atmosphere at 37 °C. The day after plating, 10 mM cytosine arabinoside was added to the cultures to prevent the proliferation of non-neuronal cells. For SPD, the medium was replaced with fresh basal minimal Eagle's medium with 5.3 mM KCl without serum. At 2, 4, 8 and 12 h following SPD the cells were assessed for cathepsin L activity and the occurrence of neuronal death. All drugs were added to the culture medium at the beginning of SPD.

Visualization of lysosomes

LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, USA) is a weak basic amine freely permeant to cell membranes that selectively accumulates in cellular compartments with low internal pH. The cells were exposed to SPD and at various times following deprivation the cells were treated with 50 nM LysoTracker Red for 60 min at 37 °C and then examined by confocal microscopy at excitation and emission wavelengths of 568 and 605 nm, respectively. Parallel measurements were made from acridine orange accumulating in acidic cellular compartments, and also staining nuclei. Neurons were treated with 5 µg/mL dye for 10 min at 37 °C then rinsed in a complete culture medium and, 10 min later, were examined with confocal microscopy at excitation and emission wavelengths of 488 and 585 nm.

Determination of cathepsin L activity by (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 staining

Lysosomal cathepsin L activity was measured *in situ* using the dipeptidyl rhodamine diamide substrate (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 (Molecular Probes). This nonfluorescent substrate penetrates lysosomal

membrane where it becomes cleaved by active cathepsin L and cleavage products emit a green fluorescent signal. The substrate is 800-fold more selective for cathepsin L than for cathepsin B, thus allowing a relatively selective detection of cathepsin L activity in the presence of high activity of cathepsin B (Assfalg-Machleidt *et al.*, 1992). Neurons were exposed to 10 µM of (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 for 60 min, rinsed in PBS and examined via confocal laser scanning microscopy on excitation at 488 nm. Emission, at 522 nm from randomly chosen fields (×200 magnification), was recorded and the mean pixel intensity was calculated using LaserSharp 2000 V4 software.

Immunohistochemical detection of cathepsin L

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 20 min at room temperature and washed twice with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS); 0.1% Triton X-100 in PBS was added for 10 min to permeabilize cells. Cells were incubated with mouse monoclonal antibodies recognizing rat cathepsin L (Alexis Corporation, Switzerland; 1 : 250 dilution) for 30 min followed by incubation with biotinylated secondary antimouse IgG (1 : 100 dilution) for 1 h, and were visualized with the streptavidin–biotin peroxidase method (ABC system and diaminobenzidine as chromogen; Vector Laboratories, UK). All antibodies were diluted in PBS containing 3% goat serum, 0.25% Triton X-100 and 0.5% Tween-20. The expression of cathepsin L was evaluated microscopically. The level of cathepsin L expression was determined as average pixel intensity in a single cell using MicroImage 1.0 software (Olympus, Japan).

Assays for neuronal death

The neuronal death was quantitatively assessed using the Trypan Blue exclusion method. For the Trypan Blue assay, the cultures were washed with PBS (145 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.42 mM Na₂HPO₄, 2.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4), and then incubated with a 0.4% Trypan Blue solution at room temperature for 10 min. At the end of incubation the cells were washed twice with PBS. In some experiments neuronal death was also assayed using the TUNEL method as described earlier (Kaasik *et al.*, 2001) using an ApopTag Plus peroxidase kit (Chemicon International, UK). Briefly, fixed and permeabilized cells were incubated at 37 °C for 60 min in a mixture containing 40 µM biotin–16-dUTP, 0.5 U/µL terminal deoxynucleotidyl transferase, 25 mM Tris HCl, 200 mM sodium cacodylate pH 6.6 and 2.5 mM cobalt chloride. The biotinylated DNA was linked to extravidin–alkaline phosphatase conjugate and visualized with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt and nitro blue tetrazolium chloride colour reaction. The cells, with DNA fragmentation, were identified morphologically by the presence of condensed dark blue nuclei.

Trypan Blue- or TUNEL-stained culture dishes were mounted on the motorized microscope stage (BX51 with 20× lenses; Olympus) connected with a video camera and five to eight random fields (305 × 232 µm), each containing 100–200 neurons, were acquired and stored in the computer (final magnification of images was 930×). The images were later analysed by blind observer, using the CAST program (Olympus, Denmark). The number of Trypan Blue- or TUNEL-positive cells and total number of cells were counted in eight randomly chosen fields in each dish (1000–1500 cells per dish). At least three dishes were used for each data point and experiments were performed twice.

The following drugs were tested against neuronal death induced by SPD: cathepsin L inhibitors N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenyl-alanyl-L-tyrosinal (FY-CHO; Merck/Calbiochem, Germany)

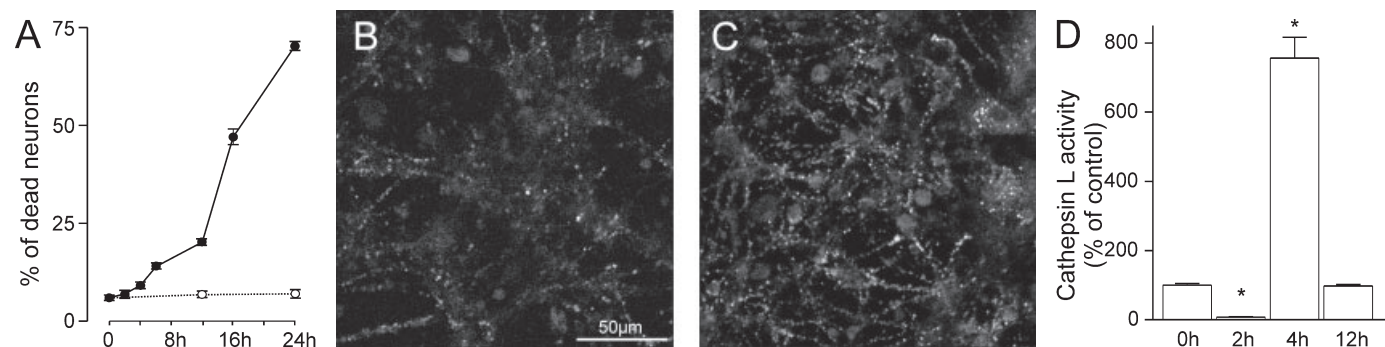


FIG. 1. Time course of neuronal death and cathepsin L activity in SPD-treated cerebellar granule neurons. (A) ●, toxicity in SPD-treated cultures; ○, untreated, control cultures. Cell death or survival was measured using the Trypan Blue assay. The data are mean $\pm$ SEM and at least three dishes per data point were used in each experiment. (B) Neurons were treated with 10 μ M of (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 for 60 min and examined with confocal microscopy at excitation and emission wavelengths of 488 and 522 nm. (C) Culture after 4 h of SPD. (D) Mean intensity of fluorescence (mean pixel intensity) reflecting the cathepsin L activity at various times following SPD. The data are mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * P < 0.05 (one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

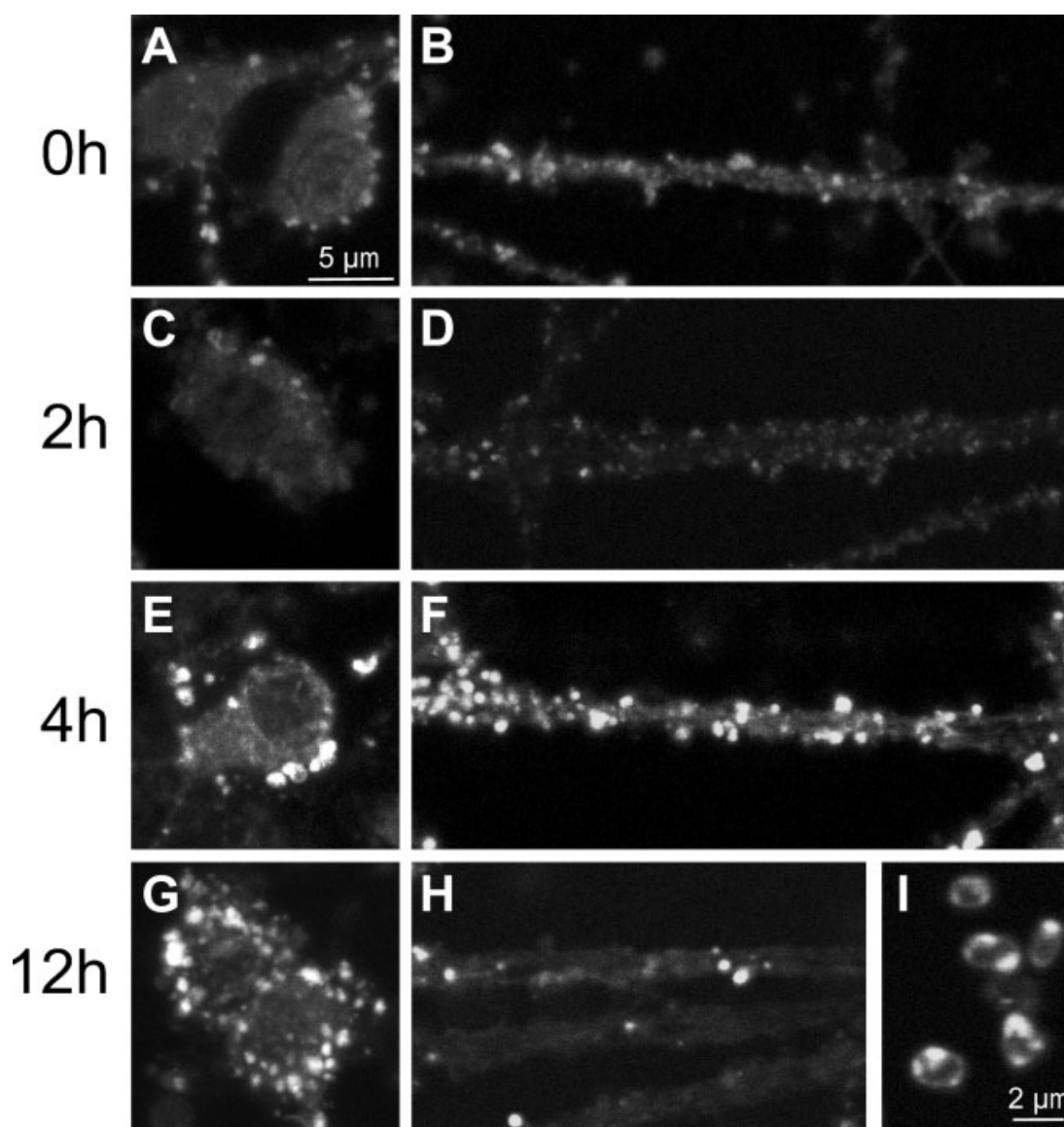


FIG. 2. Representative microphotographs of the localization of cathepsin L activity in (left column: A, C, E and G) perikarya and (right column: B, D, F and H) neurites of neurons exposed to SPD for 0 (control), 2, 4 and 12 h of SPD. (I) Multiple freely floating vacuoles with retained cathepsin L activity found in the medium. The experiments were repeated two to four times with similar results.

and N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methionine (ALLM; Tokris, UK) and the cathepsin B inhibitor *L-trans*-Epoxy succinyl-Ile-Pro-OMe propylamide (CA-074Me; Peptides International, USA), the irreversible caspase-3 inhibitor DEVD-fmk (Merck-Calbiochem, Germany) and the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA; Sigma, USA).

Electron microscopy

Cultures were fixed for 1 h at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde in a cacodylate buffer (pH 7.4). Fixed cells were then scraped off and centrifuged at 300 *g* for 5 min. After washing the pellet in buffer, cells were postfixed in 2% osmium tetroxide for 1 h. The samples were dehydrated in graded alcohol and embedded in Epon 812. The ultra-thin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and studied under transmission electron microscopy using a Tecnai 10 (FEI Co., Eindhoven, the Netherlands). For quantitative analysis, randomly photographed cells, at a magnification of 10 000 $\times$ and 20 000 $\times$, were analysed using Adobe Photoshop; electron-dense vacuoles, containing a heterogeneous material, were identified as autophagosomes. These vacuoles were further examined at higher magnification (32 000 $\times$).

Statistics

Data were analysed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test. In all instances, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Neuronal death in cerebellar granule cells following SPD

Rat cerebellar granule neurons were cultured for 7 days in a depolarizing concentration of potassium (25 mM) in the presence of serum. Simultaneous lowering of potassium concentrations to 5 mM and removal of serum (e.g. SPD) led to a loss of neuronal viability. The first signs of neuronal death were observed after 4 h of deprivation, following which there was a progressive increase in the number of dead neurons (Fig. 1A). At 12 h of deprivation 20% of neurons were Trypan Blue-positive whereas at 24 h 70% of cells had died. The TUNEL assay, which detects cells with internucleosomal DNA fragmentation (hallmark of apoptosis), showed that at 12 h of SPD 47% of dead neurons had nuclear features of apoptosis.

Cathepsin L activity in SPD neurons

Our next task was to find out whether SPD-induced neuronal death is accompanied by cathepsin L activation. Cathepsin L activity, in intact neurons, was measured using the dipeptidyl rhodamine diamide substrate (CBZ-Phe-Arg)₂-R110. The activity of cathepsin L is reflected by the mean pixel intensity of green fluorescence. Control cultures demonstrated a very low activity of cathepsin L, as was demonstrated by the low intensity of green fluorescence (Fig. 1B). SPD induced bi-directional changes in the activity of cathepsin L: a small but significant decrease at 2 h of SPD was followed by a

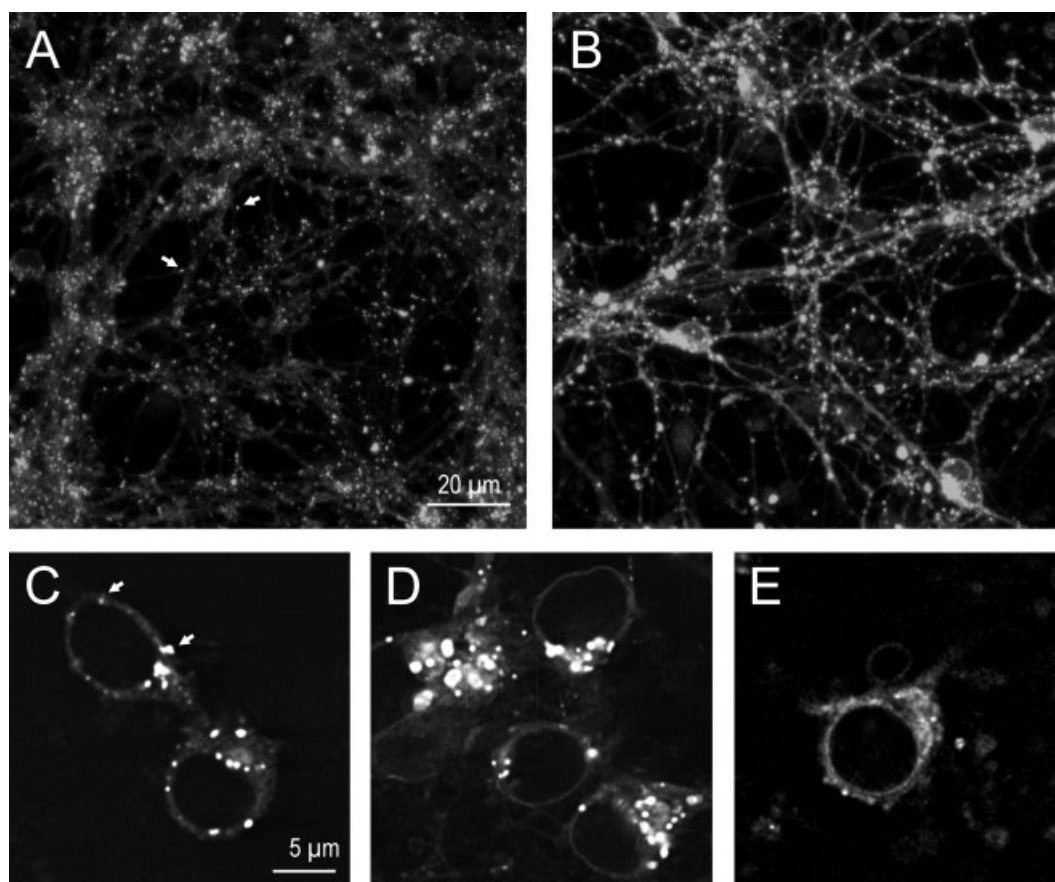


FIG. 3. Representative microphotographs demonstrating lysosomal membrane integrity in (A and C) control neurons and in (B and D) neurons exposed to SPD for 12 h at (A and B) low and (C and D) high magnification. The cells were exposed to SPD and treated with LysoTracker Red for 60 min and visualized using confocal laser scanning microscopy, as given in Materials and Methods. (E) Leakage of dye from lysosomes in neurons treated with a protonophore, carbonylcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone. Some representative lysosomes are marked with arrows. Experiments were repeated three times with similar results.

significant increase in cathepsin L activity. This initial decrease is not fully understood and could also be explained by slower accumulation of the probe into the lysosomal compartment under SPD conditions. An increased activity of cathepsin L was observed at 4–8 h following SPD (Fig. 1C) while at 12 h of deprivation the activity cathepsin L had declined to control levels (Fig. 1D).

In order to obtain more information about subcellular localization of cathepsin L-related activity, the neurons, from control and SPD cultures, were also examined at higher magnification. Figure 2 shows that a (CBZ-Phe-Arg)₂-R110-derived increased fluorescence signal was found in lysosomes located in both neurites and perikarya and that the signal was increased considerably in both regions after 4 h. At 12 h of SPD, part of the the cathepsin L activity had translocated from neurites to perikarya: no signal was any longer observed in neurites while the signal in perikarya increased considerably. The disappearance of the cathepsin L activity from neurites at the 12-h time point might be related to the neurite degeneration, whilst neuronal cell bodies remain intact at this time point. At the 12-h time point multiple vesicles with fluorescent signal were found in the medium and probably represent lysosomes released from ruptured neurites (Fig. 2, panel I). However, as neurites are responsible for most of the signal this explains the decreased total intensity demonstrated in Fig. 1. No reliable signal could be seen outside lysosomes at any time point during 12 h of SPD.

Lysosomal membrane integrity

Previous studies have demonstrated that active cathepsins could translocate or leak from ruptured lysosomes into the cytosol and

initiate there the cellular death program (Jäättelä & Tschopp, 2003). To determine whether SPD induces damage of lysosomal membranes, leading to leakage of cathepsins into the cytosol, we applied a LysoTracker Red uptake test. Rupture of LysoTracker Red-loaded lysosomes should abolish the proton gradient across the lysosomal membrane and lead to immediate release of dye. Indeed, as shown in Fig. 3E, treatment of lysosomes with a protonophore, carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, led to leakage of dye from lysosomes within minutes. During 2–12 h of SPD, we failed to find any signs of lysosomal rupture before onset of detectable neuronal death (Fig. 3). On the contrary, SPD-treated cells appeared to have increased staining with LysoTracker Red compared to untreated cells. This could be explained by increased lysosomal activity as LysoTracker Red accumulation depends on lysosomal pH. Only in some neurons, with clear nuclear condensation, had the LysoTracker Red fluorescence signal disappeared from lysosomes, suggesting a rupture of the lysosomal membrane. Similarly, no leakage from the lysosomal compartment was observed when acridine orange was used (data not shown).

Immunocytochemistry of cathepsin L

In a separate series of experiments we tested the expression of cathepsin L under SPD conditions. Cultures were stained with antibodies recognizing rat cathepsin L, but not rat procathepsin L or other cathepsins (Weber *et al.*, 1997). A quantitative analysis of cathepsin L immunoreactivity, at the single-cell level, identified two different types of cells: intensely stained cells with normal morphology and 'pale' cells that were shrunken and often had an irregular shape, both typical of cell death (Fig. 4). The fraction of pale cells was negligible in control (3%) and 4-h SDP groups (5%)

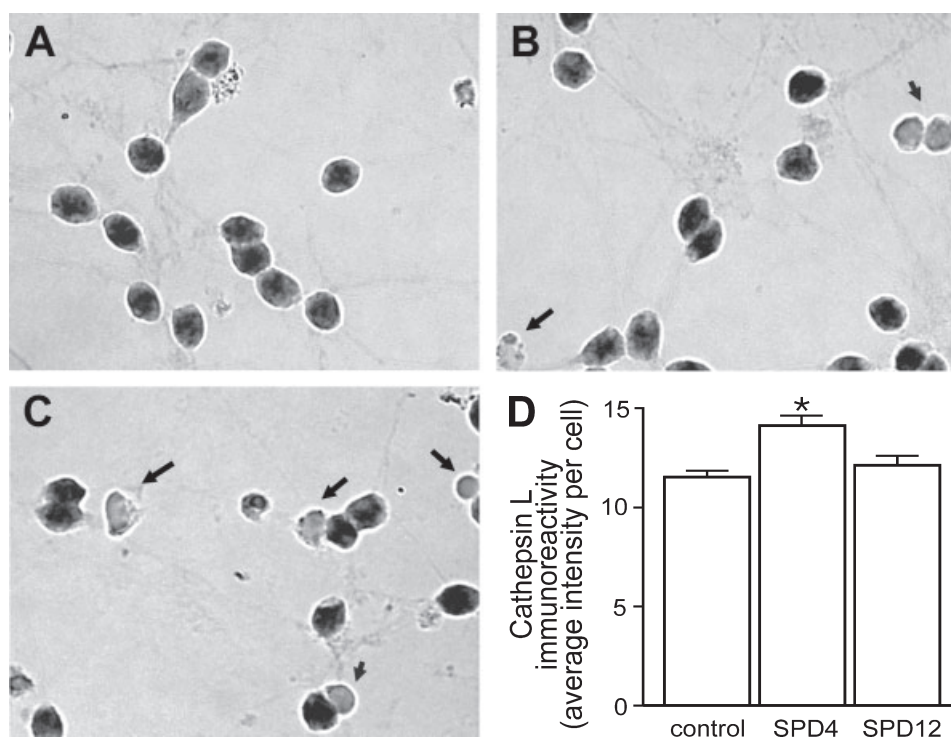


FIG. 4. Cathepsin L-immunoreactive cerebellar granule cells in (A) control cultures and in (B,C) cultures exposed to SPD for (B) 4 and (C) 12 h. (D) A quantitative analysis of cathepsin L immunoreactivity shows the average pixel intensity at the single-cell level ($n = 100$ –110 cells from three independent experiments). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Bonferroni test). Pale or dead cells are shown with arrows.

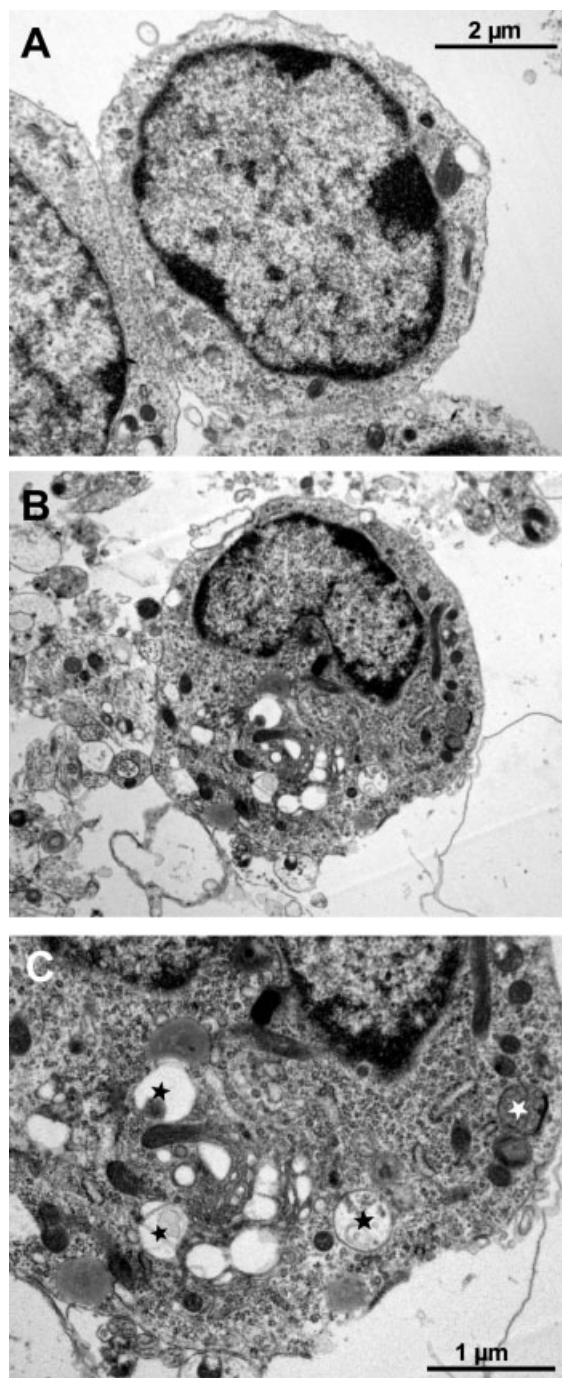


FIG. 5. Electron microscopy of cerebellar granule cells in (A) control cultures and in (B and C) cultures exposed to SPD for 12 h; magnification in C is twice that in B. Autophagic vacuoles, present in cytoplasm of SPD exposed neurons, are marked with asterisks. The experiment was repeated twice with similar results. Scale bar in A also applies to B.

but reached 20% in the 12-h SPD group. These data suggest that dying or dead cells lose their cathepsin L immunoreactivity and therefore we excluded pale cells from further analysis. Analysis of average pixel intensity in the viable population demonstrated a 23% increase in cathepsin L immunoreactivity in 4-h SPD cells when compared with control cells, but no increase after 12-h SPD (Fig. 4D).

Ultrastructural analysis of SPD granule neurons

Because activation of lysosomal enzymes is often associated with activation of autophagy, our next step was to examine a possible occurrence of autophagosomes in the neurons under conditions of SPD. A quantitative ultrastructural electron microscopy analysis revealed an increased number and area of autophagic vacuoles in 12-h SPD-treated neurons (Fig. 5, asterisks). The number of autophagic vacuoles increased 3.9-fold and the area of autophagic vacuoles 2.5-fold when compared with control values (Table 1).

Effects of autophagy-, caspase- and cathepsin inhibitors on SPD-induced death

Because morphological examination revealed the existence of autophagosomes and biochemical analysis revealed activation of lysosomal cathepsin L, our next task was to test whether activation of autophagy contributes to the neuronal death under SPD. For that purpose we tested the neuroprotective actions of the autophagy inhibitor 3-MA (which inhibits autophagy at the sequestration phase). In low micromolar concentrations, 3-MA failed to afford any neuroprotection. However, when 3-MA was added in millimolar concentrations (5 mM), 59% neuroprotection was observed (Fig. 6). The protective effect of 3-MA cannot be explained solely by the inhibition of apoptotic cell death as the caspase-3 inhibitor DEVD-fmk, 100 μ M, rescued only 31% of the neurons (Fig. 6).

Next, we tested the efficiency of selective cathepsin L inhibitors in suppressing the SPD-induced intralysosomal cathepsin-like activity. For that purpose the cultures were exposed to SPD for 4 h, to obtain maximal activation, and then exposed for 1 h to selective cathepsin L inhibitors, ALLM or FY-CHO. Both cathepsin L inhibitors concentration dependently inhibited intralysosomal cathepsin L activity as demonstrated in Fig. 7A. This inhibition, however, was not complete: 70% inhibition was observed at 100 μ M FY-CHO and 53% inhibition at 100 μ M ALLM. To control for the specificity of the fluorescent signal to cathepsin L, we also tested the effect of the specific inhibitor of another main lysosomal cathepsin, cathepsin B. No changes in cathepsin L-like activity were observed when cells were treated with up to 100 μ M of the cathepsin B inhibitor Ca074Me.

FY-CHO and ALLM were also partially effective against SPD-induced neuronal death: 49% inhibition of neuronal death was

TABLE 1. Quantification of electron micrographs of cerebellar granule cells in control cultures and in cultures exposed to SPD for 12 h

	Control ($n = 124$ cells)	SPD ($n = 100$ cells)
Number of autophagic vacuoles per section in cell	0.61 ± 0.07	$2.36 \pm 0.15^*$
Average area (in pixels) of autophagic vacuoles per section per cell	4130 ± 570	$10470 \pm 830^*$
Area of autophagic vacuoles as fraction of cytoplasm	0.012 ± 0.002	$0.034 \pm 0.002^*$

* $P < 0.0001$.

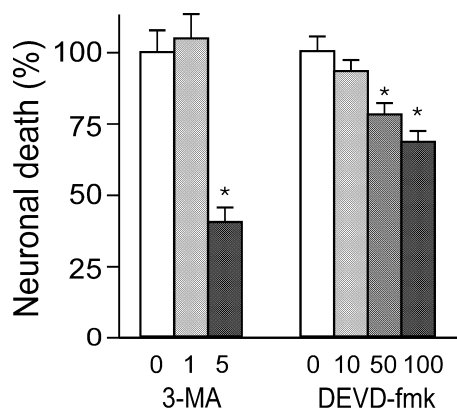


FIG. 6. Effects of the autophagy inhibitor 3-MA (5 mM) and the apoptosis inhibitor DEVD-fmk (100 μ M) on neuronal death induced by SPD. Drugs were added immediately after initiation of SPD and neuronal survival was determined 12 h later using the Trypan Blue assay. The data are mean $\pm$ SEM. Similar results were obtained in two independent experiments. * P < 0.05 (one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

observed after treatment with 50 μ M FY-CHO and 23% inhibition was observed after treatment with 50 μ M ALLM (Fig. 7B). These numbers match well with the effects of these inhibitors on cathepsin L activity (Fig. 7A): 50 μ M FY-CHO inhibited cathepsin L activity by 60% and 50 μ M ALLM by 25% (although the latter did not reach statistical significance). Higher concentrations of cathepsin L inhibitors exerted toxic effects on cultures and were not being tested. No neuroprotection was observed after the addition of the cathepsin B inhibitor Ca074Me at any concentration tested. It should be noted here, however, that Ca074Me delayed the neuronal death: 6 h after starting SPD the toxicity in Ca072Me-treated groups was lower than in the SPD-only groups.

We also tested the hypothesis that combined use of cathepsin L inhibitors and caspase-3 inhibitors increases resistance of cultures to SPD. Indeed, as demonstrated in Fig. 7C and D, combined treatment with a cathepsin L inhibitor (50 μ M FY-CHO) and a caspase-3 inhibitor (50 μ M DEVD-fmk) rescued a significantly higher percentage of neurons than FY-CHO or DEVD-fmk given alone. No synergistic effect was observed when cultures were cotreated with FY-CHO and 5 mM 3-MA.

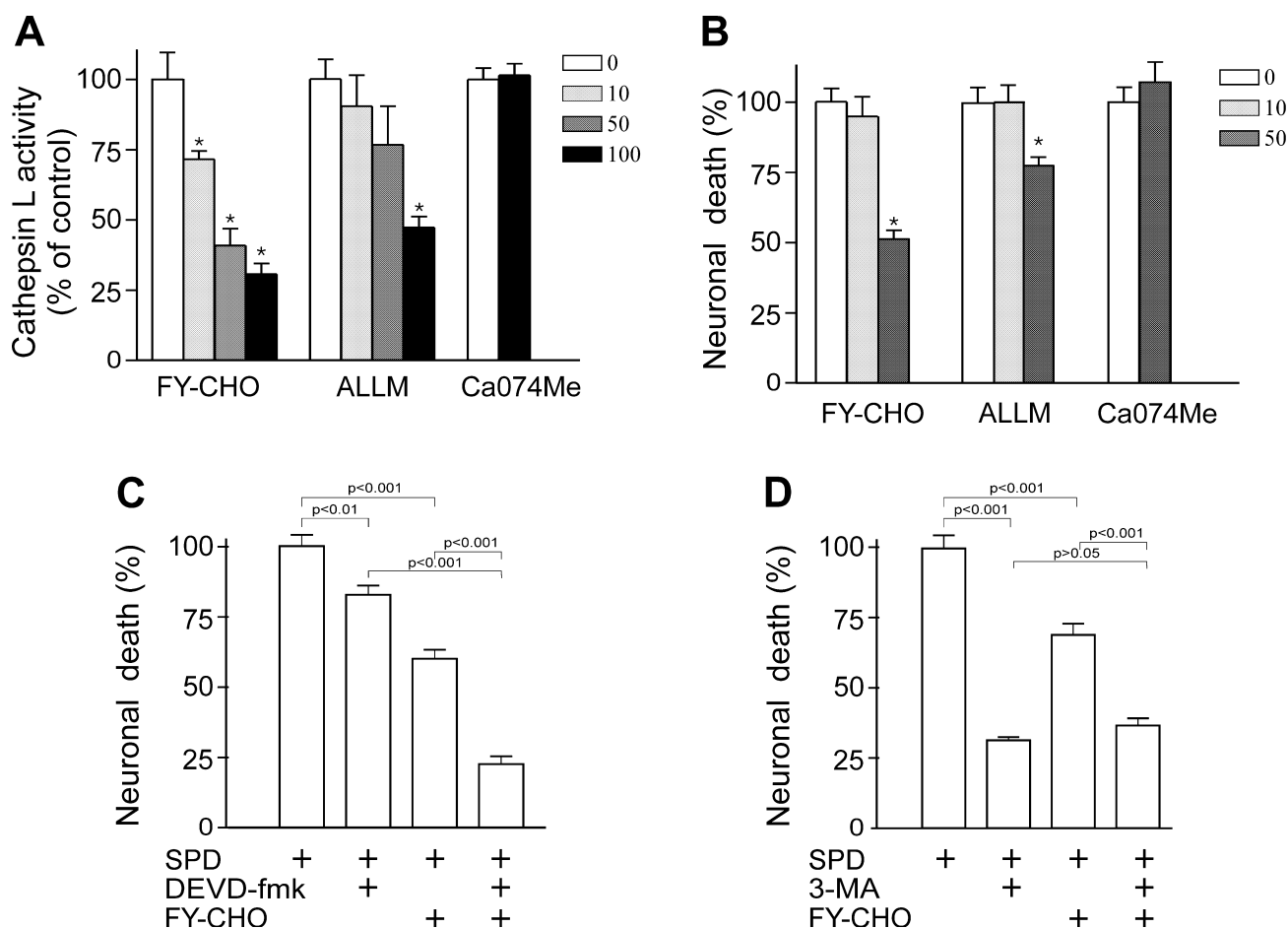


FIG. 7. Effects of cathepsin inhibitors on cathepsin L activity and neuronal survival. (A) Cathepsin L activity in SPD neurons exposed to the cathepsin L inhibitors FY-CHO (10, 50, 100 μ M) and ALLM (10, 50, 100 μ M) and the cathepsin B inhibitor Ca074Me (100 μ M). Neurons were treated with 10 μ M of (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 for 60 min and examined with confocal microscopy at excitation and emission wavelengths of 488 and 522 nm to calculate the mean intensity of fluorescence reflecting the cathepsin L activity. (B) Effects of FY-CHO (10, 50 μ M), ALLM (10, 50 μ M) and Ca074Me (50 μ M) on SPD-induced neuronal death. (C and D) Additive effect of FY-CHO and a caspase-3 inhibitor or an autophagy inhibitor. SPD neurons were exposed to the cathepsin L inhibitor FY-CHO (50 μ M), the caspase-3 inhibitor DEVD-fmk (50 μ M) or the autophagy inhibitor 3-MA (5 mM). All drugs were added immediately after initiation of SPD and neuronal survival was determined 12 h later using the Trypan Blue assay. Data are mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA, followed by the Bonferroni test, was used to test statistical significance. * P < 0.05. Similar results were obtained in two or three independent experiments.

Discussion

The results of our study demonstrate that SPD is associated with transient activation of lysosomal cathepsin L, with maximum activity at 4–8 h after the initiation of SPD. Cathepsin L inhibitors ALLM and FY-CHO inhibited cathepsin L activity and rescued half of the neurons from neuronal death during the first 12 h of deprivation. Similar concentrations of the cathepsin B inhibitor CA074Me had no persistent effect. These data suggest that cathepsin L, rather than cathepsin B, is involved in the neuronal death due to SPD.

Increased lysosomal cathepsin L activity, and subsequent neuronal death in SPD-treated neurons, might be related to excessive autophagy. Serum- and potassium-deprived neurons demonstrated an increased number of cytosolic autophagic vacuoles, indicating activation of autophagy. During the process of autophagy, lysosomes are fused with autophagosomes and thereby increased lysosomal cathepsin L activity might be necessary for the execution of efficient autophagy. Simultaneous activation of autophagy and the lysosomal system have been found in several other *in vitro* models of neuronal degeneration (Xue *et al.*, 1999; Kägedal *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002; Boland & Campbell, 2004) and in several neurodegenerative disorders (for review see Larsen & Sulzer, 2002). Indeed, ultra-structural analysis revealed an increased number of autophagosomes in the SPD-exposed neurons. Also, the experiments with 3-MA support the involvement of autophagy in SPD-induced neuronal death. Previous studies have reported that 3-MA inhibits class III phosphatidylinositol 3-kinase involved in the formation of autophagosomes at the stage of sequestration (Petiot *et al.*, 2000). In our experiments, this provided 60% neuroprotection against SPD-induced neuronal death.

There are some data which demonstrate that activation of cathepsin L might induce an activation of the apoptotic pathway. This ability of cathepsin L to induce apoptosis, however, has been demonstrated in models where the lysosomal membrane is ruptured and cathepsin L has translocated into the cytoplasmic compartment (Ishisaka *et al.*, 1999; Boland & Campbell, 2004). In our experiments, we were unable to detect any fluorescent signal associated with cathepsin L activity, from the cytosol and cellular compartments other than lysosomes, during the first 12 h of SPD. Similarly, the LysoTracker Red staining failed to demonstrate the rupture of the lysosomal membrane during the initial 12 h of SPD. These data argue against translocation of cathepsin L into the cytosol. It does not exclude, however, the possibility that some cathepsin L could be relocated to the cytosol immediately prior to the execution of death, and this would not be detected by the methods employed here.

Our study also suggests that, in the SPD model, cathepsin L-related neuronal death is at least partially caspase-3-independent. Treatment of neurons with a caspase-3 inhibitor or a cathepsin L inhibitor, separately, rescued only 20–40% of neurons from death induced by SPD. When both cathepsin L and caspase 3 inhibitors were present, $\approx 80\%$ of neurons were rescued from death. On the other hand, the cathepsin L inhibitor did not augment the neuroprotective effect of the autophagy inhibitor 3-MA. The existence of two cell populations dying, either via apoptosis or autophagy, is unlikely. Most probably both pathways are present in the same population of cells and both pathways, interacting with each other, are activated in parallel. This could provide an explanation of why inhibition of one of these pathways could not provide complete neuroprotection, as another pathway could become over-activated. It is therefore tempting to speculate that inhibition of lysosomal–autophagic pathways, together with apoptotic pathways, could provide more complete neuroprotection in other models of neuronal death that involve lysosomes. However, further investigations are required to explore this hypothesis.

Taken together, the current experiments demonstrate that activation of lysosomal cathepsin L and excessive autophagy are prominent features of SPD-induced neurodegeneration in the primary culture of cerebellar granule cells. Furthermore, the present data demonstrate that inhibition of cathepsin L activity and/or autophagy rescue neurons from SPD-induced neuronal death. Data also demonstrate the synergic effect of cathepsin-L inhibitors and caspase-3 inhibitors against SPD. Thus, the lysosomal–autophagic pathway of neuronal death might be considered an important target for the development of new neuroprotective agents.

Acknowledgements

The current work was supported by Estonian Science Foundation grants 5326, 6504 (A.Z.), 5219, 6227 (A.K.) and 5499 (A.P.), Estonian Ministry of Education and Science, and the European Community 5 FP (QLG3-CT-2000–01405). We also thank Mrs Ulla Peterson for preparing the neuronal cultures, Ms Marika Liik and Mrs Dzamilja Safulina for help in toxicity and imaging experiments and Mr Gordon Allan Leman for his help with the English revision.

Abbreviations

3-MA, 3-methyladenine; ALLM, N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methionine; CA-074Me, 1-trans-Epoxysuccinyl-Ile-Pro-OMe propylamide; DEVD-fmk, z-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone; FY-CHO, N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenyl-alanyl-L-tyrosinal; PBS, phosphate-buffered saline; SPD, serum and potassium deprivation.

References

- Assfalg-Machleidt, I., Rothe, G., Klingel, S., Banati, R., Mangel, W.F., Valet, G. & Machleidt, W. (1992) Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of cathepsin L. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **373**, 433–440.
- Bever, C.T. Jr & Garver, D.W. (1995) Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.*, **131**, 71–73.
- Boland, B. & Campbell, V. (2004) A β -mediated activation of the apoptotic cascade in cultured cortical neurones: a role for cathepsin L. *Neurobiol. Aging*, **25**, 83–91.
- Bursch, W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death. Differ.*, **8**, 569–581.
- Canu, N., Tufi, R., Serafino, A.L., Amadoro, G., Ciotti, M.T. & Calissano, P. (2005) Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, **92**, 1228–1242.
- Cataldo, A.M. & Nixon, R.A. (1990) Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **10**, 3861–3865.
- Clarke, P.G.H. (1990) Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, **181**, 195–213.
- Cuervo, A.M. (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.*, **14**, 70–77.
- D'Mello, S.R., Aglieco, F., Roberts, M.R., Borodezt, K. & Haycock, J.W. (1998) DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K⁺ deprivation. *J. Neurochem.*, **70**, 1809–1818.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T. & Callisano, P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by lowering of extracellular potassium: inhibition of death by IGF-I and camp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10989–10993.
- Gallo, V., Ciotti, M.T., Coletti, A., Aloisi, F. & Levi, G. (1982) Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7919–7923.
- Gomez-Santos, C., Santidrian, F.I., Barrachina, A.F., Gil, J. & Ambrosio, S. (2003) Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in huma neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.*, **73**, 341–350.
- Ishisaka, R., Utsumi, T., Kanno, T., Arita, K., Katunuma, N., Akiyama, J. & Utsumi, K. (1999) Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase 3. *Cell Struct. Funct.*, **24**, 465–470.
- Jäättelä, M. & Tschopp, J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.*, **4**, 416–423.

- Jia, L., Dourmashkin, R.R., Allen, P.D., Gray, A.B., Newland, A.C. & Kelsey, S.M. (1997) Inhibition of autophagy abrogates tumor necrosis factor- α induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br. J. Haematol.*, **98**, 673–685.
- Kaasik, A., Kalda, A., Jaako, K. & Zharkovsky, A. (2001) Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience*, **102**, 427–432.
- Kägedal, K., Zhao, M., Svensson, I. & Brunk, U. (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.*, **359**, 335–343.
- Larsen, K.E., Fon, E.A., Hastings, T.G., Edwards, R.H. & Sulzer, D. (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J. Neurosci.*, **22**, 8951–8960.
- Larsen, K.E. & Sulzer, D. (2002) Autophagy in neurons: a review. *Histol. Histopathol.*, **17**, 1–12.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P. & Nishimura, Y. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 177–196.
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T. & Thompson, C.B. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, **120**, 237–248.
- Marks, N., Berg, M.J., Guidotti, A. & Saito, M. (1998) Activation of caspase-3 and apoptosis on cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.*, **52**, 334–341.
- Miller, T.M. & Johnson, E.M. Jr (1996) Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci.*, **16**, 7487–7495.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F.C., Meijers, A.J. & Codogno, P. (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signalling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 992–998.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., & Tsujimoto, Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1221–1228.
- Uchiyama, U. (2001) Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.*, **64**, 233–246.
- Villalba, M. (1998) Bisindolylmaleimide prevents cerebellar granule cells apoptosis: a possible role for PKC. *Neuroreport*, **9**, 1713–1717.
- Weber, E., Bahn, H. & Gunther, D. (1997) Monoclonal antibodies against cathepsin L and procathepsin L of different species. *Hybridoma*, **16**, 159–166.
- Xue, L., Fletcher, G.C. & Tolkovsky, A.M. (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons. An alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell Neurosci.*, **14**, 180–198.
- Yan, G.-M. & Paul, S.M. (1997) Cultured cerebellar granule neurons as a model of neuronal apoptosis. In Poirier, J. (ed.), *Apoptosis Techniques and Protocols*, *Neuromethods* 29. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 47–66.

Tabel 1. Kokkuvõttev tabel arengu jooksul asetleidva raku surma kolme põhitüübi kohta. Neuronitel on täheldatud 1, 2 ja 3B tüüpi, kuid mitte 3A tüüpi surma. Kõige iseloomulikumad ja usaldusväärsemad tunnused on märgitud kursiivkirjas.

Erinevad tähistused		Tuum	Rakumembraan	Tsütoplasma	Heterofaagne eemaldamine
1 tüüp	Apoptoos; nekrootiline kahanemine; varaküps püknoos; nukleaarset tüüpi raku surm	Nukleaarne kondensatsioon, kromatiini fragmenteerumine, mis lõpeb <i>tüüpilise püknoosiga</i>	Lainetav, moodustab mullikujulisi väljasopistusi	Ribosoomide kadumine rERst ja polüsoomide lagunemine; tsütoplasma mahu vähenemine ning elektrontihedate regioonide teke	Silmatorikav ja oluline
2 tüüp	Autofaagiline raku surm	Mõningatel juhtudel püknoos; tuumad võivad eralduvaid mullikujulisi väljasopistusi moodustada	Mõningatel juhtudel võib esineda endotsütoos; mullikujuliste moodustiste tekkimine	<i>Rohkelt autofaagilisi vakuole;</i> ER ja mitokondrid on sageli paisunud; Golgi kompleks suurenenud	Juhuslik ja hiline
3A tüüp	Mittelüsoosomaalne lagundamine	Hiline vakuolisatsioon ja sellel järgnev lagundamine	Purunemine	<i>Üldine lagundamine;</i> organellide paisumine, tühimike teke, mis omavahel liitudes liituvad lõpuka ka ekstratsellulaarse ruumiga	Ei esine
3B tüüp	Tsütoplasmaatiline tüüp	Hiline kromatiini granulatsiooni suurenemine	Rakkude kuju ümardumine	<i>ER-i, tuumaümbrise, Golgi kompleksi ja mõnikord ka mitokondrite paisumine ja tühimike teke</i>	Esineb

