

УДК 57.042

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ И АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТЕАСОМ В ОБРАЗЦАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ 5xFAD

© 2023 г. А. В. Морозов^{a, *}, А. В. Буров^a, С. Ю. Фуников^a, Е. В. Тетерина^b, Т. М. Астахова^c,
П. А. Ерохов^c, А. А. Устюгов^b, В. Л. Карпов^a

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

^bИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук,
Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Поступила в редакцию 04.03.2023 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 21.03.2023 г.

Убиквитин-протеасомная система обеспечивает гидролиз большинства внутриклеточных белков в протеасомах. Разные формы протеасом различаются, в том числе, набором протеолитических субъединиц и присутствием активаторов. Нарушения в функционировании убиквитин-протеасомной системы выявлены при болезни Альцгеймера. При этом обнаружено увеличение экспрессии отдельных форм протеасом, в частности, протеасом, содержащих иммунные субъединицы (неконститутивные протеасомы). В данной работе нами изучены динамические изменения экспрессии генов каталитических субъединиц протеасом и содержания белков в коре головного мозга мышей трансгенной линии 5xFAD, служащей моделью болезни Альцгеймера. Показано, что в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD в возрасте 380 дней содержание транскриптов генов *PSMB9* и *PSMB8*, кодирующих иммунные субъединицы протеасом в 4 и 6 раз больше, чем у мышей в возрасте 60 дней. Кроме того, в гомогенатах тканей значительно повышено содержание иммунных субъединиц (в 2.8 раза — $\beta 1i$, в 2.2 раза — $\beta 2i$). Полученные данные свидетельствуют об активации синтеза иммунных субъединиц и сборки неконститутивных протеасом на терминальной стадии развития патологии. По данным электрофореза в нативных условиях в коре головного мозга 380-дневных мышей 5xFAD активируются как 20S, так и 26S протеасомы, содержащие иммунные субъединицы. Полученные нами, а также другими авторами данные свидетельствуют в пользу того, что активация неконститутивных протеасом — это универсальный феномен, характерный для различных животных моделей болезни Альцгеймера, который может отражать как развитие нейровоспаления, так и адаптационные процессы в тканях.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, протеасомы, неконститутивные протеасомы

DOI: 10.31857/S0026898423050142, **EDN:** RNKDOL

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система (УПС), центральным компонентом которой являются протеасомы, осуществляет деградацию большинства внутриклеточных белков [1]. Протеасома состоит из четырех, находящихся друг на друге, семиленных колец. Каждое кольцо состоит или из альфа-субъединиц (внешние кольца), или из бета-субъединиц (внутренние кольца). В каждом бета-кольце три субъединицы обладают каталитической активностью. Благодаря их наличию, протеасомы способны гидролизовать пептидные связи после кислых, основных и гидрофобных

аминокислотных остатков и проявлять каспаза-подобную, трипсинподобную и химотрипсинподобную активности соответственно. При этом конститутивные каталитические субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) при сборке комплексов могут заменяться на “иммунные” аналоги $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, что приводит к формированию иммунных и промежуточных (если заменяются не все конститутивные субъединицы) протеасом [2]. Все это увеличивает гетерогенность пула протеасом, сказывается на активности и спектре производимых ими пептидов [2]. (Протеасомы, содержащие иммунные каталитические субъединицы, далее будем называть неконститутивными). УПС в целом и

протеасомы в частности, вовлечены во все основные метаболические процессы в клетках, поэтому нарушение их функционирования имеет серьезные последствия для клеток и тканей организма.

Нейродегенеративные заболевания — это тяжелые, прогрессирующие заболевания центральной нервной системы (ЦНС), этиология которых, как правило, не установлена, а специфическое эффективное лечение на данный момент отсутствует. К нейродегенеративным заболеваниям относятся болезни Альцгеймера (БА), Паркинсона, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и другие [3]. Гибель нейронов ЦНС при таких заболеваниях приводит к развитию когнитивных и/или двигательных нарушений. Важной особенностью многих нейродегенеративных заболеваний является накопление в клетках или в межклеточном пространстве агрегатов, состоящих из пептидов или белков с измененной структурой, зачастую сильно убиквитинированных, что может указывать на непосредственное вовлечение системы контроля качества белков, в том числе УПС, в патогенез заболеваний этого класса [4, 5]. Действительно, схожие изменения функциональной активности УПС и пула протеасом выявлены при различных нейродегенеративных заболеваниях [6, 7].

БА — наиболее распространенная форма деменции, диагностированная более чем у 33 млн человек в мире, и ежегодно это число увеличивается на 6–7 млн (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>). При БА наблюдается потеря памяти, возникают нарушения речи и когнитивных функций; во внеклеточном пространстве и внутри нейронов формируются агрегаты пептида бета-амилоида (A β), а также нейрофибриллярные клубки (внутри нейронов), основным компонентом которых является гиперфосфорилированная форма белка тау [8].

Накопление белковых агрегатов указывает на вероятные нарушения функционирования УПС при БА [9]. Действительно, в постмортальных образцах мозга обнаружено снижение химотрипсиноподобной и каспазаподобной активности протеасом [10]. Снижение функциональной активности протеасом в образцах головного мозга также выявлено у мышей, моделирующих БА [11–13]. Кроме того, при инкубации культуры нейронов с A β 42 наблюдается интернализация пептида в клетки и снижение активности внутриклеточных протеасом [12]. В клетках, инкубированных с A β , выявлено повышение экспрессии убиквитин-конъюгирующего белка E2-25K/Nip-2 [14, 15]. Этот белок ингибирует активность протеасом, стабилизируя таким образом каспазу-12, активация которой опосредует гибель клеток, вызванную стрессом эндоплазматического ретикула [14, 15]. У мышей APP^{swe}/PS1^{dE9}, модели-

рующих БА, выявлено накопление в коре головного мозга и гиппокампе репортерного белка GFP_u, а также эндогенного субстрата протеасом p53, что указывает на снижение эффективности функционирования УПС [16]. С другой стороны, на той же модели не наблюдали накопления аналогичного белка-индикатора активности УПС — UbG76V-GFP [17]. С использованием еще одной модели БА — мышей 5xFAD — показано, что снижение уровня деубиквитирующего фермента Uch-L1 увеличивает количество β -секретазы 1, что, в свою очередь, вызывает повышение уровня A β [18]. Кроме того, в постмортальных образцах мозга пациентов с БА отмечено снижение содержания убиквитинлигазы HRD-1, локализованной в эндоплазматическом ретикулуме, что также может способствовать увеличению образования A β из белка-предшественника [19]. Недавно показали, что как окисление, так и чрезмерное фосфорилирование могут ограничивать протеасомный процессинг A β и тау [20]. При этом A β увеличивает экспрессию белка-регулятора гена кальцинеина (RCAN1), который ингибирует дефосфорилирование тау [21], а гиперфосфорилированный и фибриллярный тау, в свою очередь, может напрямую снижать активность протеасом [22]. В образцах мозга пациентов с БА при снижении общей активности протеасом наблюдалось увеличение количества протеасом, содержащих иммунные субъединицы, и полиморфизм субъединицы β 1i [23]. Показано также повышение экспрессии и активности неконститутивных протеасом вокруг амилоидных бляшек в клетках микроглии [17]. Таким образом, изменения в УПС при БА уже достаточно неплохо изучены, опубликованы данные, указывающие на существование тесной связи между накоплением агрегатов A β и тау и изменениями в пуле внутриклеточных протеасом при развитии болезни. Однако неясно, активность каких форм протеасом претерпевает наибольшие изменения при БА.

На животной модели БА нами изучены динамические изменения пула протеасом, сопровождающие развитие патологии. Кроме того, проведены детальные исследования, направленные на то, чтобы выявить, активность каких форм протеасом в тканях меняется при развитии болезни. В работе использовали наиболее распространенную среди моделей БА линию трансгенных мышей Tg(APP^{swe}Flon, PSEN1*^{M146L}*^{L286V}) 6799Vas/J, известную под условным названием 5xFAD. В геноме мышей этой линии встроена трансгенная кассета, содержащая кодирующую часть белка-предшественника амилоида (APP) с тремя аминокислотными заменами (K670N/M671L; I716V; V717I), ассоциированными с известными наследственными формами БА, и кодирующую часть белка пресенилина с двумя аминокислотными заменами (M146L; L286V), также соответствующи-

ми мутациям, обнаруживаемым при наследственных формах БА. Экспрессия трансгенов регулируется промотором гена *Thy1* мыши. Эта линия воспроизводит основные патологические черты БА и служит моделью A β 42-индуцированной нейродегенерации, а также моделью для изучения образования амилоидных бляшек [24–26].

В работе проведено комплексное изучение пула протеасом в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD в возрасте 60, 190 и 380 дней, соответствующих досимптоматической, предсимптоматической и симптоматической стадиям развития патологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали мышей линии 5xFAD – модели БА ($n = 8$), и контрольных животных линии C57BL/6 ($n = 6$). Мышей всех линий содержали в SPF-виварии (Specific Pathogen Free) при ИФАВ РАН в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч день и 12 ч ночь) при температуре 22–26°C и свободном доступе к корму и воде; не более пяти особей в клетке. Работы с животными проводили в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации” от 01.04.2016 № 199н.

Получение образцов головного мозга мышей. Образцы головного мозга мышей 5xFAD и C57BL/6 разного возраста получали хирургическим путем после терминальной анестезии животных. Все тканевые образцы были маркированы по принципу: уникальный номер животного, дата забора ткани. Образцы коры головного мозга разделяли на четыре части и маркировали. Все образцы помещали в 1.5 мл пробирки и моментально замораживали в жидком азоте, после чего хранили при –80°C.

Выделение РНК и получение кДНК. Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли спектрофотометрически, используя прибор NanoDrop (“Thermo Fisher Scientific”). Образцы РНК обрабатывали с помощью набора RapidOut DNA Removal kit (“Thermo Fisher Scientific”) для удаления ДНК. Далее проводили реакцию обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу Maxima H Minus (“Thermo Fisher Scientific”) и праймер oligo(dT)20 для получения кДНК (1.5 мкг суммарной РНК в реакционной смеси).

Оценка уровней экспрессии протеасомных генов. Количественную ПЦР в реальном времени и сравнительный анализ уровней экспрессии протеасомных генов: *PSMB3*, кодирующего структурную субъединицу β 3, а также *PSMB5* (субъеди-

ница β 5), *PSMB6* (субъединица β 1), *PSMB7* (субъединица β 2), *PSMB8* (субъединица β 5i), *PSMB9* (субъединица β 1i), *PSMB10* (субъединица β 2i), проводили, используя разработанную нами ранее ПЦР-систему [27]. ПЦР проводили на образцах кДНК из тканей животных, а также на серийных разведениях плазмид, содержащих амплифицируемый фрагмент каждого гена, используя набор Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (“Thermo Fisher Scientific”) и специфические праймеры (табл. 1). Определяли количество копий каждой плазмиды в единице объема. Используя значения пороговых циклов ПЦР для известного количества плазмид, получена калибровочная кривая. Количество транскриптов исследуемого гена в образце определяли с использованием калибровочной кривой после нормирования по экспрессии гена *Actb*.

Лизирование тканей. Ткани гомогенизировали в буфере для гомогенизации (50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 10% глицерина, 10 мМ Na₂S₂O₅ и 2 мМ АТФ) из расчета 10 мг ткани на 50 мкл буфера. Гомогенаты осветляли центрифугированием в центрифуге 5418R (“Eppendorf”, Германия) при максимальных оборотах в течение 30 мин. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Лоури.

Иммуноблотинг. Наличие белков в лизатах анализировали методом иммуноблотинга. Белки разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном денатурирующем (содержащем додецилсульфат натрия (ДСН)) полиакриламидном геле (ПААГ) в Трис-глицериновом буфере, после чего переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США). Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембраны 0.1%-ным раствором Ронсеау Руже (“Sigma-Aldrich”, США). Для выявления субъединиц протеасом мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в течение 2 ч, затем отмывали фосфатным буфером (ФБ), содержащим 0.1% Tween 20 (“Fisher Scientific”, США), и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена. Блоты проявляли с помощью набора ECL Prime (“GE Healthcare”, Великобритания). В качестве контроля в гели загружали коммерческие препараты конstitutивных и иммунных 20S протеасом (“Boston Biochem”, США). Для нормирования сигнала мембраны отмывали от антител сначала буфером для снятия антител (ФБ, 2% ДСН, 100 мМ β -меркаптоэтанол), а затем дополнительно ФБ. Мембраны инкубировали с первичными антителами к β -актину (табл. 2) в течение 1 ч, после чего отмывали и инкубировали с соответствующими вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена (табл. 2), и проявляли, как описано выше.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер*	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
PSMB3 for	AGCGTCTCAAGTTCCGACTG
PSMB3 rev	CATGGGACAGCCAATGAGGT
PSMB5 for	TAAGGAACGCATCTCGGTCG
PSMB5 rev	GTTCCCCTCGCTGTCTACG
PSMB6 for	ACTGCCAATGCTCTCGCTTT
PSMB6 rev	CGTCGGTATGGACCATCCTT
PSMB7 for	CATGGGTTCTGGCTCCTTGG
PSMB7 rev	GCTGCAATAGCCTCACTCAC
PSMB8 for	TGCCTATGGGGTGATGGACA
PSMB8 rev	CGTCTTCCTTCATGTGGTAC
PSMB9 for	ACCGTGAGGACTTGTTAGCG
PSMB9 rev	AAGCTGCGTCCACATAACCA
PSMB10 for	GGCTTGTGTTCCGAGATGG
PSMB10 rev	CAGCCCCACAGCAGTAGATT

*Последовательности праймеров аналогичны использованным нами ранее [27].

Таблица 2. Антитела, использованные в работе

Антитела	Производитель
Моноклональные антитела мыши к набору α -субъединиц протеасом $\alpha 1,2,3,5,6,7$	“Enzo”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1$	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к субъединице $\beta 2$	“Enzo”
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 5$	“GeneTex”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1i$	“Abcam”
Моноклональные антитела кролика к субъединице $\beta 2i$	“Abcam”
Моноклональные антитела мыши к β -актину	“Abcam”
Антитела козы против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Enzo”
Поликлональные антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Abcam”

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную, каспазаподобную, активности протеасом, а также специфическую активность субъединицы $\beta 5i$ в осветленных гомогенатах тканей оценивали согласно [28]. Химотрипсинподобную активность протеасом определяли по уровню гидролиза флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC (“Sigma-Aldrich”), каспазаподобную — субстрата Z-LLE-AMC (“Sigma-Aldrich”), а специфическую активность субъединицы $\beta 5i$ — по уровню гидролиза флуорогенного субстрата Ac-Ala-Asn-Trp-AMC (“Boston Biochem”) с использованием VersaFluor Fluorometer (“Bio-Rad”). Активность измеряли как минимум в трех повторностях в 100 мкл буфера для определения активности (20 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ и 30 мкМ субстрата), содержащего 6 мкл осветленного гомогената;

концентрации АТФ и $MgCl_2$ выбирали, учитывая данные [29]. Специфическую активность протеасом контролировали, добавляя в отдельные пробы 10 мкМ ингибитора протеасом MG132 (“Sigma-Aldrich”). Полученные значения пересчитывали на 1 мкл осветленного гомогената, умножали на уравнивающий коэффициент (определяется после оценки концентрации белка в пробах), вычисляли среднее значение и стандартное отклонение, после чего пересчитывали относительно уровня активности в контрольных клетках (в процентах).

Определение активности протеасом в геле. Гомогенаты тканей животных (~20 мкг общего белка), а также препараты конститутивных 20S протеасом (0.5 мкг/дорожку) (“Enzo”) наносили на градиентный 4–20%-ный ПААГ. Электрофорез проводили в течение 36 ч при +4°C (80 В, 12 ч; 140 В,

12 ч; 240 В, 12 ч). После проведения электрофореза в нативных условиях гели вымачивали в растворе, содержащем флуорогенные субстраты (Suc-LLVY-AMC, “Sigma”, США), для оценки химотрипсинподобной активности или Ac-ANW-AMC (“Boston Biochem”) — для оценки специфической активности $\beta 5i$ -субъединицы. Гель инкубировали в течение 30 мин, затем анализировали под ультрафиолетом и фотографировали, после чего фотографии анализировали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>). Для подтверждения одинаковой белковой нагрузки в образцах гель окрашивали раствором Кумасси (“Serva”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия генов иммунных протеасом возрастает в коре головного мозга животных 5xFAD на поздних стадиях развития патологии

На первом этапе работы с использованием разработанной ранее ПЦР-системы, позволяющей количественно сравнивать уровни экспрессии различных генов между собой [27], определяли уровни экспрессии протеасомных генов в коре головного мозга контрольных и трансгенных животных разного возраста. Сначала провели сравнительный анализ экспрессии генов протеасом у 60-дневных животных 5xFAD. Оказалось, что среди протестированных генов на самом высоком уровне экспрессируется ген *PSMB6*, кодирующий конститутивную каталитическую субъединицу $\beta 1$, а среди генов, кодирующих иммунные субъединицы протеасом — наиболее высокими были уровни экспрессии гена *PSMB10* (субъединица $\beta 2i$) (рис. 1).

В целом, в коре головного мозга мышей линии 5xFAD экспрессия генов, кодирующих конститутивные субъединицы протеасом, значительно превосходила уровни экспрессии генов иммунных субъединиц.

Далее оценили динамику экспрессии генов всех каталитических субъединиц протеасом в образцах головного мозга мышей 5xFAD и контрольных животных C57BL/6 в возрасте 60, 190 и 380 дней. Оказалось, что на фоне относительной стабильности уровней экспрессии в образцах, полученных от контрольных животных, в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD, начиная с возраста 190 дней, наблюдался прогрессирующий рост уровней экспрессии генов иммунных субъединиц *PSMB8* и *PSMB9*. Это повышение зависело от субъединицы и составило от 4 (*PSMB9*) до 6 раз (*PSMB8*) у животных в возрасте 380 дней в сравнении с образцами от мышей 60-дневного возраста (рис. 2).

Эти данные указывают на вероятное значительное увеличение количества неконститутив-

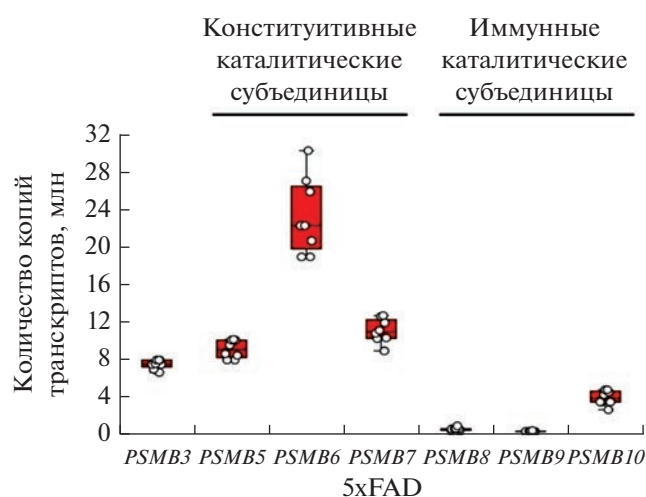


Рис. 1. Уровни экспрессии генов субъединиц протеасом в образцах коры головного мозга мышей линии 5xFAD ($n = 8$) в возрасте 60 дней. Указаны медианные значения количества копий транскриптов соответствующих субъединиц (миллионы штук в расчете на 1 мкг total RNA, выделенной из ткани).

ных протеасом в тканях головного мозга трансгенных животных, сопровождающее развитие патологии.

Экспрессия субъединиц иммунных протеасом в коре головного мозга животных 5xFAD возрастает на поздних стадиях развития патологии

В продолжение исследований методом иммуноблоттинга изучено содержание субъединиц протеасом в лизатах коры головного мозга мышей 5xFAD разного возраста. Показано сопоставимое количество конститутивных субъединиц протеасом $\beta 1$ и $\beta 2$, а также некоторое повышение содержания конститутивной субъединицы $\beta 5$ к 190 и 380 дню в образцах коры головного мозга трансгенных животных по сравнению с образцами, полученными от контрольных мышей (рис. 3, 4). Сравнительный анализ содержания α -субъединиц протеасом у мышей 5xFAD и C57BL/6 разного возраста выявил их разнонаправленные изменения между 60 и 190 днями, однако к 380 дням количество субъединиц в лизатах коры головного мозга контрольных и трансгенных мышей было сопоставимым (рис. 4). В то же время, выявлено значительное увеличение количества иммунных β -субъединиц ($*p < 0.05 - \beta 1i$, $*p < 0.05$, $\beta 2i$), рассчитано по критерию Стьюдента) в образцах трансгенных мышей в возрасте 380 дней (рис. 5). При анализе содержания иммунных субъединиц можно заметить, что на поздних стадиях развития патологии неконститутивные протеасомы могут составлять до 25% пула (соотношение содержа-

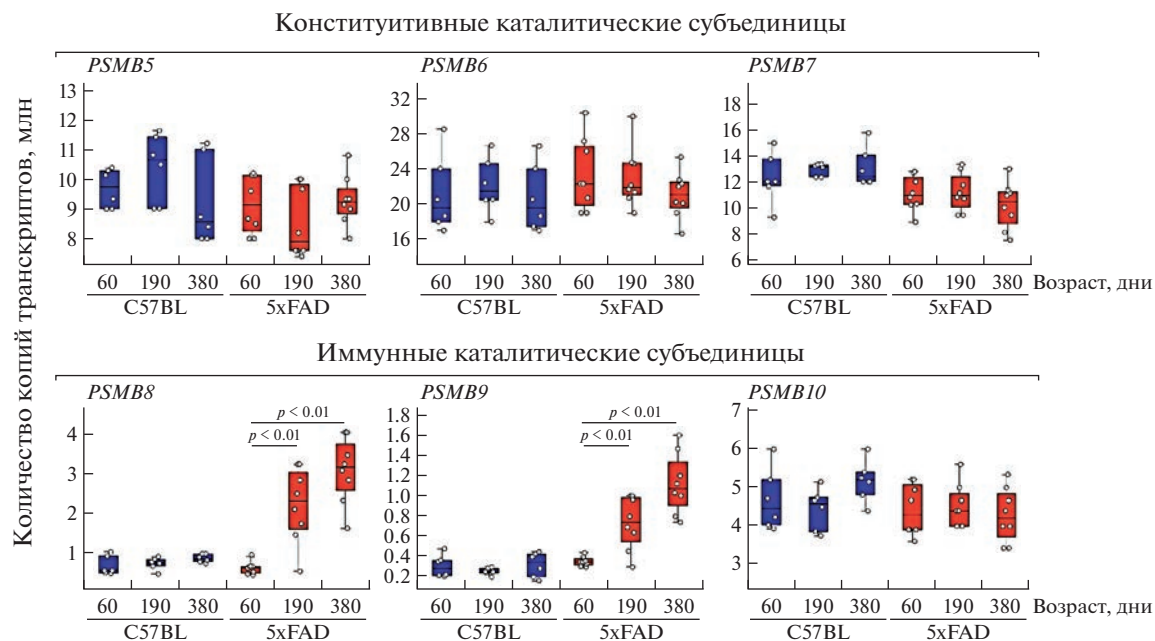


Рис. 2. Сравнительный анализ динамики экспрессии генов субъединиц протеасом в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 ($n = 6$) и 5xFAD ($n = 7$) разного возраста. Точки соответствуют количеству транскриптов в тканях конкретных животных. Указаны медианные значения количества копий транскриптов отдельных субъединиц (миллионы штук в расчете на 1 мкг суммарной РНК, выделенной из ткани). Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия Стьюдента.

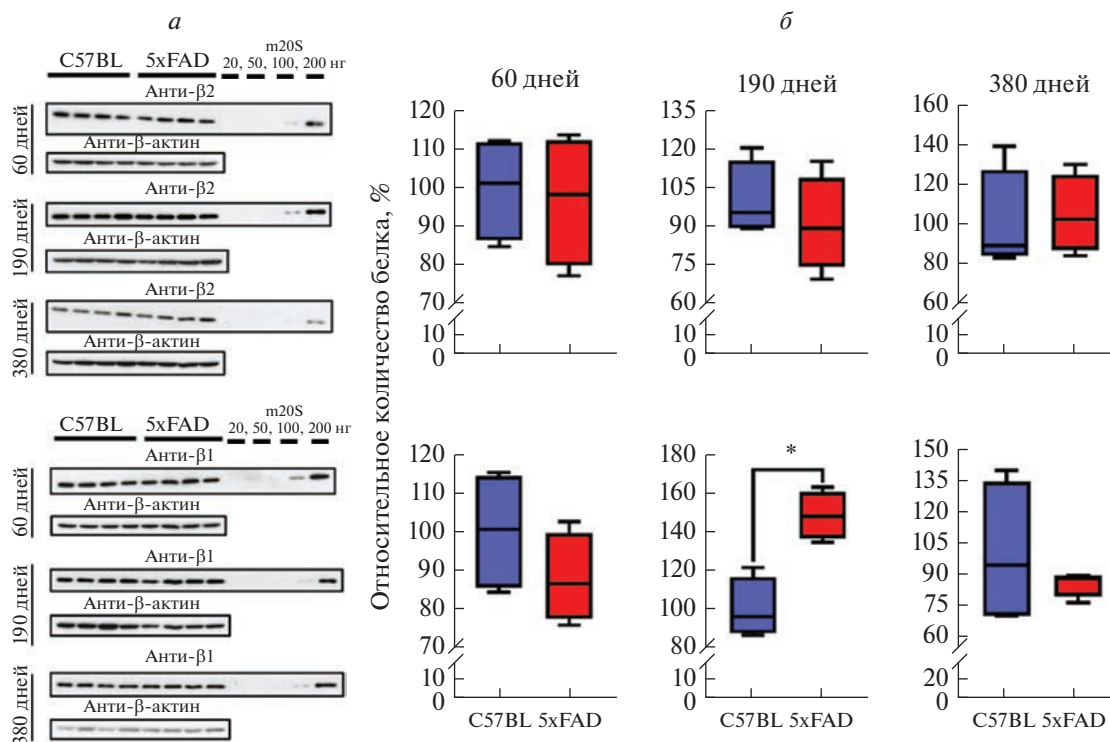


Рис. 3. Анализ содержания субъединиц протеасом $\beta 1$ и $\beta 2$ в лизатах коры головного мозга четырех мышей C57BL/6 и четырех 5xFAD различного возраста. **а** – Иммуноблоттинг образцов коры головного мозга животных. Для сравнения и оценки содержания целевого белка использованы серийные разведения коммерческого препарата 20S протеасом мыши (“R&D Systems”, США). **б** – Анализ изображений (**а**) с помощью программы ImageJ. Статистически значимые различия в содержании белков отмечены звездочками: $*p < 0.05$, рассчитано по t -критерию Стьюдента.

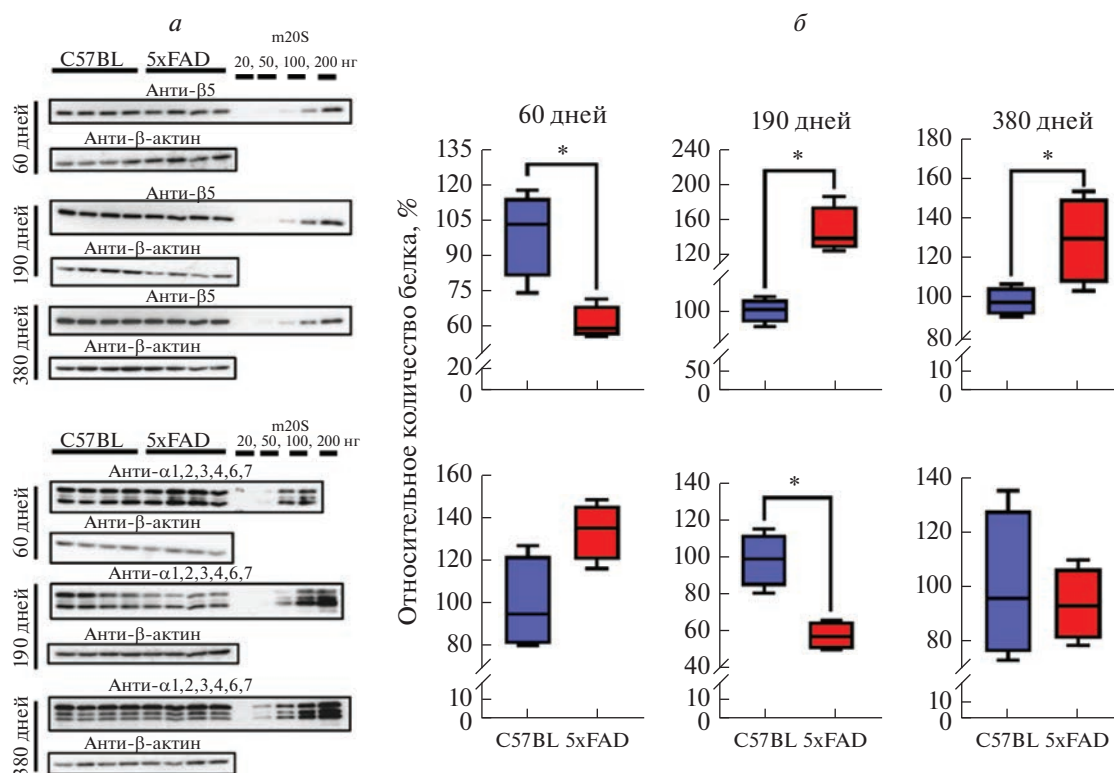


Рис. 4. Анализ содержания субъединиц протеасом $\beta 5$ и $\alpha 1,2,3,4,6,7$ в лизатах тканей коры головного мозга четырех мышей C57BL/6 и четырех 5xFAD различного возраста. *a* – Иммуноблоттинг образцов коры головного мозга животных. Для сравнения и оценки содержания целевого белка использованы серийные разведения коммерческого препарата 20S протеасом мыши (“R&D Systems”). *б* – Анализ изображений (*a*) с помощью программы ImageJ. Статистически значимые различия в содержании белков отмечены звездочками: $p < 0.05$, рассчитано по *t*-критерию Стьюдента.

ния субъединиц $\beta 2$ и $\beta 2i$ в лизатах трансгенных мышей (рис. 3, 5)).

Полученные данные подтверждают увеличение количества неконститутивных протеасом в головном мозге мышей линии 5xFAD, а также указывают на вероятные изменения активности протеасом.

Активность протеасом в образцах коры головного мозга животных имеет тенденцию к снижению с возрастом и на терминальной стадии развития патологии

В образцах коры головного мозга контрольных животных выявлена тенденция к постепенному снижению всех исследованных активностей протеасом по мере старения. В образцах, полученных от трансгенных животных, снижение активности протеасом к 380 дню было более выраженным: статистически значимым в случае каспазаподобной активности и близким к статистической значимости ($p = 0.08$, критерий Стьюдента) в случае химотрипсинподобной активности. Существенного изменения $\beta 5i$ -специфической активности протеасом при этом не выявлено (рис. 6). Эти

данные указывают на более выраженное снижение активности протеасом при развитии БА-подобной патологии по сравнению с возрастными изменениями у контрольных животных.

Активность конститутивных и неконститутивных 26S протеасом имеет тенденцию к увеличению в коре головного мозга животных 5xFAD на поздних стадиях развития патологии при анализе в нативном геле

На следующем этапе методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях определено содержание и активность различных форм протеасом в лизатах тканей головного мозга животных. В образцах выявлены свободные 20S протеасомы, вероятно, 20S протеасомы с 11S регуляторами, а также 26S протеасомы с одним или двумя 19S регуляторами (26S протеасомы) (рис. 7) [30]. Можно отметить, что в образцах коры головного мозга как контрольных, так и опытных мышей химотрипсинподобная активность ассоциирована в основном с 26S протеасомами, а химотрипсинподобная активность 20S протеасом и, предположительно, 20S протеасом с 11S активатором – сильно снижена (рис. 7).

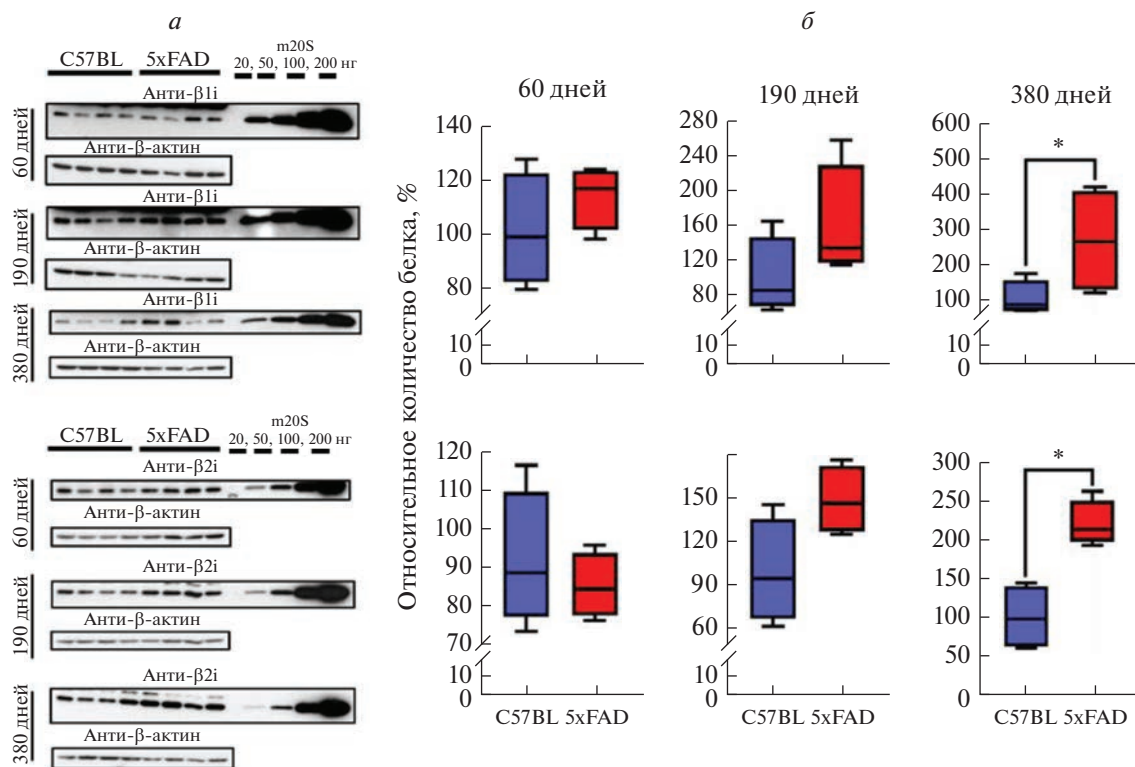


Рис. 5. Анализ содержания субъединиц протеасом $\beta 1i$ и $\beta 2i$ в лизатах тканей коры головного мозга четырех мышей C57BL/6 и четырех 5xFAD разного возраста. *a* – Иммуноблоттинг лизатов коры головного мозга животных. Для сравнения и оценки содержания целевого белка использованы серийные разведения коммерческого препарата иммунных 20S протеасом мыши (“R&D Systems”). *б* – Анализ изображений (*a*) с помощью программы ImageJ. Статистически значимые различия в содержании белков отмечены звездочками: * $p < 0.05$, t -критерию Стьюдента.

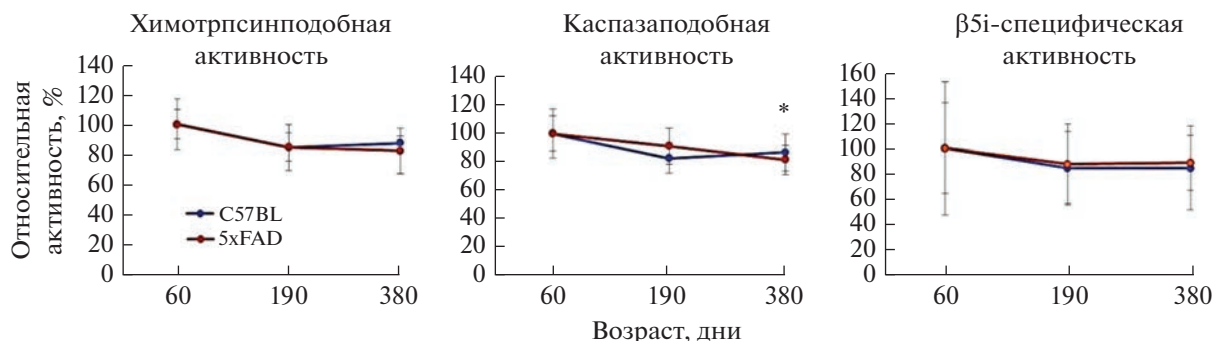


Рис. 6. Сравнительный анализ химотрипсинподобной, каспазаподобной и $\beta 5i$ -специфической активностей протеасом в образцах коры головного мозга мышей линий C57BL/6 ($n = 6$) и 5xFAD ($n = 6$) в возрасте 60, 190, 380 дней. Активность определяли в коре головного мозга шести животных в возрасте 60, 190 и 380 дней. Указаны средние значения. “Усы” отражают стандартное отклонение. Статистически значимые различия отмечены звездочкой: * $p < 0.05$, рассчитано по t -критерию Стьюдента.

Полученные нами результаты в отличие от данных определения активности протеасом в осветленных гомогенатах тканей (рис. 6) выявляют тенденцию к повышению активности протеасом трансгенных животных с возрастом (рис. 6, 7). Так, после нормирования на общий белок обнаружено близкое к статистически достоверному повыше-

ние химотрипсинподобной и специфической активности субъединицы $\beta 5i$ в 26S области в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD в возрасте 380 дней по сравнению с активностью протеасом у контрольных животных того же возраста (рис. 7). Эти данные коррелируют с динамикой экспрессии гена, кодирующего субъединицу

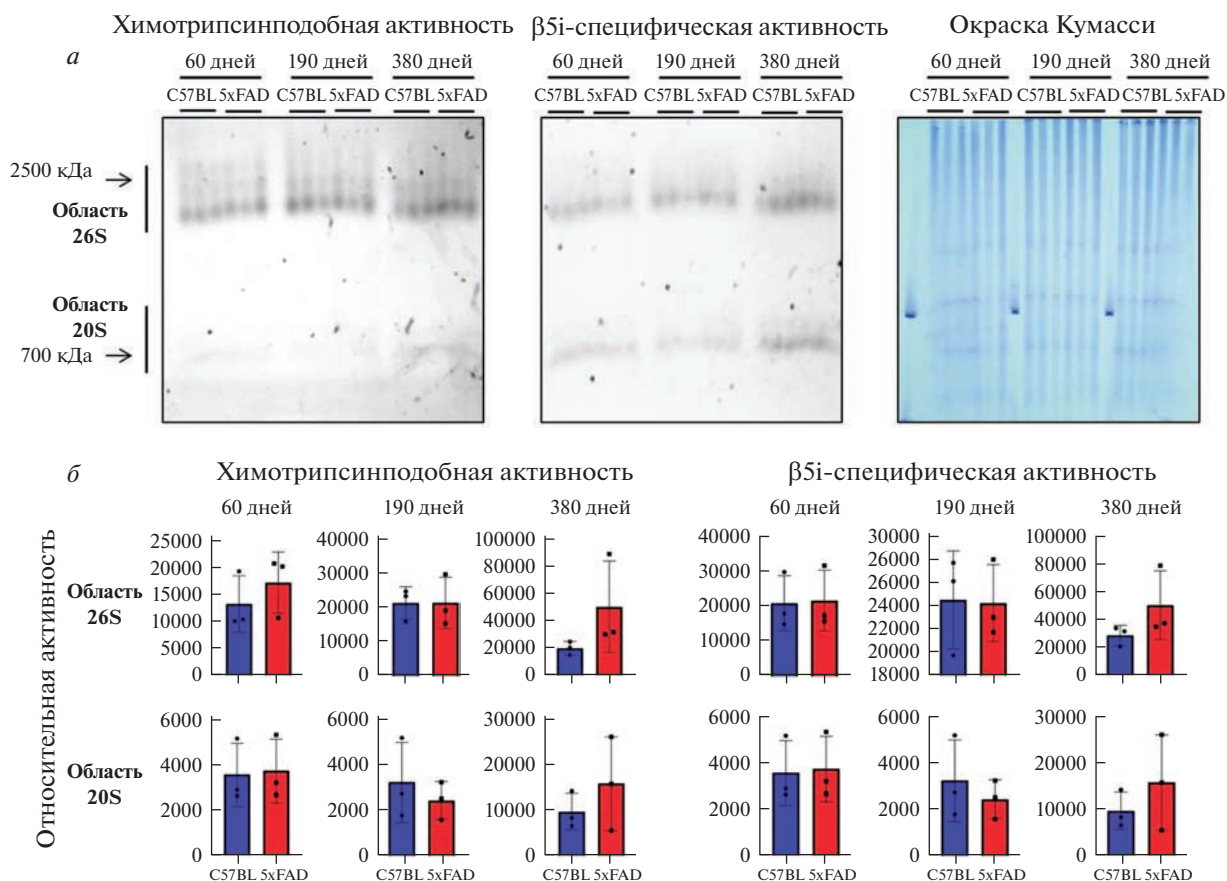


Рис. 7. а — Анализ форм протеасом и их активности в образцах коры головного мозга контрольных (C57BL/6, $n = 3$) и опытных животных (5xFAD, $n = 3$) разного возраста методом электрофореза в нативном ПААГ. После инкубации с субстратами для оценки активности протеасом гели анализировали под ультрафиолетом и фотографировали. Для подтверждения равномерности белковой нагрузки гели окрашивали раствором Кумасси. б — Анализ химотрипсинподобной и $\beta 5i$ -специфической активности протеасом в геле (а) с помощью программы ImageJ с учетом нормирования. Указаны средние значения и стандартное отклонение.

$\beta 5i$, в ходе развития патологии. Следует также отметить тенденцию к повышению химотрипсинподобной активности 20S протеасом у животных 5xFAD в возрасте 380 дней по сравнению с контрольными. Полученные данные указывают на изменения в пуле протеасом, перераспределение активности между различными формами протеасом, на вероятную активацию 26S и 20S неконститутивных протеасом при развитии патологии, подобной БА.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

БА — неизлечимое нейродегенеративное заболевание неизвестной этиологии. Однако известна ассоциация БА с накоплением в мозгу пациентов бета-амилоидных ($A\beta$) бляшек, а также внутриклеточных нерастворимых скоплений (нейрофибриллярных клубков), основным компонентом которых является тау-белок. Центральным событием при БА, согласно гипотезе амилоидно-

го каскада, считается агрегация $A\beta$ [31]. При этом $A\beta$ выявляется как вне, так и внутри клеток ЦНС [32]. Наличие внутриклеточных белковых агрегатов и нарастающее количество опубликованных данных указывают, с одной стороны, на нарушение функции УПС при прогрессировании БА [9, 33], а с другой, на растущий интерес к изучению связи между УПС и БА.

Активация экспрессии неконститутивных протеасом показана на различных моделях БА [17, 34]. Обнаружено существенное увеличение количества неконститутивных протеасом в глиальных клетках вокруг областей мозга, содержащих амилоидные бляшки [17]. При этом неконститутивные протеасомы, по-видимому, регулируют экспрессию цитокинов в клетках микроглии, влияя таким образом на развитие воспаления в ткани мозга [35], что также может стимулировать синтез таких протеасом. Последние данные говорят о первостепенной роли нейровоспаления в нарушении работы мозга при развитии БА [36]. Тем

самым снижением активности иммунных и промежуточных протеасом, играющих важную роль в развитии иммунных реакций, может рассматриваться как перспективный подход к терапии БА. Действительно, активно разрабатываются препараты, направленные на подавление активности неконститутивных протеасом [37, 38]. На животной модели 5xFAD нами получены аналогичные данные, указывающие на активацию экспрессии неконститутивных протеасом в клетках коры головного мозга животных на терминальной стадии развития патологии. Более того, нами показано, что, вероятно, происходит увеличение содержания и активности как 20S, так и 26S неконститутивных протеасом.

Синтез неконститутивных протеасом может также индуцироваться под действием стресса. Известно, что при БА выявляются признаки окислительного стресса [39], а A β 42 может вызывать подобные изменения в нейронах [40]. Важно отметить, что иммунные протеасомы обеспечивают деградацию окисленных, поврежденных, склонных к агрегации белков в клетках, а их содержание возрастает при окислительном стрессе [41]. На модели другого нейродегенеративного заболевания показано, что при нарушении сборки иммунных протеасом происходит накопление агрегатов α -синуклеина [42]. Тем самым активация иммунных протеасом может быть также и адаптационной реакцией клеток на накопление окисленных и поврежденных белков, направленной на предотвращение образования ими агрегатов. Учитывая рассмотренные функции иммунных протеасом, можно предположить, что выявленная нами активация 26S и 20S протеасом может происходить в разных клетках: в одних она обеспечивает разрушение потенциально опасных белковых субстратов, а в других — регуляцию экспрессии цитокинов.

Согласно результатам ряда работ, развитие БА сопровождается снижением активности протеасом [11–13]. Наши данные, полученные с использованием лизатов коры головного мозга мышей 5xFAD (рис. 6), согласуются с этими результатами, однако оценка уровней активности различных форм протеасом в нативном геле указывает на отсутствие достоверных различий и даже на некоторое повышение активности протеасом, сопровождающее развитие патологии (рис. 7). Данное противоречие может быть связано с разными условиями определения активности. Действительно, определение активности протеасом в лизатах тканей головного мозга с помощью флуорогенных пептидов показало, что у пациентов с БА активность протеасом существенно ниже, чем у здоровых доноров. Однако активность комплексов, измеренная после выделения протеасом, наоборот, превосходила активность протеасом, выделенных из образцов здоровых доноров [43]. Это

различие связывают с возможным отделением белков, влияющих на активность протеасом, в процессе хроматографической очистки [43]. Таким образом, нельзя исключить, что различия в динамике изменений активности протеасом, выявленные в гомогенатах и после электрофореза в нативном геле, могут быть связаны с присутствием белков, влияющих на активность протеасом. Известно, что различные белки, не относящиеся к “каноническим” активаторам протеасом, могут существенно влиять на активность комплексов. Так, при взаимодействии молекул убиквитина, белков, содержащих убиквитин-подобные домены, или, например, белка Usp14 с субъединицами 19S регулятора 26S протеасомы происходят конформационные перестройки, приводящие к открытию α -ворот, повышению активности протеасом и гидролизу АТФ [44–48]. Введение в нейроны агрегатов белков, содержащих множество GA-повторов, способствовало привлечению большого количества 26S протеасом, а также “замораживанию” комплексов в состоянии деградации субстрата, подразумевающему открытие альфа ворот 20S протеасом, но затрудняющему деградацию субстратов [49]. Кроме того, можно предположить, что изменения активности протеасом могут быть связаны с белками и пептидами, которые накапливаются непосредственно при развитии БА. Так, модуляция активности внутриклеточных протеасом A β считается важным фактором, влияющим на развитие БА [11–14, 50–53]. Показано, что A β может быть субстратом 20S комплексов и “конкурировать” с другими субстратами протеасом, снижая тем самым их активность в отношении этих субстратов [53]. С другой стороны, ранее нами показано, что в присутствии низкомолекулярных олигомеров A β 42 активность 26S протеасом, измеряемая с помощью флуорогенных пептидов, может возрастать [54]. Наконец, активность протеасом может регулироваться посредством посттрансляционных модификаций как субъединиц протеасом, так и белков активаторов [55]. В постмортальных образцах больных выявлены посттрансляционные модификации субъединиц протеасом, не обнаруживаемые в контрольных образцах [43]. Таким образом, наблюдаемые изменения активности могут быть связаны с действием как эндогенных, так и патологических факторов, влияние которых с возрастом изменяется.

В целом, совокупность результатов, полученных нами, и опубликованных данных указывает на то, что активация неконститутивных протеасом — это универсальный феномен, характерный для различных животных моделей БА. На терминальной стадии заболевания, по-видимому, происходит активация как 20S, так и 26S неконститутивных протеасом. При этом можно предположить, что повышение активности протеасом,

обусловленное повышением экспрессии иммунных субъединиц, посттрансляционными модификациями субъединиц, взаимодействием с другими белками, компенсируется негативным эффектом от взаимодействия протеасом с другими белками или агрегатами, что приводит, в конечном итоге, к ингибированию активности протеасом при развитии БА. Повышение активности неконститутивных протеасом может быть связано при этом как с адаптационными процессами, так и с развитием нейровоспаления в тканях. Дальнейшие исследования помогут более детально охарактеризовать роль отдельных форм протеасом в развитии БА.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 18-74-10095).

Работы с животными проводили в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации” от 01.04.2016 № 199н.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ciechanover A., Kwon Y.T. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* **47**, e147–e147.
2. Morozov A.V., Karpov V.L. (2018) Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon*. **4**, e00894.
3. Kovacs G.G. (2017) Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handb. Clin. Neurol.* **145**, 301–307.
4. Fernández-Cruz I., Reynaud E. (2021) Proteasome subunits involved in neurodegenerative diseases. *Arch. Med. Res.* **52**, 1–14.
5. Schmidt M.F., Gan Z.Y., Komander D., Dewson G. (2021) Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* **28**, 570–590.
6. Dantuma N.P., Bott L.C. (2014) The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 70.
7. Thibautaud T.A., Anderson R.T., Smith D.M. (2018) A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nat. Commun.* **9**, 1097.
8. d’Errico P., Meyer-Luehmann M. (2020) Mechanisms of pathogenic Tau and A β protein spreading in Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* **12**, 265.
9. Hegde A.N., Smith S.G., Duke L.M., Pourquoy A., Vaz S. (2019) Perturbations of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in aging and Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 324.
10. Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R. (2001) Impaired proteasome function in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **75**, 436–439.
11. Almeida C.G., Takahashi R.H., Gouras G.K. (2006) Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J. Neurosci.* **26**, 4277–4288.
12. Oh S., Hong H.S., Hwang E., Sim H.J., Lee W., Shin S.J., Mook-Jung I. (2005) Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 1292–1299.
13. Tseng B.P., Green K.N., Chan J.L., Blurton-Jones M., LaFerla F.M. (2008) A β inhibits the proteasome and enhances Amyloid and Tau accumulation. *Neurobiol. Aging*. **29**, 1607–1618.
14. Song S., Kim S.Y., Hong Y.M., Jo D.G., Lee J.Y., Shim S.M., Chung C.W., Seo S.J., Yoo Y.J., Koh J.Y., Lee M.C., Yates A.J., Ichijo H., Jung Y.K. (2003) Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol. Cell.* **12**, 553–563.
15. Song S., Lee H., Kam T.I., Tai M.L., Lee J.Y., Noh J.Y., Shim S.M., Seo S.J., Kong Y.Y., Nakagawa T., Chung C.W., Choi D.Y., Oubrahim H., Jung Y.K. (2008) E2-25K/Hip-2 regulates caspase-12 in ER stress-mediated A β neurotoxicity. *J. Cell Biol.* **182**, 675–684.
16. Liu Y., Hettinger C.L., Zhang D., Rezvani K., Wang X., Wang H. (2014) The proteasome function reporter GFPu accumulates in young brains of the APP^{swE}/PS1^{dE9} Alzheimer’s disease mouse model. *Cell Mol. Neurobiol.* **34**, 315–322.
17. Orre M., Kamphuis W., Dooves S., Kooijman L., Chan E.T., Kirk C.J., Dimayuga Smith V., Koot S., Mamber C., Jansen A.H., Ovaas H., Hol E.M. (2013) Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer’s disease. *Brain*. **136**, 1415–1431.
18. Guglielmotto M., Monteleone D., Vasciaveo V., Repetto I.E., Manassero G., Tabaton M., Tamagno E. (2017) The decrease of Uch-L1 activity is a common mechanism responsible for A β 42 accumulation in Alzheimer’s and vascular disease. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 320.
19. Kaneko M., Koike H., Saito R., Kitamura Y., Okuma Y., Nomura Y. (2010) Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J. Neurosci.* **30**, 3924–3932.
20. Bonet-Costa V., Pomatto L.C.-D., Davies K.J.A. (2016) The proteasome and oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 886–901.
21. Lloret A., Badia M.C., Giraldo E., Ermak G., Alonso M.D., Pallardó F.V., Davies K.J., Viña J. (2011) Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis.* **27**, 701–709.
22. Keck S., Nitsch R., Grune T., Ullrich O. (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **85**, 115–122.
23. Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. (2006) Immunoproteasome and LMP2

- polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging*. **27**, 54–66.
24. Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A., Wirths O. (2012) Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **33**, 196.e29–40.
 25. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* **26**, 10129–10140.
 26. Richard B.C., Kurdakova A., Baches S., Bayer T.A., Weggen S., Wirths O. (2015) Gene dosage dependent aggravation of the neurological phenotype in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **45**, 1223–1236.
 27. Фуников С.Ю., Спасская Д.С., Буров А.В., Тетерина Е.В., Устюгов А.А., Карпов В.Л., Морозов А.В. (2021) Отделы центральной нервной системы мыши отличаются по количеству транскриптов протеасомных генов. *Молекуляр. биология*. **55**, 54–63.
 28. Morozov A.V., Astakhova T.M., Garbuz D.G., Krasnov G.S., Bobkova N.V., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Evgen'ev M.B. (2017) Interplay between recombinant Hsp70 and proteasomes: proteasome activity modulation and ubiquitin-independent cleavage of Hsp70. *Cell. Stress Chaperones*. **22**, 687–697.
 29. Morozov A., Astakhova T., Erokhov P., Karpov V. (2022) The ATP/Mg²⁺ Balance affects the degradation of short fluorogenic substrates by the 20S proteasome. *Methods Protoc.* **5**, 15.
 30. Erokhov P.A., Lyupina Y.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Y.O., Sharova N.P. (2017) Detection of active proteasome structures in brain extracts: proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism. *Oncotarget*. **8**, 70941–70957.
 31. Hardy J., Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. **297**, 353–356.
 32. LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509.
 33. de Vrij F.M., Fischer D.F., van Leeuwen F.W., Hol E.M. (2004) Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog. Neurobiol.* **74**, 249–270.
 34. Aso E., Lomoio S., López-González I., Joda L., Carmona M., Fernández-Yagüe N., Moreno J., Juvés S., Pujol A., Pamplona R., Portero-Otin M., Martín V., Díaz M., Ferrer I. (2012) Amyloid generation and dysfunctional immunoproteasome activation with disease progression in animal model of familial Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **22**, 636–653.
 35. Wagner L.K., Gilling K.E., Schormann E., Kloetzel P.M., Heppner F.L., Krüger E., Prokop S. (2017) Immunoproteasome deficiency alters microglial cytokine response and improves cognitive deficits in Alzheimer's disease-like APPPS1 mice. *Acta Neuropathol. Commun.* **24**, 52.
 36. Lemprière S. (2023) Neuroinflammation, not amyloid- β deposition, associated with brain network dysfunction in AD. *Nat. Rev. Neurol.* **19**, 66.
 37. Yeo I.J., Lee M.J., Baek A., Miller Z., Bhattarai D., Baek Y.M., Jeong H.J., Kim Y.K., Kim D.E., Hong J.T., Kim K.B. (2019) A dual inhibitor of the proteasome catalytic subunits LMP2 and Y attenuates disease progression in mouse models of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **5**, 18393.
 38. Lee M.J., Bhattarai D., Jang H., Baek A., Yeo I.J., Lee S., Miller Z., Lee S., Hong J.T., Kim D.E., Lee W., Kim K.B. (2021) Macrocyclic immunoproteasome inhibitors as a potential therapy for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **12**, 10934–10950.
 39. Tönnies E., Trushina E. (2017) Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **57**, 1105–1121.
 40. Butterfield D.A. (2002) Amyloid beta-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* **36**, 1307–1313.
 41. Pickering A.M., Koop A.L., Teoh C.Y., Ermak G., Grune T., Davies K.J. (2010) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **432**, 585–595.
 42. Bi M., Du X., Xiao X., Dai Y., Jiao Q., Chen X., Zhang L., Jiang H. (2021) Deficient immunoproteasome assembly drives gain of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Redox Biol.* **47**, 102167.
 43. Gillardon F., Kloss A., Berg M., Neumann M., Mechtler K., Hengerer B., Dahlmann B. (2007) The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity. *J. Neurochem.* **101**, 1483–1490.
 44. Bashore C., Dambacher C.M., Goodall E.A., Matyskiela M.E., Lander G.C., Martin A. (2015) Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 712–719.
 45. Bech-Otschir D., Helfrich A., Enenkel C., Consiglieri G., Seeger M., Holzhütter H.G., Dahlmann B., Kloetzel P.M. (2009) Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 219–225.
 46. Li X., Demartino G.N. (2009) Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin. *Biochem. J.* **421**, 397–404.
 47. Collins G.A., Goldberg A.L. (2017) The logic of the 26S proteasome. *Cell*. **169**, 792–806.
 48. Peth A., Besche H.C., Goldberg A.L. (2009) Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol. Cell*. **36**, 794–804.
 49. Guo Q., Lehmer C., Martínez-Sánchez A., Rudack T., Beck F., Hartmann H., Pérez-Berlanga M., Frottin F., Hipp M.S., Hartl F.U., Edbauer D., Baumeister W.,

- Fernández-Busnadiego R. (2018) *In situ* structure of neuronal C9orf72 Poly-GA aggregates reveals proteasome recruitment. *Cell*. **172**, 696–705.e12.
50. Gregori L., Fuchs C., Figueiredo-Pereira M.E., Van Nostrand W.E., Goldgaber D. (1995) Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **270**, 19702–19708.
51. Gregori L., Hainfeld J.F., Simon M.N., Goldgaber D. (1997) Binding of amyloid beta protein to the 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* **272**, 58–62.
52. Lopez Salon M., Pasquini L., Besio Moreno M., Pasquini J.M., Soto E. (2003) Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Exp. Neurol.* **180**, 131–143.
53. Zhao X., Yang J. (2010) Amyloid- β peptide is a substrate of the human 20S proteasome. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 655–660.
54. Morozov A.V., Kulikova A.A., Astakhova T.M., Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Adzhubei A.A., Erokhov P.A., Evgen'ev M.B., Sharova N.P., Karpov V.L., Makarov A.A. (2016) Amyloid- β increases activity of proteasomes capped with 19S and 11S regulators. *J. Alzheimers Dis.* **54**, 763–776.
55. Hirano H., Kimura Y., Kimura A. (2016) Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J. Proteomics.* **134**, 37–46.

Changes in the Activity and Content of Individual Forms of Proteasomes in Samples of the Cerebral Cortex during Pathology Development in 5xFAD Mice

A. V. Morozov^{1, *}, A. V. Burov¹, S. Yu. Funikov¹, E. V. Teterina², T. M. Astakhova³, P. A. Erokhov³, A. A. Ustyugov², and V. L. Karpov¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

³Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

The ubiquitin-proteasome system (UPS) provides hydrolysis of most intracellular proteins in proteasomes. There are various forms of proteasomes differing, among other things, in the set of proteolytic subunits and the presence of activators. Alzheimer's disease (AD) is characterized by disturbances in the functional state of the UPS. At the same time, an increase in the expression of certain forms of proteasomes, in particular, proteasomes containing immune subunits (non-constitutive proteasomes), was shown. Here, we studied dynamic changes in the expression of catalytic proteasome subunit genes and protein content in the cerebral cortex of animals using a mouse model of AD (5xFAD transgenic mice). In samples from 5xFAD mice, at the age of 380 days, compared with samples from mice of 60 days of age, 4 and 6 times more gene transcripts of the immune subunits *PSMB9* and *PSMB8* were detected, as well as a significant increase in the number of immune β -subunits (2.8 times – β 1i, 2.2 times – β 2i) was observed. The results obtained indicate activation of the synthesis of immune subunits and assembly of non-constitutive proteasomes at the terminal stage of pathology development. At the same time, the results of electrophoresis in native conditions indicate the activation of both 20S and 26S proteasomes containing immune subunits in samples from 5xFAD mice, 380 days of age. The obtained data, in combination with available literature, indicate that the activation of non-constitutive proteasomes is a universal phenomenon characteristic of various animal models of AD, that may reflect both the development of neuroinflammation and adaptive processes in tissues.

Keywords: Alzheimer's disease, proteasomes, non-constitutive proteasomes