

УДК 57.042

ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ И СОДЕРЖАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТЕАСОМ В ОБРАЗЦАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ МЫШЕЙ C57BL/6

© 2023 г. А. В. Буров^а, С. Ю. Фуников^а, Т. М. Астахова^б, Е. В. Тетерина^с, В. О. Небогатиков^с, П. А. Ерохов^б, А. А. Устюгов^с, В. Л. Карпов^а, А. В. Морозов^а, *

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

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

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

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

Протеасомы — ключевые компоненты убиквитин-протеасомной системы. Известны различные формы протеасом. При старении выявлены нарушения в функционировании протеасом, а также повышенная экспрессия отдельных их форм. Учитывая эти данные, мы изучили экспрессию генов, кодирующих конститутивные и иммунные субъединицы протеасом, в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 60, 190, 380 и 720 сут. Кроме того, в осветленных гомогенатах тканей исследовано содержание конститутивных и иммунных субъединиц протеасом, химотрипсинподобная и каспазаподобная активности протеасомных пулов, а также активность иммунной субъединицы $\beta 5i$. Охарактеризованы химотрипсинподобная активность и активность субъединицы $\beta 5i$ разных форм протеасом, разделенных электрофорезом в нативных условиях. По сравнению с молодыми особями в коре головного мозга животных в возрасте 720 сут выявлены следующие изменения в паттернах экспрессии генов протеасом: снижение для гена *PSMB5*, кодирующего конститутивную субъединицу протеасом $\beta 5$; активация генов, кодирующих иммунные субъединицы $\beta 5i$ и $\beta 1i$. В осветленных гомогенатах тканей возрастных мышей увеличено содержание иммунных субъединиц $\beta 1i$ и $\beta 2i$. В образцах от старых животных также выявлено снижение общей химотрипсинподобной активности и тенденция к снижению каспазаподобной, а также активности $\beta 5i$ субъединицы протеасом. По результатам анализа нативных комплексов в тканях старых животных обнаружено снижение химотрипсинподобной активности как 26S, так и 20S протеасом, содержащих субъединицу $\beta 5i$. На основании полученных данных можно предполагать, что в пуле неконститутивных протеасом головного мозга мышей происходят изменения, отражающие адаптационные процессы при старении.

Ключевые слова: старение, неконститутивные протеасомы, экспрессия генов, головной мозг, мыши
DOI: 10.31857/S0026898423050038, **EDN:** VFWCPU

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система важна для поддержания гомеостаза клеток и тканей за счет деградации большинства внутриклеточных белков [1]. Центральный элемент убиквитин-протеасомной системы — 20S протеасомы. Это мульти-субъединичные белковые комплексы, осуществляющие протеолиз белков. Функциональная активность и субстратная специфичность протеасом зависят от набора протеолитических субъединиц в составе комплекса. Протеасомы могут содержать только конститутивные субъединицы (конститутивные протеасомы), только иммунные или

иммунные и конститутивные каталитические субъединицы одновременно (в данной работе все протеасомы, содержащие иммунные субъединицы, мы называем “неконститутивные протеасомы”). Соотношение конститутивных и неконститутивных протеасом различно в разных органах. Так, в коре головного мозга большая часть протеасомного пула представлена конститутивными протеасомами, а иммунные органы, напротив, обогащены неконститутивными протеасомами. Протеасомный пул динамичен: при стрессе, накоплении в клетках белковых агрегатов или чужеродных белков в них возрастает содержание неконститутивных протеасом и меняется профиль

активности комплексов [2]. Формы протеасом, кроме того, отличаются наличием/отсутствием активаторов, которые обеспечивают доступ субстратов в протеолитическую камеру, что также сказывается на активности протеасом. Так, 20S протеасомы, несущие 19S активатор, называют 26S протеасомами. Такие комплексы специфически распознают и разрушают белки, меченные убиквитином. Протеасомы, в частности неконститутивные, могут взаимодействовать и с другими активаторами, например с 11S, что, по всей видимости, сказывается на их активности в отношении определенных субстратов [3]. Кроме того, активность протеасом может регулироваться их взаимодействием с другими белками (не входящими в состав активаторов) и посттрансляционными модификациями [3].

Процессы старения связаны с накоплением потенциально токсичных белковых агрегатов в клетках [4]. В этой связи функциональные изменения, происходящие в пуле протеасом с возрастом, представляют большой интерес и активно изучаются. Ранее при исследовании пула протеасом разных органов, в том числе центральной нервной системы стареющих крыс линий F344BN и Wistar, выявлено повышение экспрессии протеасом с иммунными каталитическими субъединицами [5–7]. С. Giannini и соавт. [8] сообщали, что в коре головного мозга стареющих крыс линии Sprague Dawley усиливается экспрессия субъединиц иммунных протеасом и снижается эффективность гидролиза флуорогенных субстратов 20S и 26S протеасомами. В тоже время деградация полиубиквитинированных модельных субстратов 26S протеасомами старых животных была немного повышена по сравнению с выделенными от молодых животных. Стоит заметить, что работ по изучению ассоциированных со старением изменений функциональной активности и состава протеасомного пула коры головного мозга мышей мало.

Нами исследована экспрессия генов протеасом, их субъединичный состав и активность отдельных форм (в том числе содержащих иммунные субъединицы) в коре головного мозга мышей линии C57BL/6 на разных этапах естественного старения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В экспериментах использовали самцов линии C57BL/6. Мышей содержали в SPF (Specific Pathogen Free) виварии Института физиологически активных веществ Российской академии наук в условиях искусственно регулируемого светового дня при температуре 22–26°C и свободном доступе к корму и воде. Работы с мышами проводили в полном соответствии с “Пра-

вилами лабораторной практики в Российской Федерации” от 01.04.2016 № 199н.

Получение образцов головного мозга мышей. В работе использовали образцы коры головного мозга мышей C57BL/6 в возрасте 60, 190 и 380 сут ($n = 6$ для каждого возраста) и 720 сут ($n = 4$). Все образцы головного мозга были изъяты хирургическим способом после терминальной анестезии животного и промаркированы, как описано ранее [9]. Образцы коры головного мозга помещали в 1.5-миллилитровые пробирки, замораживали в жидком азоте, после чего помещали на хранение при -80°C .

Выделение РНК и получение кДНК. Выделение тотальной РНК из образцов тканей животных проводили, используя набор GeneJET RNA Purification kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, используя прибор NanoDrop (“Thermo Fisher Scientific”). Для удаления ДНК образцы РНК обрабатывали ДНКазой, используя набор RapidOut DNA Removal kit (“Thermo Fisher Scientific”). Для получения кДНК использовали 1.5 мкг тотальной РНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с обратной транскриптазой Maxima H Minus (“Thermo Fisher Scientific”) и праймером oligo(dT)₂₀.

Оценка уровней экспрессии протеасомных генов. Содержание транскриптов генов субъединиц протеасом: *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB8*, *PSMB9*, *PSMB10* – и гена, кодирующего β -актин (*Actb*), оценивали методом ПЦР в реальном времени, используя набор Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (“Thermo Fisher Scientific”). Сравнительный анализ абсолютных уровней экспрессии протеасомных генов проводили с помощью разработанной ранее системы для количественный ПЦР в реальном времени [10].

Лизирование тканей и иммуноблотинг. Ткани коры головного мозга животных гомогенизировали в буфере для гомогенизации: 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 10% глицерина, 10 мМ Na₂S₂O₅, 2 мМ АТФ – из расчета 50 мкл буфера на 10 мг ткани. Полученные гомогенаты осветляли центрифугированием при 13000 g на центрифуге Eppendorf 5418R (“Eppendorf”, Германия) в течение 30 мин. Надосадочную фракцию собирали и определяли в ней концентрацию общего белка по методу Лоури. Белки разделяли электрофорезом в 12%-ном ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США). Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембрану 0.1%-ным раствором Ponceau Rouge (“Sigma-Aldrich”, США).

Для выявления субъединиц протеасом мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 1) в течение 2 ч, затем отмывали фосфат-

Таблица 1. Антитела, использованные в работе

Антитела/разведение	Производитель
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1$ /(1 : 1000)	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к субъединице $\beta 2$ /(1 : 1000)	“Enzo”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 5$ /(1 : 2000)	“GeneTex”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1i$ /(1 : 1000)	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела кролика к субъединице $\beta 2i$ /(1 : 1000)	“Abcam”, Великобритания
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 5i$ /(1 : 1000)	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к β -актину/(1 : 3000)	“Abcam”, Великобритания
HRP-меченые поликлональные антитела козы против IgG мыши/(1 : 30000)	“Enzo”, США
HRP-меченые поликлональные антитела козы против IgG кролика/(1 : 30000)	“Abcam”, Великобритания

ным буфером (ФБ), содержащим 0.1% Tween 20 (“Thermo Fisher Scientific”), и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (табл. 1), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Для дополнительного подтверждения наличия целевого белка и полуквантитативной оценки его содержания в образцах на гель наносили коммерческие препараты конститутивных и иммунных 20S протеасом (“Boston Biochem”, США). Для нормирования сигнала мембраны инкубировали с первичными антителами к β -актину (табл. 1) (после отмывки мембран от предыдущих антител сначала буфером для снятия антител: ФБ, 2% ДСН, 100 мМ β -меркаптоэтанол, — а затем дополнительно ФБ) в течение 1 ч, после чего отмывали ФБ и инкубировали с соответствующими вторичными HRP-мечеными антителами (табл. 1). Для детекции целевых белков использовали набор ECL Prime (“GE Healthcare”, Великобритания), полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>).

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную, каспазаподобную активности протеасом, а также специфическую активность субъединицы $\beta 5i$ в осветленных гомогенатах образцов коры головного мозга мышей оценивали, как описано ранее [9]. Для определения химотрипсинподобной активности протеасом использовали флуорогенный субстрат Suc-LLVY-AMC (“Sigma-Aldrich”), каспазаподобной — Z-LLE-AMC (“Sigma-Aldrich”), а активность субъединицы $\beta 5i$ оценивали по эффективности гидролиза флуорогенного субстрата Ac-ANW-AMC (“Boston Biochem”). Измерения проводили на флуориметре VersaFluor Fluorometer (“Bio-Rad”) — как минимум в трех повторах для каждого образца.

Определение активности протеасом в нативном ПААГ. Активность протеасом в неденатурирующем ПААГ определяли, как описано ранее [9]. Осветленные гомогенаты образцов коры головного мозга животных (~20 мкг общего белка) наносили на градиентный 4–20%-ный ПААГ. Элек-

трофорез проводили в течение 36 ч при 4°C (12 ч при 80 V, 12 ч при 140 V, 12 ч при 240 V). По окончании процесса гель помещали на 30 мин в раствор, содержащий флуорогенный субстрат (Suc-LLVY-AMC для оценки химотрипсинподобной активности или Ac-ANW-AMC для оценки активности $\beta 5i$ субъединицы). Гель анализировали под ультрафиолетом и фотографировали, после чего проводили анализ изображений с помощью программы ImageJ. Для подтверждения одинаковой белковой нагрузки между образцами гель окрашивали Coomassie G-250 (“Serva”, Германия).

Статистический анализ результатов. Для оценки значимости наблюдаемых изменений после проведения ПЦР использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением критерия Тьюки в качестве поправки на множественные сравнения. Статистический анализ результатов иммуноблотинга и измерения активности протеасом проводили, сравнивая каждую точку с данными в контрольной группе, с использованием критерия Манна–Уитни и приложения GraphPad Prism V8.4.3. (“GraphPad Software”, США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения изменений в пуле протеасом коры головного мозга, сопровождающих процессы старения мышей, использованы образцы от животных линии C57BL/6 четырех возрастных групп: 60, 190, 380, 720 сут. Используя разработанную нами ранее ПЦР-систему [10], мы оценили экспрессию генов *PSMB5–7*, кодирующих конститутивные каталитические субъединицы, и генов *PSMB8–10*, кодирующих иммунные каталитические субъединицы протеасом. Показано, что экспрессия всех исследованных генов в образцах 60, 190 и 380-дневных мышей достоверно не различалась (рис. 1) и соответствовала данным, полученным нами ранее [9]. Однако в образцах животных в возрасте 720 сут, по сравнению с животными 380-дневного возраста, обнаружены су-

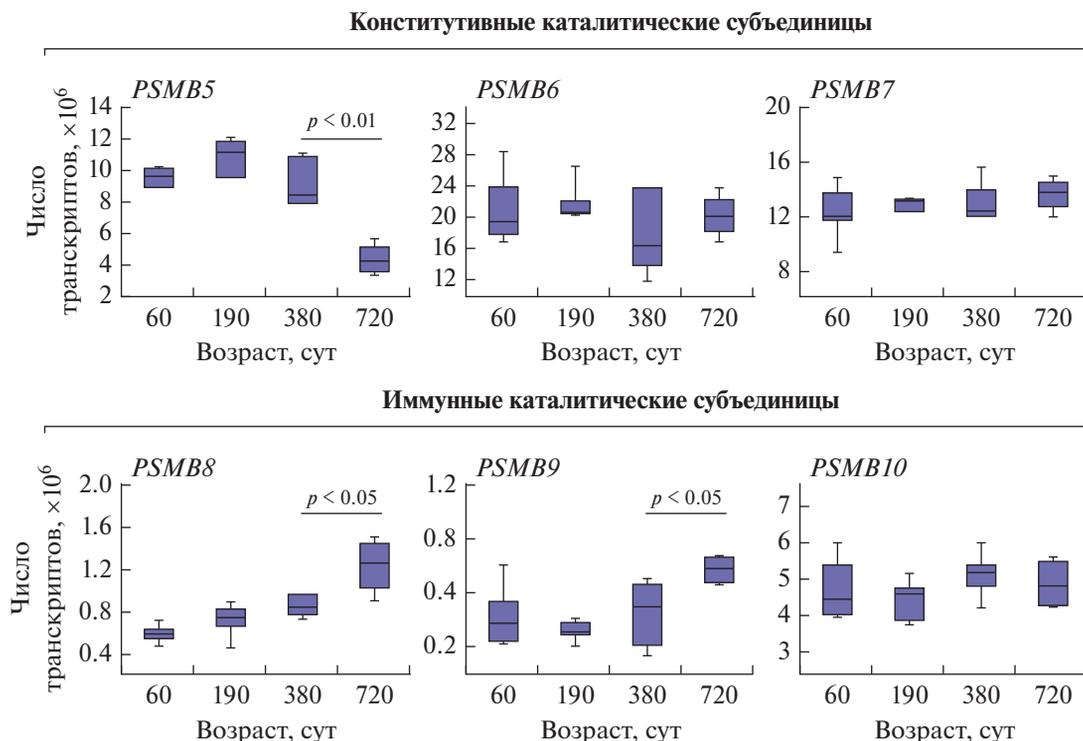


Рис. 1. Динамика уровней экспрессии генов субъединиц протеасом в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 разного возраста ($n = 6$ в группах животных в возрасте 60, 190 и 380 сут, $n = 4$ – в возрасте 720 сут). Указана медиана значений в выборке. Статистическая значимость различий оценена с помощью ANOVA (критерий Тьюки).

существенные изменения уровней транскриптов иммунных и конститутивных субъединиц протеасом. Так, выявлено почти двукратное увеличение экспрессии гена *PSMB8*, кодирующего иммунную субъединицу $\beta 5i$, и гена *PSMB9* (иммунная субъединица $\beta 1i$), а также снижение (до 2.5 раз) экспрессии гена *PSMB5*, кодирующего конститутивную субъединицу $\beta 5$ (рис. 1).

Полученные данные указывают на то, что при старении в клетках коры головного мозга мышей C57BL/6 происходят изменения в составе пула протеасом с перераспределением их форм в пользу увеличения неконститутивных. Для выяснения конкретных возрастных изменений в протеасомных паттернах мы исследовали методом иммуноблоттинга содержание конститутивных каталитических субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ и иммунных каталитических субъединиц $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ в осветленных гомогенатах образцов коры головного мозга мышей C57BL/6 разного возраста (рис. 2).

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, на протяжении всего срока исследования содержание конститутивных субъединиц $\beta 1$ и $\beta 2$ было стабильным. В гомогенатах коры головного мозга мышей 380- и 720-дневного возраста выявлено существенное увеличение содержания иммунных субъединиц $\beta 1i$ и $\beta 2i$. Следует отметить, что используемые в исследовании антитела практически не “работали” на субъединице $\beta 5i$, как в

образцах тканей животных, так и в коммерческих препаратах иммунных протеасом (данные не приведены). Несмотря на полученные данные о снижении уровня экспрессии гена, кодирующего конститутивную субъединицу $\beta 5$ (рис. 1), в гомогенатах тканей старых мышей выявлено повышенное содержание этой субъединицы (рис. 2).

На основе данных об увеличении содержания иммунных субъединиц протеасом можно предположить увеличение общей химотрипсинподобной активности, снижение каспазаподобной, а также увеличение активности иммунных субъединиц в образцах тканей старых животных. Однако в ходе изучения изменений функциональной активности протеасом коры головного мозга мышей в возрасте 720 сут выявлено достоверное снижение химотрипсинподобной активности, а также тенденция к снижению каспазаподобной активности и активности субъединицы $\beta 5i$ (рис. 3).

Взаимодействие протеасом с активаторами изменяет молекулярную массу протеасом, что позволяет разделять различные формы протеасом по наличию активатора электрофорезом в условиях поддержания нативности протеолитических комплексов. При электрофоретическом анализе образцов тканей животных в неденатурирующих условиях выявлены как свободные 20S протеасомы, так и связанные с активаторами: 26S протеасомы с одним или двумя 19S активаторами и, ве-

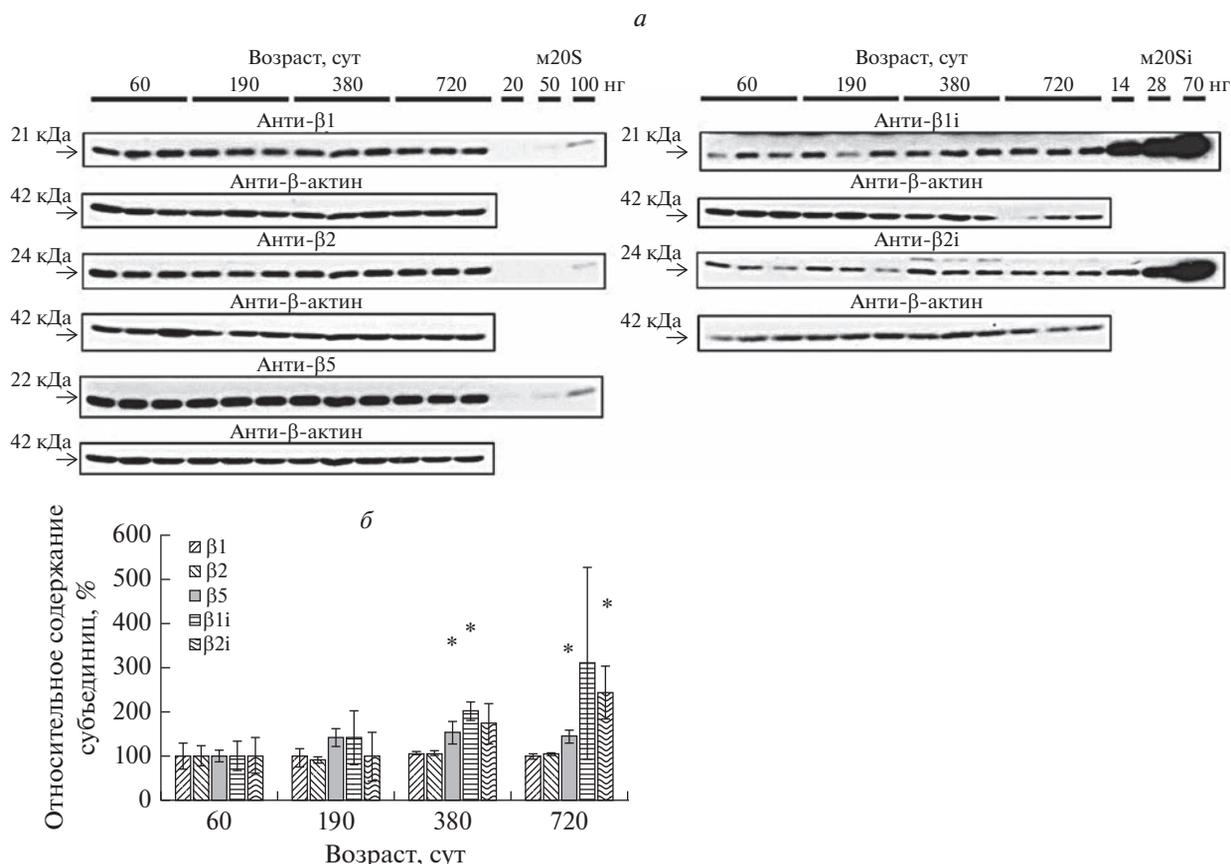


Рис. 2. Анализ содержания субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 1i$, $\beta 2i$ протеасом в осветленных гомогенатах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 разного возраста. *a* – Иммуноблоттинг гомогенатов с антителами против субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 1i$, и $\beta 2i$. В каждом эксперименте использованы образцы коры головного мозга от трех мышей одного и того же возраста. В качестве стандартного образца использованы серийные разведения коммерческих мышинных конститутивных (m20S) и иммунных (m20Si) протеасом (“R&D Systems”, Великобритания). *b* – Анализ полученных результатов с помощью программы ImageJ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия Манна–Уитни; $*p < 0.05$.

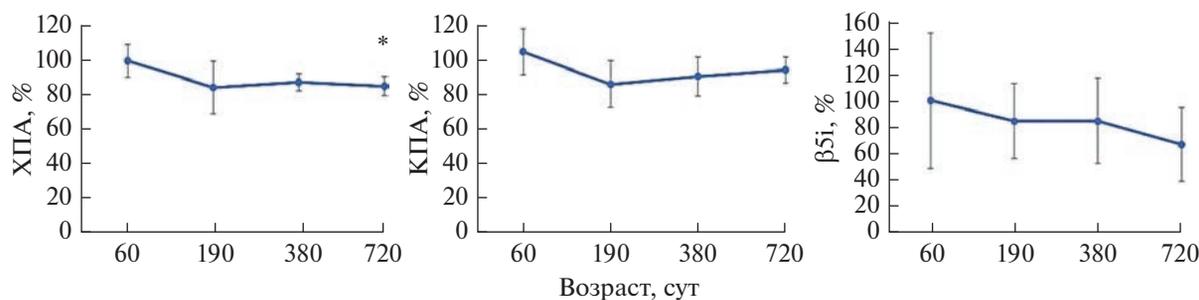


Рис. 3. Анализ химотрипсинподобной, каспазаподобной активности протеасом, а также активности субъединицы $\beta 5$ (ХПА) и каспазаподобной (КПА) активности протеасом, а также активности субъединицы $\beta 5i$ ($\beta 5i$) использованы флуорогенные субстраты Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC и Ac-ANW-AMC соответственно. За 100% принимали активность протеасом в группе молодых животных (60 сут). Результаты представлены как среднее \pm SD. Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия Манна–Уитни; $*p < 0.05$.

роятно, 20S протеасомы с одним или двумя 11S активаторами (рис. 4) [9, 11, 12]. С использованием флуорогенных субстратов определена их химотрипсинподобная активность, а также активность встроенных субъединиц $\beta 5i$ (рис. 4).

В результате проведенного анализа показано, что в коре головного мозга животных линии C57BL/6 с возрастом намечена тенденция к снижению химотрипсинподобной активности как в зоне локализации 26S, так и 20S протеасом. Стоит

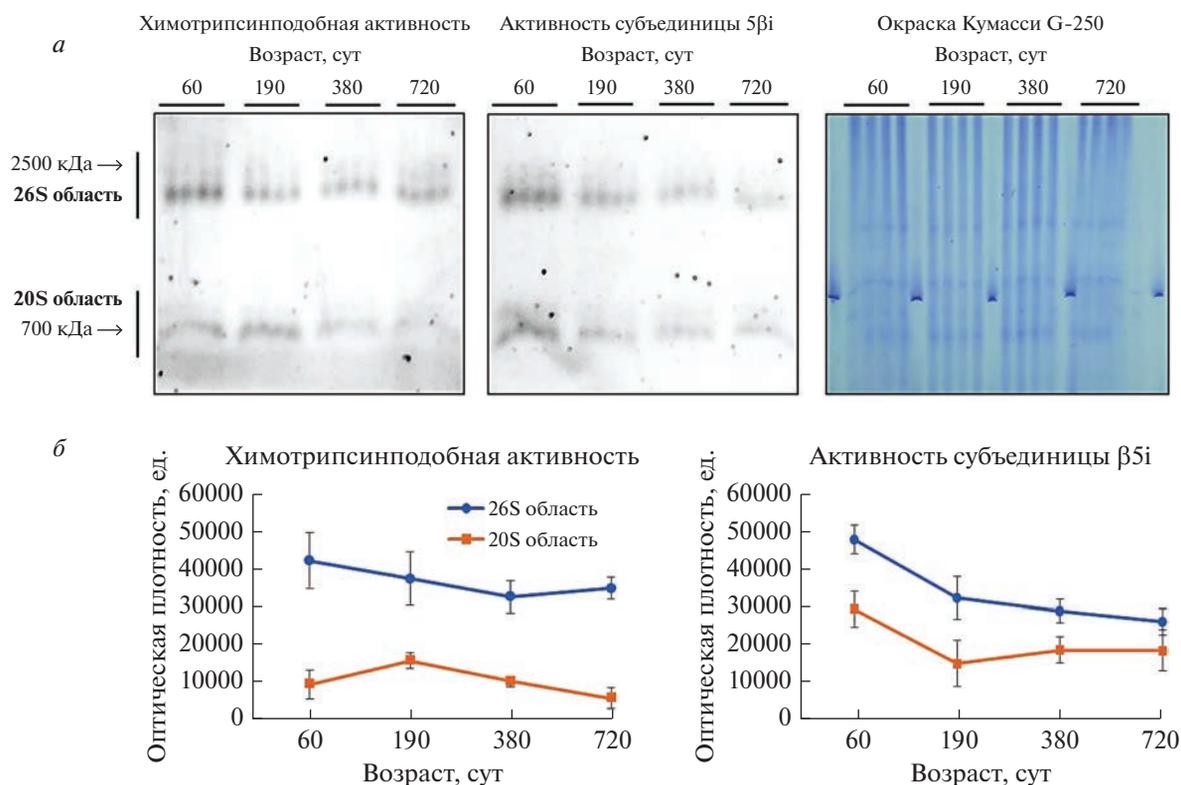


Рис. 4. Распределение химотрипсинподобной активности и активности субъединицы $\beta 5i$ между 20S и 26S протеасомами коры головного мозга мышей C57BL/6 разного возраста ($n = 4$ для каждой группы). *а* – Активность протеасом в областях геля, соответствующих подвижности 20S и 26S протеасом в нативном ПААГ (см. раздел “Экспериментальная часть”), определяли с использованием соответствующих флуорогенных субстратов. *б* – Химотрипсинподобную активность и активность субъединицы $\beta 5i$ оценивали по оптической плотности сигналов с изображений, представленных на виде *а*, с помощью программы ImageJ. Результаты представлены как среднее \pm SD.

отметить, что общая химотрипсинподобная активность протеасом в 26S-зоне была выше, чем в области 20S. Активность субъединицы $\beta 5i$ выявлена в обеих зонах локализации протеасом; при этом к 720 дню жизни, как в 26S-зоне, так и в 20S, замечено ее снижение, несмотря на активацию экспрессии гена, кодирующего субъединицу $\beta 5i$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Старение ассоциировано с накоплением окисленных и поврежденных белков в клетках и тканях, что в свою очередь может провоцировать развитие воспаления, стресса и, как следствие, различных заболеваний [13–15]. Вместе с тем накопление окисленных и поврежденных белков рассматривают как маркер нарушений в работе систем внутриклеточного протеолиза. Мы провели комплексное исследование пула протеасом коры головного мозга здоровых мышей линии C57BL/6 четырех возрастных групп: 60, 190, 380 и 720 сут – и проанализировали динамику изменений исследуемых параметров на протяжении практически всей жизни животных. Полученные данные о снижении экспрессии генов конститу-

тивных субъединиц и повышении экспрессии генов иммунных субъединиц протеасом согласуются с результатами, полученными на других моделях [4–8, 16]. В лизатах коры головного мозга животных в возрасте 720 сут выявлено увеличение (в среднем в 2–3 раза) содержания иммунных субъединиц $\beta 1i$ и $\beta 2i$ по сравнению с образцами от 60-дневных животных (рис. 2). Таким образом, в пуле внутриклеточных протеасом происходят изменения, которые ведут к перераспределению в пользу увеличения фракции протеасом с иммунными субъединицами.

Известно, что стресс и образование агрегатов белков в клетке приводит к изменению пула протеасом, в частности к повышению экспрессии неконститутивных комплексов, для которых характерна повышенная, по сравнению с конститутивными, эффективность деградации окисленных и поврежденных белков [14, 17–20]. Таким образом, индукция протеасом может отражать активацию компенсаторных механизмов, направленных на поддержание протеостаза. Кроме того, известно, что старение сопровождается развитием нейровоспаления [21], которое также может стимулировать сборку протеасом, содержащих им-

мунные субъединицы, хотя, по некоторым данным, эффективность индукции иммунопротеасом интерфероном- γ с возрастом снижается [22]. Нами показано, что, несмотря на увеличение содержания неконститутивных протеасом при старении, общая химотрипсинподобная активность, которую проявляют субъединицы $\beta 5$, $\beta 5i$ и $\beta 1i$, и активность субъединицы $\beta 5i$ в отдельности снижаются как в составе 26S, так и в составе 20S протеасом (рис. 4). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что, с одной стороны, при старении происходит стимуляция синтеза неконститутивных протеасом, а с другой — их деактивация, вероятно, за счет посттрансляционных модификаций и/или взаимодействия с белковыми агрегатами, а также эндогенными ингибиторами, такими как P131, — что наблюдается при различных возрастных заболеваниях [19, 23, 24]. Таким образом, несмотря на повышение экспрессии иммунных субъединиц, активность неконститутивных протеасом, как минимум при измерении с помощью флуорогенных субстратов, не увеличивается с возрастом.

В целом, можно предположить, что старение сопровождается активацией компенсаторных механизмов, в которых убиквитин-протеасомная система участвует в том числе путем повышения экспрессии неконститутивных протеасом. Однако снижение их активности не позволяет эффективно нейтрализовать накопление окисленных и поврежденных белков в клетках. В этой связи важно упомянуть, что при анализе образцов тканей долгожителей и долгоживущих животных, таких как голые землекопы и гигантские моллюски, выявлена повышенная активность протеасом [4, 25, 26]. Кроме того, у долгоживущих приматов обнаружен повышенный уровень экспрессии генов иммунных субъединиц протеасом и высокая протеасомная активность [27]. По-видимому, на основании этих данных можно говорить о прогностической значимости показателя активности протеасом, а также об использовании стратегий, направленных на модуляцию активности различных форм протеасом [28–31], для продления жизни и повышения ее качества.

Работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 18-74-10095.

Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 01.04.2016 № 199н.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ciechanover A., Kwon Y.T. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* **47**, e147.
- Ferrington D.A., Gregerson D.S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 75–112.
- Morozov A.V., Karpov V.L. (2018) Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon.* **4**, e00894.
- Chondrogianni N., Petropoulos I., Franceschi C., Friguet B., Gonos E.S. (2000) Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp. Gerontol.* **35**, 721–728.
- Husom A.D., Peters E.A., Kolling E.A., Fugere N.A., Thompson L.V., Ferrington D.A. (2004) Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **421**, 67–76.
- Ferrington D.A., Husom A.D., Thompson L.V. (2005) Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* **19**, 644–646.
- Gavilán M.P., Castaño A., Torres M., Portavella M., Caballero C., Jiménez S., García-Martínez A., Parrado J., Vitorica J., Ruano D. (2009) Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *J. Neurochemistry.* **108**, 260–272.
- Giannini C., Kloß A., Gohlke S., Mishto M., Nicholson T.P., Sheppard P.W., Kloetzel P.M., Dahlmann B. (2013) Poly-Ub-substrate-degradative activity of 26S proteasome is not impaired in the aging rat brain. *PLoS One.* **7**, e64042.
- Морозов А.В., Буров А.В., Фуников С.Ю., Тетерина Е.В., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Устюгов А.А., Карпов В.Л. (2023) Изменения активности и содержания отдельных форм протеасом в образцах коры головного мозга при развитии патологии у мышей линии 5×FAD. *Молекуляр. биология.* **57**(5), 873–885.
- 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**(1), 54–63.
- 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.
- 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. Alzheimer's Dis.* **54**, 763–776.
- Chondrogianni N., Stratford F.L., Trougakos I.P., Friguet B., Rivett A.J., Gonos E.S. (2003) Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 28026–28037.
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell.* **153**, 1194–1217.

15. Saez I., Vilchez D. (2014) The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases. *Curr. Genomics*. **15**, 38–51.
16. Ly D.H., Lockhart D.J., Lerner R.A., Schultz P.G. (2000) Mitotic misregulation and human aging. *Science*. **287**, 2486–2492.
17. 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.
18. Pickering A.M., Davies K.J.A. (2012) Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 227–248.
19. Grune T., Jung T., Merker K., Davies K.J. (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggregates' during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2519–2530.
20. Abi Habib J., De Plaen E., Stroobant V., Zivkovic D., Bousquet M.P., Guillaume B., Wahni K., Messens J., Busse A., Vigneron N., Van den Eynde B.J. (2020) Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. *Sci. Rep.* **10**, 15765.
21. Sparkman N.L., Johnson R.W. (2008) Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*. **15**, 323–330.
22. Stratford F.L., Chondrogianni N., Trougakos I.P., Gonos E.S., Rivett A.J. (2006) Proteasome response to interferon- γ is altered in senescent human fibroblasts. *FEBS Lett.* **580**, 3989–3994.
23. Powell S.R., Wang P., Divald A., Teichberg S., Haridas V., McCloskey T.W., Davies K.J., Katzeff H. (2005) Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1093–1101.
24. Johnston-Carey H.K., Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. (2015) The immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 268–281.
25. Pérez V.I., Buffenstein R., Masamsetti V., Leonard S., Salmon A.B., Mele J., Andziak B., Yang T., Edrey Y., Friguet B., Ward W., Richardson A., Chaudhuri A. (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 3059–3064.
26. Ungvari Z., Csiszar A., Sosnowska D., Philipp E.E., Campbell C.M., McQuary P.R., Chow T.T., Coelho M., Didier E.S., Gelino S., Holmbeck M.A., Kim I., Levy E., Sonntag W.E., Whitby P.W., Austad S.N., Ridgway I. (2013) Testing predictions of the oxidative stress hypothesis of aging using a novel invertebrate model of longevity: the giant clam (*Tridacna derasa*). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **68**, 359–367.
27. Pickering A.M., Lehr M., Miller R.A. (2015) Lifespan of mice and primates correlates with immunoproteasome expression. *J. Clin. Invest.* **125**, 2059–2068.
28. Chondrogianni N., Voutetakis K., Kapetanou M., Delitsikou V., Papaevgeniou N., Sakellari M., Lefaki M., Filippopoulou K., Gonos E.S. (2015) Proteasome activation: an innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **23**, 37–55.
29. Chondrogianni N., Voutetakis K., Kapetanou M., Delitsikou V., Papaevgeniou N., Sakellari M., Lefaki M., Filippopoulou K., Gonos E.S. (2005) Overexpression of proteasome $\beta 5$ assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J. Biol. Chem.* **280**, 11840–11850.
30. Tonoki A., Kuranaga E., Tomioka T., Hamazaki J., Murata S., Tanaka K., Miura M. (2009) Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1095–1106.
31. Vilchez D., Morante I., Liu Z., Douglas P.M., Merkwirth C., Rodrigues A.P., Manning G., Dillin A. (2012) RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature*. **489**, 263–268.

Dynamic Changes in the Activity and Content of Particular Proteasome Forms in Cerebral Cortex of C57BL/6 Mice during Aging

A. V. Burov¹, S. Yu. Funikov¹, T. M. Astakhova², E. V. Teterina³, V. O. Nebogatikov³, P. A. Erokhov²,
A. A. Ustyugov³, V. L. Karpov¹, and A. V. Morozov¹, *

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

²Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Proteasomes are key components of the ubiquitin-proteasome system. Various forms of proteasomes are known. During aging, disturbances in the functioning of proteasomes were revealed, as well as an increased expression of their individual forms. Considering these data, we studied the expression of genes encoding the constitutive and immune subunits of proteasomes in the cerebral cortex samples from C57BL/6 mice at the age of 60, 190, 380, and 720 days. In addition, the content of constitutive and immune proteasome subunits, chymotrypsin-like and caspase-like activities of proteasome pools, as well as the activity of the $\beta 5i$ immune subunit were studied in tissue homogenates. The chymotrypsin-like activity and the activity of the $\beta 5i$ subunit

of different forms of proteasomes separated by electrophoresis under native conditions were characterized. Compared with samples from young animals, in the cerebral cortex of animals aged 720 days the following changes in the expression patterns of proteasome genes were revealed: a decrease in the expression of *PSMB5* gene encoding the constitutive proteasome subunit $\beta 5$; activation of genes encoding immune subunits $\beta 5i$ and $\beta 1i$. In clarified tissue homogenates of aged mice, an increase in the content of immune subunits $\beta 1i$ and $\beta 2i$ was shown. In samples from old animals, decreased chymotrypsin-like activity and a tendency to a decrease in caspase-like activity of proteasomes as well as the $\beta 5i$ subunit activity were also revealed. Analysis of the activity of native complexes in the tissues of old animals revealed decreased chymotrypsin-like activity of both 26S and 20S proteasomes containing the $\beta 5i$ subunit. Based on the data obtained, it can be assumed that changes in the pool of non-constitutive proteasomes reflect aging-associated adaptive processes in mouse brain.

Keywords: aging, non-constitutive proteasomes, gene expression, brain, mice