

©Коллектив авторов

КАЧЕСТВЕННОЕ РАЗЛИЧИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СУБПРОТЕОМОВ RPN10- И RPN13-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА

О.А. Бунеева, А.Т. Копылов, А.Е. Медведев*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com

Накапливается всё больше данных в пользу того, что убиквитин-протеасомная система (UPS) играет важную роль в деградации митохондриальных белков и белков мембран, ассоциированных с митохондриями (так называемые МАМ-белки). В митохондриях обнаружены все компоненты убиквитин-конъюгирующей системы, необходимые для присоединения молекул убиквитина к белкам-мишеням, подлежащим последующей деградации в протеасомах. Важным этапом доставки белков, подлежащих протеолитической деградации в протеасомах, является их взаимодействие с рецепторами убиквитина, расположенными на регуляторной субчастице (19S) протеасомы: субъединицей Rpn10 или Rpn13. Считается, что обе субъединицы вносят одинаковый вклад в последующую транслокацию белков-мишеней в коровую часть протеасомы. Сравнительное исследование митохондриальных субпротеомов мозга мышей, связывающихся с субъединицами Rpn10 и Rpn13, выявило высокую специфичность репертуара Rpn10- и Rpn13-связывающих белков. При этом количество белков, для которых ранее была показана митохондриальная локализация или ассоциация с митохондриальными мембранами, преобладало при использовании в качестве аффинного лиганда субъединицы Rpn13. Все это свидетельствует в пользу того, что Rpn10 и Rpn13 играют разные роли в деградации белков митохондрий и МАМ.

Ключевые слова: убиквитин-протеасомная система; Rpn10- и Rpn13-связывающие белки; митохондриальная фракция мозга; субпротеом

DOI: 10.18097/PBMC20206602138

ВВЕДЕНИЕ

Накапливается всё больше данных в пользу того, что убиквитин-протеасомная система (UPS) играет важную роль в деградации митохондриальных белков [1-5], а также белков мембран, ассоциированных с митохондриями (так называемые МАМ-белки). В митохондриях обнаружены все компоненты убиквитин-конъюгирующей системы (E1-E3), которые необходимы для присоединения молекул убиквитина к белкам-мишеням, подлежащим последующей деградации в протеасомах [5, 6], а сами протеасомы могут связываться с этими органеллами [5-8].

Протеасомы – сложно организованные мультиферментные частицы, присутствующие во всех прокариотических и эукариотических клетках и предназначенные для селективной деградации внутриклеточных белков [9, 10] (рис. 1). В них различают коровую часть – 20S субчастицу, субъединицы которой обладают каспазоподобной, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной активностями и осуществляют протеолитическую деградацию поступивших в нее субстратов [9-11], и регуляторную часть – 19S субчастицу. В составе последней субъединицы Rpn10 и Rpn13 служат убиквитиновыми рецепторами [9, 10], которые, по-видимому, вносят равный вклад в последующую транслокацию белков-мишеней в коровую часть (20S протеасому).

Недавно проведенное протеомное профилирование митохондриальной фракции мозга мышей выявило большую группу белков, связывающихся с субъединицей Rpn10, которая была использована в качестве аффинного лиганда [12].

Целью данной работы было сравнительное исследование митохондриальных субпротеомов мозга мышей, связывающихся с субъединицами Rpn10 и Rpn13.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использованы следующие реактивы и материалы: бромциан-активированная сефароза 4В, дитиотеитол, Трис (гидроксиэтил) аминометан, мочевины, гуанидин гидрохлорид, гидрокарбонат аммония, хлористый натрий, Тритон X-100, глицерин, коктейль ингибиторов протеаз, 4-винилпирдин, дезоксихолат натрия, бикарбонат триэтиламония, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Sigma Aldrich”, США); ацетат натрия, борная кислота, тетраборат натрия, гидроксид натрия (“Acros Organics”, США); ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); муравьиная кислота, трихлоруксусная кислота, изопропанол (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade; “Promega”, США); мембранные фильтры 10 кДа (“Sartorius Stedium Biotech”, Германия); субъединица 19S протеасомы Rpn10 человеческая рекомбинантная (“Enzo Life Sciences”, США); субъединица 19S протеасомы Rpn13 человеческая рекомбинантная (“UBPBio”, США); колонки MICRO SPIN COLUMN C18 (“Pierce”); центрифужные концентрационные фильтры Amicon Ultracel-10K (“Millipore”, США); колонка Acclaim PepMap® RSLC C18 (150 мм × 75 мкм, размер

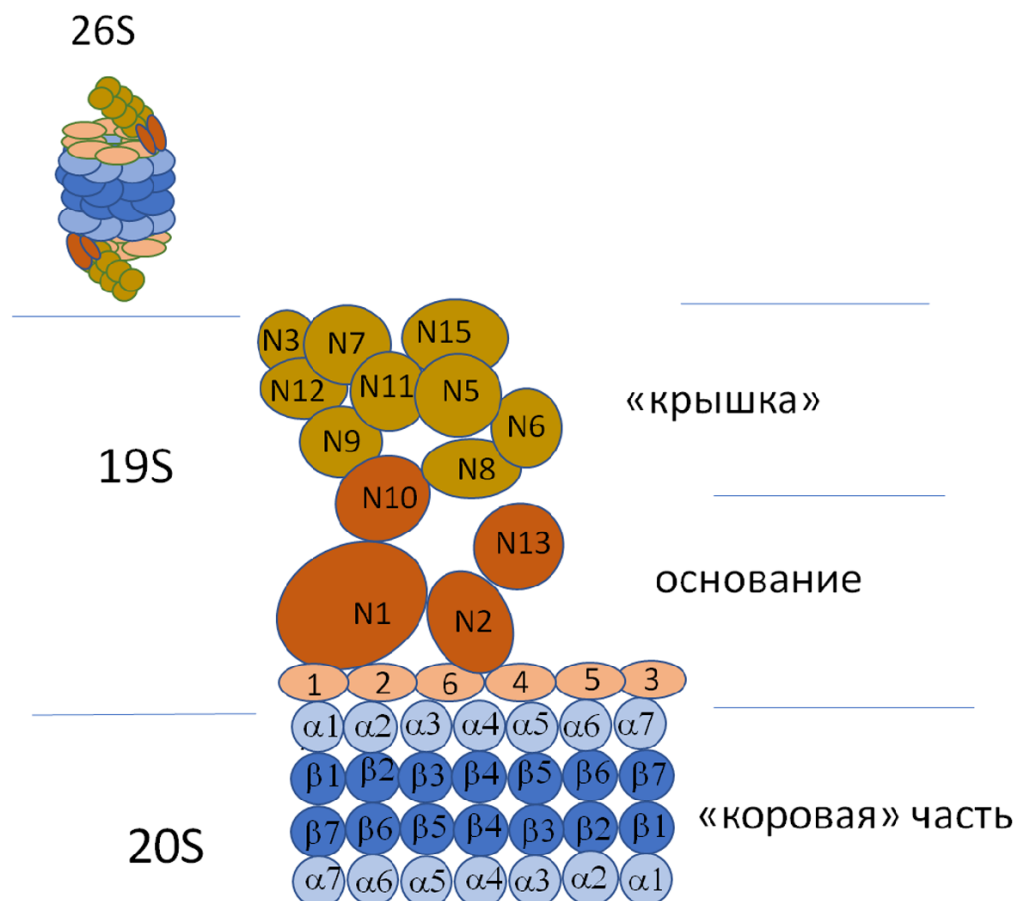


Рисунок 1. Схема строения протеасомы. К сердцевинной (коровой) части с коэффициентом седиментации 20S (обозначена синим цветом) могут присоединяться одна или две регуляторные субчастицы 19S. На рисунке показаны коровая (протеолитическая) часть протеасомы с одной регуляторной субчастицей. Коровая часть представлена четырьмя лежащими друг на друге кольцами, каждое из которых состоит из семи белковых субъединиц. Наружные кольца состоят из субъединиц альфа типа, способствующих проникновению субстратов во внутреннюю полость, образованную бета субъединицами, обладающими протеолитической активностью. Регуляторная субчастица протеасомы состоит из двух комплексов – «крышки» и основания. «Крышка» образована Rpn субъединицами, не обладающими АТРазной активностью (**R**egulatory **p**article **n**on-ATPase), на схеме обозначенными буквой N. Субъединицы основания, прилегающие к сердцевинной части протеасомы, относятся к классу АТРаз AAA-суперсемейства и носят название Rpt (**R**egulatory **p**article **t**ripleA-ATPase). На нашей схеме они обозначены оранжевыми овалами с цифрами 1-6 (соответственно Rpt1–Rpt6). Субъединицы Rpn10 и Rpn13, не обладающие АТРазной активностью и обеспечивающие связывание убиквитинированных субстратов, обозначены как N10 и N13. В левом верхнем углу показана 26S протеасома с двумя регуляторными (19S) субчастицами, присоединёнными к протеолитической (20S) части. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.

частиц 2 мкм, размер пор 100 Å) («Dionex», США). Остальные реагенты были отечественного производства высшей степени чистоты.

Иммобилизация субъединиц протеасомы на бромциан-активированной сефарозе

Ковалентное связывание субъединиц протеасомы с бромциан-активированной сефарозой 4В (CNBr-сефароза) осуществляли согласно следующей методике: 500 мг сухой CNBr-сефарозы (что соответствует 1,75 мл набухшего осевшего геля) оставляли набухать на 15 мин в 25 мл 1 мМ HCl. Затем промывали на стеклянном фильтре 100 мл 1 мМ HCl и 25 мл 0,1 М боратного буфера, pH 8,3, содержащего 0,5 М NaCl (буфер для связывания). К осевшей сефарозе добавляли раствор белка (0,1 мг/мл)

в буфере для связывания и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После отмывания несвязавшегося белка 30 объёмами боратного буфера непрореагировавшие активные группировки сефарозы блокировали 0,05 М трис HCl, pH 8,0, содержащим 0,5 М NaCl (2 ч при перемешивании и комнатной температуре). Затем удаляли избыток блокирующего реагента, промывая сефарозу поочерёдно буфером для связывания и 0,1 М Na ацетатным буфером, pH 4,0, содержащим 0,5 М NaCl (по 125 мл, 3-4 раза).

Для определения неспецифически связывающихся с аффинным сорбентом белков использовали контрольную бромциан-активированную сефарозу, которую подвергали тем же процедурам, но без добавления протеасомных субъединиц.

Выделение и идентификация связывающихся с субъединицами протеасом белков митохондрий мозга мышей

В работе использовали суммарную митохондриальную фракцию мозга мышей C57BL/6 (20 мг/мл), выделенную методом дифференциального центрифугирования [12] и хранившуюся при -20°C . После размораживания митохондриальную фракцию лизировали раствором тритона X-100 (в течение 60 мин при 4°C) и осветляли при помощи центрифугирования при 16000 g в течение 30 мин, используя в последующих экспериментах надосадочную жидкость.

Аффинную хроматографию белков на сефарозе с иммобилизованными субъединицами протеасомы для их последующего масс-спектрометрического анализа проводили следующим образом.

К аффинному носителю и к контрольной сефарозе, промытыми 0,05 М калий-фосфатным буфером (pH 7,4) (буфер А), добавляли лизат митохондрий мозга мыши с концентрацией 6 мг/мл. Инкубировали ночь в суспензии (1:1) при 4°C и осторожном перемешивании (при добавлении коктейля ингибиторов протеаз в концентрации, рекомендованной производителем). После отмывания неспецифически связавшихся белков буфером А с 0,3 М NaCl до исчезновения белка в промывных водах (контроль по D_{280}) осуществляли при комнатной температуре элюцию 1 М глициновым буфером, pH 2,8, содержащим 0,3 М NaCl, (скорость 0,5 мл/мин). Концентрировали элюат до объема 250 мкл с помощью мембранных фильтров Amicon Ultra, как рекомендовано производителем. Затем осаждали белки смесью хлороформ-этанол, как описано в [13]. Восстановление дисульфидных связей, алкилирование сульфгидрильных групп и трипсинолиз проводили на мембранных центрифужных фильтрах, как описано в [14].

Хроматографическое разделение проводили на системе Ultimate 3000 RSLC Nano ("Thermo Scientific", США). Аналитическое время – 55 мин, время уравнивания – 13 мин, общее время анализа – 68 мин. Скорость загрузки на обогащающую колонку в растворе 2% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой составляла 15 мкл/мин. Разделение пептидов проводили в градиенте подвижной фазы "А" (водный раствор 0,01% муравьиной кислоты, 0,03% уксусной кислоты) и подвижная фаза "В" (90% ацетонитрил, 10% метанол, 0,01% муравьиная кислота, 0,03% уксусная кислота) на стационарной фазе Acclaim Пермар® (геометрия 75 мкм × 150 мм, 1,8 мкм, 60 Å). Начальные условия градиента элюции 98% "А" к 2% "В" в течение 4 мин, затем увеличение содержания фазы "В" до 35% в течение последующих 40 мин, затем до 90% "В" в течение последующих 3 мин и удержание в течение 8 мин при скорости потока 0,3 мкл/мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q-Exactive HF-X ("Thermo Scientific") с источником ионизации NSI в режиме положительной

электростатической ионизации. Сканирования родительских ионов проводили с изоляцией через квадруполь в диапазоне $\pm 1,5$ Th при номинальном разрешении $R=70$ К в диапазоне m/z 450–1300 с зарядом $z = 2+...4+$ и максимальным временем интеграции ионов не более 10 мс, минимальное число интеграции – $2e5$ ионов. Tandemное сканирование проводилось с окном изоляции ± 1 m/z и нормированной энергией активации 28% в режиме HCD. Длительность одного полного цикла составляла 1,85 с.

Файлы данных в формате "raw" конвертировали в формат "mgf" с использованием MSConvert (ProteomeWizard). Идентификацию проводили против базы данных (Human, версия Uniprot от декабря 2019 года), содержащую нативные и обращенные аминокислотные последовательности белков. Трипсин был выбран в качестве специфичной протеазы (специфичное расщепление по аминокислотным остаткам лизина и аргинина) с максимальным допустимым числом внутренних участков расщепления в пептиде не более трёх (так как внутренние участки могут быть вызваны наличием остатка убиквитина, связанного с боковым радикалом лизина). Диапазон разрешённых зарядов родительских ионов от $z = 2+$ до $z = 4+$ с допустимой точностью измерения иона ± 5 ppm и допустимой точностью измерения фрагментного иона $\pm 0,005$ Да. Для идентификации пептидов использовали также переменные (дезамидирование Q/E, окисление метионина и убиквитинирование по остатку лизина в формате GG-ε или LRGG-ε). Фиксированной модификацией было пиридилэтилирование 4-винилпиридином. Результаты верифицировали по уровню отсечения FDR=1% на основе суммарной частоты ложных положительных результатов для спектров, соответствующих аминокислотным последовательностям пептидов.

Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован в нескольких независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе протеомного профилирования с использованием в качестве аффинных лигандов протеасомных субъединиц Rpn10 и Rpn13 было идентифицировано 49 и 60 белков соответственно. Они распределяются на следующие функциональные группы (табл. 1): (1) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (2) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (3) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (4) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов; (5) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (6) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (7) ферменты липидного обмена.

Количественно Rpn13-связывающиеся белки преобладали в функциональных группах 1, 2 и 5, Rpn10-связывающиеся белки – в группах 3, 4 и 7.

Таблица 1. Распределение белков митохондриальной фракции мозга мышей, связывающихся с субъединицами протеасом Rpn10 и Rpn13, по функциональным группам

| Группа* | Rpn10 | Rpn13 |
|---------|-------|-------|
| 1 | 2 | 13 |
| 2 | 6 | 16 |
| 3 | 16 | 6 |
| 4 | 15 | 13 |
| 5 | 1 | 10 |
| 6 | 2 | 2 |
| 7 | 7 | 0 |
| Всего | 49 | 60 |

Примечание. * Здесь и в других таблицах функциональные группы: (1) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (2) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (3) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (4) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов; (5) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (6) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (7) ферменты липидного обмена.

При этом количество белков, для которых ранее была показана митохондриальная локализация или ассоциация с митохондриальными мембранами, преобладало при использовании в качестве аффинного лиганда субъединицы Rpn13.

Сравнение белков митохондриальной фракции мозга, связывающихся с субъединицами Rpn10 и Rpn13, выявило всего два общих белка (рис. 2): глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу и пируваткиназу (табл. 2 и 3). Примечательно, что связывание этих белков с Rpn10 было подтверждено в модельных экспериментах с использованием иммобилизованной на кювете оптического биосенсора субъединицы Rpn10 и очищенных препаратов этих ферментов [16].

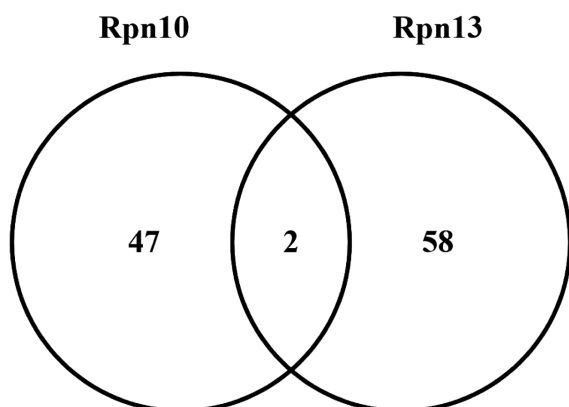


Рисунок 2. Диаграмма Венна, показывающая количество общих Rpn10- и Rpn13-связывающих белков в митохондриальной фракции мозга мышей.

Полученные результаты свидетельствуют о довольно высокой специфичности репертуара Rpn10- и Rpn13-связывающих белков, которая позволяет предположить, что в контексте функционирования 26S протеасомы субъединицам Rpn10 и Rpn13 свойственны разные функции. Недавно было показано, что протеасомные субъединицы Rpn10 и Rpn13 различаются по родству к различным полиубиквитиновым цепям. Так, например, белковые субстраты, помеченные единичными K48-полиубиквитиновыми цепями, присоединяются для последующей деградации в протеасоме практически исключительно к рецептору Rpn10 [17]. Генетические эксперименты доказали важную роль Rpn10 и Rpn13 для жизнеспособности высших позвоночных. Вместе с тем, авторы исследования мышей, дефицитных по Rpn10 и Rpn13, сделали вывод, что эти протеасомные субъединицы играют взаимозаменяемые роли в узнавании убиквитинированных белков и поддержании гомеостаза животных [18, 19]. Результаты данной работы убедительно показывают, что митохондриальные субпротеомы Rpn10- и Rpn13-связывающих белков мозга мыши различаются по составу и функциям своих компонентов. С учётом большей представленности собственно митохондриальных белков и MAM-белков в субпротеоме Rpn13-связывающих белков, можно предположить, что Rpn10 и Rpn13 играют разные роли в деградации белков митохондрий и MAM.

БЛАГОДАРНОСТИ

LC MS/MS анализ белков выполнен в ЦКП "Протеом человека" при Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (в части масс-спектрометрического анализа) и поддержана грантом РФФИ 19-015-00073а (выделение и пробоподготовка Rpn-связывающих белков митохондрий мозга).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе использована митохондриальная фракция мозга мышей, полученная ранее с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ СУБПРОТЕОМЫ RPN10- И RPN13-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Таблица 2. Rpn10-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мыши

| № | № в базе Uniprot | Название белка по Uniprot | Ген | MW [kDa] | Функция белка | Субклеточная локализация |
|----|------------------|---|------------|----------|---------------|--------------------------|
| 1 | Q00623 | Apolipoprotein AI | Apoa1 | 27,95 | 7 | C, N, Ves |
| 2 | Q300896 | Alpha-1-antitrypsin 1-3 | Serpina1c | 45,82 | 4 | G, ER |
| 3 | P07758 | Alpha-1 antitrypsin 1-1 | Serpina1a | 46,00 | 4 | G, ER |
| 4 | P07759 | Serpin (serine protease inhibitor A3K) | Serpina3k | 46,88 | 4 | Secreted |
| 5 | P22599 | Alpha-1 antitrypsin 1-2 | Serpina1b | 45,97 | 4 | G, ER |
| 6 | P28665 | Murinoglobulin-1 | Mug1 | 165,29 | 4 | Secreted |
| 7 | Q00897 | Alpha-1 antitrypsin 1-4 | Serpina1d | 45,99 | 4 | G, ER |
| 8 | Q03734 | Serpin (serine protease inhibitor A3M) | Serpina3m | 47,06 | 4 | Secreted |
| 9 | Q9Z1R9 | MCG124046 – serine protease 1 (trypsin 1) | Prss1 | 26,13 | 4 | Secreted |
| 10 | D3Z3G6 | MAPK 3 | Mapk3 | 42,40 | 3 | N, C, G, E, L |
| 11 | P62806 | Histone H4 | Hist1h4a | 11,36 | 3 | N |
| 12 | Q6GSS7 | Histone H2A type 2-A | Hist2h2aa1 | 14,09 | 3 | N |
| 13 | Q6ZWY9 | Histone 42B type 1-C/E/G | Hist1h2bc | 13,906 | 3 | N, C |
| 14 | Q8BFU2 | Histone H2A type 3 | Hist3h2a | 14,12 | 3 | N |
| 15 | G3UWL7 | Histone H2A | H2afz | 9,11 | 3 | N |
| 16 | P45591 | Cofilin-2 | Cfl2 | 18,71 | 2 | N, C |
| 17 | P16858 | <u>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</u> | Gapdh | 35,78 | 1 | C, N, Mch, PM |
| 18 | Q80TA9 | Ectopic P granules protein 5 homolog | Epg5 | 290,80 | 2 | L |
| 19 | P68433 | Histone H3,1 | Hist1h3a | 15,40 | 3 | N |
| 20 | Q8CGP0 | Histone H2B type3-B | Hist3h2bb | 13,90 | 3 | N |
| 21 | Q8CGP2-2 | Isoform 2 of histone H2B type 1-P | Hist1h2bp | 15,56 | 3 | N, C |
| 22 | Q61147 | Ceruloplasmin | Cp | 121,15 | 2 | PM |
| 23 | A2CG35 | Ras-related protein Rab-12 | Rab12 | 32,23 | 4 | L, Ves |
| 24 | Q6GYP7 | Ral GTPase activating protein subunit alpha-1 | Ralgapa1 | 229,38 | 4 | N, C |
| 25 | D3Z5G7 | Carboxylic ester hydrolase | Ces1b | 62,19 | 7 | Secreted |
| 26 | P23953 | Carboxylesterase 1C | Ces1c | 61,05 | 7 | ER |
| 27 | Q3UW12 | Cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-4 | Cnga4 | 65,83 | 4 | PM |
| 28 | P06728 | Apolipoprotein AIV | Apoa4 | 45,02 | 7 | C, secreted |
| 29 | P09813 | Apolipoprotein AII | Apoa2 | 11,30 | 7 | C, secreted |
| 30 | Q05020 | Apolipoprotein CII | Apoc2 | 10,74 | 7 | C, secreted |
| 31 | E9Q0B5 | protein Fcgbp | Fcgbp | 275,22 | 2 | Secreted |
| 32 | E9QNN1 | ATP-dependent RNA helicase A | Dhx9 | 149,69 | 3 | C, N |
| 33 | E9Q035 | Protein Gm20425 | Gm20425 | 106,70 | 4 | C, N |
| 34 | D3Z0Y2 | Peroxisomal protein 6 | Prdx6 | 22,49 | 5 | C, Mch, PM, L |
| 35 | A6X935 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 | Itih4 | 104,65 | 6 | PM |
| 36 | E9QAZ2 | Ribosomal protein L15 | Gm10020 | 33,42 | 3 | Mch |
| 37 | P62849 | 40S ribosomal protein S24 | Rps24 | 15,423 | 3 | C |
| 38 | Q61838 | Pregnancy zone protein | Pzp | 165,85 | 4 | Secreted |
| 39 | D3YYR8 | Serotransferrin | Trf | 25,67 | 2 | Secreted |
| 40 | P07309 | Transferrin | Trf | 15,77 | 2 | Secreted |
| 41 | P52480 | <u>Pyruvate kinase PKM</u> | Pkm | 57,80 | 1 | C, Mch, N |
| 42 | E9PVS1 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain | Itih3 | 102,80 | 6 | C, PM, L |
| 43 | D3YZ68 | Elongation factor 1-alpha1 | Eef1a1 | 27,58 | 3 | N |
| 44 | P63085 | Mitogen-activated protein kinase 1 | Mapk1 | 41,27 | 4 | N, C |
| 45 | O88569 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 | Hnrnpa2b1 | 37,40 | 3 | N |
| 46 | F6T4M4 | Serine/arginine repetitive matrix protein 1 | Srrm1 | 16,24 | 3 | N |
| 47 | E9QP56 | Apolipoprotein CIII | Apoc3 | 15,16 | 7 | Secreted |
| 48 | Q00898 | Alpha-1-antitrypsin 1-5 | Serpina1e | 45,89 | 4 | Secreted |
| 49 | Q64522 | Histone H2A type 2-B | Hist2h2ab | 14,01 | 3 | N |

Примечание. Здесь и в таблице 3 жирным шрифтом выделены собственно митохондриальные белки и/или белки, для которых доказана ассоциация с митохондриальными мембранами. Общие Rpn10- и Rpn13-связывающие белки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Обозначение локализации в клетке: N – ядро, C – цитоплазма, Mch – митохондрии, ER – эндоплазматический ретикулум, PM – плазматическая мембрана, Ves – везикулы, G – комплекс Гольджи, E – эндосомы, L – лизосомы, Per – пероксисомы.

Таблица 3. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мыши

| № | № в базе Uniprot | Название белка по Uniprot | Ген | MW [kDa] | Функция белка | Субклеточная локализация |
|----|------------------|---|----------|----------|---------------|---------------------------|
| 1 | O35490 | Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 | Bhmt | 44,99 | 6 | C |
| 2 | P16858 | <u>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</u> | Gapdh | 35,78 | 1 | C, N, Mch, PM |
| 3 | P50396 | Rab GDP dissociation inhibitor alpha | Gdi1 | 50,48 | 4 | G, C |
| 4 | Q80W21 | Glutathione S-transferase Mu 7 | Gstm7 | 25,69 | 5 | C, ER |
| 5 | P63101 | 14-3-3 protein zeta/delta | Ywhaz | 27,75 | 4 | Mch, N, C |
| 6 | P62259 | 14-3-3 protein epsilon | Ywhae | 29,15 | 4 | Mch, N, C |
| 7 | Q91XV3 | Brain acid soluble protein | Basp1 | 22,07 | 3 | PM, N, C |
| 8 | P16330 | 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase | Cnp | 47,09 | 4 | Mch M |
| 9 | Q8CHC4 | Synaptojanin-1 | Synj1 | 172,50 | 4 | PM, C |
| 10 | P12658 | Calbindin | Calb1 | 29,97 | 4 | C, N |
| 11 | P16125 | L-lactate dehydrogenase B chain | Ldhd | 36,54 | 1 | C, Mch |
| 12 | P05214 | Tubulin alpha-3 chain | Tuba3a | 49,92 | 2 | C |
| 13 | Q91X83 | S-adenosylmethionine synthase isoform type-1 | Mat1a | 43,48 | 4 | C, N |
| 14 | P07901 | Heat shock protein HSP 90-alpha | Hsp90aa1 | 84,73 | 5 | N, PM, C |
| 15 | Q61171 | Peroxiredoxin-2 | Prdx2 | 21,76 | 5 | C, Mch |
| 16 | P0DP26 | Calmodulin-1 | Calm1 | 16,82 | 4 | C, N, Mch, PM |
| 17 | P11031 | Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 | Sub1 | 14,41 | 3 | N |
| 18 | Q9DBJ1 | Phosphoglycerate mutase 1 | Pgam1 | 28,81 | 1 | C, N |
| 19 | Q9D0F9 | Phosphoglucomutase-1 | Pgm1 | 61,37 | 1 | C |
| 20 | P60710 | Actin, cytoplasmic 1 | Actb | 41,70 | 2 | C, N, PM |
| 21 | Q62048 | Astrocytic phosphoprotein PEA-15 | Pea15 | 15,04 | 4 | C, N |
| 22 | O08599 | Syntaxin-binding protein 1 | Stxbp1 | 67,52 | 2 | C, N, Mch, PM |
| 23 | P61982 | 14-3-3 protein gamma | Ywhag | 28,28 | 4 | C |
| 24 | Q7TMM9 | Tubulin beta-2A chain | Tubb2a | 49,87 | 2 | C |
| 25 | P62962 | Profilin-1 | Pfn1 | 14,94 | 2 | C, N |
| 26 | P61750 | ADP-ribosylation factor 4 | Arf4 | 20,38 | 4 | C, G, PM |
| 27 | P10126 | Elongation factor 1-alpha 1 | Eef1a1 | 50,08 | 3 | N, C, PM |
| 28 | P17742 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | Ppia | 17,95 | 5 | C, N |
| 29 | P58252 | Elongation factor 2 | Eef2 | 95,25 | 3 | N, C, PM |
| 30 | Q61553 | Fascin | Fscn1 | 54,47 | 2 | C, PM |
| 31 | O08553 | Dihydropyrimidinase-related protein 2 | Dpysl2 | 62,23 | 2 | C, Mch, PM |
| 32 | Q6PIC6 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 | Atp1a3 | 111,61 | 2 | PM, N, G, ER |
| 33 | Q91ZJ5 | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase | Ugp2 | 56,94 | 1 | C |
| 34 | Q9D3D9 | ATP synthase subunit delta, mitochondrial | Atp5d | 17,58 | 1 | Mch |
| 35 | O35945 | Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1 | Aldh1a7 | 54,55 | 1 | C |
| 36 | P68372 | Tubulin beta-4B chain | Tubb4b | 49,79 | 2 | C |
| 37 | P68368 | Tubulin alpha-4A chain | Tuba4a | 49,89 | 2 | C |
| 38 | P43006 | Excitatory amino acid transporter 2 | Slc1a2 | 61,98 | 2 | PM |
| 39 | P57780 | Alpha-actinin-4 | Actn4 | 104,91 | 2 | N, C |
| 40 | P11499 | Heat shock protein HSP 90-beta | Hsp90ab1 | 83,22 | 5 | N, PM, C, Mch |
| 41 | P80314 | T-complex protein 1 subunit beta | Cct2 | 57,44 | 5 | C |
| 42 | P10639 | Thioredoxin | Txn | 11,66 | 5 | N, C, Mch |
| 43 | Q8C196 | Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial | Cps1 | 164,51 | 6 | N, Mch |
| 44 | P0CG50 | Polyubiquitin-C | Ubc | 82,49 | 4 | N, C |
| 45 | P05063 | Fructose-bisphosphate aldolase C | Aldoc | 39,37 | 1 | C, Mch |
| 46 | P05064 | Fructose-bisphosphate aldolase A | Aldoa | 39,33 | 1 | C |
| 47 | P68510 | 14-3-3 protein eta | Ywhah | 28,19 | 4 | C, PM |
| 48 | Q04447 | Creatine kinase B-type | Ckb | 42,68 | 1 | Mch, N, C |
| 49 | Q63810 | Calcineurin subunit B type 1 | Ppp3r1 | 19,28 | 3 | C, PM |
| 50 | Q7TQF7 | Amphiphysin | Amph | 74,96 | 2 | C, PM |
| 51 | P63242 | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 | Eif5a | 16,82 | 3 | N, C |
| 52 | P52480 | <u>Pyruvate kinase PKM</u> | Pkm | 57,80 | 1 | C, Mch, N |
| 53 | Q61644 | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1 | Pacsin1 | 50,54 | 2 | C, E, PM |
| 54 | P63017 | Heat shock cognate 71 kDa protein | Hspa8 | 70,82 | 5 | C, L, E, N, PM |
| 55 | Q9D6F9 | Tubulin beta-4A chain | Tubb4a | 49,55 | 2 | C |
| 56 | Q7TQD2 | Tubulin polymerization-promoting protein | Tppp | 23,56 | 2 | C, N, G, Mch |
| 57 | P08228 | Superoxide dismutase [Cu-Zn] | Sod1 | 15,93 | 5 | N, L, Per, C, Mch, PM |
| 58 | P17183 | Gamma-enolase | Eno2 | 47,26 | 1 | C, PM |
| 59 | P17182 | Alpha-enolase | Eno1 | 47,11 | 1 | C, PM |
| 60 | P63038 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | Hspd1 | 60,91 | 5 | Mch, C, ER, Per, E, G, PM |

ЛИТЕРАТУРА

1. Lehmann G., Udasin R.G., Ciechanover A. (2016) Biochem. Biophys. Res. Commun., **473**, 80-86.
2. Bragoszewski P., Turek M., Chacinska A. (2017) Open Biology, **7**(4), 170007, DOI: 10.1098/rsob.170007.
3. Covill-Cooke C., Howden J.H., Birsa N., Kittler J.T. (2018) Neurochemistry International, **117**, 55-64.
4. Lavie J., De Belvalet H., Sonon S., Ion A.M., Dumon E., Melser S., Lacombe D., Dupuy J.W., Lalou C., Bénard G. (2018) Cell Reports, **23**, 2852-2863.
5. Buneeva O.A., Kopylov A.T., Medvedev A.E., Medvedeva M.V. (2019) Biochemistry (Moscow), **84**(11), 1359-1374.
6. Ross J.M., Olson L., Coppotelli G. (2016) Int. J. Mol. Sci., **16**, 19458-19476.
7. Nakagawa T., Shirane M., Iemura S., Natsume T., Nakayama K. (2007) Genes Cells, **12**, 709-719.
8. Saeki Y. (2017) J. Biochem., **161**(2), 113-124.
9. Tanaka K. (2009) Proc. Jpn. Acad., Ser. B, **85**, 12-36.
10. Kish-Trier E., Hill C.P. (2013) Annu. Rev. Biophys., **42**, 29-49.
11. Кудряева А.А., Белогуров А.А. (2019) Усп. биол. химии, **59**, 323-392. [Kudriaeva A.A., Belogurov A.A. (2019) Usp. Biol. Khim., **59**, 323-392.]
12. Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Medvedeva M.V., Nerobkova L.N., Kapitsa I.G., Zgoda V.G. (2017) Biochemistry (Moscow), **82**, 330-339.
13. Walker J.M. (Ed.) (2002) Humana Press Inc., Totowa, N.Y., 1176 p.
14. Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Nature Methods, **6**(5), 359-362.
15. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**(1), e00007. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**(1), e00007.] DOI: 10.18097/bmcrm00007
16. Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Ivanov A.S., Medvedev A.E., Medvedeva M.V. (2017) Biochemistry (Moscow), **82**(9), 1042-1047.
17. Martinez-Fonts K., Davis C., Tomita T., Elsasser S., Nager A.R., Shi Y., Finley D., Matouschek A. (2020) Nat. Commun., **11**, 477. DOI: 10.1038/s41467-019-13906-8
18. Hamazaki J., Sasaki K., Kawahara H., Hisanaga S., Tanaka K., Murata S. (2007) Mol. Cell. Biol., **27**(19), 6629-6638.
19. Hamazaki J., Hirayama S., Murata S. (2015) PLoS Genet., **11**(7), e1005401. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005401

Поступила в редакцию: 02. 03. 2020.
После доработки: 26. 03. 2020.
Принята к печати: 31. 03. 2020.

QUALITATIVE DIFFERENCE OF MITOCHONDRIAL SUBPROTEOMS OF BRAIN RPN10- AND RPN13-BINDING PROTEINS

O.A. Buneeva*, A.T. Kopylov, A.E. Medvedev

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com

Good evidence exists that the ubiquitin-proteasome system (UPS) plays an important role in degradation of mitochondrial proteins and membrane proteins associated with mitochondria (MAM proteins). Mitochondria contain all components of the ubiquitin-conjugating system, which are necessary for the attachment of ubiquitin molecules to target proteins, subjected to subsequent degradation in proteasomes. An important stage in the delivery of proteins for proteolytic degradation in proteasomes is their interaction with ubiquitin receptors located on the regulatory subunit (19S) of the proteasome: the Rpn10 or Rpn13 subunit. These subunits make basically the same contribution to the subsequent translocation of target proteins to the core part of the proteasome. A comparative study of mouse brain mitochondrial subproteomes bound to Rpn10 and Rpn13 subunits revealed a high specificity of the repertoire of Rpn10 and Rpn13-binding proteins. Moreover, proteins, for which mitochondrial localization or association with mitochondrial membranes was previously shown, prevailed in the case of using the Rpn13 subunit as an affinity ligand (Rpn13-binding proteins). This suggests that Rpn10 and Rpn13 play different roles in the degradation of mitochondrial proteins and MAM.

Key words: ubiquitin-proteasome system; Rpn10- and Rpn13-binding proteins; mitochondrial fraction of the brain; subproteome

Funding. This work performed within the framework of the State Academies of Sciences Fundamental Scientific Research Program for 2013-2020 (Mass spectrometry analysis) was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-015-00073a; isolation and sample preparation of Rpn13(10)-binding proteins).

Received: 02.03.2020, revised: 26.03.2020, accepted: 31.03.2020.