

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С 26S И 20S ПРОТЕАСОМАМИ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

О.А. Бунеева^{1}, А.Т. Копылов¹, В.Г. Згода¹, О.В. Гнеденко¹,
С.А. Калошина¹, М.В. Медведева², А.С. Иванов¹, А.Е. Медведев¹*

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com

²Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва

Из печени и мозга кролика выделены фракции 26S и 20S протеасом. По данным масс-спектрометрического (МС) анализа, фракции 26S протеасом из этих органов содержали каталитические и регуляторные субъединицы, характерные для коровой части протеасом и для регуляторных субчастиц. Фракции 20S протеасом мозга и печени содержали только каталитические субъединицы протеасом. Помимо субъединиц протеасом, в полученных фракциях обнаружены компоненты убиквитин-протеасомной системы, убиквитинированные белки, ферменты, играющие важную роль в метаболических процессах, компоненты цитоскелета, сигнальные, регуляторные и защитные белки, а также белки регуляции экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. Представленность ряда ассоциированных с протеасомами белков была сопоставима или превышала представленность собственных компонентов протеасом. Около трети белков, общих для всех исследованных фракций (26S и 20S протеасом мозга и печени), относятся к группе мультифункциональных белков. Выборочная биосенсорная валидация подтвердила аффинное связывание идентифицированных в ходе МС анализа белков (альдолаза, фосфоглицераткиназа) с 20S протеасомой мозга. Сопоставление субпротеомов 26S и 20S протеасом мозга показало, что при удалении компонентов регуляторных (19S) субчастиц количество индивидуальных белков, ассоциированных с коровой частью протеасомы (20S), практически удваивалось. В печени количество белков, ассоциированных с коровой частью протеасомы, после удаления компонентов регуляторных субчастиц практически не изменялось. Это свидетельствует о том, что в мозге и, возможно, в других органах белки регуляторной (19S) субчастицы играют важную роль в формировании протеасомного интерактома.

Ключевые слова: 26S и 20S протеасомы; убиквитин-протеасомная система; субпротеом; биосенсор; мультифункциональные белки

DOI: 10.18097/PBMC20226801018

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система (UPS) является ключевым механизмом своевременного удаления из клетки неправильно свёрнутых, повреждённых или короткоживущих белков [1-3]. Протеасомы представляют собой мультисубъединичные комплексы, состоящие из коровой (сердцевинной) части (20S субчастицы), субъединицы которой обладают каспазоподобной, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной активностями и осуществляют непосредственный протеолиз белковых субстратов и (чаще всего двух) 19S регуляторных субчастиц, акцептирующих убиквитинированные субстраты и направляющих их в коровую часть [4-6]. Хотя комплекс, состоящий из одной 20S субчастицы и двух 19S субчастиц, не может иметь коэффициент седиментации 26S, термин “26S протеасома” широко применяется для всех протеасом, содержащих одну или две регуляторные субчастицы.

Проведённое нами исследование митохондриальных субпротеомов белков мозга мышей, взаимодействующих с убиквитинсвязывающими субъединицами Rpn10 и Rpn13 регуляторной субчастицы протеасом, выявило ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена, белки цитоскелета и экзоцитоза,

белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки, белки передачи сигнала и регуляции активности ферментов, антиоксидантные и защитные белки, ферменты метаболизма белков, аминокислот и других азотистых соединений [7, 8]. Сравнение этих субпротеомов показало высокую специфичность репертуара Rpn10- и Rpn13-связывающих белков [9]. Выборочная биосенсорная валидация этих результатов (полученных с помощью аффинной хроматографии и последующего МС-анализа) подтвердила высокоаффинное связывание идентифицированных белков (ГАФД, пируваткиназа, гистоны H2A и H2B) с субъединицами Rpn10 и Rpn13 регуляторной 19S субчастицы [8, 10]. При этом с коровой частью протеасомы, иммобилизованной на ячейке биосенсора, связывались как убиквитинированные, так и неубиквитинированные белки [11]. Это свидетельствует в пользу того, что ассоциированные с протеасомами белки не только являются мишенью для их последующей деградации, но и могут быть компонентами интерактома, играющего определённую роль в функционировании UPS.

Одним из подходов, позволяющих оценить возможную роль именно интерактома, может быть изучение тканевых особенностей белков,

ассоциированных с протеасомами. Недавно мы выделили фракции протеасом мозга кролика и провели анализ белков, ассоциированных с 20S и 26S протеасомами [12]. В связи с этим представляло интерес провести сравнительный анализ белков, связанных с 20S и 26S протеасомами мозга и печени кролика.

МЕТОДИКА

Реактивы и материалы

В работе использовали следующие реактивы: изатин, дитиотреитол, коктейль ингибиторов протеаз, Трис (гидроксиметил)аминометан, мочевины, гидрокарбонат аммония, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, диметилпимелимидат, бикарбонат триэтиламония, Кумасси бриллиантовый синий G-250, глицерин ("Merck", США); ацетонитрил ("Fisher Chemical", Великобритания); муравьиная кислота, трихлоруксусная кислота, изопропанол ("Fluka", США); трис-(2-карбокситетил)-фосфин ("Pierce", США), модифицированный трипсин (mass spectrometry grade; "Promega", США); HBS-буфер (150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% детергент P20, 10 mM HEPES (pH 7,4)), 10 mM ацетатный буфер (pH 5,0), набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминокислоты (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 M этаноламин-HCl (pH 8,5)) ("Cytiva", США, ранее "GE Healthcare Life Science", США). Остальные реагенты были отечественного производства высшей степени чистоты.

Выделение фракций протеасом осуществляли с использованием центрифуг Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge ("Beckman Coulter Life Sciences", США) и Eppendorf Centrifuge 5415R ("Eppendorf", Германия). Протеомный анализ выполнен с использованием оборудования центра коллективного пользования "Протеом человека" Института биомедицинской химии (ИБМХ). Биосенсорные исследования выполнены с использованием оптического SPR-биосенсора Biacore T200 и специального программного обеспечения Biacore Control ("Cytiva").

Выделение протеасом

Выделение протеасом мозга и печени кролика проводили, как описано ранее [12], используя метод Шаровой и др. [13] с небольшими модификациями. Альдозу и фосфолипидкиназу выделяли из скелетных мышц кролика, как описано в [14]. Полученные препараты ферментов были электрофоретически гомогенны и характеризовались удельной активностью 10,4 мкмоль/мин на 1 мг белка и 390 мкмоль/мин на 1 мг белка соответственно.

Масс-спектрометрический анализ проводили, как описано в [12]. Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован в трёх независимых экспериментах.

Биосенсорный анализ

Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM3 ("Cytiva"), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. Молекулярные взаимодействия регистрировали в виде сенсограмм, представляющих зависимость сигнала биосенсора (в резонансных единицах, RU) от времени. Иммобилизацию фосфолипидкиназы и альдозу осуществляли путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM3 и аминокислотными группами ферментов. Карбоксильные группы чипа активировали путём инъекции смеси 0,2 M EDC/0,05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Инъекцию растворов фосфолипидкиназы или альдозы (10 мкг/мл) в 10 mM ацетатном буфере (pH 5,0) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 10 мин. Далее пропускали 1 M этаноламин-HCl (pH 8,5) в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Для предотвращения возможной диссоциации в ходе экспериментов иммобилизованную альдозу стабилизировали в соответствии с разработанным протоколом [11]. Взаимодействие протеасом мозга и печени кролика с иммобилизованными белками исследовали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин. Перед повторным использованием поверхность чипа регенерировали промывкой 1 M NaCl в 50 mM фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Полученные сенсограммы анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 ("Cytiva").

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным МС-анализа, полученные нами в данной работе фракции 26S протеасом из печени и мозга кролика содержали каталитические и регуляторные субъединицы, типичные для коровой части протеасом и для регуляторных субчастиц соответственно (табл. 1, 2). Фракции 20S протеасом мозга и печени содержали только каталитические субъединицы протеасом (табл. 3, 4). Кроме протеасомных субъединиц в полученных фракциях обнаружены компоненты UPS, убиквитинированные белки, ферменты, играющие важную роль в метаболических процессах, компоненты цитоскелета, сигнальные, регуляторные и защитные белки, а также белки регуляции экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (рис. 1А-Г, табл. 5, табл. 1а-4а дополнительных материалов). Хотя соотношение долей белков, относящихся к разным функциональным группам, как и состав этих групп, различались во всех четырёх фракциях (табл. 5, рис. 2А,Б), их сопоставление выявило интересную тканеспецифическую особенность: удаление регуляторных субчастиц протеасом приводило к почти двукратному увеличению числа идентифицированных белков во фракции 20S протеасом мозга, но не печени (табл. 5).

АНАЛИЗ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С 26S И 20S ПРОТЕАСОМАМИ

Таблица 1. Собственно протеасомные белки, идентифицированные во фракции 26S протеасом мозга кролика

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	Покры- тие	Коли- чество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последова- тельности (PSMs)	Скоринго- вый балл	MW (кДа)
Субъединицы регуляторной субчастицы									
1	G1SVF2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	PSMD1	1,43	3	3	5	Infinity	108,431
2	G1SSA2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2	5,71	5	5	6	Infinity	115,167
3	G1TP15	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 3	PSMD3	6,02	8	8	8	Infinity	57,136
4	B7NZD2	Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 4 (Predicted) 26S proteasome regulatory subunit RPN10	PSMD4	2,89	2	2	2	27,530	41,061
5	G1U115	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 6	PSMD6	4,37	2	2	2	36,515	45,634
6	G1SVT4	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 7	PSMD7	5,24	2	2	2	41,597	44,375
7	G1U354	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 8	PSMD8	2,85	2	2	2	Infinity	39,601
8	G1SL46	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	N/A	5,38	1	1	1	Infinity	24,765
9	G1SVA3	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 11	PSMD11	13,74	5	5	8	Infinity	47,434
10	G1T6D4	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 12	PSMD12	2,95	1	2	2	Infinity	51,295
11	G1SM51	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 13	PSMD13	4,79	4	4	4	50,579	42,741
12	G1SFE0	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 14	PSMD14	4,47	2	2	2	Infinity	32,663
13	G1SYV0	Proteasome 26S subunit, ATPase 2	PSMC2	4,89	4	4	4	59,118	45,768
14	G1TLQ8	Proteasome 26S subunit, ATPase 3	PSMC3	8,43	3	3	4	Infinity	49,133
15	G1TUD6	Proteasome 26S subunit, ATPase 4	PSMC4	10,44	5	5	5	Infinity	55,811
16	G1T3S1	Proteasome 26S subunit, ATPase 6	PSMC6	2,73	5	5	6	53,602	49,133
Субъединицы коровой субчастицы									
1	G1SDA8	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	14,45	4	4	5	Infinity	28,609
2	G1T2L1	Proteasome subunit alpha type	N/A	8,12	1	2	2	Infinity	25,899
3	G1SZ14	Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3	3,68	3	3	3	Infinity	36,284
4	G1T519	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4	3,83	1	4	4	41,908	29,484
5	G1T670	Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	5,00	1	1	1	Infinity	26,230
6	G1T9V4	Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	9,35	2	2	2	Infinity	27,399
7	G1SWI7	Proteasome 20S subunit alpha 8	PSMA8	8,00	2	2	2	Infinity	27,968
8	G1SU71	Proteasome subunit beta type-1	PSMB1	4,15	1	1	1	Infinity	26,487
9	G1T4X8	Proteasome subunit beta type-2	PSMB2	5,47	1	1	1	Infinity	22,820
10	G1T4Q9	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5	8,65	2	2	2	Infinity	28,764
11	G1T235	Proteasome subunit beta type-6	PSMB6	8,79	2	2	2	Infinity	25,389

Таблица 2. Собственно протеасомные белки, идентифицированные во фракции 26S протеасом печени кролика

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	Покры- тие	Коли- чество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последова- тельности (PSMs)	Скоринго- вый балл	MW (кДа)
Субъединицы регуляторной субчастицы									
1	G1SVF2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	PSMD1	4,69	6	0	6	Infinity	108,44
2	G1SSA2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2	5,99	7	7	7	Infinity	115,17
3	G1TP15	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 3	PSMD3	7,63	5	5	6	85,260	57,14
4	B7NZD2	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 4 26S proteasome regulatory subunit RPN10	PSMD4	9,47	4	4	5	Infinity	41,04
5	G1U115	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 6	PSMD6	9,51	5	5	5	79,080	45,63
6	G1SVT4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	PSMD7	4,74	3	3	3	49,757	44,37
7	G1SL46	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	PSMD9	30,49	8	8	10	Infinity	24,77
8	G1SVA3	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 11	PSMD11	20,38	10	10	14	Infinity	47,43
9	G1T6D4	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 12	PSMD12	5,90	7	7	7	66,260	51,30
10	G1SM51	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 13	PSMD13	44,79	3	3	3	42,043	42,74
11	G1SFE0	26S proteasome regulatory subunit RPN11	PSMD14	12,03	2	3	3	Infinity	32,66
12	G1SQL0	AAA domain-containing protein	PSMC1	12,27	5	4	6	Infinity	49,15
13	A0A5F9C6P7	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT1	PSMC2	67,50	1	1	1	100,00	48,04
14	G1SYV0	Proteasome 26S subunit, ATPase 2	PSMC2	16,38	9	9	9	Infinity	52,34
15	G1TLQ8	Proteasome 26S subunit, ATPase 3	PSMC3	8,43	4	4	6	Infinity	49,13
16	G1TUD6	Proteasome 26S subunit, ATPase 4	PSMC4	15,06	6	6	7	Infinity	55,81
17	G1SLK2	AAA domain-containing protein	PSMC5	13,05	6	5	6	Infinity	45,60
18	G1T3S1	Proteasome 26S subunit, ATPase 6	PSMC6	17,37	8	8	11	Infinity	45,77
19	G1U8C4	Proteasome activator subunit 1	PSME1	9,24	2	2	2	37,204	28,64
Субъединицы коровой субчастицы									
1	G1SDA8	Proteasome endopeptidase complex	PSMA1	3,52	3	3	3	33,359	28,06
2	G1SZ14	Proteasome subunit alpha type 3	PSMA3	4,14	1	1	1	Infinity	36,30
3	G1T519	Proteasome subunit alpha type	PSMA4	6,51	2	2	2	34,848	29,46
4	G1T670	Proteasome subunit alpha type	PSMA5	67,50	1	1	1	Infinity	26,21
5	G1T9V4	Proteasome subunit alpha type	PSMA6	5,91	1	1	1	16,720	27,39
6	G1SWI7	Proteasome 20S subunit alpha 8	PSMA8	5,38	1	1	1	24,487	38,66
7	G1SU71	Proteasome subunit beta type	PSMB1	5,95	1	1	1	24,556	26,48
8	G1T4X8	Proteasome subunit beta type	PSMB2	7,31	1	1	1	15,682	22,82
9	G1SHV9	Proteasome subunit beta type	PSMB3	7,32	1	1	1	21,702	22,97

АНАЛИЗ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С 26S И 20S ПРОТЕАСОМАМИ

Таблица 3. Собственно протеасомные белки, идентифицированные во фракции 20S протеасом мозга кролика

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (кДа)
1	G1SDA8	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	14,45	4	4	5	Infinity	28,609
2	G1T2L1	Proteasome subunit alpha type	N/A	23,08	5	3	5	Infinity	25,899
3	G1SZ14	Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3	13,19	6	6	7	Infinity	36,284
4	G1T519	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4	3,07	3	3	3	33,115	29,484
5	G1T670	Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	5,00	1	1	1	Infinity	26,230
6	G1T9V4	Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	13,01	3	3	3	Infinity	27,399
7	G1SWI7	Proteasome 20S subunit alpha 8	PSMA8	4,40	2	2	3	Infinity	27,985
8	G1SU71	Proteasome subunit beta type-1	PSMB1	7,88	3	3	3	Infinity	26,487
9	G1T4X8	Proteasome subunit beta type-2	PSMB2	4,98	1	1	1	Infinity	22,808
10	G1SHV9	Proteasome subunit beta type-3	PSMB3	15,12	2	2	2	Infinity	22,976
11	G1T918	Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	4,40	2	2	3	Infinity	28,657
12	G1T4Q9	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5	18,42	6	6	7	Infinity	28,780
13	G1T235	Proteasome subunit beta type-6	PSMB6	8,79	3	3	3	Infinity	25,389
14	G1SWK8	Proteasome subunit beta type-7	PSMB7	3,31	1	1	1	22,304	32,438

Таблица 4. Собственно протеасомные белки, идентифицированные во фракции 20S протеасом печени кролика

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (кДа)
1	G1SDA8	Proteasome endopeptidase complex	PSMA1	13,28	3	3	8	Infinity	28,609
2	G1T2L1	Proteasome subunit alpha type	N/A	14,96	2	3	3	Infinity	25,882
3	G1SZ14	Proteasome endopeptidase complex	PSMA3	13,19	6	6	10	Infinity	36,284
4	G1T519	Proteasome subunit alpha type	PSMA4	6,90	2	2	2	42,848	29,465
5	G1T670	Proteasome subunit alpha type	PSMA5	3,00	1	3	3	Infinity	26,213
6	G1T9V4	Proteasome subunit alpha type	PSMA6	4,07	1	4	4	Infinity	27,381
7	G1SWI7	Proteasome subunit alpha type	PSMA8	14,80	2	4	5	Infinity	27,967
8	G1SU71	Proteasome subunit beta type	PSMB1	12,03	2	2	2	Infinity	26,470
9	G1T4X8	Proteasome subunit beta type	PSMB2	8,46	1	2	2	23,657	22,808
10	G1SHV9	Proteasome subunit beta type	PSMB3	8,78	1	1	1	Infinity	22,960
11	G1T4Q9	Proteasome subunit beta type	PSMB5	5,26	1	3	3	Infinity	28,764
12	G1SWK8	Proteasome subunit beta type	PSMB7	6,29	3	3	5	41,352	32,438

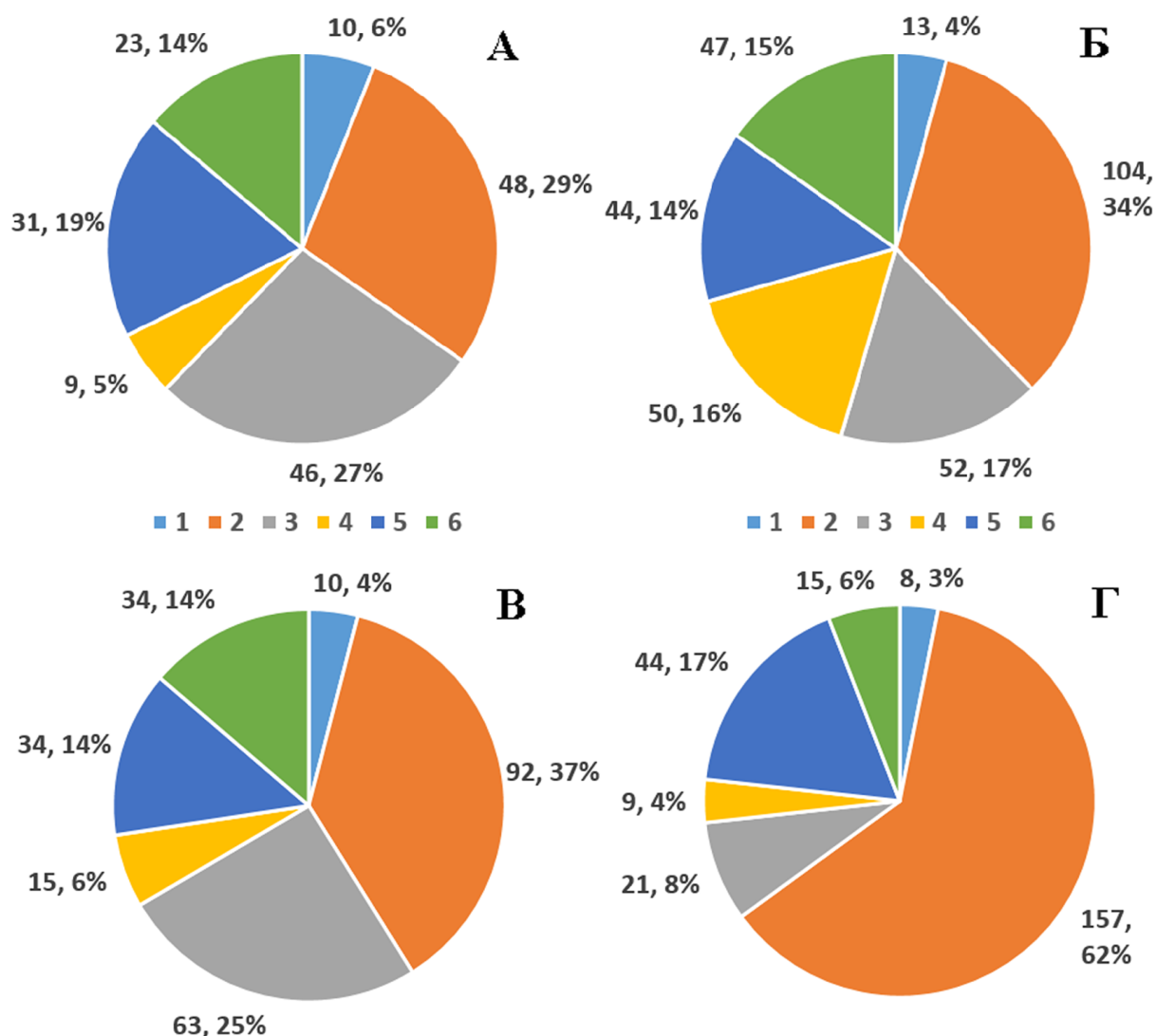


Рисунок 1. Распределение по функциям белков, ассоциированных с протеасомами кролика: **А** — фракция 26S протеасом мозга, **Б** — фракция 20S протеасом мозга, **В** — фракция 26S протеасом печени, **Г** — фракция 20S протеасом печени. 1 — компоненты UPS, 2 — метаболические ферменты, 3 — белки цитоскелета и транспорта, 4 — белки передачи сигнала и регуляции активности ферментов, 5 — защитные белки, 6 — белки регуляции экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки.

Таблица 5. Белки, идентифицированные во фракциях протеасом мозга и печени кролика*

Группа**	Протеасомы мозга			Протеасомы печени		
	26S	20S	26S/20S	26S	20S	26S/20S
I	10	13↑	0,77	10	8↓	1,25
II	47	101↑	0,44	91	155↑	0,59
III	46	52↑	0,88	63	21↓	3,00
IV	9	50↑	0,18	15	9↓	1,67
V	32	47↑	0,68	35	47↑	0,74
VI	23	47↑	0,49	34	15↓	2,27
Всего	167	310↑	0,54	248	255=	0,97

Примечание. * — Списки идентифицированных белков приведены в дополнительных материалах. В данной таблице приведено число всех идентифицированных белков за исключением белков, образующих собственно 26S и 20S протеасомы. ** — Функциональные группы белков, связывающихся с протеасомами: (I) белки/ферменты UPS, не являющиеся компонентами субчастиц протеасом; (II) метаболические ферменты; (III) белки, участвующие в образовании цитоскелета и транспорте; (IV) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов; (V) защитные белки/ферменты; (VI) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. Стрелки показывают снижение (↓), увеличение (↑) (а знак = отсутствие изменений) числа идентифицированных белков во фракции 20S протеасом мозга или печени кролика по сравнению с фракцией 26S.

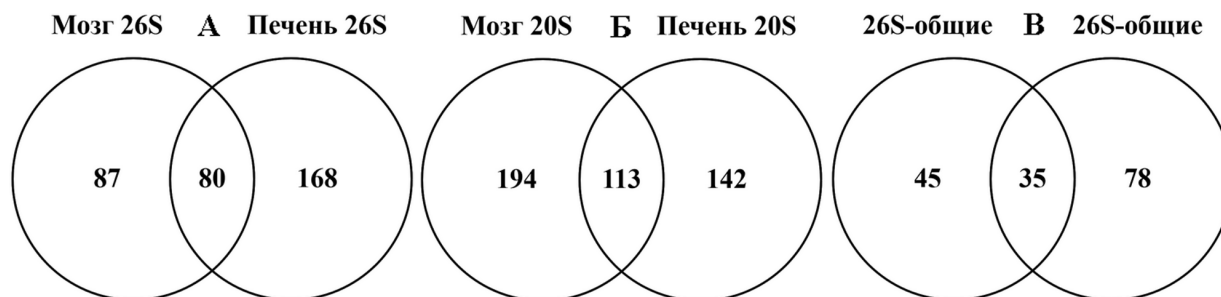


Рисунок 2. Диаграмма Венна: **А** — белки, ассоциированные с фракциями 26S протеасом мозга и печени кролика, **Б** — белки, ассоциированные с фракциями 20S протеасом мозга и печени кролика, **В** — сравнение белков, ассоциированных с фракциями 20S и 26S протеасом, общих для мозга и печени.

В соответствии с ранее полученными данными [12] представленность ряда выборочно проанализированных “непротеасомных” белков, общих для всех фракций (26S и 20S протеасом) мозга и печени, была сопоставима или превышала представленность собственных белков протеасом (рис. 3, 4). Это свидетельствует в пользу того, что белки, обнаруженные в выделенных из мозга и печени кролика фракциях 26S и 20S протеасом, по-видимому, представляют собою компоненты протеасомного интерактома (другими словами, белки, взаимодействующие с протеасомами).

Прямым экспериментальным подтверждением этого предположения могут служить данные биосенсорного анализа, которые продемонстрировали аффинное связывание фракции 20S протеасом мозга с выявленными с помощью МС-анализа белками (альдолазой, фосфоглицераткиназой) (рис. 5). Следует также отметить, что проведённое нами ранее биосенсорное исследование взаимодействия 20S протеасомы с ключевыми ферментами гликолиза альдолазой и пируваткиназой показало, что эти ферменты взаимодействуют с коровой частью протеасомы с высоким сродством (K_d соответственно $8,17 \cdot 10^{-7}$ М и $5,56 \cdot 10^{-7}$ М) [11].

В публикациях ряда авторов, использовавших разные методы выделения протеасом с последующим МС-анализом, сообщается об ассоциированных с протеасомами белках, включающих компоненты UPS, метаболические ферменты, белки, участвующие в образовании цитоскелета, транспорте, передаче сигналов и регуляции активности ферментов, белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки [15-18].

Все эти группы белков были обнаружены и в настоящем исследовании. Хотя сопоставление субпротеомов белков фракций 26S и 20S протеасом мозга и печени выявило их высокую органную специфичность, в них определяется общий пул, включающий 35 белков (рис. 2В, табл. 6). Две основные группы этого пула представлены метаболическими ферментами (14) и защитными белками (11). Меньшая доля принадлежит компонентам UPS (3) и белкам регуляции экспрессии генов (4) и совсем мало белков цитоскелета и регуляторных (2 и 1 соответственно). Примечательно, что из 35 ассоциированных с протеасомами белков,

общих для всех четырёх фракций, 10 принадлежат к так называемым мультифункциональным белкам. Среди них глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [19], альфа-енолаза [20-22], фактор элонгации 1-альфа 1 [23], альдолаза [24, 25], глутатионпероксидаза [26, 27], белок теплового шока Hsp60 [28], лактатдегидрогеназа [29], триозофосфатизомераза [30].

В контексте известных данных о внутриклеточном трафике протеасом и их транслокации в различные компартменты клетки в зависимости от функционального состояния клетки [31, 32] существование большого числа белков, взаимодействующих с протеасомами и формирующих протеасомный интерактом, вполне объяснимо. При этом регуляторной субчастице, по-видимому, принадлежит важная роль в формировании протеасомного интерактома и его регуляции. Во всяком случае, удаление белков регуляторной (19S) субчастицы влияет на репертуар белков, ассоциированных с 20S протеасомой, а в мозге — практически удваивает число белков, идентифицированных во фракции 20S протеасом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фракции 26S и 20S протеасом мозга и печени кролика содержат белки, формирующие структуру этих надмолекулярных частиц, а также белки, ассоциированные с 26S и 20S протеасомами. Представленность ряда ассоциированных с протеасомами белков сопоставима с представленностью собственных компонентов протеасом (рис. 3, [12]). Эти данные вместе с результатами биосенсорной валидации свидетельствуют в пользу того, что белки, обнаруженные в выделенных нами фракциях 26S и 20S протеасом, по-видимому, представляют собою компоненты протеасомного интерактома, а не примеси, попавшие в анализируемые фракции в ходе их выделения. Хотя сопоставление субпротеомов фракций 26S и 20S протеасом мозга и печени выявило их высокую органную специфичность, в них определяется общий пул, включающий 35 ассоциированных с протеасомами белков. Регуляторная (19S) субчастица, по-видимому, имеет важное значение как для формирования протеасомного интерактома, так и его регуляции.

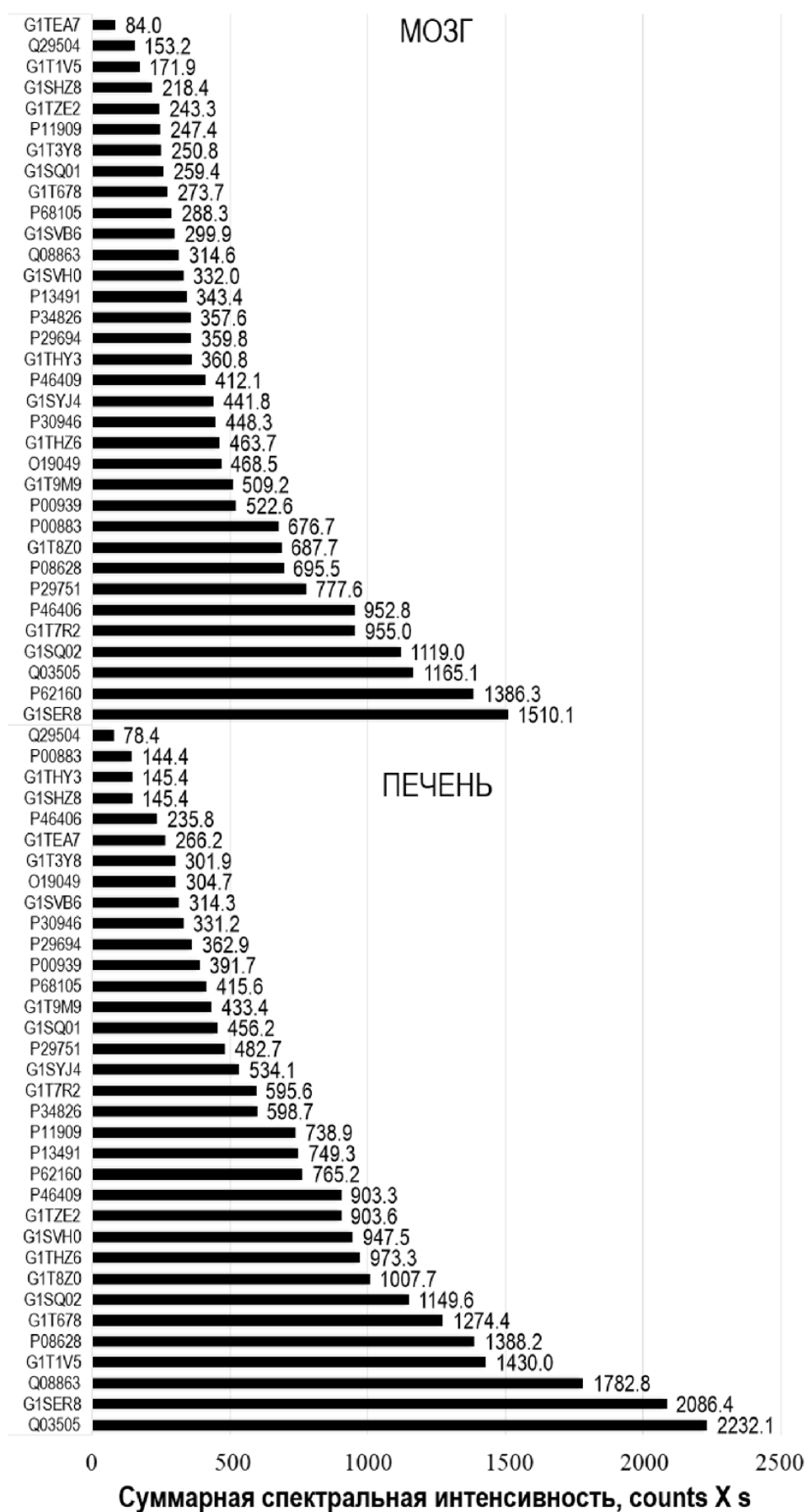


Рисунок 3. MS анализ представленности непротеасомных белков, общих для всех фракций, выявленных во фракциях 26S протеасом мозга и печени и ассоциированных с протеасомами (см. табл. 6).

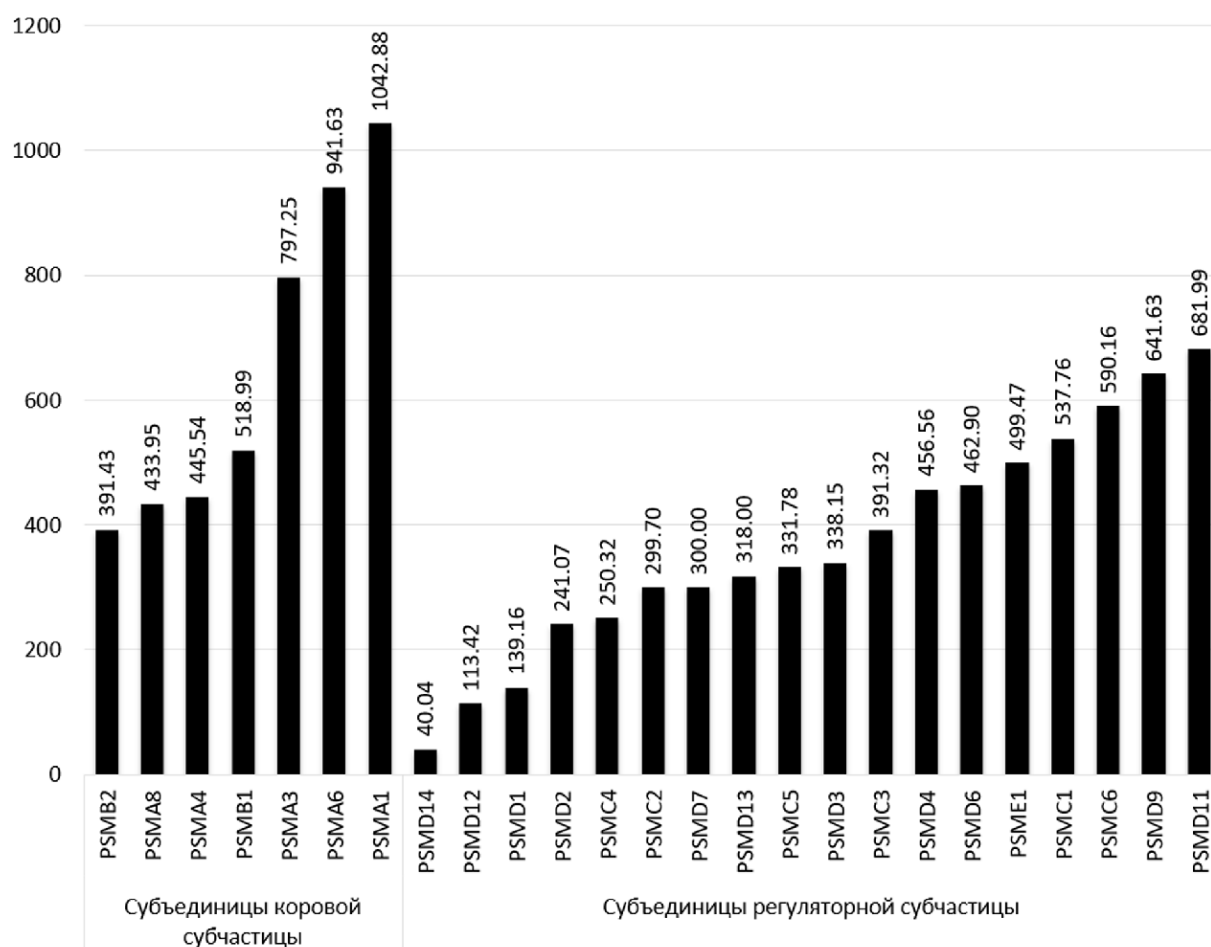


Рисунок 4. MS анализ представленности собственно протеасомных белков печени кролика (субъединицы фракции 26S). Данные по представленности собственно протеасомных субъединиц фракции 26S протеасом мозга кролика приведены в [12].

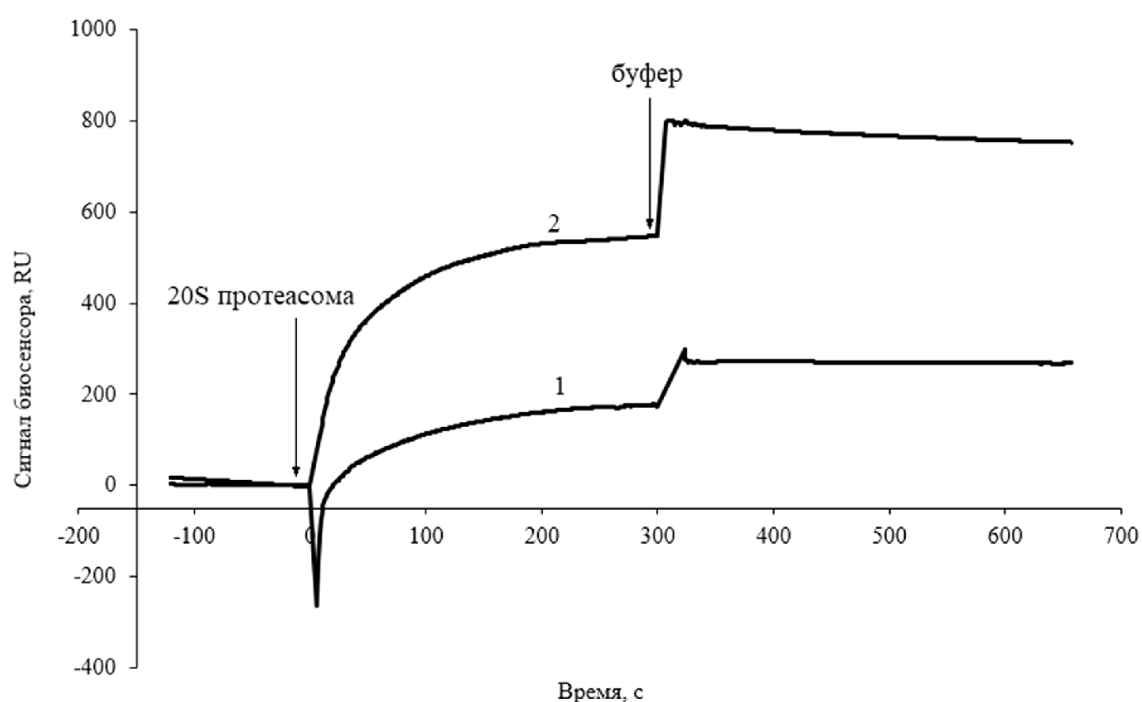


Рисунок 5. Взаимодействие фракции 20S протеасом мозга кролика (1 мг/мл) с иммобилизованными на чипе биосенсора белками: 1 — фосфоглицераткиназой, 2 — альдолазой, обработанной сшивающим реагентом.

Таблица 6. Ассоциированные с протеасомами белки, общие для четырёх фракций (20S и 26S протеасом мозга и 20S и 26S протеасом печени кролика). Названия белков и их функции приведены согласно базе данных Uniprot

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции
1	P29751	Actin, cytoplasmic 1	Один из основных элементов цитоскелета. Помимо цитоплазмы может находиться в ядре (в мономерной и полимерной форме) и регулировать транскрипцию и репарацию ДНК.
2	G1T678	Acetyl-CoA acetyltransferase	Трансферазная активность.
3	G1SVH0	Adenosylhomocysteinase	Фермент, преобразующий S-аденозилгомоцистеин в гомоцистеин и аденозин.
4	Q03505	Alcohol dehydrogenase 1	Катализирует окисление спиртов и ацеталей до альдегидов и кетонов в присутствии NAD ⁺ .
5	G1SQ01	Aldo-keto reductase family 1 member A1 Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	NADPH-зависимая оксидоредуктаза, участвующая в восстановлении альдегидов и кетонов до первичных и вторичных спиртов.
6	G1TEA7	Carbamoyl-phosphate synthase 1	Осуществляет гидролиз глутамина в присутствии АТР; участвует в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов.
7	G1T1V5	Carbonic anhydrase 3	Цинк-зависимый фермент; катализирует обратимую гидратацию CO ₂ .
8	P62160	Calmodulin	Кальций-связывающий белок, связывает и осуществляет регуляцию большого количества ферментов (в том числе протеинкиназ и фосфатаз), ионных каналов; участвует в регуляции функций centrosomes и внутриклеточного движения.
9	G1SHZ8	Chaperonin containing TCP1 subunit 8	Шаперон фолдинга белка, обладает АТР-зависимой активностью; участвует во взаимодействии сперматозоидов с оболочкой яйцеклетки, формировании пор, регуляции функционирования теломеров, транспорте токсинов.
10	G1SYJ4	Enolase 1	Moonlighting protein. Магний-зависимый фермент гликолиза, катализирует превращение 2-фосфо-D-глицериновой кислоты в фосфоенолпируват. Рецептор плазминогена. ДНК-связывающий белок, регулятор транскрипции и трансляции. Иммунорегулятор.
11	P68105	Elongation factor 1-alpha 1	Moonlighting protein. Осуществляет GTP-зависимое присоединение аминокислот-тРНК к А сайту рибосомы в процессе биосинтеза белка. Принимает участие в активации транскрипции интерферона гамма в Т-хелперных клетках.
12	P34826	Elongation factor 1-beta	Катализирует регенерацию связанного с альфа субъединицей фактора элонгации 1 GDP (превращение в GTP).
13	P29694	Elongation factor 1-gamma	Связывает комплекс с другими клеточными компонентами, обладает глутатион-S-трансферазной активностью (участие в метаболизме глутатиона).
14	P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A	Moonlighting protein. Гомотетрамер. Ключевой фермент гликолиза и глюконеогенеза. Катализирует образование D-глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата из фруктозо-1,6-бисфосфата. Ингибирует Agr2/3 комплекс-опосредованную полимеризацию актина. Осуществляет позитивную регуляцию миграции клеток.
15	G1SVB6	Glutamate dehydrogenase	Катализирует обратимое превращение L-глутаминовой кислоты в α-кетоглутаровую.

АНАЛИЗ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С 26S И 20S ПРОТЕАСОМАМИ

Таблица 6. Ассоциированные с протеасомами белки, общие для четырёх фракций (20S и 26S протеасом мозга и 20S и 26S протеасом печени кролика). Названия белков и их функции приведены согласно базе данных Uniprot

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции
16	P11909	Glutathione peroxidase 1	Moonlighting protein. Детоксикация гиперпероксидов. Ингибирование апоптоза и воспаления. Регуляция сигнальных путей. Регуляция транскрипции.
17	Q08863	Glutathione S-transferase alpha I	Обладает глутатионтрансферазной активностью, участвует в метаболизме глутатиона.
18	P46409	Glutathione S-transferase Mu 1	Обладает глутатионтрансферазной активностью, участвует в метаболизме глутатиона.
19	P46406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Moonlighting protein. Ключевой фермент гликолиза, катализирует превращение D-глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосфоглицерат. Работает как митохондриальная транс-S-нитрозилаза. Регулирует организацию цитоскелета. Работает как регулятор трансляции. Важна для врождённого иммунного ответа.
20	G1T3Y8	Heat shock protein family D (Hsp60) member 1	Moonlighting protein. АТФ-зависимый молекулярный шаперон. Предотвращает мисфолдинг белков. Регуляция иммунного ответа.
21	P30946	Heat shock protein HSP 90-alpha	Молекулярный шаперон, осуществляет регуляцию передачи сигнала, клеточного цикла, регуляцию апоптоза, иммунного ответа, фолдинга белков.
22	G1T9M9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 8	АТФ-зависимый молекулярный шаперон.
23	O19049	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Участвует в регуляции транскрипции, процессинге и сплайсинге РНК.
24	G1THZ6	Immunoglobulin heavy constant mu	Иммунный ответ.
25	P13491	L-lactate dehydrogenase A chain	Moonlighting protein. Катализирует окисление молочной кислоты в пируват. Участвует в регуляции транскрипции.
26	G1TZE2	Maleylacetoacetate isomerase	Катализирует взаимопревращение 4-малеилацетоацетат = 4-фумарилацетоацетат, участвует в деградации L-фенилаланина.
27	G1SQ02	Peroxiredoxin 1	Тиол-специфическая пероксидаза.
28	G1T8Z0	Peroxiredoxin 6	Тиол-специфическая пероксидаза.
29	G1SER8	Profilin	Актин-связывающий белок, участвует в структуризации актинового цитоскелета.
30	P08628	Thioredoxin	Протеин дисульфид-оксидоредуктазная активность. Регуляция связывания факторов транскрипции с ДНК. Участвует в регуляции окислительно-восстановительного потенциала клетки и передачи сигнала.
31	P00939	Triosephosphate isomerase	Moonlighting protein. Фермент гликолиза и глюконеогенеза, катализирует взаимопревращение дигидроксиацетонфосфата и D-глицеральдегид-3-фосфата. Обладает также метилглиоксальсинтазной активностью.
32	G1T7R2	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon	Участвует в передаче сигнала путём связывания фосфосерин-содержащих белков.
33	P62975	Ubiquitin	Метит белки для последующей элиминации в протеасомах, участвует во многих процессах внутриклеточной регуляции.
34	Q29504	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Катализирует АТФ-зависимую первую стадию убиквитинирования белков.
35	G1THY3	Ubiquitin conjugating enzyme E2 V1	Участвует в K63-убиквитинировании белков. Регуляция сигнального пути NF-κB.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ белков выполнен с использованием оборудования и ресурсов ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 г.г.) (в части масс-спектрометрического анализа) и гранта РФФИ 19-015-00073а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schwartz A.L., Ciechanover A. (2009) Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **49**, 73-96. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340
2. Goldberg A.L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **426**, 895-899. DOI: 10.1038/nature02263
3. Finley D., Chen X., Walters K.J. (2016) Gates, channels, and switches: elements of the proteasome machine. *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 77-93. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.009
4. Tanaka K. (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **85**, 12-36. DOI: 10.2183/pjab.85.12
5. Kish-Trier E., Hill C.P. (2013) Structural biology of the proteasome. *Annu. Rev. Biophys.*, **42**, 29-49. DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130417
6. Wolf D.H., Hilt W. (2004) The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 19-31. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.007
7. Медведев А.Е., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Медведева М.В., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Згода В.Г. (2017) Митохондриальный субпротеом Rpn10-связывающих белков мозга и его изменения, индуцированные нейротоксином МФТП и нейропротектором изатином. *Биохимия*, **82**(3), 470-480. [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) Brain Mitochondrial Subproteome of Rpn10-Binding Proteins and Its Changes Induced by the Neurotoxin MPTP and the Neuroprotector Isatin. *Biochemistry (Moscow)*, **82**(3), 330-339.] DOI: 10.1134/S0006297917030117
8. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Капица И.Г., Иванова Е.А., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2021) Изменение митохондриального субпротеома Rpn13-связывающих белков мозга мыши под действием нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина. *Биомедицинская химия*, **67**(1), 51-65. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2021) Changes in the mitochondrial subproteome of mouse brain Rpn13-binding proteins induced by the neurotoxin MPTP and the neuroprotector isatin. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(1), 51-65.] DOI: 10.18097/PBMC20216701051
9. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Медведев А.Е. (2020) Качественное различие митохондриальных субпротеомов Rpn10- и Rpn13-связывающих белков мозга. *Биомедицинская химия*, **66**(2), 138-144. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Medvedev A.E. (2020) Qualitative difference of the mitochondrial subproteomes of brain Rpn10- and Rpn13-binding proteins. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(2), 297-305.] DOI: 10.18097/PBMC20206602138
10. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Копылов А.Т., Медведева М.В., Згода В.Г., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2017) Количественное аффинное взаимодействие убиквитинированных и неубиквитинированных белков с Rpn10 субъединицей протеасом. *Биохимия*, **82**(9), 1338-1344. [Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Kopylov A.T., Medvedeva M.V., Zgoda V.G., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2017) Quantitative affinity interaction of ubiquitinated and non-ubiquitinated proteins with proteasome subunit Rpn10. *Biochemistry (Moscow)*, **82**(9), 1042-1047.] DOI: 10.1134/S0006297917090073
11. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Згода В.Г., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2019) Биосенсорное исследование взаимодействия белков с коровой частью протеасомы. *Биомедицинская химия*, **65**(4), 306-310. [Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Zgoda V.G., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2019) A biosensor study of protein interaction with the 20S proteasome core particle. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(4), 306-310.] DOI: 10.18097/PBMC20196504306
12. Бунеева О., Копылов А., Калашина С., Згода В., Медведев А. (2021) 20S and 26S proteasome-binding proteins of the rabbit brain: a proteomic dataset. *Data Brief*, **38**, 107276. DOI: 10.1016/j.dib.2021.107276
13. Шарова Н.П., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Люпина Ю.В., Дмитриева С.Б., Карпова Я.Д. (2012–2021) Способ разделения пулов 26S- и 20S-протеасом из цитоплазматической фракции клеток. Патент № RU 2427623 C1 от 27.08.2011, Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. [Sharova N.P., Astakhova T.M., Lyupina Yu.V., Dmitrieva S.B., Erokhov P.A., Karpova Ya.D. (2012–2021) Method of 26S- and 20S-Proteasome Pool Division from Cytoplasmic Cell Fraction, Russian State Patent Agency Certificate, Patent No. RU 2427623 C1 of 27.08.2011.]
14. Scopes R.K., Stoter A. (1982) Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract. *Methods Enzymol.*, **90**(Pt. E), 479-490. DOI: 10.1016/s0076-6879(82)90175-6
15. Besche H.C., Haas W., Gygi S.P., Goldberg A.L. (2013) Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. *Biochemistry*, **48**(11), 2538-2549. DOI:10.1021/bi802198q
16. Wang X., Huang L. (2008) Identifying dynamic interactors of protein complexes by quantitative mass spectrometry.

- Mol. Cell Proteomics, **7**(1), 46-57.
DOI: 10.1074/mcp.M700261-MCP200
17. Артамонова Т.О., Ходорковский М.А., Цимоха А.С. (2014) Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562. Биоорганическая химия, **40**(6), 720-734. [Artamonova T.O., Khodorkovskii M.A., Tsimokha A.S. (2014) Mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes from the human myelogenous leukemia K562 cell line. Bioorg. Khim., **40**(6), 720-734.] DOI: 10.1134/s1068162014060041
18. Зайкова Ю.Я., Куличкова В.А., Ермолаева Ю.Б., Боттрилл А., Барлев Н.А., Цимоха А.С. (2013) Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии. Цитология, **55**(2), 111-122. [Zaikova Yu.Ya., Kulichkova V.A., Ermolaeva Yu.B., Bottrill A., Barlev N.A., Tsimokha A.S. (2013) Characterization of extracellular proteasomes and its interacting proteins by iTRAQ mass spectrometry. Tsitologiya, **55**(2), 111-122.]
19. Kohr M.J., Murphy E., Steenbergen C. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-mitrosylase in the heart. PLoS One, **9**(10), e111448. DOI: 10.1371/journal.pone.0111448
20. Kang H.J., Jung S.K., Kim S.J., Chung S.J. (2008) Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. Acta Crystallogr., Sect. D., **64**, 651-657. DOI: 10.1107/S0907444908008561
21. Qiao G., Wu A., Chen X., Tian Y., Lin X. (2021) Enolase 1, a moonlighting protein, as a potential target for cancer treatment. Int. J. Biol. Sci., **17**(14), 3981-3992. DOI: 10.7150/ijbs.63556
22. Didiasova M., Schaefer L., Wygrecka M. (2019) When place matters: shuttling of enolase-1 across cellular compartments. Front. Cell Dev. Biol., **7**, 61. DOI: 10.3389/fcell.2019.00061
23. Ejiri S. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. Biosci. Biotechnol. Biochem., **66**(1), 1-21. DOI: 10.1271/bbb.66.1
24. Pirovich D.B., Da'dara A.A., Skelly P.J. (2021) Multifunctional fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a therapeutic target. Front. Mol. Biosci., **8**, 719678. DOI: 10.3389/fmolb.2021.719678
25. Gizak A., Wiśniewski J., Heron P., Mamczur P., Sygusch J., Rakus D. (2019) Targeting a moonlighting function of aldolase induces apoptosis in cancer cells. Cell Death Dis., **10**(10), 712. DOI: 10.1038/s41419-019-1968-4
26. Conrad M., Schneider M., Seiler A., Bornkamm G.W. (2007) Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. Biol. Chem., **388**(10), 1019-1025. DOI: 10.1515/BC.2007.130
27. Haraguchi C.M., Mabuchi T., Hirata S., Shoda T., Yamada A.T., Hoshi K., Yokota S. (2003) Spatiotemporal changes of levels of a moonlighting protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, in subcellular compartments during spermatogenesis in the rat testis. Biol. Reprod., **69**(3), 885-895. DOI: 10.1095/biolreprod.102.013524
28. Jeffery C.J. (2018) Protein moonlighting: what is it, and why is it important? Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, **373**(1738), 20160523. DOI: 10.1098/rstb.2016.0523
29. Brighenti E., Carnicelli D., Brigotti M., Fiume L. (2017) The inhibition of lactate dehydrogenase A hinders the transcription of histone 2B gene independently from the block of aerobic glycolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun., **485**(4), 742-745. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.119
30. Auer J., Camoin L., Courtot A.M., Hotellier F., de Almeida M. (2004) Evidence that P36, a human sperm acrosomal antigen involved in the fertilization process is triosephosphate isomerase. Mol. Reprod. Dev., **68**, 515-552. DOI: 10.1002/mrd.20107
31. Enenkel C. (2014) Proteasome dynamics. Biochim. Biophys. Acta, **1843**, 39-46. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.023

Поступила в редакцию: 12. 01. 2022.
После доработки: 28. 01. 2022.
Принята к печати: 01. 02. 2022.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PROTEINS ASSOCIATED WITH 26S AND 20S PROTEASOMES ISOLATED FROM RABBIT BRAIN AND LIVER

O.A. Buneeva^{1}, A.T. Kopylov¹, V.G. Zgoda¹, O.V. Gnedenko¹,
S.A. Kaloshina¹, M.V. Medvedeva², A.S. Ivanov¹, A.E. Medvedev¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

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

²Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, 119991 Russia

We have isolated fractions of 26S and 20S proteasomes from the rabbit liver and the brain. According to mass spectrometric (MS) analysis, the 26S proteasome fractions from these organs contained catalytic and regulatory subunits characteristic of the proteasome core and regulatory subunits. The 20S fractions of brain and liver proteasomes contained only catalytic proteasome subunits. In addition to proteasome subunits, the isolated fractions contained components of the ubiquitin-proteasome system, ubiquitinated proteins, enzymes that play an important role in metabolic processes, cytoskeletal components, signaling, regulatory, and protective proteins, as well as proteins regulating gene expression, cell division, and differentiation. The abundance of a number of proteasome-associated proteins was comparable or exceeded the abundance of intrinsic proteasome components. About a third of the proteins common to all studied fractions (26S and 20S of brain and liver proteasomes) belong to the group of multifunctional proteins. Selective biosensor validation confirmed the affinity binding of proteins (aldolase, phosphoglycerate kinase) identified during MS analysis to the brain 20S proteasome. Comparison of the subproteomes of the 26S and 20S brain proteasomes showed that removal of components of the regulatory (19S) subparticles caused almost two-fold increase in the total number of individual proteins associated with the core part of the proteasome (20S). In the liver, the number of proteins associated with the core part of the proteasome remained basically unchanged after the removal of the components of the regulatory (19S) subparticles. This indicates that in the brain and, possibly, in other organs, proteins of the regulatory (19S) subunit play an important role in the formation of the proteasome interactome.

Key words: 26S and 20S proteasomes; ubiquitin-proteasome system; subproteome; biosensor; moonlighting proteins

Funding. The work done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030 was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-015-00073a).

Received 12.01.22; revised 28.01.22; accepted 01.02.22.