

©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО СУБПРОТЕОМА Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА МЫШИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙРОТОКСИНА МФТП И НЕЙРОПРОТЕКТОРА ИЗАТИНА

О.А. Бунеева^{1}, А.Т. Копылов¹, О.В. Гнеденко¹, М.В. Медведева²,
И.Г. Капица³, Е.А. Иванова³, А.С. Иванов¹, А.Е. Медведев¹*

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

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

³Институт фармакологии имени В.В. Закусова, 125315, Москва

Митохондриальная дисфункция и сбой в работе убиквитин-протеасомной системы (UPS) вносят существенный вклад в развитие болезни Паркинсона (БП). Субъединица протеасомы Rpn13, расположенная на регуляторной субчастице (19S), играет важную роль в доставке белков, подлежащих деградации, в протеолитическую часть (20S) протеасомы. Ранее нами обнаружен ряд митохондриальных белков мозга, специфически связывающихся с Rpn13 (Бунеева и соавт., Биомедицинская химия, 2020, **66**(2), 138-144). В данной работе изучено влияние нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) и нейропротектора изатина на митохондриальный субпротеом Rpn13-связывающих белков мозга мыши. Введение МФТП (30 мг/кг) животным вызывало развитие двигательных нарушений, свойственных для БП, а предварительное введение изатина (100 мг/кг) ослабляло их выраженность. При этом введение МФТП, изатина или их комбинации (изатин + МФТП) приводило к изменению общего числа и состава Rpn13-связывающих белков. Введение МФТП снижало общее число Rpn13-связывающих белков по сравнению с контролем, а введение изатина перед введением МФТП или без МФТП приводило к существенному увеличению числа Rpn13-связывающих белков преимущественно из функциональной группы белков, участвующих в регуляции метаболизма белков, а также экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. Выборочная биосенсорная валидация подтвердила взаимодействие ряда белков (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, пируваткиназа, гистоны H2A и H2B), выявленных в ходе протеомного профилирования, с субъединицей протеасомы Rpn13. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального МФТП-индуцированного паркинсонизма нейропротекторное действие изатина может быть направлено на взаимодействие митохондрий с компонентами UPS.

Ключевые слова: МФТП-индуцированный паркинсонизм; нейропротектор; изатин; Rpn13-связывающие белки; митохондриальная фракция мозга; субпротеом

DOI: 10.18097/PBMC20216701051

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — одно из самых распространённых двигательных расстройств, этиология которого остаётся не до конца изученной [1]. Некоторые исследователи полагают, что основная причина нейродегенерации при этом заболевании — мисфолдинг белков, приводящий к их агрегации и появлению специфических включений — телец Леви [2-4]. Другие отводят первичную роль повреждению митохондрий в результате окислительного стресса или выделяют как решающий фактор сбой в работе убиквитин-протеасомной системы, либо считают, что обе эти причины связаны между собой и взаимозависимы [5-7].

Убиквитин-протеасомная система (UPS) — один из основных протеолитических путей, служащих для своевременного таргетного удаления индивидуальных белков из клетки [8-10]. Протеасомы представляют собой сложноорганизованные мультиферментные протеолитические комплексы, в составе которых особая роль отводится регуляторным субъединицам Rpn10, Rpn13 и Rpn1 — рецепторам

убиквитина [11-13]. Исследования, выполненные на мышах, дефицитных по Rpn10 и Rpn13, свидетельствуют о том, что эти протеасомные субъединицы играют взаимозаменяемые роли в узнавании убиквитинированных белков [14, 15]. В то же время недавно выяснилось, что эти протеасомные субъединицы различаются по сродству к различным полиубиквитиновым цепям [16]. Проведённое нами сравнительное исследование митохондриальных субпротеомов Rpn10- и Rpn13-связывающих белков мозга мышей выявило существенные различия: из более чем полусотни связывающихся белков, характерных для каждой из субъединиц, лишь два (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) и пируваткиназа (ПК)) были общими [17], причем связывание этих белков с Rpn10 было подтверждено в модельных экспериментах с использованием иммобилизованной на кювете оптического биосенсора субъединицы Rpn10 и высокоочищенных препаратов этих ферментов [18]. Это может свидетельствовать о разной роли рецепторов убиквитина Rpn10 и Rpn13 в деградации как митохондриальных белков, так и белков, ассоциированных с митохондриями [17].

Ранее мы показали, что при введении нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), вызывающего у мышей двигательные нарушения, свойственные БП, и нейропротектора изатина, снижающего их выраженность, митохондриальный субпротеом Rpn10-связывающих белков мозга претерпевает существенные изменения [19]. В нём чётко различались два пула: конститутивный пул Rpn10-связывающих белков, нечувствительный к действию нейротоксинов и нейропротекторов, и вариабельный пул, специфически изменяющийся при введении МФТП, изатина или обоих этих веществ [19].

Целью данной работы было исследование влияния МФТП и изатина на протеомные профили Rpn13-связывающих белков препаратов митохондрий мозга мышей и биосенсорная валидация связывания очищенных препаратов ГАФД и пируваткиназы, а также гистонов H2A и H2B с Rpn13-субъединицей протеасомы.

МЕТОДИКА

Реактивы и материалы

В работе использовались следующие реактивы: бромциан-активированная сефароза 4В, изатин, МФТП, дитиотреитол, коктейль ингибиторов протеаз, Трис (гидроксиметил)аминометан, мочеви́на, гидрокарбонат аммония, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, натриевая соль деоксихолевой кислоты, бикарбонат триэтиламония, Кумасси бриллиантовый синий G-250 ("Sigma Aldrich", США); рекомбинантные гистоны H2A и H2B человека ("New England Biolabs", США; электрофоретическая чистота 95%), рекомбинантная Rpn13 субъединица 19S протеасомы ("UBPBio", США; электрофоретическая чистота 95%); 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); колонки MICRO SPIN COLUMN C18 ("Pierce"); центрифужные концентрационные фильтры Amicon Ultracel-10K ("Millipore", США); колонка Acclaim PepMap® RSLC C18 (150 мм × 75 мкм, размер частиц 2 мкм, размер пор 100 Å) ("Dionex", США); HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% детергент P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4)); 10 мМ ацетатный буфер (pH 4,5); набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5)) ("Cytiva", США, ранее "GE Healthcare Life Science", США). Остальные реагенты были отечественного производства высшей степени чистоты.

Экспериментальные животные, моделирование паркинсонизма и исследование влияния МФТП и изатина на поведенческие реакции

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 массой 23-26 г из Центрального питомника лабораторных животных ("Столбовая", Московская область), прошедших однедельный карантин после прибытия. Животных содержали при естественном световом режиме, постоянном доступе к питьевой воде и корму. МФТП вводили внутривентриально (в/б) в дозе 30 мг/кг, изатин — в дозе 100 мг/кг в/б за 30 мин до МФТП. Контрольные животные получали в/б физиологический раствор в расчёте 0,1 мл на 10 г веса. Каждая группа состояла из 6–8 мышей. Изменения поведенческих реакций, вызванных введением исследуемых веществ, анализировали с использованием теста оценки ригидности, тестов оценки двигательной активности и координации движений: перемещение в актометре, "Открытое поле", "Вращающийся горизонтальный стержень" и "Вертикальный стержень" [20-24]. Регистрацию ригидности по уменьшению длины шага мыши проводили через 10-12 мин после введения нейротоксина. Исследование поведения мышей в условиях теста "Вертикальный стержень" и "Вращающийся горизонтальный стержень" проводили через 90 мин после введения животным МФТП, а в актометре — через 100-110 мин. Через 24 ч после введения МФТП исследовали поведение мышей в тесте "Открытое поле". Ориентировочно-исследовательскую реакцию в этом тесте определяли по сумме показателей горизонтальной и вертикальной активности, выраженной в условных единицах (у.е.). Все процедуры были одобрены соответствующими комитетами по проведению исследований на животных.

Выделение митохондриальной фракции мозга проводили, как описано ранее [25].

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу и пируваткиназу выделяли из скелетных мышц кролика, как описано в [26]. Полученные препараты ферментов были электрофоретически гомогенны и характеризовались удельной активностью 135 мкмоль/мин на 1 мг белка и 230 мкмоль/мин на 1 мг белка соответственно.

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

Митохондриальную фракцию мозга мышей лизировали 3% 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 Rpn13 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 D280) 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 объёма 250 мкл с помощью мембранных фильтров Amicon Ultra, как рекомендовано производителем. Затем осаждали белки смесью хлороформ-этанол, как описано в [27]. Восстановление дисульфидных связей, алкилирование сульфгидрильных групп и трипсинолиз проводили на мембранных центрифужных фильтрах, как описано в [28]. 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 Permapar® (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 $R=70$ K 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. Тандемное сканирование проводили 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 посформате "raw" конвертировали в формат "mgf" с использованием MSConvert (ProteomeWizard). Идентификацию проводили против базы данных (Human, версия Uniprot от декабря 2019 года), содержащей нативные и обращённые 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-e или LRGG-e). 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.

Биосенсорные исследования

Валидацию взаимодействия высокоочищенных белков с Rpn13 субъединицей протеасомы осуществляли, используя оптический SPR-биосенсор Biacore T200 и специальное программное обеспечение Biacore Control ("Cytiva"). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 ("Cytiva"), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. Молекулярные взаимодействия регистрировали в виде сенсограмм, представляющих зависимость сигнала биосенсора (в резонансных единицах, RU) от времени.

Иммобилизацию Rpn13 субъединицы, гистона H2A или H2B выполняли в соответствии с разработанным протоколом [18]. Взаимодействие белков с иммобилизованными Rpn13 субъединицей,

ВЛИЯНИЕ МФТП И ИЗАТИНА НА Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

гистоном H2A или H2B исследовали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин. Перед повторным использованием поверхность чипа регенерировали промывкой 1 М NaCl в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин.

Полученные сенсограммы анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 (“Cytiva”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние МФТП и изатина на двигательную активность мышей

Внутрибрюшинное введение мышам C57BL/6 МФТП в дозе 30 мг/кг приводило к появлению у них двигательных расстройств, характерных для экспериментального паркинсонизма [29, 30]. Так, через 10-12 мин после введения нейротоксина МФТП у животных отмечалась ярко выраженная ригидность, что проявилось в значимом уменьшении в 1,68 раза длины шага мышей по сравнению с контролем (табл. 1). Также у животных обнаружилось снижение двигательной активности в актометре на фоне введения МФТП: количество горизонтальных перемещений снизилось в 33,6 раза по сравнению с показателем контрольной группы животных ($p<0,05$) (табл. 2).

Исследование поведения мышей в условиях теста “Вертикальный стержень” проводили через 90 мин после введения животным МФТП. Животным с МФТП индуцированным паркинсонизмом было значительно труднее осуществить поворот в направлении движения к клетке (сверху вниз):

среднее время, необходимое для поворота, было в 9 раз больше ($p<0,05$), чем в контрольной группе. Продолжительность спуска мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом по вертикальному стержню была в 2,92 раза ($p<0,05$) больше, чем у контрольных животных (табл. 2). Через 90-100 мин после инъекции нейротоксина МФТП у животных развивался выраженный моторный дефицит, регистрируемый в тесте “Вращающийся стержень”: продолжительность удержания на вращающемся стержне была в 3,67 раза меньше показателя контрольной группы ($p<0,05$) (табл. 2).

Через 24 ч после введения последнего препарата отмечалось снижение горизонтальной и вертикальной активности в тесте “Открытое поле” в 1,85 ($p<0,05$) и 1,57 раз соответственно по сравнению с группой “Контроль” (табл. 1).

В группе животных, получавших изатин за 30 мин до инъекции МФТП, значимых отличий по показателю двигательной активности не обнаружено, хотя соединение увеличило в 4,8 раза число горизонтальных перемещений относительно группы, которой вводили только МФТП. На показатель ригидности предварительное введение изатина (перед МФТП) влияния не оказывало (табл. 1).

Введение изатина за 30 мин до инъекции МФТП не уменьшало выраженности олигокинезии и не оказывало существенного влияния на снижение моторного дефицита у мышей с ПС через 90 мин после введения последнего препарата (тесты “Вращающийся стержень” и “Вертикальный стержень” (табл. 2), однако существенно улучшало показатели двигательной активности, регистрируемые

Таблица 1. Влияние МФТП и изатина на ригидность и двигательную активность мышей линии C57BL/6

Вещества	Ригидность (длина шага, см)	Тест «Открытое поле»	
		Горизонтальная активность, ед.	Вертикальная активность, ед.
Контроль, физ. р-р. в/б	6,7±0,2	47,7±6,8	4,7±1,1
Изатин 100 мг/кг в/б	5,8±0,2 [#]	78,8±18,0	8,3±1,0 [#]
Физ. р-р + МФТП 30 мг/кг в/б	4,0±0,2 [#]	25,8±4,1 [#]	3,0±1,0
Изатин 100 мг/кг в/б + МФТП	4,0±0,3 [#]	42,1±5,5*	7,0±1,4

Примечание. Приведены средние значения ± ошибка средней. # — $p<0,05$ достоверность отличий относительно группы “Контроль”. * — $p<0,05$ достоверность отличий относительно группы “МФТП”.

Таблица 2. Влияние МФТП и изатина на двигательную активность мышей линии C57BL/6 (тесты “Вертикальный стержень” и “Вращающийся стержень”, перемещение в актометре)

Вещества	Координация движений		Время нахождения на стержне, вращающемся с постоянной скоростью 10 об./мин, с	Среднее количество горизонтальных перемещений в минуту в актометре, ед.
	«t-поворота», с	«t-спуска», с		
Контроль: физ. р-р. в/б	1,1±0,1	7,6±0,8	180,0±0,0	155,6±31,5
Изатин 100 мг/кг в/б	1,7±0,4	8,2±1,2	170,8±9,3	276,8±25,2 [#]
Физ. р-р + МФТП 30 мг/кг в/б	9,5±2,8 [#]	22,2±4,5 [#]	49,0±19,9 [#]	4,6±1,2 [#]
Изатин 100 мг/кг в/б + МФТП	7,89±2,1 [#]	21,00±4,4 [#]	57,6±20,3 [#]	22,2±10,4 [#]

Примечание. Приведены средние значения ± ошибка средней. # — $p<0,05$ достоверность отличий относительно группы “Контроль”.

в установке “Открытое поле” через 24 ч после введения нейротоксина (табл. 1). Так, на фоне изатина отмечалось увеличение горизонтальных перемещений и вертикальных стоек в 1,6 ($p<0,05$) и 2,3 раз соответственно по сравнению с группой мышей, получавших инъекцию МФТП. Таким образом, изатин при его однократном внутривбрюшинном введении в дозе 100 мг/кг мышам линии C57BL/6 с ПС не снижает нарушений, вызванных однократной инъекцией МФТП (30 мг/кг) при наблюдении в первые сутки опыта. Через 24 ч после введения изатина отмечено улучшение показателей двигательной активности по сравнению с животными, которым вводили только МФТП.

При введении изатина интактным животным отмечено увеличение двигательной активности, регистрируемой в условиях актометра, в 1,78 раза ($p<0,05$) относительно контрольной группы (табл. 2). Это не согласуется с известными представлениями о том, что высокие дозы изатина оказывают седативное действие [31]. Вместе с тем, в тестах “Вращающийся стержень” и “Вертикальный стержень”, проведенных через 90-100 мин после инъекции изатина животным без патологии и в тесте “Открытое поле” (через 24 ч после введения изатина), значимых изменений локомоторной активности по сравнению с контрольной группой мышей, получавших физиологический раствор, не наблюдалось (табл. 1, 2).

Влияние нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина на изменение субпротеома Rpn13-связывающих белков митохондрий мозга

Профилирование Rpn13-связывающих белков митохондрий мозга контрольных мышей и животных, получивших инъекции нейротоксина МФТП и (или) нейропротектора изатина позволило выявить существенные различия в числе и составе функциональных групп идентифицированных белков (табл. 3-8, рис. 1). Во всех группах животных Rpn13-связывающиеся белки митохондриальной фракции мозга распределялись по следующим

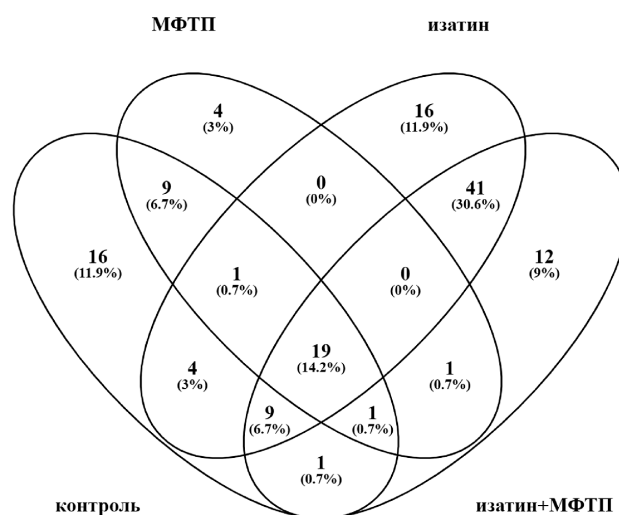


Рисунок 1. Диаграмма Венна, показывающая количество связывающихся с Rpn13-субъединицей протеасомы белков митохондриальной фракции мозга мыши, общих для животных исследованных групп.

функциональным группам: 1 — белки углеводного обмена и генерации энергии; 2 — белки цитоскелета, транспорта, экзоцитоза; 3 — белки, ответственные за регуляцию экспрессии генов, клеточное деление и дифференцировку; 4 — белки передачи сигнала и регуляции активности ферментов; 5 — антиоксидантные и защитные белки; 6 — белки, осуществляющие метаболизм белков, аминокислот и других азотистых соединений. Белок липидного обмена (аполипопротеин В-100) был обнаружен лишь в группе животных, получивших инъекции МФТП и изатина (табл. 8). Как и в случае профилирования белков митохондрий мозга, связывающихся с другим убиквитиновым рецептором протеасомы (Rpn10) [19], при исследовании профилей Rpn13-связывающих белков было обнаружено, что большинство идентифицированных белков, кроме собственно митохондриальных, ассоциировано с внутренним или наружным компартментом митохондрий (табл. 4-7).

Таблица 3. Влияние введения МФТП (30 мг/кг), изатина (100 мг/кг) и совместного введения МФТП и изатина на количество идентифицированных Rpn13-связывающих белков митохондриальной фракции мозга мышей и их распределение по функциональным группам. Стрелками показано увеличение (↑) или уменьшение (↓) количества идентифицированных Rpn13-связывающих белков по сравнению с контролем

Группа	Контроль	МФТП	изатин	МФТП+изатин
1	13	10 ↓	15 ↑	15 ↑
2	15	8 ↓	23 ↑	18 ↑
3	9	4 ↓	19 ↑	17 ↑
4	13	6 ↓	8 ↓	7 ↓
5	8	4 ↓	10 ↑	8
6	2	3 ↑	15 ↑	18 ↑
7	—	—	—	1 ↑
Общее количество	60	35 ↓	90 ↑	84 ↑

Примечание. Здесь в последующих таблицах в колонке “Группа” цифрами обозначены следующие функциональные группы белков: 1 — углеводный обмен и генерация энергии; 2 — цитоскелет, транспорт, экзоцитоз; 3 — регуляция экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; 4 — передача сигнала и регуляция активности ферментов; 5 — антиоксидантные и защитные свойства; 6 — метаболизм белков, аминокислот и других азотистых соединений; 7 — метаболизм липидов.

ВЛИЯНИЕ МФТП И ИЗАТИНА НА Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

Введение МФТП привело к существенному снижению количества Rpn13-связывающих белков (35 против 60 в контроле) в основном за счёт антиоксидантных и защитных белков, белков передачи сигнала и регуляции активности ферментов, белков цитоскелета, транспорта, экзоцитоза и белков регуляции экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (табл. 3). Инъекция изатина перед введением МФТП или без МФТП приводила к увеличению количества Rpn13-связывающих белков практически на треть (84 и 90 белков соответственно против 60 в контроле). Это увеличение происходило в основном за счёт белков, регулирующих метаболизм белков, а также экспрессию генов, клеточное деление и дифференцировку (функциональные группы 6 и 3, табл. 3). Так, из 41 белка, общего для групп животных, получавших инъекции изатина и инъекции изатина и МФТП, 13 приходится на функциональную группу 3 (из них 4 белка относятся к гистонам) и 9 приходится на группу 6 (все это рибосомные белки). Если же объединить белки, общие для этой группы, с белками, выявленными эксклюзивно в группе животных, получавших изатин, и в группе животных, получавших изатин и МФТП (всего 69 белков), то 17 из них (почти 25%) относится к функциональной группе 3 (5 из них гистоны) и 17 (почти 25%) к группе 6 (из них 14 — рибосомные белки, протеасомная альфа субъединица 7 и убиквитин-карбокси-концевая гидролаза 33). То есть, половина всех белков, которые под влиянием изатина связываются с рецептором протеасомы Rpn13, принадлежат к белкам, регулирующим метаболизм белков, экспрессию генов, клеточное деление и дифференцировку. Интересно

также, что среди Rpn13-связывающих белков, зарегистрированных только в группе животных, получавших изатин, был бета-синуклеин, который, наряду с альфа-синуклеином, включения которого являются диагностическим признаком БП, может играть роль в нейродегенерации [32].

Данные результаты сильно отличаются от полученных нами при исследовании влияния МФТП и изатина на профили белков, связывающихся с убиквитиновым рецептором протеасомы Rpn10. При введении мышам МФТП количество Rpn10-связывающих белков митохондрий мозга практически не изменялось (хотя изменялся их качественный состав), а при введении нейропротектора изатина (вместе с МФТП или индивидуально) это количество вдвое уменьшалось [19].

Пул нечувствительных к введению нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина Rpn13-связывающих белков (общих для всех четырех групп животных) был довольно обширным (19 белков). Он содержал, в частности, белки теплового шока, полиубиквитин, кальмодулин, белки цитоскелета (в основном тубулины), белки регуляции экспрессии генов. Однако самая большая функциональная группа (7 белков) содержала ферменты углеводного обмена (табл. 4).

Несмотря на то, что субъединица протеасомы Rpn13 известна как один из рецепторов убиквитинированных белков [11-13], масс-спектрометрическое профилирование Rpn13-связывающих белков не выявило так называемой “убиквитиновой сигнатуры” (характерного сдвига молекулярной

Таблица 4. Rpn13-связывающие белки, общие для всех исследованных препаратов митохондриальной фракции мозга мышей

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	MW [kDa]	Группа	Субклеточная локализация
1	P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>Hsp90aa1</i>	84,73	5	N, PM, C
2	O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	<i>Bhmt</i>	44,99	6	C
3	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	<i>Dpysl2</i>	62,23	2	C, Mch, PM
4	P0CG50	Polyubiquitin-C	<i>Ubc</i>	82,49	4	N, C
5	P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	<i>Aldoc</i>	39,37	1	C, Mch
6	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	<i>Aldoa</i>	39,33	1	C
7	P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>Gdi1</i>	50,48	4	G, C
8	P0DP26	Calmodulin-1	<i>Calm1</i>	16,82	4	C, N, Mch, PM
9	O35945	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	<i>Aldh1a7</i>	54,55	1	C
10	P68368	Tubulin alpha-4A chain	<i>Tuba4a</i>	49,89	2	C
11	Q04447	Creatine kinase B-type	<i>Ckb</i>	42,68	1	Mch, N, C
12	P52480	Pyruvate kinase PKM	<i>Pkm</i>	57,80	1	C, Mch, N
13	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>Hspa8</i>	70,82	5	C, L, E, N, PM
14	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	<i>Ldhb</i>	36,54	1	C, Mch
15	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	<i>Tubb4a</i>	49,55	2	C
16	P10126	Elongation factor 1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>	50,08	3	N, C, PM
17	P80314	T-complex protein 1 subunit beta	<i>Cct2</i>	57,44	3	C
18	P05214	Tubulin alpha-3 chain	<i>Tuba3a</i>	49,92	2	C
19	P17183	Gamma-enolase	<i>Eno2</i>	47,26	1	C, PM

Примечание. Здесь в последующих таблицах в колонке “Субклеточная локализация”: N — ядро; C — цитоплазма; Mch — митохондрии; ER — эндоплазматический ретикулум; G — комплекс Гольджи; E — эндосомы; L — лизосомы; Per — пероксисомы; PM — плазматическая мембрана.

Таблица 5. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга контрольных мышей

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

ВЛИЯНИЕ МФТП И ИЗАТИНА НА Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

Таблица 6. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мышей, получавших инъекцию МФТП

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	MW [kDa]	Группа	Субклеточная локализация
1	Q9D0F9	Phosphoglucomutase-1	<i>Pgm1</i>	61,37	1	C
2	P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>Hsp90aa1</i>	84,73	5	N, PM, C
3	O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	<i>Bhmt</i>	44,99	6	C
4	Q61553	Fascin	<i>Fscn1</i>	54,47	2	C
5	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	<i>Dpysl2</i>	62,23	2	C, Mch, PM
6	Q8BFU3	RING finger protein 214	<i>Rnf214</i>	73,57	6	C
7	P0CG50	Polyubiquitin-C	<i>Ubc</i>	82,49	4	N, C
8	Q3THS6	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	<i>Mat2a</i>	43,66	4	C
9	P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	<i>Aldoc</i>	39,37	1	C, Mch
10	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	<i>Aldoa</i>	39,33	1	C
11	Q9QUM9	Proteasome subunit alpha type-6	<i>Psmab6</i>	27,35	6	C
12	P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>Gdi1</i>	50,48	4	G, C
13	P0DP26	Calmodulin-1	<i>Calml1</i>	16,82	4	C, N, Mch, PM
14	Q80W21	Glutathione S-transferase Mu 7	<i>Gstm7</i>	25,69	5	C, ER
15	P63101	14-3-3 protein zeta/delta	<i>Ywhaz</i>	27,75	4	C, N, Mch, Ve
16	Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	<i>Pgam1</i>	28,81	1	C, N
17	P17182	Alpha-enolase	<i>Eno1</i>	47,11	1	PM, C
18	P62259	14-3-3 protein epsilon	<i>Ywhae</i>	29,15	4	C, N, PM, Mch
19	O35945	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	<i>Aldh1a7</i>	54,55	1	C
20	P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>Hnrnpk</i>	50,94	3	N, C
21	P68368	Tubulin alpha-4A chain	<i>Tuba4a</i>	49,89	2	C
22	Q04447	Creatine kinase B-type	<i>Ckb</i>	42,68	1	Mch, N, C
23	P03995	Glial fibrillary acidic protein	<i>Gfap</i>	49,86	2	C
24	P68372	Tubulin beta-4B chain	<i>Tubb4b</i>	49,79	2	C
25	O08599	Syntaxin-binding protein 1	<i>Stxbp1</i>	67,52	2	N, C, PM, Mch
26	P63242	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	<i>Eif5a</i>	16,82	3	N, ER
27	P52480	Pyruvate kinase PKM	<i>Pkm</i>	57,80	1	C, Mch, N
28	P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	<i>Hsp90ab1</i>	83,22	5	N, PM, Secreted
29	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>Hspa8</i>	70,82	5	C, L, E, N, PM
30	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	<i>Ldhb</i>	36,54	1	C, Mch
31	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	<i>Tubb4a</i>	49,55	2	C
32	P10126	Elongation factor 1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>	50,08	3	N, C, PM
33	P80314	T-complex protein 1 subunit beta	<i>Cct2</i>	57,44	3	C
34	P05214	Tubulin alpha-3 chain	<i>Tuba3a</i>	49,92	2	C
35	P17183	Gamma-enolase	<i>Eno2</i>	47,26	1	C, PM

Таблица 7. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мышей, получавших инъекцию изатина

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	MW [kDa]	Группа	Субклеточная локализация
1	O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	<i>Bhmt</i>	44,99	6	C
2	P61264	Syntaxin-1B	<i>Stx1b</i>	33,22	2	M
3	Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B	<i>Aldob</i>	39,48	1	C
4	P10922	Histone H1.0	<i>H1f0</i>	20,84	3	N
5	P04370	Myelin basic protein	<i>Mbp</i>	27,15	4	N, PM
6	P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>Gdi1</i>	50,48	4	G, C
7	Q62189	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	<i>Snrpa</i>	31,81	3	N
8	Q91ZZ3	Beta-synuclein	<i>Sncb</i>	14,04	4	C, Mch
9	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	<i>Baspl</i>	22,07	3	PM
10	P97450	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	<i>Atp5j</i>	12,48	1	Mch
11	P16330	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	<i>Cnp</i>	47,09	6	M
12	P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	<i>Hist1h2bf</i>	13,92	3	N
13	Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	<i>Tubb2a</i>	49,87	2	C
14	Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	<i>Ndufa2</i>	10,90	1	Mch
15	P62320	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	<i>Snrpd3</i>	13,90	3	N
16	P61358	60S ribosomal protein L27	<i>Rpl27</i>	15,78	6	C, ER
17	Q9Z1P6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	<i>Ndufa7</i>	12,56	1	Mch
18	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	<i>Ldhb</i>	36,54	1	C, Mch
19	P05214	Tubulin alpha-3 chain	<i>Tuba3a</i>	49,92	2	C
20	P61255	60S ribosomal protein L26	<i>Rpl26</i>	17,24	6	C, ER
21	P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>Hsp90aa1</i>	84,73	5	N, PM, C
22	O08807	Peroxiredoxin-4	<i>Prdx4</i>	31,03	5	ER
23	P13595	Neural cell adhesion molecule 1	<i>Ncam1</i>	119,35	4	PM
24	P62751	60S ribosomal protein L23a	<i>Rpl23a</i>	17,68	6	C, ER
25	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>Hspe1</i>	10,95	5	Mch
26	Q61171	Peroxiredoxin-2	<i>Prdx2</i>	21,76	5	C
27	P62889	60S ribosomal protein L30	<i>Rpl30</i>	12,77	6	C, ER
28	P0DP26	Calmodulin-1	<i>Calml1</i>	16,82	4	C, N, Mch, PM
29	P11031	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	<i>Subl</i>	14,41	3	N
30	P52503	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	<i>Ndufs6</i>	13,01	1	Mch
31	P60710	Actin, cytoplasmic 1	<i>Actb</i>	41,70	2	C
32	P62301	40S ribosomal protein S13	<i>Rps13</i>	17,21	6	C, N
33	P26645	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	<i>Marcks</i>	29,64	2	C
34	P55066	Neurocan core protein	<i>Ncan</i>	137,11	2	Secreted
35	Q9D0M5	Dynein light chain 2,	<i>Dynll2</i>	10,34	2	C
36	O08599	Syntaxin-binding protein 1	<i>Stxbp1</i>	67,52	2	C
37	P26350	Prothymosin alpha	<i>Ptma</i>	12,24	3	N
38	Q8C0J6	Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHC	<i>Sowahe</i>	54,90	2	C
39	Q62059	Versican core protein	<i>Vcan</i>	366,55	2	Secreted
40	Q6IRU5	Clathrin light chain B	<i>Cltb</i>	25,15	2	PM
41	Q7SIG6	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	<i>Asap2</i>	106,73	4	C
42	Q9DD18	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1	<i>Dtdl</i>	23,36	6	C
43	P62852	40S ribosomal protein S25	<i>Rps25</i>	13,73	6	C
44	O35988	Syndecan-4	<i>Sdc4</i>	21,46	3	Secreted

ВЛИЯНИЕ МФТП И ИЗАТИНА НА Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

Таблица 7. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мышей, получавших инъекцию изатина (продолжение)

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	MW [kDa]	Группа	Субклеточная локализация
45	P10126	Elongation factor 1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>	50,08	3	N, C, PM
46	Q9D1L0	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2	<i>Chchd2</i>	15,65	3	Mch, N
47	P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>Ppia</i>	17,95	6	C, Secreted
48	Q71M36	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	<i>Cspg5</i>	60,36	3	C, PM, G, ER
49	P62627	Dynein light chain roadblock-type 1	<i>Dynlrb1</i>	10,98	2	C
50	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	<i>Dpysl2</i>	62,23	2	C, Mch, PM
51	P43274	Histone H1.4	<i>Hist1h1e</i>	21,96	3	N
52	B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	<i>Ptprz1</i>	254,24	3	PM
53	P62806	Histone H4	<i>Hist1h4a</i>	11,36	3	N
54	P63168	Dynein light chain 1, cytoplasmic	<i>Dynll1</i>	10,35	2	C
55	Q9CWH6	Proteasome subunit alpha type-7-like	<i>Pma8</i>	27,84	6	C
56	Q8R001	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	<i>Mapre2</i>	36,92	2	C
57	Q9D3D9	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	<i>Atp5d</i>	17,58	1	Mch
58	P56382	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	<i>Atp5e</i>	5,83	1	Mch
59	O35945	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	<i>Aldh1a7</i>	54,55	1	C
60	P68368	Tubulin alpha-4A chain	<i>Tuba4a</i>	49,89	2	C
61	P56391	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	<i>Cox6b1</i>	10,06	1	Mch
62	P57780	Alpha-actinin-4	<i>Actn4</i>	104,91	2	C
63	Q61361	Brevican core protein	<i>Bcan</i>	95,75	2	Secreted
64	P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	<i>Prdx5</i>	21,88	5	Mch
65	P62908	40S ribosomal protein S3	<i>Rps3</i>	26,65	6	N, Mch
66	P80314	T-complex protein 1 subunit beta	<i>Cct2</i>	57,44	3	C
67	Q9CZX8	40S ribosomal protein S19	<i>Rps19</i>	16,07	6	N, C
68	P62900	60S ribosomal protein L31	<i>Rpl31</i>	14,45	6	N, C
69	P10639	Thioredoxin	<i>Txn</i>	11,66	5	C
70	P09405	Nucleolin	<i>Ncl</i>	76,67	3	N, C
71	P0CG50	Polyubiquitin-C	<i>Ubc</i>	82,49	4	N, C
72	P15864	Histone H1.2	<i>Hist1h1c</i>	21,25	3	N
73	P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	<i>Aldoc</i>	39,37	1	C, Mch
74	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	<i>Aldoa</i>	39,33	1	C
75	E9Q557	Desmoplakin	<i>Dsp</i>	332,70	2	C
76	Q61937	Nucleophosmin	<i>Npm1</i>	32,53	3	N
77	O70456	I4-3-3 protein sigma	<i>Sfn</i>	27,68	4	C
78	Q04447	Creatine kinase B-type	<i>Ckb</i>	42,68	1	Mch, N, C
79	P08553	Neurofilament medium polypeptide	<i>Nefm</i>	95,85	2	C
80	Q9CY00	Tetratricopeptide repeat protein 30B	<i>Ttc30b</i>	76,04	2	C
81	Q7TQF7	Amphiphysin	<i>Amph</i>	74,96	2	C
82	P52480	Pyruvate kinase PKM	<i>Pkm</i>	57,80	1	C, Mch, N
83	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>Hspa8</i>	70,82	5	C, L, E, N, PM
84	P67984	60S ribosomal protein L22	<i>Rpl22</i>	14,74	6	C
85	P84089	Enhancer of rudimentary homolog	<i>Erh</i>	12,25	3	C
86	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	<i>Tubb4a</i>	49,55	2	C
87	P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Sod1</i>	15,93	5	N, C
88	P35700	Peroxiredoxin-1	<i>Prdx1</i>	22,16	5	C, Mch, N
89	P17183	Gamma-enolase	<i>Eno2</i>	47,26	1	C, PM
90	P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>Hspd1</i>	60,91	5	Mch

Таблица 8. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мышей, получавших инъекцию изатина и МФТП

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	MW [kDa]	Группа	Субклеточная локализация
1	Q9CR68	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	<i>Uqcrcf1</i>	29,34	1	Mch
2	O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	<i>Bhmt</i>	44,99	6	C
3	P61264	Syntaxin-1B	<i>Stx1b</i>	33,22	2	M
4	Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B	<i>Aldob</i>	39,48	1	C
5	P97351	40S ribosomal protein S3a	<i>Rps3a</i>	29,86	6	N, C
6	P10922	Histone H1.0	<i>H1f0</i>	20,84	3	N
7	P04370	Myelin basic protein	<i>Mbp</i>	27,15	4	N, PM
8	P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>Gdi1</i>	50,48	4	G, C
9	Q8R5K2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33	<i>Usp33</i>	102,66	6	C, N
10	Q62189	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	<i>Snrpa</i>	31,81	3	N
11	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	<i>Basp1</i>	22,07	3	PM
12	P97450	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	<i>Atp5j</i>	12,48	1	Mch
13	P62267	40S ribosomal protein S23	<i>Rps23</i>	15,79	6	C
14	P16330	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	<i>Cnp</i>	47,09	6	M
15	P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	<i>Hist1h2bf</i>	13,92	3	N
16	Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	<i>Ndufa2</i>	10,90	1	Mch
17	P62320	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	<i>Snrpd3</i>	13,90	3	N
18	P61358	60S ribosomal protein L27	<i>Rpl27</i>	15,78	6	C, ER
19	Q9Z1P6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	<i>Ndufa7</i>	12,56	1	Mch
20	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	<i>Ldhb</i>	36,54	1	C, Mch
21	P05214	Tubulin alpha-3 chain	<i>Tuba3a</i>	49,92	2	C
22	P61255	60S ribosomal protein L26	<i>Rpl26</i>	17,24	6	C, ER
23	E9Q414	Apolipoprotein B-100	<i>Apob</i>	509,11	7	Secreted
24	P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>Hsp90aa1</i>	84,73	5	N, PM, C
25	O08807	Peroxiredoxin-4	<i>Prdx4</i>	31,03	5	ER
26	P13595	Neural cell adhesion molecule 1	<i>Ncam1</i>	119,35	4	PM
27	P62889	60S ribosomal protein L30	<i>Rpl30</i>	12,77	6	C, ER
28	Q9QUM9	Proteasome subunit alpha type-6	<i>Psm6</i>	27,35	6	C, N
29	P0DP26	Calmodulin-1	<i>Calm1</i>	16,82	4	C, N, Mch, PM
30	P11031	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 (TCP4_MOUSE)	<i>Sub1</i>	14,41	3	N
31	P52503	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	<i>Ndufs6</i>	13,01	1	Mch
32	P60710	Actin, cytoplasmic 1	<i>Actb</i>	41,70	2	C
33	P62301	40S ribosomal protein S13	<i>Rps13</i>	17,21	6	C, N
34	P55066	Neurocan core protein	<i>Ncan</i>	137,11	2	Secreted
35	P26350	Prothymosin alpha	<i>Ptma</i>	12,24	3	N
36	Q6IRU5	Clathrin light chain B	<i>Cltb</i>	25,15	2	PM
37	P62858	40S ribosomal protein S28	<i>Rps28</i>	7,83	6	C, ER
38	P62852	40S ribosomal protein S25	<i>Rps25</i>	13,73	6	C
39	O35988	Syndecan-4	<i>Sdc4</i>	21,46	3	Secreted
40	P10126	Elongation factor 1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>	50,08	3	N, C, PM
41	P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>Ppia</i>	17,95	6	C, Secreted

ВЛИЯНИЕ МФТП И ИЗАТИНА НА Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

Таблица 8. Rpn13-связывающие белки митохондриальной фракции мозга мышей, получавших инъекцию изатина и МФТП (продолжение)

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген	MW [kDa]	Группа	Субклеточная локализация
42	Q71M36	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	<i>Cspg5</i>	60,36	3	C, PM, G, ER
43	P62627	Dynein light chain roadblock-type 1	<i>Dynlrb1</i>	10,98	2	C
44	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	<i>Dpysl2</i>	62,23	2	C, Mch, PM
45	P43274	Histone H1.4 (H14_MOUSE)	<i>Hist1h1e</i>	21,96	3	N
46	Q9CYT6	Adenylyl cyclase-associated protein 2	<i>Cap2</i>	52,82	2	M, PM
47	B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	<i>Ptpnz1</i>	254,24	3	PM
48	P63168	Dynein light chain 1, cytoplasmic (DYL1_MOUSE)	<i>Dynl1l</i>	10,35	2	C
49	Q8R001	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	<i>Mapre2</i>	36,92	2	C
50	Q9D3D9	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	<i>Atp5d</i>	17,58	1	Mch
51	P56382	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial (ATP5E_MOUSE)	<i>Atp5e</i>	5,83	1	Mch
52	O35945	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	<i>Aldh1a7</i>	54,55	1	C
53	P18760	Cofilin-1	<i>Cfl1</i>	18,54	2	N, C
54	P68368	Tubulin alpha-4A chain	<i>Tuba4a</i>	49,89	2	C
55	P68372	Tubulin beta-4B chain	<i>Tubb4b</i>	49,79	2	C
56	Q8K310	Matrin-3	<i>Matr3</i>	94,57	3	N
57	Q61361	Brevican core protein	<i>Bcan</i>	95,75	2	Secreted
58	P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	<i>Prdx5</i>	21,88	5	Mch
59	P62908	40S ribosomal protein S3	<i>Rps3</i>	26,65	6	N, Mch
60	P80314	T-complex protein 1 subunit beta	<i>Cct2</i>	57,44	3	C
61	Q9CZX8	40S ribosomal protein S19	<i>Rps19</i>	16,07	6	N, C
62	P62900	60S ribosomal protein L31	<i>Rpl31</i>	14,45	6	N, C
63	P10639	Thioredoxin	<i>Txn</i>	11,66	5	C
64	P09405	Nucleolin	<i>Ncl</i>	76,67	3	N, C
65	P0CG50	Polyubiquitin-C	<i>Ubc</i>	82,49	4	N, C
66	P84099	60S ribosomal protein L19	<i>Rpl19</i>	23,45	6	C
67	P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	<i>Aldoc</i>	39,37	1	C, Mch
68	P15864	Histone H1.2 (H12_MOUSE)	<i>Hist1h1c</i>	21,25	3	N
69	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	<i>Aldoa</i>	39,33	1	C
70	Q61937	Nucleophosmin	<i>Npm1</i>	32,53	3	N
71	O70456	14-3-3 protein sigma	<i>Sfn</i>	27,68	4	C
72	Q04447	Creatine kinase B-type	<i>Ckb</i>	42,68	1	Mch, N, C
73	P08553	Neurofilament medium polypeptide	<i>Nefm</i>	95,85	2	C
74	Q7TQF7	Amphiphysin	<i>Amph</i>	74,96	2	C
75	P52480	Pyruvate kinase PKM	<i>Pkm</i>	57,80	1	C, Mch, N
76	Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	<i>Pacsin1</i>	50,54	4	PM, C
77	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>Hspa8</i>	70,82	5	C, L, E, N, PM
78	P67984	60S ribosomal protein L22 (RL22_MOUSE)	<i>Rpl22</i>	14,74	6	C
79	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	<i>Tubb4a</i>	49,55	2	C
80	P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Sod1</i>	15,93	5	N, C
81	P35700	Peroxiredoxin-1	<i>Prdx1</i>	22,16	5	C, Mch, N
82	P63158	High mobility group protein B1	<i>Hmgb1</i>	24,87	5	N, C, End, PM, Secreted
83	P17183	Gamma-enolase	<i>Eno2</i>	47,26	1	C, PM
84	P97352	Protein S100-A13	<i>S100a13</i>	11,15	2	Secreted

массы пептидов, образующихся при трипсинолизе убиквитинированных белков, за счёт дополнительных диглициновых остатков). Отметим, что ранее для регуляторной субъединицы протеасомы Rpn10 в экспериментах с использованием биосенсора мы показали количественное аффинное взаимодействие этой субъединицы с высокоочищенными как убиквитинированными, так и неубиквитинированными белками [18].

Биосенсорная валидация связывания с субъединицей протеасомы Rpn13 ряда высокоочищенных белков

Мы осуществили биосенсорную валидацию связывания с Rpn13 высокоочищенного препарата пируваткиназы, фермента, выявленного при протеомном профилировании во всех четырёх исследованных группах. Также в биосенсорных экспериментах использовали высокоочищенную ГАФД (этот фермент был выявлен при профилировании взаимодействующих с Rpn13 белков митохондриальной фракции мозга контрольной группы животных)

и гистоны H2A и H2B (большое количество гистонов было обнаружено в масс-спектрометрических экспериментах в группах животных, получавших инъекции изатина и инъекции изатина и МФТП). Как показывали наши предыдущие исследования, все эти белки взаимодействовали с субъединицей протеасомы Rpn10 [18].

В случае ГАФД и пируваткиназы на чипе биосенсора иммобилизовали субъединицу протеасомы Rpn13, а ферменты использовали в качестве аналитов. В случае обоих гистонов из-за их высокого неспецифического связывания с подложкой чипа каждый из исследованных гистонов иммобилизовали на кювете оптического биосенсора в качестве лиганда и использовали Rpn13 в качестве аналита. Было показано количественное взаимодействие субъединицы протеасом Rpn13 со всеми исследованными белками (рис. 2). Константы диссоциации составляли в случае ГАФД $1,35 \cdot 10^{-6}$ М, в случае пируваткиназы $4,64 \cdot 10^{-6}$ М, в случае гистонов H2A и H2B $3,31 \cdot 10^{-6}$ М и $7,48 \cdot 10^{-7}$ М соответственно.

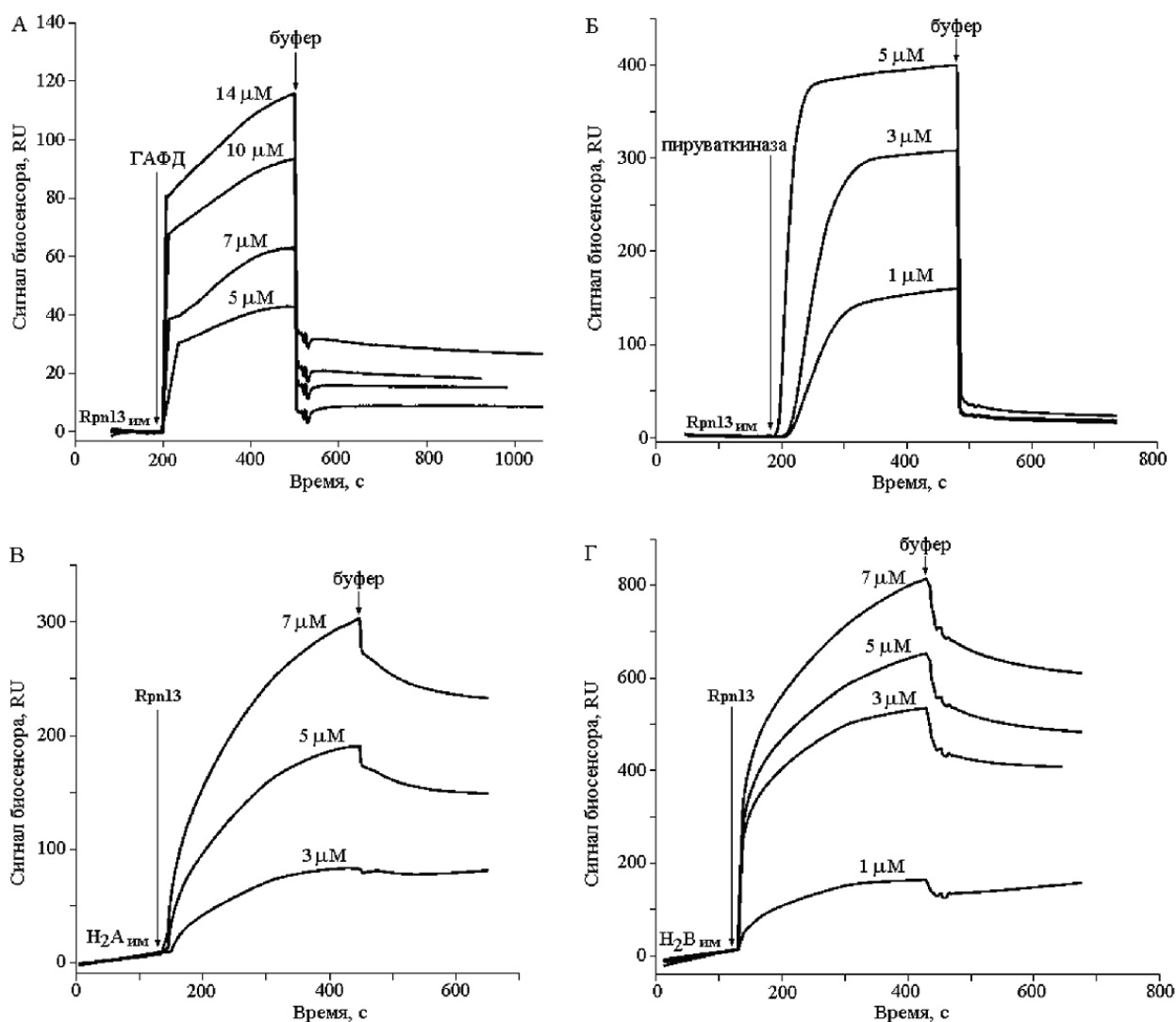


Рисунок 2. Типичные сенсограммы связывания ГАФД (А) и пируваткиназы (Б) с иммобилизованной Rpn13-субъединицей протеасомы, а также связывания Rpn13-субъединицы протеасомы с иммобилизованными гистонами H2A (В) и гистонами H2B (Г). Стрелки показывают инъекцию анализируемых белков, а цифры над кривыми связывания — их концентрацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального паркинсонизма, индуцированного МФТП, нейропротекторное действие изатина может быть направлено на взаимодействие митохондрий с компонентами UPS. При этом доза изатина, оказывающая терапевтический эффект в условиях экспериментального МФТП-индуцированного паркинсонизма, по-разному влияет на взаимодействие белков митохондриальной фракции мозга с рецепторными субъединицами протеасом Rpn10 и Rpn13. В первом случае число Rpn10-связывающих белков и профиль белков митохондрий мозга, взаимодействующих с субъединицей Rpn10, снижается [19], а во втором (число Rpn13-связывающих белков и профиль белков митохондрий мозга, взаимодействующих с субъединицей Rpn13) — увеличивается (табл. 5, 8).

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ белков и SPR анализ межмолекулярных взаимодействий выполнен с использованием оборудования и ресурсов ЦКП “Протеом человека” при Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (в части масс-спектрометрического анализа) и гранта РФФИ 19-015-00073а (исследование двигательной активности животных под влиянием нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина и выделение и пробоподготовка Rpn-связывающих белков митохондрий мозга, биосенсорный анализ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальное моделирование болезни Паркинсона и исследование изменений двигательной активности мышей под влиянием нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cookson M.R. (2005) Ann. Rev. Biochem., **74**, 9-52.
2. Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1822**(2), 261-285.
3. Uversky V.N. (2009) Front. Biosci. (Landmark Ed.), **14**, 5188-5238.
4. Mehra S., Sahay S., Maji S.K. (2019) Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom., **1867**(10), 890-908.
5. Moore D.J., West A.B., Dawson V.L., Dawson T.M. (2005) Annu. Rev. Neurosci., **28**, 57-87.
6. Branco D.M., Arduino D.M., Esteves A.R., Silva D.F.F., Cardoso S.M., Oliveira C.R. (2010) Front. Aging Neurosci., **2**, 1-10.
7. Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2011) Биомедицинская химия, **57**(3), 246-281. [Buneeva O.A., Medvedev A.E. (2011) Biomeditsinskaya Khimiya, **57**(3), 246-281].
8. Schwartz A.L., Ciechanover A. (2009) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **49**, 73-96.
9. Goldberg A.L. (2003) Nature, **426**, 895-899.
10. Finley D., Chen X., Walters K.J. (2016) Trends Biochem. Sci., **41**, 77-93.
11. Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 7059-7061.
12. Husnjak K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., Shi Y., Hofmann K., Walters K., Finley D., Dikic I. (2008) Nature, **453**(7194), 481-488.
13. Shi Y., Chen X., Elsasser S., Stocks B.B., Tian G., Lee B.-H., Shi Y., Zhang N., de Poot S.A.H., Tuebing F., Sun S., Vannoy J., Tarasov S.G., Engen J.R., Finley D., Walters K.J. (2016) Science, **351**, 6275, pii: aad9421. DOI: 10.1126/science.aad9421.
14. Hamazaki J., Sasaki K., Kawahara H., Hisanaga S., Tanaka K., Murata S. (2007) Mol. Cell. Biology, **27**(19), 6629-6638.
15. Hamazaki J., Hirayama S., Murata S. (2015) PloS Genet., **11**, e1005401. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005401.
16. Martinez-Fontes 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.
17. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Медведев А.Е. (2020) Биомедицинская химия, **66**(2), 138-144. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Medvedev A.E. (2020) Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(2), 138-144.]
18. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Копылов А.Т., Медведева М.В., Згода В.Г., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2017) Биохимия, **82**(9), 1042-1047. [Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Kopylov A.T., Medvedeva M.V., Zgoda V.G., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2017) Biochemistry (Moscow), **82**(9), 1042-1047.]
19. 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) 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) Biochemistry (Moscow) **82**(3), 470-480.]
20. Tillerson J.L., Miller G.W. (2003) J. Neurosci. Methods, **123**(2), 189-200.
21. Ogawa N., Hirose Y., Ohara S., Ono T., Watanabe Y. (1985) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **50**(3), 435-441.
22. Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Капица И.Г., Неробкова Л.Н. (2012) В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Гриф и К, Москва, сс. 219-234. [Voronina T.A., Val'dman E.A., Kapitsa I.G., Narobkova L.N. (2012) in: Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv, Grif and Co, Moscow, pp. 219-234].
23. Deacon R.M. (2013) J. Vis. Exp., **75**, e2609. DOI: 10.3791/2609.
24. Prut L., Belzung C. (2003) Eur. J. Pharmacol., **463**, 3-33.
25. Buneeva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A. (2018) Cells, **7**, 91. DOI: 10.3390/cells7080091.
26. Scopes R.K., Stoter A. (1982) Methods Enzymol., **90**(Pt. E), 479-490.

27. Walker J.M. (ed.) (2002) Humana Press Inc., Totowa, N.Y., 1176 p.
28. Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Nature Methods, **6**(5), 359-362.
29. Ayala A., Venero J.L., Cano J., Machado A. (2007) Front. Biosci., **12**, 986-1007.
30. Cannon J.R., Greenamyre J.T. (2010) Progr. Brain Res., **184**, 17-33.
31. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) Biochem. Pharmacol., **52**, 385-391.
32. Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Makani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S. (2010) PNAS, **107**, 19573-19578.

Поступила в редакцию: 12. 01. 2021.
После доработки: 29. 01. 2021.
Принята к печати: 01. 02. 2021.

CHANGES IN THE MITOCHONDRIAL SUBPROTEOME OF MOUSE BRAIN Rpn13-BINDING PROTEINS INDUCED BY THE NEUROTOXIN MPTP AND THE NEUROPROTECTOR ISATIN

O.A. Buneeva^{1}, A.T. Kopylov¹, O.V. Gnedenko¹, M.V. Medvedeva²,
I.G. Kapitsa³, E.A. Ivanova³, A.S. Ivanov¹, A.E. Medvedev¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com

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

³Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, 125315 Russia

Mitochondrial dysfunction and ubiquitin-proteasome system (UPS) failure contribute significantly to the development of Parkinson's disease (PD). The proteasome subunit Rpn13 located on the regulatory (19S) subparticle play an important role in the delivery of proteins, subjected to degradation, to the proteolytic (20S) part of proteasome. We have previously found several brain mitochondrial proteins specifically bound to Rpn13 (Buneeva et al. (2020) Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **14**, 297-305). In this study we have investigated the effect of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and the neuroprotector isatin on the mitochondrial subproteome of Rpn13-binding proteins of the mouse brain. Administration of MPTP (30 mg/kg) to animals caused movement disorders typical of PD, while pretreatment with isatin (100 mg/kg, 30 min before MPTP) reduced their severity. At the same time, the injection of MPTP, isatin, or their combination (isatin + MPTP) had a significant impact on the total number and the composition of Rpn13-binding proteins. The injection of MPTP decreased the total number of Rpn13-binding proteins in comparison with control, and the injection of isatin prior to MPTP or without MPTP caused an essential increase in the number of Rpn13-binding proteins, mainly of the functional group of proteins participating in the protein metabolism regulation, gene expression, and differentiation. Selected biosensor validation confirmed the interaction of Rpn13 subunit of proteasome with some proteins (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, histones H2A and H2B) revealed while proteomic profiling. The results obtained testify that under the conditions of experimental MPTP-induced parkinsonism the neuroprotective effect of isatin may be aimed at the interaction of mitochondria with the components of UPS.

Key words: MPTP-induced parkinsonism; neuroprotector; isatin; Rpn13-binding proteins; mitochondrial fraction of the brain; subproteome

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: 12.01.2021; revised 29.01.2021; accepted: 01.02.2021.