

©Коллектив авторов

## КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНОЙ 19S СУБЧАСТИЦЫ В ИЗМЕНЕНИИ СУБПРОТЕОМА ПРОТЕАСОМ МОЗГА, ИНДУЦИРОВАННОМ НЕЙРОПРОТЕКТОРОМ ИЗАТИНОМ

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

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

Изатин (индол-2,3-дион) — эндогенный регулятор, оказывающий разнообразные эффекты, которые опосредуются многочисленными изатинсвязывающими белками, локализованными в различных компартментах клеток мозга и периферических тканей. Он проявляет свойства нейропротектора, который в модели экспериментального паркинсонизма, индуцированного ведением нейротоксина МФТП, снижает двигательные нарушения, свойственные этому заболеванию. Молекулярные механизмы нейропротекторного действия изатина включают его прямое взаимодействие с протеасомами — внутриклеточными надмолекулярными комплексами, ответственными за таргетную элиминацию белков. При инкубации с изатином (100 мкМ) фракций 26S и 20S протеасом мозга кролика, содержащих весь спектр собственно протеасомных субъединиц, а также ряд ассоциированных с протеасомами белков, обнаружены существенные различия в количестве и составе высвободившихся белков. В случае 26S протеасом, содержащих, помимо коровой части (20S протеасома), 19S регуляторные субчастицы, инкубация с изатином приводила к более чем трёхкратному увеличению числа диссоциировавших белков. В случае 20S протеасом (содержащих только коровую часть) инкубация с изатином приводила к существенному снижению числа диссоциировавших белков по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли компонентов регуляторной 19S субчастицы в формировании субпротеома протеасом и чувствительности этих надмолекулярных комплексов к изатину.

**Ключевые слова:** 26S и 20S протеасомы; субпротеом; интерактом; изатин; нейропротектор; коровая часть протеасомы; регуляторная субчастица

**DOI:** 10.18097/PBMC20226804250

### ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индол-2,3-дион) — эндогенный непептидный нейропротектор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях животных и человека [1-3]. При введении экспериментальным животным он оказывает множественные эффекты в мозге, включающие изменение экспрессии изатин-чувствительных генов, профиля изатин-связывающих белков и их интерактонов [4-6]. В модели экспериментального паркинсонизма, индуцированного нейротоксином МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), изатин снижает двигательные нарушения, свойственные этому заболеванию, а также влияет на митохондриальный субпротеом белков мозга мыши, связывающихся с рецепторами убиквитина — субъединицами RPN10 и RPN13 регуляторной субчастицы протеасомы [7-9].

Протеасомы — мультисубъединичные комплексы, осуществляющие элиминацию неправильно свёрнутых, поврежденных или короткоживущих белков [10-12]. 26S протеасомы состоят из коровой (сердцевинной) части (20S субчастицы), субъединицы которой осуществляют непосредственный протеолиз белковых субстратов, и одной или двух 19S регуляторных субчастиц, акцептирующих убиквитинированные субстраты и направляющих их в коровую часть [13-15]. Среди субъединиц регуляторной субчастицы протеасомы особая роль принадлежит

рецепторам убиквитинированных субстратов — белкам Rpn1, Rpn10 и Rpn13 [16-18]. Элиминация белков в протеасомах может происходить и без участия регуляторных субчастиц. В этом случае неубиквитинированные субстраты поступают сразу в коровую часть протеасомы; необходимым условием для этого является наличие в белке-субстрате неструктурированных участков [19, 20].

Помимо собственно протеасомных субъединиц, фракции протеасом, выделенные из разных источников с использованием различных методов, содержат непротеасомные белки, участвующие в формировании протеасомного интерактома, которому отводят определенную роль в функционировании убиквитин-протеасомной системы (UPS) [21-26]. Удаление регуляторных 19S субчастиц в процессе фракционирования 26S и выделения изолированных 20S протеасом приводило к существенному повышению (практически в два раза) количества белков, ассоциированных с коровой частью протеасомы [26]. Этот эффект, по-видимому, тканеспецифичен, поскольку наблюдался в экспериментах по фракционированию протеасом мозга, но не печени кролика [26].

С учётом данных о регуляторном влиянии изатина на профили белков, связывающихся с рецепторными субъединицами 19S субчастицы, представляло интерес исследовать влияние изатина на субпротеомы фракций 26S и 20S протеасом мозга кролика.

## МЕТОДИКА

### Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие реактивы: изатин, дитиотреитол, коктейль ингибиторов протеаз, трис-(гидроксиметил)аминометан, мочевиная, гидрокарбонат аммония, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, бикарбонат триэтиламмония, Кумасси бриллиантовый синий G-250, глицерин (“Merck”, 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); 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). Остальные реагенты были отечественного производства высшей степени чистоты.

Выделение фракций 26S и 20S 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” НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ).

*Выделение фракций 26S и 20S протеасом мозга кролика* проводили по методу Шаровой и др. [27] с небольшими модификациями, описанными ранее [25]. Выделенные протеасомы хранили в 50% растворе глицерина в 10 mM Трис-буфере, pH 7,5, содержащем 0,5 mM ЭДТА, 0,5 mM дитиотреитол, 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и коктейль ингибиторов протеаз в концентрации, рекомендованной производителем, при -20°C не более трёх недель с момента получения.

*Инкубацию фракций протеасом с изатином* осуществляли в течение 30 мин в 10 mM Трис-буфере, pH 7,5, содержащем 0,5 mM ЭДТА и 0,5 mM дитиотреитол, при температуре 37°C, концентрации образцов протеасом 2 мг/мл и концентрации изатина 100 мкМ. По окончании инкубации пробы помещали в ледяную баню, затем проводили осаждение протеасомных фракций (10000 g, 30 мин, 4°C), используя для масс-спектрометрического анализа супернатант.

*Масс-спектрометрический анализ* проводили, как описано в [25]. Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован в трёх независимых экспериментах.

*Иерархический анализ и семантическая визуализация биологических процессов для белков, диссоциировавших от фракций 26S и 20S протеасом*

Белки в каждой группе сравнения были обогащены с помощью инструмента поиска биологических процессов и молекулярных функций Gene Ontology (выпуск базы данных GO от апреля 2021 г.)

против полногеномной базы человека с поправкой Бонферрони на множественный анализ при  $p < 0,001$  ( $p < 2,13 \times 10^{-5}$  с применением поправки). Анализ иерархической направленности молекулярных функций и устранение избыточных GO-терминов с коэффициентом подобия более 0,7, приписываемых обогащённому белку, был выполнен с использованием инструмента REVIGO [28] (обновление базы данных GO от 02 марта 2022 г.; обновление базы данных сопоставления UniProt-to-GO от 17 января 2022 г.) при  $p < 0,001$ . Визуализация семантического подобия была выполнена с помощью алгоритма Резника, который измеряет сходство между двумя терминами (функциями) как информационное содержание их (функций) наиболее общего предка [29].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованные в работе фракции 26S содержали полный набор регуляторных и каталитических субъединиц. Во фракции 20S протеасом компоненты регуляторной (19S) субчастицы не были обнаружены [25]. Как фракции 26S, так и фракции 20S протеасом содержали ряд ассоциированных с протеасомами белков. Эти белки, формирующие протеасомный субпротеом, принадлежали к следующим функциональным группам: белки/ферменты UPS, не являющиеся компонентами субчастиц протеасом; метаболические ферменты; белки, участвующие в образовании цитоскелета и транспорте; белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов; защитные белки/ферменты; белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки [25, 26].

Инкубация фракций 26S и 20S протеасом мозга кролика с изатином (100 мкМ) приводила к изменению субпротеома ассоциированных с протеасомами белков. Белки фракций протеасом мозга кролика, высвободившиеся после инкубации с изатином, по сравнению с контролем, представлены в таблицах 1 и 2. Мы наблюдали существенные отличия в количестве и составе высвободившихся белков в случае фракций 26S и 20S протеасом (табл. 3, рис. 1А,Б). Во фракции 26S протеасом, содержащих регуляторные (19S) субчастицы, после инкубации и изатином выявлено более чем трёхкратное увеличение количества диссоциировавших белков (37) по сравнению с фракцией 20S протеасом, не содержащих эти субчастицы (11) (табл. 3). При этом количество перешедших в раствор белков фракции 26S протеасом, инкубированных в присутствии изатина, почти вдвое превышало число белков этой фракции, перешедших в раствор в ходе инкубации в тех же условиях без изатина (контроль) — 37 против 19. Среди диссоциировавших в присутствии изатина белков значительную часть (20) составляли цитоскелетные и транспортные белки. Представлены также метаболические ферменты (5), регуляторные (6) и защитные белки (4) (рис. 1А).

В случае 20S протеасом, содержащих лишь коровую часть, напротив, инкубация с изатином вызывала существенное уменьшение количества

Таблица 1. Влияние 100 мкМ изатина на белки фракции 26S протеасом мозга кролика, высвободившиеся после инкубации со 100 мкМ изатином, по сравнению с контролем

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген по Uniprot	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (kDa)	Функциональная группа
контроль										
1	G1TR82	Tubulin alpha-4A chain	<i>TUBA4A</i>	45,09	13	2	36	Infinity	49,892	III
2	G1SL10	Tubulin alpha chain	<i>LOC100348075</i>	32,37	10	0	32	Infinity	50,149	III
3	G1U5S4	Tubulin beta-3 chain	<i>TUBB3</i>	30,56	9	1	24	Infinity	48,494	III
4	G1SY02	Tubulin beta-2A chain	<i>TUBB2A</i>	45,84	13	3	30	Infinity	49,874	III
5	G1SH05	Tubulin beta chain	<i>TUBB</i>	40,54	11	1	26	Infinity	49,694	III
6	G1U410	Tubulin beta-4A chain	<i>TUBB4A</i>	33,78	9	1	22	Infinity	49,553	III
7	P29751	Actin, cytoplasmic 1	<i>ACTB</i>	10,67	3	0	5	Infinity	41,728	III
8	P68135	Actin, alpha skeletal muscle	<i>ACTA1</i>	8,49	2	0	4	Infinity	42,023	III
9	P63169	Dynein light chain 1, cytoplasmic	<i>DYNLL1</i>	30,34	1	1	1	Infinity	10,359	III
10	G1TMP7	Syntaxin binding protein 1	<i>STXBPI</i>	1,52	1	1	2	Infinity	67,486	III
11	G1SN11	Spectrin beta chain	<i>SPTBN1</i>	0,98	1	1	1	Infinity	271,101	III
12	G1SNC0	Microtubule-associated protein	<i>MAP2</i>	0,76	1	1	1	Infinity	198,963	III
13	G1T854	RAB9B, member RAS oncogene family	<i>RAB9B</i>	13,93	2	2	2	Infinity	22,674	III
14	G1TIQ3	Zinc finger homeobox 2	<i>ZFHX2</i>	0,89	1	1	1	Infinity	272,424	VI
15	G1TVG9	DUF4629 domain-containing protein	<i>LOC100351390</i>	2,69	1	1	1	Infinity	95,418	IV
16	G1SUH4	MTSS1, I-BAR domain containing	<i>MTSS1</i>	3,75	1	1	1	Infinity	86,092	III
17	U3KPD2	FUN14 domain containing 1	<i>FUNDC1</i>	17,42	1	1	1	Infinity	17,175	IV
18	G1SQS0	Programmed cell death 11	<i>PDCD11</i>	0,85	1	1	1	Infinity	209,040	VI
19	G1U974	Dihydropyrimidinase like 2	<i>DPYSL2</i>	7,87	3	3	3	Infinity	62,266	V

Таблица 1. Влияние 100 мкМ изатина на белки фракции 26S протеасом мозга кролика, высвободившиеся после инкубации со 100 мкМ изатином, по сравнению с контролем

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген по Uniprot	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (kDa)	Функциональная группа
<b>изатин</b>										
1	G1SZ31	DDB1 and CUL4 associated factor 1 – (protein ubiquitination)	<i>DCAF1</i>	1,14	1	1	1	Infinity	176,907	I
2	G1TR82	Tubulin alpha-4A chain	<i>TUBA4A</i>	69,64	30	4	122	Infinity	49,892	III
3	G1SL10	Tubulin alpha chain	<i>LOC100348075</i>	64,97	29	0	127	Infinity	50,149	III
4	G1SH05	Tubulin beta chain	<i>TUBB</i>	68,02	25	4	99	Infinity	49,694	III
5	G1SY02	Tubulin beta-2A chain	<i>TUBB2A</i>	62,25	25	6	114	Infinity	49,874	III
6	G1U410	Tubulin beta-4A chain	<i>TUBB4A</i>	72,75	26	7	94	Infinity	49,553	III
7	G1U5S4	Tubulin beta-3 chain	<i>TUBB3</i>	42,36	17	4	77	Infinity	48,494	III
8	P29751	Actin, cytoplasmic 1	<i>ACTB</i>	60,53	18	2	43	Infinity	41,728	III
9	P68135	Actin, alpha skeletal muscle	<i>ACTA1</i>	18,57	7	1	19	Infinity	42,023	III
10	G1T4C2	Dynamain 1	<i>DNMI</i>	6,61	3	2	4	Infinity	51,765	III
11	G1SQ38	Dynamain 3	<i>DNM3</i>	2,91	2	1	2	Infinity	96,492	III
12	P63169	Dynein light chain 1, cytoplasmic	<i>DYNLL1</i>	30,34	1	1	1	Infinity	10,359	III
13	G1SCI0	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	<i>DYNCH1</i>	0,70	1	1	1	Infinity	378,292	III
14	G1TEG5	Tenascin R	<i>TNR</i>	1,40	1	1	1	Infinity	148,899	IV
15	G1TMP7	Syntaxin binding protein 1	<i>STXBPI</i>	1,52	1	1	1	Infinity	67,486	III
16	G1TKR2	Synapsin I	<i>SYN1</i>	9,67	5	4	10	Infinity	73,234	III
17	G1TAJ8	Synapsin II	<i>SYN2</i>	4,90	2	1	4	Infinity	49,522	III
18	G1SL57	Septin 7	<i>SEPT7</i>	2,60	1	1	1	Infinity	44,814	III
19	G1U092	Microtubule associated protein 10	<i>MAP10</i>	1,45	1	1	1	Infinity	98,171	III

Таблица 1. Влияние 100 мкМ изатина на белки фракции 26S протеасом мозга кролика, высвободившиеся после инкубации со 100 мкМ изатином, по сравнению с контролем

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген по Uniprot	Покрывание	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (kDa)	Функциональная группа
20	G1SF26	Clathrin heavy chain	<i>CLTCL1</i>	1,56	1	1	1	Infinity	188,971	III
21	G1SRX8	Glial fibrillary acidic protein	<i>GFAP</i>	4,98	3	3	4	Infinity	48,493	III
22	G1SFQ8	Solute carrier family 16 member 6	<i>SLC16A6</i>	3,02	1	1	1	Infinity	57,401	III
23	G1SEX5	SH3 domain containing GRB2 like 2, endophilin A1	<i>SH3GL2</i>	4,55	1	1	1	Infinity	39,901	IV
24	P00567	Creatine kinase B-type	<i>CKB</i>	4,20	1	1	1	Infinity	42,636	II
25	P46406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	8,41	1	1	1	Infinity	35,757	II
26	G1TX10	Peptidylprolyl isomerase	<i>FKBP11</i>	2,79	1	1	1	Infinity	40,174	II
27	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>PPIA</i>	10,98	1	1	1	Infinity	17,825	II
28	G1SW00	Glutamate-ammonia ligase	<i>GLUL</i>	13,51	3	3	5	Infinity	37,454	II
29	G1TMS4	HR, lysine demethylase and nuclear receptor corepressor	<i>HR</i>	5,22	1	1	1	Infinity	128,542	IV
30	G1TZP0	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	<i>YWHAH</i>	11,74	2	2	2	Infinity	28,240	IV
31	G1SDY5	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	<i>YWHAZ</i>	16,67	4	4	4	Infinity	27,826	IV
32	G1SK22	Ribosomal protein S27a	<i>RPS27A</i>	16,03	2	2	3	Infinity	17,953	VI
33	G1U974	Dihydropyrimidinase like 2	<i>DPYSL2</i>	43,36	15	15	32	Infinity	62,266	V
34	G1T883	Dihydropyrimidinase like 5	<i>DPYSL5</i>	3,88	1	1	1	Infinity	77,540	V
35	G1T469	Nucleotide binding oligomerization domain containing 2	<i>NOD2</i>	2,65	1	1	1	Infinity	112,936	IV
36	G1T9M9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 8	<i>HSPA8</i>	6,79	4	4	7	Infinity	71,038	V
37	G1THZ6	Immunoglobulin heavy constant mu	<i>N/A</i>	5,00	2	2	2	Infinity	51,937	V

Примечание: Здесь и в таблице 2 идентификаторы белков, названия белков и названия кодирующих их генов даны, как указано в базе данных Uniprot.

Таблица 2. Белки фракции 20S протеасомы мозга кролика, высвободившиеся после инкубации со 100 мкМ изаитином, по сравнению с контролем

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген по Uniprot	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (kDa)	Функциональная группа
<b>контроль</b>										
1	G1TR82	Tubulin alpha-4A chain	<i>TUBA4A</i>	27,90	7	1	13	Infinity	49,892	III
2	G1SL10	Tubulin alpha chain	<i>LOC100348075</i>	18,18	5	3	12	Infinity	50,149	III
3	G1U5S4	Tubulin beta-3 chain	<i>TUBB3</i>	20,14	5	1	11	Infinity	48,494	III
4	G1SY02	Tubulin beta-2A chain	<i>TUBB2A</i>	19,55	5	1	12	Infinity	49,874	III
5	G1U410	Tubulin beta-4A chain	<i>TUBB4A</i>	12,16	4	2	6	Infinity	49,553	III
6	G1SIX4	Tubulin polymerization promoting protein	<i>TPPP</i>	14,04	1	1	1	Infinity	12,591	III
7	G1TF67	Coronin	<i>CORO1A</i>	6,50	1	1	1	Infinity	49,360	III
8	P63169	Dynein light chain 1, cytoplasmic	<i>DYNLL1</i>	30,34	1	1	1	Infinity	10,359	III
9	G1TMP7	Syntaxin binding protein 1	<i>STXBPI</i>	1,52	1	1	1	Infinity	67,486	III
10	G1SF26	Clathrin heavy chain	<i>CLTCL1</i>	1,56	1	1	1	Infinity	188,971	III
11	G1T854	RAB9B, member RAS oncogene family	<i>RAB9B</i>	13,93	1	1	1	Infinity	22,674	III
12	B7NZQ6	Rab GDP dissociation inhibitor	<i>GDI1</i>	27,52	7	7	9	Infinity	50,504	IV
13	P30946	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>HSP90A41</i>	9,22	5	1	7	Infinity	79,683	V
14	P30947	Heat shock protein HSP 90-beta	<i>HSP90AB1</i>	5,79	3	1	4	Infinity	83,415	V
15	G1T9M9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 8	<i>HSP48</i>	3,40	2	2	2	Infinity	71,038	V
16	G1SQ02	Peroxiredoxin 1	<i>PRDX1</i>	5,53	1	1	1	Infinity	22,138	V
17	G1T8Z0	Peroxiredoxin 6	<i>PRDX6</i>	3,96	1	1	1	Infinity	25,233	V
18	P46409	Glutathione S-transferase mu 1	<i>N/A</i>	16,06	2	1	2	Infinity	25,401	V
19	G1U9R0	Glutathione S-transferase pi 1	<i>GSTP1</i>	33,81	4	4	7	Infinity	23,477	V
20	G1T0R9	Glutathione S-transferase	<i>LOC100357917</i>	5,96	1	1	1	Infinity	25,481	V
21	G1IST9	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein beta	<i>YWHA B</i>	15,04	3	1	5	Infinity	28,064	IV

Таблица 2. Белки фракции 20S протеасомы мозга кролика, высвободившиеся после инкубации со 100 мкМ изаатином, по сравнению с контролем

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген по Uniprot	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (kDa)	Функциональная группа
22	G1TZP0	Tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein gamma	<i>YWHA G</i>	20,65	5	3	7	Infinity	28,240	IV
23	G1T7R2	Tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein epsilon	<i>YWHA E</i>	19,22	5	3	9	Infinity	29,169	IV
24	B7NZM8	Tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein eta	<i>YWHA H</i>	13,41	3	1	5	Infinity	28,180	IV
25	G1SDY5	Tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein zeta	<i>YWHA Z</i>	37,80	9	6	24	Infinity	27,826	IV
26	G1SY74	Germinal center associated signaling and motility	<i>GCSA M</i>	7,87	1	1	1	Infinity	20,586	IV
27	Q6Q6X0	14-3-3 protein theta	<i>YWHA Q</i>	15,10	3	1	5	Infinity	27,760	IV
28	P80912	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	<i>HINT 1</i>	21,43	1	1	2	Infinity	13,684	IV
29	G1T1Q5	A-kinase anchoring protein 13	<i>AKA P13</i>	0,84	1	1	2	Infinity	293,766	IV
30	P62160	Calmodulin	<i>CAL M</i>	20,13	2	2	3	Infinity	16,826	IV
31	G1SYJ4	Enolase 1	<i>ENO 1</i>	16,13	4	3	9	Infinity	47,243	II
32	G1SK04	Enolase 2	<i>ENO 2</i>	24,88	5	4	13	Infinity	47,193	II
33	G1SPF5	Phosphoglycerate mutase 1	<i>PGA M1</i>	29,81	3	3	4	Infinity	23,634	II
34	G1T652	Fructose-bisphosphate aldolase C	<i>ALDO C</i>	32,69	9	5	17	Infinity	39,336	II
35	P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A	<i>ALDO A</i>	30,77	9	5	17	Infinity	39,318	II
36	G1T332	Aspartate aminotransferase	<i>GOT 1</i>	5,08	1	1	2	Infinity	46,429	II
37	P11974	Pyruvate kinase PKM	<i>PKM</i>	32,96	13	13	27	Infinity	58,010	II
38	G1SVY8	Creatine kinase B-type	<i>CKB</i>	43,31	11	11	23	Infinity	42,712	II
39	P46406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	10,81	3	3	5	Infinity	35,757	II
40	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>PPIA</i>	27,44	6	6	10	Infinity	17,825	II
41	G1TXI0	Peptidylprolyl isomerase	<i>FKBP 11</i>	2,79	1	1	1	Infinity	40,174	II

Таблица 2. Белки фракции 20S протеасомы мозга кролика, высвободившиеся после инкубации со 100 мкМ изаитином, по сравнению с контролем

№	№ в базе Uniprot	Название белка по Uniprot	Ген по Uniprot	Покрытие	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Совпадения последовательностей (PSMs)	Скоринговый балл	MW (kDa)	Функциональная группа
42	Q9N1E2	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>GPI</i>	4,84	1	1	1	Infinity	62,706	II
43	G1TYA7	L-lactate dehydrogenase	<i>LDHB</i>	10,57	4	4	9	Infinity	36,611	II
44	G1SQG5	Malate dehydrogenase	<i>MDHI</i>	3,59	1	1	2	Infinity	36,472	II
45	P00939	Triosephosphate isomerase	<i>TPII</i>	11,69	1	1	1	Infinity	26,608	II
46	Q8MI17	Aldehyde dehydrogenase 1A1	<i>ALDH1A1</i>	5,24	1	1	1	Infinity	54,305	II
47	P59667	Glucocorticoid receptor	<i>NR3C1</i>	1,81	1	1	1	Infinity	84,808	IV
48	G1SK22	Ribosomal protein S27a	<i>RPS27A</i>	10,26	1	1	2	Infinity	17,953	VI
49	G1U974	Dihydropyrimidinase like 2	<i>DPYSL2</i>	22,03	6	6	9	Infinity	62,266	V
50	G1SCK0	Pre-mRNA processing factor 8	<i>PRPF8</i>	0,94	1	1	1	Infinity	273,426	VI
51	G1TGQ0	EF-hand calcium binding domain 5	<i>EFCAB5</i>	1,19	1	1	1	Infinity	173,355	IV
<b>ИЗАТИН</b>										
1	P29751	Actin, cytoplasmic 1	<i>ACTB</i>	7,73	1	1	1	Infinity	41,728	III
2	G1SL10	Tubulin alpha chain	<i>LOC100348075</i>	5,32	2	2	3	Infinity	50,149	III
3	G1TGQ0	EF-hand calcium binding domain 5	<i>EFCAB5</i>	1,19	1	1	1	Infinity	173,355	IV
4	G1T854	RAB9B, member RAS oncogene family	<i>RAB9B</i>	13,93	2	2	2	Infinity	22,674	III
5	G1TZP0	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	<i>YWHAG</i>	11,74	1	1	1	Infinity	28,240	IV
6	G1SDY5	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	<i>YWHAZ</i>	16,67	2	2	3	Infinity	27,826	IV
7	P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A	<i>ALDOA</i>	7,69	1	1	1	Infinity	39,318	II
8	G1SK04	Enolase 2	<i>ENO2</i>	10,14	2	2	3	Infinity	47,193	II
9	P11974	Pyruvate kinase PKM	<i>PKM</i>	4,33	1	1	1	Infinity	58,010	II
10	P00567	Creatine kinase B-type	<i>CKB</i>	20,21	5	5	8	Infinity	42,636	II
11	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>PPIA</i>	10,98	1	1	1	Infinity	17,825	II



## 19S ПРОТЕАСОМА В РЕГУЛЯЦИИ СУБПРОТЕОМА ИЗАТИНОМ

Таблица 3. Количество белков различных функциональных групп фракций 26S и 20S протеасом мозга кролика, высвободившихся после инкубации со 100 мкМ изатином, по сравнению с контролем

Функциональные группы	26S		20S	
	Контроль	Изатин	Контроль	Изатин
I	0	1↑	0	0
II	0	5↑	16	4↓
III	13	20↑	10	5↓
IV	4	6↑	15	2↓
V	0	4↑	8	0↓
VI	2	1↓	2	0↓
Всего	19	37↑	51	11↓

Примечание. 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 (↓) и увеличение (↑) количества диссоциировавших белков во фракциях 26S и 20S протеасом мозга кролика, инкубированных в присутствии 100 мкМ изатина, по сравнению с контролем.

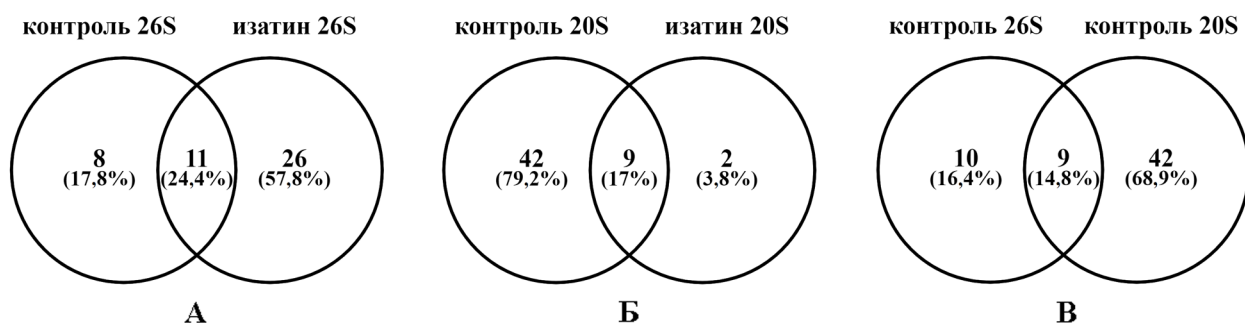


Рисунок 1. Влияние изатина на протеом диссоциировавших от протеасом мозга кролика белков после инкубации в течение 30 мин при температуре 37°C (диаграмма Венна): А – инкубация фракции 26S протеасом в присутствии или в отсутствие 100 мкМ изатина; Б – инкубация фракции 20S протеасом в присутствии или в отсутствие 100 мкМ изатина; В – фракции 26S и 20S протеасом, инкубация без изатина.

диссоциировавших белков по сравнению с контролем — 11 против 51. Белки, диссоциировавшие в этом случае, относятся в основном к группе метаболических ферментов (4) и компонентов цитоскелета (5) (табл. 3, рис. 1Б).

Следует отметить, что при инкубации фракций протеасом в описанных условиях в отсутствие изатина (контроль) количество и состав диссоциировавших белков также существенно отличались (табл. 3, рис. 1В). В случае фракции 26S протеасом диссоциировало всего 19 белков (в основном, это белки, участвующие в образовании цитоскелета и транспорте), тогда как в случае 20S протеасом — 51 белок (преимущественно метаболические ферменты, регуляторные и цитоскелетные белки). Вероятно, это связано со стабилизирующим влиянием регуляторной субчастицы на протеасомный протеом.

Проведенная реконструкция молекулярных функций белков, диссоциировавших от фракций 26S и 20S протеасом, инкубированных с или без изатина, выявила существенные различия. При инкубации изатина с фракцией 26S протеасом обнаружено существенно большее разнообразие молекулярных функций белков, диссоциировавших от этих структур

по сравнению с контролем, которым служила фракция 26S протеасом, инкубированных без изатина (рис. 2, 3). В отличие от 26S протеасом, для белков, диссоциировавших от 20S протеасом, влияние изатина фактически не определялось как в контексте иллюстрации иерархического дерева процессов, так и в контексте семантического анализа (рис. 4).

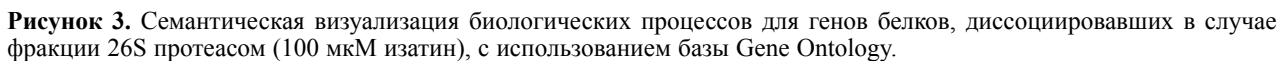
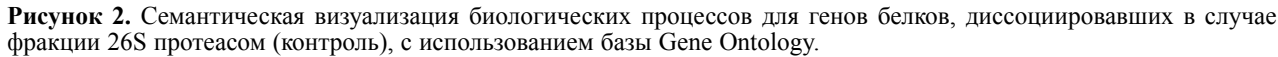
Эти данные свидетельствуют об определяющей роли регуляторных 19S субчастиц протеасом, определяющих стабильность субпротеома и интерактома протеасом и его чувствительность к нейропротектору изатину.

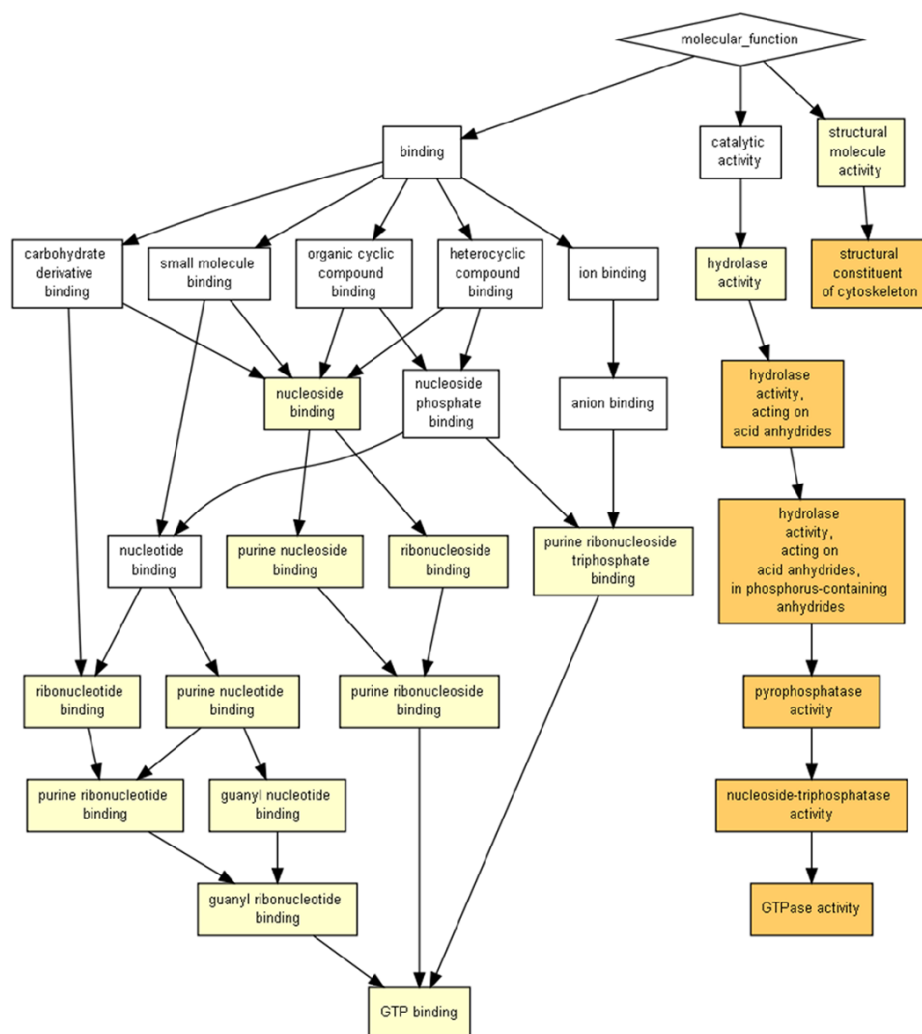
### БЛАГОДАРНОСТИ

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.) (no. 122030100170-5).





**Рисунок 4.** Семантическая визуализация биологических процессов для генов белков, диссоциировавших в случае фракции 20S протеасом (контроль и 100 мкМ изатин), с использованием базы Gene Ontology.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) Isatin – a link between natriuretic peptides and monoamines? *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391. DOI: 10.1016/0006-2952(96)00206-7
2. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) Isatin: Role in stress and anxiety. *Stress*, **8**, 175-183. DOI: 10.1080/10253890500342321.
3. Medvedev A., Buneva O., Glover V. (2007) Biological targets for isatin and its analogues: implications for therapy. *Biologics*, **1**, 151-162
4. Medvedev A., Buneva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A. (2018) Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications. *Biofactors*, **44**(2), 95-108. DOI: 10.1002/biof.1408
5. Medvedev A., Kopylov A., Buneva O., Kurbatov L., Tikhonova O., Ivanov A., Zgoda V.A. (2020) Neuroprotective dose of isatin causes multilevel changes involving the brain proteome: Prospects for further research. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(11), 4187. DOI: 10.3390/ijms21114187
6. Medvedev A., Buneva O. (2022) Tryptophan metabolites as mediators of microbiota-gut-brain communication: Focus on isatin. A mini review. *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 922274. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.922274
7. Buneva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A. (2018) The effect of neurotoxin MPTP and neuroprotector isatin on the profile of ubiquitinated brain mitochondrial proteins. *Cells*, **7**(8), 91. DOI: 10.3390/cells7080091
8. Медведев А.Е., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Медведева М.В., Неробкова Л.Н., Капца 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
9. 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
10. 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
11. Goldberg A.L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **426**, 895-899. DOI: 10.1038/nature02263
12. 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
13. Tanaka K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **85**, 12-36. DOI: 10.2183/pjab.85.12
14. 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
15. 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
16. 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., Su S., Vannoy J., Tarasov S.G., Engen J.R., Finley D., Walters K.J. (2016) Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science*, **351**(6275), aad9421. DOI: 10.1126/science.aad9421
17. Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M. (1994) A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059-7061.
18. Husnjak K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., Shi Y., Hofmann K., Walters K., Finley D., Dikic I. (2008) Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*, **453**(7194), 481-488. DOI: 10.1038/nature06926
19. Sánchez-Lanzas R., Castaño J.G. (2014) Proteins directly interacting with mammalian 20S proteasomal subunits and ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biomolecules*, **4**(4), 1140-1154. DOI: 10.3390/biom4041140
20. Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2018) Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах. *Биомедицинская химия*, **64**(2), 134-148. [Buneeva O.A., Medvedev A.E. (2018) Ubiquitin-independent protein degradation in proteasomes. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **64**(2), 134-148.] DOI: 10.18097/PBMC20186402134
21. 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
22. 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
23. 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/s10681620140600041
24. 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.]
25. Бунеева О., Копылов А., Калوشина 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
26. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Гнеденко О.В., Калوشина С.А., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2022) Сравнительный анализ белков, ассоциированных с 26S и 20S протеасомами мозга и печени кролика. *Биомедицинская химия*, **68**(1), 18-31. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Gnedenko O.V., Kaloshina S.A., Medvedeva M.V., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2022) Comparative analysis of proteins associated with 26S and 20S proteasomes isolated from rabbit brain and liver. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(1), 18-31.] DOI: 10.18097/PBMC20226801018
27. Шарова Н.П., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Люпина Ю.В., Дмитриева (Абатурова) С.Б., Карпова Я.Д. (2011) Способ разделения пулов 26S- и 20S-протеасом из цитоплазматической фракции клеток. Патент на изобретение № 2427623 от 27.08. 2011 г. РФ. <https://findpatent.ru/patent/242/2427623.html>.
28. Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, **6**, e21800. DOI: 10.1371/journal.pone.0021800
29. Pesquita C., Faria D., Falcão A.O., Lord P., Couto F.M. (2009) Semantic similarity in biomedical ontologies. *PLoS Comput. Biol.*, **5**, e1000443. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000443

Поступила в редакцию: 13. 07. 2022.  
После доработки: 20. 07. 2022.  
Принята к печати: 27. 07. 2022.

THE KEY ROLE OF THE REGULATORY 19S SUBUNIT IN CHANGES  
IN THE BRAIN PROTEASOME SUBPROTEOME INDUCED BY THE NEUROPROTECTOR ISATIN

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

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

Isatin (indole-2,3-dione) is an endogenous regulator exhibiting various effects mediated by numerous isatin-binding proteins localized in different compartments of cells of the brain and peripheral tissues. It attenuates manifestations of experimental parkinsonism induced by administration of the MPTP neurotoxin and reduces the movement disorders characteristic of this disease. The molecular mechanisms of the neuroprotective action of isatin include its direct interaction with proteasomes, intracellular supramolecular complexes responsible for the targeted elimination of proteins. Incubation of fractions of 26S and 20S rabbit brain proteasomes, containing the whole spectrum of proteasomal subunits, as well as a number of proteasome-associated proteins, with isatin (100  $\mu$ M) had a significant impact on the profile of released proteins. In the case of 26S proteasomes containing, in addition to the core part (20S proteasome), 19S regulatory subparticles, incubation with isatin resulted in a more than threefold increase in the number of dissociated proteins. In the case of 20S proteasomes (containing only the 20S core particle), incubation with isatin resulted in a significant decrease in the number of dissociated proteins compared to the control. Our results indicate an important role of the regulatory 19S subunit components in the formation of the proteasome subproteome and the sensitivity of these supramolecular complexes to isatin.

**Key words:** 26S and 20S proteasomes; subproteome; interactome; isatin; neuroprotector; proteasome core; regulatory subunit

**Funding.** The work performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (no. 122030100170-5).

Received: 13.07.2022; revised: 20.07.2022; accepted: 27.07.2022.