

ПРОТЕАСОМНЫЙ ИНТЕРАКТОМ И ЕГО РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ПЛАСТИЧНОСТИ МОЗГА

Обзор

© 2023 О.А. Бунеева, А.Т. Копылов, А.Е. Медведев*

НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: professor57@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 29.11.2022

Протеасомы – высококонсервативные мультиферментные комплексы, ответственные за расщепление короткоживущих, регуляторных, неправильно свернутых и поврежденных белков. Они играют важную роль в процессах пластичности мозга, и снижение их функциональной активности сопровождается развитием нейродегенеративной патологии. Исследования, выполненные в разных лабораториях как на культивируемых клетках млекопитающих и человека, так и на препаратах коры мозга крысы и мозга кролика, выявили большое количество белков, ассоциированных с протеасомами. Поскольку идентифицированные белки принадлежат к определенным метаболическим путям, многократное обогащение фракции протеасом этими белками свидетельствует о важной роли последних для функционирования протеасом. Если экстраполировать на мозг человека данные, полученные на различных биологических объектах, можно предположить, что ассоциированные с протеасомами белки составляют не менее 28% протеома мозга человека. Протеасомный интерактом мозга содержит большое количество белков, принимающих участие в сборке этих надмолекулярных комплексов, регуляции функционирования и внутриклеточной локализации, которая может меняться при изменении условий (например, при окислительном стрессе) или в различные фазы клеточного цикла. В контексте молекулярных функций Gene Ontology (GO) Pathways белки протеасомного интерактома обеспечивают взаимодействие компонентов более 30 метаболических путей, аннотированных в терминах GO. Главным итогом этих взаимодействий, по-видимому, является связывание адениновых и гуаниновых нуклеотидов, которые, очевидно, обеспечивают реализацию нуклеотид-зависимых функций 26S- и 20S-протеасом. Поскольку развитие нейродегенеративной патологии чаще всего связано с региоселективным снижением функциональной активности протеасом, положительный терапевтический эффект, очевидно, будут оказывать факторы, способствующие повышению активности протеасом. В любом случае фармакологическая регуляция протеасом мозга, по-видимому, реализуется через изменение состава и/или активности белков, ассоциированных с ними (деубиквитиназы, РКА, СаМКIIα и др.).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеасомы, мозг, 20S-субчастица, 19S-субчастица, субклеточная локализация и функции, ассоциированные с протеасомами белки, протеасомный протеом и интерактом.

DOI: 10.31857/S032097252303003X, **EDN:** QFWFPM

ВВЕДЕНИЕ

Протеасомы – высококонсервативные мультиферментные комплексы, присутствующие во всех прокариотических и эукариотических клетках и осуществляющие расщепление короткоживущих, регуляторных, неправильно свернутых и поврежденных белков [1–3].

Протеолитическая коровая (сердцевинная) и регуляторная субчастицы протеасом, а также протеасома, содержащая обе субчастицы, получили названия 20S-, 19S- и 26S-протеасом в соответствии с их коэффициентами седиментации. Протеасомы играют важную роль в процессах пластичности мозга, и снижение

Принятые сокращения: УПС – убиквитин-протеасомная система; Ecm29 – регулятор окислительного стресса; PA28 – 11S-субчастица; РКА – сАМР-зависимая протеинкиназа; Rpn – субъединицы, не обладающие АТРазной активностью; Rpt – субъединицы, обладающие АТРазной активностью.

* Адресат для корреспонденции.

их функциональной активности сопровождается развитием нейродегенеративной патологии [2, 3].

В большинстве случаев подлежащие протеасомной деградации белки сначала подвергаются убиквитинированию – АТР-зависимому присоединению остатков убиквитина, белка с молекулярной массой около 8,5 кДа. Меченные таким образом полиубиквитинированные белки узнаются рецепторами 19S-субчастицы протеасомы. В ней под действием деубиквитиназ происходит отщепление убиквитиновой метки, а подлежащие протеолитической деградации белки поступают в 20S-протеасому [4, 5]. Помимо такого пути доставки белков для деградации в протеасомах, известного как АТР- и убиквитин-зависимый [6], белки могут подвергаться деградации в протеасомах АТР- и убиквитин-независимым путем [7–11]. В последнем случае одной из основных структурных предпосылок такой деградации белков является наличие неструктурированных областей, которые и обеспечивают взаимодействие с 20S-протеасомой [12].

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ПРОТЕАСОМ

20S-протеасома (20S-субчастица). 20S-протеасома представляет собой цилиндр, состоящий из четырех гептамерных колец, каждое из которых образовано семью α - или семью β -субъединицами, кодируемыми четырнадцатью различными генами. Два внешних кольца цилиндра, состоящие из субъединиц α -типа, во-первых, выполняют функцию «ворот», через которые белки-субстраты попадают во внутреннюю каталитическую область, и, во-вторых, отвечают за ассоциацию 20S-протеасомы с регуляторными субчастицами [13]. Два внутренних кольца образованы β -субъединицами, из которых субъединицы β_1 , β_2 , β_5 обладают соответственно каспазоподобной, трипсिनоподобной и химотрипсिनоподобной активностями [14, 15] (рис. 1).

19S-протеасома (19S-субчастица) и другие регуляторы протеасом. 19S-субчастица. Регуляторная 19S-субчастица, известная также как активатор протеасомы 700 (PA700; Proteasome activator 700), состоит из двух субкомплексов: «крышки» (lid) и «основания» (base) и включает в себя до 20 различных субъединиц, обладающих или не обладающих АТРазной активностью (рис. 1). Субъединицы, обладающие АТРазной активностью, обозначаются как Rpt-субъединицы (Rpt – regulatory particle triphosphatase), а субъединицы, не обладаю-

щие АТРазной активностью, – Rpn (Rpn – regulatory particle non-triphosphatase). Помимо 19S-субчастиц (PA700), которые могут присоединяться к коровой части протеасомы с одной стороны или с двух сторон сразу, есть и другие регуляторы протеасомы. PA28 (или 11S-субчастица) существует в двух основных формах: PA28 $\alpha\beta$ и PA28 γ (или REG γ). PA28 $\alpha\beta$ экспрессируется в цитоплазме, состоит из двух субъединиц α и β массой по 28 кДа, индуцируется γ -интерфероном и усиливает способность 20S-протеасомы расщеплять короткие пептиды и окисленные субстраты [15, 16]. Активатор протеасомы PA28 γ экспрессируется в ядре; присоединяясь к коровой части протеасомы, действует, подобно молекулярному сити, отбирая белки для деградации непосредственно в коровой части протеасомы по АТР- и убиквитин-независимому пути. PA28 γ принимает участие в регуляции таких важных клеточных процессов, как клеточный рост и пролиферация, апоптоз, репарация ДНК, иммунный ответ, метаболизм, таким образом, поддерживая гомеостаз клетки [17].

19S-регуляторная субчастица ответственна за распознавание полиубиквитинированных субстратов, их разворачивание, деубиквитинирование и направление во внутреннее пространство коровой части, где они расщепляются до олигопептидов. Активный транспорт субстратов в каталитическую область осуществляется с использованием энергии гидролиза АТР. Шесть субъединиц «основания» 19S-регуляторной субчастицы (Rpt1–Rpt6) относятся к АТРазам семейства AAA (ATPases associated with various cellular activities). Эти субъединицы образуют кольцо, как и четыре субъединицы, не обладающие АТРазной активностью (Rpn1, Rpn2, Rpn10 и Rpn13) [18]. Субъединицы Rpn1, Rpn10 и Rpn13 служат рецепторами убиквитина, распознавая субстраты, меченные для элиминации в протеасоме [19–22]. Субъединицы – убиквитиновые рецепторы – различаются по своему средству к разным полиубиквитиновым цепям [23, 24]. «Крышка» представлена девятью различными субъединицами (Rpn3, Rpn5–9, Rpn11, Rpn12 и Rpn15), которые формируют подковообразную структуру [25–27]. Основная функция «крышки» – деубиквитинирование субстратов, осуществляемое при помощи нескольких деубиквитиназ (одна из них – собственный компонент протеасомы Rpn11) [28–30]. Энергия АТР необходима для стабилизации комплекса регуляторной и каталитической субчастиц протеасомы и главное – для изменений конформации субъединиц, позволяющих открыть «ворота» протеолитической полости

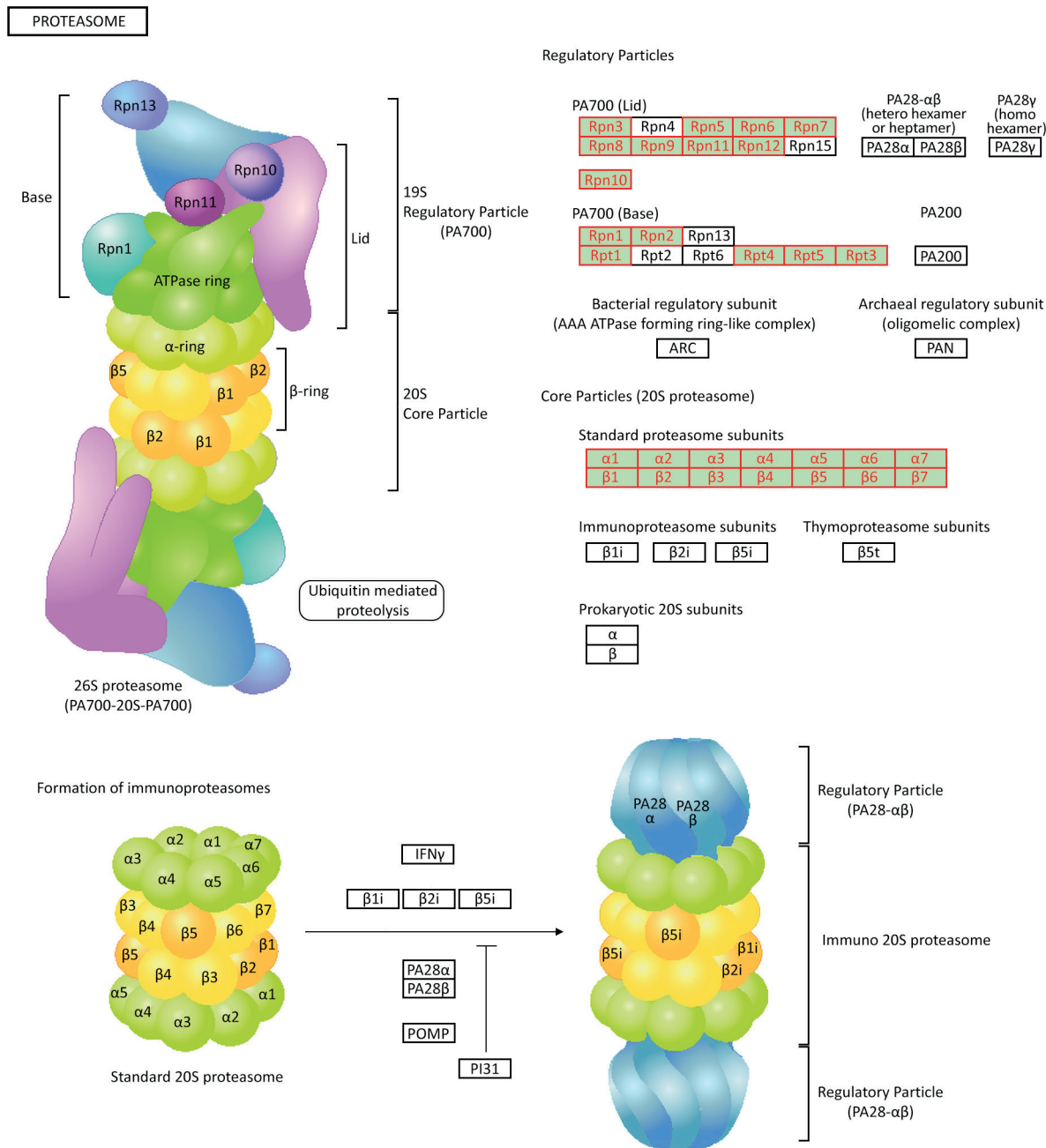


Рис. 1. Строение протеасом (см. пояснения в тексте). Изображение (map03050) адаптировано и взято из открытого ресурса KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa Laboratory) [15] с разрешения правообладателя

для прохождения внутрь белковых субстратов [31]. Энергия гидролиза АТФ используется также и для разворачивания субстратов во время перемещения их в протеолитическую область [32, 33].

Другие регуляторы протеасомы. Активатор протеасомы PA200 – фосфопротеин, широко представленный в клетке в виде пула, свободного от протеасом. В случае стрессовых условий PA200 рекрутируется протеасомами. При присоединении к 20S-протеасоме – усиливает ее пептидазную активность; способен также взаи-

модействовать с 26S-протеасомой, образуя 19S–20S–PA200 гибридную протеасому. PA200 участвует в ключевых сигнальных путях клетки, играет роль в репарации ДНК, обеспечивая стабильность генома. Экспрессия этого фактора резко увеличивается в случае опухолевых процессов и, наоборот, подавляется при нейродегенеративных заболеваниях. В настоящее время этому фактору уделяется пристальное внимание как возможной терапевтической мишени [34].

У высших позвоночных стимуляция клетки γ -интерфероном или другими противо-

воспалительными цитокинами приводит к тому, что при формировании протеасомы из 15S-препротеасомного комплекса образуется иммунопротеасома, содержащая вместо субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ альтернативные каталитические субъединицы $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ и обладающая видоизмененной протеолитической активностью и субстратной специфичностью [35, 36] (рис. 1). В настоящее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о роли иммунопротеасом не только в случае иммунного ответа, но и при окислительном стрессе, канцерогенезе и нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, аутоиммунные заболевания (в частности, рассеянный склероз) [37, 38].

Регулятор Ecm29 играет ключевую роль в защите клетки от окислительного стресса. Было показано, что при окислительном стрессе происходит резкое увеличение количества 20S-протеасом в клетке не только в результате регуляции транскрипции, но и благодаря диссоциации 26S-протеасомных комплексов. Это необходимо для скорейшей элиминации поврежденных белков убиквитин- и АТФ-независимыми способами. Регулятор Ecm29 ускоряет процесс диссоциации 26S-протеасом в ответ на окислительный стресс, по-видимому, вызывая конформационные изменения и влияя на белок-белковые взаимодействия между 19S- и 20S-субкомплексами [39].

Протеасомный регулятор PI31 (Proteasomal Inhibitor of 31 kDa) был первоначально открыт как ингибитор гидролиза пептидов 20S-протеасомой *in vitro*. Позже оказалось, что *in vivo* он, напротив, способствует протеасомному расщеплению белков. Рибозилирование PI31 способствует сборке 26S-протеасомы. Не так давно обнаружили, что этот фактор также работает как адаптер протеасомного транспорта в нейроны. В опытах на мутантных мышях было показано, что «выключение» этого фактора в спинальных мотонейронах и в клетках Пуркинье вызывает аксонопатию, дегенерацию нейронов, спинальную и мозжечковую неврологические дисфункции. Авторы предполагают, что протеасомный регулятор PI31 может играть ключевую роль в гомеостазе белков и функции синапсов и, соответственно, его дисфункции могут приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний у человека [40].

Сборка протеасом. Сборка протеасом представляет собой сложный регулируемый процесс; в настоящее время она достаточно хорошо изучена (на примере протеасом дрожжей и человека) благодаря криоэлектронной

микроскопии. Сборка коровой части у эукариот может быть условно разделена на три этапа: формирование α -кольца, формирование β -кольца, димеризация полупротеасомы и созревание. Эти этапы обеспечиваются пятью шаперонами, которые носят названия Pba1–Pba4 (proteasome biogenesis associated 1–4) и Ump1 (underpinning maturation of proteasome 1) у дрожжей и соответственно PAC1–PAC4 (proteasome assembly chaperone 1–4) и POMP (proteasome maturation protein) – в случае протеасом человека [41, 42].

Сборка регуляторной субчастицы – также многостадийный процесс; два ее субкомплекса – «крышка» и «основание» – могут собираться независимо друг от друга. В сборке «основания» участвуют пять шаперонов (соответственно у дрожжей и у человека): Nas2 (p27), Nas6 (p28), Hsm3 (S5b), Rpn14 (PAAF1) (proteasomal ATPase associated factor 1) и Adc17 (ATPase dedicated chaperone of 17 kDa). Было предложено две модели сборки «основания» регуляторной субчастицы протеасомы. Согласно одной из них, сборка «основания» не зависит от коровой части; другая модель предполагает, что 20S-субчастица служит «платформой» для формирования «основания» 19S-субчастицы [41, 42].

«Крышка» может собираться в отсутствие «основания» 19S-субчастицы и коровой части протеасомы. На первом этапе образуются два интермедиата: один состоит из субъединиц Rpn5–6, Rpn8, Rpn9 и Rpn11, другой – из субъединиц Rpn3, Rpn7 и Rpn15. После ассоциации этих интермедиатов присоединяется последняя субъединица Rpn12, что является триггером для конформационных изменений, позволяющих «крышке» присоединиться к «основанию» 19S-субчастицы. В ассоциации коровой и регуляторной части протеасомы принимают участие шаперон Nas6 (p28) и субъединицы «крышки» Rpn5 и Rpn6 [41, 43].

На сборку протеасом может влиять функциональное состояние митохондрий [44]. Дефекты дыхательного комплекса I ухудшают сборку 26S-протеасомы, нарушения которой менее заметны в присутствии пирувата или аспартата [44].

Компартментализация протеасом. Чтобы элиминировать соответствующие белки в нужный момент в нужном месте, протеасомам необходимо быть динамичными не только в аспекте их структуры, но и в аспекте компартментализации. Поэтому субклеточная локализация протеасом может меняться при изменении условий (например, при окислительном стрессе) или в различные фазы клеточного цикла.

Протеасомы содержатся в цитоплазме, часть их ассоциирована с цитоскелетом и мембранами эндоплазматического ретикулума. В то же время большое количество протеасом находится в ядре. Более того, в опытах на эмбриональных фибробластах мыши было показано, что новосинтезированные протеасомы находятся именно в ядре, тогда как трехдневные протеасомы в основном обнаруживались в цитоплазме, что свидетельствует о поступлении новосинтезированных протеасом из ядра в цитоплазму [45]. Примечательно, что белки, реализующие ядерные функции (циклины, ингибиторы циклин-зависимых киназ, факторы транскрипции NF- κ B, I κ B, p53), были одними из первых идентифицированных физиологических протеасомных субстратов [46–48].

Недавно у млекопитающих (в трех различных клеточных линиях) был обнаружен белок AKIRIN2 – адаптер импорта в ядро зрелых коровых частиц. AKIRIN2 обеспечивает наличие у зрелой коровой частицы специальной последовательности, необходимой для транспорта в ядро, и способствует связыванию транспортного рецептора импорта 9. AKIRIN2 ингибирует коровую субчастицу и расщепляется при попадании ее в ядро [49]. Механизмы импорта протеасом в ядро у дрожжей и млекопитающих схожи тем, что 20S-субчастица проходит через ядерные поровые комплексы в ингибированном либо незрелом состоянии, вероятно, для того чтобы избежать деградации белков ядерных пор, богатых неупорядоченными последовательностями.

На клетках млекопитающих и дрожжей было показано, что различные стрессовые факторы (ингибирование протеасом, окислительный стресс и другие) вызывают аккумуляцию протеасом в ядерных или околядерных локусах (так называемых специфических «безмембранных органеллах»). Как только стрессовые факторы перестают действовать, наблюдается «демонтаж» этих «органелл» [50–53].

Если aberrантные белки вовремя не элиминируются в ядре из-за протеасомных дисфункций, они могут аккумулироваться в PML-тельцах (ядерные тельца промиелоцитарной лейкемии), заполняя «protein quality compartments» в ответ на стресс [54]. Протеасомы рекрутируются в PML-тельца для деградации белков, однако в неблагоприятных условиях, например, при недостатке АТФ, убиквитин-протеасомная система не может работать в полную силу. В этом случае PML-тельца с избытком протеасом становятся токсичными; это может приводить к нейродегенеративным заболеваниям [55].

В нейронах обнаружен новый 20S-протеасомный комплекс, локализованный в плазматической мембране и экспонированный во внеклеточное пространство [56, 57]. Образующиеся в результате работы этого комплекса пептиды могут стимулировать кальциевую сигнализацию нейронов.

Посттрансляционные модификации протеасом. Среди посттрансляционных модификаций протеасом наиболее изучено фосфорилирование. Согласно базе данных PhosphoSitePlus, известно более 450 фосфосайтов на 26S-протеасоме человека, которые были обнаружены на каждой субъединице протеасом [58]. Окружающие фосфосайты протеасом аминокислотные последовательности соответствуют мотивам узнавания различных протеинкиназ (MAPK, CDK, CaMK, GSK3 и некоторых других) [58]. Это предполагает участие различных протеинкиназ в регуляции функции протеасом (и протеинфосфатаз, осуществляющих обратимость такой регуляции путем дефосфорилирования). Результаты нескольких исследований свидетельствуют в пользу того, что фосфорилирование Rpn6-субъединицы 19S-протеасом сАМР-зависимой протеинкиназой (РКА) повышает активность протеасом и увеличивает деградацию токсических белков. Активация РКА *in vivo* путем увеличения уровня внутриклеточного сАМР снижала накопление фосфорилированного тау-белка и улучшала когнитивные функции у мышей с таупатией [59]. Стимуляция активности 26S-протеасомы при фосфорилировании сGMP-зависимой протеинкиназой также способствовала увеличению протеасомной деградации белков (включая белки, вовлеченные в развитие нейродегенеративных заболеваний) [60].

Помимо фосфорилирования, есть сообщения об O-связанном N-ацетилглюкозаминировании [61], ADP-рибозилировании [62], ацетилировании и миристилировании [63, 64]. O-связанное N-ацетилглюкозаминирование приводит к торможению АТРазной активности 26S-комплекса и ингибирует протеолитическую активность протеасом. У млекопитающих этому типу модификации (как *in vitro*, так и *in vivo*) подвергается Rpt2-субъединица 19S-протеасом [61]. ADP-рибозилирование способствует активности 26S-протеасом как в клетках дрозофилы, так и в клетках человека. Танкираза – фермент ADP-рибозилтрансфераза, а также шапероны dp27 и dS5b, участвующие в сборке 19S-протеасомы, связываются с регулятором протеасомы P131. ADP-рибозилирование последнего снижает его сродство к α -субъединицам протеасомы 20S. Это снижает

действие PI31 на коровую субчастицу (20S). Кроме того, модификация PI31 увеличивает связывание и секвестрацию dp27 и d55b из регуляторных частиц 19S, способствуя тем самым сборке 26S. Протеомное профилирование 26S-протеасом сердца мыши выявило *N*-концевое ацетилирование пяти субъединиц 19S-протеасом (Rpn1, Rpn5, Rpn6, Rpt3 и Rpt6) и пяти субъединиц 20S-протеасом ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$ и $\beta 4$), а также *N*-концевое миристилирование Rpt2-субъединицы 19S-протеасом [63]. Увеличение ацетилирования субъединиц коровой части (20S) повышало протеолитическую активность протеасом мыши и человека [65, 66]. У дрожжей миристилированная Rpt2-субъединица направляет протеасомы для осуществления контроля качества ядерных белков. Мутации, блокирующие эту модификацию, приводят к нарушению внутриклеточной локализации протеасом [64].

Окислительная модификация сульфгидрильных групп 20S-протеасомы (окисление остатков цистеина Cys-SH до цистеинсульфеновой кислоты Cys-SOH) приводит к последующему S-глутатионилированию (Cys-S-SG). Это сопровождается частичной потерей химо-трипсиноподобной активности [67]. В условиях *in vitro* глутаредоксин 2 проявлял де-глутатионлигазную активность, удаляя глутатион из глутатионилированных *in vivo* и *in vitro* 20S-протеасом. Аналогичным образом действовали и другие цитоплазматические редокс-белки тиоредоксин 1 и тиоредоксин 2 [67].

БЕЛКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРОТЕАСОМАМИ

Помимо собственно протеасомных белков, фракции протеасом, выделенные при помощи различных методов из разных источников (от дрожжей до клеток и тканей высших позвоночных и человека), содержат существенное количество ассоциированных с этими частицами белков [68–78].

В одной из первых работ, посвященных анализу белкового состава очищенных 19S-, 20S- и 26S-протеасом дрожжей, все идентифицированные белки были разделены на несколько классов (по терминологии авторов работы) [70].

(1) Субъединицы протеасом, а также компоненты убиквитин-протеасомной системы (УПС), взаимодействующие с ними. К числу последних относятся убиквитиназы, деубиквитиназы и т.д.

(2) Белки-шапероны, участвующие в ассоциации/диссоциации протеасом, в разделении плотно упакованных убиквитинированных субстратов в ходе подготовки к их протеолизу, а также во взаимодействии с развернутыми (или неправильно свернутыми) белками-мишенями для последующей протеолитической деградации.

(3) Разнообразные белки, участвующие в регуляции транскрипции и трансляции, а также в функционировании цитоскелета, метаболизме РНК, делении клеток, проведении сигналов и метаболизме.

(4) Белки рибосом и гликолитические ферменты. С учетом данных о том, что не менее трети всех новосинтезированных белков клеток млекопитающих подвергаются протеасомной деградации в течение нескольких минут после трансляции [79], ассоциация белоксинтезирующей машины и УПС имеет важное значение в немедленной ликвидации aberrантных белков. К тому же реакции субстратного фосфорилирования, в которых участвуют гликолитические ферменты, создают потенциальные возможности образования дополнительных количеств АТФ, оказывающих влияние на нуклеотид-чувствительное взаимодействие белков с протеасомами, а также на функционирование субъединиц регуляторной 19S-субчастицы, проявляющих АТФазную активность (Rpt1–6).

Условность такого деления белков, ассоциированных с протеасомами, очевидна, особенно когда речь заходит о трех последних классах. Многофункциональные белки, например гликолиза, помимо своих классических биохимических функций, едва ли не с равным успехом могут рассматриваться и как шапероны (например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД)), и как белки, предназначенные для деградации в протеасомах. То же самое относится к регуляторам и компонентам трансляционной машины (рибосомные белки). Участие белков этих групп в конкретных метаболических путях, включая протеасомную деградацию, определяется их структурными особенностями в данный конкретный момент времени. Например, уже упоминавшийся выше фермент гликолиза – ГАФД – может выполнять шаперонные функции, защищая новосинтезированный белок, высвобожденный с рибосом, от протеасомной деградации [80]. Однако при окислении остатка цистеина (Cys²⁴⁷) ГАФД теряет способность выполнять функцию шаперона [80], и шаперон Hsp70, связываясь с окисленной ГАФД, защищает клетку от агрегации этого белка [81].

Исследования, выполненные как на культивируемых клетках млекопитающих и человека [68, 70–75], так и на препаратах коры мозга крысы [69], мозга и печени кролика [76, 77], также выявили большое количество белков, ассоциированных с протеасомами (таблица). Белки, не являющиеся собственно компонентами УПС, относятся к различным функциональным группам, включающим: (I) компоненты цитоскелета и белки, вовлеченные в транспортировку внутриклеточных «грузов»; (II) защитные белки; (III) сигнальные белки и регуляторы активности ферментов; (IV) регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки клеток; (V) метаболические ферменты, в том числе мультифункциональные белки. Примечательно, что представленность ряда ассоциированных с протеасомами белков была не ниже и даже превышала представленность белков, формирующих структуру протеасом [69, 76, 77]. Уровень протеасомных субъединиц, формирующих коровую часть протеасомы, варьировал в диапазоне 400–1000 ед. (условные единицы, arbitrary units of spectrum counting); для субъединиц регуляторной субчастицы этот

показатель был в диапазоне 200–680 ед. [76]. Для ряда белков вышеприведенных функциональных групп представленность превышала обнаруженные для собственно протеасомных субъединиц диапазоны. Например: (I) цитоплазматический актин (P29751 Actin, cytoplasmic) – 1777,6 ед.; (II) белок теплового шока (G1T9M9 Heat shock protein family A (Hsp70) member 8) – 509,2 ед.; (III) кальмодулин (P62160 Calmodulin) – 1386,3 ед.; (IV) гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К (O19049 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) – 468,5 ед.; (V) ГАФД (P46406 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) – 952,8 ед. [76]. С учетом того, что абсолютное количество приведенных белков в мозге [82] отличается от их представленности во фракции протеасом, все это, очевидно, свидетельствует о том, что выделяемые вместе с фракцией протеасом белки не являются контаминантными, а представляют собой компоненты протеасомных протеомов. В пользу этого же свидетельствует и многократное обогащение выделенных протеасом мозга белками, принадлежащими к определенным метаболическим путям (рис. 2).



Рис. 2. Обогащение протеасом определенными группами белков, идентифицированных в мозге [76, 77]. Анализ данных ресурсом Quick GO по базе Explore Biology показал распределение обнаруженных белков по нескольким метаболическим путям. По отношению к полноразмерному протеому человека наибольшее обогащение обнаружено в случае белков, участвующих в метаболизме глутамина и глутамата (P02747; 100-кратное обогащение в субпротеоме связанных с протеасомами белков), гликолиза (P00024; 82-кратное обогащение), метаболизма фруктозы (P02744; 37-кратное обогащение), метаболизма пирувата (P02772; 34-кратное обогащение) и т.д. Заметное обогащение выявлено для метаболических путей, вовлеченных в развитие болезни Паркинсона (P00049; 12-кратное обогащение) и болезни Гентингтона (P00029; 8-кратное обогащение). Идентификаторы метаболических путей представлены в соответствии с номенклатурой ресурса Quick GO в терминах GO Slims (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>) [83]

Функциональные группы белков, ассоциированных с протеасомами

Источник протеасом	Метод выделения	Функциональные группы белков					Метод избирательной валидации взаимодействия с протеасомой	Ссылка
		I	II	III	IV	V		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	аффинная очистка на основе anti-Flag M2* агарозы	+	+	+	+	+		[70]
<i>S. cerevisiae</i>	изотопное мечение, сшивка <i>in vivo</i> и тандемная аффинная очистка SILAC**, количественный анализ QTAG***	+	+	+	+	+	обратная коочистка и иммуноблоттинг	[72]
<i>Homo sapiens</i> , клетки 293HF-UbR/Rpn11-TB	аффинная очистка с применением сшивки <i>in vivo</i> XBAR****		+	+	+	+		[74]
<i>H. sapiens</i> , клетки линия K562	аффинная очистка на основе комплекса биотин-стрептавидин с применением протеазы TEV *****	+	+	+		+		[75]
<i>H. sapiens</i> , внеклеточные 26S-протеасомы клеточной линии K562	центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы и ионообменная хроматография	+			+		коочистка и иммуноблоттинг	[73]
<i>H. sapiens</i> , 26S-протеасомы клеток hеs 293, экспрессирующих меченную Rpn11-НТВН	аффинная очистка MAP*****-SILAC	+	+	+	+			[68]
<i>Rattus norvegicus</i> , цитозоль и синапсомы коры больших полушарий	аффинная очистка с использованием глутатион-сефарозы, GST (glutathione S-transferase) и мечения UBL (ubiquitin-like domain)	+	+	+	+		коочистка и иммуноблоттинг	[69]
<i>R. norvegicus</i> , скелетные мышцы	аффинная очистка с использованием глутатион-сефарозы, GST (glutathione S-transferase) и мечения UBL (ubiquitin-like domain)	+	+	+	+	+		[78]
<i>Oryctolagus cuniculus</i> , печень	высокоскоростное ультрацентрифугирование, фракционирование сульфатом аммония	+	+	+	+	+	оптический биосенсор (поверхностный плазмонный резонанс)	[77]
<i>O. cuniculus</i> , головной мозг	высокоскоростное ультрацентрифугирование, фракционирование сульфатом аммония	+	+	+	+	+	оптический биосенсор (поверхностный плазмонный резонанс)	[76, 77]

Примечание. Белки, принадлежащие к данным функциональным группам, не являются ни собственно протеасомными белками, ни компонентами убиквитин-протеасомной системы (убиквитиназы, деубиквитиназы и пр.). Они были идентифицированы в количестве нескольких десятков с помощью масс-спектрометрических методов во фракциях протеасом, выделенных из различных источников, и в ряде случаев их взаимодействие с протеасомами было подтверждено независимыми методами.

Функциональные группы ассоциированных с протеасомами белков:

I – компоненты цитоскелета и белки, вовлеченные в транспортировку внутриклеточных «грузов»;

II – защитные белки;

III – сигнальные белки и регуляторы активности ферментов;

IV – регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки;

Примечание к таблице (окончание).

V — метаболические ферменты, преимущественно мультифункциональные белки.

* Моноклональные антитела к FLAG-эпиту.

** Stable isotope labeling of amino acids in cell culture.

*** Quantitative analysis of tandem-affinity purified cross-linked (x) protein complexes.

**** *In vivo* cross-linking (X) assisted bimolecular tandem affinity purification strategy.

***** Использовали клетки, экспрессирующие beta 7 субъединицу 20S-протеасомы, меченной C-концевым НТВН-пептидом, содержащим два His(6)-фрагмента, специфический сайт протеазы TEV (Tobacco Etch Virus), биотинилирование *in vivo*, метод нековалентного связывания с образованием комплекса биотин-стрептавидин с последующей элюцией с применением протеазы TEV.

***** Смешивание по-разному меченных проб (MAP, Mixing after purification).

Фракционирование 26S-протеасом мозга оказывает существенное влияние на профиль связанных с коровой субчастицей (20S) белков. Число индивидуальных белков, идентифицированных во фракции 20S-протеасом мозга кролика, практически удваивается по сравнению с фракцией 26S-протеасом мозга [76, 77] преимущественно за счет метаболических ферментов, белков, участвующих в передаче сигнала и регуляции активности ферментов, защитных белков и белков-регуляторов экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки [77]. При фракционировании 26S-протеасом печени кролика число индивидуальных белков во фракции 20S-протеасом практически не изменяется по сравнению с фракцией 26S. Следует подчеркнуть, что сопоставление субпротеомов белков фракций 26S- и 20S-протеасом мозга и печени кролика выявило их высокую органную специфичность. Пул общих белков ($n = 35$) в основном представлен метаболическими и защитными белками, на долю которых приходится более 70% белков. Примечательно, что из 35 ассоциированных с протеасомами белков, общих для всех четырех фракций (фракции 26S и 20S мозга и печени), 10 принадлежат к так называемым мультифункциональным белкам. Среди них: ГАФД [84], α -енолаза [85, 86], фактор элонгации 1- α 1 [87], альдолаза [88, 89], глутатионпероксидаза [90, 91], белок теплового шока Hsp60 [92], лактатдегидрогеназа [93], триозофосфатизомераза [94]. Существенное расширение репертуара белков, связанных с коровой субчастицей протеасом (20S) мозга, после удаления белков 19S-субчастицы, указывает на то, что компонентам последней принадлежит важная роль в формировании протеасомного интерактома и его регуляции. Во всяком случае, профили митохондриальных белков мозга крысы, связывающихся с субъединицей Rpn10 19S-субчастицы протеасом, существенно различались при введении животным нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) и нейропротектора изатина [95].

Поскольку субъединица Rpn10 19S-протеасом играет важную роль в узнавании субстратов, предназначенных для протеолитической деградации в протеасомах [96, 97], это согласуется с представлениями о том, что именно субъединицы 19S-протеасом определяют упорядоченное поступление белков, подвергающихся протеолитической деградации в коровой субчастице. При этом нельзя не отметить тот факт, что вопреки общепринятому представлению о том, что протеасомные рецепторы убиквитина — субъединицы Rpn10 и Rpn13 — взаимозаменяемы в контексте функционирования протеасом [25], профили белков мозга, связывающихся Rpn10- и Rpn13-субъединицами *in vitro*, существенно различались [98]. Это согласуется с результатами, полученными другими авторами на дрожжах [72]. По их данным, профили белков, взаимодействующих с субъединицами 19S-протеасомы Rpn1, Rpn10, Rpn11 и Rpn15, не полностью идентичны.

В контексте известных данных о внутриклеточном трафике протеасом и их транслокации в различные компартменты клетки в зависимости от функционального состояния клетки [42–45] существование большого числа белков, взаимодействующих с протеасомами и формирующих протеасомный интерактом, вполне объяснимо.

Краткая характеристика групп белков, взаимодействующих с протеасомами. Будучи широко представленным надмолекулярным комплексом в клетках мозга и периферических тканях [64, 99], протеасомы обнаруживаются в ядре и в цитоплазме, где они связаны с различными субклеточными структурами, включая хроматин, цитоскелет, ядерную оболочку, плазматическую мембрану, цитозольную мембрану. При этом их распределение в клетках неравномерно, и конкретная субклеточная локализация протеасом часто зависит от типа клеток, статуса роста и динамически меняющихся регуляторных стимулов [64, 100]. В контексте молекулярных механизмов пластичности мозга локализация компонентов УПС служит важным регулятором синаптической

функции, а нейрональные протеасомы могут взаимодействовать с внутриклеточными мембранными структурами, включая синаптические везикулы, везикулы аппарата Гольджи, митохондрии и лизосомы [101]. Локальные нарушения протеасомной деградации вовлечены в развитие многих нейродегенеративных заболеваний [102, 103].

(I) Компоненты цитоскелета и белки, вовлеченные в транспортировку внутриклеточных «грузов», и их роль в локализации протеасом в различных компартментах клетки. Один из молекулярных моторов — динеиновый комплекс — играет ключевую роль в подвижности протеасом в аксонах [104, 105].

Перераспределение 26S-протеасом в нейронах и других типах клеток обеспечивается путем взаимодействия с компонентами цитоскелета, который, в свою очередь, подвергается ремоделированию при участии протеасом [106]. Для размещения протеасом в синапсах нейроны используют зависимые от микротрубочек молекулярные моторы.

В нейронах дрозофилы компонентами зависимо от микротрубочек протеасомного транспорта служат белки легкой цепи динеина (DYNLL1/2) [105].

В связывании протеасом с белками DYNLL1/2 важную адаптерную роль играет консервативный связывающий протеасомы белок PI31 [107, 108]. Фосфорилирование с помощью p38 MAPK увеличивало связывание PI31 с DYNLL1/2, стимулировало образование комплексов протеасома—DYNLL1/2 и способствовало направленному движению протеасом в аксонах [108]. Инактивация PI31 нарушала взаимодействие легких цепей динеина с протеасомами и транспорт последних в аксоны. Это приводило к изменению пресинаптических зон и способствовало развитию дефектов белкового гомеостаза на периферии нейронов. Кроме того, PI31 прочно связывается с F-box-белком Ntc/FBXO7/PARK15 [107, 108], мутации которого сопровождаются нарушением функций протеасом и вызывают развитие ювенильной формы болезни Паркинсона [109]. Другой адаптерный белок, Escm29, связываясь с миозинами и кинезинами, способствует взаимодействию протеасом с различными компартментами клеток [110]. Нокдаун тяжелой цепи моторного белка кинезина I (KIF5B) приводит к нарушению дендритного транспорта, процессов обучения и памяти [111] и антероградного движения протеасом к аксонам [101]. Факторы, способствующие росту аксонов, стимулировали ретроградный транспорт протеасом из

растущих терминалей аксонов, который регулировался посредством фосфорилирования адаптерного белка протеасом Escm29, взаимодействующего с динеином [104].

(II) Защитные белки. Помимо участия в сборке протеасом, клеточные шапероны участвуют в протеолитической деградации белков протеасомами. Члены семейства Hsp70 непосредственно вовлечены в процессы деградации белков путем доставки белковых субстратов к протеасоме. При этом участие Hsc70/Hsp70 в деградации белков 26S-протеасомой опосредует кошаперон CHIP (carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein). Он действует как убиквитинлигаза, а белок BAG1 (BCL2-associated athanogene) координирует связывание Hsp70-субстратного комплекса с 26S-протеасомой [112–114]. В случае протеолитической элиминации окисленных белков протеасомами клетки используют протеолитические возможности 20S-протеасомы, осуществляя диссоциацию 26S-протеасомы. В этом процессе важная роль принадлежит белку теплового шока 70 (Hsp70), который способствует увеличению количества свободных 20S-протеасом и предотвращает накопление окисленных белков в клетках в условиях окислительного стресса [115]. В ходе формирования клеточного ответа на окислительный стресс Hsp70 может взаимодействовать и с окисленными белками, и с 20S-протеасомой, которая, в отличие от 26S-протеасомы, способна распознавать и расщеплять развернутые белки АТФ- и убиквитин-независимым способом [116]. Протеасома 20S узнает свои субстраты по их неструктурированным гидрофобным участкам, экспонированным наружу в результате разворачивания белковой молекулы [7–11]. При этом протеасома 20S значительно более устойчива к окислительному стрессу, чем протеасома 26S [117, 118]. Устойчивости 20S-протеасомы к окислительному повреждению способствует Hsp90 [119]. Hsp90 также связывается с окисленным кальмодулином [120], представленность которого в протеасомах мозга превышает уровень ряда субъединиц протеасом [76], и способствует деградации этого регуляторного белка 20S-субчастицей.

(III) Сигнальные белки и регуляторы активности ферментов. Фосфорилирование играет важную роль в регуляции протеасом и их субклеточной локализации. Ретроградный транспорт протеасом зависит от стадии развития нейрона и увеличивается по мере роста аксонов [104]. Это процесс стимулируют cAMP и мозговой нейротрофический фактор (BDNF), не влияя на антероградное направление.

Регуляторный механизм включает BDNF/сАМР-зависимую активацию РКА и фосфорилирование адаптерного белка 26S-протеасомы Ecm29, которое усиливает взаимодействие протеасомы с динеином. В качестве главного регулятора (так называемого master regulator) синапсов рассматривают α -субъединицу Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII α) [58], которая в мозге ассоциирована с протеасомами [121]. Транслокация этого фермента в синапс способствует накоплению протеасом в шипиках и их постсинаптическому перераспределению. Автофосфорилирование CaMKII α усиливает связывание с протеасомами и мобилизацию последних в шипики. Действие CaMKII α на протеасомы осуществляется посредством некаталитического и каталитического механизмов. В первом случае активированная (автофосфорилированная) CaMKII α эффективнее связывается с протеасомами, способствуя их мобилизации к шипикам. Во втором случае CaMKII α стимулирует активность протеасом, фосфорилируя остаток серина (Ser120) субъединицы Rpt6. Однако для деградации полиубиквитинированных белков шипиков важное значение имеет именно транслокация CaMKII α , а не ее киназная активность [121]. Тем не менее, по данным других авторов, блокада этого фосфорилирования у мутантного белка с аминокислотной заменой S120A или ингибирование CaMKII α снижают синаптическую активность и рост шипиков [122, 123]. Кондиционирование страха сопровождалось увеличением фосфорилирования Ser120 Rpt6-субъединицы регуляторной субчастицы протеасом и активности протеасом в миндалевидном теле крыс Лонг-Эванс (Long Evans) [124]. Введение специфического ингибитора CaMKII – myr-AIP (myristoylated autocalcinein-2 related inhibitory peptide) – приводило к значительному снижению индуцированного обучением увеличения фосфорилирования Ser120 Rpt6-субъединицы и активности протеасом, не влияя на уровни полиубиквитинирования белков. Специфический ингибитор РКА таким действием не обладал. Эти и другие данные свидетельствуют в пользу того, что CaMKII участвует в формировании памяти, регулируя фосфорилирование Rpt6 и функцию протеасом [124, 125].

Полоподобная протеинкиназа 1 (polo-like kinase 1 – фермент семейства серин-треониновых киназ, участвующий в регуляции клеточного цикла, ответов клетки на повреждение ДНК и др.) активирует 20S-протеасому, фосфорилируя α -субъединицу [126]. Однако

роль этой киназы, которую некоторые авторы называют протеасомной протеинкиназой [58], в пластичности мозга пока остается невыясненной. Известно, что ингибирование этого фермента блокирует прогрессию клеточного цикла при некоторых глиомах [127].

Кальмодулин – активатор Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II – обнаруживается при протеомном профилировании фракций 26S- и 20S-протеасом мозга [76, 77]. С учетом известных данных о диссоциации кальмодулина от CaMKII [128] обнаружение этого белка в протеасомах может свидетельствовать о его потенциальной роли в качестве регулятора CaMKII и, возможно, других кальмодулин-зависимых ферментов, связанных с протеасомами. Нельзя исключить также и поступление этого белка к месту протеолитической деградации. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что свободный кальмодулин, лишенный ионов Ca^{2+} , подвергается деградации, не требующей убиквитинирования как 26S-, так и 20S-протеасомами [120, 129].

(IV) Регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки клеток. Значительное количество протеасом находится в ядре, где они играют ключевую роль в регуляции клеточного цикла, транскрипции, ремоделирования хроматина, эпигенетического контроля, сплайсинга РНК, восстановления повреждений ДНК и контроля качества ядерных белков [64, 130]. В связи с этим регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки, обнаруживаемые во фракции протеасом, могут рассматриваться в качестве потенциальных субстратов, подлежащих протеолитической деградации. Фактор элонгации eEF1A, играющий важную роль в долговременной синаптической пластичности [131], связывается с протеасомами [76, 77, 132]. Уровень этого белка снижен в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера [133]. С другой стороны, есть сообщения о том, что фактор элонгации eEF1A связывает aberrантные белки, высвобождающиеся с рибосом, и доставляет их в протеасомы для последующей деградации [132]. eEF1A взаимодействует преимущественно с Rpt1-субъединицей регуляторной 19S-субчастицы, а также с убиквитинированными белками [132]. Наиболее сильное взаимодействие отмечено при истощении АТФ; при делеции гена, кодирующего Rpt1-субъединицу, связывание eEF1A с протеасомой снижалось, но не исчезало совсем [132]. Это свидетельствует о том, что eEF1A может связываться и с другими компо-

нентами протеасом. Последнее, по-видимому, объясняет тот факт, что в мозге eEF1A обнаруживается как во фракции 26S-протеасом, так и во фракции 20S-протеасом [76, 77].

(V) Метаболические ферменты. Метаболические ферменты, ассоциированные с протеасомами и обнаруженные в протеасомах, выделенных из различных биологических объектов [69, 70, 72, 73, 75–78], вовлечены практически во все виды обмена. При этом только гликолитические ферменты, обнаруженные в протеасомах (рис. 3) и снабжающие их энергией АТФ в реакциях субстратного фосфорилирования, по-видимому, могут рассматриваться в качестве функционально значимых. Во всяком случае, субъединицам митохондриального АТФ-синтазного комплекса [73, 78] или транспортных АТФаз [76, 77] трудно «предложить работу по специальности» в протеасомах. По-видимому, часть этих ферментов (например, уже упоминавшаяся ранее ГАФД), не подлежащая деградации в протеасомах, может выполнять

неканонические функции, действуя, например, в качестве шаперонов или белков-ингибиторов 20S-протеасомы [134]. С другой стороны, субъединицы лактатдегидрогеназы [76, 77], входящие в состав лактатоксидазного комплекса, обнаруженного в нейронах мозга крыс [135], могут служить одним из связующих звеньев между компонентами протеасомного интерактома и митохондриями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеасомный интерактом содержит большое количество белков, которые принимают участие в сборке этих надмолекулярных комплексов, регуляции функционирования и внутриклеточной локализации. При экстраполяции на мозг человека данных, полученных на различных биологических объектах, ассоциированные с протеасомами белки составляют не менее 28% протеома мозга человека (рис. 4).

В контексте молекулярных функций Gene Ontology (GO) Pathways белки протеасомного интерактома обеспечивают взаимодействие компонентов более 30 метаболических путей, аннотированных в терминах GO (рис. 5) [136]. Главным итогом этих взаимодействий, по-видимому, является связывание адениновых и гуаниновых нуклеотидов, которые, очевидно,

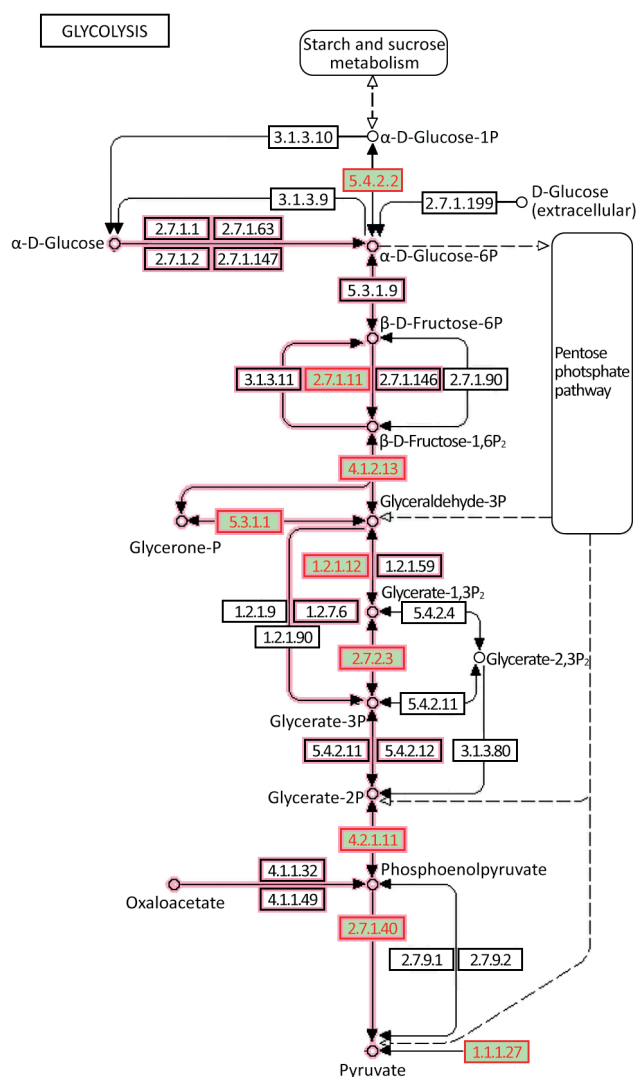


Рис. 3. Обогащение протеасом ферментами гликолиза, идентифицированными в мозге кролика [76, 77]. Красным цветом обозначены те реакции гликолиза, участниками которых являются обнаруженные белки. Блоки, заполненные зеленым цветом, показывают идентифицированные белки, которые обозначены номерами в классификации ферментов, а также идентификаторами KEGG и UniProtKB: фосфоглюкомутаза-1 (EC 5.4.2.2; идентификатор KEGG – K01835, идентификатор UniProtKB – P36871), АТФ-зависимая 6-фосфофруктокиназа (EC 2.7.1.11; идентификатор KEGG – K00850, идентификатор UniProtKB – P308237), фруктозобисфосфатальдолаза А (EC 4.1.2.13, идентификатор KEGG – K01623, идентификатор UniProtKB – P04075), триозофосфатизомеразы (EC 5.3.1.1; идентификатор KEGG – K01803, идентификатор UniProtKB – P60174), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (EC 1.2.1.12; идентификатор KEGG – K00134, идентификатор UniProtKB – P04406), фосфоглицераткиназа 2 (EC 2.7.2.3; идентификатор KEGG – K00927, идентификатор UniProtKB – P07205), альфа-енолаза (EC 4.2.1.11; идентификатор KEGG – K01689, идентификатор UniProtKB – P06733), пируваткиназа PKM (EC 2.7.1.40; идентификатор KEGG – K00873, идентификатор UniProtKB – P14618), L-лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27; идентификатор KEGG – K00016, идентификатор UniProtKB – P00338). Изображение адаптировано и взято из открытого ресурса KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa Laboratory) с разрешения правообладателя. Идентификатор оригинальной карты гликолиза KEGG – map00010 [15]

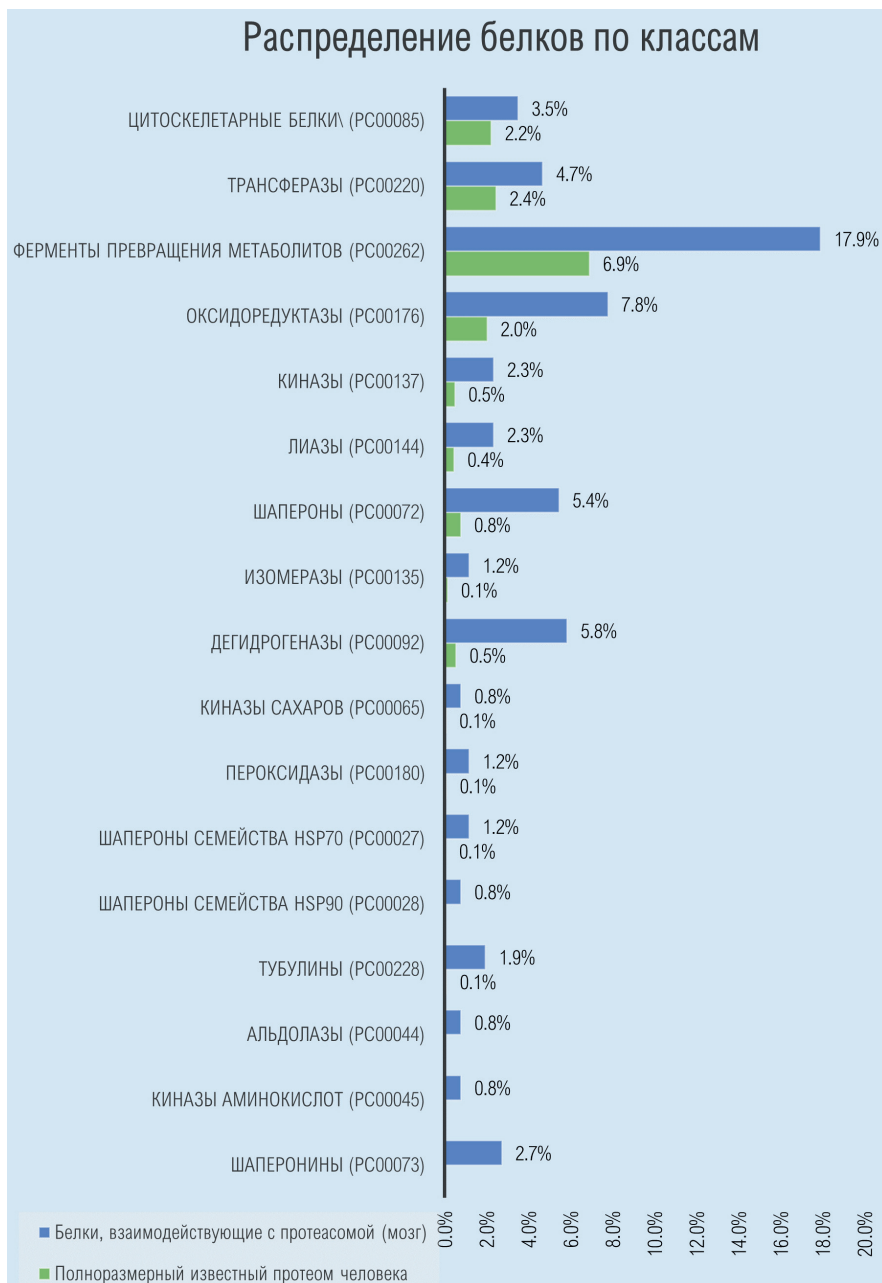


Рис. 4. Функциональные классы (Protein Classes) ассоциированных с протеасомами белков, идентифицированных в мозге кролика [76, 77] и экстраполированных на протеом человека. Белки, ассоциированные с протеасомой, подразделяются на несколько функциональных классов в соответствии с данными анализа ресурса GO Slims <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>. Синим цветом обозначен вклад белков в идентифицированном субпротеоме, ассоциированном с протеасомами, зеленым цветом отмечен вклад идентичного функционального класса в полноразмерном человеческом протеоме. Функциональные классы белков (обозначены в скобках) приведены в номенклатуре ресурса Quick GO Explore Biology

и обеспечивают реализацию нуклеотид-зависимых функций 26S- и 20S-протеасом [31, 137, 138] в клетках центральной нервной системы и периферических тканей.

Участие протеасом в патогенезе различных заболеваний центральной нервной системы и периферических тканей делают эти надмолекулярные комплексы привлекательным объектом таргетной фармакологической регуляции.

Хотя в данной области преобладает явный интерес к разработке и применению ингибиторов протеасом для лечения различных видов рака, фармакологической регуляции функциональной активности протеасом мозга также уделяется определенное внимание. Поскольку развитие нейродегенеративной патологии чаще всего связано с региоселективным снижением функциональной активности

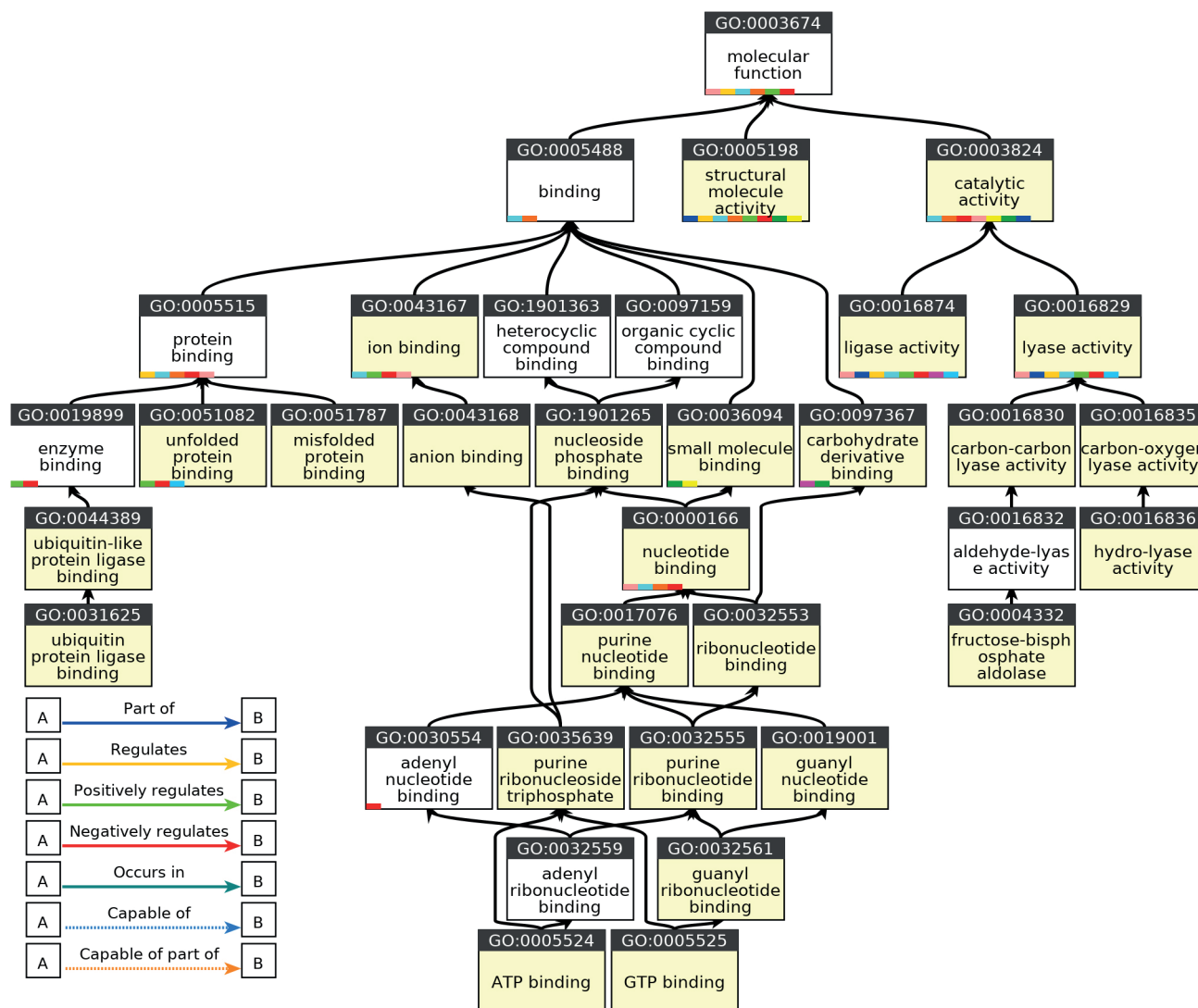


Рис. 5. Молекулярные функции белков мозга [76, 77], ассоциированных с протеасомами. Дерево распределения и взаимосвязи функциональных классов, соответствующих белкам, ассоциированным с протеасомами, реконструировано с использованием ресурса PANTHER™ Protein Class (версия 17.0, дата обновления 2022-02-22; <http://pantherdb.org/>) [136]. Анализ группировки функциональных классов выполнен с поправкой FDR < 0,001 против полноразмерного протеома человека. Желтым цветом выделены блоки классов, к которым принадлежат обнаруженные белки, ассоциированные с протеасомой; белым цветом отмечены блоки функциональных классов, отвечающих или сопряженных с функциональными активностями белков, ассоциированными с протеасомами. Идентификаторы молекулярных функций приведены в номенклатуре Gene Ontology. Цветовые индикаторы в блоках отражают направление воздействия (активности) соседних или связанных блоков

протеасом, положительный терапевтический эффект, очевидно, будут оказывать факторы, способствующие повышению активности протеасом. В качестве одного из основных подходов в настоящее время рассматривается возможность фармакологического торможения активности деубиквитиназ [109]. Блокада этих ферментов способствует поступлению убиквитинированных субстратов в протеасомы для последующей протеолитической деградации. Другой подход, предполагающий посттрансляционную модификацию субъединиц протеасомного комплекса, связан с рядом компонентов протеасомного субпротеома (PKA,

СаМКIIα и др.) [139]. В любом случае фармакологическая регуляция протеасом мозга, по-видимому, реализуется через изменение состава и/или активности белков, ассоциированных с протеасомами. Результаты исследований, проведенных на модельных объектах *in vitro* и *in vivo* [139], внушают определенный оптимизм в плане реализуемости данного подхода.

Вклад авторов. О.А. Бунеева – анализ собственных и литературных данных по теме, написание глав обзора; А.Т. Копылов – биоинформатический анализ массивов протеомных

данных, подготовка иллюстративного материала, участие в написании глав обзора по ассоциированным с протеасомами белкам; А.Е. Медведев – концепция обзора, написание отдельных глав обзора, научное редактирование.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170–5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная работа не предполагала использования людей и животных в качестве объектов исследования. Исследования авторов оригинальных работ, результаты которых обобщены в данном обзоре, были выполнены с одобрения соответствующих комитетов по этике, указанных в каждой процитированной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tanaka, K. (2009) The proteasome: overview of structure and functions, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **85**, 12–36, doi: 10.2183/pjab.85.12.
2. Schmidt, M., and Finley, D. (2014) Regulation of proteasome activity in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 13–25, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.012.
3. Goldberg, A. L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins, *Nature*, **426**, 895–899, doi: 10.1038/nature02263.
4. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761–807, doi: 10.1146/annurev.bi.61.070192.003553.
5. Driscoll, J., and Goldberg, A. L. (1990) The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4789–4792, doi: 10.1016/S0021-9258(19)34041-4.
6. Schwartz, A. L., and 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.
7. Ben-Nissan, G., and Sharon, M. (2014) Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway, *Biomolecules*, **4**, 862–884, doi: 10.3390/biom4030862.
8. Orłowski, M., and Wilk, S. (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome, *Arch. Biochem. Biophys.*, **415**, 1–5, doi: 10.1016/s0003-9861(03)00197-8.
9. Eroles, J., and Coffino, P. (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 216–221, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.05.008.
10. Sánchez-Lanzas, R., and Castaño, J. G. (2014) Proteins directly interacting with mammalian 20S proteasomal subunits and ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biomolecules*, **4**, 1140–1154, doi: 10.3390/biom4041140.
11. Бунеева О. А., Медведев А. Е. (2018) Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах, *Биомед. Хим.*, **64**, 134–148, doi: 10.18097/PBMC20186402134.
12. Uversky, V. N., Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2005) Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling, *J. Mol. Recognit.*, **18**, 343–384, doi: 10.1002/jmr.747.
13. Sharon, M., Witt, S., Felderer, K., Rockel, B., Baumeister, W., and Robinson, C. V. (2006) 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 9569–9575, doi: 10.1074/jbc.M511951200.
14. Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., and Martin, A. (2018) Structure and function of the 26S proteasome, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 697–724, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011931.
15. Kanehisa, M., Sato, Y., and Kawashima, M. (2022) KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data, *Protein Sci.*, **31**, 47–53, doi: 10.1002/pro.4172.
16. Pickering, A. M., and Davies, K. J. A. (2012) Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 alpha beta, Pa28 gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **523**, 181–190, doi: 10.1016/j.abb.2012.04.018.
17. Funderburk, K. E., Kang, J., and Li, H. J. (2022) Regulation of life & death by REGγ, *Cells*, **11**, 2281, doi: 10.3390/cells11152281.
18. Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., and García-González, V. (2015) Protein folding and mechanisms of proteostasis, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 17193–17230, doi: 10.3390/ijms160817193.
19. Fu, H., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., and Vierstra, R. D. (1998) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1, *J. Biol. Chem.*, **273**, 1970–1981, doi: 10.1074/jbc.273.4.1970.
20. Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K. J., and Groll, M. (2008) Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-

- homology domain interaction, *Nature*, **453**, 548-552, doi: 10.1038/nature06924.
21. Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D., and Dikic, I. (2008) Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor, *Nature*, **453**, 481-488, doi: 10.1038/nature06926.
 22. 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., and Walters, K. J. (2016) Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome, *Science*, **351**, 6275, doi: 10.1126/science.aad9421.
 23. Martinez-Fonts, K., Davis, C., Tomita, T., Elsasser, S., Nager, A. R., Shi, Y., Finley, D., and Matouschek, A. (2020) The proteasome 19S cap and its ubiquitin receptors provide a versatile recognition platform for substrates, *Nat. Commun.*, **11**, 477, doi: 10.1038/s41467-019-13906-8.
 24. Liu, Z., Dong, X., Yi, H. W., Yang, J., Gong, Z., Wang, Y., Liu, K., Zhang, W. P., and Tang, C. (2019) Structural basis for the recognition of K48-linked Ub chain by proteasomal receptor Rpn13, *Cell. Discov.*, **5**, 19, doi: 10.1038/s41421-019-0089-7.
 25. Kish-Trier, E., and Hill, C. P. (2013) Structural biology of the proteasome, *Annu. Rev. Biophys.*, **42**, 29-49, doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130417.
 26. Da Fonseca, P. C., and Morris, E. P., (2008) Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23305-23314, doi: 10.1074/jbc.M802716200.
 27. Sahu, I., and Glickman, M. H. (2021) Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome, *Biochem. Soc. Trans.*, **49**, 629-644, doi: 10.1042/BST20200382.
 28. Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H., and Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function, *Mol. Cell*, **10**, 495-507, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00638-x.
 29. Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle, *Nature*, **482**, 186-191, doi: 10.1038/nature10774.
 30. Guterman, A., and Glickman, M. H. (2004) Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome, *J. Biol. Chem.*, **279**, 1729-1738, doi: 10.1074/jbc.M307050200.
 31. Smith, D. M., Chang, S. C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., and Goldberg, A. L. (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry, *Mol. Cell.*, **27**, 731-744, doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.033.
 32. Gallastegui, N., and Groll, M. (2010) The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine, *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 634-642, doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.005.
 33. Kleijnen, M. F., Roelofs, J., Park, S., Hathaway, N. A., Glickman, M., King, R. W., and Finley, D. (2007) Stability of the proteasome can be regulated allosterically through engagement of its proteolytic active sites, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1180-1188, doi: 10.1038/nsmb1335.
 34. Yazgili, A. S., Ebstein, F., and Meiners, S. (2022) The proteasome activator PA200/PSME4: an emerging new player in health and disease, *Biomolecules*, **12**, 1150, doi: 10.3390/biom12081150.
 35. Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., Kaer, L. V., Monaco, J. J., and Colbert, R. A. (1998) Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits, *J. Exp. Med.*, **187**, 97-104, doi: 10.1084/jem.187.1.97.
 36. Kloetzel, P. M., and Osendorp, F. (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation, *Curr. Opin. Immunol.*, **16**, 76-81, doi: 10.1016/j.coi.2003.11.004.
 37. Johnston-Carey, H. K., Pomatto, L. C., and Davies, K. J. (2015) The immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **51**, 268-281, doi: 10.3109/10409238.2016.1172554.
 38. Ferrington, D. A., and Gregerson, D. S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **109**, 75-112, doi: 10.1016/B978-0-12-397863-9.00003-1.
 39. Wang, X., Chemmama, I. E., Yu, C., Huszagh, A., Xu, Y., Viner, R., Block, S. A., Cimermancic, P., Rychnovsky, S. D., Ye, Y., Sali, A., and Huang, L. (2017) The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **292**, 16310-16320, doi: 10.1074/jbc.M117.803619.
 40. Minis, A., Rodriguez, J. A., Levin, A., Liu, K., Govek, E. E., Hatten, M. E., and Steller, H. (2019) The proteasome regulator PI31 is required for protein homeostasis, synapse maintenance, and neuronal survival in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 24639-24650, doi: 10.1073/pnas.1911921116.
 41. Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., and Hochstrasser, M. (2017) Proteasome structure and assembly, *J. Mol. Biol.*, **429**, 3500-3524, doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.027.
 42. Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., and Ciechanover, A. (2016) The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death, *Cell Res.*, **26**, 869-885, doi: 10.1038/cr.2016.86.
 43. Rousseau, A., and Bertolotti, A. (2018) Regulation of proteasome assembly and activity in health

- and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 697-712, doi: 10.1038/s41580-018-0040-z.
44. Meul, T., Berschneider, K., Schmitt, S., Mayr, C. H., Mattner, L. F., Schiller, H. B., Yazgili, A. S., Wang, X., Lukas, C., Schlessner, C., Prehn, C., Adamski, J., Graf, E., Schwarzmayer, T., Perocchi, F., Kukat, A., Trifunovic, A., Kremer, L., Prokisch, H., Popper, B., von Toerne, C., Hauck, S. M., Zischka, H., and Meiners, S. (2020) Mitochondrial regulation of the 26S proteasome, *Cell Rep.*, **32**, 108059, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108059.
 45. Enenkel, C., Kang, R. W., Wilfling, F., and Ernst, O. P. (2022) Intracellular localization of the proteasome in response to stress conditions, *J. Biol. Chem.*, **298**, 102083, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102083.
 46. Herter, J. R., and Fuchs, S. Y. (2002) Recognition of substrate and Skp1 by the Homologue of Slimb (HOS) ubiquitin ligase receptor D role of the F-box, *Med. Sci. Monit.*, **8**, BR283-BR288.
 47. Dawson, S., Hastings, R., Takayanagi, K., Reynolds, S., Low, P., Billett, M., and Mayer, R. J. (1997) The 26S-proteasome: regulation and substrate recognition, *Mol. Biol. Rep.*, **24**, 39-44, doi: 10.1023/a:1006800522814.
 48. Devine, T., and Dai, M. S. (2013) Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 3248-3262, doi: 10.2174/1381612811319180009.
 49. de Almeida, M., Hinterdorfer, M., Brunner, H., Grishkovskaya, I., Singh, K., Schleiffer, A., Jude, J., Deswal, S., Kalis, R., Vunjak, M., Lendl, T., Imre, R., Roitinger, E., Neumann, T., Kandolf, S., Schutzbier, M., Mechtler, K., Versteeg, G. A., Haselbach, D., and Zuber, J. (2021) AKIRIN2 controls the nuclear import of proteasomes in vertebrates, *Nature*, **599**, 491-496, doi: 10.1038/s41586-021-04035-8.
 50. Uriarte, M., Sen Nkwe, N., Tremblay, R., Ahmed, O., Messmer, C., Mashtalir, N., Barbour, H., Masclef, L., Voide, M., Viillard, C., Daou, S., Abdelhadi, D., Ronato, D., Paydar, M., Darracq, A., Boulay, K., Desjardins-Lecavalier, N., Sapieha, P., Masson J.-Y., Sergeev, M., Kwok, B. H., Hulea, L., Mallette F. A., Milot, E., Larrivée, B., Wurtele, H., and Affar, E. B. (2021) Starvation-induced proteasome assemblies in the nucleus link amino acid supply to apoptosis, *Nat. Commun.*, **12**, 6984, doi: 10.1038/s41467-021-27306-4.
 51. Yasuda, S., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Guo, Q., Ikeuchi, K., Endo, A., Arai N, Ohtake, F., Murata, S., Inada, T., Baumeister, W., Fernández-Busnadiego, R., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2020) Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome, *Nature*, **578**, 296-300, doi: 10.1038/s41586-020-1982-9.
 52. Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments, *Nature*, **454**, 1088-1095, doi: 10.1038/nature07195.
 53. Gu, Z. C., Wu, E., Sailer, C., Jando, J., Styles, E., Eisenkolb, I., Kuschel, M., Bitschar, K., Wang, X., Huang, L., Vissa, A., Yip, C.M., Yedidi. R.S., Friesen, H., and Enenkel, C. (2017) Ubiquitin orchestrates proteasome dynamics between proliferation and quiescence in yeast, *Mol. Biol. Cell*, **28**, 2479-2491, doi: 10.1091/mbc.E17-03-0162.
 54. Fabunmi, R. P., Wigley, W. C., Thomas, P. J., and DeMartino, G. N. (2001) Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies, *J. Cell Sci.*, **114**, 29-36, doi: 10.1242/jcs.114.1.29.
 55. Mediani, L., Guillen-Boixet, J., Vinet, J., Franzmann, T. M., Bigi, I., Mateju, D., Carrà, A.D., Morelli, F.F., Tiago, T., Poser, I., Alberti, S., and Carra, S. (2019) Defective ribosomal products challenge nuclear function by impairing nuclear condensate dynamics and immobilizing ubiquitin, *EMBO J.*, **38**, 101341, doi: 10.15252/embj.2018101341.
 56. Ramachandran, K. V., and Margolis, S. S. (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 419-430, doi: 10.1038/nsmb.3389.
 57. Türker, F., Cook, E. K., and Margolis, S. S. (2021) The proteasome and its role in the nervous system, *Cell. Chem. Biol.*, **28**, 903-917, doi: 10.1016/j.chembiol.2021.04.003.
 58. Guo, X., Huang, X., and Chen, M. J. (2017) Reversible phosphorylation of the 26S proteasome, *Protein Cell*, **8**, 255-272, doi: 10.1007/s13238-017-0382-x.
 59. Myeku, N., Clelland, C. L., Emrani, S., Kukushkin, N. V., Yu, W. H., Goldberg, A. L., and Duff, K. E. (2016) Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling, *Nat. Med.*, **22**, 46-53, doi: 10.1038/nm.4011.
 60. VerPlank, J. J. S., Tyrkalska, S. D., Fleming, A., Rubinsztein, D. C., and Goldberg, A. L. (2020) CGMP via PKG activates 26S proteasomes and enhances degradation of proteins, including ones that cause neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 14220-14230, doi: 10.1073/pnas.2003277117.
 61. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D. B., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome, *Cell*, **115**, 715-725, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00974-7.
 62. Cho-Park, P. F., and Steller, H. (2013) Proteasome regulation by ADP-ribosylation, *Cell*, **153**, 614-627, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.040.
 63. Gomes, A. V., Zong, C., Edmondson, R. D., Li, X., Stefani, E., Zhang, J., Jones, R. C., Thyparambil, S., Wang, G. W., Qiao, X., Bardag-Gorce, F., and Ping, P. (2006) Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes, *Circ. Res.*, **99**, 362-371, doi: 10.1161/01.RES.0000237386.98506.f7.

64. Guo, X. (2022) Localized proteasomal degradation: from the nucleus to cell periphery, *Biomolecules*, **12**, 229, doi: 10.3390/biom12020229.
65. Wang, D., Fang, C., Zong, N. C., Liem, D. A., Cadeiras, M., Scruggs, S. B., Yu, H., Kim, A. K., Yang, P., Deng, M., Lu, H., and Ping, P. (2013) Regulation of acetylation restores proteolytic function of diseased myocardium in mouse and human, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 3793-3802, doi: 10.1074/mcp.M113.028332.
66. Bi, M., Du, X., Jiao, Q., Chen, X., and Jiang, H. (2021) Expanding the role of proteasome homeostasis in Parkinson's disease: beyond protein breakdown, *Cell Death Dis.*, **12**, 154, doi: 10.1038/s41419-021-03441-0.
67. Silva, G. M., Netto, L. E., Discola, K. F., Piassa-Filho, G. M., Pimenta, D. C., Bárcena, J. A., and Demasi, M. (2008) Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome, *FEBS J.*, **275**, 2942-2955, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06441.
68. Wang, X., Chen, C. F., Baker, P. R., Chen, P. L., Kaiser, P., and Huang, L. (2007) Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex, *Biochemistry*, **46**, 3553-3565, doi: 10.1021/bi061994u.
69. Tai, H. C., Besche, H., Goldberg, A. L., and Schuman, E. M. (2010) Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins, *Front. Mol. Neurosci.*, **3**, 12, doi: 10.3389/fnmol.2010.00012.
70. Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R. J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes, *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3425-3439, doi: 10.1091/mbc.11.10.3425.
71. Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P., and Huang, L. (2006) An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified *in vivo* cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network, *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 366-378, doi: 10.1074/mcp.M500303-MCP200.
72. Guerrero, C., Milenkovic, T., Przulj, N., Kaiser, P., and Huang, L. (2008) Characterization of the proteasome interaction network using a QTAX-based tag-team strategy and protein interaction network analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13333-13338, doi: 10.1073/pnas.0801870105.
73. 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**, 111-122, doi: 10.1134/S1990519X13030139.
74. Yu, C., Yang, Y., Wang, X., Guan, S., Fang, L., Liu, F., Walters, K. J., Kaiser, P., and Huang, L. (2016) Characterization of dynamic UbR-proteasome subcomplexes by *in vivo* cross-linking (X) assisted bimolecular tandem affinity purification (XBAP) and label-free quantitation, *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 2279-2292, doi: 10.1074/mcp.M116.058271.
75. Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Цимоха А. С. (2014) Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562, *Биоорг. Химия*, **40**, 720-734, doi: 10.1134/s1068162014060041.
76. Buneeva, O., Kopylov, A., Kaloshina, S., Zgoda, V., and Medvedev, A. (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.
77. Бунеева О. А., Копылов А. Т., Згода В. Г., Гнеденко О. В., Калошина 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, *Биомед. Хим.*, **68**, 18-31, doi: 10.18097/PBMC20226801018.
78. Besche, H. C., Haas, W., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2009) Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins, *Biochemistry*, **48**, 2538-2549, doi: 10.1021/bi802198q.
79. Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Binnik, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature*, **404**, 770-774, doi: 10.1038/35008096.
80. Jia, J., Arif, A., Willard, B., Smith, J. D., Stuehr, D. J., Hazen, S. L., and Fox, P. L. (2012) Protection of extraribosomal RPL13a by GAPDH and dysregulation by S-nitrosylation, *Mol. Cell*, **47**, 656-663, doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.006.
81. Lazarev, V. F., Nikotina, A. D., Mikhaylova, E. R., Nudler, E., Polonik, S. G., Guzhova, I. V., and Margulis, B. A. (2016) Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **470**, 766-771, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.076.
82. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein, *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1265-1272, doi: 10.1074/mcp.M500061-MCP200.
83. Binns, D., Dimmer, E., Huntley, R., Barrell, D., O'Donovan, C., and Apweiler, R. (2009) QuickGO: a web-based tool for gene ontology searching, *Bioinformatics*, **25**, 3045-3046, doi: 10.1093/bioinformatics/btp536.

84. Kohr, M. J., Murphy, E., and Steenbergen, C. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart, *PLoS One*, **9**, 111448, doi: 10.1371/journal.pone.0111448.
85. Qiao, G., Wu, A., Chen, X., Tian, Y., and Lin, X. (2021) Enolase 1, a moonlighting protein, as a potential target for cancer treatment, *Int. J. Biol. Sci.*, **17**, 3981-3992, doi: 10.7150/ijbs.63556.
86. Didiasova, M., Schaefer, L., and Wygrecka, M. (2019) When place matters: shuttling of enolase-1 across cellular compartments, *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 61, doi: 10.3389/fcell.2019.00061.
87. Ejiri, S. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1-21, doi: 10.1271/bbb.66.1.
88. Pirovich, D. B., Da'dara, A. A., and Skelly, P. J. (2021) Multifunctional fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a therapeutic target, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 719678, doi: 10.3389/fmolb.2021.719678.
89. Gizak, A., Wiśniewski, J., Heron, P., Mamczur, P., Sygusch, J., and Rakus, D. (2019) Targeting a moonlighting function of aldolase induces apoptosis in cancer cells, *Cell Death Dis.*, **10**, 712, doi: 10.1038/s41419-019-1968-4.
90. Conrad, M., Schneider, M., Seiler, A., and Bornkamm, G. W. (2007) Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals, *Biol Chem.*, **388**, 1019-1025, doi: 10.1515/BC.2007.130.
91. Haraguchi, C. M., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Yamada, A. T., Hoshi, K., and Yokota, S. (2003) Spatiotemporal changes of levels of a moonlighting protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, in subcellular compartments during spermatogenesis in the rat testis, *Biol. Reprod.*, **69**, 885-895, doi: 10.1095/biolreprod.102.013524.
92. Jeffery, C. J. (2018) Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **373**, 20160523, doi: 10.1098/rstb.2016.0523.
93. Brighenti, E., Carnicelli, D., Brigotti, M., and Fiume, L. (2017) The inhibition of lactate dehydrogenase A hinders the transcription of histone 2B gene independently from the block of aerobic glycolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**, 742-745, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.119.
94. Auer, J., Camoin, L., Courtot, A. M., Hotellier, F., and De Almeida, M. (2004) Evidence that P36, a human sperm acrosomal antigen involved in the fertilization process is triosephosphate isomerase, *Mol. Reprod. Dev.*, **68**, 515-523, doi: 10.1002/mrd.20107.
95. Медведев А. Е., Бунеева О. А., Копылов А. Т., Тихонова О. В., Медведева М. В., Неробкова Л. Н., Капица И. Г., Згода В. Г. (2017) Митохондриальный субпротеом Rpn10-связывающих белков мозга и его изменения, индуцированные нейротоксином МФТП и нейропротектором изатином, *Биохимия*, **82**, 470-480, doi: 10.1134/S0006297917030117.
96. Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., and Rechsteiner, M. (1994) A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates, *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059-7061.
97. Hamazaki, J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S., Tanaka, K., and Murata, S. (2007) Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6629-6638, doi: 10.1128/MCB.00509-07.
98. Buneeva, O. A., Kopylov, A. T., and Medvedev, A. E. (2020) Qualitative difference of mitochondrial subproteoms of brain RPN10- and RPN13-binding proteins, *Biomed. Khim.*, **66**, 138-144, doi: 10.18097/PBMC20206602138.
99. Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Förster, F., Danev, R., and Baumeister, W. (2015) Proteasomes. A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons, *Science*, **347**, 439-442, doi: 10.1126/science.1261197.
100. Wójcik, C., and DeMartino, G. N. (2003) Intracellular localization of proteasomes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**, 579-589, doi: 10.1016/s1357-2725(02)00380-1.
101. Otero, M. G., Alloatti, M., Cromberg, L. E., Almenar-Queralt, A., Encalada, S. E., Pozo Devoto, V. M., Bruno, L., Goldstein, L. S., and Falzone, T. L. (2014) Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function, *J. Cell Sci.*, **127**, 1537-1549, doi: 10.1242/jcs.140780.
102. Oddo, S. (2008) The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease, *J. Cell. Mol. Med.*, **12**, 363-373, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00276.x.
103. Yi, J. J., and Ehlers, M. D. (2007) Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function, *Pharmacol. Rev.*, **59**, 14-39, doi: 10.1124/pr.59.1.4.
104. Hsu, M. T., Guo, C. L., Liou, A. Y., Chang, T. Y., Ng, M. C., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., Wu, Y. L., Liao, J. C., and Cheng, P. L. (2015) Stage-dependent axon transport of proteasomes contributes to axon development, *Dev. Cell*, **35**, 418-431, doi: 10.1016/j.devcel.2015.10.018.
105. Kreko-Pierce, T., and Eaton, B. A. (2017) The *Drosophila* LC8 homolog *cut up* specifies the axonal transport of proteasomes, *J. Cell Sci.*, **130**, 3388-3398, doi: 10.1242/jcs.207027.
106. Ibañez-Vega, J., Del Valle Batalla, F., Saez, J. J., Soza, A., and Yuseff, M. I. (2019) Proteasome dependent actin remodeling facilitates antigen extraction at the immune synapse of B cells, *Front. Immunol.*, **10**, 225, doi: 10.3389/fimmu.2019.00225.
107. Bader, M., Benjamin, S., Wapinski, O. L., Smith, D. M., Goldberg, A. L., and Steller, H. (2011) A conserved F box regulatory complex controls proteasome activity in *Drosophila*, *Cell*, **145**, 371-382, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.021.
108. Liu, K., Jones, S., Minis, A., Rodriguez, J., Molina, M., and Steller, H. (2019) PI31 is an adaptor protein

- for proteasome transport in axons and required for synaptic development, *Dev. Cell*, **50**, 509-524, doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.009.
109. Buneeva, O., and Medvedev, A. (2022) Atypical ubiquitination and Parkinson's disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3705, doi: 10.3390/ijms23073705.
 110. Gorbea, C., Pratt, G., Ustrell, V., Bell, R., Sahasrabudhe, S., Hughes, R. E., and Rechsteiner, M. (2010) A protein interaction network for Ecm29 links the 26 S proteasome to molecular motors and endosomal components, *J. Biol. Chem.*, **285**, 31616-31633, doi: 10.1074/jbc.M110.154120.
 111. Zhao, J., Fok, A. H. K., Fan, R., Kwan, P.Y., Chan, H. L., Lo, L. H., Chan, Y. S., Yung, W. H., Huang, J., Lai, C. S. W., and Lai, K. O. (2020) Specific depletion of the motor protein KIF5B leads to deficits in dendritic transport, synaptic plasticity and memory, *eLife*, **9**, e53456, doi: 10.7554/eLife.53456.
 112. Kundrat, L., and Regan, L. (2010) Balance between folding and degradation for Hsp90-dependent client proteins: a key role forCHIP, *Biochemistry*, **49**, 7428-7438, doi: 10.1021/bi100386w.
 113. Luders, J., Demand, J., and Hohfeld, J. (2000) The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome, *J. Biol. Chem.*, **275**, 4613-4617, doi: 10.1074/jbc.275.7.4613.
 114. Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein, *EMBO Rep.*, **2**, 1133-1138, doi: 10.1093/embo-reports/kve246.
 115. Reeg, S., Jung, T., Castro, J. P., Davies, K. J. A., Henze, A., and Grune, T. (2016) The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome, *Free Radic. Biol. Med.*, **99**, 153-166, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.002.
 116. Davies, K. J. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome, *Biochimie*, **83**, 301-310, doi: 10.1016/s0300-9084(01)01250-0.
 117. Reinhecke, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J., and Grune, T. (1998) Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *Biochem. J.*, **335**, 637-642, doi: 10.1042/bj3350637.
 118. Reinheckel, T., Ullrich, O., Sitte, N., and Grune, T. (2000) Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.*, **377**, 65-68, doi: 10.1006/abbi.2000.1717.
 119. Conconi, M., Petropoulos, I., Emod, I., Turlin, E., Biville, F., and Friguet, B. (1998) Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90, *Biochem. J.*, **333**, 407-415, doi: 10.1042/bj3330407.
 120. Whittier, J. E., Xiong, Y., Rechsteiner, M. C., and Squier, T. C. (2004) Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome, *J. Biol. Chem.*, **279**, 46135-46142, doi: 10.1074/jbc.M406048200.
 121. Bingol, B., Wang, C. F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., and Sheng, M. (2010) Autophosphorylated CaMKII α acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines, *Cell*, **140**, 567-578, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.024.
 122. Djakovic, S. N., Marquez-Lona, E. M., Jakawich, S. K., Wright, R., Chu, C., Sutton, M. A., and Patrick, G. N. (2012) Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, **32**, 5126-5131, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4427-11.2012.
 123. Hamilton, A. M., Oh, W. C., Vega-Ramirez, H., Stein, I. S., Hell, J. W., Patrick, G. N., and Zito, K. (2012) Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome, *Neuron*, **74**, 1023-1030, doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.031.
 124. Jarome, T. J., Kwapis, J. L., Ruenzel, W. L., and Helmstetter, F. J. (2013) CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories, *Front. Behav. Neurosci.*, **7**, 115, doi: 10.3389/fnbeh.2013.00115.
 125. Jarome, T. J., Ferrara, N. C., Kwapis, J. L., and Helmstetter, F. J. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **128**, 103-109, doi: 10.1016/j.nlm.2016.01.001.
 126. Feng, Y., Longo, D. L., and Ferris, D. K. (2001) Polo-like kinase interacts with proteasomes and regulates their activity, *Cell Growth Differ.*, **12**, 29-37.
 127. Metselaar, D. S., du Chatinier, A., Meel, M. H., Ter Huizen, G., Waranecki, P., Goulding, J. R., Bugiani, M., Koster, J., Kaspers, G. J. L., and Hulleman, E. (2022) AURKA and PLK1 inhibition selectively and synergistically block cell cycle progression in diffuse midline glioma, *iScience*, **25**, 104398, doi: 10.1016/j.isci.2022.104398.
 128. Colbran, R. J., and Brown, A. M. (2004) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **14**, 318-327, doi: 10.1016/j.conb.2004.05.008.
 129. Tarcsa, E., Szymanska, G., Lecker, S., O'Connor, C. M., and Goldberg, A. L. (2000) Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by *in vitro* aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination, *J. Biol. Chem.*, **275**, 20295-20301, doi: 10.1074/jbc.M001555200.
 130. Kito, Y., Matsumoto, M., Hatano, A., Takami, T., Oshikawa, K., Matsumoto, A., and Nakayama, K. I. (2020) Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin, *Sci. Rep.*, **10**, 5801, doi: 10.1038/s41598-020-62697-2.
 131. Beckelman, B. C., Day, S., Zhou, X., Donohue, M., Gouras, G. K., Klann, E., Keene, C. D., and Ma, T. (2016) Dysregulation of elongation factor 1A

- expression is correlated with synaptic plasticity impairments in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **54**, 669-678, doi: 10.3233/JAD-160036.
132. Chuang, S. M., Chen, L., Lambertson, D., Anand, M., Kinzy, T. G., and Madura, K. (2005) Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 403-413, doi: 10.1128/MCB.25.1.403-413.2005.
 133. Beckelman, B. C., Zhou, X., Keene, C. D., and Ma, T. (2016) Impaired eukaryotic elongation factor 1A expression in Alzheimer's disease, *Neurodegener. Dis.*, **16**, 39-43, doi: 10.1159/000438925.
 134. Olshina, M. A., Arkind, G., Deshmukh, F. K., Fainer, I., Taranavsky, M., Hayat, D., Ben-Dor, S., Ben-Nissan, G., and Sharon, M. (2020) Regulation of the 20S proteasome by a novel family of inhibitory proteins, *Antioxid. Redox Signal.*, **32**, 636-655, doi: 10.1089/ars.2019.7816.
 135. Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H. S., Kaufer, D., and Brooks, G. A. (2008) Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles, *PLoS One*, **3**, e2915, doi: 10.1371/journal.pone.0002915.
 136. Thomas, P.D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L.P., and Mi, H. (2022) PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all, *Protein Sci.*, **31**, 8-22, doi: 10.1002/pro.4218.
 137. Rabl, J., Smith, D. M., Yu, Y., Chang, S. C., Goldberg, A. L., and Cheng, Y. (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases, *Mol Cell*, **30**, 360-368, doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.004.
 138. Smith, D. M., Fraga, H., Reis, C., Kafri, G., and Goldberg, A. L. (2011) ATP binds to proteasomal ATPases in pairs with distinct functional effects, implying an ordered reaction cycle, *Cell*, **144**, 526-538, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.005.
 139. Myeku, N., and Duff K. E. (2018) Targeting the 26S proteasome to protect against proteotoxic diseases, *Trends Mol. Med.*, **24**, 18-29, doi: 10.1016/j.molmed.2017.11.006.

THE PROTEASOME INTERACTOME AND ITS ROLE IN THE MECHANISMS OF BRAIN PLASTICITY

Review

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

Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; E-mail: professor57@yandex.ru

Proteasomes are highly conserved multienzyme complexes responsible for the proteolytic degradation of short-lived, regulatory, misfolded, and damaged proteins. They play an important role in the processes of brain plasticity, and the decrease in their function is accompanied by the development of neurodegenerative pathology. Studies performed in different laboratories both on cultured mammalian and human cells and on preparations of the rat and rabbit brain cortex revealed a large number of proteasome-associated proteins. Since the identified proteins belong to certain metabolic pathways, multiple enrichment of the proteasome fraction with these proteins indicates their important role the proteasome functioning. Extrapolation of the experimental data, obtained on various biological objects, to the human brain, suggests that proteasome-associated proteins account for at least 28% of the human brain proteome. The proteasome interactome of the brain contains a large number of proteins involved in the assembly of these supramolecular complexes, regulation of their functioning, and intracellular localization, which can be changed at different conditions (for example, during oxidative stress) or in different phases of the cell cycle. In the context of the molecular functions of the Gene Ontology (GO) Pathways, the proteins of the proteasome interactome mediate cross-talk between components of more than 30 metabolic pathways annotated in terms of GO. The main result of these interactions is the binding of adenine and guanine nucleotides, crucial for realization of the nucleotide-dependent functions of the 26S and 20S proteasomes. Since the development of neurodegenerative pathology is often associated with a regioselective decrease in the functional activity of proteasomes, a positive therapeutic effect will obviously be provided by factors increasing the proteasomal activity. In any case, the pharmacological regulation of brain proteasomes seems to be realized through changes in the composition and/or activity of proteins associated with proteasomes (deubiquitinase, PKA, CaMKII α , etc.).

Keywords: proteasomes, brain, 20S subunit, 19S subunit, subcellular localization and functions, proteasome-associated proteins, proteasome proteome and interactome