

©Коллектив авторов

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА У КРЫС С ИНДУЦИРОВАННЫМ РОТЕНОНОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ

О.А. Бунеева^{1}, И.Г. Капица^{1,2}, Л.Ш. Казиева¹, Н.Э. Вавилов¹, В.Г. Згода¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10, *эл. почта: olbuneeva@gmail.ru

²НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

Изатин (2,3-диоксоиндол) — эндогенный регулятор, обнаруженный в организме человека и животных и обладающий широким спектром биологической активности, опосредованным большим количеством изатин-связывающих белков. Он проявляет нейропротекторное действие в ряде экспериментальных моделей заболеваний, включая паркинсонизм, индуцированный нейротоксином МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином). Ротенон — нейротоксин, используемый для моделирования у грызунов болезни Паркинсона, — вызывает существенное изменение профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс. Сравнительная протеомная идентификация белков мозга контрольных крыс и крыс с ротенон-индуцированным паркинсоническим синдромом (ПС) выявила значимые количественные изменения 86-ти белков под воздействием ротенона. В основном нейротоксин вызывал увеличение количества белков, участвующих в передаче сигнала и регуляции активности ферментов (24), белков цитоскелета и экзоцитоза (23), а также ферментов, участвующих в процессах генерации энергии и углеводного обмена (19). Из этих белков всего 11 относилось к изатин-связывающим белкам; из них отмечено увеличение уровня у 8 белков, снижение — у 3. Это позволяет предположить, что радикальное изменение профиля изатин-связывающих белков, обнаруженное при развитии ротенон-индуцированного ПС, связано с изменением состояния существующих молекул белков и в меньшей степени с изменением экспрессии кодирующих их генов.

Ключевые слова: паркинсонизм; нейродегенерация; нейротоксин ротенон; мозг; изатин; изатин-связывающие белки; протеомное профилирование

DOI: 10.18097/PBMC20236903188

ВВЕДЕНИЕ

Нейротоксин ротенон широко используется при моделировании паркинсонического синдрома (ПС) на клеточных моделях и у грызунов. Курсовое введение этого вещества вызывает классические признаки болезни Паркинсона: дегенерацию дофаминергических нейронов, накопление альфа-синуклеина, митохондриальную дисфункцию и нарушения работы убиквитин-протеасомной системы [1–3].

В наших опытах введение ротенона крысам в течение 7 дней приводило к развитию тяжёлого ПС [4]. У животных отмечена значимая потеря веса, олигокинезия, ригидность и постуральная неустойчивость, а также в ряде случаев и гибель животных. Протеомный анализ препаратов мозга животных с ротеноновым ПС выявил изменение профиля изатин-связывающих белков мозга [4].

Изатин (2,3-диоксоиндол) — эндогенный регулятор, содержание которого в организме изменяется при окислительном стрессе и при ряде патологических состояний, включая болезнь Паркинсона [5, 6]. Биологические эффекты изатина опосредуются путём воздействия на изатин-чувствительные гены [7] и взаимодействие с многочисленными изатин-связывающими белками. Введение изатина оказывает нейропротекторные свойства в различных экспериментальных моделях нейродегенерации [6, 8]. В экспериментах на мышцах с ПС, индуцированным

нейротоксином МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином), предварительное введение изатина снижало выраженность двигательных нарушений, свойственных данному патологическому состоянию, и влияло на профиль изатин-связывающих белков [9–12].

Изменение профиля белков, связывающихся с аффинным лигандом, может отражать как изменения (увеличение или снижение) уровня белков в исследуемом объекте, так и изменение свойств уже существующих белков. В связи с этим целью данной работы было исследование количественных изменений изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеноном экспериментальным паркинсонизмом.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: Трис (гидроксиметил)аминометан, гидрокарбонат аммония, дитиотреитол, мочевины, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Merck”, США); муравьиную кислоту, едкий натр (“Acros Organics”, США), ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); изопропанол, трифторуксусную кислоту (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (“Pierce”, США);

модифицированный трипсин (mass spectrometry grade, “Promega”, США). Остальные реактивы были отечественного производства максимально доступной чистоты.

Экспериментальные животные

Исследование выполнено на аутбредных белых крысах, полученных из питомника “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при двенадцатичасовом световом режиме.

Моделирование экспериментального паркинсонизма у крыс

Моделирование ПС с помощью системного введения ротенона проводилось согласно руководству [13], путём ежедневного 7-дневного внутрибрюшинного введения крысам раствора ротенона в нейтральном триглицериде миглиоле (Miglyol 840), в дозе 2,75 мг/кг. Раствор ротенона готовили, как описано ранее [4]. Контрольные животные получали ежедневно физиологический раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объёме 0,2 мл на 100 г веса тела животного.

Получение лизатов гомогенатов мозга осуществляли, как описано в [4]. Для оценки количественных изменений белков при подготовке проб использовали одинаковое количество общего белка, которое контролировали с помощью метода Бредфорда [14]. Белки экстрагировали смесью хлороформ-метанол [15], осадок белков растворяли в 8 М мочеvine, содержащей 20 мМ дитиотреитол и 100 мМ Трис-НСI (рН 8,5) и подвергали алкилированию и последующему трипсинолизу непосредственно на центрифужных мембранных фильтрах Vivaspin 500 (“Sartorius Stedim Biotech”, Германия) с мембраной на 10000 Да, как описано ранее [4]. Реакцию останавливали муравьиной кислотой (конечная концентрация 0,1%). Пробы выпаривали при помощи вакуумного концентратора 5301 (“Eppendorf”, Германия),

растворяли в 0,1% муравьиной кислоте и анализировали с использованием оборудования центра коллективного пользования “Протеом человека” (ИБМХ).

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США) в нанопотоковом режиме масс-спектрометрического детектора Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”). Хроматографическое разделение пептидов проводили на аналитической колонке с обращённой фазой Peaky C18 (100 мкм × 300 мм, 1,7 мкм размер частиц, “Молекта”, Россия) в линейном градиенте элюции подвижной фазы А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазы Б (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) от 2 до 45% при скорости потока 0,3 мкл/мин в течение 60 мин, с промывкой системы 99% Б в течение 5 мин, с последующим уравниванием хроматографической системы в начальных условиях градиента (А:Б = 2:98) в течение 5 мин.

Условия масс-спектрометрического анализа и биоинформатической обработки данных подробно приведены в [4]. Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован, по меньшей мере, в трёх независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная протеомная идентификация белков мозга контрольных крыс и крыс с ротенон-индуцированным ПС показала, что под воздействием ротенона значимо меняется относительное содержание 86-ти белков (табл. 1, дополнительные материалы). Почти четверть часть из них (19) относится к митохондриальным белкам, преимущественно к компонентам цитохром с-оксидазного комплекса и потенциал-зависимых ионных каналов (табл. 1, дополнительные материалы). При этом среди белков, уровень которых возрастал при развитии ПС,

Таблица 1. Распределение белков мозга, количественно меняющихся в динамике развития индуцированного ротенонем ПС, по функциям

Функция	Всего белков	Количество белков после воздействия ротенона	
		↑	↓
Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена	19	17	2
Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе	23	17	6
Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов	24	17	7
Антиоксидантные и защитные белки/ферменты	7	4	3
Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки	7	4	3
Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений	2	2	0
Ферменты, участвующие в метаболизме липидов	4	4	0
Всего	86	65	21

Примечание: знак “↑” показывает увеличение количества белка, а знак “↓” – уменьшение.

ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ

Таблица 2. Изатин-связывающие белки мозга крыс, относительное содержание которых значительно меняется при введении животным ротенона (по сравнению с контролем)

№	№ по базе данных Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Отличие от контроля при введении ротенона	
					-Log(P-значение)	Разность
1	P04797	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	2,4	0,7
2	P07943	<i>Akr1b1</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B1	7	3,4	1,0
3	P19527	<i>Nefl</i>	Neurofilament light polypeptide	2	3,1	-0,8
4	P38983	<i>Rpsa</i>	40S ribosomal protein SA	5	4,0	1,5
5	P62744	<i>Ap2s1</i>	AP-2 complex subunit sigma	2	3,4	1,3
6	P62815	<i>Atp6v1b2</i>	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	2	4,4	0,8
7	Q63198	<i>Cntn1</i>	Contactin-1	3	3,0	1,9
8	Q6P0K8	<i>Jup</i>	Junction plakoglobin	2	3,0	3,4
9	A0A8I6A1Y1	<i>Ogdh</i>	Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	1	3,4	-0,5
10	A0A8I6A304	<i>Baspl</i>	Brain abundant, membrane attached signal protein 1	3	5,1	4,2
11	A0A8I6A7U6	<i>Sfpq</i>	Splicing factor proline and glutamine rich	5	4,9	-1,5

Примечание. Цифры в колонке “функции” обозначают следующие функциональные группы белков: 1. Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена. 2. Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе. 3. Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов. 4. Антиоксидантные и защитные белки/ферменты. 5. Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. 6. Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений. 7. Ферменты, участвующие в метаболизме липидов

был обнаружен альфа-синуклеин и ряд других белков, ассоциированных с нейродегенеративной патологией (дополнительные материалы).

Анализ функциональных групп белков, уровень которых изменился при моделировании ПС, показал, что действие нейротоксина в основном затрагивает: (а) белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов (24); (б) белки цитоскелета и экзоцитоза (23); (в) ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена (19) (табл. 1). При этом в большинстве случаев количество белков после воздействия нейротоксина увеличивается. То же самое можно сказать и о белках других функциональных групп (табл. 1).

Введение ротенона приводило к изменению уровня всего 11 изатин-связывающих белков мозга: увеличение уровня отмечено у 8 белков, снижение — у 3 (табл. 2). Это свидетельствует о том, что изменения профиля изатин-связывающих белков (69 изатин-связывающих белков мозга, не характерных для контрольных животных, было выявлено у крыс с ПС), обнаруженное при развитии ротенон-индуцированного ПС [4], очевидно, определяются изменением состояния существующих молекул белков и в меньшей степени измененной экспрессией кодирующих их генов. В пользу этого предположения может также свидетельствовать тот факт, что моделирование окислительного стресса *in vitro* оказывало существенное влияние на взаимодействие ГАФД с лигандом изатином [16].

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 23-25-00066).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным, в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Greenamyre J.T., Betarbet R., Sherer T.B. (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat. Disord., Suppl* **2**, S59-S64. DOI: 10.1016/s1353-8020(03)00023-3
2. Betarbet R., Canet-Aviles R.M., Sherer T.B., Mastroberardino P.G., McLendon C., Kim J.H., Lund S., Na H.M., Taylor G., Bence N.F., Kopito R., Seo B.B., Yagi T., Yagi A., Klinefelter G., Cookson M.R., Greenamyre J.T. (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: Effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol. Dis.*, **22**(2), 404-420. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.12.003
3. de Miranda B.R., Rocha E.M., Bai Q., El Ayadi A., Hinkle D., Burton E.A., Greenamyre J.T. (2018) Astrocyte-specific DJ-1 overexpression protects against rotenone-induced neurotoxicity in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, **115**, 101-114. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.04.008
4. Капица И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Копылов А.Т., Медведев А.Е., Бунеева О.А. (2023) Особенности поведенческих реакций и профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным rotenone-экспериментальным паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **69**(1), 46-54. [Kapitsa I.G., Kazieva L.S., Vavilov N.E., Zgoda V.G., Kopylov A.T., Medvedev A.E., Buneeva O.A. (2023) Characteristics of behavioral reactions and the profile of brain isatin-binding proteins of rats with the rotenone-induced experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(1), 46-54.] DOI: 10.18097/PBMC20236901046
5. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) Isatin: Role in stress and anxiety. *Stress*, **8**(3), 175-183. DOI: 10.1080/10253890500342321
6. Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A. (2018) Isatin, an endogenous non-peptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions and their biomedical implications. *Biofactors*, **44**, 95-108. DOI: 10.1002/biof.1408
7. Medvedev A., Kopylov A., Buneeva O., Kurbatov L., Tikhonova O., Ivanov A., Zgoda V. (2020) A 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
8. Medvedev A., Buneeva O. (2022) Tryptophan metabolites as mediators of microbiota-gut-brain communication: Focus on isatin. *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 922274. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.922274.
9. 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. [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
10. Buneeva 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
11. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2017) Влияние нейротоксина МФТП на протеомный профиль изатин-связывающих белков мозга мышей. *Биомедицинская химия*, **63**(4), 316-320. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Nerobkova L.N., Kapitsa I.G., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2017) The effect of neurotoxin MPTP administration to mice on the proteomic profile of brain isatin-binding proteins. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(4), 316-320.] DOI: 10.18097/PBMC20176304316
12. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2018) Влияния введения депренила и изатина мышам на профиль изатин-связывающих белков печени. *Биомедицинская химия*, **64**(4), 354-359. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2018) The effect of deprenyl and isatin administration to mice on the proteomic profile of liver isatin-binding proteins. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **64**(4), 354-359.] DOI: 10.18097/PBMC20186404354
13. Воронина Т.А., Середенин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В. (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая (Миронов А.Н., ред.), Гриф и К, Москва, 994 с. [Voronina T.A., Seredenin S.B., Yarkova M.A., Voronin M.V. (2012) Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv, chast' pervaya (Mironov A.N. ed.), Grif i K, Moskva, 994 p.]
14. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
15. Walker J.M. (ed.) (2002) *The Protein Protocol Handbook*, Humana Press Inc., Totowa, N.Y.
16. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2016) Влияние окислительной модификации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на взаимодействие с эндогенным нейропротектором изатином. *Биомедицинская химия*, **62**(2), 160-163. [Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2016) Oxidative modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase influences its interaction with endogenous neuroprotector isatin. *Biomeditsinskaya Khimiya* **62**(2), 160-163.] DOI: 10.18097/PBMC20166202160

Поступила в редакцию: 20. 05. 2023.
После доработки: 14. 06. 2023.
Принята к печати: 15. 06. 2023.

QUANTITATIVE CHANGES OF BRAIN ISATIN-BINDING PROTEINS OF RATS
WITH THE ROTENONE-INDUCED EXPERIMENTAL PARKINSONISM

O.A. Buneeva^{1*}, I.G. Kapitsa^{1,2}, L.Sh. Kazieva¹, N.E. Vavilov¹, V.G. Zgoda¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com
²Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

Isatin (indoldione-2,3) is an endogenous regulator found in humans and animals. It exhibits a broad range of biological activity mediated by numerous isatin-binding proteins. Isatin produces neuroprotective effects in several experimental models of diseases, including Parkinsonism induced by the neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Rotenone (a neurotoxin used to modeling Parkinson's disease in rodents) causes significant changes in the profile of isatin-binding proteins of rat brain. Comparative proteomic identification of brain proteins of control rats and the rats with the rotenone-induced Parkinsonian syndrome (PS) revealed significant quantitative changes of 86 proteins under the influence of rotenone. This neurotoxin mainly caused the increase of the quantity of proteins involved in signal transduction and regulation of enzyme activity (24), proteins involved in cytoskeleton formation and exocytosis (23), and enzymes involved in energy generation and carbohydrate metabolism (19). However, only 11 of these proteins referred to isatin-binding proteins; the content of eight of them increased while the content of three proteins decreased. This suggests that the dramatic change of the profile of isatin-binding proteins, found in the development of the rotenone-induced PS, comes from changes in the state of the pre-existing molecules of proteins, rather than altered expression of corresponding genes.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: Parkinsonism; neurodegeneration; neurotoxin rotenone; brain; isatin; isatin-binding proteins; proteomic profiling

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00066).

Received: 20.05.2023; revised: 14.06.2023; accepted: 15.06.2023.