Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 4, с. 316-320.

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТОКСИНА МФТП НА ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА МЫШЕЙ

О.А. Бунеева[1], А.Т. Копылов[1], Л.Н. Неробкова[2], И.Г. Капица[2], В.Г. Згода[1], А.Е. Медведев[1]*

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Погодинская ул., 10, эл. почта: professor57@yandex.ru
[2]Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова,
125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный индол, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих. Он оказывает нейропротекторное действие, снижая выраженность двигательных нарушений у животных при моделировании болезни Паркинсона. Проявляя широкий спектр биологической активности, изатин взаимодействует с многочисленными изатин-связывающими белками. Целью данного исследования было изучить профиль изатин-связывающих белков мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом на высоте развития двигательных нарушений (через 90 мин) и через семь дней после введения этого нейротоксина. Однократное введение МФТП (30 мг/кг, в/бр.) приводило к развитию двигательных расстройств в тесте “открытое поле”; через семь дней после введения МФТП двигательная активность животных улучшалась, но уровня контрольных животных не достигала. В ходе пяти независимых экспериментов по протеомному профилированию изатин-связывающих белков мозга контрольных животных было идентифицировано 96±12 белков. На высоте двигательных нарушений, вызванных введением МФТП, число изатин-связывающих белков существенно снизилось (63±6; n=5; $p<0,01$). Через семь дней после введения МФТП общее число изатин-связывающих белков увеличилось, достигнув уровня контроля (132±34; n=4). Профили изатин-связывающих белков были специфичны для каждой группы мышей: в контроле эти белки (которые не были обнаружены ни на высоте двигательных нарушений, ни через неделю после введения МФТП) составили более 70% от общего числа идентифицированных белков. Для мышей, получавших инъекцию МФТП, на высоте двигательных нарушений этот показатель составил около 60%, а через семь дней после введения МФТП >82%. Основные изменения обнаружены в группах изатин-связывающих белков, участвующих в образовании цитоскелета и экзоцитозе, белков, регулирующих процессы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки, а также белков, вовлеченных в сигнальную трансдукцию.

Ключевые слова: МФТП-индуцированный паркинсонизм, изатин, изатин-связывающие белки, мозг, протеомное профилирование

DOI: 10.18097/PBMC20176304316

ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный индол, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих [1-5]. Повышение его уровня в организме экспериментальных животных обнаружено при моделировании различных видов стресса [2, 4], а также в моче пациентов с поздними стадиями болезни Паркинсона (III-V по классификации Хен-Яра) [6]. Проявляя широкий спектр биологической активности, изатин взаимодействует с многочисленными изатин-связывающими белками, многие из которых были идентифицированы в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей и крыс [7-9]. При этом ряд обнаруженных изатин-связывающих белков играет важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний [8].

В настоящее время есть веские экспериментальные доказательства того, что изатин оказывает нейропротекторное действие, снижая выраженность двигательных нарушений у животных при моделировании болезни Паркинсона. У крыс с экспериментальным паркинсонизмом, индуцированным нейротоксином 6-гидроксидофамином (6-OHDA), введение изатина (100 мг/кг) тормозило вызванные апоморфином круговые движения животных [10]. Введение аналогичной дозы изатина крысам с паркинсонизмом, индуцированным вирусом японского энцефалита [11-12], а также мышам с паркинсонизмом, индуцированным однократной инъекцией нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) [13], снижало выраженность двигательных нарушений, свойственных этому заболеванию.

В контексте модели МФТП-индуцированного паркинсонизма следует отметить, что при однократном введении этого нейротоксина снижение двигательной активности животных обычно наблюдается в течение первых четырех дней с момента его введения [14]. В связи с этим важно проследить изменения изучаемых параметров, как минимум, в течение недели после введения МФТП.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучить профиль изатин-связывающих белков мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом на высоте развития двигательных нарушений (через 90 мин) и через семь дней после введения этого нейротоксина.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (вес 20-25 г) из питомника "Столбовая" (Московская область), прошедших однонедельный карантин после прибытия. Животных содержали при естественном световом режиме, постоянном доступе к питьевой воде и корму (полный рацион экструдированного брикетированного корма, ГОСТ Р 50258-92). МФТП вводили внутрибрюшинно (в/бр) в дозе 30 мг/кг. Контрольные животные получали физиологический раствор (в/бр) в расчёте 0,1 мл на 10 г веса. Каждая группа включала не менее 8-12 мышей. Изменения поведенческих реакций, вызванных введением МФТП, анализировали в тесте открытого поля через 90 мин и через семь дней после введения этого нейротоксина [15]. Ориентировочно-исследовательскую реакцию в тесте открытого поля определяли по сумме показателей горизонтальной и вертикальной активностей, выраженной в условных единицах (у.е.). Все процедуры одобрены соответствующими комитетами по проведению исследований на животных.

После исследования поведенческих реакций животных декапитировали, головной мозг измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Ultra-Turrax T 10 при 10 000 об/мин в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4, до получения 30% гомогената (масса/объём). Получение мембранной и растворимой фракций гомогената мозга мыши и их последующую обработку для осуществления этапа аффинной хроматографии проводили в соответствии с разработанной ранее методикой [8].

В экспериментах использовали бромциан-активированную сефарозу 4B, дитиотреитол, йодацетамид, трипсин, Tris(гидроксиметил)аминометан, гуанидин гидрохлорид, гидрокарбонат аммония, натрий хлористый, Triton X-100, ацетонитрил, кумасси бриллиантовый синий G-250 фирмы "Sigma-Aldrich" (США); ацетат натрия, борную кислоту, муравьиную кислоту, тетраборат натрия, едкий натр – "Acros Organics" (США). Синтез 5-аминоизатина был описан ранее [16].

Ковалентное связывание 5-аминоизатина с бромциан-активированной сефарозой 4B осуществляли согласно стандартной методике. Количество иммобилизованного аналога изатина, оцениваемое по определяемому нами числу функциональных групп бромциан-активированной сефарозы, составляло ~ 0,2 мкмоль/мл в суспензии 1 : 1 (объём/объём).

Для определения неспецифически связывающихся с аффинным сорбентом белков использовали контрольную бромциан-активированную сефарозу, которую подвергали тем же процедурам, что и 5-аминоизатинсефарозу, но без добавления аффинных лигандов.

Аффинную хроматографию на 5-аминоизатин-сефарозе для последующего масс-спектрометрического анализа проводили так же, как описано ранее [9, 10]. В каждом протеомном эксперименте использовали суммарные препараты, полученные в ходе аффинного обогащения растворимой и мембранной фракций гомогенатов мозга не менее 2 мышей.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием интегрированной чиповой колоночной системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Infinity 1290 ("Agilent", США) в микропотоковом режиме. Хроматографическое разделение пептидов проводили на аналитической колонке с обращённой фазой (Zorbax RRHD, "Agilent", длина колонки 100 мм, диаметр 2,1 мм, размер частиц 2,8 мкм) в линейном градиенте элюции подвижной фазы А (0,1%-ый водный раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазы Б (80%-ый ацетонитрил, 0,1%-ая муравьиная кислота) от 2% до 60% при скорости потока 0,3 мл/мин в течение 60 мин с последующим уравновешиванием хроматографической системы в начальных условиях градиента (А : Б = 2 : 98) в течение 5 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на квадрупольном времяпролётном масс-спектрометре Agilent 6550 ("Agilent") в режиме положительной ионизации. Сканирование тандемных спектров осуществляли в режиме автоматической селекции пяти доминантных пиков прекурсорных ионов, зарегистрированных при m/z = 400–1300. Напряжение на входе капилляра составляло 3900 В, скорость потока осушающего газа (азот) – 14 л/мин, температура осушающего газа – 280°C, скорость потока фокусирующего газа 11 л/мин, температура фокусирующего газа – 320°C. Время одного полного цикла сканирования не более 1,079 с. Отбирали 4 сигнала наиболее интенсивных ионов с последующим тандемным сканированием не более 10 спектров фрагментации. Для снижения избыточного сигнала использовали режим активного исключения прекурсорных пиков после трёх регистраций в течение не более 20 с.

Анализ масс-спектрометрических данных с последующей идентификацией белков проводили с использованием пакетного программного обеспечения Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev B.04.01.141 ("Agilent"). Белки идентифицировали сравнительным анализом экспериментально зарегистрированного масс-спектрометрического сигнала с базой данных белков мыши (*Mus musculus*) Swiss Prot/Uniprot. Для экстракции сигнала и его последующей обработки использовали следующие параметры: фермент протеолитического расщепления – трипсин; максимально допустимое количество внутрипептидных лизинов или аргининов не более 1; допустимая погрешность измерения моноизотопной массы пептида ±0,01 Да, допустимая погрешность измерения фрагментного иона ±0,05 Да. В качестве фиксированной химической модификации выбирали карбамидометилирование аминокислотных остатков цистеина, в качестве лабильной модификации – окисление метионина. Сигнал считали истинно-положительным и белок идентифицированным в случае идентификации как минимум двух протеотипических пептидов, принадлежащих к одному белку, с индексом достоверности для каждого пептида более 7,0,

а для всего белка не менее 13 [15]. Ложно-позитивный сигнал проверяли через δ-коэффициент достоверности при поиске экспериментальных данных против базы данных случайно сгенерированных пептидных последовательностей. Для истинно-позитивного сигнала δ-коэффициент должен превышать 2,0.

Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован, по меньшей мере, в трёх независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В соответствии с результатами предыдущего исследования [13], однократное введение МФТП (30 мг/кг, в/бр.) приводило к развитию двигательных расстройств в тесте “открытое поле”, характерных для экспериментального моделирования паркинсонизма (табл. 1). Проведение повторного теста “открытое поле” через семь дней после введения МФТП показало улучшение двигательной активности животных, которая, тем не менее, не достигала уровня контрольных животных (табл. 1).

Развитие двигательных нарушений, характерных для МФТП-индуцированного паркинсонизма, сопровождалось значительными изменениями числа изатин-связывающих белков мозга (табл. 2).

В ходе масс-спектрометрического определения изатин-связывающих белков мозга контрольных животных было идентифицировано не менее 118 индивидуальных белков (табл. 2), представляющих следующие функциональные группы: (1) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (2) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (3) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (4) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов; (5) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (6) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (7) ферменты липидного обмена.

На высоте двигательных нарушений, вызванных введением МФТП, число изатин-связывающих белков существенно снизилось во всех группах (табл. 2). По данным четырёх независимых экспериментов, до 63±6 против 96±12 у контрольных животных (M±SD; $p<0,01$). При этом наибольший вклад в уменьшение общего числа изатин-связывающих белков внесли представители функциональных групп 2-4 (например, по данным одного из экспериментов, 94 в контроле против 55 на высоте индуцированных МФТП двигательных расстройств).

Таблица 1. Влияние МФТП на двигательную активность мышей в тесте “открытое поле”. Двигательную активность мышей (горизонтальные и вертикальные перемещения) исследовали через 90 мин после введения МФТП или физ. раствора (контроль). Приведены средние значения ± ошибка средней

	Время после введения МФТП или физ. раствора	Контроль	МФТП	Изменение по отношению к контролю	p
Горизонтальные перемещения	90 мин	51,8±3,7	6,4±2,6	-87%	<0,001
Вертикальные перемещения	90 мин	16,2±2,0	0,75±0,41	-95%	<0,001
Горизонтальные перемещения	7 дней	77,8±4,4	54,2±7,9	-30%	<0,05
Вертикальные перемещения	7 дней	19,1±2,0	10,8±3,1	-43,50%	<0,05

Таблица 2. Влияние МФТП на число идентифицированных изатин-связывающих белков мозга мышей и их распределение по функциональным группам*

Группа**	Контроль	МФТП (90 мин)	МФТП 7 дней
1	6	2↓	2↓
2	41	27↓	30↓
3	30	17↓	40↑
4	23	14↓	37↑
5	6	4↓	5↓
6	9	3↓	7↓
7	3	2↓	0↓

Примечание. * - Полные списки идентифицированных изатин-связывающих белков приведены в Приложении в виде дополнительных материалов, доступных на сайте журнала: pbmc.ibmc.msk.ru. ** - Функциональные группы изатин-связывающих белков: (1) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (2) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (3) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (4) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов; (5) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (6) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (7) ферменты липидного обмена. Стрелки показывают снижение (↓) или увеличение (↑) числа идентифицированных изатин-связывающих белков в мозге мышей с экспериментальным паркинсонизмом по сравнению с контролем.

Через семь дней после введения МФТП увеличение числа белков именно этих функциональных групп привело к тому, что общее число изатин-связывающих белков увеличилось, достигнув уровня контроля – 132±34 ($p<0,01$). При этом профили изатин-связывающих белков были довольно специфичны для каждой группы мышей (рисунок): в контроле – 79 белков, которые не были обнаружены ни у животных на высоте двигательных нарушений, ни через неделю после введения МФТП. Для мышей, получавших инъекцию МФТП, число специфичных изатин-связывающих белков составило 31 (на высоте двигательных нарушений) и 105 (через семь дней после введения МФТП) соответственно.

Общими для всех трёх групп мышей были белки (n=9), участвующие в формировании цитоскелета и процессов экзоцитоза/внутриклеточного транспорта (cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1, tubulin alpha-4A chain, tubulin beta-2A chain, tubulin beta-2B chain, tubulin beta-2C chain, tubulin beta-4 chain, tubulin beta-5 chain, dihydropyrimidinase-related protein 2), а также heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (см. Приложение).

ОБСУЖДЕНИЕ

Протеомные исследования, проведенные в различных лабораториях, выявили многочисленные изменения в мозге мышей в ходе развития МФТП-индуцированного паркинсонизма (см. [14, 18]). Результаты настоящей работы показывают, что развитие двигательных нарушений, вызванных у мышей однократным введением МФТП, приводит к количественным и качественным изменениям профиля изатин-связывающих белков мозга (см. рисунок). На высоте двигательных нарушений, обнаруженных через 90 мин после инъекции нейротоксина, общее число этих белков существенно уменьшилось. Очевидно, это связано не с изменением уровня анализируемых белков, а с изменением их свойств, приводящих к снижению сродства к изатину. В пользу этого свидетельствует тот факт, что проведённое в условиях модельного эксперимента *in vitro* окисление глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФД) приводило к значительному снижению сродства окисленного фермента к изатину [19]. Проведённое через семь дней после введения МФТП исследование двигательной активности животных и протеомного профиля изатин-связывающих белков показало как существенное улучшение двигательной активности, так и значительное увеличение числа этих белков, которое достигало уровня контроля. При этом качественный состав изатин-связывающих белков был специфичен: мы обнаружили всего девять белков, общих для трёх групп животных.

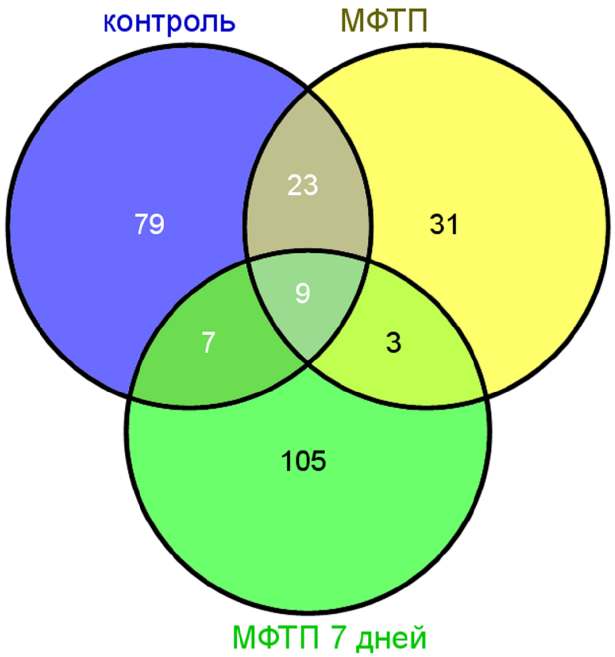

Рисунок. Диаграмма Венна, показывающая число общих изатин-связывающих белков, идентифицированных в мозге животных исследованных групп.

На сегодняшний день известно всего несколько белков-мишеней изатина, активность которых изменяется (снижается) в присутствии физиологических концентраций этого индола [1, 2, 4]. Для подавляющего большинства идентифицированных изатин-связывающих белков (особенно ферментов) функциональное значение взаимодействия с изатином остается неясным. С учётом данных о влиянии изатина на различные белок-белковые взаимодействия [21-23] есть все основания полагать, что изменение профиля изатин-связывающих белков в динамике МФТП-индуцированного паркинсонизма отражает изменения интерактома, вызванные как введением нейротоксина, так и последующими (по-видимому, компенсаторными?) процессами в клетках. При этом нельзя не отметить тот факт, что основные изменения происходят в группах белков, участвующих в образовании цитоскелета и экзоцитозе, белков, регулирующих процессы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки, а также белков, вовлеченных в сигнальную трансдукцию. Именно белки этих групп играют важную роль в реакции организма животных на развитие паркинсонизма и введение нейропротекторов [14, 18, 23, 24].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (протеомный анализ изатин-связывающих белков) и частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 15-04-01545а – экспериментальное моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма, анализ поведенческих реакций и пробоподготовка для проведения протеомного профилирования изатин-связывающих белков).

Масс-спектрометрический анализ белков выполнен в ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V.* (1996) Biochem. Pharmacol., **52**, 385-391.
2. *Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V.* (2005) Stress, **8**, 175-183.
3. *Pandeya S.N., Smitha S., Jyoti M., Sridhar S.K.* (2005) Acta Pharm., **55**, 27-46.
4. *Medvedev A., Buneeva O., Glover V.* (2007) Biologics, **1**, 151-162.
5. *Pakravan P., Kashanian S., Khodaei M.M., Harding F.J.* (2013) Pharmacol. Rep., **65**, 313-335.
6. *Hamaue N., Yamazaki N., Terado M., Minami M., Ohno K., Ide H., Ogata A., Honma S., Tashiro K.* (2000) Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., **108**, 63-73.
7. *Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A.* (2009) J. Neurosci. Res., **87**, 2763-2772.
8. *Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A.* (2010) Proteomics, **10**, 23-37.
9. *Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И.* (2012) Биохимия, **77**, 1584-1599.
10. *Zhou Y., Zhao Z.Q., Xie J.X.* (2001) Brain Res., **917**, 127-132.
11. *Hamaue N., Minami M., Terado M., Hirafuji M., Endo T., Machida M., Hiroshige T., Ogata A., Tashiro K., Saito H., Parvez S.H.* (2004) Neurotoxicology, **25**, 205-213.
12. *Minami M., Hamaue N., Hirafuji M., Saito H., Hiroshige T., Ogata A., Tashiro K., Parvez S.H.* (2006) J. Neural. Transm., Suppl. **71**, 87-95.
13. *Медведев А.Е., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Медведева М.В., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Згода В.Г.* (2017) Биохимия, **82**, 470-480.
14. *Sowell R.A., Owen J.B., Batterfield D.A.* (2009) Ageing Research Reviews, **8**, 1-17.
15. *Prut L., Belzung C.* (2003) Eur. J. Pharmacol., **463**, 3-33.
16. *Medvedev A.E., Goodwin D.L., Sandler M., Glover V.* (1999) Biochem. Pharmacol., **57**, 913-915.
17. *Kapp E.A., Schutz F., Connolly L.M., Chakel J.A., Meza J.E., Miller C.A., Fenyo D., Eng J.K., Adkins J.N., Omenn G.S., Simpson R.J.* (2005) Proteomics, **5**, 3475-3490.
18. *Klemann C.J.H.M., Martens G.J.M., Poelmans G, Visser J.E.* (2016) Mol. Neurobiol., **53**, 1625-1636.
19. *Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2016) Биомед. химия, **62**, 160-163.
20. *Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A.* (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 476-495.
21. *Ершов П.В., Яблоков Е.О., Мезенцев Ю.В., Калужский Л.А., Флоринская А.В., Веселовский А.В., Гнеденко О.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С.* (2017) Биомед. химия, **63**, 170-175. DOI: 10.18097/PBMC20176302170.
22. *Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2016) Биомед. химия, **62**, 720-724. DOI: 10.18097/PBMC20166206720.
23. *Cartelli D., Casagrande F., Busceti C.L., Bucci D., Molinaro G., Traficante A., Passarella D., Giavini E., Pezzoli G., Battaglia G., Cappelletti G.* (2013) Sci Rep., **3**, 1837.
24. *Lin X., Shi M., Masilamoni J.G., Dator R., Movius J., Aro P., Smith Y., Zhang J.* (2015) Biochim. Biophys, Acta, **1854**, 779-787.

Поступила: 08. 06. 2017.
Принята к печати: 08. 07. 2017.

THE EFFECT OF NEUROTOXIN MPTP ADMINISTRATION TO MICE ON THE PROTEOMIC PROFILE OF BRAIN ISATIN-BINDING PROTEINS

O.A. Buneeva[1], A.T. Kopylov[1], L.N. Nerobkova[2], I.G. Kapitsa[2], V.G. Zgoda[1], A.E. Medvedev[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: professor57@yandex.ru
[2]Zakusov Institute of Pharmacology, 8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia

Isatin (indole-2,3-dione) is an endogenous indole found in the mammalian brain, peripheral organs and body fluids. It acts as a neuroprotector, which decreases manifestation of locomotor impairments in animal models of Parkinson's disease. A wide range of biological activity of isatin is associated with interaction of this regulator with numerous isatin-binding proteins. The aim of this study was to investigate the profile of brain isatin-binding proteins in mice with MPTP-induced Parkinsonism (90 min and seven days after administration of this neurotoxin). A single dose administration of MPTP (30 mg/kg, ip.) was accompanied by locomotor impairments in the open field test 90 min after administration; seven days after MPTP administration locomotor activity of mice significantly improved but did not reach the control level. Five independent experiments on proteomic profiling of isatin-binding proteins resulted in confident identification of 96±12 proteins. Development of MPTP-induced locomotor impairments was accompanied by a significant decrease in the number of isatin-binding proteins (63±6; n=5; $p<0.01$). Seven days after MPTP administration the total number of identified proteins increased and reached the control level (132±34; n=4). The profiles of isatin-binding proteins were rather specific for each group of mice: in the control group these proteins (which were not found in both groups of MPTP-treated mice) represented more than 70% of total proteins. In the case of MPTP treated mice this parameter was 60% (90 min after MPTP administration) and >82% (seven days after MPTP administration). The major changes were found in the groups of isatin-binding proteins involved into cytoskeleton formation and exocytosis, regulation of gene expression, cell division and differentiation and also proteins involved in signal transduction.

Key words: MPTP-induced Parkinsonism, isatin, isatin-binding proteins, brain, proteomic profiling