

ОБЗОР

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ
ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ И МОЗГА МЫШЕЙ

О.А. Бунеева*, А.Т. Копылов, В.Г. Згода, А.Е. Медведев

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),
119121, Москва, Погодинская ул. 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный индол, проявляющий разнообразные виды биологической активности, которая реализуется при его взаимодействии с многочисленными белками-мишенями (т.н. изатин-связывающими белками). На сегодняшний день изатин-связывающие белки охарактеризованы в мозге мышей и крыс. Целью настоящего исследования был сравнительный протеомный анализ изатин-связывающих белков печени и мозга мышей. Протеомное профилирование осветленных лизатов мембранной и растворимой фракций гомогенатов печени и мозга выполнено с использованием 5-аминокапроилизатина в качестве аффинного лиганда. При аффинном разделении изатин-связывающих белков растворимых и мембранных фракций гомогенатов мозга мыши, лизированных тритоном X-100, было идентифицировано 63 индивидуальных белка. Аналогичное разделение фракций гомогената печени мыши в ходе аффинной хроматографии позволило идентифицировать 80 белков. Все идентифицированные белки печени и мозга принадлежали к следующим функциональным группам: (I) Метаболизм углеводов и генерация энергии; (II) Метаболизм липидов; (III) Метаболизм нуклеотидов и аминокислот; (IV) Формирование цитоскелета, экзоцитоз; (V) Регуляция экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (VI) Антиоксидантные и протекторные белки; (VII) Передача сигнала и регуляция активности ферментов. При этом общее число изатин-связывающих белков, совпадающих для мозга и печени, было невелико – всего 12. Наибольшее число общих для мозга и печени изатин-связывающих белков обнаружено в группе VI (антиоксидантные и протекторные белки), полное отсутствие совпадений – в группе II (метаболизм липидов) и группе IV (формирование цитоскелета, экзоцитоз). Обнаруженные различия в профиле изатин-связывающих белков, по-видимому, играют важную роль в специфических эффектах изатина в определенных органах.

Ключевые слова: изатин; изатин-связывающие белки мозга и печени; протеомное профилирование; 5-аминокапроилизатин

DOI: 10.18097/BMCRM00007

ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный индол, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных [1-4]. Обладая широким спектром биологической активности, изатин взаимодействует с многочисленными изатин-связывающими белками, многие из которых были идентифицированы в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей и крыс [1, 5, 6]. Поскольку ряд обнаруженных изатин-связывающих белков играет важную роль в развитии нейродегенеративной патологии [1, 6], интерес исследователей именно к изатин-связывающим белкам мозга вполне объясним. Вместе с тем, данные биосенсорного анализа, проведенного более пятнадцати лет назад [7], свидетельствуют о существовании в мембранной и растворимой фракциях печени, почек и сердца изатин-связывающих белков, которые до сих пор не охарактеризованы.

В связи с этим целью настоящего исследования было сравнительное изучение профиля изатин-связывающих белков печени и мозга мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали бромциан-активированную сефарозу 4В, 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); модифицированный трипсин (sequencing grade) – «Promega» (США).

Синтез 5-аминокапроилизатина был описан ранее [5]. Остальные реактивы были отечественного производства максимально доступной чистоты.

Ковалентное связывание 5-аминокапроилизатина с бромциан-активированной сефарозой 4В 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 (по объёму).

Дизайн эксперимента приведён на рисунке.

В экспериментах использовали печень и мозг самцов мышей линии C57BL/6 (вес 20–25 г) из питомника «Столбовая» (Московская область). Эти ткани измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Ultra-Turrax T 10 при 10000 об/мин в 0.05 М калий-фосфатном буфере, pH 7.4, для получения 30% гомогената. Выделение мембранной и растворимой фракций гомогената печени и мозга мыши и их последующую обработку для осуществления этапа аффинной хроматографии проводили в соответствии с разработанной ранее методикой [6]. Сначала гомогенаты этих органов центрифугировали 5 мин при 500 g для удаления дебриса. Надосадочную жидкость далее центрифугировали 60 мин при 16000 g, обрабатывая



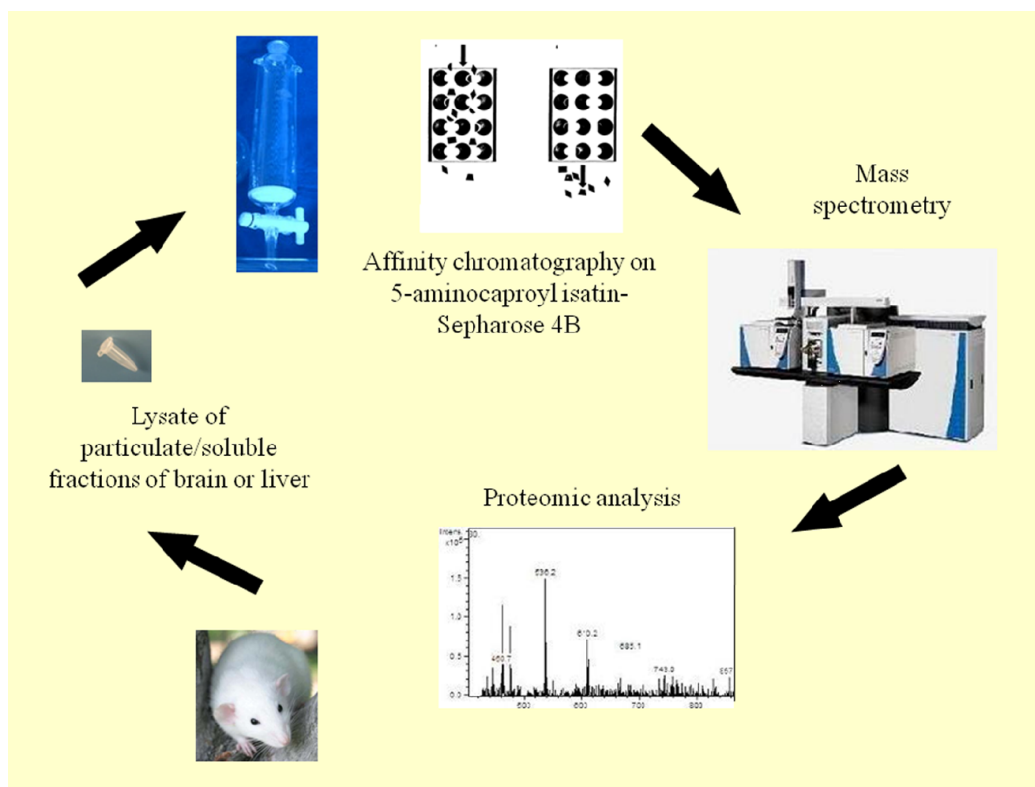


Рисунок. Дизайн эксперимента по протеомному профилированию изитин-связывающих белков мозга и печени мышей.

растворимую и мембранную фракции тритоном X-100 разделяли. Осадок (мембранную фракцию) сначала суспендировали в 0.05 М калий-фосфатном буфере (pH 7.4) до конечной концентрации 30 мг/мл. После добавления тритона X-100 (конечная концентрация 3%), инкубации в течение 60 мин при 4°C и последующего трёхкратного разведения тем же фосфатным буфером пробы центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин для получения осветленной надосадочной жидкости. Растворимую фракцию гомогената мозга или печени (концентрация белка около 30 мг/мл) инкубировали с 3% тритоном X-100 и центрифугировали аналогичным способом.

Аффинную хроматографию на 5-аминокапроиллизатинсефарозе для последующего масс-спектрометрического анализа проводили так же, как описано ранее [6]. Осветлённые при помощи центрифугирования лизаты мембранной и растворимой фракций гомогенатов печени и мозга (концентрация белка примерно 10 мг/мл) добавляли к суспензии 5-аминокапроилсефарозы (1:1) и инкубировали 2 ч при 4°C и медленном перемешивании. Аффинный сорбент промывали 100 объёмами буфера для удаления неспецифически связавшихся белков, после чего остальные белки элюировали с использованием колонки (1×2 см) при комнатной температуре сначала 30 мл 1 мМ изитина в 0.05 М фосфатном буфере (pH 7.4), потом тем же объёмом 1 М NaCl в 0.05 М фосфатном буфере (pH 7.4).

Элюат (30 мл) концентрировали до 0.25 мл при помощи центрифужного устройства Amicon Ultra («Millipore», США). Белки экстрагировали

смесью хлороформ-метанол [8], восстанавливали 20 мМ дитиотреитолом в 6 М хлориде гуанидина (pH 6.8) при 37°C в течение 60 мин; после карбоксиметилирования сульфгидрильных групп 0.17 мМ йодоацетамидом (37°C, 60 мин) и повторной хлороформно-метанольной экстракции осадок белков растворяли в 50 мМ бикарбонате аммония и подвергали трипсинолизу (сначала 1 мкг трипсина/100 мкг белка, 37°C, 60 мин; потом 2 мкг трипсина/100 мкг белка, 37°C, в течение ночи) [9]. 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 при помощи LC-MS/MS.

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

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 обращенной 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 уравниванием 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 $m/z = 400\text{--}1300$. 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 внутривептидных 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-положительный

сигнал проверяли через δ -коэффициент достоверности при поиске экспериментальных данных против базы данных случайно сгенерированных пептидных последовательностей. Для истинно-положительного сигнала δ -коэффициент должен превышать 2.0.

В каждом протеомном эксперименте использовали суммарные препараты, полученные в ходе аффинного обогащения растворимой и мембранной фракций гомогенатов мозга или печени не менее 2-х мышей.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

В соответствии с результатами наших предыдущих исследований с использованием 5-аминокапролизатина в качестве аффинного лиганда [6, 10] в ходе аффинного разделения изатин-связывающих белков растворимой и мембранной фракций гомогенатов мозга мыши, лизированных тритоном X-100, было идентифицировано не менее 60 индивидуальных белков, специфически связывающихся с 5-аминокапролизатинсефарозой (см. Приложение, табл. 1S). Аналогичное разделение фракций гомогената печени мыши в ходе аффинной хроматографии позволило идентифицировать 80 белков (см. Приложение, табл. 2S). При визуальной экспертной оценке все идентифицированные белки печени и мозга принадлежали к следующим функциональным группам: (I) Метаболизм углеводов и генерация энергии; (II) Метаболизм липидов; (III) Метаболизм нуклеотидов и аминокислот; (IV) Формирование цитоскелета, экзоцитоз; (V) Регуляция экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (VI) Антиоксидантные и протекторные белки; (VII) Передача сигнала и регуляция активности ферментов. При этом общее число изатин-связывающих белков, совпадающих для мозга и печени, было невелико – всего 12 (табл. 1).

Наиболее число общих для мозга и печени изатин-связывающих белков обнаружено в группе VI (антиоксидантные и протекторные белки), полное отсутствие совпадений – в группе II (метаболизм липидов) и группе IV (формирование цитоскелета, экзоцитоз). В таблице 2 приведена функциональная аннотация, клеточная локализация и молекулярные функции идентифицированных изатин-связывающих белков, охарактеризованные ресурсами Gene Ontology.

Таблица 1. Сравнение протеомных профилей изатин-связывающих белков мозга и печени мышей

Функция	Количество белков мозга	Количество белков печени	Общие белки
I. Метаболизм углеводов и генерация энергии	19	15	4
II. Метаболизм липидов	0	11	0
III. Метаболизм нуклеотидов и аминокислот	5	16	1
IV. Формирование цитоскелета, экзоцитоз	13	5	0
V. Регуляция экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки	12	21	2
VI. Антиоксидантные и протекторные белки	6	11	4
VII. Передача сигнала и регуляция активности ферментов	8	1	1
Всего	63	80	12

Таблица 2. Список идентифицированных изотин-связывающих белков и их аннотация ресурсами Gene Ontology

[illegible]

Таблица 2. Список идентифицированных изатин-связывающих белков и их аннотация ресурсами Gene Ontology (продолжение)

[illegible]

Таблица 2. Список идентифицированных изотин-связывающих белков и их аннотация ресурсами Gene Ontology (продолжение)

[illegible]

Примечание к таблице 2. 1 - Cellular process; 2 - Developmental process; 3 - Growth; 4 - Immune system process; 5 - Interaction with cells and organisms; 6 - Localization; 7 - Metabolic process; 8 - Regulation; 9 - Reproduction; 10 - Response to stimulus; 11 - Other; 12 - Endosome; 13 - Chromosome; 14 - Ribosome; 15 - Golgi; 16 - ER; 17 - Mitochondria; 18 - Nucleus; 19 - Peroxisome/microbody; 20 - Cytoskeleton; 21 - Plasma membrane; 22 - Cell surface; 23 - Extracellular; 24 - Other intracellular organelles; 25 - Other cytoplasmic vesicle; 26 - Macromolecular complex; 27 - Cytoplasm; 28 - Other2; 29 - Antioxidant Activity; 30 - Binding; 31 - Catalytic Activity2; 32 - Enzyme regulator activity; 33 - Molecular transducer activity; 34 - Structural molecule activity; 35 - Transcription regulator activity; 36 - Translation regulator activity; 37 - Transporter activity; 38 - Chaperone activity; 39 - Motor activity; 40 - Other3.

Следует отметить, что изатин-связывающие белки были обнаружены не только среди белков, представленных в клетке в относительно высоких концентрациях (белки, участвующие в формировании цитоскелета, белки теплового шока и др.), но также и среди белков, концентрация которых в клетке значительно ниже [11]. Интересно, что изатин-связывающие белки мозга и печени сильно различались и по представленности в выделенных функциональных группах. Так, в мозге количество изатин-связывающих белков в каждой группе уменьшалось в следующем порядке: $I > IV \geq V > VII > VI \geq III \gg II$; для печени порядок уменьшения числа изатин-связывающих белков в группах был иным: $V > III \geq I > II = VI > IV \gg VII$ (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Изатин (индолдион-2,3) – эндогенный индол, содержащийся в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих [1-4]. Интерес исследователей к изатину связан с потенциальным фармакологическим эффектом как самого изатина, так и его многочисленных аналогов [12-15]. В этом контексте детальный протеомный анализ изатин-связывающих белков будет способствовать не только лучшему пониманию функций изатина в организме, но и идентификации конкретных биологических мишеней, обуславливающих различные ответы на введение аналогов изатина.

Из-за отсутствия у изатина функциональных групп, необходимых для ковалентного связывания с носителем без потери его биологической активности, использование в качестве аффинных лигандов химических производных этого соединения представляет собой необходимый шаг в процессе выделения изатин-связывающих белков и последующего протеомного анализа. На сегодняшний день для протеомного профилирования изатин-связывающих белков используются два аналога изатина: 5-аминоапроилизатин (N-(6-аминоапроил)-5-аминоизатин) и 5-аминоизатин [5, 6, 10]. Недавно проведенное сравнительное исследование протеомных профилей изатин-связывающих белков мозга, выделенных при помощи обоих аналогов изатина, показало, что число идентифицированных белков мозга было выше при использовании более короткого аналога изатина [10]. Это свидетельствует о том, что длина вставки между аминокислотной группой, используемой для пришивки аффинного лиганда к сефарозе, и собственно изатином оказывает существенное влияние

на результаты протеомного профилирования изатин-связывающих белков. Учитывая тот факт, что основные количественные различия протеомных профилей были обусловлены преобладанием белков, участвующих в формировании цитоскелета и экзцитозе, в данной работе для сравнительного изучения профиля изатин-связывающих белков печени и мозга мышей был использован более длинный (и гибкий) аналог изатина.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при использовании 5-аминоапроилизатина в качестве аффинного лиганда в печени выявляется больше индивидуальных белков (80), чем в мозге (63). Незначительное число белков, общих для печени и мозга (12), свидетельствует о высокой тканевой специфичности потенциального взаимодействия изатина со своими мишенями.

На сегодняшний день известно всего несколько белков-мишеней изатина, активность которых изменяется (снижается) в присутствии физиологических концентраций этого индола [1]. Для подавляющего большинства идентифицированных изатин-связывающих белков (особенно ферментов) функциональное значение взаимодействия с изатином остается неясным. С учетом появляющихся данных о влиянии изатина на различные белок-белковые взаимодействия [16-18], различия в профиле изатин-связывающих белков мозга и печени могут свидетельствовать об участии идентифицированных белков в различных (суб)интерактомах. Нельзя исключить также, что обнаруженные различия в профиле изатин-связывающих белков, по-видимому, играют важную роль в специфических эффектах изатина в определенных органах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (протеомный анализ изатин-связывающих белков). Масс-спектрометрический анализ белков выполнен в ЦКП «Протеом человека» при ИБМХ, поддержанном Минобрнауки РФ в рамках соглашения №14.621.21.0017 (идентификатор RFMEFI62117X0017).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (<http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00007>) на сайте журнала.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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
2. Medvedev, A., Buneeva, O., Glover, V. (2007) Biological targets for isatin and its analogues: implications for therapy. *Biologics*, 1, 151-162.
3. Medvedev, A., Igosheva, N., Crumeyrolle-Arias, M., and Glover, V. (2005) Isatin: role in stress and anxiety. *Stress*, 8, 175-183. DOI: 10.1080/10253890500342321
4. Medvedev, A.E., Clow, A., Sandler, M., Glover, V. (1996) Isatin - a link between natriuretic peptides and monoamines? *Biochem. Pharmacol.*, 52, 385-391. DOI: 10.1016/0006-2952(96)00206-7
5. Crumeyrolle-Arias, M., Buneeva, O., Zgoda, V., Kopylov, A., Cardona, A., Tournaire, M.C., Pozdnev, V., Glover, V., Medvedev, A. (2009) Isatin binding proteins in rat brain: *In situ* imaging, quantitative characterization of specific [³H]isatin binding, and proteomic profiling. *J. Neurosci. Res.*, 87, 2763-2772. DOI: 10.1002/jnr.22104
6. Buneeva, O., Gnedenko, O., Zgoda, V., Kopylov, A., Glover, V., Ivanov, A., Medvedev, A., Archakov, A. (2010) Isatin-binding proteins of rat and mouse brain: proteomic identification and optical biosensor validation. *Proteomics*, 10, 23-37. DOI: 10.1002/pmic.200900492
7. Ivanov, Yu.D., Panova, N.G., Gnedenko, O.V., Buneeva, O.A., Medvedev A. E., Archakov A.I. (2002) Study of the tissue and subcellular distribution of isatin-binding proteins with optical biosensor. *Vopr. Med. Khim.*, 48, 73-83.
8. Walker J.M. (Ed.) *The Protein Protocol Handbook*, Humana Press Inc., Totowa, N.Y., 2002 DOI: 10.1385/1592591698
9. Wisniewski J., Zougman A., Nagaraj N., and Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359-362. DOI: 10.1038/nmeth.1322
10. Buneeva, O.A., Kopylov, A.T., Tikhonova, O.V., Zgoda, V.G., Medvedev, A.E., Archakov A.I. (2012) Effect of affinity sorbent on proteomic profiling of isatin-binding proteins of mouse brain. *Biochemistry (Mosc.)*, 77, 1326-1338. DOI: 10.1134/S0006297912110120
11. Ishihama Y., Sato T., Tabata T., Miyamoto N., Sagane K., Nagasu T., Oda Y. (2005) Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standards. *Nature Biotechnol* 23: 617-621. DOI: 10.1038/nbt1086
12. Phogat, P., Singh, P. (2015) A mini review on central nervous system potential of isatin derivatives. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 15, 28-31. DOI: 10.2174/1871524915666150213122246
13. Pakravan, P., Kashanian, S., Khodaei, M.M., and Harding F.J. (2013) Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity, *Pharmacol. Rep.*, 65, 313-335. DOI: 10.1016/S1734-1140(13)71007-7
14. Vine, K.L., Matesic, L., Locke, J.M., Ranson, M., and Skropeta, D. (2009) Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 9, 397-414. DOI: 10.2174/1871520610909040397
15. Pandeya, S.N., Smitha, S., Jyoti, M., Sridhar, S.K. (2005) Biological activities of isatin and its derivatives. *Acta Pharm.*, 55, 27-46.
16. Ershov P.V., Yablokov E.O., Mezentshev Yu.V., Kalushskiy L.A., Florinskaya A.V., Veselovsky A.V., Gnedenko O.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Medvedev A.E., Ivanov A.S. (2017) The effect of isatin on protein-protein interactions between cytochrome *b₅* and cytochromes P450. *Biomed. Khim.*, 63, 170-175. DOI: 10.18097/pbmc20176302170
17. Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2016) The effect of neuroprotector isatin on binding of some model proteins with beta-amyloid peptide: a biosensor study. *Biomed. Khim.*, 62(6), 720-724. DOI: 10.18097/pbmc20166206720
18. Ershov P., Mezentshev Y., Gilep A., Usanov S., Buneeva O., Medvedev A., Ivanov A. (2017) Isatin-induced increase in the affinity of human ferrochelatase and adrenodoxin reductase interaction. *Protein Science*, 26(12), 2458-2462. DOI: 10.1002/pro.3300

Поступила: 18. 03. 2018.
Принята к публикации: 23. 03. 2018.

COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF MOUSE LIVER AND BRAIN ISATIN-BINDING PROTEINS

O.A. Buneeva, A.T. Kopylov, V.G. Zgoda, A.E. Medvedev*

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

Isatin (indol-2,3-dione) is an endogenous indole, exhibiting various biological activities that are realized via its interacts with numerous target proteins (so-called isatin-binding proteins). To date, isatin-binding proteins have been characterized in the brain of mice and rats. In this study we have performed a comparative proteomic analysis of the isatin-binding proteins of the mouse liver and brain. Proteomic profiling of clarified lysates of membrane and soluble fractions of liver and brain homogenates was performed using 5-aminocaproyl-isatin as an affinity ligand. During affinity based separation of isatin-binding proteins of soluble and membrane fractions of mouse brain homogenates lysed with Triton X-100, 63 individual proteins were identified. A similar separation of mouse liver homogenate fractions during affinity chromatography resulted in identification of 80 proteins. All identified liver and brain proteins belonged to the following functional groups: (I) Carbohydrate metabolism and energy generation; (II) Lipid metabolism; (III) Metabolism of nucleotides and amino acids; (IV) Formation of the cytoskeleton, exocytosis; (V) Regulation of gene expression, cell division and differentiation; (VI) Antioxidant and protective proteins; (VII) Signal transmission and regulation of enzyme activity. The total number of isatin-binding proteins common for the brain and liver was only 12. The most common for the brain and liver of isatin-binding proteins was found in group VI (antioxidant and protective proteins), complete absence of coincidence in group II (lipid metabolism) and group IV (formation of the cytoskeleton, exocytosis). The observed differences in the profile of isatin-binding proteins appear to play an important role in the specific effects of isatin in certain organs.

Key words: isatin; isatin-binding proteins; brain and liver; proteomic profiling; 5-aminocaproyl-isatin