

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

©Коллектив авторов

### АЦЕТИЛИРОВАНИЕ, МЕТИЛИРОВАНИЕ И УБИКВИТИНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У МЫШЕЙ: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

В.С. Скворцов\*, Я.О. Иванова, А.И. Воронина

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: vladlen@ibmh.msk.su

Проанализированы доступные в базе данных ProteomeXchange (accession code PXD016538) экспериментальные результаты (Simats et al. (2020) Molecular & Cellular Proteomics, 19(12), 1921-1936), полученные при использовании комплексного мультиомного подхода по выявлению потенциальных биомаркеров ишемического инсульта в крови мышей. В качестве посттрансляционных модификаций рассмотрены ацетилирование, метилирование и убиквитинирование. Анализ достоверности изменения уровня модификации белков оценивали для ишемической ткани в сравнении с неповреждённой инсультом тканью и контролем, взятым у мышей после мнимой операции (sham operation). При уровне статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ) найдено 2 белка (Q02248 и Q8BL66); для ещё 7 белков различия находятся на уровне статистической тенденции ( $p < 0,1$ ). Для 7 из найденных 9 белков в литературе есть данные о связи с ишемией мозга.

**Ключевые слова:** посттрансляционные модификации; ишемический инсульт; биоинформатика

**DOI:** 10.18097/PBMC20226805390

## ВВЕДЕНИЕ

Данная работа — логическое продолжение нашего предыдущего исследования [1], в котором мы предприняли попытку анализа изменений уровня посттрансляционных модификаций (ПТМ) в белках при ишемическом инсульте. Наличие ПТМ обеспечивает регуляцию биохимических процессов [2], в том числе связанных с патологическим состоянием. Это может служить косвенным маркёром возникновения подобных состояний, тем более, что при деструкции тканей возможно попадание модифицированных белков в кровоток, и тогда они могут быть обнаружены в крови масс-спектрометрическими методами. Более того, применяя безметковый (“label-free”) количественный протеомный анализ, основанный на сравнении площадей под пиками (“abundance”) зарегистрированных первичных ионов [3], можно не только зарегистрировать наличие ПТМ (которая может существовать и в норме), но и оценить изменения степени модификации белка. В отличие от предыдущего исследования, в котором в качестве ПТМ рассматривали только фосфорилирование и дезаминирование, в данной работе анализировали ацетилирование, метилирование и убиквитинирование. Принципиальное различие для этих двух групп ПТМ определяется особенностями протокола протеомного эксперимента при тандемной масс-спектрометрической (MS-MS) идентификации. Обычно в ходе пробоподготовки для гидролиза белков используют трипсин. В этом случае нельзя использовать самый очевидный параметр — отношение величин “abundance” модифицированного и немодифицированного пептида, прямо указывающего на количественные изменения и независимого от условий масс-спектрометрической

детекции. Так как мишенью ацетилирования (исключая N-концевое), метилирования и убиквитинирования служит остаток лизина целевого белка, то при полном гидролизе немодифицированной формы этого пептида просто нет, а при неполном гидролизе невозможно оценить его количество. Трипсин использовали и в работе [4], “сырые” данные (доступны в базе данных ProteomeXchange, accession code PXD016538) которой послужили основой для нашего биоинформатического анализа. Её авторы использовали комплексный мультиомный подход по выявлению потенциальных биомаркеров в крови мышей с экспериментальным ишемическим инсультом, но не рассматривали вопрос об изменении уровня ПТМ. Также важным фактором было то, в работе исследовано несколько биологических проб, что позволяет оценить достоверность количественных изменений.

## МЕТОДИКА

Методика уже была описана ранее [1]. Вкратце, в работе [4] были исследованы образцы мозга 8 мышей, у которых вызывали инфаркт в области средней мозговой артерии с использованием модели преходящей церебральной ишемии (tMCAO), у 4 проводили мнимую операцию (sham control, Sh.C.); образцы мозга брали через 2 ч из правого полушария в зоне инфаркта (IP, ipsilateral) и левого (CL, contralateral) полушария. Всего в работе было проанализировано 24 биологические пробы. Для определения пептидов с такими модификациями, как ацетилирование, метилирование и убиквитинирование, мы провели идентификацию пептидов заново с использованием программы Peaks Studio X Pro [5]. Точность при идентификации

прекурсора — 2 ppm, точность идентификации фрагментов — 0,01 Да. Отбирали пептиды, соответствующие уровню FDR 1%. Если пептид мог принадлежать более чем 1 белку, то его не рассматривали. Исключение — близкие гомологи. Если модификация была найдена на С-конце, пептид также исключался, так как с высокой долей вероятности это могла быть ошибочная идентификация, иначе по этой позиции не должен идти эффективный гидролиз трипсином. После идентификации пептидов дополнительно рассматривали первичные ионы, совпадающие по величине  $m/z$  с точностью до 2 ppm, с пересечением диапазона по RT (время удержания, retention time) не менее 80%.

В работе [1] анализировали как абсолютные значения “abundance” (в виде десятичных логарифмов), так и отношение “abundance” модифицированного пептида/“abundance” немодифицированного пептида в каждой пробе. Так как второй вариант к данным модификациям неприменим, то знаменатель вычисляли как среднее по величине “abundance” для всех идентифицированных пептидов без модификаций данного белка в той же пробе, в которой был обнаружен модифицированный пептид. При этом для расчёта среднего учитывали только второй и третий квартили

для распределения величины “abundance”. Критерии отбора немодифицированных пептидов совпадали с критериями для первоначального поиска пептидов с модификациями. При первом варианте нельзя определить, что было причиной наблюдаемых изменений — изменение общего количества белка или изменение доли модифицированных молекул.

Учитывая малые размеры выборок и неполноту данных (не во всех 24 пробах модифицированный пептид мог быть идентифицирован), для определения достоверности различия между выборками использовали критерий Манна-Уитни. Контрольные выборки по правому и левому полушариям были объединены (8 проб для 4 мышей).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлена статистическая сводка по всем идентифицированным пептидам с модификациями и соответствующим белкам (более подробная информация с указанием названия белка, позиции с ПТМ и др. по каждому из пептидов доступна в дополнительных материалах). Указание о наличии ПТМ в столбцах свидетельствует о наличии в конкретном пептиде второй модификации. Поскольку для близких гомологов пептиды

Таблица 1. Количество пептидов с модификациями, идентифицированных в работе, и список белков, которым они соответствуют

Модификация	Пептиды с модификациями	Совпадение с Uniprot PTM	N-концевое ацетилирование	Ацетилирование	Метилирование	Убиквитинирование	Фосфорилирование	Всего белков	Без учёта гомологов	Список белков (Uniprot ID)
N-концевое ацетилирование	33	23			1	1		33	31	Q9EP69, E9PUL5, Q9EPK7, Q8K0U4, P40124, Q8C0C7, P20444, Q8CBW3, Q9Z1B3, Q92019, Q8C194, G5E829, Q68FD5, Q6ZQ38, Q9Z0E0, Q01853, P43006, P80316, Q99MN1, Q02248, P28652, P60710, P63260, Q9R0K7, P48962, Q03265, Q9WUA3, Q61036, P46660, Q9Z1Q9, Q9QYB5, P08551, O70318
Ацетилирование	12	–				1	4	12	10	Q02053, Q8C194, O88485, O88487, Q9Z2H5, A2ASS6, O08553, Q8BL66, B9EJA2, Q64332, Q9WV92, P14685
Метилирование	40	3	1			2	6	38	33	P10637, P11798, P28652, Q6PHZ2, Q91WC3, Q9R0K7, Q3U1J4, Q6PIC6, Q6ZPE2, P16627, P17879, Q61696, P80316, Q3TTY5, P52480, Q61361, Q60864, P26443, Q99KI0, Q8BG39, Q99KC8, Q8VBW6, Q5SQX6, Q8BGQ7, A2ASS6, P47708, Q8BYR5, Q921I1, Q9QYR6, O88935, P58252, O08553, O55143, Q03265, P16546, P14873, Q3UHL1, P63318
Убиквитинирование	8	1	1	1	2		1	11	8	A2ASS6, O88643, P0CG49, P0CG50, P14685, P62983, P62984, Q64332, Q8VD65, Q99KI0, Q9Z2H2
Всего	92	27						83	75	

не отбрасывали (в противном случае такие группы белков всегда выпадали бы из исследования), то всего было отобрано 83 белка (75 без учёта гомологов). Общее число отобранных вариантов 105, так как для нескольких белков было идентифицировано больше одного пептида. Все пептиды были проверены на наличие информации о идентифицированном ПТМ в базе данных Uniprot [6]. Из 27 совпадающих с данными Uniprot ПТМ только 5 имеют ссылку на литературный источник, остальные определены по сходству с другими белками.

Для белка Q8K0U4 (Heat shock 70 kDa protein 12A) при идентификации было выявлено 2 варианта одного пептида (A(+42.01)DKEAGGGDAGPR и ADK(+42.01)EAGGGDAGPR; в круглых скобках место и тип ПТМ, в данном случае ацетилирование, у первого пептида N-концевое). Однако при ручной проверке спектра был выбран первый вариант. У белка E9PUL5 (Proline-rich transmembrane protein 2) 3 пептида (A(+42.01)ASSSQVSEM(+15.99)K, A(+42.01)ASSSQVSEMKGVEDSSK и A(+42.01)ASSSQVSEMK), один из которых содержит окисленный метионин, а ещё один — результат неполного гидролиза. Объединить их не представляется возможным, но можно принять допущение, что вероятность окисления метионина и неполного гидролиза и количественные соотношения между пептидами зависят только от условий пробоподготовки. Неудивительно, что был найден и фрагмент самого убиквитина (LLFAGK(+114.04)QLEDG; формально этот фрагмент может быть у 4-х белков: P0CG49, P0CG50, P62983 и P62984). В данном случае имеется косвенное подтверждение правильной идентификации пептида, так как параллельно был обнаружен и его вариант LLFAGK(+383.23)QLEDGR. K(+383.23) появляется при протеолизе химо трипсина; это может быть следствием как естественной деградации, так и наличием у трипсина химо трипсин-подобной активности. Также оба варианта (+114.04 и +383.23) были обнаружены у 2 пептидов K(+114.04)TQLPT(+79.97)APEAPR и (DGQKLPA GK(+114.04)DYK белка A2ASS6 (Titin).

Для статистического анализа использовали 3 варианта сравнения: IP сравнивали с CL, IP с Sh.C (данные для правого и левого полушария рассматривали как независимые, всего 8 значений), IP с объединённой выборкой CL+Sh.C. Несмотря на то, что критерий Манна-Уитни работает на малых выборках, а объединённая выборка могла содержать до 16 значений, только для 48 вариантов пептидов с ПТМ (43 белка) было обнаружено число пептидов, достаточное для статистического анализа (табл. 2; полная версия таблицы представлена в дополнительных материалах). Для каждой из выборок сравнения в таблице указано число проб, в которых были обнаружены пептиды с модификациями. В качестве меры сходства выборок используется “*p*-value”, считая, что выборки достоверно различаются, если данное значение не больше 0,05, и имеется статистическая тенденция, если *p* не больше 0,1. При сравнении данных для абсолютных значений “abundance” и

относительных величин результаты несколько различались, как и в различных вариантах сравнения. Представляется корректным считать, что если хотя бы один из вариантов показал приемлемый результат, то данный пептид и белок нужно включить в список, требующий дополнительного изучения.

Для уровня статистической значимости  $p < 0,05$  найдено всего 2 белка: (i) Q02248 (Catenin beta-1), (ii) Q8BL66 (Early endosome antigen 1). Модификация первого (N-концевое ацетилирование) описана в Uniprot. В литературе имеются данные о связи  $\beta$ -катенина с нарушениями целостности гемато-энцефалического барьера при ишемии/реперфузии у мышей, а также с такими патологиями как фиброз печени, рост опухолей и ишемический инсульт [7]. Несмотря на то, что значимые различия имеются только для относительных значений (что как бы должно свидетельствовать в пользу изменения уровня модифицированных белков), существуют данные о повышенном содержании  $\beta$ -катенина в мозге после инсульта [8]. ПТМ второго белка — ацетилирование и дополнительная ПТМ — фосфорилирование (S(+79.97)ELLENLK(+42.01)QTLTKK). Поскольку перед остатком S в аминокислотной последовательности Q8BL66 стоит также K, то без ацетилирования при трипсинолизе образуется короткий пептид, который не был обнаружен. В данном случае добавляется вероятность, что изменение относительного количества модифицированного пептида связано именно с изменением уровня фосфорилирования. В нашей предыдущей работе [1], где обязательным условием было наличие пары модифицированный пептид/немодифицированный пептид, он обнаружен не был (по указанным выше причинам). О связи данного белка с ишемическим инсультом также известно [9].

Для 7 белков (или 9, считая гомологи; литературная ссылка указывает, что какая-либо связь белка с ишемией мозга была обнаружена при литературном поиске) обнаружена статистическая тенденция ( $p < 0,1$ ). К ним относятся: (1) A2ASS6 (Titin); учитывая роль титина в процессе сокращения поперечнополосатых мышц это, скорее всего, ложноположительный результат, обусловленный его колоссальными размерами и наличием вариаций в генах реальных мышечных; (2) G5E829 (Plasma membrane calcium-transporting ATPase) [10]; (3) O70318 (Band 4.1-like protein 2); (4) P08551 (Neurofilament light polypeptide) [11]; (5) O88935 (Synapsin-1) [12]; (6) Q8K0U4 (Heat shock 70 kDa protein 12A) [13]; (7-9) группа из 3 высокомолекулярных белков P11798, P28652, Q6PHZ2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha, beta, delta) [14] для пептида LK(+14.02)GALLTTLATR. Следует отметить, что белки O88935, Q8K0U4 и P11798 фигурировали и в нашей предыдущей работе [1].

Хотя полученные результаты не могут быть доказательством изменения уровня ПТМ при ишемическом инсульте, они дают возможность определить более узкий круг конкретных белков, которые необходимо прицельно исследовать в контексте анализа ПТМ белков при ишемическом инсульте.

Таблица 2. Белки, для которых можно оценить вероятность достоверности изменения уровня модификации при ишемическом инсульте

№	Uniprot ID	Название белка (по Uniprot)	Пептид	Число наблюдений						p (для сравнения относительных значений)				p (для сравнения абсолютных значений)		
				IP	CL	Sh.C	CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C
1	P63260	Actin, cytoplasmic 2	E(+42.01)EELAAALVLDNGSGMCK	4	3	2	5	0,400		0,413	0,400			0,400		0,413
2	P40124	Adenyl cyclase-associated protein 1	A(+42.01)DMQNLVER	3	4	4	8	0,857	0,857	0,776	0,857			0,857	0,629	0,921
3	P46660	Alpha-internexin	S(+42.01)FGSEHYLCSASSYR	6	5	2	7	0,792	0,857	0,731	1,000			1,000	0,643	0,836
4	Q9WUA3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	S(+42.01)DLDSSSSSAYPK	5	2	3	5	1,000	1,000	1,000	0,571			0,571	0,250	0,690
5	Q9Z2H5	Band 4.1-like protein 1	MDDK(+42.01)DYSEADGLSER	5	4	6	10	0,286	0,792	0,768	0,905			0,905	0,792	0,768
6	O70318	Band 4.1-like protein 2	T(+42.01)TEVGSASEVKK	2	4	1	5			0,857						0,095
7	Q9WV92	Band 4.1-like protein 3	VEST(+79.97)SVGSLSPGGAK(+42.01)LELSTK	4	2	3	5		0,857	1,000				1,000		0,556
8	P11798	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	LK(+14.02)GALLTTMLATR	4	3	6	9	1,000	0,914	0,940	0,229			0,229	0,114	0,076
9	P28652	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	LK(+14.02)GALLTTMLATR	4	3	6	9	0,857	0,914	0,825	x			x	x	x
10	Q6PHZ2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	LK(+14.02)GALLTTMLATR	4	3	6	9	0,857	0,476	0,503	x			x	x	x
11	Q3UHL1	CaM kinase-like vesicle-associated protein	LENGLLK(+14.02)EPCGTPEYLAPEVVGR	7	5	6	11	0,432	0,731	0,860	0,202			0,202	0,945	0,536
12	Q02248	Catenin beta-1	A(+42.01)TQADLMELDMAMEPDRK	5	5	0	5	0,032		0,032	0,548			0,548		0,548
13	Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	A(+42.01)QLPLR	5	4	3	7	0,905	0,571	0,639	0,556			0,556	0,393	1,000
14	B9EJA2	Cortactin-binding protein 2	KEFDVDT(+79.97)LSK(+42.01)SELR	4	4	0	4	0,200		0,200	0,886			0,886		0,886
15	O88485	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1	SDK(+42.01)SDLKAELEL	4	6	4	10	0,257	0,886	0,374	1,000			1,000	0,886	0,945
16	O88487	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	SDK(+42.01)SDLKAELEL	4	6	4	10	0,610	0,486	0,454	x			x	x	x

УРОВЕНЬ БЕЛКОВ С ПТМ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У МЫШЕЙ

Таблица 2. Белки, для которых можно оценить вероятность достоверности изменения уровня модификации при ишемическом инсульте (продолжение)

№	Uniprot ID	Название белка (по Uniprot)	Пептид	Число наблюдений						p (для сравнения относительных значений)				p (для сравнения абсолютных значений)		
				IP	CL	Sh.C	CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C
17	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	LVAPPGGR(+14.02)ANLTSLG	3	2	2	4			0,629						0,629
18	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	QLGENLLVPGGVK(+42.01)T(+79.97)LEAHSR	4	2	2	4			0,343						1,000
19	Q8BL66	Early endosome antigen 1	S(+79.97)ELLENLK(+42.01)QTLTKK	3	5	4	9	0,036	0,400	0,064	0,786	0,629	0,600			
20	P43006	Excitatory amino acid transporter 2	A(+42.01)STEGANNMPK	7	8	6	14	0,779	0,628	0,971	0,867	0,945	0,856			
21	Q9EPK7	Exportin-7	A(+42.01)DHVQSLAQLENLCK	4	3	2	5	0,229		0,111	0,857		0,556			
22	Q9QYB5	Gamma-adducin	S(+42.01)SDTSPAVVTTPPPSMPHK	3	3	3	6	1,000	1,000	0,905	0,700	1,000	0,714			
23	Q8C194	Glycogen phosphorylase, brain form	AK(+42.01)PLTDSER	2	2	3	5			0,381			0,381			
24	Q8K0U4	Heat shock 70 kDa protein 12A	A(+42.01)DKEAGGGDAGPR	3	7	3	10	0,667	0,100	0,287	1,000	0,100	0,469			
25	Q99MN1	Lysine--tRNA ligase	A(+42.01)TLQSEVKVDGEQK	5	4	3	7	0,905	0,250	0,432	0,476	0,762	0,852			
26	Q6ZPE2	Myotubularin-related protein 5	R(+14.02)FRTFLDSDYER	4	5	3	8	1,000	0,857	0,933	0,413	0,857	0,461			
27	Q9Z0E0	Neurochondrin	A(+42.01)SDCEPALNQAESR	3	3	1	4	1,000		0,629	0,200		0,400			
28	P08551	Neurofilament light polypeptide	S(+42.01)SFGYDPYFSTSYK	4	5	2	7	0,286		0,412	0,556		0,788			
29	P08551	Neurofilament light polypeptide	S(+42.01)SFGYDPYFSTSYKR	5	4	4	8	0,063	0,905	0,354	0,905	0,730	0,943			
30	Q8C0C7	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	A(+42.01)DNPVLELLLR	4	3	2	5	0,229		0,111	0,886		0,914			
31	Q9EP69	Phosphatidylinositol-3-phosphatase SAC1	A(+42.01)AAAYEHLK	4	4	2	6	0,886		0,762	0,486		0,914			
32	G5E829	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	G(+42.01)DMANNSVAYSGVK	4	3	1	4	1,000		0,686	0,114		0,057			
33	Q9R0K7	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	G(+42.01)DMTNSDFYSK	4	3	6	9	1,000	0,114	0,260	0,629	0,257	0,260			
34	Q9R0K7	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	K(+14.02)VLEPMACDGLR	6	3	4	7	0,714	0,476	0,445	0,714	0,914	0,731			

Таблица 2. Белки, для которых можно оценить вероятность достоверности изменения уровня модификации при ишемическом инсульте (продолжение)

№	Uniprot ID	Название белка (по Uniprot)	Пептид	Число наблюдений				<i>p</i> (для сравнения относительных значений)			<i>p</i> (для сравнения абсолютных значений)		
				IP	CL	Sh.C	CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C	IP-CL	IP-Sh.C	IP-CL+Sh.C
35	E9PUL5	Proline-rich transmembrane protein 2	A(+42.01)ASSSQVSEM(+15.99)K	3	1	2	3			1,000			1,000
36	E9PUL5	Proline-rich transmembrane protein 2	A(+42.01)ASSSQVSEMKGVEDSSK	3	2	1	3			0,200			0,200
37	P20444	Protein kinase C alpha type	A(+42.01)DVYPANDSTASQDVANR	4	3	5	8	0,400	0,905	0,570	0,857	1,000	0,933
38	P52480	Pyruvate kinase PKM	AGK(+14.02)PVLCATQMLESMLK	4	5	5	10	1,000	0,413	0,635	0,286	0,111	0,106
39	O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	NYLEQPGK(+14.02)ECVQPATK	4	6	3	9	0,257	0,400	0,199	0,762	0,857	0,710
40	Q6PIC6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	K(+14.02)YNTDCVQGLTHSK	7	5	5	10	1,000	0,876	0,962	0,876	0,755	0,962
41	Q60864	Stress-induced-phosphoprotein 1	LLK(+14.02)EQER	5	1	1	2			0,381			0,571
42	O88935	Synapsin-1	DASPGR(+14.02)GSHSQSSSPGALTGR	6	5	5	10	0,537	0,931	0,635	0,662	0,537	0,958
43	O88935	Synapsin-1	QSRPVAGGPGAPPAAR(+14.02)PPASPSRQR	6	6	6	12	0,180	0,093	0,067	0,485	0,699	0,494
44	P80316	T-complex protein 1 subunit epsilon	A(+42.01)SVGTALAFDEYGRPFLLK	3	1	2	3			0,700			0,700
45	A2ASS6	Titin	EAK(+114.04)VTETAR	3	4	3	7	0,400	0,400	0,267	0,857	0,400	0,517
46	A2ASS6	Titin	K(+42.01)PEATAVPELPEK	2	2	3	5			0,095			0,095
47	A2ASS6	Titin	RHDK(+14.02)PDFER	5	3	3	6	0,786	0,571	0,931	0,571	1,000	0,662
48	A2ASS6	Titin	TTPTTLALEK(+42.01)TK	3	1	2	3			0,700			1,000
49	Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	A(+42.01)SGADSKGDDLSTALLK	3	1	3	4		0,400	0,400		1,000	1,000
50	Q9Z1Q9	Valine--tRNA ligase	S(+42.01)LLYVSPHPDAFPSLR	3	6	3	9	0,381	1,000	0,600	0,548	0,400	0,373
51	Q99KC8	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A	SLR(+14.02)VPAYDLCSAESANLVLK	3	1	2	3			0,700	0,786	0,381	0,421

Примечание. Число наблюдений: IP – образцы мозга из правого полушария в зоне инфаркта; CL – образцы мозга из левого, не затронутого инфарктом, полушария; Sh.C – образцы мозга контрольных мышей после мнимой операции; *p* – вероятность совпадения выборки по критерию Манна-Уитни; *x* – удаление повторов при сравнении выборок для абсолютных значений.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://pbmc.ibmc.msk.ru)).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Скворцов В.С., Иванова Я.О., Воронина А.И. (2021) Биоинформатическая идентификация белков с меняющимся уровнем посттрансляционных модификаций при экспериментальном ишемическом инсульте у мышей. Биомедицинская химия, **67**(6), 475-484. [Skvortsov V.S., Ivanova Ya.O., Voronina A.I. (2021) The bioinformatic identification of proteins with varying levels of post-translational modifications in experimental ischemic stroke in mice. Biomeditsinskaya khimiya, **67**(6), 475-484.] DOI: 10.18097/PBMC20216706475
2. Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Годовикова Т.С. (2009) Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков. Acta Naturae, **1**(3), 32-56. [Knorre D.G., Kudryashova N.V., Godovikova T.S. (2009) Chemical and functional aspects of posttranslational modification of proteins. Acta Naturae, **1**(3), 29-51.] DOI: 10.32607/20758251-2009-1-3-29-51
3. Кисриева Ю.С., Петушкова Н.А., Саменкова Н.Ф., Кузнецова Г.П., Ларина О.В., Теряева Н.Б., Усачев Д.Ю., Згода В.Г., Карузина И.И. (2019) Сравнительный анализ модификаций протеома плазмы крови больных церебральной ишемией на основе метода ВЭЖХ-МС/МС. Биомедицинская химия, **65**(3), 251-258. [Kisrieva Y.S., Petushkova N.A., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Larina O.B., Teryaeva N.B., Usachev D.Yu., Zgoda V.G., Karuzina I.I. (2019) Comparative analysis of post-translational modifications in plasma proteome of patients with cerebral ischemia based on HPLC-MS/MS method. Biomeditsinskaya khimiya, **65**(3), 251-258.] DOI: 10.18097/PBMC20196503251
4. Simats A., Ramiro L., García-Berrocso T., Briansó F., Gonzalo R., Martín L., Sabé A., Gill N., Penalba A., Colomé N., Sánchez A., Canals F., Bustamante A., Rosell A., Montaner J. (2020) A mouse brain-based multi-omics integrative approach reveals potential blood biomarkers for ischemic stroke. Mol. Cell. Proteomics, **19**(12), 1921-1936. DOI: 10.1074/mcp.RA120.002283
5. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. (2003) PEAKS: Powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., **17**(20), 2337-2342. DOI: 10.1002/rcm.1196
6. The UniProt Consortium (2020) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Res., **49**(D1), D480-D489. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100
7. Mo Z., Zeng Z., Liu Y., Zeng L., Fang J., Ma Y. (2022) Activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway as a promising therapeutic candidate for cerebral ischemia/reperfusion injury. Front. Pharmacol., **13**, 914537. DOI: 10.3389/fphar.2022.914537
8. Song S., Huang H., Guan X., Fiesler V., Bhuiyan M., Liu R., Jalali S., Hasan M.N., Tai A.K., Chattopadhyay A., Chaparala S., Sun M., Stolz D.B., He P., Agalliu D., Sun D., Begum G. (2021) Activation of endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by protective astrocytes repairs BBB damage in ischemic stroke. Progress Neurobiology, **199**, 101963. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101963
9. Yuan D., Hu K., Loke C.M., Teramoto H., Liu C., Hu B. (2021) Interruption of endolysosomal trafficking leads to stroke brain injury. Experimental Neurology, **345**, 113827. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113827
10. Singh V., Mishra V.N., Chaurasia R.N., Joshi D., Pandey V. (2019) Modes of calcium regulation in ischemic neuron. Ind. J. Clin. Biochem., **34**(3), 246-253. DOI: 10.1007/s12291-019-00838-9
11. Uphaus T., Bittner S., Gröschel S., Steffen F., Muthuraman M., Wasser K., Weber-Krüger M., Zipp F., Wachter R., Gröschel K. (2019) NfL (neurofilament light chain) levels as a predictive marker for long-term outcome after ischemic stroke. Stroke, **50**(11), 3077-3084. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.026410
12. Kitagawa K., Matsumoto M., Sobue K., Tagaya M., Okabe T., Niinobe M., Ohtsuki T., Handa N., Kimura K., Mikoshiba K., Kamada T. (1992) The synapsin I brain distribution in ischemia. Neuroscience, **46**(2), 287-299. DOI: 10.1016/0306-4522(92)90051-3
13. Kim J.Y., Kim J.W., Yenari M.A. (2020) Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury. Neurosci. Lett., **715**, 134642. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134642
14. Zhang X., Connolly J., Levitan E.S., Sun D., Wang J.Q. (2021) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in cerebrovascular diseases. Translational Stroke Research, **12**(4), 513-529. DOI: 10.1007/s12975-021-00901-9

Поступила в редакцию: 23. 05. 2022.

После доработки: 17. 06. 2022.

Принята к печати: 19. 06. 2022.

## ACETYLATION, METHYLATION, AND UBIQUITINATION OF PROTEINS IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE IN MICE: A BIOINFORMATICS ANALYSIS

*V.S. Skvortsov\*, Ya.O. Ivanova, A.I. Voronina*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: vladlen@ibmh.msk.su

The experimental results available in the ProteomeXchange database (accession code PXD016538) (Simats *et al.* (2020) *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(12), 1921-1936) obtained using a comprehensive multi-omics approach were analyzed in mouse blood to identify potential biomarkers of ischemic stroke. Acetylation, methylation, and ubiquitination were considered as post-translational modifications. The analysis of the significance of changes in the level of protein modification was evaluated for ischemic tissue in comparison with tissue undamaged by stroke and control taken from mice after sham operation. At the level of statistically significant differences according to the Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ), 2 proteins were found (Q02248 and Q8BL66); for additional 7 proteins, the differences were at the level of a statistical trend ( $p < 0.1$ ). For 7 of 9 selected proteins there are reports in the literature, for their association with cerebral ischemia.

**Key words:** posttranslational modifications; ischemic stroke; bioinformatics

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

Received: 23.05.2022; revised: 17.06.2022; accepted: 19.06.2022.