

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ С МЕНЯЮЩИМСЯ УРОВНЕМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПРИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ У ЧЕЛОВЕКА

Ю.В. Мирошниченко*, А.В. Рыбина, В.С. Скворцов

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

Проанализированы масс-спектрометрические данные, полученные при анализе тканей гиппокампа пациентов склеротической и несклеротической височной эпилепсии и без неё для выявления различий в уровне посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков. Исходные протеомные данные, полученные Mathoux и соавт. [DOI: 10.1172/jci.insight.188612], были депонированы в репозитории PRIDE (идентификатор PXD064519). В результате сравнительного протеомного анализа образцов отобрано 53 белка с ПТМ (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и цитруллинирование), имеющих существенные изменения в уровне отдельных модифицированных пептидов. Согласно литературным данным, все 53 белка вовлечены в процессы, связанные с неврологическими заболеваниями в целом или эпилептогенезом в частности. Проведённый анализ позволил выявить ПТМ белков, которые могут играть важную роль в патогенезе развития неврологических заболеваний.

Ключевые слова: посттрансляционные модификации; эпилепсия; биоинформатика

DOI: 10.18097/PBMCR1612

ВВЕДЕНИЕ

Данное исследование продолжает серию наших предыдущих работ [1, 2] по биоинформатическому реанализу данных, депонированных в репозитории PRIDE [3]. Как правило, авторы масштабных экспериментальных работ с использованием масс-спектрометрии (МС) планируют эксперимент и последующий анализ полученных данных так, чтобы максимально точно и с наименьшими временными затратами получить интересующие их данные. Однако в исходных данных эксперимента содержится ещё много информации, которая может быть извлечена при обработке данных с другими параметрами или другими методами. В частности, во многих работах по идентификации белков или сравнении спектров белков в норме и патологии авторы либо полностью игнорируют весь спектр посттрансляционных модификаций (ПТМ), либо учитывают только часть из них, согласно своему видению проблемы. В то же время роль ПТМ трудно переоценить [4, 5], а информация об их наличии может представлять интерес в контексте формирования гипотезы о роли различных ПТМ при патологии или планирования более специализированных экспериментов для подтверждения полученной информации. Интерес также представляют и данные об изменении количества конкретных наблюдаемых ПТМ. Современные технологии профилирования всего протеома с использованием МС позволяют с высокой точностью и воспроизводимостью получать количественные данные о каждом конкретном ионе даже без предварительного

обогащения модифицированных белков/пептидов и без использования изотопных меток [6].

Болезни нервной системы входят в первую тройку групп заболеваний, на развитие патологического процесса которых влияют нарушения ПТМ [7]. Височно-долевая эпилепсия (ВДЭ) — одно из самых распространённых хронических заболеваний нервной системы у взрослых [8]. Преобладающим патологическим изменением при эпилепсии, особенно при ВДЭ, является склероз гиппокампа, однако патофизиологический механизм эпилептического повреждения ткани гиппокампа остаётся неясным [9].

В данной работе мы проанализировали набор данных, депонированных в репозитории PRIDE [3] с идентификатором PXD064519. В оригинальной работе [8] на образцах тканей гиппокампа от мышей и людей с лекарственно-устойчивой височной эпилепсией был проведён комплексный сравнительный анализ профилирования внутренней модификации матричной РНК — метилирования остатков аденозина в положении N^6 (м6А). Авторы работы [8] показали, что в тканях, поражённых эпилепсией, нарушены метаболические и аутофагические пути, которые могут быть напрямую связаны с обработкой (м6А). При протеомном анализе образцов гиппокампа человека была выбрана варибельная модификация с N-концевым ацетилированием белка, но количественные изменения рассматривали для белков в целом. Другие физиологические ПТМ авторы не учитывали, поэтому нами были проанализированы исходные данные [8] с целью поиска белков с различным уровнем ПТМ в опыте и контроле.



МЕТОДИКА

В работе [8] использовали постоперационные человеческие ткани гиппокампа, удалённого при склеротической (S) (n=7) и несклеротической (NS) (n=7) височной эпилепсии, а также взятые при аутопсии у пациентов без эпилепсии в качестве контрольных (C) образцов (n=10). Этапы извлечения образцов ткани у пациентов с эпилепсией, получение контрольных образцов, пробоподготовка и протеомный анализ подробно описаны авторами оригинальной экспериментальной работы [8].

В нашей работе идентификация пептидов на основе необработанных (raw) файлов была выполнена заново с использованием программы “PEAKS Studio 13” [10]. Поиск проводили по аминокислотным последовательностям белков человека (*Homo sapiens*, UniProtKB/Swiss-Prot release 2025_04, 83587 записей [11]); расщепляющий фермент — трипсин; точность совпадения теоретической и экспериментальной массы пептида (peptide mass tolerance) — 10 ppm; точность совпадения теоретической и экспериментальной массы фрагментарных ионов (fragment mass tolerance) — 0,02 Да; количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином — 2; количество вариабельных модификаций на пептид — 2 (при окончательном анализе рассматривали пептиды с единственной исследуемой модификацией). В качестве фиксированной модификации было установлено карбамидометилирование цистеина, в качестве вариабельных модификаций выбраны: (1) окисление метионина (не рассматривалась как значимая), (2) фосфорилирование серина, треонина и тирозина, (3) метилирование лизина, аргинина и гистидина, (4) ацетилирование лизина и N-концевого пептида белка, (5) цитруллинирование аспарагина. Все опции дополнительной фильтрации и образования химерных спектров были отключены. Модификации остатков лизина и аргинина рассматривали только в случае, если модифицированный остаток не был первым или последним остатком в пептиде. Уровень ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) для окончательного отбора идентифицированных пептидов — 0,1%. Идентификацию проводили для каждой пробы независимо.

С использованием хроматографических данных из необработанных (raw) файлов средствами программы Progenesis LC-MS [12] было проведено выравнивание всего пространства первичных ионов и нормализация величины площади под пиком для каждого из первичных ионов (Normalized abundance, NA). Данные по идентификации пептидов импортировали в проект программы Progenesis LC-MS, объединив результаты выравнивания с результатами идентификации пептидов для последующего сравнения количественных данных проб гиппокампа.

При анализе достоверности изменения уровня пептидов с ПТМ оценивали показатели дисперсионного анализа (ANOVA), выполненного вычислительными алгоритмами, реализованными

в программе Progenesis LC-MS. Изменение уровня модифицированных пептидов считали достоверным при Anova p -value < 0,05 и Max fold change ≥ 2 . Max fold change — мера, которая описывает, насколько изменится средняя величина NA между контрольной (C) и исследуемыми группами (S, NS); например, для двух значений NA_C и NA_S диапазон изменения NA_S в отношении NA_C , есть NA_S/NA_C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После выравнивания и нормализации необработанных данных в программе Progenesis LC-MS и объединения с результатами идентификации пептидов было отобрано 212985 первичных ионов, из которых 22354 ионов были идентифицированы. Всего было определено 15576 последовательностей пептидов для 2560 белков. При окончательном отборе рассматривали белки, для количественного определения которых программой Progenesis LC-MS было использовано не менее 6 пептидов. Таблица с полным набором данных по идентификации представлена в Дополнительных материалах.

Идентифицированные пептиды с ПТМ, соответствующие условиям “Anova p -value < 0,05” и “Max fold change ≥ 2 ” при оценке среднего NA между исследуемыми группами и контролем, приведены в таблице 1. Пептидов с метилированием гистидина при заданных параметрах отбора идентифицировано не было. Если пептид в таблице указан более одного раза, то данные приведены для ионов различного заряда. Суммировать данные напрямую возможно, так как распределение пептида между ионами разного заряда не зависит от его концентрации в пробе [13], но так как в каждом конкретном случае нет уверенности, что идентифицированы все ионные состояния, это может быть источником ошибок при интерпретации результатов.

Как видно из таблицы 1, существенных количественных изменений относительно общего содержания белка не было выявлено только для пептидов № 61, 69, 71 с метилированием остатка лизина и 2-мя N-концевыми ацетилированиями соответственно. Для остальных изменение среднего NA пептида между опытом (NS и S) и контролем (C) отличалось от того же параметра для белка не менее чем в 1,2 раза. Например, для пептида AEEAKDEPPSEGEAEIEEK (№ 9, P07196) с фосфорилированием по остатку серина такая разница составила 139,4 раза. Однако в данном случае этот эффект, вероятно, связан с тем, что данный пептид является “недорезом” (пропущенным сайтом гидролиза при трипсинолизе), а кроме того содержит большое число отрицательно заряженных остатков (см. далее раздел, посвящённый обсуждению рисунков 1 и 2). Для пептидов № 1–3, 25–38, 47, 52, 67, 68 был отмечен факт увеличения количества в опыте, в то время как для самого белка в большинстве случаев было отмечено незначительное уменьшение количества. Обратное соотношение было выявлено для пептидов № 10, 11, 19, 62, 63, 78–85, 88, 89 — уменьшение

Таблица 1. Идентифицированные пептиды с ПТМ, соответствующие условиям Апоча p -value < 0,05 и Max fold change ≥ 2 при оценке среднего NA между исследуемыми группами (S, NS) и контролем (C)

ID белка в UniProt	Название белка в UniProt	№	Последовательность модифицированного пептида	Апоча p -value пептида	Max fold change пептида	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для пептида	Max fold change белка	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для белка
Фосфорилирование (S,T,Y+79,97)								
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	1	EGEERTVYSD E EEPRKDESARK	0,0488	2,1	NS	1,5	C
O15075	Serine/threonine-protein kinase DCLK1	2	SPSP S PTSPGSLRK	0,0039	2,8	NS	1,2	C
		3	SSQHGG S STSLASTK	0,0004	31,2	S		
O75363	Breast carcinoma-amplified sequence 1	4	TTPPEPEPTGAPQK	0,0007	4,7	NS	2,1	NS
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	5	ITLPVDFVITADK	0,0001	15,6	C	1,2	C
P02671	Fibrinogen alpha chain	6	AD S GE G DFLAEGGGVGR	1,99E-06	482,7	S	5,4	S
P05060	Secretogranin-1	7	WAEGGGH S RER	0,0022	17,6	C	1,2	S
P07196	Neurofilament light polypeptide	8	AEEAKDEPP S EGEAEEEEK	1,07E-06	32,9	NS	1,2	NS
		9	AEEAKDEPP S EGEAEEEEK	6,96E-06	167,3	NS		
P07197	Neurofilament medium polypeptide	10	KAESPVK E EAVA E VVT	1,69E-06	15,3	C	1,5	NS
P12036	Neurofilament heavy polypeptide	11	SDQAE E GG S EK	0,0063	105,6	C	1,3	NS
		12	EEAR S PADK F PEK	0,0075	3,2	NS		
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	13	DKEV S DD E AEEKEDK E EEK	0,0122	2,0	C	1,3	C
		14	ERDK E V S DD E AEEK	3,35E-06	2,6	C		
		15	ERDK E V S DD E AEEK	0,0001	2,3	C		
		16	ERDK E V S DD E AEEKEDK E EEK	0,0200	2,2	C		
		17	ERDK E V S DD E AEEKEDK E EEK	0,0131	2,2	C		
		18	ERDK E V S DD E AEEKEDK E EEK	0,0129	2,2	C		
		19	ETSP E SSLIQ E IAVK	0,0471	2,1	C		
		20	KETSP E SSLIQ E IAVK	0,0375	3,1	S		
P11137	Microtubule-associated protein 2	21	GHDLSPLASDILNT S GSMD E GDDYLPATTPALEK	0,0015	81,6	S	1,3	S
		22	GHDLSPLASDILNT S GSMD E GDDYLPATTPALEK	0,0100	10,13	S		
		23	KTEVQA H S PSRK	0,0073	2,6	S		
		24	KTEVQA H S PSRK	0,0400	3,4	S		

БЕЛКИ С МЕНЯЮЩИМСЯ УРОВНЕМ ПТМ ПРИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Таблица 1. Идентифицированные пептиды с ПТМ, соответствующие условиям Аноа p -value < 0,05 и Max fold change ≥ 2 при оценке среднего NA между исследуемыми группами (S, NS) и контролем (C) (продолжение)

ID белка в UniProt	Название белка в UniProt	№	Последовательность модифицированного пептида	Аноа p -value пептида	Max fold change пептида	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для пептида		Max fold change белка	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для белка	
						S	C		S	C
P46821	Microtubule-associated protein 1B	25	AD <u>S</u> RESLKRAAKPLPSK	0,0099	2,6	S	C	1,1	C	NS
		26	SPSDSGYSYETIGK	2,77E-07	14,7	NS	C			
		27	TTK <u>T</u> PE D GGDYSYEIEK	0,0020	30,4	NS	C			
		28	TTR <u>T</u> PEEGGYSDISEK	1,10E-09	34,3	NS	C			
		29	TTR <u>T</u> PEEGGYSDISEK	0,0003	69,3	NS	C			
		30	TT <u>S</u> PPEVSGYSYEEK	0,0046	2,6	NS	C			
		31	VL <u>S</u> PLR <u>S</u> PLIGSESAYESFLSADDK	0,0001	3,7	S	C			
		32	AELEEMEEVHP <u>S</u> DEEEEDATK	0,0096	22,6	NS	C			
		33	CL <u>S</u> PDDSTVK	0,0002	3,0	S	C			
		34	DRGLD <u>S</u> GAE T EEEEK	0,0356	4,6	NS	C			
P78559	Microtubule-associated protein 1A	35	DRGLD <u>S</u> GAE T EEEEK	0,0003	7,8	S	C	1,1	C	NS
		36	EL <u>S</u> SEPQ <u>T</u> PPAQK	0,0001	33,4	S	C			
		37	SHWDDSTSDSELEK	1,49E-11	67,0	NS	C			
		38	YHG <u>H</u> MSDPGVSYR	3,29E-05	3,6	S	C			
P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	39	K <u>M</u> SSSGAK	0,0355	3,9	NS	C	1,6	NS	C
		40	<u>S</u> HEAEVLK	0,0002	5,4	S	C			
P16949	Stathmin	41	AGE <u>T</u> PSEEK	0,0464	3,5	S	C	2,1	NS	C
		42	NV <u>T</u> ESPSFSAGDNPVLFSSDFR	0,0013	48,0	NS	C			
P17677	Neuromodulin	43	VMIPTAPHTYEYIES <u>S</u> P	0,0002	3,3	NS	C	1,3	NS	NS
		44	AAF <u>S</u> KDE <u>S</u> KEPIVEVR	2,03E-06	3,3	NS	C			
P20916	Myelin-associated glycoprotein	45	RD <u>S</u> RDVDDEEK	6,32E-07	9,5	S	C	3,7	S	C
		46	RD <u>S</u> RDVDDEEK	1,01E-05	4,5	S	C			
P961E9	Microtubule-associated protein 6					NS	C	1,2	NS	C
P13591	Neural cell adhesion molecule 1					NS	C	1,1	S	NS
P16157	Ankyrin-1					S	C	3,7	S	C
						S	C			
P28482	Mitogen-activated protein kinase 1					S	C	1,3	C	S

Таблица 1. Идентифицированные пептиды с ПТМ, соответствующие условиям Апоча p -value < 0,05 и Max fold change ≥ 2 при оценке среднего NA между исследуемыми группами (S, NS) и контролем (C) (продолжение)

ID белка в UniProt	Название белка в UniProt	№	Последовательность модифицированного пептида	Апоча p -value пептида	Max fold change пептида	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для пептида	Max fold change белка	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для белка	
P29966	Multisubstrated alanine-rich C-kinase substrate	48	GERAAAAAREAGAS <u>P</u> VEK	0,0002	3,9	S C	1,5	S C	
P35611	Alpha-adducin	49	AAVVT <u>S</u> PPPTTAPHK	0,0055	3,3	S C	1,1	S C	
		50	QK <u>S</u> EEENLDEAR	0,0002	4,5	NS C			
P63010	AP-2 complex subunit beta	51	HLPIHHG <u>S</u> TDAGDSPVGGTTATNLE	2,37E-10	46,3	C NS	1,2	C NS	
Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	52	AQTLPTSVV <u>T</u> ITSE <u>S</u> SPGKR	4,61E-07	5,1	NS C	1,3	C NS	
Q08495	Dematin	53	ST <u>S</u> PPSPPEVWADSR	0,0003	4,0	NS C	2,5	NS C	
Q15121	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	54	DIIRQ <u>P</u> SEEEIHK	2,45E-09	3,4	NS C	1,3	NS S	
		55	LTR <u>P</u> SAK	0,0020	3,6	NS C			
Q7Z6L0	Proline-rich transmembrane protein 2	56	AHSGHP <u>G</u> SPR	0,0005	7,9	S C	1,0	S NS	
Q96GW7	Brevican core protein	57	DVLEGD <u>S</u> SEDR	0,0372	4,4	C NS	1,2	C NS	
Q9UEY8	Gamma-adducin	58	IEEVL <u>S</u> PEGSPSK <u>S</u> PSK	0,0001	5,5	S C	1,1	S C	
Q9UK76	Jupiter microtubule associated homolog 1	59	RNS <u>S</u> EASSGDFLDLK	1,97E-05	11,3	NS C	2,1	NS C	
Q9Y2J0	Rabphilin-3A	60	WHQLQENHVS <u>D</u>	0,0185	2,3	C NS	1,3	C NS	
Метилирование (K,R+14,02)									
O60664	Perilipin-3	61	TVCDAA <u>E</u> KGVR	0,0243	2,0	NS C	2,1	NS C	
P10636	Microtubule-associated protein tau	62	<u>S</u> KDGTGSDDK	0,0140	4031,4	C NS	1,2	S C	
		63	<u>S</u> KDGTGSDDKK	0,0372	125,0	C S			
Q13554	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	64	YPPFWDEQH <u>K</u> LYQQIKAGAYDFPSP <u>E</u> WDIVTPEAK	0,0006	26,9	C NS	1,9	C NS	
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	65	IVAPPGGR <u>R</u> ANITSLG	0,0010	3,5	S C	1,1	NS S	
Ацетилирование (K,N-term+42,01)									
Q7L266	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	66	GA <u>Q</u> KTDCQK	2,16E-05	2,5	S C	1,3	S C	
Q9NVA2	Septin-11	67	DD <u>S</u> YKPIVEYIDAQFEAYLQEE <u>L</u> KIK	0,0210	4,5	S C	1,1	C S	

БЕЛКИ С МЕНЯЮЩИМСЯ УРОВНЕМ ПТМ ПРИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Таблица 1. Идентифицированные пептиды с ПТМ, соответствующие условиям Апоча p -value < 0,05 и Max fold change ≥ 2 при оценке среднего NA между исследуемыми группами (S, NS) и контролем (C) (продолжение)

ID белка в UniProt	Название белка в UniProt	№	Последовательность модифицированного пептида	Апоча p -value пептида	Max fold change пептида	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для пептида	Max fold change белка	Группа с самым высоким и самым низким средним NA для белка
Q9ULV4	Coronin-1C	68	LHERK K CEPIITVPR	0,0004	4,8	NS C	1,4	C NS
P04040	Catalase	69	ADSRDPASDQM Q HWK	4,00E-05	3,8	NS C	3,4	NS C
P07197	Neurofilament medium polypeptide	70	SYTLDSLGNPSAYRR	0,0050	2,7	NS C	1,5	NS C
P16949	Stathmin	71	ASSDIQVK	0,0166	2,2	NS C	2,1	NS C
P17252	Protein kinase C alpha type	72	ADVFPNDSTASQDVANR	0,0247	2,4	C S	1,6	C NS
P27816	Microtubule-associated protein 4	73	ADLSADALTEPSPDIEGEIKR	1,50E-06	24,8	S C	1,7	NS C
Q16352	Alpha-internexin	74	SFGSEHYLCSSSSYR	0,0004	2,6	S C	1,3	NS C
		75	SFGSEHYLCSSSSYRK	0,0021	2,1	S C		
Q9BY11	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	76	SSSYDEASLAPETTTDSFWGVNYKR	0,0003	3,3	C NS	1,3	C NS
Q9NQ66	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	77	AGAQGVHALQLKPCVSDSLK	0,0447	2,4	C NS	1,2	C NS
Q9Y2J2	Band 4,1-like protein 3	78	TTESGDSSESKPDQEAEPQEAAGAQQGR	1,50E-05	79,8	C S	1,3	NS C
Цитруллинирование (R+0,98)								
O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	79	AISSPTVSR L TDTTK	0,0057	5,3	C S		
		80	AISSPTVSR L TDTTK	2,00E-06	5,3	C S	1,3	NS C
		81	ERFDPSGK	0,0224	2,5	C NS		
P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	82	STLAR R VIVDK	5,99E-07	27,5	C NS		
		83	TLFIL R GLPGSGK	0,0042	110,0	C NS	1,6	NS C
		84	TLFIL R GLPGSGK	4,00E-05	33,8	C NS		
P12277	Creatine kinase B-type	85	VLTPELYAEL R AK	0,0179	2,3	C NS	1,1	S C
P50993	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	86	ILDRCS T ILVQGK	0,0058	2,5	C S	1,2	C NS
Q13885	Tubulin beta-2A chain	87	GHYTEGAELVDSVLDVV R K	0,0354	3,7	C S	1,2	C NS
Q8TAM6	Ermin	88	GHQAAEIEI W LGF R K	2,06E-05	4,6	C S	3,9	NS C
Q9H4G4	hogenesis-related protein 1	89	EAOQQSEALAST R ILK	4,73E-06	9,7	C S	1,9	NS C

количества в опыте, и несущественное увеличение количества для белка в целом. Например, для пептида SKDGTGSDDK (№ 62, P10636 — тау-белок, ассоциированный с микротрубочками) с метилированием по остатку лизина среднее NA в опыте в 4031,4 раз меньше по сравнению с контролем, в то время как количество самого белка в опыте немного больше, чем в контроле. Метилирование тау-белка является одним из важных в его физиологическом состоянии и может конкурировать с другими ПТМ. Глобальное метилирование в нейронах, микроглии и астроцитах участвует во множестве клеточных функций [14].

На рисунке 1 для наглядности приведены примеры распределения величины NA для 4 пептидов по каждой пробе из опытных (NS и S) и контрольной групп. Для сравнения представлены данные как для модифицированной формы пептида, так и немодифицированной формы, обнаруженной в той же пробе. Доля пептида VLTPELYAELR(+0.98)AK в контрольной группе сравнима с количеством пептида VLTPELYAELRAK (без ПТМ), в то время как в группах NS и S количество пептида с ПТМ уменьшается. Следует отметить, что пептид VLTPELYAELRAK, очевидно, представляет собой “недорез” и в пробе идентифицирован и пептид VLTPELYAELR со сравнимыми величинами NA ($6,5 \times 10^8$ для ионов 2+ и $2,8 \times 10^6$ для ионов 3+). Другой вариант — пептид DRGLDS(+79.98)GAETEEEEK, где в контрольной группе фосфорилированного пептида меньше, чем в опытных, в которых их представленность равная. Как и в предыдущем случае в пробах зарегистрирован ион 2+ для пептида GLDSGAETEEEEK (NA ~ $6,6 \times 10^5$). Учитывая, что при гидролизе трипсином следовало бы ожидать, что количество “недорезанных” пептидов должно быть меньше пептидов, соответствующих полному гидролизу, то, вероятно, существенная часть пептидов не зарегистрирована, так как, возможно, получает при ионизации заряд 1+ (в работе [8] такие ионы не регистрировали). Пептид DIIRQPS(+79.97)EEEEIK примечателен тем, что пептид QPSEEEIK не идентифицирован ни в какой форме, но идентифицирован двойной “недорез” в фосфорилированной форме YKDIIRQPS(+79.97)EEEEIK (ион 3+, NA ~ $8,5 \times 10^5$), но достоверного различия его уровня между группами не показано, хотя тенденция наблюдается та же — фосфорилированного пептида в контрольной группе меньше. Все 3 пептида содержат большое число отрицательно заряженных аминокислотных остатков, что, возможно, влияет на ионизацию.

И наконец, рассмотрим пептид AEEAKDEPPS(+79.97)EGEAEEEEEK, который обсуждался выше. Если исключить возможные особенности пробоподготовки в различных группах, а также ошибки выравнивания и идентификации, у нас нет разумного объяснения, почему в контрольной группе количество пептида с одним “недорезом” и в фосфорилированной форме, и без ПТМ настолько меньше чем в группах NS и S. Этот вопрос требует целенаправленной экспериментальной проверки.

Если рассмотреть не абсолютные значения NA, а соотношение величин NA для ионов 3+ пептида с ПТМ и пептида без ПТМ (рис. 2), то различие средних значений не значимо (недостаточная регистрация ионов 2+ не позволяет считать сравнение адекватным). Для остальных 3 пептидов, использованных в примере, результаты совпадают с данными для абсолютных значений. К сожалению, использовать данное отношение не всегда возможно, так как немодифицированный пептид может не регистрироваться, как, например, для случаев ацетилирования, метилирования или цитруллинирования, когда немодифицированный пептид в отличие от модифицированного подвергается гидролизу трипсином, а число возможных “недорезов” может сильно варьировать от пробы к пробе.

Наибольшее число пептидов, представленных в таблице 1, имеют в качестве ПТМ фосфорилирование. Так, было идентифицировано два пептида астроцитарного фосфопротеина PEA-15 (PEA15) (Q15121), фосфорилированных по остаткам серина (DIIRQPSEEEIK — S116, LTRIPSAK — S104). PEA15 — небольшой фосфопротеин, который участвует в эпилептогенезе, защищает астроциты от апоптоза, модулирует выживаемость и пролиферацию клеток. Эти функции зависят от дифференциального фосфорилирования, регулирующего пролиферативные и/или апоптотические сигналы в астроцитах после эпилептического статуса [15]. Другой пример — представители семейства ассоциированных с микротрубочками белков (АМБ) (P10636, P11137, P27816, P46821, P78559, Q96JE9), которые играют важную роль в процессах развития мозга, включая образование нейронов и синапсов, а также миелинизацию. Дестабилизация микротрубочек влияет на функции мозга, связанные с нейродегенеративными и психическими расстройствами, такими как когнитивные нарушения, проблемы с памятью, внимание [16]. Фосфорилирование АМБ в ответ на различные внеклеточные сигналы регулирует функции нейронов [17]. В таблице 1 пептидами с фосфорилированием представлены четыре АМБ из шести (P11137, P46821, P78559, Q96JE9), пептиды которых имеют фосфорилированные остатки. Другой широко распространённый цитоскелетный адаптерный белок, активность которого регулируется фосфорилированием, — дематин (Q08495). Дематин связывает и объединяет актиновые филаменты и является основным регулятором мобилизации кальция [18]. Белок гомолог 1, связанный с микротрубочками Юпитера (Q9UK76), активно экспрессируется во многих тканях человека, особенно в головном мозге, содержит участки фосфорилирования; фосфорилирование способствует прогрессии клеточного цикла и модулирует репликацию ДНК и процессы репарации [19].

Среди белков из таблицы 1 можно выделить группу белков цитоскелета, которые экспрессируются в нервных клетках и участвуют в поддержании их стабильности и правильной проводимости. Например, белки семейства нейрофиламентов (P07196, P07197, P12036) — основные белки

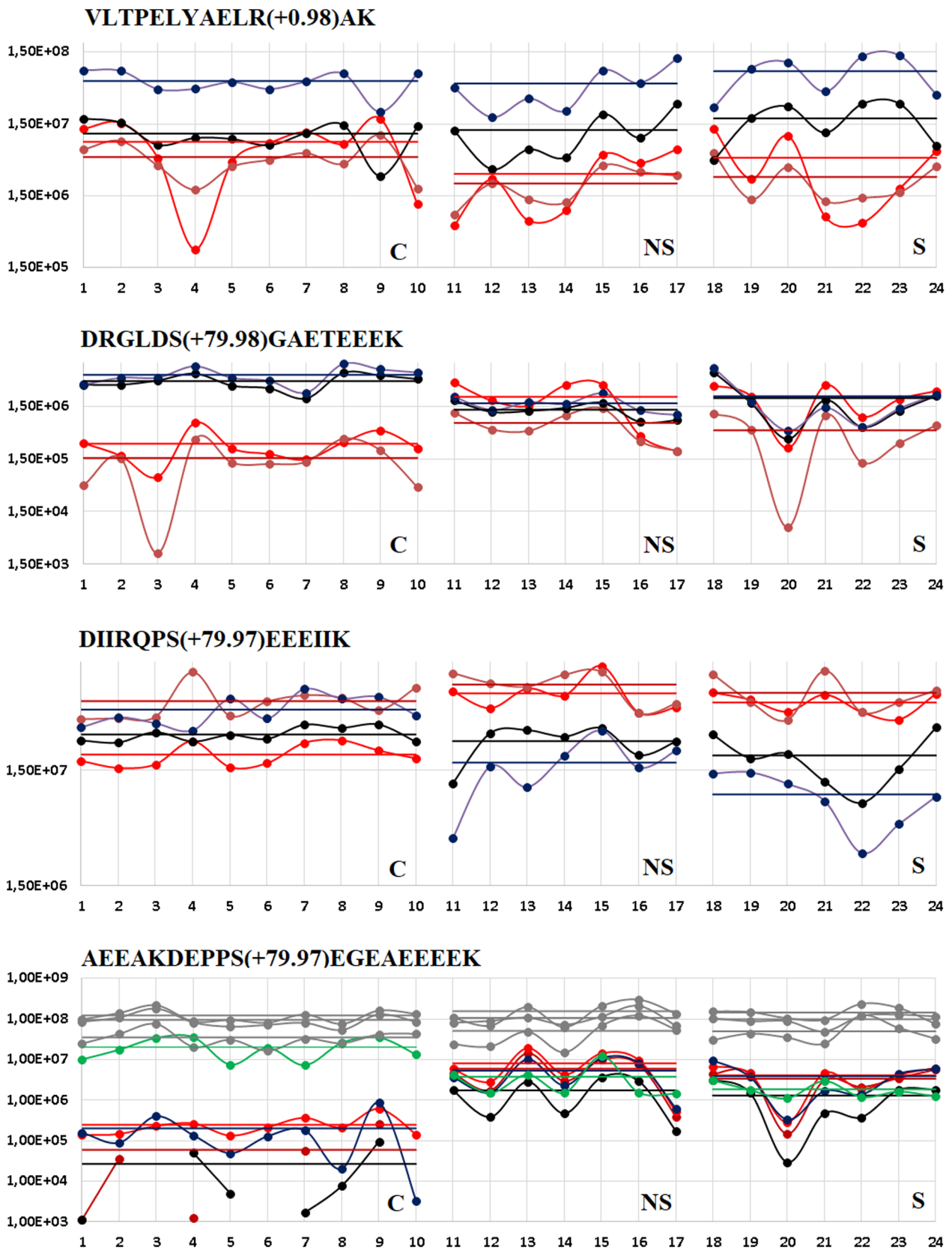


Рисунок 1. Пример, демонстрирующий изменения NA между группами проб (C, NS и S) для 4 пептидов. По оси абсцисс представлены номера проб, по оси ординат – величина NA в логарифмической шкале. Бордовым цветом отмечены данные для иона 2+ модифицированного пептида, красным – ионы 2+. Аналогично чёрным и синим цветом ионы 2+ и 3+ немодифицированной формы того же пептида. На диаграмме пептида AEEAKDEPPS(+79.97)EGEAEEEEK серым цветом отмечены 3 иона 2+ пептидов того же белка, не имеющих ПТМ и “недорезов”. Зелёным – ион 2+ пептида DEPPSEGEAEEEEK.

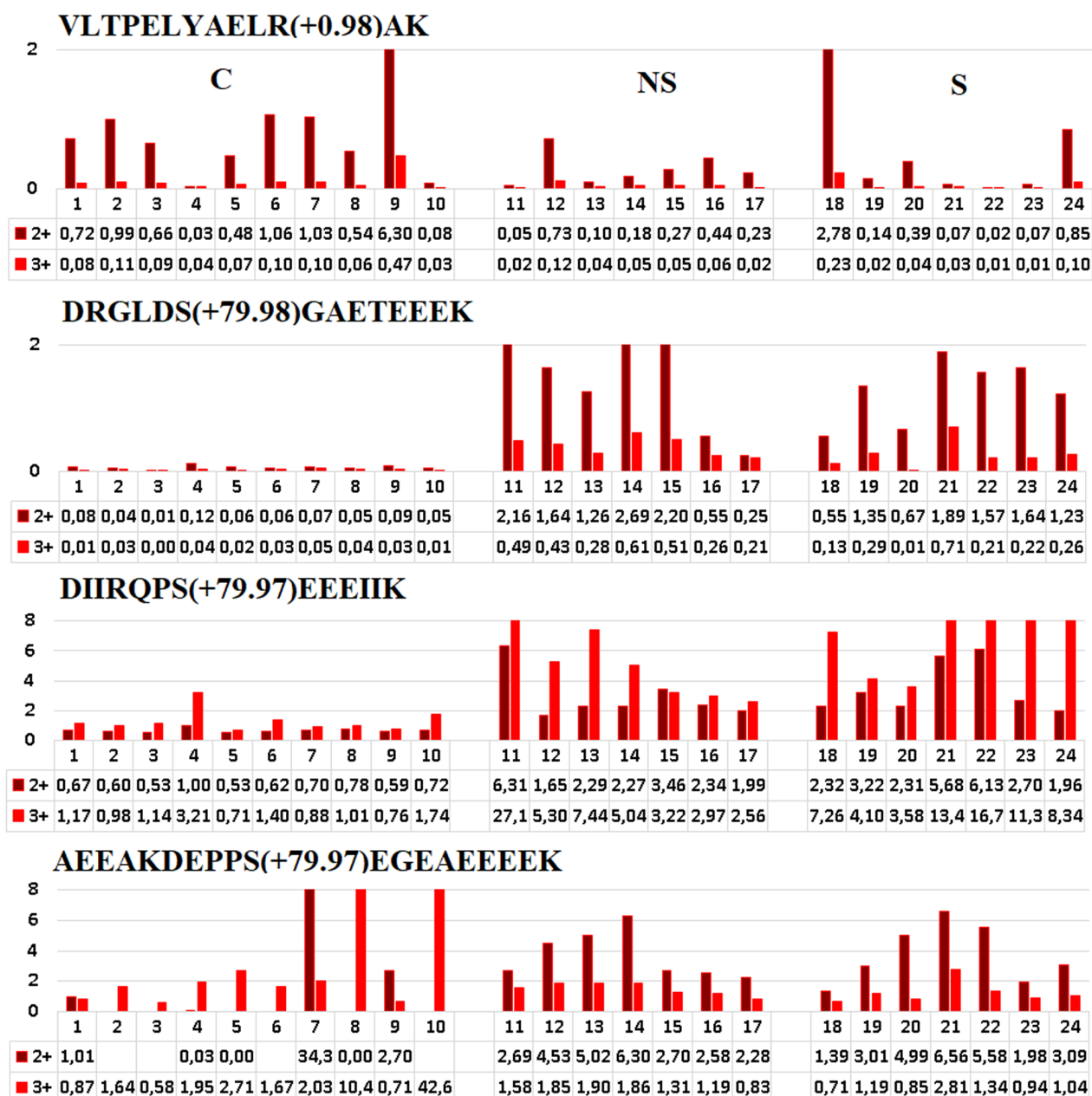


Рисунок 2. Пример, демонстрирующий изменения соотношения величин NA для ионов 2+ и 3+ пептида с ПТМ и пептида без ПТМ. По оси абсцисс представлены номера проб, по оси ординат – величина NA. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

цитоскелета в аксонах нейронов. Взаимодействие между нейрофиламентами и другими белками цитоскелета регулирует диаметр аксонов и аксоплазматический транспорт. Нарушение регуляции нейрофиламентов может привести к гибели нейронов и развитию эпилепсии, а также других заболеваний нервной системы [20]. Статмин (P16949) — эволюционно консервативный белок, участвующий в регулировке динамики микротрубочек. Повышение уровня статмина и снижение стабильности микротрубочек, особенно в островковой доле коры и гиппокампе, может играть важную роль в развитии страха при эпилепсии [21]. Белок септин-11 (Q9NVA2) локализуется совместно с микротрубочками и стрессовыми волокнами в различных линиях эпителиальных клеток, а изменения в растворимости

септина-11 могут нарушить функцию цитоскелета и привести к клеточной токсичности — механизму, установленному для протеинопатий при нейродегенеративных заболеваниях [22]. Ещё один компонент цитоскелета — коронин-1 (Q9ULV4) — активно экспрессируется в центральной нервной системе взрослого организма, связывает F-актин и играет важную роль в миграции клеток и морфогенезе головного мозга [23].

К другой группе можно отнести белки, задействованные в нейрогенезе, клеточной сигнализации и других нейрональных механизмах регуляции. Так, белок P13591 (невральная молекула межклеточной адгезии 1) обеспечивает распознавание и адгезию нейронов, участвует в росте аксонов, нейрональной синаптической

реконструкции, процессах миграции нейронов. Таким образом, белок P13591 способствует нейрогенезу и синаптической пластичности, например, после травмы головного мозга. У крыс с эпилепсией он играет важную роль в нарушении пространственной памяти [24]. Секретогранин-1 (P05060) взаимодействует и секретируется совместно с различными гормонами, регулирует уровень внутриклеточного кальция, клеточную сигнализацию, в том числе в клетках гиппокампа, что играет важную роль при различных неврологических заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, эпилепсия или шизофрения [25]. Богатый пролином трансмембранный белок 2 (Q7Z6L0) отвечает за стабильность нейронов, негативно влияя на внутреннюю возбудимость, вызывая плейотропные пароксизмальные синдромы, включая эпилепсию, кинезигенную дискинезию, эпизодическую атаксию и мигрень [26]. Синаптический белок рабфилин 3А (Q9Y2J0) опосредованно отвечает за синаптическую пластичность и когнитивные функции. Нарушения в гене *RPH3A*, кодирующем рабфилин 3А, связывают с нарушениями развития нервной системы, проявляющимися либо в виде лекарственно-устойчивой эпилепсии с умственной отсталостью, либо в виде расстройства аутистического спектра с нарушением способности к обучению [27]. Белок-медиатор ответа на коллапс 2 (Q16555) локализуется в основном в нервной системе, обладает высокой степенью консервативности, необходим для стимулирования роста аксонов и поддержания нейронной полярности в нейронах гиппокампа. Значительное снижение уровня этого белка может свидетельствовать о нейродегенерации, нарушении нейронной пластичности и проводящих путей головного мозга при мультисистемной атрофии, может быть вовлечён в этиологию эпилепсии и возрастного снижения когнитивных функций [28]. Изаоспартилпептидаза/L-аспарагиназа (Q7L266) — фермент, который может участвовать в образовании нейромедиаторной аминокислоты L-аспартата, способного действовать как возбуждающий нейромедиатор в некоторых областях мозга, а также снижает накопление некоторых токсичных пептидов в мозге и других тканях млекопитающих [29]. Белок 4.1В (Q9Y2J2) играет важную роль в дифференцировке олигодендроцитов, а его потеря нарушает олигодендроглиальную функцию у мышей и выживание клеток. Биаллельные варианты гена, кодирующего данный белок, вызывают нарушение миелинизации олигодендроцитов, сопровождающееся судорогами у пациентов [30]. Белок, способствующий полимеризации тубулина (O94811) экспрессируется исключительно в олигодендроцитах в нормальном головном мозге. Его нефизиологический уровень тесно связан с этиологией болезни Паркинсона, мультисистемной атрофии, рассеянного склероза, а также глиомы [31]. Альфа-интернексин (Q16352) характеризуется ранней экспрессией, что может стабилизировать нейроны и их процессы и обеспечивать каркас для совместной сборки других белков в процессе развития. Альфа-интернексин является единственным экспрессируемым белком

промежуточных филаментов, что указывает на роль этого белка в созревании и регенерации нейронов после повреждения [32].

При некоторых нейродегенеративных заболеваниях и травмах головного мозга в патогенезе участвуют активные формы кислорода и окислительный стресс. Каталаза (P04040) — фермент, расщепляющий пероксид водорода, остаётся важной мишенью антиоксидантной терапии [33]. Фосфоглицераткиназа-1 (P00558) — ключевой фермент в гликолитическом пути, участвует в таких биологических процессах, как ангиогенез, аутофагия, репарация ДНК. Дефицит фосфоглицераткиназы-1 приводит к гемолитической анемии, рабдомиолизу, миопатии и поражению центральной нервной системы, в том числе идиопатическому инсульту, инсульту подобным эпизодам и эпилепсии [34]. Белок альфа-цепь фибриногена (P02671), связанный с железом, ускоряет плазменную коагуляцию у пациентов с различными заболеваниями, сопровождающимися повышением активности гем-оксигеназы; накапливается при отложении амилоид-β в нервных клетках и сосудах головного мозга и влияет на прогрессирование болезни Альцгеймера [35]. Альфа-2 субъединица Na⁺/K⁺-АТФазы (P50993) представляет собой ферментативную версию натрий-калиевого насоса, которая отвечает за различные важные функции клетки, такие как поддержание катионного равновесия и восстановление мембранного потенциала покоя в нейронах [36]. Гольджи-ассоциированный с фитопатогенами белок 1, связанный с патогенезом растений (Q9H4G4, GAPR-1) относится к суперсемейству белков, богатых цистеином. Показано, что этот белок эффективно связывается с префибриллярными олигомерными структурами β-амилоида на ранних стадиях формирования фибрилл [37]. Альфа-протеинкиназа С (P17252) активируется в ответ на множество различных стимулов и перемещается из цитозоля в специализированные клеточные компартменты (ядро, кавеолы и т.д.), где предположительно и работает, участвуя в различных клеточных функциях, таких как пролиферация, апоптоз, дифференцировка, подвижность и воспаление [38].

Следует отметить, что все остальные белки из таблицы 1, не перечисленные в данном разделе, также упоминаются в литературе и непосредственно участвуют в одном и/или нескольких важных (пато)биологических процессах, таких как нейропротекция, нейрогенез, нейродегенерация, эпилептогенез, судорожная активность при эпилепсии, атерогенез на фоне заболеваний нервной системы, а также психические заболевания у людей [9, 39–57].

В заключение можно сказать, что проведённый нами анализ позволил выявить ПТМ белков, которые могут быть важными в патогенезе развития неврологических заболеваний. Полученные результаты требуют дополнительной проверки либо более точными методами, чем метод количественного протеомного анализа без использования меток, либо независимыми методами, адаптированными для поиска изменений уровня ПТМ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления выполнены на оборудовании ЦКП «Протеом человека» НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

ЛИТЕРАТУРА

- 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
- Воронина А.И., Мирошниченко Ю.В., Скворцов В.С. (2024) Биоинформатическая идентификация белков с меняющимся уровнем ПТМ у линии мышей, созданной для изучения механизмов развития фибромускулярной дисплазии. *Биомедицинская химия*, **70**(4), 248–255. [Voronina A.I., Miroshnichenko Yu.V., Skvortsov V.S. (2024) Bioinformatic identification of proteins with altered PTM levels in a mouse line established to study the mechanisms of the development of fibromuscular dysplasia. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(4), 248–255.] DOI: 10.18097/PBMC20247004248
- Martens L., Hermjakob H., Jones P., Adamski M., Taylor C., States D., Gevaert K., Vandekerckhove J., Apweiler R. (2005) PRIDE: the proteomics identifications database. *Proteomics*, **5**(13), 3537–3545. DOI: 10.1002/pmic.200401303
- Salovska B., Liu Y. (2023) Post-translational modification and phenotype. *Proteomics*, **23**(3–4), e2200535. DOI: 10.1002/pmic.202200535
- Yamaguchi K., Hu Y.-Y., Kawajiri K., Itakura M., Nakashima F., Shibata T., Uchida K. (2025) Adductome-based identification of lysine monomethylation as a key post-translational protein modification in autoimmune diseases. *J. Biol. Chem.*, **301**(10), 110684. DOI: 10.1016/j.jbc.2025.110684
- Tuli L., Tsai T.-H., Varghese R.S., Xiao J.F., Cheema A., Resson H.W. (2012) Using a spike-in experiment to evaluate analysis of LC-MS data. *Proteome Sci.*, **10**, 13. DOI: 10.1186/1477-5956-10-13
- Ramazi S., Zahiri J. (2021) Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford)*, **2021**, baab012. DOI: 10.1093/database/baab012
- Mathoux J., Wilson M.M., Srinivas S., Litovskich G., Villalba B.L., Tran C., Kesavan J., Harnett A., Auer T., Sanz-Rodriguez A., Alkhayyat M.Kh.A.E., Sullivan M., Liu Z., Huang Y., Lacey A., Delanty N., Cryan J., Brett F.M., Farrell M.A., O'Brien D.F., Casillas-Espinosa P.M., Jimenez-Mateos E.M., Glennon J.C., Canavan M., Henshall D.C., Brennan G.P. (2025) N6-methyladenosine (m6A) dysregulation contributes to network excitability in temporal lobe epilepsy. *JCI Insight*, **10**(14), e188612. DOI: 10.1172/jci.insight.188612
- Chen Y., Nie Q., Song T., Zou X., Li Q., Zhang P. (2025) Integrated proteomics and lipidomics analysis of hippocampus to reveal the metabolic landscape of epilepsy. *ACS Omega*, **10**(9), 9351–9367. DOI: 10.1021/acsomega.4c10085
- 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
- The UniProt Consortium (2020) UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.*, **49**(D1), D480–D489. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100
- Progenesis LC-MS version 4.0, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK.
- Скворцов В.С., Алексейчук Н.Н., Мирошниченко Ю.В., Рыбина А.В. (2019) Предсказание доли иона пептида заданного заряда в масс-спектрометрии с положительной электроспрейной ионизацией. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(4), e00100. [Skvortsov V.S., Alekseychuk N.N., Miroshnichenko Yu.V., Rybina A.V. (2019) The prediction of the ion fraction of the peptide with selected charge in mass spectrometry with positive electrospray ionization. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(4), e00100.] DOI: 10.18097/BMCRM00100
- Balmik A.A., Chinnathambi S. (2021) Methylation as a key regulator of Tau aggregation and neuronal health in Alzheimer's disease. *Cell Commun. Signal.*, **19**, 51. DOI: 10.1186/s12964-021-00732-z
- Park J.-Y., Kang T.-C. (2018) The differential roles of PEA15 phosphorylations in reactive astrogliosis and astroglial apoptosis following status epilepticus. *Neurosci. Res.*, **137**, 11–22. DOI: 10.1016/j.neures.2018.02.003
- Chang Q., Yang H., Wang M., Wei H., Hu F. (2018) Role of microtubule-associated protein in autism spectrum disorder. *Neurosci. Bull.*, **34**(6), 1119–1126. DOI: 10.1007/s12264-018-0246-2
- Sanchez C., Diaz-Nido J., Avila J. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.*, **61**(2), 133–168. DOI: 10.1016/s0301-0082(99)00046-5
- Fritz D.I., Ding Y., Merrill-Skoloff G., Flaumenhaft R., Hanada T., Chishti A.H. (2023) Dematin regulates calcium mobilization, thrombosis, and early Akt activation in platelets. *Mol. Cell. Biol.*, **43**(6), 283–299. DOI: 10.1080/10985549.2023.2210033

19. Li H., Fan S., Gong Z., Chan J.Y.K., Tong M.C.F., Chen G.G. (2024) Role of hematological and neurological expressed 1 (HN1) in human cancers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **201**, 104446. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2024.104446
20. Xin Y., Lin G., Hua T., Liang J., Sun T., Wu X. (2023) The altered expression of cytoskeletal and synaptic remodeling proteins during epilepsy. *Open Life Sci.*, **18**, 20220595. DOI: 10.1515/biol-2022-0595
21. Zhang L., Feng D., Tao H., De X., Chang Q., Hu Q. (2015) Increased stathmin expression strengthens fear conditioning in epileptic rats. *Biomed. Rep.*, **3**(1), 28–32. DOI: 10.3892/br.2014.386
22. Gozal Y.M., Seyfried N.T., Gearing M., Glass J.D., Heilman C.J., Wu J., Duong D.M., Cheng D., Xia Q., Rees H.D., Fritz J.J., Cooper D.S., Peng J., Levey A.I., Lah J.J. (2011) Aberrant septin 11 is associated with sporadic frontotemporal lobar degeneration. *Mol. Neurodegener.*, **6**, 82. DOI: 10.1186/1750-1326-6-82
23. Thal D., Xavier C.-P., Rosentreter A., Linder S., Friedrichs B., Waha A., Pietsch T., Stumpf M., Noegel A., Clemen C. (2008) Expression of coronin-3 (coronin-1C) in diffuse gliomas is related to malignancy. *J. Pathol.*, **214**(4), 415–424. DOI: 10.1002/path.2308
24. Kong Q., Min X., Sun R., Gao J., Liang R., Li L., Chu X. (2016) Effects of pharmacological treatments on hippocampal NCAM1 and ERK2 expression in epileptic rats with cognitive dysfunction. *Oncol. Lett.*, **12**(3), 1783–1791. DOI: 10.3892/ol.2016.4882
25. Nicolay N.H., Hertle D., Boehmerle W., Heidrich F.M., Yeckel M., Ehrlich B.E. (2007) Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor and chromogranin B are concentrated in different regions of the hippocampus. *J. Neurosci. Res.*, **85**(9), 2026–2036. DOI: 10.1002/jnr.21328
26. Franchi F., Marte A., Corradi B., Sterlini B., Alberini G., Romei A., de Fusco A., Vogel A., Maragliano L., Baldelli P., Corradi A., Valente P., Benfenati F. (2023) The intramembrane COOH-terminal domain of PRRT2 regulates voltage-dependent Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.*, **299**(5), 104632. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104632
27. Barzasi M., Spinola A., Costa A., Pavinato L., Brusco A., Marcello E., DiLuca M., Gardoni F. (2025) Arg209Lys and Gln508His missense variants in Rabphilin 3A cause pre- and post-synaptic dysfunctions at excitatory glutamatergic synapses. *Sci. Rep.*, **15**, 8698. DOI: 10.1038/s41598-025-93403-9
28. Zhu J.X., Aswad D.W. (2024) Isoaspartate formation and irreversible aggregation of collapsin response mediator protein 2: implications for the etiology of epilepsy and age-related cognitive decline. *Amino Acids*, **57**, 5. DOI: 10.1007/s00726-024-03435-0
29. Cantor J.R., Stone E.M., Chantranupong L., Georgiou G. (2009) The human asparaginase-like protein 1 hASRGL1 is an Ntn hydrolase with beta-aspartyl peptidase activity. *Biochemistry*, **48**(46), 11026–11031. DOI: 10.1021/bi901397h
30. Werren E.A., Rodriguez Bey G., Majethia P., Kaur P., Patil S.J., Kekatpure M.V., Afenjar A., Qebibo L., Burglen L., Tomoum H., Demurger F., Duborg C., Siddiqui S., Tsan Y.-C., Abdullah U., Ali Z., Saadi S.M., Baig S.M., Houlden H., Maroofian R., Padiath Q.S., Bielas S.L., Shukla A. (2024) Biallelic EPB41L3 variants underlie a developmental disorder with seizures and myelination defects. *Brain*, **147**(12), 4033–4042. DOI: 10.1093/brain/awae299
31. Olah J., Bertrand P., Ovadi J. (2017) Role of the microtubule-associated TPPP/p25 in Parkinson's and related diseases and its therapeutic potential. *Expert Rev. Proteomics*, **14**(4), 301–309. DOI: 10.1080/14789450.2017.1304216
32. Liu X.-Y., Yang J.-L., Chen L.-J., Zhang Y., Yang M.-L., Wu Y.-Y., Li F.-Q., Tang M.-H., Liang S.-F., Wei Y.-Q. (2008) Comparative proteomics and correlated signaling network of rat hippocampus in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Proteomics*, **8**(3), 582–603. DOI: 10.1002/pmic.200700514
33. Singhal A., Morris V.B., Labhsetwar V., Ghorpade A. (2013) Nanoparticle-mediated catalase delivery protects human neurons from oxidative stress. *Cell Death Dis.*, **4**(11), e903. DOI: 10.1038/cddis.2013.362
34. Guimarães T.G., Parnera J.B., Castro M.A.A., Cury R.G., Barbosa E.R., Kok F. (2024) X-Linked levodopa-responsive parkinsonism-epilepsy syndrome: a novel PGK1 mutation and literature review. *Mov. Disord. Clin. Pract.*, **11**(5), 556–566. DOI: 10.1002/mdc3.13992
35. Nielsen V.G., Jacobsen W.K. (2016) Iron modulates the alpha chain of fibrinogen. *Biometals*, **29**(2), 235–238. DOI: 10.1007/s10534-016-9909-5
36. Hernández-R J. (1992) Na⁺/K⁺-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem. Int.*, **20**(1), 1–10. DOI: 10.1016/0197-0186(92)90119-c
37. Olrichs N.K., Mahalka A.K., Kaloyanova D., Kinnunen P.K., Bernd H.J. (2014) Golgi-associated plant pathogenesis related protein 1 (GAPR-1) forms amyloid-like fibrils by interaction with acidic phospholipids and inhibits aggregation. *Amyloid*, **21**(2), 88–96. DOI: 10.3109/13506129.2014.882304
38. Nakashima S. (2002) Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. *J. Biochem.*, **132**(5), 669–675. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003272
39. Petersen S.L., Intlekofer K.A., Moura-Conlon P.J., Brewer D.N., del Pino Sans J., Lopez J.A. (2013) Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front. Neurosci.*, **7**, 164. DOI: 10.3389/fnins.2013.00164
40. Fedotcheva T.A., Shimanovsky N.L. (2025) Neurosteroids progesterone and dehydroepiandrosterone: molecular mechanisms of action in neuroprotection and neuroinflammation. *Pharmaceuticals (Basel)*, **18**(7), 945. DOI: 10.3390/ph18070945
41. Huang Z., Shen S., Han X., Li W., Luo W., Lin L., Xu M., Wang Y., Huang W., Wu G., Liang G. (2023) Macrophage DCLK1 promotes atherosclerosis via binding to IKKβ and inducing inflammatory responses. *EMBO Mol. Med.*, **15**(5), e17198. DOI: 10.15252/emmm.202217198
42. Mastroeni D., Sekar S., Nolz J., Delvaux E., Lunnon K., Mill J., Liang W.S., Coleman P.D. (2017) ANK1 is up-regulated in laser captured microglia in Alzheimer's brain; the importance of addressing cellular heterogeneity. *PLOS One*, **12**(7), e0177814. DOI: 10.1371/journal.pone.0177814
43. Wang X., Chen G., Wan B., Dong Z., Xue Y., Luo Q., Wang D., Lu Y., Zhu L. (2022) NRF1-mediated microglial activation triggers high-altitude cerebral edema. *J. Mol. Cell Biol.*, **14**(5), mjac036. DOI: 10.1093/jmcb/mjac036
44. Blondiaux A., Jia S., Annamneedi A., Çalıřkan G., Nebel J., Montenegro-Venegas C., Wykes R.C., Fejtova A., Walker M.C., Stork O., Gundelfinger E.D., Dityatev A., Seidenbecher C.I. (2023) Linking epileptic phenotypes and neural extracellular matrix remodeling signatures in mouse models of epilepsy. *Neurobiol. Dis.*, **188**, 106324. DOI: 10.1016/j.nbd.2023.106324
45. Sun Z.M., Chen Q., Li M.H., Ma W.N., Zhao X.Y., Huang Z. (2019) Chronic phosphoproteomic in temporal lobe epilepsy mouse models induced by kainic acid. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **51**(2), 197–205. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167X.2019.02.001

46. Liu X.-B., Murray K.D. (2012) Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: location, location, location. *Epilepsia*, **53**(Suppl 1), 45–52. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2012.03474.x
47. Cai S., Li J., Wu Y., Jiang Y.J. (2020) *De novo* mutations of TUBB2A cause infantile-onset epilepsy and developmental delay. *Hum. Genet.*, **65**(7), 601–608. DOI: 10.1038/s10038-020-0739-5
48. Schoonjans A.-S., Meuwissen M., Reyniers E., Kooy F., Ceulemans B. (2016) PLCB1 epileptic encephalopathies: review and expansion of the phenotypic spectrum. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, **20**(3), 474–479. DOI: 10.1016/j.ejpn.2016.01.002
49. Fard M.K., van der Meer F., Sanchez P., Cantuti-Castelvetri L., Mandad S., Jäkel S., Fornasiero E.F., Schmitt S., Ehrlich M., Starost L., Kuhlmann T., Sergiou C., Schultz V., Wrzos C., Brück W., Urlaub H., Dimou L., Stadelmann C., Simons M. (2017) BCAS1 expression defines a population of early myelinating oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Sci. Transl. Med.*, **9**(419), eaam7816. DOI: 10.1126/scitranslmed.aam7816
50. Hu S., Tang Y., Li X., Li W., Zeng Y., Jiang M., Chen R., Zheng P., Yang L., Song Z., Xie D., Chen Y., Yuan Y. (2024) Hsp90aa1/JUN/Ccl2 regulatory axis mediates migration and differentiation of NSPCs, promoting the onset and progression of early post-ischemic stroke epilepsy. *Neurobiol. Dis.*, **200**, 106635. DOI: 10.1016/j.nbd.2024.106635
51. Gu C., Wang F., Zhang Y.-T., Wei S.-Z., Liu J.-Y., Sun H.-Y., Wang G.-H., Liu C.-F. (2021) Microglial MT1 activation inhibits LPS-induced neuroinflammation via regulation of metabolic reprogramming. *Aging Cell*, **20**(6), e13375. DOI: 10.1111/accel.13375
52. Ying Z., Najm I., Nemes A., Pinheiro-Martins A.P., Alexopoulos A., Gonzalez-Martinez J., Bingaman W. (2014) Growth-associated protein 43 and progressive epilepsy in cortical dysplasia. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **1**(7), 453–461. DOI: 10.1002/acn3.69
53. Xiao L., Chen W., Guo W., Li H., Chen R., Chen Q. (2025) Exploring the mechanism of action of *Phyllanthus emblica* in the treatment of epilepsy based on network pharmacology and molecular docking. *Medicine* (Baltimore), **104**(7), e41414. DOI: 10.1097/MD.00000000000041414
54. Fan B., Gu J.-Q., Yan R., Zhang H., Feng J., Ikuyama S. (2013) High glucose, insulin and free fatty acid concentrations synergistically enhance perilipin 3 expression and lipid accumulation in macrophages. *Metabolism*, **62**(8), 1168–1179. DOI: 10.1016/j.metabol.2013.02.013
55. Wesseling H., Rahmoune H., Tricklebank M., Guest P.C., Bahn S. (2015) A targeted multiplexed proteomic investigation identifies ketamine-induced changes in immune markers in rat serum and expression changes in protein kinases/phosphatases in rat brain. *J. Proteome Res.*, **14**(1), 411–421. DOI: 10.1021/pr5009493
56. Tavakkoli A., Abnous K., Vahdati Hassani F., Hosseinzadeh H., Birner-Gruenberger R., Mehri S. (2020) Alteration of protein profile in cerebral cortex of rats exposed to bisphenol A: a proteomics study. *Neurotoxicology*, **78**, 1–10. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.01.013
57. Wang T., Jia L., Lv B., Liu B., Wang W., Wang F., Yang G., Bu X., Yao L., Zhang B. (2011) Human Ermin (hErmin), a new oligodendrocyte-specific cytoskeletal protein related to epileptic seizure. *Brain Res.*, **1367**, 77–84. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.10.003

Поступила в редакцию: 09.09.2025.
После доработки: 05.10.2025.
Принята к печати: 20.10.2025.

IDENTIFICATION OF PROTEINS WITH VARIABLE LEVELS OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN HUMAN TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Yu.V. Miroshnichenko*, A.V. Rybina, V.S. Skvortsov

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

Comparative mass spectrometry analysis of hippocampal tissue samples from patients with sclerotic and non-sclerotic temporal lobe epilepsy and nonepileptic patients was undertaken to identify differences in the levels of protein post-translational modifications (PTMs). The original proteomic data obtained by Mathoux et al. [DOI: 10.1172/jci.insight.188612] and deposited in the PRIDE repository (PXD064519) were used in this work. Our reanalysis of the comparative proteomic data identified 53 proteins with PTMs (phosphorylation, methylation, acetylation, and citrullination) that exhibited significant changes in the levels of individual modified peptides. According to the published original data, all 53 proteins are involved in processes associated with neurological diseases in general and epileptogenesis in particular. The analysis identified PTMs of proteins that could play an important role in the pathogenesis of neurological diseases.

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

Keywords: post-translational modifications; epilepsy; 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: 09.09.2025; revised: 05.10.2025; accepted: 20.10.2025.