

УДК 577.21

©Коллектив авторов

РЕДАКТИРОВАНИЕ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ ADAR: АНАЛИЗ НА ПРОТЕОМНОМ УРОВНЕ

*А.А. Ключникова¹, К.Г. Кузнецова¹, С.А. Мошковский^{*1,2}*

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,

119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8; факс: +7 (499)245-08-57, эл. почта: smosh@mail.ru

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,

117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1; тел.: +7(499)246-48-81; факс: +7(499)246-08-57

Посттранскрипционное редактирование РНК специфичными аденозиндезаминазами ADAR, обнаруженное уже более двух десятилетий назад, обеспечивает дополнительную регуляцию транскриптома животных и человека. Преимущественно оно происходит в нервной ткани, причем в ходе реакции аденозин в особых участках РНК преобразуется в инозин. В случае мРНК остаток инозина распознается на рибосоме как гуанозин, что приводит к аминокислотным заменам при трансляции. Хотя такие замены влияют на функцию белков, например, субъединиц глутаматного рецептора, большая часть работ по редактированию РНК, даже кодирующей белок, использует только анализ нуклеиновых кислот. В данном обзоре мы обосновываем необходимость использования панорамной протеомики, основанной на хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, для непосредственной оценки последствий редактирования РНК на белковом уровне. Разработанные в последние годы способы обработки больших массивов данных позволяют совместить результаты различных “омик”-подходов в так называемой протеогеномике. Предложенный протеогеномный подход для анализа последствий редактирования РНК на белковом уровне позволит непосредственно проводить качественный и количественный анализ отредактированных участков белков в масштабах протеома с изучением, в том числе, клинической значимости этого явления в патологиях нервной системы.

Ключевые слова: РНК-зависимая аденозиндезаминаза (ADAR), редактирование РНК, панорамная протеомика, протеогеномика

DOI 10.18097/PBMC20166205510

ВВЕДЕНИЕ

Центральная догма молекулярной биологии, по признанию её авторов, названная догмой по ошибке [1], описывает поток информации от ДНК к мРНК, с которой считывается белок. Остальные РНК, известные ещё в прошлом веке, считались вспомогательными, обеспечивающими генную экспрессию до стадии белкового продукта. Взрывообразное развитие технологий на рубеже веков открыло новую страницу молекулярной биологии клетки – мир РНК. По данным международного проекта ENCODE, инвентаризирующего регуляцию генома человека, около 60% этого генома считывается в виде РНК, причем функция этих РНК остаётся неизвестной [2]. Вслед за несколькими видами малых РНК, способными осуществлять интерференцию РНК, регулируя экспрессию генов [3], обнаружены длинные некодирующие РНК, для некоторых из которых были недавно описаны важные регуляторные функции [4]. Мир РНК предстал настолько разнообразным, что множество этих молекул с неясной функцией и отсутствием чётких мотивов в последовательности называли “тёмной материей РНК” [5].

Если вернуться к проблеме мРНК, то до последнего времени единственным известным видом регуляции их структуры был альтернативный сплайсинг, если не считать не влияющего на структуру кодируемых белков 5'-концевого кэпирования

и 3'-концевого полиаденилирования [6]. Изоформы белков, транслируемые в результате сплайсинга, широко исследовались, в том числе высокопроизводительными протеомными методами [7]. Однако, в 90-е годы прошлого столетия появилась информация о других регулируемых формах изменения РНК, зачастую с последствиями на уровне кодируемых белков. Так, обнаружена активность фермента цитидиндезаминазы, которая приводит к дезаминированию цитозина в РНК с образованием урацила [8]. Эта реакция, названная редактированием РНК, по сути, повторяет распространенную реакцию мутирования ДНК, происходящую спонтанно. У человека такой тип редактирования (С на U) участвует в изменении аминокислотной последовательности аполипопротеина В [9]. Однако, в наибольшей степени такой вид редактирования распространен у растений [10, 11]. Другим широко распространенным типом редактирования РНК, обнаруженным примерно в то же время, является ферментативное дезаминирование аденозина с образованием инозина [12]. Во многих организмах от круглых червей до человека описаны более разнообразные последствия такого редактирования РНК (А на I) на белковом уровне [13]. В данной работе мы впервые сформулировали технический подход для исследования последствий редактирования РНК с изменением аденозина на инозин в масштабах целых протеомов.

* - адресат для переписки

1. РЕДАКТИРОВАНИЕ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ ADAR – ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ТОНКОЙ НАСТРОЙКИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Около четверти века назад была охарактеризована РНК-зависимая аденозиндезаминаза (ADAR – AdenosineDeAminase, RNA-dependent; КФ 3.5.4.4) [14, 15]. Как следует из названия, этот фермент взаимодействует с участками двухцепочечной РНК и дезаминирует остатки аденозина с образованием инозина [12]. Такая посттранскрипционная модификация, происходящая в большинстве случаев в ядре клеток [16], была признана одним из видов редактирования РНК (RNA editing). В этом контексте следует отличать редактирование РНК от сплайсинга РНК. Мы считаем, что в русскоязычной научной литературе термин “редактирование” более уместен, чем “эдитинг”. Все ферменты ADAR имеют общее строение; в них выделяют вариабельный N-концевой домен, связывающийся с двухцепочечной РНК, и С-концевой дезаминазный домен [17]. ADAR были найдены в многоклеточных организмах, и их активность хорошо исследована на таких модельных организмах, как плодовая мушка и мышь, а также у человека [18]. Три фермента, способные дезаминировать аденозин (ADAR1, ADAR2, ADAR3), были найдены у млекопитающих. Эти ферменты кодируются тремя генами, отличающимися по профилю экспрессии в разных тканях и воздействующими на разные РНК субстраты. ADAR1 (также известный, как ADAR) и ADAR2 (ADARB1) представлены во всех тканях человека с самым высоким уровнем экспрессии в мозге, лёгких и сердце [19]. ADAR3 (ADARB2) экспрессируется исключительно в головном мозге и, вероятно, выполняет регуляторную роль при редактировании РНК, поскольку, как показано, препятствует связыванию первых двух ферментов с их мишенями *in vitro* [20].

Инозиновый остаток в составе экзонной РНК перекодирует её информационное значение. Рибосома воспринимает её азотистое основание не как аденин, а как гуанин [21]. Таким образом, осуществляемое ADAR редактирование мРНК вызывает изменение аминокислотной последовательности соответствующих белков или замену стоп-кодона с образованием триплета, кодирующего аминокислоту (рис. 1). У многих модельных и хорошо изученных организмов обнаружены белковые продукты, появившиеся в результате редактирования РНК, в аминокислотной последовательности которых выявляются точечные замены, аналогичные кодируемым единичными нуклеотидными заменами [14]. Такие замены обнаруживаются в определенных участках белка, и для некоторых из них известно биологическое значение [22], о котором будет более подробно рассказано ниже. Часто в клетках, где активны ферменты ADAR, присутствуют как неотредактированная, так и отредактированная форма транскрипта и соответствующего ему белка. Их отношение может играть существенную роль при дифференцировке клеток и развитии нервной

системы [23, 24]. Предполагается, что регуляция путём редактирования РНК осуществляется не только за счёт изменения аминокислотной последовательности, но и на уровне самих РНК в её некодирующих участках, в том числе, микро-РНК [25]. В настоящей работе мы рассмотрим феномен редактирования транскриптов кодирующих белки генов и его последствия на белковом уровне.

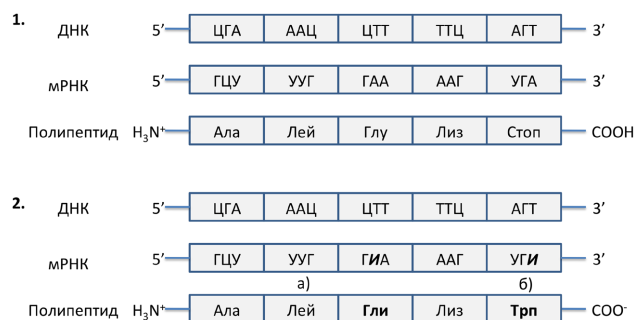


Рисунок 1. Редактирование транскриптов генов, кодирующих белки. На рисунке показаны процессы трансляции нуклеотидной последовательности мРНК в белок: 1 - при отсутствии редактирования мРНК, 2 - в присутствии редактирования. При редактировании кодирующих регионов мРНК замена аденозина (А) на инозин (И) приводит к: а) изменению кодируемой аминокислоты и, как следствие, белка; б) изменению стоп-кодона на триплет, кодирующий аминокислоту, и, как следствие, событию альтернативного сплайсинга.

Ферменты ADAR проявляют свою активность преимущественно в нервных тканях, хотя процессы редактирования РНК описаны в паренхиматозных органах млекопитающих, в клетках белой крови и в жировой ткани [19, 26] (табл. 1). Это, по-видимому, связано с повышенной потребностью в точной и быстрой настройке работы нейронов. Модулирование работы этих клеток путем изменения структуры хроматина, открытие и закрытие определенных участков генома, изменение уровня экспрессии ансамблей генов в ряде случаев оказывается слишком медленным или вообще невозможным из-за того, что нейроны не являются быстро возобновляемым ресурсом [27]. Возникает вопрос, почему нужные аминокислотные замены возникают в ходе редактирования РНК, а не в процессе мутаций в геномной последовательности? На это в литературе имеется несколько объяснений [28, 29]. Во-первых, организму на разных этапах развития требуется как исходный, так и неотредактированный вариант. Полагаться в таких случаях на гетерозиготность рискованно, поскольку гомозиготы в обоих случаях будут менее жизнеспособны. Кроме того, по сравнению с наличием в геноме нескольких вариантов одного и того же гена, например, паралогов (гомологичные гены, дивергировавшие после дупликации предкового гена [30]), редактирование РНК значительно менее затратно с точки зрения ресурсов клетки, чем запуск дифференциальной экспрессии с генов-паралогов. Интересно, что участки, подвергаемые редактированию ADAR в геноме дрозофилы, в ходе эволюции “отредактировались” у других насекомых уже на уровне генома [31].

Таблица 1. Процент встречаемости ADAR-специфического редактирования мРНК в тканях человека. Число событий редактирования выражено в процентах относительно общего числа событий замены А на I, найденных в 6 тканях человека. Числовые данные взяты из [19]

Ткань	Число событий замены А на I, %
Мозг	31,7
Лёгкие	28,3
Почки	17,6
Печень	15,5
Сердце	5,0
Мышцы	1,9

В исследованиях редактирования РНК в разных организмах было установлено биологическое значение некоторых примеров этого явления [32-36]. Обнаружены участки редактирования РНК, консервативные среди муравьев, но различно отредактированные у королев (маток) и рабочих особей. Это говорит о том, что кроме важной роли в функционировании нервной системы, редактирование может играть роль в формировании социального поведения [32]. Точные механизмы регуляции молекулярных каскадов с помощью ферментов ADAR зачастую остаются нераскрытыми.

У плодовой мушки редактированию подвергаются транскрипты генов, кодирующие белки, ответственные за синаптическую передачу. По-видимому, в зависимости от условий среды и стадии развития интенсивно регулируются компоненты комплекса SNARE (soluble NSF attachment receptor), обеспечивающего своевременное слияние везикул с пресинаптической мембраной и их последующее отсоединение [33]. Известно, что уровень редактирования РНК у этого насекомого существенно зависит от температуры окружающей среды [34]. Действительно, небольшие пойкилотермные животные находятся в затруднительном положении с точки зрения биохимии по сравнению с гомойотермными. Их системы, включая нервную, должны адекватно функционировать в диапазоне температур до двадцати градусов, при существенном влиянии таких перепадов на термодинамические и кинетические параметры взаимодействия биомолекул. Есть предположение, что зависимое от температуры редактирование ADAR транскриптов важных участников синаптической передачи адаптирует этот процесс к перепадам температур, являясь системой более быстрого реагирования по сравнению с изменением генной экспрессии [33, 35]. Детальный механизм этой адаптации на уровне белковых комплексов пока не расшифрован. Известно, что ADAR жизненно важен для нормального функционирования дрозофилы. Мутанты, лишённые этого фермента, страдают существенными нарушениями неврологического характера, а именно: температурно-чувствительный паралич, потеря двигательной координации, тремор, которые будут усиливаться с возрастом организма [36].

Аминокислотные замены, опосредованные ADAR редактированием РНК в белках млекопитающих,

с функциональной точки зрения изучены несколько лучше. “Классикой” такого редактирования является замена остатка глутамина на аргинин в субъединице возбуждающего глутаматного рецептора GluA2, известная у мыши и человека [37, 38]. Содержащая остаток аргинина форма этого ионного канала характеризуется существенным снижением тока кальция в клетку. Интересно, что почти все молекулы этого рецептора в зрелой нервной ткани находятся в отредактированной форме, начиная с ранней дифференцировки стволовой клетки [39, 40]. Другие известные аминокислотные замены начинают происходить по ходу созревания нервных клеток несколько позднее [41]. Очевидно, что события редактирования транскриптов в нервной системе млекопитающих не только обеспечивают синаптическую пластичность, но и вовлечены в дифференцировку нервных клеток [37, 38].

Функциональная значимость последствий редактирования РНК у млекопитающих на белковом уровне хорошо описана в ряде обзорных статей [22, 39, 42]. Мы не планируем подробно останавливаться на примерах, отсылая читателя к этим источникам. Перечислим лишь некоторые из них. Так, отредактированный серотониновый рецептор 5HT2C слабее связывается с некоторыми G-белками [43]. Субъединица $\alpha 3$ тормозного ГАМК_A рецептора (GABA_A) в отредактированном виде подвергается скорейшей деградации в лизосомах, тогда как исходная форма чаще возвращается обратно на клеточную мембрану [44, 45]. Из этих примеров ясно, что мишенью опосредованного ADAR редактирования транскриптов у млекопитающих является не только синаптическая передача, но и каскады внутриклеточной сигнализации, кругооборот белковых молекул и другие процессы.

Очевидно, что процессы, управляемые редактированием РНК, играют существенную роль. Поэтому их нарушение имеет значительный эффект на состояние организма. У человека и мыши три гена и три изоформы ADAR. Нокаут гена ADAR2, продукт которого редактирует упомянутый глутаматный рецептор GluA2, вызывает гибель мышат в течение 3 недель после рождения вследствие судорожной активности [46]. Мутации в ADAR1 летальны на уровне эмбрионов [47].

Можно предположить, что более мягкие нарушения опосредованные ADAR редактирования РНК могут сказываться и на здоровье человека, в частности, при контроле таких патологических состояний, как судорожная активность, депрессия, нейродегенеративные заболевания, а также злокачественные опухоли. Исследования в этой области только начинаются [48, 49]. Вероятно, отредактированные участки РНК, а также активность самих ферментов ADAR могут служить мишенью терапевтического воздействия. Профиль редактирования аденозина на инозин, который сегодня может быть установлен при помощи секвенирования нового поколения (NGS – next-generation sequencing), может служить источником потенциальных биомаркеров неврологических патологий [19].

Способы идентификации редактирования собственно РНК подробно описаны в недавнем обзоре [50]. Так, предложен метод ICE (Inosine Chemical Erasing – химическое удаление инозина), который позволяет детектировать остатки инозина посредством цианоэтилирования в сочетании с реакцией обратной транскрипции [51] (рис. 2).

За прошедшие годы платформы высокопроизводительного секвенирования и эффективные вычислительные технологии способствовали быстрому накоплению данных по редактированию РНК. Большинство известных участков редактирования РНК были обнаружены с помощью вычислительных методов, сравнивающих

геномные и транскриптомные последовательности одного и того же образца [52, 53]. Достоверно выявленные отличия соответствующих остатков азотистых оснований свидетельствуют о наличии редактирования РНК. Также известны способы идентификации участков редактирования с использованием данных только секвенирования одной РНК путём сравнения транскриптомных вариантов разных индивидуумов [54]. Разработан вычислительный подход, основанный на методе учёта маркерных экспрессирующихся последовательностей (EST, expressed sequence tag) мРНК, где для анализа используют короткие последовательности комплементарной ДНК (кДНК) [26].

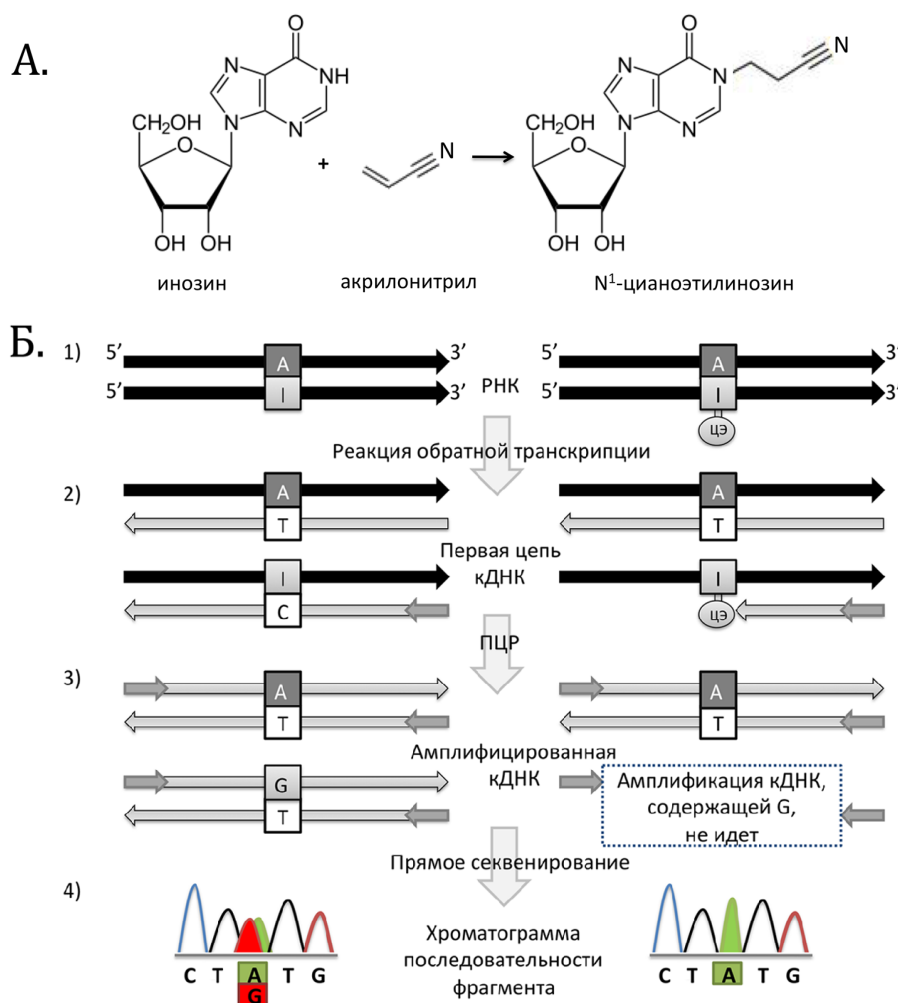


Рисунок 2. Реакция цианоэтилирования инозина и схема метода ICE (inosine chemical erasing - химическое удаление инозина) (А) Химическая реакция цианоэтилирования (ЦЭ) инозина (I), в которой акрилонитрил присоединяется к N₁-атому инозина с образованием N¹-цианоэтилинозина. (Б) Метод ICE. Схемы с реакцией цианоэтилирования (ЦЭ+) и без (ЦЭ-) показаны справа и слева соответственно. РНК изображена чёрным цветом, комплементарная ДНК (кДНК) - серым. 1) Цианоэтилирование инозина. Инозин в цепи РНК цианоэтилирован с образованием N¹-цианоэтилинозина. 2) Синтез первой цепи кДНК. Реакция обратной транскрипции с обратным праймером (серая стрелка влево). В ходе реакции аденин (А) в цепи мРНК превращается в тимин (Т) на кДНК в обоих случаях (ЦЭ+ и ЦЭ-). В состоянии ЦЭ-, I превращается в цитозин (С) на кДНК. В состоянии ЦЭ+ первая цепь кДНК блокирована. 3) ПЦР. Первая цепь кДНК, несущая С или Т в участке редактирования амплифицируется с помощью ПЦР (праймеры отмечены серыми стрелками). кДНК, несущая С в участке редактирования не амплифицируется при ЦЭ+, привоя к тому, что кДНК не будет содержать гуанина (G) из-за удаления события редактирования из ПЦР продуктов. 4) Прямое секвенирование. При ЦЭ- участок редактирования может быть детектирован как смесь сигналов А и G в хроматограмме последовательности фрагмента. При ЦЭ+ сигнал от G, получающийся в результате редактирования, исчезает и заменяется на А. Адаптировано из [51].

Накопленные при помощи рассмотренных выше методов данные вошли в специализированные базы данных событий редактирования РНК. Примерами таких ресурсов являются базы данных RADAR (A collection of rigorously annotated A-to-I events) [55] и DARNED (Database of RNa EDiting) [56], в которых представлены аннотированные данные по участкам редактирования РНК человека, мыши и плодовой мушки. Так, установлено, что свыше 2,5 млн. оснований в человеческом транскрипте могут подвергаться редактированию РНК, и более 95% этих оснований находятся в Alu-повторах [55].

2. ПРОТЕОГЕНОМИКА – ОБЪЕДИНЕНИЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПРОТЕОМИКИ

Наиболее эффективным с точки зрения количества идентифицируемых в образцах белков способом протеомного анализа является панорамная (shotgun) протеомика с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения [57]. Задача, которая решается при масс-спектрометрической идентификации пептидов, заключается в сопоставлении экспериментального масс-спектра какой-либо пептидной последовательности. Эту задачу, пользуясь знаниями по масс-спектрометрии модельных пептидов, автоматически выполняют специальные алгоритмы – так называемые поисковые машины. Эмпирически известно, что даже на существующем методическом уровне подстановка всех возможных последовательностей дает неприемлемый уровень ошибочных, ложноположительных результатов. Поэтому число теоретически возможных вариантов для предсказания последовательности стараются сократить. Во-первых, для расщепления белков исследуемого протеома используют трипсин, который обеспечивает специфичный профиль расщепления, так что каждый пептид, кроме С-концевого, заканчивается остатком лизина или аргинина. Кроме того, используют теоретически предсказанные белковые последовательности только того организма, из которого происходит образец. Достоверность оценки присутствия в пробе происходящего из белка пептида и, как следствие, самого белка была существенно повышена введением работы поисковых машин по базе данных, содержащей теоретически ожидаемые и заведомо ложные последовательности (target-decoy method) [58]. Такой подход позволяет адекватно устанавливать уровень ложноположительных идентификаций (False Discovery Rate, FDR). По мере обработки поисковый алгоритм начинает ставить в соответствие реальным масс-спектрам заведомо ложные последовательности (decoy). Избежать этого полностью не удастся, однако, процентное содержание таких ложных сообщений позволяет оценить общий уровень ошибок процедуры (FDR). Последний обычно задается на уровне не более 1%.

Панорамный подход с использованием ложных последовательностей вкупе с развитием аналитических характеристик хромато-масс-спектрометрии позволил достичь значительного покрытия протеома. Например, после гидролиза

трипсином белков клеточной линии НЕК293, предварительного фракционирования полученных в результате пептидов и хромато-масс-спектрометрического анализа фракций на приборе высокого разрешения удается зарегистрировать в протеоме продукты более 9 тысяч генов, почти половину кодирующих белки генов человека [59].

Возможность регистрации десятков и даже сотен тысяч пептидов обеспечивает возможность анализировать тонкие изменения структуры белков. Речь идет о так называемых протеоформах [60], под которыми подразумеваются различные изменения структуры белковой молекулы по сравнению с её усредненным вариантом, кодируемым в консенсусном геноме. Они образуются в результате генного полиморфизма, альтернативного сплайсинга, ферментативного расщепления, различных посттрансляционных модификаций [61]. Рассматриваемые в настоящей статье изменения последовательности белка вследствие редактирования РНК также следует считать протеоформами. Подход, когда белковые продукты одного гена, в ходе регуляторных процессов в клетке приобретающие разный химический состав, рассматриваются в качестве отдельных протеоформ, получил развитие лишь с улучшением аналитических методов, позволивших разрешать такие формы. В ряде работ белковые продукты одного гена сообща рассматривались в виде так называемого “мастерного” белка [62].

В период становления масс-спектрометрической протеомики для поиска использовали базу данных с усредненным, так называемым консенсусным геномом исследуемого организма. Как указано выше, транслированные *in silico* белковые последовательности такого генома составляли подмножество гипотез, ограничивающих протеомный анализ. С тех пор и по настоящее время ограничение поиска пределами геномной базы данных приводит к более эффективной идентификации пептидов из масс-спектров, чем поиск пептидных последовательностей *de novo*, без привязки к геному [63]. После того, как масс-спектрометрия стала надежно определять большое количество пептидов из протеома, исследователи задумались об изменении потока информации от протеома к геному. Данные панорамной масс-спектрометрии предложили использовать для уточнения расположения кодирующих рамок считывания в плохо аннотированных геномах [64]. Этот подход, названный протеогеномикой, востребован преимущественно в изучении новых организмов, в особенности, в микробиологии. В случае хорошо аннотированных геномов, например, человека, протеомика для решения задач “обратной” геномики востребована в меньшей степени. Недавно в масштабах большого количества геномных и протеомных данных обследовали геном человека на предмет новых кодирующих белки генов [65]. Удалось подтвердить существование новых 16-ти таких генов, что в масштабах двадцати тысяч, находящихся в полном геноме, представляет собой скромное количество.

В исследовании человеческих геномов большее значение имеет другое направление, которое также включили в состав протеогеномики – поиск отклонений от усредненного генома на белковом уровне с использованием модифицированных геномных баз данных для протеомного поиска [66]. Точнее говоря, в это направление протеогеномики входит протеомный анализ с использованием персонализированных геномных баз данных, учитывающих полиморфизм генома и альтернативный сплайсинг мРНК [67]. Геномные мутации, отраженные на белковом уровне, особенно актуально искать при протеомном поиске в злокачественных опухолях. В первых работах по этой тематике использовали объединенные данные по мутациям во многих образцах злокачественных опухолей [68], например, содержащие информацию базы данных таких мутаций COSMIC [69]. Статистический анализ поиска вариантов аминокислотной последовательности в панорамной протеомике совершенствовался с повышением надежности результатов. С нашим участием был предложен подход раздельного определения уровня ложноположительных результатов для вариантов аминокислотной последовательности [70, 71]. В результате к настоящему моменту накоплен значительный инструментарий вычислительных методов, интегрирующих геномные, транскриптомные и протеомные данные. Установлены аминокислотные замены и варианты альтернативного сплайсинга во многих опухолевых клеточных линиях и в биопсийном материале [72-75]. Учтены особенности такого протеогеномного поиска. Так, некоторые аминокислотные замены могут имитироваться в масс-спектрах сходными по сдвигу молекулярной массы химическими модификациями аминокислот [76]. Недавно опубликована обзорная статья, подытоживающая развитие протеогеномики человека с момента её зарождения примерно пять лет назад [77].

3. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ПРОТЕОГЕНОМИКА – ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК НА БЕЛКОВОМ УРОВНЕ

Полномасштабные исследования редактирования РНК, как описано выше, осуществляется в основном методами секвенирования нуклеиновых кислот. Наличие отредактированных последовательностей на белковом уровне просто предполагается по умолчанию (примеры см. в табл. 2). Почти отсутствуют работы, которые описывают количественные отношения отредактированных или исходных последовательностей на белковом уровне. Что, если отредактированная последовательность является нестабильной и быстро элиминируется после трансляции системой протеостаза? В этом случае последствия редактирования на белковом уровне отсутствуют, представляя своего рода информационный шум.

При изучении функционального значения редактирования, например, в случае глутаматных рецепторов, отредактированные и исходные белки получают в системах экспрессии, а затем тестируют их функциональность. Так, работу отредактированных ионных каналов испытывали в трансфицированных клетках с применением микроэлектродов [78]. Однако, такое исследование невозможно в масштабе протеома. Оно не позволяет охарактеризовать значение редактирования в белках с неизвестной функцией.

События редактирования РНК ферментами ADAR в протеоме регистрировали только в одной работе, где проводилось полномасштабное исследование всех протеоформ в печени крыс [79]. Тем не менее, печень не является органом, в котором описано функционально значимое редактирование РНК. Кроме того, идентифицированные в этой статье 20 участков редактирования на белковом уровне дополнительно не валидированы и никак не обсуждаются.

Основываясь на нашем опыте в области протеогеномики [70, 73, 80], мы предлагаем использовать современную панорамную протеомику для идентификации последствий редактирования РНК в масштабе целого протеома. На сегодня выработаны основные принципы интеграции данных секвенирования нуклеиновых кислот и протеомной хромато-масс-спектрометрии. В качестве основного алгоритма действий может быть реализована схема, приведенная на рисунке 3. Основываясь на совокупности отредактированных участков РНК – так называемом “эдитоме” [53], формируют базу данных для протеомного поиска отредактированных участков. Источником для нее, в идеале, должны быть данные по редактированию РНК в конкретном исследуемом образце. Тем не менее, в связи с выраженным консерватизмом участков редактирования в пределах одного вида [33] для этой цели может быть использована интегрированная видоспецифическая база данных редактирования, наподобие указанных выше RADAR [55] или DARNED [56]. Затем используются данные панорамного протеомного анализа интересующего биологического образца, полученные на масс-спектрометре с высоким разрешением. Поисковыми машинами для идентификации пептидов дополняют геномную базу данных полученной базой с участками редактирования. По нашему опыту, лучшим способом оценки уровня ложноположительных результатов (FDR) является отдельный расчёт для отредактированных пептидов. Валидацию результатов можно проводить, осуществляя поиск несколькими разными поисковыми машинами [70]. Отредактированные пептиды, найденные одновременно двумя поисковыми машинами для панорамной протеомики, будут наиболее достоверными.

Панорамная протеомика позволит идентифицировать как отредактированные пептиды, так и исходные пептиды интересующих белков в случае, если эти пептиды в принципе могут быть зарегистрированы с использованием стандартной схемы панорамного протеомного анализа.

Таблица 2. Методы исследования редактирования РНК ферментами ADAR

Результаты	Используемые методы	Источник
Оценка активности ферментов редактирования		
Исследована первичная структура ADAR и редактирование рецептора GluR у человека	Двумерная тонкослойная хроматография продуктов реакции для изучения ферментативной активности <i>in vitro</i> . Саузерн-блоттинг продуктов реакции	[14]
Исследованы ферменты ADAR и редактирование рецептора GluR шпорцевой лягушки <i>Xenopus</i>	Двумерная тонкослойная хроматография продуктов реакции	[15]
Исследование активности ADAR при редактировании субъединиц рецептора GluR мозга крыс	Трансфекция конструкций с отредактированными субъединицами рецепторов. Нозерн-блоттинг для анализа сигнала меченных изотопом ^{32}P тканей мозга крыс.	[84]
Визуализация активности ADAR <i>in vivo</i> в нервной системе плодовой мушки	Создание флуоресцентного репортерного гена редактирования. Анализ флуоресцентного сигнала в клетках и тканях.	[85]
Поиск участков редактирования РНК-транскриптов		
Найдено 5072 участка редактирования РНК в транскрипте человека	Химическое удаление инозина (ICE inosine chemical erasing), основанное на цианоэтировании в сочетании с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией	[51]
Найдено 23 участка тканеспецифичного редактирования РНК в 43 тканях человека	Метод учёта маркерных экспрессирующихся последовательностей (EST, expressed sequence tag) мРНК	[26]
Найдено 303624 события редактирования в Alu повторах, 2796 в не-Alu повторах и 2815 в неповторяющихся (уникальных) регионах разных индивидуумов	Высокопроизводительное секвенирование РНК, сравнение транскриптомных вариантов	[54]
Поиск участков редактирования РНК путём сравнения данных секвенирования генома и транскриптома		
Найдено 239 участков редактирования в нескольких типах тканей здоровых людей	Сравнение ДНК и РНК различных тканей одного индивидуума. Применение метода, использующего зонд, замыкающийся в кольцо при лигировании (padlock) в образцах ДНК и кДНК	[86]
Найдено 22688 событий редактирования у человека	Сравнение геномных и транскриптомных последовательностей одного и того же образца	[53]
Исследовано редактирование РНК, считываемой с Alu-повторов. Найдено 1,6 миллиона сайтов редактирования человека	Высокопроизводительное секвенирование РНК. Сравнение с референсными последовательностями генома.	[87]
Найдено 3041422 событий редактирования 6 различных тканей 3 здоровых людей	РНК-секвенирование и полногеномное секвенирование одних и тех же образцов тканей с биоинформатической обработкой	[19]
Исследование последствий редактирования РНК на уровне протеома		
Идентифицировано 20 из 196 несинонимичных замен вследствие редактирования РНК на уровне протеома печени крыс	Высокопроизводительное секвенирование РНК. Панорамный протеомный анализ путём хромато-масс-спектрометрии. Протеогеномная обработка данных	[79]
Изучение влияния редактирования на проницаемость каналов и работу рецепторов		
Исследование проницаемости кальциевых каналов HEK293	Трансфекция конструкций с отредактированными субъединицами рецепторов. Регистрация потенциалов (patch-clamp) трансгенной клетки	[78]
Исследование проницаемости калиевых каналов на клетках линии HeLa	Трансфекция конструкций с отредактированными субъединицами рецепторов, меченными флуоресцентными белками. Получение флуоресцентных изображений.	[88]

Их полуколичественный анализ можно проводить уже непосредственно при обработке данных панорамной протеомики. Однако для надежной оценки соотношения концентраций отредактированного и исходного белка следует применять таргетный масс-спектрометрический анализ, например,

мониторинг множественных реакций (MRM) в тройном квадруполье [81]. Используя данные тандемных спектров, зарегистрированные в обзорном анализе, возможно создать методы анализа тех же пептидов таргетным методом с использованием меченых стабильными изотопами стандартов [82].



Рисунок 3. Схема интеграции данных секвенирования нуклеиновых кислот и протеомной хромато-масс-спектрометрии. Алгоритм действий включает в себя формирование базы данных для протеомного поиска отредактированных участков, основываясь на методах высокопроизводительного секвенирования. Следующий этап - получение данных панорамного протеомного анализа и поиск отредактированных пептидов как минимум по двум поисковым машинам. Для валидации полученных результатов может использоваться таргетный масс-спектрометрический анализ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей статье рассмотрена перспектива идентификации кодирующих участков редактирования РНК, в первую очередь, наиболее исследованного, значимого в регуляции нервной системы редактирования ферментами ADAR, в масштабах протеома при помощи хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Хорошо изученное на уровне РНК, такое редактирование часто оказывает свой эффект именно на уровне последовательностей значимых белков. Протеогеномика, как способ интеграции данных секвенирования нуклеиновых кислот и протеомного анализа, прекрасно подходит для изучения редактирования РНК, причем поиск такого редактирования возможно провести уже на готовых, опубликованных данных. Мы полагаем, что данный подход применим и для других видов редактирования РНК, при которых происходят единичные нуклеотидные замены, как, например, дезаминирование цитозина с образованием урацила [8].

Дальнейшей стадией исследования отредактированных белков может быть их количественный анализ методами таргетной протеомики. Степень редактирования значимых белков может быть потенциальным биомаркером тех заболеваний человека, в развитии которых подозревают роль ферментов ADAR. Это, в первую очередь, психические и нейродегенеративные заболевания, например, депрессия, бессонница, болезнь Паркинсона [48] и даже некоторые виды злокачественных опухолей [83].

Масс-спектрометрическая протеомика, основным преимуществом которой является значительная специфичность в отношении аминокислотной последовательности, реализуемая в масштабе сотен и тысяч белков уже со значительным покрытием, является наиболее подходящим инструментом для изучения последствий редактирования РНК на белковом уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №14-15-00395).

ЛИТЕРАТУРА

1. Crick F. (1970) *Nature*, **227**, 561-563.
2. ENCODE Project Consortium (2012) *Nature*, **489**, 57-74.
3. Saurabh S., Vidyarthi A.S., Prasad D. (2014) *Planta*, **239**, 543-564.
4. Ernst C., Morton C.C. (2013) *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 168.
5. Kapranov P., St Laurent G. (2012) *Front. Genet.*, **3**, 60.
6. Matlin A.J., Clark F., Smith C.W.J. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 386-398.
7. Blakeley P., Siepen J.A., Lawless C., Hubbard S.J. (2010) *Proteomics*, **10**, 1127-1140.
8. Blanc V., Davidson N.O. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1395-1398.
9. Blanc V., Davidson N.O. (2010) *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **2**, 594-602.
10. Takenaka M., Verbitskiy D., Zehrmann A., Härtel B., Bayer-Császár E., Glass F., Brennicke A. (2014) *Mitochondrion*, **19**, 191-197.
11. Shikanai T. (2015) *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 779-785.
12. Alseth I., Dalhus B., Bjørås M. (2014) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **26**, 116-123.
13. Licht K., Jantsch M.F. (2016) *J. Cell Biol.*, **213**, 15-22.

14. Kim U., Wang Y., Sanford T., Zeng Y., Nishikura K. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 11457-11461.
15. Bass B.L., Weintraub H.B. (1988) Cell, **55**, 1089-1098.
16. Chen L. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci., **110**, E2741-E2747.
17. Goodman R.A., Macbeth M.R., Beal P.A. (2012) Curr. Top. Microbiol. Immunol., **353**, 1-33.
18. Keegan L.P., Leroy A., Sproul D., O'Connell M.A. (2004) Genome Biol., **5**, 209.
19. Picardi E., Manzari C., Mastropasqua F., Aiello I., D'Erchia A.M., Pesole G. (2015) Sci. Rep., **5**, 14941.
20. Chen C.X., Cho D.S., Wang Q., Lai F., Carter K.C., Nishikura K. (2000) RNA, **6**, 755-767.
21. Basilio C., Wahba A.J., Lengyel P., Speyer J.F., Ochoa S. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **48**, 613-616.
22. Tomaselli S., Locatelli F., Gallo A. (2014) Cell Tissue Res., **356**, 527-532.
23. Egebjerg J., Heinemann S.F. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 755-759.
24. Vissel B., Royle G.A., Christie B.R., Schiffer H.H., Ghetti A., Tritto T., Perez-Otano I., Radcliffe R.A., Seamans J., Sejnowski T. et al. (2001) Neuron, **29**, 217-227.
25. Alon S., Mor E., Vigneau F.T., Church G.M., Locatelli F., Galeano F., Gallo A., Shomron N., Eisenberg E. (2012) Genome Res., **22**, 1533-1540.
26. He T., Wang Q., Feng G., Hu Y., Wang L., Wang Y. (2011) PLoS One, **6**, e18129.
27. Young W. (2014) Cell Transplant., **23**, 573-611.
28. Niswender C.M., Copeland S.C., Herrick-Davis K., Emeson R.B., Sanders-Bush E. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 9472-9478.
29. Orlandi C., La Via L., Bonini D., Mora C., Russo I., Barbon A., Barlati S. (2011) PLoS One., **6**, e25350.
30. Studer R.A., Robinson-Rechavi M. (2009) Trends Genet., **25**, 210-216.
31. Jin Y., Tian N., Cao J., Liang J., Yang Z., Lv J. (2007) BMC Evol. Biol., **7**, 98.
32. Li Q., Wang Z., Lian J., Schiøtt M., Jin L., Zhang P., Zhang Y., Nygaard S., Peng Z., Zhou Y., Deng Y., Zhang W., Boomsma J.J., Zhang G. (2014) Nat. Commun., **5**, 4943.
33. Rieder L.E., Savva Y.A., Reyna M.A., Chang Y.-J., Dorsky J.S., Rezaei A., Reenan R.A. (2015) BMC Biol., **13**, 1.
34. Garrett S.C., Rosenthal J.J.C. (2012) Physiology (Bethesda), **27**, 362-369.
35. Montgomery J.C., Macdonald J.A. (1990) Am. J. Physiol., **259**, R191-196.
36. Palladino M.J., Keegan L.P., O'Connell M.A., Reenan R.A. (2000) Cell, **102**, 437-449.
37. Pachernegg S., Mønster Y., Muth-Köhne E., Fuhrmann G., Hollmann M. (2015) Front. Cell. Neurosci., **9**, 69.
38. Whitney N.P., Peng H., Erdmann N.B., Tian C., Monaghan D.T., Zheng J.C. (2008) FASEB J., **22**, 2888-2900.
39. Behm M., Öhman M. (2016) Trends Genet., **32**, 165-175.
40. Ekdahl Y., Farahani H.S., Behm M., Lagergren J., Öhman M. (2012) Genome Res., **22**, 1477-1487.
41. Wahlstedt H., Daniel C., Ensterö M., Öhman M. (2009) Genome Res., **19**, 978-986.
42. Liu H., Ma C.-P., Chen Y.-T., Schuyler S.C., Chang K.-P., Tan B.C.-M. (2014) Cell Biosci., **4**, 44.
43. Werry T.D., Loiacono R., Sexton P.M., Christopoulos A. (2008) Pharmacol. Ther., **119**, 7-23.
44. Ohlson J., Pedersen J.S., Haussler D., Öhman M. (2007) RNA, **13**, 698-703.
45. Rula E.Y., Lagrange A.H., Jacobs M.M., Hu N., Macdonald R.L., Emeson R.B. (2008) J. Neurosci., **28**, 6196-6201.
46. Higuchi M., Maas S., Single F.N., Hartner J., Rozov A., Burnashev N., Feldmeyer D., Sprengel R., Seeburg P.H. (2000) Nature, **406**, 78-81.
47. Hartner J.C., Schmittwolf C., Kispert A., Müller A.M., Higuchi M., Seeburg P.H. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 4894-4902.
48. Maas S., Kawahara Y., Tamburro K.M., Nishikura K. (2006) RNA Biol., **3**, 1-9.
49. Kwak S., Hideyama T., Yamashita T., Aizawa H. (2010) Neuropathology, **30**, 182-188.
50. Ramaswami G., Li J.B. (2016) Methods. DOI:10.1016/j.ymeth.2016.05.011.
51. Sakurai M., Yano T., Kawabata H., Ueda H., Suzuki T. (2010) Nat. Chem. Biol., **6**, 733-740.
52. Ramaswami G., Lin W., Piskol R., Tan M.H., Davis C., Li J.B. (2012) Nat. Methods, **9**, 579-581.
53. Peng Z., Cheng Y., Tan B.C.-M., Kang L., Tian Z., Zhu Y., Zhang W., Liang Y., Hu X., Tan X., Guo J., Dong Z., Liang Y., Bao L., Wang J. (2012) Nat. Biotechnol., **30**, 253-260.
54. Ramaswami G., Zhang R., Piskol R., Keegan L.P., Deng P., O'Connell M.A., Li J.B. (2013) Nat. Methods, **10**, 128-132.
55. Ramaswami G., Li J.B. (2014) Nucleic Acids Res., **42**, D109-113.
56. Kiran A.M., O'Mahony J.J., Sanjeev K., Baranov P.V. (2013) Nucleic Acids Res., **41**, D258-261.
57. Wilhelm M., Schlegl J., Hahne H., Gholami A.M., Lieberenz M., Savitski M.M., Ziegler E., Butzmann L., Gessulat S., Marx H. et al. (2014) Nature, **509**, 582-587.
58. Elias J.E., Gygi S.P. (2007) Nat. Methods, **4**, 207-214.
59. Chick J.M., Kolippakkam D., Nusinow D.P., Zhai B., Rad R., Huttlin E.L., Gygi S.P. (2015) Nat. Biotechnol., **33**, 743-749.
60. Smith L.M., Kelleher N.L., Linial M., Goodlett D., Langridge-Smith P., Ah Goo Y., Safford G., Bonilla L., Kruppa G., Zubarev R. et al. (2013) Nat. Methods, **10**, 186-187.
61. Lisitsa A., Moshkovskii S., Chernobrovkin A., Ponomarenko E., Archakov A. (2014) Expert Rev. Proteomics, **11**, 121-129.
62. Ponomarenko E.A., Kopylov A.T., Lisitsa A.V., Radko S.P., Kiseleva Y.Y., Kurbatov L.K., Ptitsyn K.G., Tikhonova O.V., Moisa A.A., Novikova S.E. et al. (2014) J. Proteome Res., **13**, 183-190.
63. Nesvizhskii A.I., Aebersold R. (2005) Mol. Cell. Proteomics, **4**, 1419-1440.
64. Ansong C., Purvine S.O., Adkins J.N., Lipton M.S., Smith R.D. (2008) Brief. Funct. Genomic. Proteomic., **7**, 50-62.
65. Wright J.C., Mudge J., Weisser H., Barzine M.P., Gonzalez J.M., Brazma A., Choudhary J.S., Harrow J. (2016) Nat. Commun., **7**, 11778.
66. Nesvizhskii A.I. (2014) Nat. Methods, **11**, 1114-1125.
67. Menon R., Im H., Zhang E.Y., Wu S.-L., Chen R., Snyder M., Hancock W.S., Omenn G.S. (2014) J. Proteome Res., **13**, 212-227.
68. Li J., Su Z., Ma Z.-Q., Slebos R.J.C., Halvey P., Tabb D.L., Liebler D.C., Pao W., Zhang B. (2011) Mol. Cell. Proteomics, **10**, M110.006536.
69. Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P., Leung K., Bindal N., Boutselakis H., Ding M., Bamford S., Cole C., Ward S. et al. (2015) Nucleic Acids Res., **43**, D805-811.
70. Karpova M.A., Karpov D.S., Ivanov M.V., Pyatnitskiy M.A., Chernobrovkin A.L., Lobas A.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I., Gorshkov M.V., Moshkovskii S.A. (2014) J. Proteome Res., **13**, 5551-5560.
71. Woo S., Cha S.W., Na S., Guest C., Liu T., Smith R.D., Rodland K.D., Payne S., Bafna V. (2014) Proteomics, **14**, 2719-2730.

72. Ruggles K.V., Tang Z., Wang X., Grover H., Askenazi M., Teubl J., Cao S., McLellan M.D., Clauser K.R., Tabb D.L. et al. (2016) *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 1060-1071.
73. Lobas A.A., Karpov D.S., Kopylov A.T., Solovyeva E.M., Ivanov M.V., Ilina I.I., Lazarev V.N., Kuznetsova K.G., Ilgisonis E.V., Zgoda V.G., Gorshkov M.V., Moshkovskii S.A. (2016) *Proteomics*. DOI:10.1002/pmic.201500349.
74. Li H.-D., Menon R., Omenn G.S., Guan Y. (2014) *Proteomics*, **14**, 2709-2718.
75. Mertins P., Mani D.R., Ruggles K.V., Gillette M.A., Clauser K.R., Wang P., Wang X., Qiao J.W., Cao S., Petralia F. et al. (2016) *Nature*, **534**, 55-62.
76. Chernobrovkin A.L., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Moysa A.A., Pyatnitskiy M.A., Kuznetsova K.G., Ilina I.Y., Karpova M.A., Karpov D.S., Veselovsky A.V., Ivanov M.V., Gorshkov M.V., Archakov A.I., Moshkovskii S.A. (2015) *J. Proteomics*, **120**, 169-178.
77. Sheynkman G.M., Shortreed M.R., Cesnik A.J., Smith L.M. (2016) *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)*, **9**, 521-545.
78. Huang H., Tan B.Z., Shen Y., Tao J., Jiang F., Sung Y.Y., Ng C.K., Raida M., Köhr G., Higuchi M., Fatemi-Shariatpanahi H., Harden B., Yue D.T., Soong T.W. (2012) *Neuron*, **73**, 304-316.
79. Low T.Y., van Heesch S., van den Toorn H., Giansanti P., Cristobal A., Toonen P., Schafer S., Hübner N., van Breukelen B., Mohammed S., Cuppen E., Heck A.J.R., Guryev V. (2013) *Cell Rep.*, **5**, 1469-1478.
80. Polyakova A., Kuznetsova K., Moshkovskii S. (2015) *Expert Rev. Proteomics*, 1-9.
81. Anderson L., Hunter C.L. (2006) *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 573-588.
82. Zgoda V.G., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Moisa A.A., Pyndyk N.V., Farafonova T.E., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V. et al. (2013) *J. Proteome Res.*, **12**, 123-134.
83. Chan T.H.M., Lin C.H., Qi L., Fei J., Li Y., Yong K.J., Liu M., Song Y., Chow R.K.K., Ng V.H.E., Yuan Y.-F., Tenen D.G., Guan X.-Y., Chen L. (2014) *Gut*, **63**, 832-843.
84. Melcher T., Maas S., Herb A., Sprengel R., Seeburg P.H., Higuchi M. (1996) *Nature*, **379**, 460-464.
85. Jepson J.E.C., Savva Y.A., Jay K.A., Reenan R.A. (2011) *Nat. Methods*, **9**, 189-194.
86. Li J.B., Levanon E.Y., Yoon J.-K., Aach J., Xie B., Leproust E., Zhang K., Gao Y., Church G.M. (2009) *Science*, **324**, 1210-1213.
87. Bazak L., Haviv A., Barak M., Jacob-Hirsch J., Deng P., Zhang R., Isaacs F.J., Rechavi G., Li J.B., Eisenberg E., Levanon E.Y. (2014) *Genome Res.*, **24**, 365-376.
88. Streit A.K., Matschke L.A., Dolga A.M., Rinné S., Decher N. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 26762-26771.

Поступила: 06. 07. 2016.
Принята к печати: 12. 09. 2016.

ADAR-MEDIATED MESSENGER RNA EDITING: ANALYSIS AT THE PROTEOME LEVEL

A.A. Kliuchnikova¹, K.G. Kuznetsova¹, S.A. Moshkovskii^{1,2}

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., 119121, Moscow, Russia; fax: +7(499)246-08-57; e-mail: smosh@mail.ru

²Pirogov Russian National Research Medical University,

1 Ostrovitianova str., 117997, Moscow, Russia; tel.: +7(499)246-48-81; fax: +7(499)246-08-57

Post-transcriptional RNA editing by RNA specific adenosine deaminases (ADAR) was discovered more than two decades ago. It provides additional regulation of animal and human transcriptome. In most cases, it occurs in nervous tissue, where, as a result of the reaction, adenosine is converted to inosine in particular sites of RNA. In case of messenger RNA, during translation, inosine is recognized as guanine leading to amino acid substitutions. Those substitutions are shown to affect substantially the function of proteins, e.g. subunits of the glutamate receptor. Nevertheless, most of the works on RNA editing use analysis of nucleic acids, even those which deal with a coding RNA. In this review, we propose the use of shotgun proteomics based on high resolution liquid chromatography and mass spectrometry for investigation of the effects of RNA editing at the protein level. Recently developed methods of big data processing allow combining the results of various omics techniques, being referred to as proteogenomics. The proposed proteogenomic approach for the analysis of RNA editing at the protein level will directly conduct a qualitative and quantitative analysis of protein edited sequences in the scale of whole proteome.

Key words: adenosine deaminases, RNA specific, ADAR, RNA editing, shotgun proteomics, proteogenomics