

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

БИОИНФОРМАТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ С МЕНЯЮЩИМСЯ УРОВНЕМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У МЫШЕЙ

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

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

Проанализированы экспериментальные данные (Simats A. et al. (2020) *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(12), 1921-1936), полученные при использовании комплексного мультиомного подхода по выявлению потенциальных биомаркеров крови при ишемическом инсульте у мышей и доступные в базе данных ProteomeXchange (accession code PXD016538). Идентификация пептидов с посттрансляционными модификациями (ПТМ) была проведена заново. В качестве ПТМ рассматривали только фосфорилирование и дезаминирование. Различные комбинации данных (ишемическая ткань с неповреждённой, ишемическая ткань с контролем, взятым у мышей после мнимой операции, и т.д.) сравнивали как по отношению представленности (abundance) для модифицированного пептида к немодифицированному варианту, так и по абсолютным значениям представленности. Наиболее вероятное изменение уровня ПТМ показано для 27 белков, к числу которых относятся динамин, гликогенфосфоорилаза и белок теплового шока 70 кДа.

Ключевые слова: посттрансляционные модификации; ишемический инсульт; биоинформатика

DOI: 10.18097/PBMC20216706475

ВВЕДЕНИЕ

Биосинтез полипептидной цепи на рибосомах часто ещё не конечный этап образования функционально значимого белка. Образовавшаяся полипептидная цепь подвергается дополнительным химическим превращениям, как правило, ферментативным, получившим название посттрансляционные модификации (ПТМ). Существуют две основных группы таких модификаций — отщепление части полипептидной цепи и химические модификации боковых радикалов аминокислотных остатков [1]. Последние важны для осуществления нескольких групп функций белков (внесение простетических групп, формирование третичной и четвертичной структуры, метки для внутриклеточной локализации). Для данной работы важной является способность ПТМ обеспечивать регуляцию биохимических процессов, в том числе связанных с патологическим состоянием, а значит, и служить косвенным маркером возникновения подобных состояний. При развитии патологии модифицированные формы белков, в норме отсутствующие или имеющиеся в незначительных количествах, могут попадать в кровотоки [2]. Одним из направлений в протеомных исследованиях, наряду с идентификацией пептидов, является выявление модифицированных форм [2, 3]. Однако такого рода исследования обычно ограничиваются только фиксацией самого факта обнаружения данной ПТМ; для анализа изменений соотношения количества модифицированного и не модифицированного белка необходимы специальные исследования с количественным определением белка с использованием меток. В то же время для оценки количественных изменений может быть использован и так называемый безметковый (“label-free”)

количественный протеомный анализ, основанный на сравнении площадей под пиками (abundance) зарегистрированных первичных ионов [2]. Важным фактором при определении достоверности количественных изменений является наличие достаточного количества биологических проб.

Данная работа была выполнена с использованием результатов исследования [4], доступных в базе данных ProteomeXchange (accession code PXD016538). Её авторы применяли комплексный мультиомный подход по выявлению потенциальных биомаркеров в крови мышей с экспериментальным ишемическим инсультом. Примечательно, что авторы этой работы не рассматривали вопрос об изменении уровня ПТМ, хотя полученные исходные данные и могли содержать подобную информацию.

МЕТОДИКА

Для понимания сути работы необходимо кратко описать схему эксперимента, поставленного в работе [4] в той части, в которой были исследованы образцы мозга мышей. Авторы использовали модель преходящей церебральной ишемии (tMCAO), провоцируя инфаркт в области средней мозговой артерии 8-ми мышей, лигируя её нейлоновой нитью на 90 мин с последующей реперфузией в течение 30 мин. Мнимую операцию (sham control, Sh.C) проводили без введения нейлоновой нити. Образцы мозга брали через 2 ч из правого полушария в зоне инфаркта (IP, ipsilateral) и левого (CL, contralateral) полушарий. Аналогичные пробы брали у 4-х контрольных мышей. При масс-спектрометрическом анализе каждую пробу предварительно делили на 5 проб электрофорезом

в полиакриламидном геле с SDS. Так как в работе [4] авторы не ставили задачей исследование ПТМ, то в качестве модификаций они рассматривали только карбамидметилирование остатков цистеина (особенность пробоподготовки) и спонтанное окисление метионина. Чтобы найти пептиды с такими модификациями, как фосфорилирование и дезаминирование, мы провели идентификацию пептидов заново с использованием программы Peaks Studio X Pro [5], добавив эти варианты ПТМ в параметры поиска. Ограничение для идентификации прекурсора было установлено в 2 ppm, точность идентификации фрагментов — 0,01 Да. По результатам поиска были отобраны пептиды по уровню FDR 1%.

Следует отметить, что в случае дезаминирования процесс не обязательно должен быть фермент-опосредованным. Это может быть процесс окислительного неферментативного дезаминирования [6], а также дезаминирование уже непосредственно пептидов в процессе пробоподготовки. С дезаминированием можно перепутать и наличие одноаминокислотной замены. Всё это свидетельствует о том, что к результатам по данному виду ПТМ необходимо относиться с осторожностью и по возможности применять более жёсткие условия отбора. Для анализа отбирали только те пары модифицированный пептид / немодифицированный пептид, для которых были найдены оба пептида со значением оценочной функции, удовлетворяющей условию: уровень FDR не хуже 1%. Однако если такая пара была найдена, то рассматривали и первичные ионы, совпадающие по величине m/z с точностью до 2 ppm, найденные в том же номере пробы (от 1 до 5, полученные в результате электрофореза), с пересечением диапазона по RT (retention time) не менее 50%. Анализировали как абсолютные значения abundance (в виде десятичных логарифмов), так и отношение abundance модифицированного пептида / abundance немодифицированного пептида у каждой из мышей. Учитывая малые размеры выборок, к тому же с неполными данными (не для каждой из 24 проб удавалось найти соответствующий пептид), для определения достоверности различия между выборками использовали критерий Уитни-Манна. Кроме того, контрольные выборки по правому и левому полушариям были объединены.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование для статистического анализа варианта с отношением abundance модифицированного пептида / abundance немодифицированного пептида даёт наиболее понятный и просто интерпретируемый результат. Эта величина прямо указывает на изменение количества модифицированной формы и при этом не зависит от возможных изменений условий между масс-спектрометрическими прогонами для разных мышей. В таблице 1 представлены данные только для пар пептидов, у которых хотя бы в одном из вариантов сравнения можно было применить критерий Уитни-Манна. И даже среди отобранных пар более чем в 40% случаев данных недостаточно

для применения этого критерия. Сравнение проводили по 4 вариантам: IP с контролем (Sh.C), IP с CL, и комбинированные выборки IP с CL+Sh.C, IP+CL с Sh.C. Наличие комбинированных выборок обусловлено их малыми размерами. Для того, чтобы получить соотношение в конкретной пробе (то есть для конкретной мыши), в ней должны быть идентифицированы как модифицированный, так и немодифицированный пептиды. Возможны и другие варианты сравнения, например, сравнение участков повреждённой и неповреждённой ткани, а также сравнение мышей с патологией и без неё. Однако в любом случае кодами IP и CL обозначены одни и те же мыши. В качестве меры сходства выборок используется p -value. Считается, что выборки достоверно различаются, если данное значение не больше 0,05. Для каждого случая указано число значений. Сами значения для каждой мыши и критерий U приведены в полном варианте таблицы в дополнительных материалах. Всего для 7 белков (см. ниже), приведённых в верхней части таблицы, можно подозревать отличия в уровне фосфорилирования либо дезаминирования.

Второй вариант — сравнение абсолютных значений величины abundance, которое даёт значительно больше вариантов пар пептидов с числом значений, достаточных для использования критерия Уитни-Манна. В таблице 2 приведены только те варианты, для которых хотя бы одно из значений p -value было меньше или равно 0,05. В данном случае следует рассматривать в совокупности два параметра: отличие по количеству пептидов, содержащих модификации, между двумя выборками и отличие по количеству пептидов, не содержащих модификации, между теми же выборками. Это нужно для того, чтобы оценить, с чем связаны изменения: с изменением уровня модификаций или с изменением продукции белка в целом. По сравнению с предыдущими 4-мя вариантами формирования выборок для сравнения в таблицу 2 добавлен вариант сравнения CL с Sh.C, характеризующий изменения в здоровых тканях инфарктных мышей. К сожалению, полноценное попарное сравнение и в этом случае из-за нехватки статистики не всегда возможно. Всего можно выделить 12 пептидов из белков, для которых можно предположить достоверные отличия в уровне фосфорилирования, либо дезаминирования. Ещё 8 пептидов не имеют достаточных данных для сравнения в выборках с немодифицированными вариантами. 4 пептида демонстрируют отличия только в группе сравнения CL с Sh.C.

Все белки, для которых можно предположить наличие изменения уровня модификаций, включая те, для которых недостаточно данных, приведены в таблице 3. Большая часть этих белков подвергается дезаминированию. Хотя и маловероятно, что согласованные изменения у разных мышей являются случайным процессом, для этой ПТМ такой вариант исключить нельзя. Присутствие в списке белков кератина и миозина, вероятно, обусловлено загрязнением проб. Для фосфорилированных белков изменение уровня показано, например, для динамина (Dynamin, P39053 или Q8BZ98),

Таблица 1. Данные сравнения выборок, объединяющих различные группы мышей, по параметру “отношение abundance модифицированного пептида / abundance немодифицированного пептида”

Модифицированный пептид	Uniprot AC	IP	Sh.C	p-value	IP	CL	p-value	IP	CL + Sh.C	p-value	CL + IP	Sh.C	p-value
N(+.98)GVELTATRK	P97300	2	6	0,033	2	3		2	9	0,097	5	6	0,004
WN(+.98)GQETTLTR	P11404	4	4	0,015	4	5	0,311	4	9	0,061	9	4	0,008
LQELQT(+79.97)FR	Q9CYT6	0	3		0	3		0	6		3	3	0,040
CAYEVTQ(+.98)ANGK	O08599	2	2		2	3		2	5	0,041	5	2	0,281
YEN(+.98)N(+.98)VMNLR	P63328	3	2		3	2		3	4	0,298	5	2	0,041
RELSY(+79.97)ALK	P39053 Q8BZ98	2	2		2	3		2	5	0,423	5	2	0,041
GVLDMGN(+.98)SLLER	P16546	2	2		2	3		2	5	0,041	5	2	0,423
MN(+.98)LALALT(+79.97)AAR	Q64521	2	2		2	5	0,088	2	7	0,054	7	2	0,153
FLEQQN(+.98)QVLQTK	Q6NXH9	3	2		3	3	0,191	3	5	0,500	6	2	0,067
MVT(+79.97)GDNLNTAR(+31.99)	Q9R0K7 G5E829	3	3	0,191	3	2		3	4	0,188	5	2	0,088
LTLTN(+.98)DKGR	P63017	5	4	0,451	5	2	0,088	5	6	0,324	7	4	0,254
VTVNTAYGSN(+.98)GVSVLR	P97300	3	0		3	3	0,095	3	3	0,095	6	0	
N(+.98)GDLDNDTVQK	Q9WUA3	4	1		4	2		4	3	0,108	6	1	
LLLEQ(+.98)MQK	Q60864	3	1		3	4	0,108	3	5	0,117	7	1	
N(+.98)MVPQQALVLR	Q6PIC6 Q6PIE5 Q8VDN2	3	2		3	3	0,191	3	5	0,117	6	2	0,434
GADFLVTEVEN(+.98)GGSLGSK	P52480	6	2	0,309	6	5	0,118	6	7	0,260	11	2	0,187
LS(+79.97)LDELGRK	Q6PIE5	4	4	0,333	4	5	0,196	4	9	0,408	9	4	0,124
ASTEGAN(+.98)NMPK	P43006	4	3	0,430	4	3	0,298	4	6	0,458	7	3	0,127
NQ(+.98)LSDPDLK	B2RS91	2	3		2	4		2	7	0,153	6	3	0,449
LVQ(+.98)EVT(+79.97)DFAK	P07724	1	2		1	4		1	6		5	2	0,166
N(+.98)NLAGAEELFAR	Q68FD5	2	2		2	3		2	5	0,423	5	2	0,166
LEVN(+.98)MQALK	O08638	2	2		2	3		2	5	0,166	5	2	0,423
KN(+.98)DEVSSLDNFLDLR	P43006	6	5	0,206	6	4	0,375	6	9	0,384	10	5	0,179
FLSQ(+.98)LES DR	P17710	1	5		1	2		1	7		3	5	0,186
VLNQQLTN(+.98)HLR	P39053 Q8BZ98	3	2		3	3	0,331	3	5	0,186	6	2	0,309
LLSTTN(+.98)GGQER	Q8BW75	3	1		3	3	0,331	3	4	0,188	6	1	
FAAYFQQGD MESN(+.98)GK	P06745	2	3		2	2		2	5	0,423	4	3	0,188
MYGVLPWN(+.98)AFPGK	P60202	2	3		2	2		2	5	0,423	4	3	0,188
N(+.98)GLTEENLNK	O08599	4	4	0,443	4	3	0,188	4	7	0,254	7	4	0,462
N(+.98)TLFNLSNFLDK	Q61548	2	3		2	1		2	4		3	3	0,191
KFPAVET(+79.97)R	P28660	2	2		2	4		2	6	0,202	6	2	0,309
LLKDDFLQQN(+.98)GYTPYDR	P50516	4	4	0,333	4	4	0,235	4	8	0,222	8	4	0,276
LLQDFFN(+.98)GK	P63017	6	8	0,281	6	4	0,297	6	12	0,241	10	8	0,482
TSLALDTLLN(+.98)Q(+.98)K	Q03265	4	3	0,298	4	3	0,430	4	6	0,375	7	3	0,247
N(+.98)DEVSSLDNFLDLR	P43006	5	5	0,338	5	5	0,265	5	10	0,250	10	5	0,476

УРОВЕНЬ БЕЛКОВ С ПТМ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У МЫШЕЙ

Таблица 1. Данные сравнения выборок, объединяющих различные группы мышей, по параметру “отношение abundance модифицированного пептида / abundance немодифицированного пептида” (продолжение)

Модифицированный пептид	Uniprot AC	IP	Sh.C	p-value	IP	CL	p-value	IP	CL + Sh.C	p-value	CL + IP	Sh.C	p-value
N(+.98)SVFQQGMK	Q6PIC6 Q6PIE5 Q8VDN2	2	4		2	4		2	8	0,257	6	4	0,458
TQSLYDDKN(+.98)HR	P43006	5	4	0,451	5	6	0,261	5	10	0,291	11	4	0,324
MN(+.98)LALALTAAR	Q64521	3	3	0,500	3	2		3	5	0,275	5	3	0,383
LLCLLS(+79.97)HPLK	P50396	3	5	0,275	3	4	0,430	3	9	0,356	7	5	0,313
Q(+.98)LEMLSGER	Q61FZ9	5	1		5	1		5	2	0,281	6	1	
LNKTDEELS(+79.97)S	O08599	3	2		3	2		3	4	0,298	5	2	0,281
DKDLSWFSPN(+.98)GEK	P13595	2	3		2	2		2	5	0,281	4	3	0,430
AVFQAN(+.98)QENLPLLK	Q8VDN2	4	3	0,298	4	6	0,375	4	9	0,295	10	3	0,466
VLDN(+.98)ALETEK	Q62261	1	3		1	3		1	6		4	3	0,298
GLVDSLGTGQ(+.98)R	E9Q557	4	0		4	3	0,298	4	3	0,298	7	0	
RPPS(+79.97)PDPNTK	Q62261	4	2		4	1		4	3	0,298	5	2	0,423
LDQLLY(+79.97)LPLPDEK	Q01853	2	2		2	4		2	6	0,309	6	2	0,434
LHLMQN(+.98)GKR	P46096	3	4	0,430	3	3	0,331	3	7	0,324	6	4	0,375
LQSLGTENT(+79.97)EENR	P05064	3	1		3	2		3	3	0,331	5	1	
AENSSLN(+.98)LLGK	P46460	2	3		2	1		2	4		3	3	0,331
GSTASQ(+.98)VLQR	Q8VEM8	0	3		0	3		0	6		3	3	0,331
SLAVN(+.98)LKDPR	Q7TNE1	1	3		1	2		1	5		3	3	0,331
FEAPLFN(+.98)AR	Q91VD9	3	2		3	1		3	3	0,331	4	2	
HLHFT(+79.97)LVK	Q8CI94	4	4	0,333	4	2		4	6	0,375	6	4	0,375
VFVGYN(+.98)STGAELR	P46096	5	1		5	2	0,423	5	3	0,383	7	1	
N(+.98)SLESYAFNMK	P63017	3	3	0,500	3	2		3	5	0,383	5	3	0,383
YVN(+.98)LMEQR	Q9Z1B3	3	5	0,383	3	5	0,500	3	10	0,466	8	5	0,471
VFSVT(+79.97)HLK	Q9JIS5	2	3		2	5	0,423	2	8	0,448	7	3	0,410
FKPSQY(+79.97)LK	Q62413	1	2		1	4		1	6		5	2	0,423
LLLADEN(+.98)GR	Q8BH59	2	1		2	4		2	5	0,423	6	1	
VQ(+.98)LVS(+79.97)LMK	Q9Z0E0	2	2		2	3		2	5	0,423	5	2	0,423
VAELPFN(+.98)STNK	Q6PIC6 Q6PIE5	2	2		2	3		2	5	0,423	5	2	0,423
LT(+79.97)PELLTR	P17710	2	3		2	2		2	5	0,423	4	3	0,430
LFQEDN(+.98)GMPVHLK	P48771	2	3		2	2		2	5	0,423	4	3	0,430
EGLEET(+79.97)LR	P08551	1	4		1	2		1	6		3	4	0,430
AEDELLN(+.98)R	P35564	1	3		1	3		1	6		4	3	0,430
EKDVLEDLPR	P20357	1	2		1	5		1	7		6	2	0,434
MPTPPS(+79.97)YK	P40142	1	3		1	2		1	5		3	3	0,500
LLVSASQ(+.98)DGK	P62874	1	3		1	2		1	5		3	3	0,500
Q(+.98)LLDTEDELRL	Q01065	0	3		0	3		0	6		3	3	0,500

Примечание. Число наблюдений: IP — образцы мозга из правого полушария в зоне инфаркта; CL — образцы мозга из левого, не затронутого инфарктом, полушария; Sh.C — образцы мозга контрольных мышей после мнимой операции, p-value — вероятность совпадения выборок по критерию Уитни-Манна.

Таблица 2. Данные сравнения выборок, объединяющих различные группы мышей, по параметру “логарифм абсолютного значения abundance”

Модифицированный пептид	Uniprot AC	Ip.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip	Sh.C	p-value	Ip.mod	CL.mod	p-value	IP	CL	p-value	Ip.mod	CL.mod + Sh.C.mod	p-value	Ip	CL + Sh.C	p-value	CL.mod	Sh.C.mod	p-value	CL	Sh.C	p-value	Ip.mod + CL.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip + CL	Sh.C	p-value
Модифицированный пептид	Q9WUA3	5	2	0,041	6	3	0,449	5	4	0,089	6	4	0,228	5	6	0,028	6	7	0,260	4	2		4	3	0,298	9	2	0,023	10	3	0,336
	P46096	4	2		5	6	0,206	4	3	0,142	5	5	0,417	4	5	0,043	5	11	0,248	3	2		5	6	0,324	7	2	0,028	10	6	0,435
	O08638	5	3	0,117	3	3	0,331	5	6	0,041	3	3	0,331	5	9	0,031	3	6	0,259	6	3	0,449	3	3	0,331	11	3	0,320	6	3	0,449
	P97300	3	6	0,047	5	8	0,413	3	4	0,430	5	5	0,500	3	10	0,136	5	13	0,461	4	6	0,055	5	8	0,255	7	6	0,019	10	8	0,282
	P16546	2	3		3	2		2	6	0,033	3	4	0,188	2	9	0,023	3	6	0,259	6	3	0,259	4	2		8	3	0,459	7	2	0,232
	Q61548	3	1		4	4	0,333	3	2		4	5	0,451	3	3	0,040	4	9	0,469	2	1		5	4	0,135	5	1		9	4	0,158
	Q61548	2	4		6	7	0,360	2	1		6	8	0,423	2	5	0,041	6	15	0,363	1	4		8	7	0,477	3	4	0,056	14	7	0,426
	P16546	2	2		3	2		2	3		3	4	0,108	2	5	0,041	3	6	0,349	3	2		4	2		5	2	0,423	7	2	0,054
	P63017	6	4	0,375	7	6	0,260	6	3	0,047	7	7	0,399	6	7	0,112	7	13	0,290	3	4	0,108	7	6	0,360	9	4	0,408	14	6	0,268
	Q80TJ1	5	1		4	1		5	5	0,047	4	4	0,443	5	6	0,118	4	5	0,451	5	1		4	1		10	1		8	1	
	Q8VEM8	3	5	0,275	4	3	0,188	3	6	0,449	4	1		3	11	0,438	4	4	0,156	6	5	0,011	1	3		9	5	0,023	5	3	0,186
	P50446	3	3	0,040	0	1		3	2		0	0		3	5	0,068	0	1		2	3		0	1		5	3	0,037	0	1	
	P23116	2	3		2	1		2	7	0,442	2	1		2	10	0,226	2	2		7	3	0,020	1	1		9	3	0,013	3	1	
	E9Q4S1	2	5	0,166	2	1		2	5	0,041	2	2		2	10	0,054	2	3		5	5	0,047	2	1		7	5	0,208	4	1	
	Q8C1B7	2	2		1	1		2	4		1	3		2	6	0,033	1	4		4	2		3	1		6	2	0,122	4	1	
	Q3UIA2	5	5	0,072	1	1		5	5	0,072	1	2		5	10	0,038	1	3		5	5	0,265	2	1		10	5	0,334	3	1	
	Q9DBG3	1	3		0	0		1	2		0	1		1	5		0	1		2	3		1	0		3	3	0,040	1	0	
	Q8CI94	1	3		1	1		1	2		1	0		1	5		1	1		2	3		0	1		3	3	0,040	1	1	
	Q62245	2	2		1	0		2	3		1	2		2	5	0,088	1	2		3	2		2	0		5	2	0,041	3	0	
	Q60864	3	3	0,095	1	3		3	3	0,331	1	1		3	6	0,123	1	4		3	3	0,095	1	3		6	3	0,047	2	3	
Q9ZIB3	8	5	0,471	3	6	0,449	8	5	0,210	3	7	0,324	8	10	0,313	3	13	0,343	5	5	0,006	7	6	0,260	13	5	0,118	10	6	0,352	
Q9QYC0	4	3	0,430	2	7	0,028	4	3	0,298	2	3		4	6	0,458	2	10	0,020	3	3	0,040	3	7	0,500	7	3	0,127	5	7	0,127	
P11404	4	4	0,234	4	5	0,056	4	7	0,009	4	5	0,013	4	11	0,021	4	10	0,012	7	4	0,036	5	5	0,125	11	4	0,198	9	5	0,473	
Q7TNE1	3	3	0,500	4	6	0,083	3	4	0,298	4	4	0,056	3	7	0,324	4	10	0,039	4	3	0,026	4	6	0,228	7	3	0,127	8	6	0,373	
P16546	6	6	0,344	1	2		6	5	0,261	1	2		6	11	0,480	1	4		5	6	0,028	2	2		11	6	0,087	3	2		
DLAN(+98)ENEAQFQ(+98)LR		4	2		0	1		4	6	0,120	0	0		4	8	0,276	0	1		6	2	0,033	0	1		10	2	0,054	0	1	
EKGADFLVTEVEN(+98)GGSLSK	P52480	2	5	0,423	3	1		2	3		3	4	0,430	2	8	0,448	3	5	0,383	3	5	0,050	4	1		5	5	0,087	7	1	
LVQ(+98)EVT(+79,97)DFAK	P07724	1	3		6	6	0,023	1	5		6	7	0,003	1	8		6	13	0,002	5	3	0,500	7	6	0,415	6	3	0,349	13	6	0,102

УРОВЕНЬ БЕЛКОВ С ПТМ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У МЫШЕЙ

Таблица 2. Данные сравнения выборок, объединяющих различные группы мышей, по параметру “логарифм абсолютного значения abundance” (продолжение)

Модифицированный пептид	Uniprot AC	Ip.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip	Sh.C	p-value	Ip.mod	CL.mod	p-value	IP	CL	p-value	Ip.mod	CL.mod	p-value	CL + Sh.C	p-value	Ip	CL	p-value	Ip.mod + CL.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip + CL	Sh.C	p-value						
FLMAN(+98)GQLVK LY(+79.97)N(+98)NHELRL SLNSEMDN(+98)LLAN(+98)LR Q(+98)LEMLSGER TQ(+98)SLYDDKNHR S(+79.97)GKPAELLK GLQY(+79.97)LLER Q6PIC6 Q6PIES Q8VDN2	P50396	4	3	0,298	3	4	0,026	4	1		3	4	0,430	4	4	0,443	3	8	0,179	1	3		4	4	0,015	5	3	0,186	7	4	0,005		
			1	1		7	3	0,011	1	1		7	5	0,165	1	2		7	8	0,343	1	1		5	3	0,018	2	1		12	3	0,006	
			0	1		2	5	0,041	0	0		2	3		0	1		2	8	0,120	0	1		3	5	0,018	0	1		5	5	0,006	
			6	5	0,206	6	1		6	3	0,123	6	4	0,007	6	8	0,110	6	5	0,041	3	5	0,068	4	1		9	5	0,500	10	1		
	P43006	3	3	0,331	6	6	0,015	3	2		6	7	0,216	3	5	0,275	6	13	0,044	2	3		7	6	0,027	5	3	0,383	13	6	0,008		
	P40142	3	3	0,500	6	7	0,019	3	1		6	6	0,023	3	4	0,430	6	13	0,008	1	3		6	7	0,309	4	3	0,430	12	7	0,187		
			0	0		2	4		0	1		2	5	0,423	0	1		2	9	0,278	1	0		5	4	0,010	1	0		7	4	0,009	
	Q6PIC6																																
	Q6PIES	3	2		3	5	0,500	3	3	0,500		3	4	0,026	3	5	0,500	3	9	0,133	3	2		4	5	0,010	6	2	0,434	7	5	0,072	
	Q8VDN2																																
TVVSLTQ(+98)ER Q(+98)LEESVSEK WVKNMEKTN(+98)K AQ(+98)ELLAR EANELQ(+98)QWLTEK P16546 Q61699 O08599 P07724 QLASLTGLVQS(+79.97)ALLR T(+79.97)Q(+98)LDHYVGLAR KY(+79.97)VDKLEK ENYGELADCCT(+79.97)K DLAS(+79.97)VQALLR P63017 FFYSSGS(+79.97)SSPHTAK KDLT(+79.97)AALAAER MADPAECS(+79.97)LK Q(+98)RAEVCQLR		0	1		3	7	0,011	0	1		3	6	0,449	0	2		3	13	0,069	1	1		6	7	0,050	1	1		9	7	0,010		
		1	1		6	5	0,158	1	0		6	4	0,035	1	1		6	9	0,044	0	1		4	5	0,010	1	1		10	5	0,334		
	Q9QYB8	0	1		4	4	0,015	0	1		4	1		0	2		4	5	0,010	1	1		1	4		1	1		5	4	0,089		
	Q6PIC6	0	0		6	6	0,046	0	4		6	5	0,392	0	4		6	11	0,196	4	0		5	6	0,018	4	0		11	6	0,012		
	P16546	1	3		6	6	0,468	1	1		6	4	0,012	1	4		6	10	0,106	1	3		4	6	0,035	2	3		10	6	0,208		
	Q61699	1	1		3	4	0,025	1	1		3	5	0,037	1	2		3	9	0,013	1	1		5	4	0,134	2	1		8	4	0,466		
	O08599	3	0		6	7	0,050	3	3	0,500	6	8	0,017	3	3	0,500	6	15	0,013	3	0		8	7	0,343	6	0		14	7	0,288		
	P07724	1	4		3	2		1	2		3	4	0,026	1	6		3	6	0,014	2	4		4	2		3	4	0,188	7	2	0,153		
		0	0		3	6	0,123	0	1		3	6	0,449	0	1		3	12	0,307	1	0		6	6	0,015	1	0		9	6	0,015		
	Q9ES97	3	3	0,500	3	4	0,108	3	3	0,191	3	4	0,430	3	6	0,349	3	8	0,179	3	3	0,040	4	4	0,015	6	3	0,123	7	4	0,015		
P56399	1	0		4	4	0,030	1	1		4	3	0,188	1	1		4	7	0,254	1	0		3	4	0,056	2	0		7	4	0,015			
P07724	0	1		4	2		0	0		4	2		0	1		4	4	0,015	0	1		2	2		0	1		6	2	0,033			
P16546	3	1		5	5	0,072	3	4	0,108	5	5	0,018	3	5	0,117	5	10	0,016	4	1		5	5	0,265	7	1		10	5	0,334			
P63017	8	8	0,357	6	8	0,474	8	7	0,477	6	5	0,118	8	15	0,436	6	13	0,315	7	8	0,408	5	8	0,017	15	8	0,349	11	8	0,100			
		1	2		6	5	0,118	1	2		6	8	0,474	1	4		6	13	0,284	2	2		8	5	0,017	3	2		14	5	0,023		
P39053	4	1		5	5	0,018	4	2		5	5	0,265	4	3	0,430	5	10	0,049	2	1		5	5	0,105	6	1		10	5	0,022			
		1	1		1	5		1	0		1	4		1	1		1	9		0	1		4	5	0,019	1	1		5	5	0,018		
		3	3	0,331	1	3		3	5	0,184	1	4		3	8	0,179	1	7		5	3	0,500	4	3	0,026	8	3	0,379	5	3	0,018		

Таблица 2. Данные сравнения выборок, объединяющих различные группы мышей, по параметру “логарифм абсолютного значения abundance” (продолжение)

Модифицированный пептид	Uniprot AC	Ip.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip	Sh.C	p-value	Ip.mod	CL.mod	p-value	IP	CL	p-value	Ip.mod	CL.mod + Sh.C.mod	p-value	Ip	CL + Sh.C	p-value	CL.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip + CL	Sh.C	p-value
		2	0		4	4	0,056	2	1		4	5	0,033	2	1		4	9	0,019	1	0		9	4	0,198
NNTQVLLN(+98)CR	Q68FD5	0	0		2	4		0	2		2	3		0	2		2	7	0,232	2	0		5	4	0,019
	P11798	2	1		2	5	0,088	2	2		2	2		2	3		2	7	0,153	2	1		4	5	0,019
	Q9QYC0	3	3	0,500	2	7	0,028	3	7	0,086	2	3		3	10	0,136	2	10	0,020	7	3	0,086	5	7	0,127
	P58252	1	2		4	2		1	2		4	4	0,056	1	4		4	6	0,021	2	2		8	2	0,075
	Q9D394	3	0		2	4		3	0		2	4		3	0		2	8	0,025	0	0		6	4	0,169
	MGDPLPLNLN(+98)JLQ(+98)EPR	2	4		2	3		2	2		2	2		2	6	0,202	2	5	0,166	2	4		4	3	0,026
	Q(+98)LLDTEDEL	2	4		1	3		2	8	0,180	1	3		2	12	0,261	1	6		8	4	0,222	4	3	0,026
	P63017	3	4	0,188	4	4	0,333	3	4	0,298	4	3	0,026	3	8	0,179	4	7	0,254	4	4	0,443	7	4	0,149
	Q76MZ3	4	1		1	4		4	3	0,298	1	2		4	4	0,235	1	6		3	1		3	4	0,026
	LQAHVAQT(+79.97)NLLR		2	0		3	2		2	0		3	2		2	0		3	4	0,026	0	0		5	2
S(+79.97)LLHLS(+79.97)LAN(+.98)NNLQTLPK		0	0		3	1		0	2		3	3	0,040	0	2		3	4	0,026	2	0		6	1	
	ALNEQ(+98)ACR	0	2		4	3	0,026	0	1		4	7	0,110	0	3		4	10	0,039	1	2		11	3	0,081
	TALVAN(+.98)TSNMPVAAR	0	0		5	6	0,324	0	1		5	3	0,117	0	1		5	9	0,175	1	0		8	6	0,281
	KVQ(+98)AAQSEAK	1	2		4	4	0,097	1	1		4	5	0,033	1	3		4	9	0,027	1	2		9	4	0,439
	LFQEDN(+98)GMPVHLK	5	4	0,196	2	4		5	3	0,117	2	3		5	7	0,097	2	7	0,029	3	4	0,108	5	4	0,451
	DAMPSDANLN(+98)SLNK	4	1		2	2		4	4	0,235	2	5	0,041	4	5	0,357	2	7	0,029	4	1		7	2	0,232
	AEDELLN(+98)R	2	6	0,122	2	5	0,423	2	4		2	5	0,423	2	10	0,054	2	10	0,457	4	6	0,083	7	5	0,052
	T(+79.97)LLSSLKT(+79.97)K	0	1		5	1		0	0		5	4	0,033	0	1		5	5	0,030	0	1		9	1	
	KLDSQ(+98)ER	2	0		5	5	0,087	2	0		5	2	0,166	2	0		5	7	0,285	0	0		7	5	0,031
	KLVEYQC(+98)R	0	0		4	6	0,083	0	1		4	7	0,036	0	1		4	13	0,031	1	0		11	6	0,326
Q(+98)SCSGSPRVK		0	1		3	4	0,108	0	1		3	5	0,037	0	2		3	9	0,032	1	1		8	4	0,466
	CALKVEQ(+98)SAER	0	2		2	4		0	0		2	5	0,423	0	2		2	9	0,453	0	2		7	4	0,036
	LPSSQQ(+98)HPHLR	1	0		4	3	0,108	1	1		4	2		1	1		4	5	0,033	1	0		6	3	0,349
	YQ(+98)QEVDRLK	2	5	0,423	2	4		2	4		2	2		2	9	0,144	2	6	0,033	4	5	0,270	4	4	0,097
	Q(+98)VHDT(+79.97)NMR	2	0		2	2		2	1		2	4		2	1		2	6	0,067	1	0		6	2	0,033
	TWN(+.98)DPSVQ(+98)QDLK	0	2		5	5	0,105	0	0		5	3	0,037	0	2		5	8	0,034	0	2		8	5	0,210
HLNATVNNLQ(+98)T(+79.97)K	Q9D394	1	1		3	4	0,108	1	1		3	3	0,040	1	2		3	7	0,034	1	1		6	4	0,458

Таблица 2. Данные сравнения выборок, объединяющих различные группы мышей, по параметру “логарифм абсолютного значения abundance” (продолжение)

Модифицированный пептид	Uniprot AC	Ip.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip	Sh.C	p-value	Ip.mod	CL.mod	p-value	IP	CL	p-value	Ip.mod	CL.mod	p-value	CL + Sh.C	p-value	Ip	CL	Sh.C	p-value	Ip.mod + CL.mod	Sh.C.mod	p-value	Ip + CL	Sh.C	p-value		
		0	0		3	2		0	1		3	5	0,037	0	1		3	7	0,034	1	0	5	2	0,088	1	0		8	2	0,348
VVSSTS(+79.97)EEEEAFTEK LHS(+79.97)PT(+79.97)NPR QWSVHS(+79.97)RWTK	Q4KMM3	1	1		4	4	0,097	1	2		4	2		1	3		4	6	0,297	2	1	2	4		3	1		6	4	0,035
	Q01065	1	0		4	3	0,108	1	2		4	3	0,056	1	2		4	6	0,035	2	0	3	3	0,500	3	0		7	3	0,247
	P68373																													
	P68369 P05213	0	0		4	6	0,035	0	1		4	6	0,297	0	1		4	12	0,082	1	0	6	6	0,236	1	0		10	6	0,072
AENSSLN(+98)LLGK SSGQ(+98)HHLSFFAFK MTQALPRQ(+98)PQR MGSEQ(+98)VLMR KPGNEGSGAPS(+79.97)PLSK TPGPGAQS(+79.97)ALR LDALDQ(+98)LLEAK LGLHEDSTN(+98)RR QS(+79.97)LP SHDLR EAN(+98)VLWSK LLGWLQ(+98)NK FT(+79.97)LRDEGK ALSAGNLDDALQ(+98)CYSEALK SVDLVMQELLNT(+79.97)VK SVDLVM(+31.99)QELLN(+98)TVK Q(+98)LVSEMLR DNGQYKCT(+79.97)SKK TDYNLCN(+98)GK	P46460	3	4	0,298	6	6	0,054	3	1		6	6	0,087	3	5	0,275	6	12	0,038	1	4	6	6	0,344	4	4	0,443	12	6	0,256
	Q8C8R3	2	0		1	3		2	3		1	2		2	3		1	5		3	0	2	3		5	0		3	3	0,038
	O88935	3	3	0,500	3	4	0,108	3	2		3	7	0,247	3	5	0,383	3	11	0,500	2	3	7	4	0,054	5	3	0,500	10	4	0,039
		2	0		4	3	0,108	2	2		4	7	0,054	2	2		4	10	0,039	2	0	7	3	0,500	4	0		11	3	0,320
	Q61548	2	0		3	1		2	2		3	2		2	2		3	3	0,040	2	0	2	1		4	0		5	1	
		1	2		3	2		1	1		3	3	0,040	1	3		3	5	0,068	1	2	3	2		2	2		6	2	0,434
		1	0		2	3		1	0		2	1		1	0		2	4		0	0	1	3		1	0		3	3	0,040
	P11499	1	3		3	1		1	0		3	3	0,040	1	3		3	4	0,188	0	3	3	1		1	3		6	1	
		2	2		1	2		2	1		1	4		2	3		1	6		1	2	4	2		3	2		5	2	0,041
		1	0		4	2		1	2		4	1		1	2		4	3	0,298	2	0	1	2		3	0		5	2	0,041
	1	1		2	2		1	1		2	3		1	2		2	5	0,041	1	1	3	2		2	1		5	2	0,088	
		1	0		5	5	0,047	1	0		5	7	0,097	1	0		5	12	0,041	0	0	7	5	0,500	1	0		12	5	0,215
	Q60864	0	0		3	3	0,095	0	1		3	3	0,095	0	1		3	6	0,047	1	0	3	3	0,331	1	0		6	3	0,349
	Q8BZ98	0	1		5	2	0,423	0	0		5	5	0,047	0	1		5	7	0,072	0	1	5	2	0,281	0	1		10	2	0,457
	Q8BZ98	0	1		5	2	0,423	0	1		5	5	0,047	0	2		5	7	0,072	1	1	5	2	0,281	1	1		10	2	0,457
		1	0		3	6	0,078	1	1		3	3	0,095	1	1		3	9	0,048	1	0	3	6	0,259	2	0		6	6	0,344
		3	1		2	3		3	3	0,500	2	3		3	4	0,430	2	6	0,307	3	1	3	3	0,061	6	1		5	3	0,050
	Q80TJ1	1	1		6	2	0,090	1	0		6	6	0,236	1	1		6	8	0,500	0	1	6	2	0,067	1	1		12	2	0,050

Примечание. Число наблюдений: IP — образцы мозга из правого полушария в зоне инфаркта; CL — образцы мозга из левого, не затронутого инфарктом, полушария; Sh.C — образцы мозга контрольных мышей после минимой операции, mod — в выборке модифицированные пептиды, p-value — вероятность совпадения выборок по критерию Уитни-Манна.

Таблица 3. Белки, для которых можно предположить изменения уровня модификации при ишемическом инсульте

Uniprot ID	Группа отбора	ПТМ в пептиде, по которому отобран белок	Число пептидов, по которым отобран белок	Общее число пептидов в работе	Найденные ПТМ	Название белка по Uniprot
P39053	1	дезаминирование	1	3	фосфорилирование, дезаминирование	Dynamin-1
Q9CYT6	1	дезаминирование	1	3	фосфорилирование	Adenylyl cyclase-associated protein 2
P63328	1	дезаминирование	1	2	дезаминирование	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform
Q8BZ98	1	фосфорилирование	1	4	фосфорилирование, дезаминирование	Dynamin-3
O08599	1	фосфорилирование	1	4	фосфорилирование, дезаминирование	Syntaxin-binding protein 1
P16546	1	дезаминирование	2	6	фосфорилирование, дезаминирование	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
O08638	2	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Myosin-11
Q9WUA3	2	дезаминирование	1	1	дезаминирование	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type
Q80TJ1	2	дезаминирование	1	2	дезаминирование	Calcium-dependent secretion activator 1
P97300	2	дезаминирование	1	2	дезаминирование	Neuroplastin
Q61548	2	дезаминирование	1	3	фосфорилирование, дезаминирование	Clathrin coat assembly protein AP180
P63017	2	дезаминирование	1	3	дезаминирование	Heat shock 70 kDa protein
P46096	2	дезаминирование	1	3	дезаминирование	Synaptotagmin-1
Q7TNE1	3	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Succinate-hydroxymethylglutarate CoA-transferase
P11404	3	дезаминирование	2	1	дезаминирование	Fatty acid-binding protein
Q9Z1B3	3	дезаминирование	1	1	дезаминирование	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1
Q9QYC0	3	фосфорилирование	1	2	фосфорилирование, дезаминирование	Alpha-adducin
P50446	4	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Keratin, type II cytoskeletal 6A
Q62245	4	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Son of sevenless homolog 1
Q3UIA2	4	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Rho GTPase-activating protein 17
Q8C1B7	4	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Septin-11
P23116	4	дезаминирование	1	1	дезаминирование	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
E9Q4S1	4	дезаминирование	1	1	дезаминирование	High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8B
Q8CI94	4	дезаминирование	1	2	фосфорилирование, дезаминирование	Glycogen phosphorylase, brain form
Q8VEM8	4	дезаминирование	1	2	дезаминирование	Phosphate carrier protein, mitochondrial
Q9DBG3	4	дезаминирование	1	2	дезаминирование	AP-2 complex subunit beta
Q60864	4	дезаминирование	1	3	дезаминирование	Stress-induced-phosphoprotein 1

Примечание. Группа отбора: (1) по отношению “abundance модифицированного пептида / abundance немодифицированного пептида”; (2) по абсолютным значениям abundance — варианты, когда выборка с IP для модифицированных пептидов отличается от контрольных выборок, а для немодифицированных нет; (3) аналогично 2, но для сравнения CL с Sh.C; (4) варианты, когда выборка с IP для модифицированных пептидов отличается от контрольных выборок, а для немодифицированных нет достаточного количества данных.

связь которого с ишемическим инсультом была показана в экспериментах [7], и который рассматривается как терапевтическая мишень. Также ранее была показана активация фосфорилирования гликогенфосфорилазы (Glycogen phosphorylase, Q8CI94) при ишемическом инсульте [8]. В нашем случае для пептида этого белка с фосфорилированием критерий Уитни-Манна не показал достоверности изменений, но имеется другой пептид с дезаминированием, хотя и в группе без контроля по изменению общего уровня белка. Среди выявленных белков имеется белок теплового шока 70 кДа (Heat shock 70 kDa protein, P63017), которому отводят важную роль в регуляции гомеостаза в клетках, в том числе и при ишемическом инсульте [9].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Годовикова Т.С. (2009) *Acta Naturae*, **1**(3), 32-56. [Knorre D.G., Kudryashova N.V., Godovikova T.S. (2009) *Acta Naturae*, **1**(3), 29-51.]
2. Кисриева Ю.С., Петушкова Н.А., Саменкова Н.Ф., Кузнецова Г.П., Ларина О.В., Теряева Н.Б., Усачев Д.Ю., Згода В.Г., Карузина И.И. (2019) *Биомедицинская химия*, **65**(3), 251-258. [Kisrieva Y.S., Petushkova N.A., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Larina O.B., Teryaeva N.B., Usachev D.Yu., Zgoda V.G., Karuzina I.I. (2019) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(3), 251-258.] DOI: 10.18097/PBMC20196503251
3. Нарыжный С.Н., Легина О.К. (2019) *Биомедицинская химия*, **65**(4), 263-276. [Naryzhny S.N., Legina O.K. (2019) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(4), 263-276.] DOI: 10.18097/PBMC20196504263
4. Simats A., Ramiro L., Garcia-Berrocso T., Briansó F., Gonzalo R., Martín L., Sabé A., Gill N., Penalba A., Colomé N., Sánchez A., Canals F., Bustamante A., Rosell A., Montaner J. (2020) *Mol. Cell. Proteomics*, **19**(12), 1921-1936.
5. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**(20), 2337-2342.
6. McKerrow J.H. (1979) *Mech. Ageing Dev.*, **10**(6), 371-377.
7. Kim J.Y., Kim N., Lee J.E., Yenari M.A. (2017) *Ther. Hypothermia Temp. Manag.*, **7**(3), 171-177.
8. Feng Wang L., Ramasamy R., Schaefer S. (1999) *Cardiovasc. Res.*, **42**(3), 644-650.
9. Kim J.Y., Kim J.W., Yenari M.A. (2020) *Neurosci. Lett.*, **715**, 134642. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134642

Поступила в редакцию: 10. 11. 2021.
После доработки: 30. 11. 2021.
Принята к печати: 02. 12. 2021.

THE BIOINFORMATIC IDENTIFICATION OF PROTEINS WITH VARYING LEVELS OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE IN MICE

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

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

The experimental data obtained by Simats A. et al. (*Molecular & Cellular Proteomics*, 2020, **19**(12), 1921-1936) was analysed using a bioinformatic approach. Original experimental results available in the ProteomeXchange database were obtained using a comprehensive multidomain approach to identify potential blood biomarkers in ischemic stroke in mice. The identification of peptides with post-translational modification (PTM) was performed by us using the raw data (accession code PXD016538). Only phosphorylation and deamination were considered as PTMs. Different combinations of data sets (ischemic tissue with intact tissue, ischemic tissue with control taken from mice after sham surgery, etc.) were compared both in terms of the ratio of abundance for the modified peptide to the unmodified variant and in terms of absolute values of abundance. The most likely change in precisely PTM levels was shown for 27 proteins, which include dynamin, glycogen phosphorylase and 70 kDa heat shock protein.

Key words: posttranslational modifications; ischemic stroke; bioinformatics

Funding. The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030.

Received: 10.11.2021, revised: 30.11.2021, accepted: 02.12.2021.