

На правах рукописи

Ключникова Анна Алексеевна

**ПЕРЕКОДИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЕ МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ И ЧЕЛОВЕКА ВСЛЕДСТВИЕ
РЕДАКТИРОВАНИЯ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАМИ**

1.5.4. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор РАН
Мошковский Сергей Александрович

Официальные оппоненты: **Москалев Алексей Александрович** доктор биологических наук, член-корр. РАН, заведующий лабораторией геропротекторных и радиопротекторных технологий Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН

Клычников Олег Игоревич
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры биохимии МГУ им. М.В.Ломоносова

Ведущая организация: ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

Защита состоится «11» ноября 2021 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121, гор. Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы, цель и задачи

Протеогеномика является новой областью молекулярного анализа. Она основана на интеграции результатов геномных, транскриптомных и протеомных данных (Мошковский С.А. и соавт., 2020). В частности, она направлена на выявление и количественную оценку вариации первичной структуры белка, кодируемой геномом, и увеличение диапазона результатов панорамной протеомики для более точной идентификации белковых последовательностей. В настоящее время изучение белковых вариантов методами протеогеномики в основном используется при исследовании злокачественных опухолей, что позволяет, вслед за геномом злокачественной опухоли, точнее охарактеризовать и ее протеом (Lobas A.A. *et al.*, 2018). В дополнение к изменениям в геноме, одним из источников вариантов аминокислотной последовательности является редактирование РНК - не до конца изученное явление посттранскрипционной модификации РНК. Редактирование матричной РНК может приводить к изменению структуры белков, в результате чего синтезируется укороченный белок или белок с другой аминокислотной последовательностью. Этот процесс подразумевает химическую модификацию оснований, точнее, сайт-специфическое дезаминирование с преобразованием аденозина в инозин или цитозина в урацил (Patterson *et al.*, 1995). Наиболее распространенный вид такого явления – преобразование остатка аденозина с получением инозина, возникающее посредством активности ферментов семейства РНК-зависимых аденозиндезаминаз (ADAR, код классификации ферментов EC: 3.5.4.37). Некоторые события редактирования РНК, приводящие к аминокислотным заменам в белках, как установлено, имеют функциональную значимость у многоклеточных организмов с точки зрения функционирования молекулярных механизмов в их клетках (Гончаров А.О. и соавт., 2019).

Представленная работа была направлена на изучение последствий редактирования РНК ферментами ADAR на протеомном уровне с использованием протеогеномного подхода. Методами хроматомасс-спектрометрии выявлены белки центральной нервной системы плодовой мушки, мыши и человека, последовательность которых перекодирована указанным путем. Исследование включало применение находящихся в открытом доступе результатов геномных и протеомных данных для биоинформатического поиска редактирования РНК и получение протеомов выбранных клеток и тканей модельных организмов для подтверждения результатов этого поиска.

Цель данной работы - идентификация перекодирования белковых последовательностей, возникших в результате редактирования РНК с дезаминированием аденозина, в масштабе протеомов клеток и тканей центральной нервной системы плодовой мушки, мыши и человека.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Поиск перекодированных редактированием РНК участков в протеомах плодовой мушки с использованием протеомных и транскриптомных данных, как находящихся в открытом доступе, так и собственных.
2. Валидация и количественный анализ событий перекодирования с помощью таргетного протеомного анализа головного мозга плодовой мушки на разных стадиях онтогенеза.
3. Поиск и сравнительный анализ участков перекодирования в масштабах протеомов клеток и тканей центральной нервной системы мыши и человека с использованием находящихся в открытом доступе данных.
4. Валидация и количественный анализ событий перекодирования с помощью таргетного протеомного анализа на уровне протеома головного мозга трансгенных мышей – моделей заболеваний ЦНС.

1.2. Научная новизна работы

В этом проекте впервые были использованы панорамные протеомы головного мозга дрозофилы, мыши и человека для выявления в этих организмах перекодирования белков вследствие дезаминирования остатков аденозина в кодонах мРНК ферментами семейства ADAR. Для *Drosophila melanogaster* были проверены и количественно оценены отобранные перекодированные сайты с помощью таргетной протеомики в тканях мозга на разных стадиях метаморфоза. На дрозофиле показано, что некоторые белки с известной функцией, например, эндофилин А, в мозге насекомого перекодированы в значительной степени. Также в работе впервые выявлены последствия ADAR-опосредованного редактирования мРНК в масштабе протеомов мыши и человека. Хотя исследуемый тип редактирования РНК реализуется почти во всех тканях организма млекопитающего, только десятки перекодированных участков обнаруживаются на уровне протеома. В этом исследовании найдено тридцать восемь потенциальных перекодированных сайтов в центральной нервной системе человека и двадцать у мыши в протеомах с наибольшим количеством

идентификаций, доступных на сегодняшний день. Часть из них валидированы в головном мозге экспериментальных мышей методом таргетной протеомики.

1.3. Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что редактирование РНК потенциально образует тысячи аминокислотных замен, но до уровня детектирования самого чувствительного протеомного анализа доходят немногие - 1% у дрозофилы примерно из 8 тысяч сайтов, обнаруженных путем анализа РНК, и 2-3% у млекопитающих из 1-2 тыс. таких сайтов. Мы показали, что консерватизм в участках редактирования белков между насекомым и млекопитающими отсутствует. У дрозофилы оно затрагивает белки пресинаптической мембраны, в частности, участвующие в созревании и высвобождении мембранных везикул с нейромедиатором. Кроме того, редактируются некоторые белки цитоскелета и ионные каналы. У мыши и человека, наоборот, воспроизводимо редактируются одни и те же сайты, часть из которых уже хорошо известна из биохимических исследований, не связанных с протеомикой. Это глутаматные рецепторы АМРА-типа, белки цитоскелета и корцепторы (продукты генов *FLNA* и *CYFIP2*), белок везикул комплекса Гольджи альфа-коатомер, а также единственный продукт, который редактируется и у дрозофилы - участник экзоцитоза секреторных везикул *CADPS*. В данной работе мы демонстрируем подход и инструменты, которые могут быть применены для анализа роли редактирования РНК в функциональных моделях патологических процессов, а также для использования перекодированных протеоформ в качестве биомаркеров различных патологий нервной системы.

1.4. Личный вклад автора

Работа была выполнена в лаборатории медицинской протеомики ИБМХ в период с 2016 по 2020 год. Соискатель проводил поиск и анализ литературы, планирование экспериментов, пробоподготовку к анализу нуклеиновых кислот и протеомный анализ данных, интерпретацию результатов и подготовку публикаций. Автор благодарит коллег за проведение масс-спектрометрического анализа, синтез изотопно-меченных пептидных стандартов, подготовку программного обеспечения для обработки данных и работу с трансгенными мышами.

1.5. Основные положения, выносимые на защиту

1. Протеогеномный подход позволяет идентифицировать десятки участков перекодирования белков вследствие редактирования РНК аденозиндезаминазами, в том числе и ранее описанные случаи перекодирования белковой последовательности, например, в субъединицах ионотропных глутаматных рецепторов млекопитающих.
2. Впервые идентифицированы события перекодирования вследствие редактирования РНК в центральной нервной системе плодовой мушки, мыши и человека. Часть из обнаруженных участков перекодирования подтверждены таргетной протеомикой.
3. Перекодирование за счет редактирования РНК у насекомых и млекопитающих затрагивает в основном компоненты цитоскелета и белки, участвующие в синаптической передаче.
4. Редактирование РНК потенциально образует тысячи аминокислотных замен, но до уровня детектирования с помощью протеомного анализа доходят немногие, например, у млекопитающих 2-3% из 800-1800 таких сайтов.

1.6. Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием методов обработки и оценки данных, соответствующих современным научным критериям. Обсуждение результатов проведено с учетом современных исследований, опубликованных в области белковой биохимии, протеомики и протеогеномики.

Положения и выводы, изложенные в диссертации, подтверждены публикациями и следуют из результатов исследований, проведенных диссертантом. Основные положения работы были опубликованы в рецензируемых научных изданиях, а также представлены в виде постерных докладов на конгрессе международной организации «Протеом человека» (HUPO 2017, Дублин), конференции «Клиническая протеомика. Постгеномная медицина» (ClinProt 2017, Москва), конгрессе Федерации Европейских биохимических обществ (FEBS 2018, Прага) и конгрессе Европейской протеомной ассоциации (EuPA 2019, Потсдам). Устные сообщения с соавторством диссертанта представлялись на 7-м и 9-м съезде Всероссийского масс-спектрометрического общества (Москва, 2015 и 2019) и международном

конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2019).

1.7. Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 13 работ, из которых 6 статей представлены в рецензируемых научных журналах и 7 публикаций находятся в трудах конференций.

1.8. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 11 рисунков. Состоит из следующих глав: словарь терминов и сокращений, введение, обзор литературных источников, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, а также включает благодарности, финансирование и приложение.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе поиск сайтов перекодирования производился с использованием протеоеномного подхода. Общая схема, используемая нами, представлена на рисунке 1. Следуя этому подходу, стандартную базу пептидных последовательностей FASTA расширили за счет добавления перекодированных вариантов белков, найденных при анализе данных высокопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот. Примерами баз данных, содержащих информацию о редактировании на транскриптомном уровне, являются RADAR (Ramaswami *et al.*, 2014) и DARNED (Kiran *et al.*, 2013). На следующем этапе данные панорамного протеомного анализа, как взятые из открытого доступа, так и полученные в нашем коллективе, проанализировали с использованием дополненной протеомной базы данных. В результате получили список пептидов, содержащий перекодированные редактированием РНК последовательности. В ряде случаев проводили валидацию результатов путем таргетного масс-спектрометрического анализа и секвенирования нуклеиновых кислот.



Рисунок 1. Схема протеогеномного подхода, используемая для поиска событий перекодирования белков вследствие редактирования РНК.

В первой части работы поиск сайтов перекодирования вследствие редактирования РНК проводили в протеомах взрослых особей плодовой мушки. Для этого использовались результаты панорамного протеомного анализа *D. melanogaster* линии Canton-S, выполненного для протеомов целых тел, голов, а также протеомов изолированных мозгов. Протеом головного мозга впервые получили экспериментально, а два других взяли из открытого доступа (Xing *et al.*, 2014; Aradska *et al.*, 2015). Также произвели поиск событий перекодирования в протеомных данных жизненного цикла *D. melanogaster* [Casas-Vila *et al.*, 2017]. После анализа данных панорамной протеомики для валидации полученных результатов наиболее интересных сайтов перекодирования проводили таргетный анализ на хромато-масс-спектрометрах с детектором типа тройного квадруполь (Quantiva или Vantage, Thermo Fisher Scientific, США). Пептиды с перекодированным и кодируемым в геноме остатком синтезировали с включением в состав изотопно-меченной аминокислоты. Данным методом оценивали изменения в пяти белках, связанных с синаптической проводимостью, кодируемых генами *EndoA*, *stol*, *Cadps*, *cpx* и *Syx1A*. Также для дополнительной проверки было проведено секвенирование выбранных последовательностей нуклеиновых кислот. Семь полиморфных сайтов в генах плодовой мушки (*Syx1A*, *cpx*, *Atpalpha*, *stol*, *alpha-Spec*, *Cadps*, *EndoA*, *Atx2*, *RhoGAP100F*) секвенировали с использованием метода Сэнгера на генетическом анализаторе

Applied Biosystems 3500xL с программным обеспечением SeqScape (Thermo Fisher Scientific, США). Для идентификации инозинов в составе молекулы РНК использовали метод химического удаления инозина с последующим секвенированием по Сэнгеру (Sakurai *et al.*, 2010).

Во второй части работы проводили поиск сайтов перекодирования в протеомах двух млекопитающих – мыши и человека. Хромато-масс-спектрометрические данные высокого разрешения, по три набора для каждого вида, отбирали из репозитория открытых данных Proteomexchange (Vizcaíno *et al.*, 2014). Для мозга мыши и человека выбрали два основных набора данных из проектов по инвентаризации протеомов головного мозга (Sharma *et al.*, 2015, Carlyle *et al.*, 2017). В качестве дополнительных данных для проверки результатов для мыши взяли протеомы моделей болезни Гентингтона (Langfelder *et al.*, 2016) и нейропатической боли (Altmann *et al.*, 2016) с номерами доступа PXD003442 и PXD004087 соответственно. Дополнительные данные протеомов человека взяли из работы по изучению спинномозговой жидкости (Macron *et al.*, 2018), PXD009646, и из протеогеоминого исследования дорсолатеральной префронтальной коры мозга (Wingo *et al.*, 2017), PXD004143. Исследование спинномозговой жидкости выбрано для проверки возможности идентификации перекодированных белков в образцах, которые проще получить от пациентов.

Основные участки перекодирования, такие как продукты генов *CADPS*, *GRIA3*, *CADPS*, *GRIA2*, *GRIA4*, *Cyfp2*, *Copa*, у человека и мыши оказались консервативными. Поэтому был получен набор для таргетного анализа этих участков для мыши и человека на хромато-масс-спектрометрах с детектором типа тройного квадруполь Vantage и Quantiva (Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого участка перекодирования создали пептидный стандарт с перекодированным остатком и стандарт с геномным вариантом.

Чтобы понять количественные изменения уровня перекодирования для исследуемых белков, взяли 3 группы трансгенных мышей и соответствующие им контрольные группы. С помощью набора для таргетного анализа исследовали модельных животных с FUS-опатией (моделирует нейродегенерацию, например, при боковом амиотрофическом склерозе), таупатией (гиперфосфорилирование белка тау, имитирующее признаки болезней Паркинсона, Пика и Альцгеймера), а также с нокаутом гена некодирующей РНК *NEAT1* (животные с поведенческими нарушениями). В качестве анализируемого материала использованы образцы мозжечка и коры, полученные в трех биологических повторах для каждого образца и предоставленные партнерами из ИФАВ РАН.

3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Поиск сайтов перекодирования в протеоме плодовой мушки

В исследованных протеомных данных плодовой мушки идентифицированы 62 перекодированных пептида, соответствующих событиям редактирования матричной РНК аденозиндезаминазами. Эти пептиды принадлежали 54 белкам, поскольку некоторые из них, согласно транскриптомным данным, могут содержать несколько сайтов редактирования (St Laurent *et al.*, 2013). Среди перекодированных сайтов только 8 идентифицированы во всех наборах данных (таблица 1). В эту группу, как и ожидалось, входили белки, специфичные для центральной нервной системы. Другие 25 сайтов найдены как минимум в двух наборах данных. Оставшиеся 35 сайтов были идентифицированы только в одном исследовании.

Для понимания функциональной значимости редактирования РНК полный список идентифицированных пептидов анализировали с помощью базы знаний белок-белковых взаимодействий STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017). Найдены две группы белков с повышенным уровнем взаимодействий между собой.

В первую группу входили следующие участники: синтаксин (*Syx1A*), синаптотагмин (*Syt1*), комплексин (*cpx*), синапсин (*Syn*), адаптин (*AP-2alpha*), эндофилин А (*endoA*), белок stoned В (*StnB*), белок bruchpilot (*brp*), кальций-зависимый активатор секреции (*Cadps*) и субъединица кальциевых ионных каналов *stol* (*CG4587*) (Heinrich *et al.*, 2020). Эти белки играют роль в синаптической передаче сигнала. В частности, синтаксин и синаптотагмин являются компонентами комплекса SNARE, который обеспечивает слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной, а комплексин - дополнительный важный связующий компонент этого комплекса (Wang and Chapman, 2010). Белок StnB также связывает этот комплекс и играет роль в эндоцитозе синаптических пузырьков (Fergestad and Broadie, 2001). Адаптины участвуют в процессе рециклинга синаптических пузырьков (González-Gaitán and Jäckle, 1997). Эндофилин (*endoA*) действует в процессе эндоцитоза везикул в нервно-мышечной системе (Guichet *et al.*, 2002; Verstreken *et al.*, 2002; Coyle *et al.*, 2004). Кальций-зависимый активатор секреции (*Cadps*) является Ca^{2+} -зависимым фактором эндоцитоза везикул (Pongs *et al.*, 1993; Renden *et al.*, 2001). Группа синаптической передачи сигнала включала пять белков, перекодированных во всех исследуемых масс-спектрометрических данных.

Во вторую функциональную группу включены белки немышечного миозина (*zip*), альфа-спектрина (*alpha-Spec*), титина (*sls*) и других генных

продуктов. Все белки этой группы либо являлись компонентами цитоскелета, либо взаимодействовали с ними и участвовали в процессах клеточного транспорта. Эта группа включала только один перекодированный сайт, идентифицированный во всех трех исследованных протеомах, который принадлежал альфа-спектрину.

Часть сайтов, представленных в таблице 1 и идентифицированных панорамной протеомикой во всех исследованных наборах данных, была дополнительно проверена на ADAR-опосредованное редактирование на уровне нуклеиновых кислот и валидирована таргетным масс-спектрометрическим анализом. Результаты таргетных тестов подробнее описаны ниже в разделе 3.3.

Таблица 1. Пептиды, соответствующие событиям редактирования РНК, и их подтверждение методами химического удаления инозина и таргетной протеомики

Последовательность пептида	Ген	Идентификатор Uniprot	А/к замена	Подтверждение на уровне мРНК	Подтверждение с помощью MRM
<i>ADSLVESGQFDTAGIQEK</i>	<i>alpha-Spec</i>	M9PGV6	Q1700R	Нет	Нет данных
<i>LVTTVSTPVFDGR</i>	<i>stol</i> (CG4587)	A8DZ06	R489G	Нет	Да
<i>IEYHVEHAVDYVQTATQD</i> <i>TK</i>	<i>Syx1A</i>	Q24547	M244V	Да	Да
<i>GVGPAAPSANASADSSSR</i>	<i>Atx2</i>	Q8SWR8-2	K398R	Нет	Нет
<i>LVSVLESTLSK</i>	<i>Cadps</i>	Q9NHE5-2	M1234V	Да	Да
<i>NQMETQVNELK</i>	<i>cpx</i>	E1JJ33	I125M	Да	Да
<i>YSLDDNIEQNFLEPLHHM</i> <i>QTK</i>	<i>EndoA</i>	B5RIU6	K137E	Нет	Да
<i>MTVAHMFWDNQIIEADTT</i> <i>EDQSGVQCDR</i>	<i>Atalpha</i>	P13607-7	Y390C	Да	Нет данных
<i>YLLQIWPQPQAQHQR</i>	<i>RhoGAP10</i> <i>0F</i>	Q9V9S7	Q1142R	Нет	Нет

Не все исследованные сайты-кандидаты удалось подтвердить на уровне мРНК. Отсутствие обнаружения сайтов редактирования путем химического удаления инозина может быть объяснено низким выходом продуктов обработки для этих конкретных сайтов. Другими словами, содержание мРНК и белковых продуктов одного и того же гена не всегда коррелирует, по крайней мере, если

их измерять в конкретные моменты без временной зависимости (Liu, Beyer and Aebersold, 2016).

3.2. Распределение перекодированных белков по стадиям жизненного цикла

Набор данных для анализа перекодирования на разных стадиях жизненного цикла состоял из двух подмножеств. Первое включало пятнадцать стадий развития плодовой мухи от яйца до имаго, а второе охватывало четырнадцать временных точек эмбриогенеза, то есть развития яйца (Casas-Vila *et al.*, 2017). Всего было найдено 40 участков перекодирования, каждый из которых принадлежал уникальному белку. Из них только десять участков были идентифицированы в наборе данных по эмбриогенезу, шесть совпадали с набором данных жизненного цикла, содержащим четыре временных точки развития яйца.

Используя протеомные данные, мы определили перекодированные пептиды, возникшие вследствие редактирования, и уровни экспрессии соответствующих белков, чтобы эти значения можно было в дальнейшем сравнивать между стадиями развития. Все перекодированные сайты кластеризовали с использованием интенсивности иона-предшественника (MS1) как меры концентрации триптического пептида. Примечательно, что кластеризация «без учителя» распределила перекодированные белки в точном соответствии с фазами жизненного цикла (рис. 2). Эти данные показывают, что несинонимичное редактирование РНК изменяет последовательности затронутых белков и, предположительно, их функции, в зависимости от фазы жизненного цикла.

Кластер белков, перекодированных преимущественно на эмбриональной стадии, включал эмбрионально-специфичный рецептор вителлогенина, кодируемый геном *yl*. Субъединица сигнального комплекса COP9 (*CSN7*), перекодированная на этой стадии, как показано, участвует как в оогенезе, так и в эмбриогенезе (Doronkin *et al.*, 2003). В этой группе интерес представляли также связанные с цитоскелетом белки гельзолин (*Gel*) и эхиноид (*ed*), играющие роль в морфогенезе. Ехиноидный белок и неохарактеризованный продукт гена *CG4975* перекодировались не только в фазе яйца, но и у личинок. Некоторые продукты, перекодированные в эмбриональной фазе, также имели небольшой пик у взрослых особей (рис. 2).

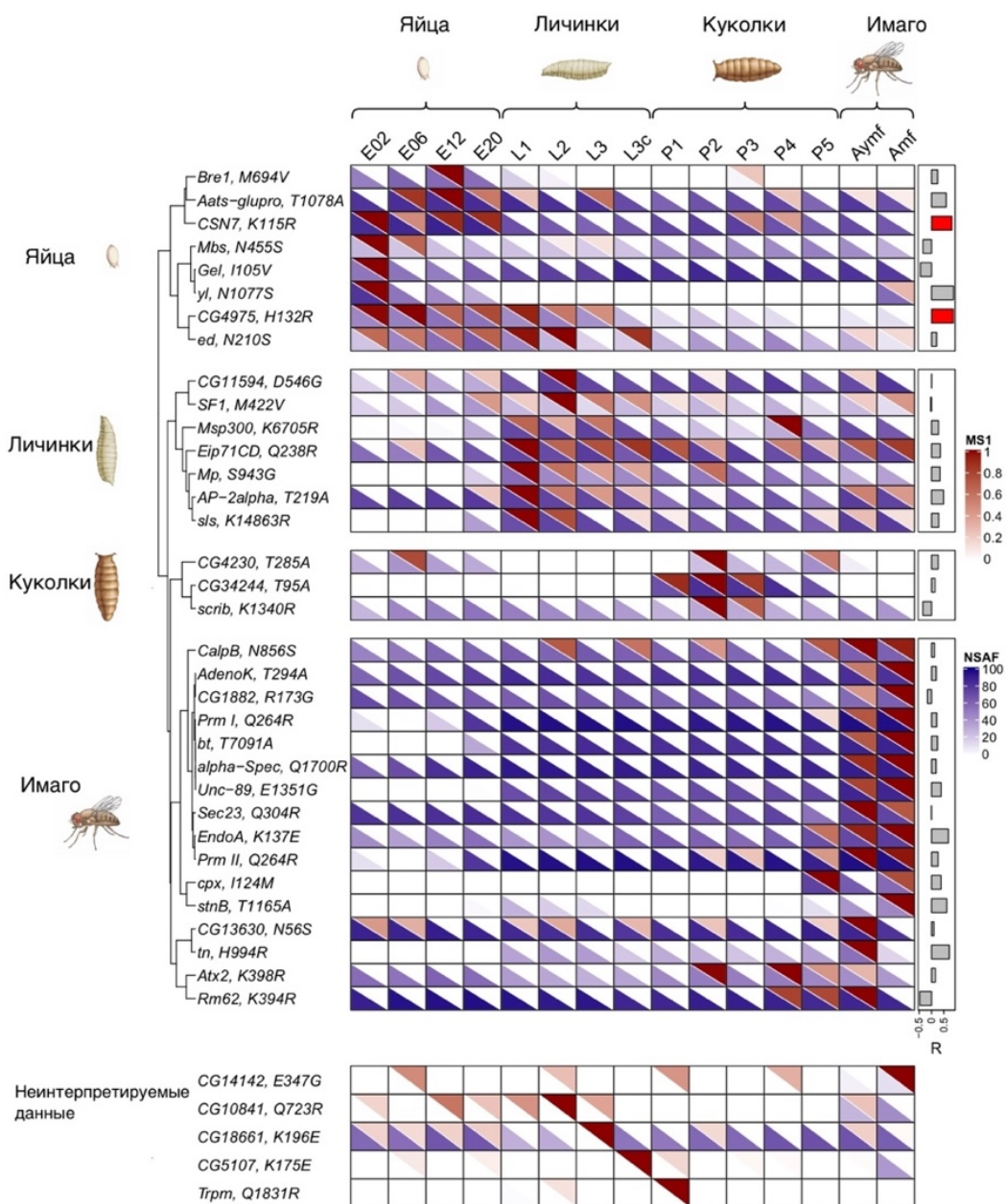


Рисунок 2. Тепловая карта относительной представленности перекодированных участков в виде триптических пептидов и соответствующих белков на различных стадиях жизненного цикла плодовой мушки. Уровень перекодирования (красная половина каждой ячейки диаграммы) показана в значениях интенсивности MSI для соответствующих вариантных пептидов, нормированных индивидуально для каждой строки. Количество белка (фиолетовая половина каждой клетки) показана как процентиль NSAF (Zybailov et al., 2007). Коэффициенты корреляции Пирсона между значениями MSI и NSAF показаны справа. Для каждого коэффициента вычислен уровень значимости его отличия от нуля. Значения, выделенные красным, представляют собой коэффициенты Пирсона с поправкой на множественное сравнение $FDR < 0,05$. Кластеризация проводилась с использованием интенсивностей MSI. Если перекодированный редактированием участок был идентифицирован, а содержание белка невозможно было оценить, данные считались неинтерпретируемыми. Протеомные данные по стадиям жизненного цикла взяты из работы Casas-Vila и соавт. (Casas-Vila et al., 2017). Пептиды SLLESSLHR и VEIELDSVR, принадлежащие парамиозину, показаны как Prm_1 (left) Prm_r (right) соответственно.

Личиночные стадии были обогащены перекодированными белками мышечного аппарата. Они включали в себя титин (*sls*), мультиплексин (*Mp*) и мышечно-специфический белок (*Msp300*). Из трех белков кластера куколки продукт гена *scrib* был примечателен своим участием в морфогенезе крыла (Gui *et al.*, 2016).

Самый большой кластер белков, кодируемый у поздних куколок и имаго насекомых, соответствовал ранее описанному всплеску редактирования ADAR, связанного с нейронными функциями у взрослых животных (Pargo *et al.*, 2012). В кластере видны хорошо известные мишени ADAR, например, указанные выше белки, связанные с функцией синаптических пузырьков и их обновлением. Это компоненты комплекса SNARE, комплексин (*cpx*), stoned B (*stnB*) и эндофилин А (*EndoA*), регулятор кривизны мембран. Более того, РНК-связывающий продукт гена *Atx2* может представлять собой связь между редактированием РНК и регуляцией циркадных ритмов (Zhang *et al.*, 2013). Помимо нейрональных компонентов, перекодированные мышечные белки, такие как *abba* / тин (*tn*), парамиозин (*Prm*) и *projectin* (*bt*), могут указывать на участие редактирования РНК в формировании мускулатуры взрослой особи.

3.3. Количественное определение специфичных для мозга белков, перекодированных редактированием РНК, на разных стадиях жизненного цикла плодовой мушки

Сравнительные уровни перекодированных и кодируемых в геноме сайтов шести выбранных белков количественно оценивали в мозге *D. melanogaster* на трех этапах жизненного цикла – в личинках, куколках и имаго с помощью таргетной масс-спектрометрии на основе мониторинга множественных реакций (MRM) с использованием меченых стабильными изотопами пептидных стандартов. Все биологические эксперименты были выполнены на двух независимых культурах дрозофил с использованием двух разных хромато-масс-спектрометров с детектором типа тройного квадруполя.

Из шести рассмотренных в данной работе перекодированных участков анализ пяти дал интерпретируемые результаты. На исследованных пептидах продемонстрирована тенденция к увеличению уровня перекодирования в мозге при переходе от стадии личинки к взрослой особи (рис. 3). Сайт эндофилина А с заменой лизина на глутаминовую кислоту в 137 положении характеризовался самой высокой степенью перекодирования, достигавшей 75-80% в мозге взрослых особей. В то же время уровень перекодирования этого сайта также был относительно высоким даже у личинок. Нами выдвинуто предположение, что

аминокислотная замена в результате перекодирования может перезаряжать контактирующую с мембраной поверхность димера эндофилина А и снижать сродство его связывания с внутриклеточными мембранами из-за изменения электростатических взаимодействий (Kuznetsova *et al.*, 2018).

Из двух компонентов комплекса SNARE (Hu *et al.*, 2002) перекодирование участка комплексина (*срх*) значительно увеличивалось от стадии личинки до куколки, а затем стабилизировалось или даже немного снижалось. Что касается синтаксина 1А (*Syx1A*), то уровень его перекодирования был низким на всех стадиях жизненного цикла.

Кальций-зависимый активатор секреции CADPS представляет собой белок, который функционально близок к комплексу SNARE, так как он также способствует высвобождению кальций-зависимых везикул (Renden *et al.*, 2001). Его умеренно перекодированный вследствие редактирования сайт также характеризовался увеличением процента перекодирования в течение жизненного цикла. Другой связанный с нейротрансмиссией белок — это потенциал-зависимый кальциевый канал *stol* (*CG4587*) (Heinrich *et al.*, 2020). Перекодирование этого сайта значительно увеличивалось на каждой фазе жизненного цикла, что, вероятно, указывает на его функциональную важность. Этот тип замены в результате редактирования РНК изменяет размер и электростатический заряд аминокислотного остатка и, как было показано, модулирует электрофизиологические свойства субъединиц глутаматных каналов крыс (Wen *et al.*, 2017).

В соответствии с транскриптомными данными, таргетный анализ перекодированных белков мозга дрозофилы показал, что метаморфоз этого насекомого сопровождается увеличением уровня перекодирования, повторяющим всплеск редактирования РНК, описанный ранее (Paro *et al.*, 2012). Примечательно, что по крайней мере пять из шести исследованных участков перекодировались в личиночной фазе, что дополнительно подтверждает предположение о существовании базального уровня активности ADAR в раннем развитии.

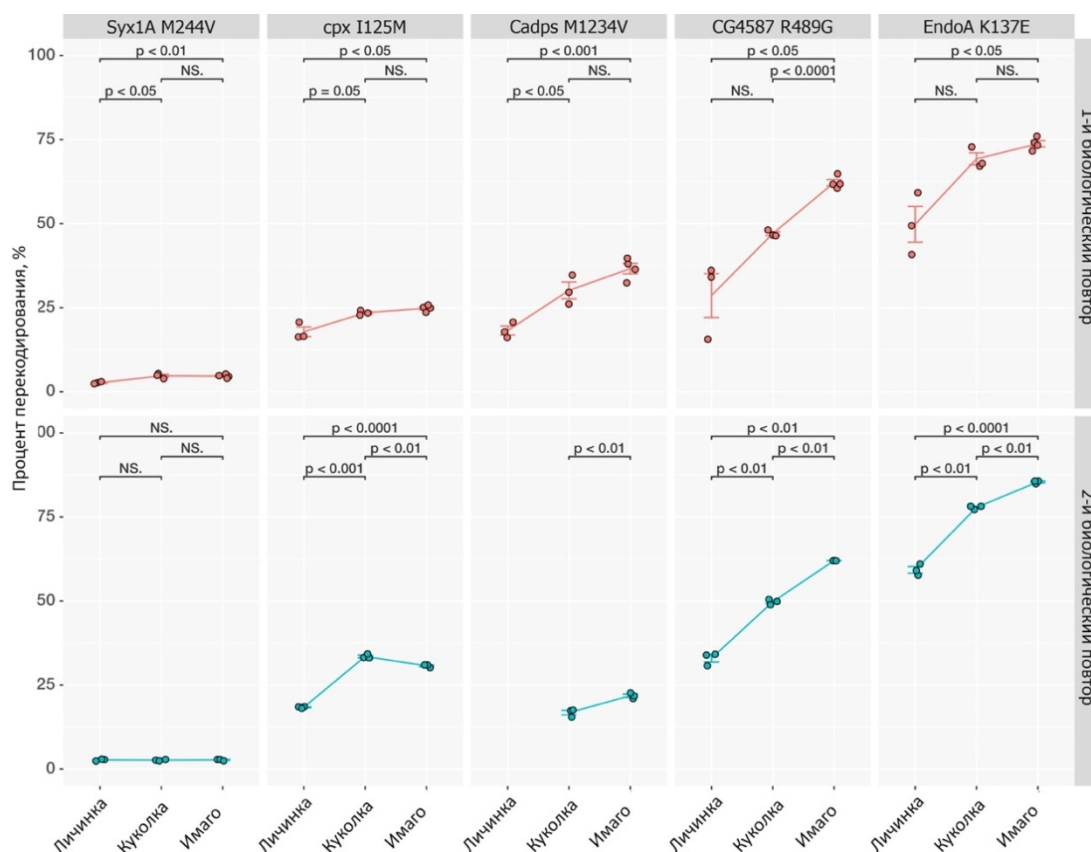


Рисунок 3. Динамика уровня перекодирования выбранных участков белков в мозге на разных фазах жизненного цикла *D. melanogaster*. Данные показаны независимо для двух биологических повторов. Процент перекодирования рассчитывался как концентрация варианта, перекодированного редактированием РНК, деленная на сумму концентраций перекодированных редактированием и кодируемых в геноме форм. Уровень значимости *t*-критерия Стьюдента представлен для оценки разницы в уровне перекодирования между фазами жизненного цикла. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение для трех технических повторов. Перекодированный редактированием сайт *Cadps* во втором биологическом повторе не был обнаружен на личиночной стадии.

3.4. Поиск сайтов редактирования РНК в протеоме мышцы

Используя хромато-масс-спектрометрические данные высокого разрешения микроглии мозга молодых и взрослых мышей, гранулярных мозжечковых и кортикальных нейронов (все первичные культуры) и фракционированного целого мозга (Sharma *et al.*, 2015), перекодированные пептиды были оценены по количеству идентифицированных спектров без использования изотопной метки. Для анализа были отобраны те образцы, в которых количество спектральных идентификаций (peptide-spectrum match, PSM) для перекодированных пептидов каждого представляющего интерес белка было не менее 5. Для клеточных культур были найдены сайты перекодирования, характеризующиеся наибольшим количеством спектральных идентификаций. В образцах тканей, содержащих много стромальных внеклеточных компонентов, перекодированные сайты были идентифицированы с низким количеством PSM.

Из всех исследованных тканей мозга в работе Шарма и соавторов (Sharma *et al.*, 2015) для протеома целого мозга, проанализированного фракциями трипсиновых пептидов, показано наибольшее количество спектральных идентификаций для перекодированных продуктов.

Используя пять наборов данных с большим количеством перекодированных сайтов, было исследовано, соответствует ли степень перекодирования уровню каждого белка. Другими словами, если имеется высокое значение PSM для перекодированных пептидов глутаматного рецептора в кортикальных нейронах и низкое значение в микроглии, означает ли это, что рецептор высоко экспрессируется в нейронах? Чтобы ответить на этот вопрос, были пересчитаны параметры LFQ (label-free quantification, количественный анализ без использования изотопной метки) для белков в пяти представляющих интерес наборах данных и получены процентные доли индекса нормированных спектральных коэффициентов обилия (normalized spectral abundance factors, NSAF), (Zybailov *et al.*, 2007). Далее эти индексы были нанесены на график расчета PSM для тех белков, которые достигли пяти или более PSM перекодированных пептидов, по крайней мере в одном из интересующих наборов данных (рис. 4).

В некоторых случаях простая логика «нет белка - нет перекодирования редактированием» действительно имела место. Таким образом, в микроглии практически отсутствовали продукты генов рецепторов глутамата *GRIA2* и *GRIA3*, и поэтому в этом типе клеток не было выявлено перекодированных сайтов. Для других белков наблюдался разный уровень перекодирования при сопоставимых уровнях экспрессии. Например, перекодирование продукта гена *GRIA2* было специфичным для нейронов коры головного мозга без перекодирования в нейронах гранулярных слоя мозжечка (рис. 4). Продукт гена *GRIA3* имел низкие уровни перекодирования в обоих типах нейронов, несмотря на высокие уровни для целого мозга, что может означать его перекодирование в других типах нейронов, не охваченных конкретным набором данных (Sharma *et al.*, 2015).

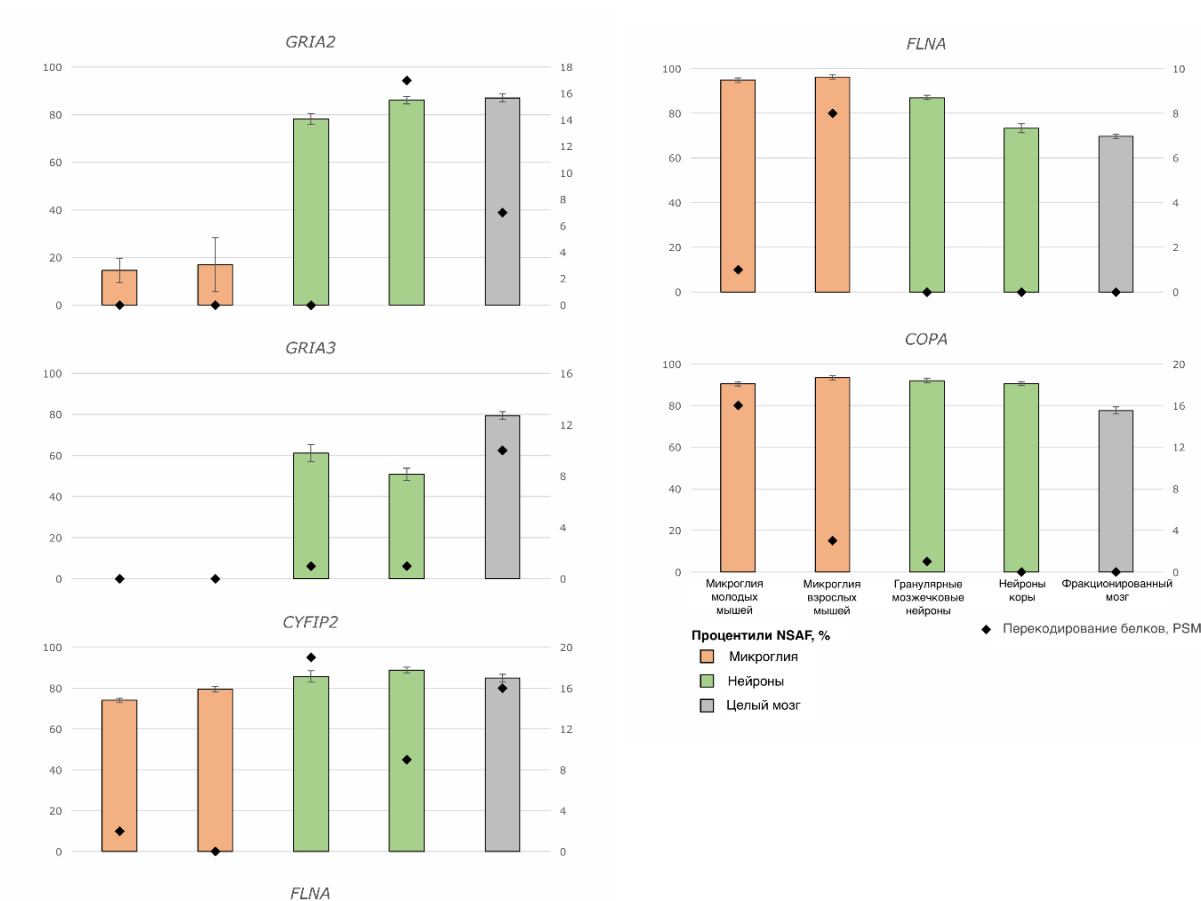


Рисунок 4. Уровни перекодирования и экспрессии выбранных белков в субпротеомах микроглии мозга молодых и взрослых мышей, гранулярных мозжечковых, кортикальных нейронах (все первичные культуры) и фракционированного целого мозга. Степень перекодирования выражается в PSM перекодированных пептидов, просуммированных для каждого белка, если у него было более одного перекодированного сайта. Уровень экспрессии белка выражается в процентах NSAF (Zybailov et al., 2007) с планками погрешностей, выражающих стандартное отклонение для трех биологических повторов. Субпротеомы из работы Шарма и соавт. (Sharma et al., 2015) были отобраны, если хотя бы один из идентифицированных перекодированных сайтов имел более пяти PSM. Субъединица глутаматного рецептора GRIA2 имеет общий перекодированный сайт с GRIA4, однако перекодирование сообщается в первую очередь для GRIA2.

Из полученных данных следует, что продукт гена *CYFIP2* дифференцированно перекодируется в нейрональных клетках с низким уровнем перекодирования в микроглии, несмотря на относительно высокую представленность белка во всех типах клеток. Напротив, филамин-A (*FLNA*) и альфа-субъединица коатомера (*COPA*) перекодированы в основном в микроглии. Примечательно, что редактирование продукта гена *COPA*, характерное для микроглии новорожденных мышей, в то же время, как было показано, увеличивает пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток *in vitro* на примере клеточных линий рака молочной железы и почки (Peng et al., 2018). Данный перекодированный белок отвечает за ретроградный транспорт из аппарата Гольджи в эндоплазматическую сеть. Вероятно, его специфическое

перекодирование с заменой изолейцина на валин способствует изменениям в обороте транспортных белков, характерным для растущих клеток.

3.5. Поиск сайтов редактирования РНК в протеоме человека

Для идентификации событий перекодирования в протеоме человеческого мозга использовался тот же дизайн исследования, что и для мышинных данных. Более объемный набор данных ожидаемо обеспечил большинство identifications перекодированных пептидов (Carlyle *et al.*, 2017). Однако данные относились к большему количеству субъектов и в то же время не имели того количества identifications, которое было достигнуто при исследовании мозга лабораторных животных. Более того, не было проанализировано клеточных культур, которые, в случае мышинного протеома мозга, давали лучший охват перекодированных продуктов. Анализируя данные человека, также необходимо было рассмотреть полиморфизм генома, который не может наблюдаться у инбредных животных и, в свою очередь, иногда может перекрывать события перекодирования. База данных для человека содержала более 1800 событий перекодирования, что в три раза больше мышинной, вероятно, в связи с лучшей изученностью событий редактирования РНК человека.

В общей сложности, в протеомах человеческого мозга идентифицировали 38 перекодированных сайтов, принадлежавших продуктам 33 генов, причем только 19 сайтов характеризовались двумя или более спектральными identifications ($PSM \geq 2$). Совокупность результатов, общих для мыши и человека, включала 8 перекодированных редактированием участков: основной, кодируемый геном *CYFIP2*, три участка для глутаматных рецепторов *GRIA2* и *GRIA3*, участки *COPA*, *FLNA* и *CADPS*, описанные выше (таблица 2). В отличие от мышинных данных для субъединицы рецептора *GRIA2* также была найдена перекодированная флоп-изоформа с заменой аргинина на глицин.

В этой части исследования был также включен набор данных протеома спинномозговой жидкости (Macron *et al.*, 2018). Ликвор является наиболее доступным образцом, связанным с человеческим мозгом, который, в частности, может быть извлечен без сложного оперативного вмешательства. Как и следовало ожидать, классические сайты редактирования РНК, такие как в глутаматных рецепторах, на протеомном уровне в этой жидкости идентифицировать не удалось. Вместо этого был обнаружен сайт замены глутамина на аргинин простагландин- H_2 D-изомеразы (PTGDS). PTGDS является многофункциональным ферментом и нейромодулятором, также известным как

биомаркер ликвора, применяемый для диагностики ликвореи (Bachmann and Petereit, 2004). Кроме того, в ликворе также идентифицировали сайт перекодирования белка-участника каскада инсулиноподобного фактора роста IGFBP7, до этого обнаруженный в протеоме полосатых тел мозга мыши (Langfelder *et al.*, 2016).

Таблица 2. Перекодированные вследствие редактирования РНК участки, общие для протеомов головного мозга человека и мыши (Carlyle *et al.*, 2017; Wingo *et al.*, 2017; Macron *et al.*, 2018).

Белок	Последовательность пептида	Идентификатор Uniprot	А/к замена	Ген	Количество PSM
Кальций-зависимый активатор секреции 1	VNGEMYIER, <i>dk</i> VNGEMYIER*	Q9ULU8	E1241G	<i>CADPS</i>	3
Альфа субъединица коагомера	VWDVSLR	P53621	I164V	<i>COPA</i>	3
Цитоплазматический белок 2, взаимодействующий с FMR1	YIETSAHYEENK	Q96F07	K124E	<i>CYFIP2</i>	73
Филамин-А	LTVSSLR, <i>r</i> LTVSSLR	P21333	Q2341R	<i>FLNA</i>	10
Глутаматный рецептор 3 (GluR-3), флип-изоформа	GSALGNAVNLAVLK	P42263	R775G	<i>GRIA3</i>	26
Глутаматный рецептор 3 (GluR-3), флип-изоформа	GSALGTPVNLAVLK	P42263	R775G	<i>GRIA3</i>	10
Глутаматный рецептор 2 (GluR2); Глутаматный рецептор 4 (GluR4), флип-изоформа	GSSLGTPVNLAVLK	P48058; P42262	R765G (Gria4); R764G (Gria2)	<i>GRIA4</i> ; <i>GRIA2</i>	43
Белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, 7 (IGFBP-7)**	GEGEPCGGGGAGGGYC APGMECVK	Q16270	R78G	<i>IGFBP7</i>	4

*В пептидах с недорезами добавления к перекодированным пептидам показаны строчным буквами курсивом.

** У человека этот сайт был обнаружен только в протеоме спинномозговой жидкости (Macron *et al.*, 2018). В то же время он также был обнаружен в наборе данных протеомов полосатых тел мыши (Langfelder *et al.*, 2016).

Еще один набор данных (Wingo *et al.*, 2017), который относился к протеогеномному исследованию префронтальной коры, имел недостаточное для анализа количество идентификаций и показал единственный перекодированный

сайт (PSM=1) белка 3, взаимодействующего с полимеразой дельта. Даже в человеческом протеоме с наибольшим количеством идентификаций, полученным Карлайлом и соавт. (Carlyle *et al.*, 2017), не удалось найти того количества перекодированных пептидов, как в мышинном наборе данных Шармы и соавт. (Sharma *et al.*, 2015). Таким образом, для данных человеческого мозга мы не смогли поддержать или опровергнуть результаты дифференциального перекодирования белков для разных клеток, показанные для мышинного мозга в разделе 3.4.

3.6. Количественный анализ событий перекодирования на уровне протеома головного мозга трансгенных мышей – моделей заболеваний ЦНС

При сравнении идентификаций перекодированных пептидов мыши и человека выяснилось, что восемь из них, наблюдаемых с самой высокой интенсивностью, полностью совпадают. Основные участки перекодирования между видами оказались консервативными. Поэтому был получен набор для таргетного анализа этих участков для мыши и человека. Набор был испытан на мозжечке и коре больших полушарий трех линий трансгенных мышей и контрольных линий. В результате были получены новые данные об отношении перекодированных и кодируемых в геноме участков на белковом уровне. Доля перекодирования варьировала от 100% перекодированных пептидов, например, для продуктов генов *GRIA3* (глутаматный рецептор) и *CYFIP2*, до менее 10% для *COPA* и *CADPS* в мозжечке. Как оказалось, профиль перекодирования был совершенно одинаковым во всех трех линиях трансгенных мышей по сравнению с контролем. Таким образом, экспрессия генов *FUS*, *tau* и *NEAT1* в головном мозге мышей никак не влияла на редактирование РНК, детектируемое на уровне протеома. Было показано, что профили перекодирования разных анализируемых сайтов воспроизводимо отличаются между корой головного мозга и мозжечком всех животных. Значение этих различий также может быть поводом для дальнейших исследований.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Редактирование РНК, опосредованное ферментами ADAR, является широко распространенной посттранскрипционной модификацией и критически значимо для многоклеточных организмов, включая человека. Дезаминазная активность ферментов семейства ADAR преобразует аденозиновые нуклеозиды РНК в инозиновые, что может приводить к изменению ее информационного значения и, как следствие, аминокислотным заменам в белке. С использованием

протеогеномного подхода с дополненными базами данных для протеомного поиска в данных панорамной протеомики обнаружены 62 участка перекодирования в 54 белках плодовой мушки. Также перекодирование, опосредованное редактированием РНК, было изучено для фаз жизненного цикла плодовой мушки. Результаты продемонстрировали, что фазовоспецифичное редактирование белков может происходить независимо от уровней их экспрессии. Однако остается неясным, какие факторы регулируют это перекодирование в течение жизненного цикла. В соответствии с ранее полученными в других работах транскриптомными данными мы также наблюдали всплеск несинонимичного перекодирования, вызванного редактированием РНК, во время метаморфоза насекомых. Положительная динамика перекодирования белков была впервые подтверждена с помощью таргетной масс-спектрометрии белков мозга плодовой мушки.

С использованием сходного подхода анализировали хромато-масс-спектрометрические данные высокого разрешения мозга мыши (Sharma *et al.*, 2015; Altmann *et al.*, 2016; Langfelder *et al.*, 2016) и человека (Carlyle *et al.*, 2017; Wingo *et al.*, 2017; Macron *et al.*, 2018), выбранные из общедоступных источников. По сравнению с центральной нервной системой насекомого, хромато-масс-спектрометрические данные с большим количеством идентификаций (более 9000 белков) были необходимы для нахождения более десяти перекодированных вследствие редактирования пептидов в мозге млекопитающих.

В мышинном мозге идентифицированы 20 перекодированных белковых сайтов, принадлежащих 14 генам. Для человеческого мозга найдено 37 перекодированных участков, относящихся к 33 генам. При сравнении идентификаций перекодированных пептидов мыши и человека выяснилось, что восемь из них, наблюдаемых с самой высокой интенсивностью, полностью совпадают. Основные участки перекодирования между видами оказались консервативными. Поэтому был получен набор для таргетного анализа этих участков для мыши и человека.

Использование таргетного набора на мышинных моделях выбранных нейродегенеративных заболеваний показало, что трансгенное вмешательство исследованных типов не оказывает воздействия на профиль перекодирования. Однако выявлены отличия в уровне перекодирования анализируемых сайтов в коре и мозжечке всех животных, что может быть предпосылкой для дальнейших работ. Перспективными для дальнейшего исследования функционального значения редактирования РНК на уровне протеома с помощью полученного

набора могут оказаться и культуры клеток мозга различного происхождения - нейронов и микроглии.

5. ВЫВОДЫ

1. При исследовании протеома плодовой мушки впервые обнаружены 62 перекодированных в результате редактирования РНК участка, принадлежащих 54 белкам. Эти белки в основном являлись компонентами цитоскелета или были связаны с синаптической передачей сигнала.
2. Таргетный протеомный анализ белков мозга насекомых на разных стадиях развития позволил подтвердить и количественно измерить изменения в пяти белках, связанных с синаптической проводимостью, кодируемых генами *EndoA*, *stol*, *Cadps*, *cpx* и *Syx1A*. В соответствии с изменениями транскриптома, всплеск перекодирования белков был выявлен на стадии метаморфоза при переходе от поздней куколки к раннему имаго.
3. На протеомном уровне мышинового мозга выявлено 20 участков перекодирования, принадлежащих 14 белкам. Для наборов данных человеческого мозга найдено 38 перекодированных участков в 33 белках. Полученный список последовательностей содержал 8 общих для двух видов участков, в том числе главный сайт перекодирования, кодируемый геном *CYFIP2*, три сайта глутаматных рецепторов *GRIA2* и *GRIA3*, сайты белков *COPA*, *FLNA* и *CADPS*. В первичных культурах мышинных клеток мозга для перекодированных белков, ответственных за пространственную организацию актиновых филаментов (*CYFIP2*, *FLNA*) и компонента специфического покрытия везикул (*COPA*), было показано дифференциальное перекодирование между нейронами и микроглией.
4. На трех линиях трансгенных мышей проанализировано влияние на степень перекодирования белков при таких состояниях, как FUS-опатия (отчасти моделирует нейродегенерацию, например, при боковом амиотрофическом склерозе), таупатия (гиперфосфорилирование белка тау, имитирующее признаки болезней Паркинсона, Пика и Альцгеймера), а также моделирующий психическое расстройство нокаут гена некодирующей РНК *NEAT1*. Выяснилось, что эти модели не вносят заметного вклада в перекодирование исследуемых белковых сайтов, однако в профилях перекодирования анализируемых белков показано отличие между корой головного мозга и мозжечком.

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

- 1а. Ключникова А.А., Кузнецова К.Г. Мошковский. С.А. Редактирование матричной РНК аденозиндезаминазами ADAR: анализ на протеомном уровне // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62, № 5. С. 510–519.
- 1b. Kliuchnikova A.A., Kuznetsova K.G., Moshkovskii S.A. 2016. ADAR-mediated messenger RNA editing: analysis at the proteome level // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry Vol. 11, № 1. P. 32-42.
2. Kuznetsova K.G., Kliuchnikova A.A., Ilina I.U., Chernobrovkin A.L., Novikova S.E., Farafonova T.E., Karpov D.S., Ivanov M.V, Goncharov A.O., Ilgisonis E.V, Voronko O.E., Nasaev S.S., Zgoda V.G., Zubarev R.A., Gorshkov M.V, Moshkovskii S.A. Proteogenomics of Adenosine-to-Inosine RNA Editing in the Fruit Fly // Journal of Proteome Research. 2018. Vol. 17, №11. P. 3889–3903.
- 3а. Ключникова А.А., Мошковский, С. А. Природное редактирование РНК с заменой аденозина на инозин может участвовать в патогенезе болезней человека // Вестник Российского Государственного медицинского университета. 2019. № 2. С. 25-28.
- 3b. Kliuchnikova, A.A., Moshkovskii, S.A. Adenosine-to-inosine RNA editing may be implicated in human pathogenesis // Bulletin of Russian State Medical University. 2019. Vol. 8, №2. P. 22-25.
- 4а. Гончаров А.О., Ключникова А.А., Насаев Ш.Ш., Мошковский С.А. Редактирование РНК аденозиндезаминазами ADAR: от молекулярной пластичности белков нервной системы до патогенеза злокачественных опухолей человека // Биохимия. 2019. Т. 84, №8. С. 1129–1138.
- 4b. Goncharov A.O., Kliuchnikova A.A., Nasaev S.S., Moshkovskii S.A., RNA Editing by ADAR Adenosine Deaminases: From Molecular Plasticity of Neural Proteins to the Mechanisms of Human Cancer // Biochemistry (Moscow). 2019. Vol. 84, №8. P. 896–904.
5. Levitsky L.I., Kliuchnikova A.A., Kuznetsova K.G., Karpov D.S., Ivanov M.V., Pyatnitskiy M.A., Kalinina O.V., Gorshkov M.V., Moshkovskii S.A.. Adenosine-to-Inosine RNA Editing in Mouse and Human Brain Proteomes // Proteomics. 2019. Vol. 19, №23. P. 1900195.

6. Kliuchnikova A.A., Goncharov A.O., Levitsky L.I., Pyatnitskiy M.A., Novikova S.E., Kuznetsova K.G., Ivanov M.V., Ilina I.Y., Farafonova T.E., Zgoda V.G., Gorshkov M.V., Moshkovskii S.A. Proteome-Wide Analysis of ADAR-Mediated Messenger RNA Editing during Fruit Fly Ontogeny // Journal of Proteome Research. 2020. Vol. 19, №10. P. 4046-4060.

Работы, опубликованные в сборниках материалов научных конференций:

7. Мошковский С.А., Полякова А.А., Кузнецова К.Г., Карпов Д.С., Лобас А.А., Иванов М.В., Горшков М.В. Масс-спектрометрия для протеогеномики и иммунобиологии злокачественных опухолей // Седьмой съезд ВМСО. Москва. Россия. 2015, С.19.

8. Kliuchnikova A., Trufanov P., Karpov D., Ivanov M., Kuznetsova K., Gorshkov M., Moshkovskii S. ADAR-mediated RNA editing in mouse brain proteome // 16th Human Proteome Organisation World Congress. Dublin. Ireland. 2017. P. 139.

9. Kliuchnikova A., Karpov D., Ivanov M., Kuznetsova K., Gorshkov M., Moshkovskii S. Adenosine-to-Inosine RNA editing in mouse brain proteome // Clinical proteomics. Postgenome medicine. Moscow. Russia. 2017. P. 118.

10. Kliuchnikova A., Kuznetsova K., Levitskiy L., Karpov D., Ivanov M., Gorshkov M., Moshkovskii S. Proteogenomics of ADAR-mediated RNA editing in mouse brain // 43rd FEBS Congress. Prague. Czech Republic. 2018. P. 151.

11. Мошковский С.А., Кузнецова К.Г., Ключникова А.А., Гончаров А.О., Левицкий Л.И., Горшков М.Г. Природное редактирование РНК ферментами ADAR и его последствия на уровне протеома человека // Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни. Москва. Россия. 2019. С. 53.

12. Moshkovskii S., Kliuchnikova A., Kuznetsova K., Goncharov A., Levitsky L., Karpov D., Gorshkov M. Proteogenomics of Adenosine-to-Inosine RNA Editing in Brain Proteomes of Fruit Fly, Mouse and Human // XIII Annual Congress of the European Proteomics Association: From genes via proteins and their interaction to function. Potsdam. Germany. 2019. С. 54.

13. Мошковский С.А., Левицкий Л.И., Кузнецова К.Г., Ключникова А.А., Зубарев Р.А., Згода В.Г., Горшков М.Г. Масс-спектрометрия в мультиомиксном анализе: в поисках событий РНК-редактирования в протеомах живых организмов // Девятый съезд ВМСО. Москва. Россия. 2019. С. 29.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит руководителя и коллег за помощь в проведении работы и подготовке диссертации. В частности, автор благодарен проф. Згоде В.Г. и к.б.н. Новиковой С.Е. за проведение масс-спектрометрического анализа, к.б.н. Фарафоновой Т.Е. за проведение синтеза пептидов, к.б.н. Пятницкому М.А., Левицкому Л.И. и к.ф.-м.н. Иванову М.В. за консультации и помощь при обработке данных. Кроме того, автор благодарит к.ф.-м.н. Горшкова М.В., Гончарова А.О., Ильину И.Ю., к.б.н. Карпова Д.С., Кузнецову К.Г., проф. Медведева А.Е., к.б.н. Курбатова Л.К., к.б.н. Кухарского М.С. и других коллег, участвовавших в проекте или помогавших его проведению.