

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Васильева Ирина Дмитриевна**

**Метод масс-спектрометрического установления первичной структуры  
интактных пептидов амфибий семейства *Ranidae***

1.4.3 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:** **Лебедев Альберт Тарасович**  
доктор химических наук

**Официальные оппоненты:** **Зенкевич Игорь Георгиевич**  
доктор химических наук, профессор  
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры органической химии Института химии

**Родин Игорь Александрович**  
доктор химических наук  
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», Химический факультет, кафедра аналитической химии, ведущий научный сотрудник

**Борисов Роман Сергеевич**  
кандидат химических наук  
ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, Лаборатория спектральных и хроматографических исследований, ведущий научный сотрудник

Защита состоится «07» декабря 2022 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.1 Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу 119991, Москва, ГПС-1, Ленинские горы, д.1, стр. 3, Химический факультет МГУ, ауд. 446.

E-mail: maloshitskaya@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте ИАС «ИСТИНА»:  
<https://istina.msu.ru/dissertations/503749397/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат химических наук

О.А. Малошицкая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Появившиеся в 80-х годах XX века мягкие методы ионизации (электроспрей и МАЛДИ) позволили изучать строение макромолекул при помощи масс-спектрометрии, что привело к появлению протеомики – постгеномной науки, посвящённой анализу белков и пептидов, в том числе и изучению их функций. Особый вклад в развитие мягких методов ионизации был отмечен Нобелевской премией по химии в 2002 г. Масс-спектрометрия позволила устанавливать первичную структуру белка, то есть секвенировать его, при помощи различных методов фрагментации. Развитие масс-спектрометрических инструментов, особенно появление приборов высокого разрешения (ИЦР ПФ и Orbitrap), практически полностью исключило из использования классический метод секвенирования – деградацию по Эдману. В настоящее время существуют различные способы масс-спектрометрического секвенирования компонентов белковых/пептидных смесей, самый распространенный – «снизу вверх», с применением трипсинолиза и последующим секвенированием коротких пептидов с конструированием на их основе последовательностей исходных белков. Противоположный ему способ – «сверху вниз», где пептиды секвенируют в интактных смесях исключительно методами самой масс-спектрометрии, прибегая порой к небольшим химическим модификациям (ацетилирование *N*-концевых аминокислот, дериватизация дисульфидных связей). К сожалению, эти модификации далеко не всегда приводят к успешному секвенированию. Они трудоемки, времязатратны, а более того, они ведут к неизбежным потерям минорных компонентов исследуемых смесей. Понятие *de novo* секвенирование применимо к любому из подходов и говорит о том, что последовательность анализируемой молекулы установлена исключительно из спектральной информации.

Изучение процессов, протекающих в результате химических реакций пептидов в источнике ионизации и ячейке соударений масс-спектрометра, привлекает внимание учёных, заставляя искать новые и актуальные объекты. Отдельный интерес представляют собой пептиды, выделяемые кожными железами амфибий при стрессе. Они обладают разнообразными активностями: антимикробными, антидиабетическими, противоопухолевыми, фунгицидными и т.д., что может сделать их моделями для фармпрепаратов нового поколения. Эти пептиды являют собой сложные объекты для анализа из-за разнообразных посттрансляционных модификаций (ПТМ), обеспечивающих разнообразие молекул и их функций. Одна из самых распространённых ПТМ кожных пептидов амфибий – внутримолекулярная дисульфидная связь, образованная боковыми цепями двух цистеинов и исключающая фрагментацию внутри образующегося S-S цикла. В подавляющем большинстве протеомных работ для установления последовательностей аминокислот внутри таких циклов прибегают к дериватизации – химической модификации

с целью раскрытия дисульфидной связи, что делает доступными для секвенирования все аминокислоты внутри цикла. Однако использование современных приборов требует очистки анализируемых смесей от реагентов, что зачастую искажает состав. Применение метода «сверху вниз» к интактным образцам без химической модификации, исключительно с помощью доступных на масс-спектрометрах методов фрагментации, с возможностью установить полную аминокислотную последовательность – цель, к которой стремятся многие учёные.

Создание метода секвенирования пептидов «сверху вниз», лишённого всех перечисленных недостатков, является актуальной научной проблемой. В настоящей работе разработан и опробован такой метод для *de novo* секвенирования компонентов кожных секретов амфибий с установлением полных последовательностей интерпретацией спектров, полученных комплексом методов тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения без использования химических модификаций.

**Степень разработанности темы.** Секвенирование пептидов – задача трудоёмкая. Существующие автоматические алгоритмы секвенирования, в основном, ориентированы на триптические пептиды (подход «снизу вверх»), имеющие C-концевой лизин/аргинин, дающий выраженную серию у-ионов во фрагментации пептидных связей, активированной соударениями (ДАС). Этот подход предполагает работу с базами белковыми данных для восстановления сиквенсов исходных белков. Если такой белок/пептид отсутствует в базе данных из-за отсутствия геномных данных по конкретному виду амфибий, то для решения задач данной работы метод неприменим. Геномы большинства видов амфибий неизвестны, что делает ручную интерпретацию спектров единственным способом *de novo* секвенирования неизученных видов. Многие группы исследователей практикуют клонирование кДНК, выделенной из кожи амфибий, для получения библиотеки пептидов, потенциально могущих секретироваться, с дальнейшим направленным поиском предсказанных последовательностей в кожных секретах. Но транскриптом не отражает состава пептидома – полного набора всех секретлируемых пептидов: он больше, не учитывает посттрансляционных модификаций, содержит только те классы пептидов, поиск которых был заложен исследователем на стадии геномных экспериментов. Стоит также подчеркнуть, что во всех существующих масс-спектрометрических подходах для установления структур пептидов использовалась только малая часть всех фрагментных ионов тандемных спектров, тогда как большинство этих ионов просто игнорировалось.

В нашей группе долгое время использовали комбинированный метод секвенирования, объединяющий способ «сверху вниз» с простыми химическими модификациями. Из-за потерь минорных компонентов при проведении модификаций и очистки образцов мы впервые решили отказаться от химического модифицирования и попытаться секвенировать кожные

пептиды только методами тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (подход «сверху вниз»).

**Объекты исследования** – это пептидные компоненты кожных секретов особей *Rana arvalis* из центральнословенской популяции, а также особей *Rana temporaria* из центральнословенской и архангельской популяций.

**Методология диссертационного исследования.** Секвенирование компонентов интактных кожных пептидомов проводилось комплексом методов тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения в варианте «сверху вниз», разработанным в рамках выполнения данной работы, с ручной интерпретацией полученных масс-спектров. Проведено сравнение результатов ручного и автоматического секвенирования компонентов кожных секретов, в том числе и дериватизованных, на примере программы PEAKS Studio.

**Личный вклад автора** заключался в научной проработке темы диссертации, получении и интерпретации экспериментальных данных, написании диссертации и автореферата к ней. В совместно опубликованных по теме работах соискателю принадлежит существенный вклад.

**Цели и задачи.** Целью данной работы явилось создание надежного метода секвенирования компонентов кожных секретов ранидных амфибий исключительно методами масс-спектрометрии в варианте «сверху вниз». Для этого необходимо было:

- Изучить применимость гибридного MS<sup>3</sup> метода фрагментации EThcD (диссоциация при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии) к секвенированию пептидных компонентов кожных секретов амфибий семейства *Ranidae*;
- Изучить характер протекания радикального разрыва S-S связей в условиях EThcD фрагментации в пептидах, содержащих одну дисульфидную связь, с целью применения к секвенированию новых кожных пептидов и пептидов с уже известными последовательностями методом «сверху вниз» (без использования химических модификаций);
- Изучить серии фрагментных ионов, не описанные классическими механизмами фрагментации и не используемые в процедурах ручного и автоматического секвенирования, в разных типах тандемных масс-спектров;
- Установить пептидомы трёх ранидных амфибий: *Rana arvalis* (центральная Словения) и *Rana temporaria* (центральная Словения и Архангельск), включая последовательность аминокислот внутри дисульфидных циклов и идентификацию изомерных остатков Leu/Ile;
- Сравнить полученные составы пептидомов с составами других популяций этих двух видов амфибий для выявления потенциальных биомаркеров популяций и вида;

- Сравнить данные, полученные ручной интерпретацией спектров, с результатами автоматического секвенирования с помощью программы PEAKS Studio;

**Научная новизна.** Впервые установление первичной структуры пептидов проводилось без использования химических модификаций, исключительно методами тандемной масс-спектрометрии, доступными на масс-спектрометрах с орбитальной ловушкой: ДАС (диссоциация, активированная соударениями); ДАСПЭ (диссоциация, активированная соударениями при повышенной энергии); ДПЭ (диссоциация под действием переноса электрона) и с помощью МС<sup>3</sup> эксперимента, EThcD.

Показана наибольшая информативность EThcD при секвенировании кожных пептидомов ранидных лягушек методом «сверху вниз». Он отлично зарекомендовал себя в определении последовательностей как коротких, но сложных для секвенирования объектов, темпоринов, так и длинных дисульфидсодержащих пептидов. Комплементарная ДАС/ДАСПЭ фрагментация внутри «Rana box» в условиях EThcD дополнила созданный алгоритм секвенирования «сверху вниз».

Показано, что радикальный разрыв S-S связей в дисульфидсодержащих пептидах протекает для всех изученных семейств пептидов и сопровождается фрагментацией пептидных связей внутри C-концевого S-S цикла («Rana box»). Предложена схема фрагментации дисульфидсодержащих пептидов в условиях EThcD эксперимента, позволяющая установить всю последовательность.

Впервые установлены составы трёх кожных пептидомов ранидных амфибий: *Rana arvalis* (центральная Словения) и *Rana temporaria* (центральная Словения и Архангельск), включая C-концевые последовательности практически всех интактных дисульфидсодержащих пептидов и дифференцированы изомерные остатки Leu/Pe практически во всех 160 обнаруженных пептидах, в том числе 16, описанных впервые. Проведено сравнение пептидомов исследованных популяций с пептидомами других популяций этих двух видов амфибий для выявления потенциальных биомаркеров популяций и вида;

Показана применимость программы автосеквенирования PEAKS Studio для коротких пептидов семейства темпоринов и коротких бревининов 1 (до 24 а.к.), где программно удаётся частично секвенировать линейную часть интактных пептидов или установить полную последовательность части модифицированных пептидов в случае высокой концентрации молекулы и успешно прошедшей реакции дериватизации.

Проведена оценка потенциальной биологической активности новых пептидов из двух пептидомов путем построения их 2D карт и по их физико-химическим характеристикам.

Составлены две таблицы возможных замен для темпоринов (из различных популяций вида *Rana temporaria*) и мелиттин-родственных пептидов, известных на сегодня.

**Практическая значимость работы.** Созданный метод секвенирования природных нетриптических пептидов ранидных амфибий «сверху вниз» исключительно при помощи масс-спектрометрии без модифицирования исходного субстрата может быть использован для установления первичной структуры пептидов других организмов, содержащих одну внутримолекулярную дисульфидную связь. Комплементарность структурных данных, полученных при фрагментациях, протекающих в «Rapa box» у дисульфидных пептидов в условиях MS<sup>3</sup> эксперимента EThcD и ДАС/ДАСПЭ, делает обоснованным и более эффективным секвенирование интактных кожных секретов амфибий ранидных лягушек способом «сверху вниз», поскольку устраняет потери их минорных компонентов, неизбежно происходящие при очистке образцов после любой химической модификации. Показанная эффективность секвенирования коротких темпоринов по спектрам EThcD делает этот метод ключевым для применения его к исследованию компонентного состава кожных секретов амфибий по типу «сверху вниз». Параллельный эксперимент с классическими модификациями показал себя значительно менее эффективным. Получены идентификационные номера в международной базе данных UnitProKB для впервые установленных пептидных последовательностей. Продемонстрированные возможности текущей версии программы автоматического секвенирования PEAKS Studio могут быть использованы для получения частичной информации о последовательностях компонентов кожных секретов ранидных лягушек. Показана эффективность продления времени хроматографирования и сбора спектров в режиме зависимых сканирований с временно отложенным сканированием интенсивных ионов (DDA) для секвенирования минорных компонентов секретов. Составленные таблицы возможных замен с выделением консервативных участков в последовательностях темпоринов из кожных секретов *Rana temporaria* и мелиттин-родственных пептидов оказываются полезными при секвенировании новых пептидов этих семейств.

**Публикации.** По полученным в результате выполнения работы данным опубликованы три печатные работы в ведущих зарубежных журналах уровня Q1, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.3 – органическая химия, 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

**Апробация работы.** Основные положения работы доложены на семи отечественных и зарубежных конференциях: на Международной конференции Socratic Symposium 2021 (Любляна, Словения, 2020); на XXVIII-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021", (Москва, 2021); на IX-ой Всероссийской конференции Всероссийского масс-спектрометрического общества с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», (Москва, 2021); Chem2Change, Environmental Chemistry towards Global Change, (Словения, 2022); на Международной научной

конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», (Россия, 2022); на XXIV Международной масс-спектрометрической конференции (Маастрихт, Нидерланды, 2022), XII Международной масс-спектрометрической конференции по нефтехимии, экологической и пищевой химии Petromass (Крит, Греция, 2022).

**Объём и структура работы.** Диссертация изложена на 142 страницах. Состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части и заключения. Содержит 15 таблиц, 51 рисунок и 4 схемы. В списке цитируемой литературы содержится 271 ссылка.

#### **Положения, выносимую на защиту:**

1. Разработанный новый метод «сверху вниз» позволяет устанавливать первичную структуру природных интактных пептидов без каких-либо предварительных химических модификаций.

2. Фрагментация дисульфидсодержащих пептидов с участием радикального центра в условиях EThcD эксперимента позволяет установить последовательность внутри S-S циклов.

3. Комплементарность структурной информации о последовательностях «Rana box», получаемых при фрагментации методами EThcD и ДАС/ДАСПЭ позволяет подтвердить последовательность внутри S-S циклов.

4. Применимость нового метода секвенирования «сверху вниз» показана на трёх не изученных ранее популяциях ранидных амфибий.

5. На изученных вручную образцах применён автоматический алгоритм секвенирования PEAKS Studio, показана его эффективность для получения частичной информации о нетриптических пептидах амфибий семейства *Ranidae*.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты исследования – получение секретов амфибий**

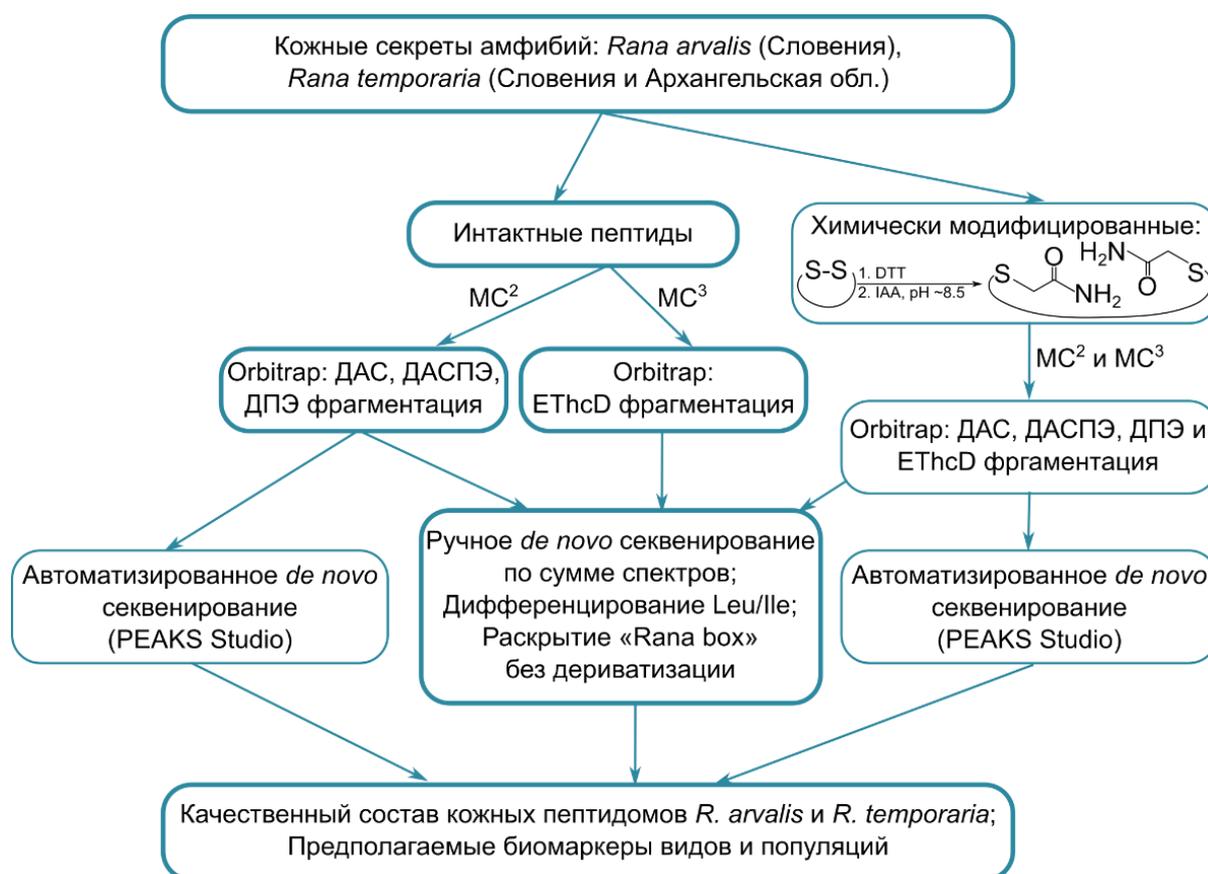
Объектами изучения являлись кожные секреты двух видов ранидных амфибий: *Rana arvalis*, остромордая лягушка, из центральнословенской популяции (10 особей) и *Rana temporaria*, травяная лягушка, из архангельской (2 особи) и центральнословенской популяций (2 особи). Кожные секреты получали щадящей электростимуляцией кожных желез. Выделения смывали деионизованной водой в контейнер, содержащий равное количество метанола. Полученные растворы центрифугировали, фильтровали (0,45 мкм, PTFE), концентрировали, лиофильно высушивали и хранили при -26°C.

Все особи были отпущены в места отлова.

### **Общая схема эксперимента**

Основная масса секретов была использована для получения набора тандемных спектров MS<sup>2</sup>: ДАС, ДАСПЭ и ДПЭ, и MS<sup>3</sup> – EThcD. Спектры регистрировали при следующих

оптимальных значениях нормализованной энергии соударений (NCE): в ДАС – 35; в ДАСПЭ – 28; время накопления сигнала в спектрах ДПЭ варьировалось в интервале 50-106 мс в зависимости от интенсивности сигналов фрагментных ионов; нормализованная энергия соударений (NCE) в EThcD ступенчато повышалась в интервале значений 5-40 с шагом 5-10. Все полученные тандемные масс-спектры интактных и модифицированных образцов были проинтерпретированы вручную, а в конце работы с помощью программы автоматического секвенирования PEAKS Studio с тем, чтобы оценить применимость алгоритма, нацеленного на работу с триптическими пептидами, к секвенированию компонентов интактных кожных секретов амфибий семейства *Ranidae*.

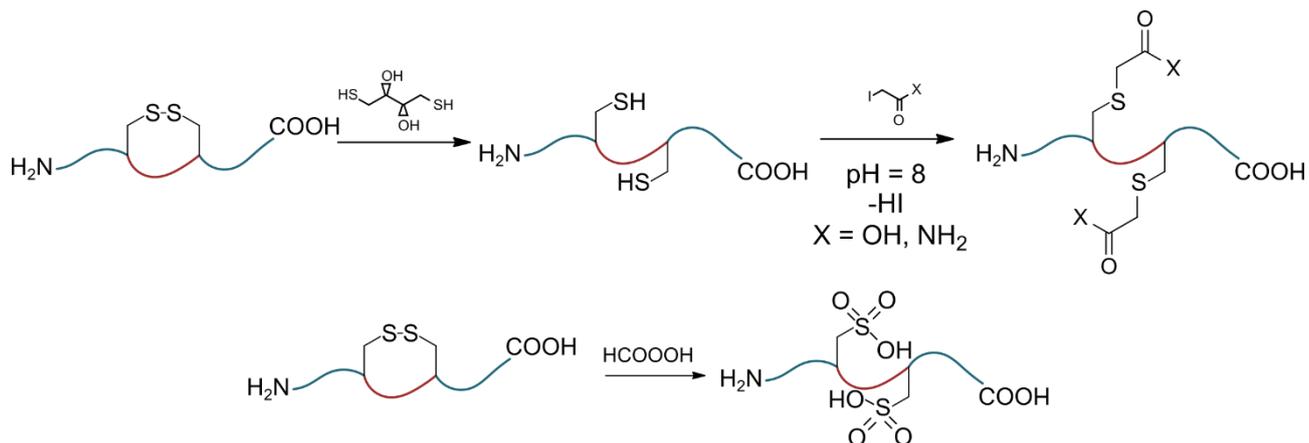


**Рисунок 1.** Общая схема эксперимента.

### Секвенирование пептидов с внутримолекулярной дисульфидной связью

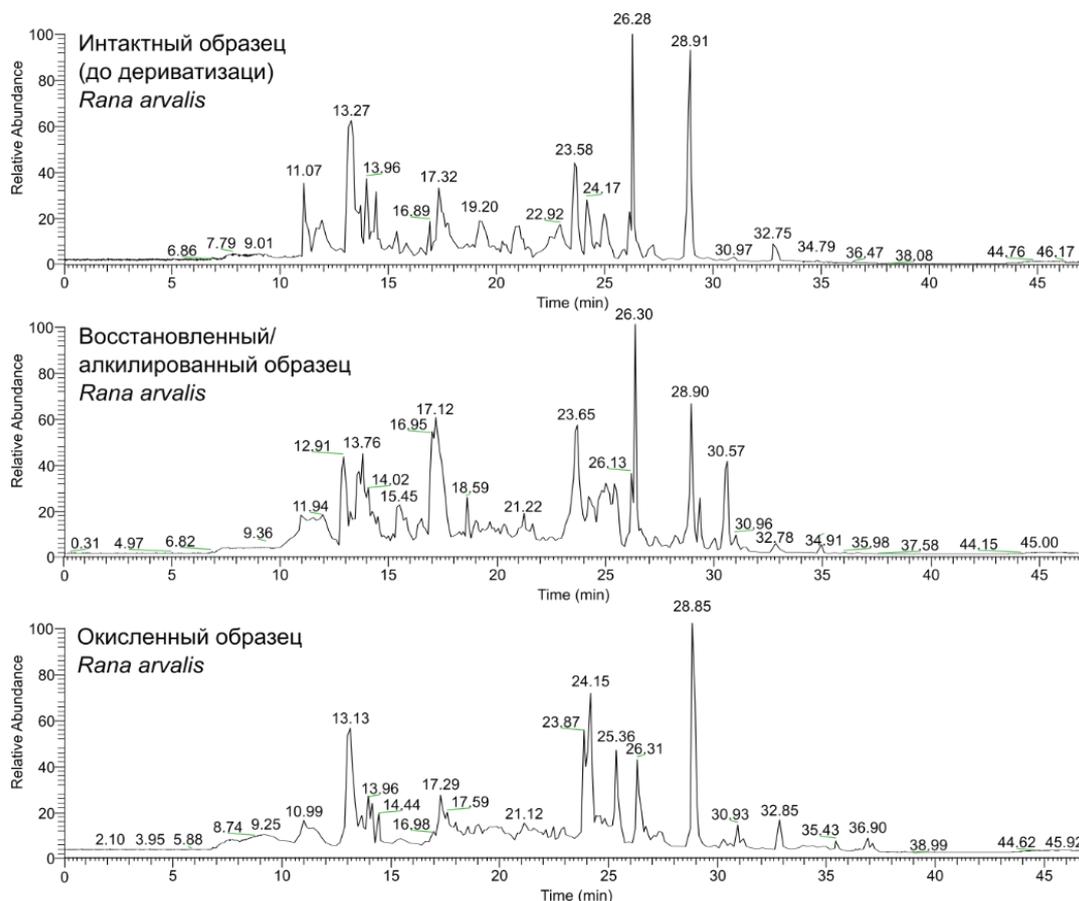
Дисульфидная связь, образованная тиольными группами боковых цепей двух остатков цистеинов – одна из самых распространённых посттрансляционных модификаций в белках и пептидах. Её присутствие осложняет секвенирование из-за отсутствия фрагментации внутри такого цикла, для пептидов ранидных лягушек называющегося «Rana box». Общепринятой процедурой для полного установления последовательностей аминокислот внутри таких циклов является восстановление/алкилирование дисульфидной связи при помощи дитиотреитола (DTT) и йодацетамида (IAA), общая схема реакция изображена на схеме 1 (верх). Помимо этого, ранее в нашей научной группе прибегали к окислению дисульфидных

связей надкислотами, что приводило к образованию фрагментов сульфоновых кислот вместо тиольных групп цистеина, схема реакции также приведена на схеме 1 (низ).



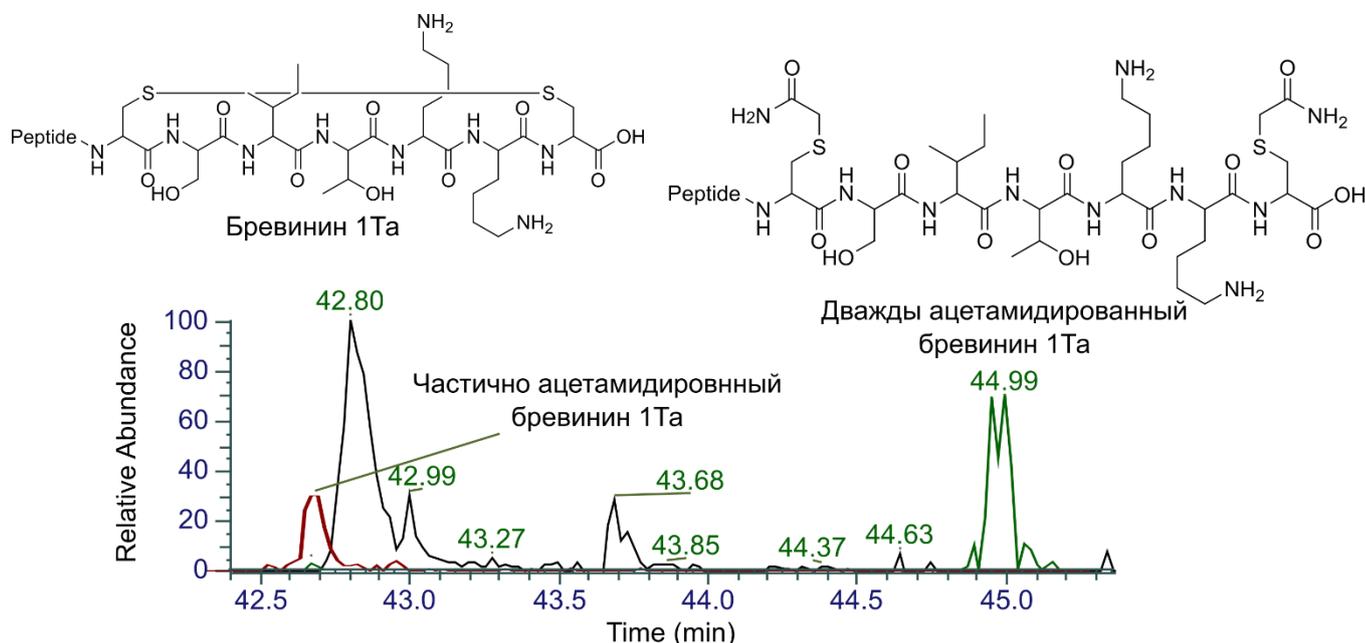
**Схема 1.** Реакции модификации дисульфидной связи в пептиде: сверху – восстановление/алкилирование (DTT/IAA), внизу – окисление (НСООН).

Для сравнения хроматографических профилей интактных и модифицированных образцов на примере исследованной в работе словенской остромордой лягушки построены хроматограммы по полному ионному току (рис. 2), в которых видно потерю части компонентов кожных секретов.



**Рисунок 2.** Хроматограммы по полному ионному току образцов *Rana arvalis*: сверху – интактный, в середине – восстановленный/алкилированный DTT/IAA, внизу – окисленный HCOOH образец.

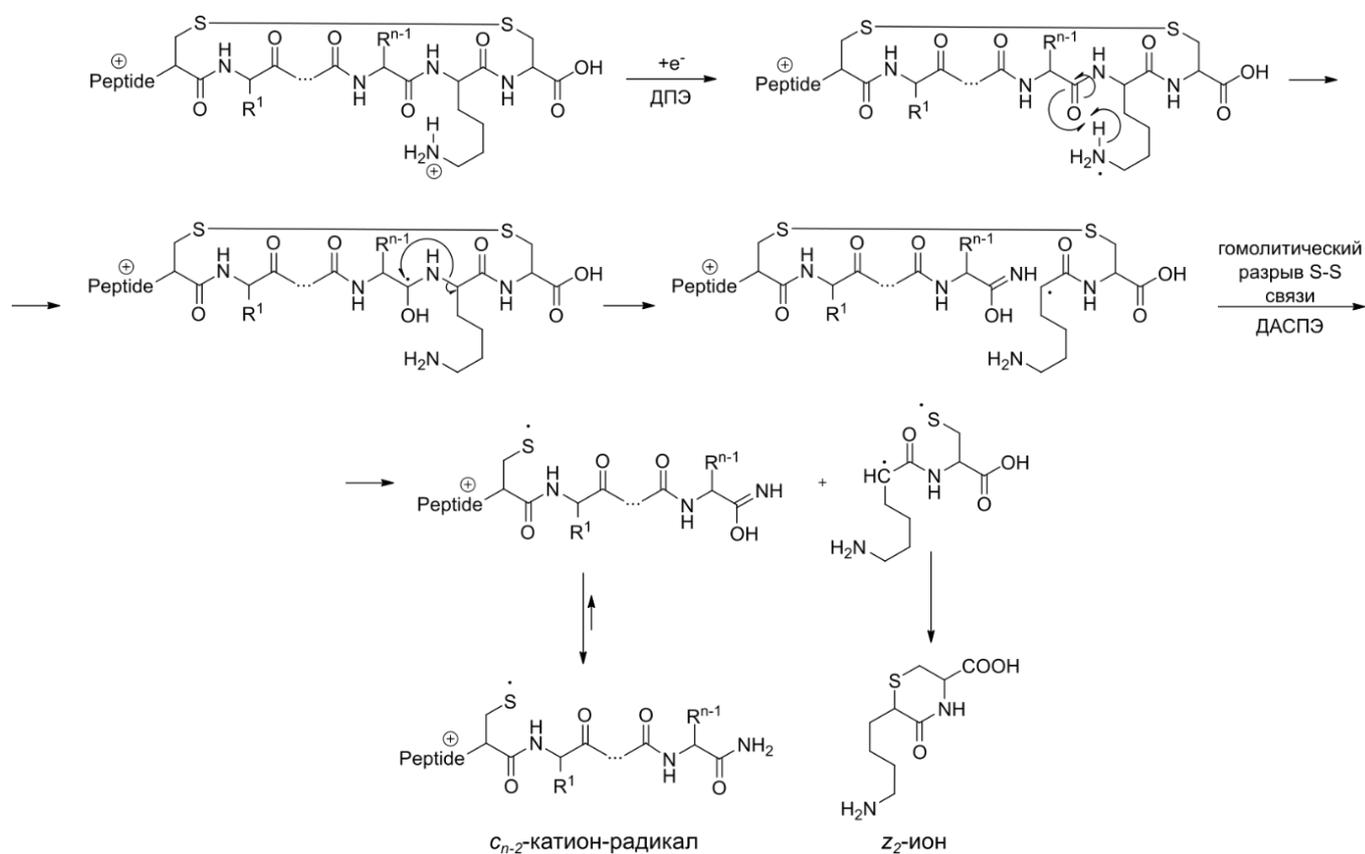
Неселективность и неоптимальность условий модификации дисульфидных связей в образцах природных пептидов приводит к тому, что в спектре можно наблюдать набор производных одной и той же молекулы, т.е. непрореагировавший пептид в его интактной форме, а также полностью или частично модифицированный пептид (рис. 3).



**Рисунок 3.** Масс-хроматограмма бревинина 1Ta после восстановления/алкилирования DTT/IAA образца секрета словенской *Rana temporaria*.

В случае большой концентрации такого компонента это становится дополнительной помехой для регистрации масс-спектров минорных пептидов кожного секрета, помимо их потери после очистки образца от реагентов. Для анализа дисульфидсодержащих пептидов в данной работе прибегли к регистрации EThcD спектров, в которых удалось обнаружить стабильную серию нетипичных ионов, позволившую установить последовательность десяти дисульфидсодержащих пептидов из трёх семейств: бревининов 1 и 2 и ранатуеринов 2.

В ходе EThcD фрагментации в спектрах наблюдалось образование *s*-катион-радикалов для фрагментных ионов, содержащих остаток цистеина. В работе был предложен следующий механизм их образования (схема 2): в ходе ДЗЭ-активации происходит захват электрона боковой цепью основной аминокислоты с последующим переносом радикального центра на карбонильный атом углерода. Возникший радикальный центр инициирует разрыв связи N-C $\alpha$ , а последующая ДАСПЭ активация вызывает гомолитический разрыв дисульфидной связи. В результате образуется серия *s*-катион-радикалов и короткая быстро затухающая серия чётноэлектронных  $z$ -ионов, содержащих циклический тиоморфолиноновый фрагмент.

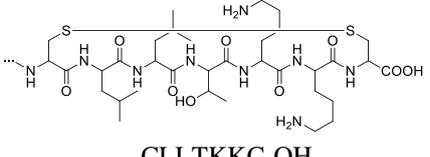
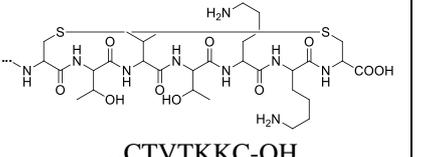
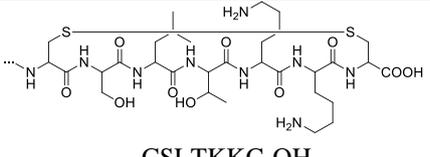
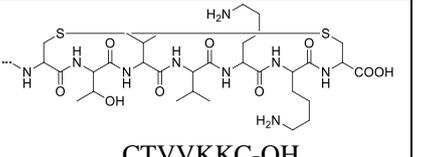
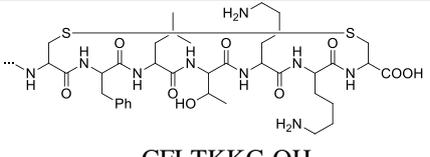
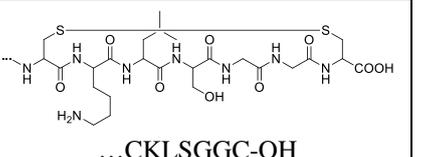
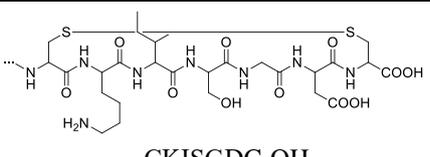
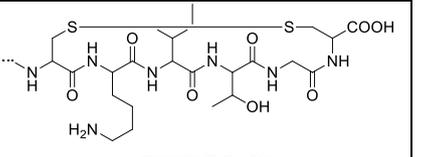
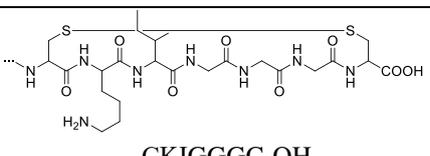
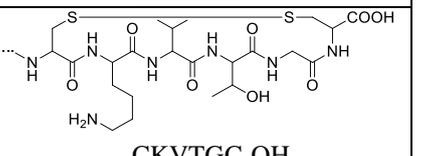


**Схема 2.** Предложенная схема фрагментации полипротонированных пептидов, содержащих C-концевой дисульфидный цикл, в условиях EThcD

В ходе ДАСПЭ для некоторых пептидов, например, бревининов 1, содержащих две основные аминокислоты в «Rapa box», возможно раскрытие дисульфидного цикла благодаря разрыву амидной связи между C-концевым цистеином и предыдущей аминокислотой. Такой тип фрагментации для спектров диссоциации, индуцированной соударениями, был обнаружен ранее в нашей научной группе. В таком случае становится возможно уточнить неразрешённую пару аминокислот, если она не была установлена в ходе EThcD эксперимента. Применение этих двух комплементарных методов для дисульфидсодержащих пептидов сделало возможным установление последовательностей «Rapa box» в интактных пептидах (таблица 1).

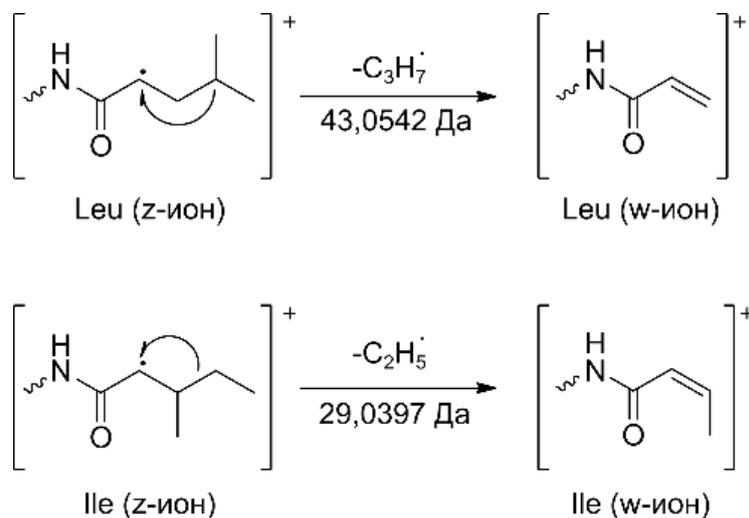
В случае бревинина 2AV и ранатуеринов 2AVb и 2AVc последовательности также были установлены и по протеолитическим фрагментам этих пептидов, содержащим данный цикл. Это связано с низкой концентрацией пептида и невозможностью зарегистрировать его качественные спектры в случае бревинина 2AV или просто с получением дополнительной информации о последовательности в случае ранатуеринов 2.

**Таблица 1.** Установленные последовательности «Rana box» в ходе ДАСПЭ и EThcD экспериментов

Последовательность Rana box, установленная вручную (ДАСПЭ + EThcD)			
<i>Rana temporaria</i> , Архангельская область		<i>Rana arvalis</i> , Центральная Словения	
Бревинин 1Т	 ... <u>CLLT</u> KKC-OH	Бревинин 1AVa	 ... <u>CTVT</u> KKC-OH
Бревинин 1Та	 ... <u>CSLT</u> KKC-OH	Бревинин 1AVb	 ... <u>CTVV</u> KKC-OH
Бревинин 1Тб	 ... <u>CFLT</u> KKC-OH	Бревинин 2AV	 ... <u>CKLS</u> GGC-OH
Бревинин 2Т	 ... <u>CKIS</u> GDC-OH	Ранатуерин 2AVb	 ... <u>CKIT</u> GC-OH
Бревинин 2Тd	 ... <u>CKIG</u> GGC-OH	Ранатуерин 2AVc	 ... <u>CKVT</u> GC-OH

### Дифференцирование изомерных аминокислотных остатков Leu/Ile

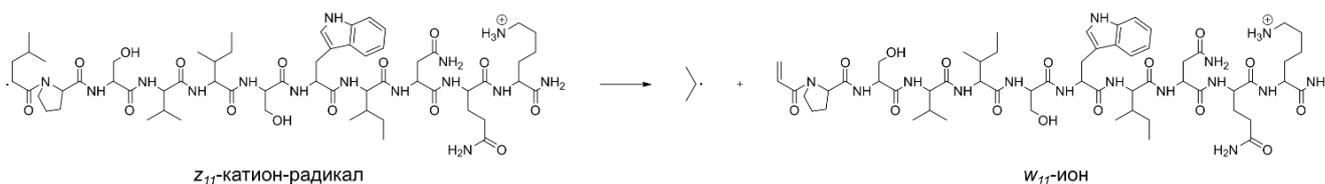
Разработанная в нашей лаборатории методика для дифференцирования изомерных остатков заключается в регистрации характеристических *w*-ионов, которые образуются при потере Et<sup>•</sup> или *i*-Pr<sup>•</sup> радикалов из *z*<sup>+</sup> ионов, содержащих *N*-концевые Ile/Leu.



**Схема 3.** Идентификация Ile/Leu по потере Et<sup>•</sup> или *i*-Pr<sup>•</sup> из целевых *z*<sup>+</sup> ионов

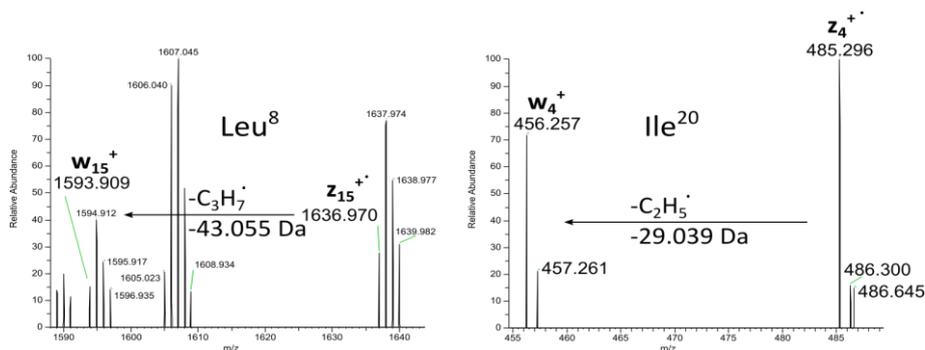
Схема 3 показывает реакции, протекающие в данном случае. В настоящей работе было проведено дифференцирование более, чем в 50-ти парах изомерных Ile/Leu.

Так, в последовательностях двух мелиттин-родственных пептидов из секретов центральнословенских особей *R. arvalis* были идентифицированы все Leu/Ile (суммарно 11). Следует отметить, что хотя массы этих двух родственных пептидов различались всего на 0.004 Да, разработанный подход с использованием тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения позволил не только детектировать их, но и секвенировать, а также определить все изомерные аминокислоты. На схеме 4 приведён пример образования  $w_{11}$ -катиона с потерей изопропильного радикала при фрагментации целевого  $z_{11}$ -катион-радикала мелиттин-родственного пептида АК-23-1.



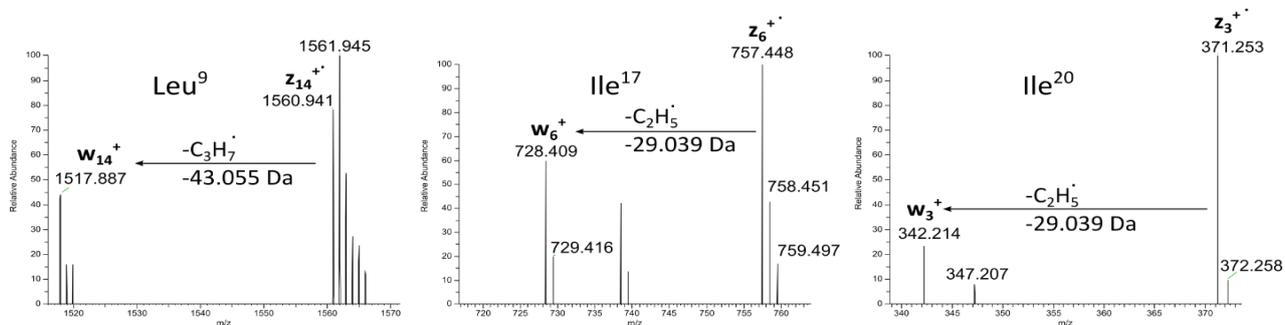
**Схема 4.** Образование  $w_{11}^+$  и  $i\text{-Pr}^\bullet$  при фрагментации целевого  $z_{11}^{+\bullet}$  МРП АК-23-1

Дифференцирование всех шести изомерных Leu/Ile было проведено по спектрам EThcD, снятых ступенчатым увеличением энергии активирующих частиц (NCE 5-40). В качестве примера показаны фрагменты спектров EThcD разнозарядных ионов с  $m/z$  788.483<sup>3+</sup> (NCE 40) и  $m/z$  591.615<sup>4+</sup> (NCE 20) полипротонированного мелиттин-родственного пептида АК-23-1, по которым были идентифицированы Leu<sup>8</sup> и Ile<sup>20</sup>. Время экспозиции в ДПЭ составляло 50 мс. Точность измерения характеристических  $w_{15}$  и  $w_4$  ионов равнялась 1.3 ppm и 1 ppm, соответственно (рис. 4).



**Рисунок 4.** Фрагменты спектров EThcD МРП АК-23-1 для определения Leu<sup>8</sup> и Ile<sup>20</sup>.

Последовательность одного из мелиттин-родственных пептидов, FQ-22 (FVGAALKVLANVLPPVISWIKQ-NH<sub>2</sub>), была установлена в секрете подмосковных *Rana arvalis* ранее, но все пять изомерных Leu/Ile определены в данной работе по спектрам EThcD. Точность измерения характеристических ионов составила:  $w_{14}$  1.3 ppm,  $w_6$  и  $w_3$  < 1 ppm (рис. 5).

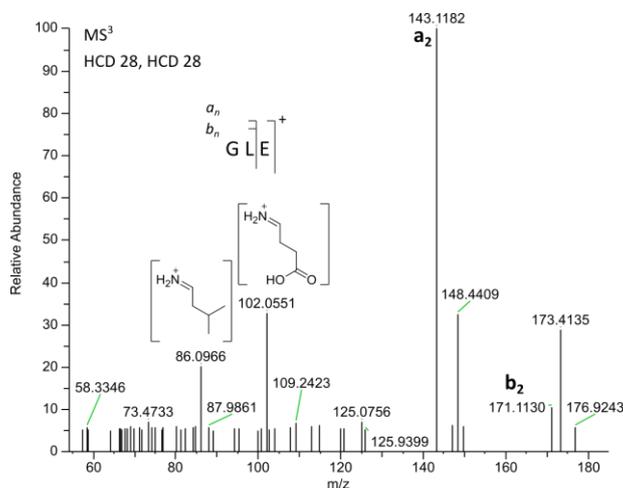


**Рисунок 5.** Фрагменты спектров EThcD МРП FQ-22 для определения Leu<sup>9</sup>, Ile<sup>17</sup> и Ile<sup>20</sup>.

### Карбонилирование пептида – вариант необычной посттрансляционной модификации

В образце словенской остромордой лягушки мы обнаружили темпорины, впервые показав их присутствие в кожном секрете *Rana arvalis*. Темпорин AVa, новый пептид с последовательностью GLEVLGKILSGIL-NH<sub>2</sub>, включающей в себя уникальную на сегодняшний день замену – обычно консервативный Pro<sup>3</sup> в данной последовательности оказался заменён остатком глутаминовой кислоты.

Для подтверждения присутствия Glu<sup>3</sup> в работе был проведен MS<sup>3</sup> эксперимент с фрагментацией b<sub>3</sub>-иона (рис. 6), полученного в ходе ДАСПЭ фрагментации. Для этого b<sub>3</sub>-ион подвергли дополнительной ДАСПЭ активации.

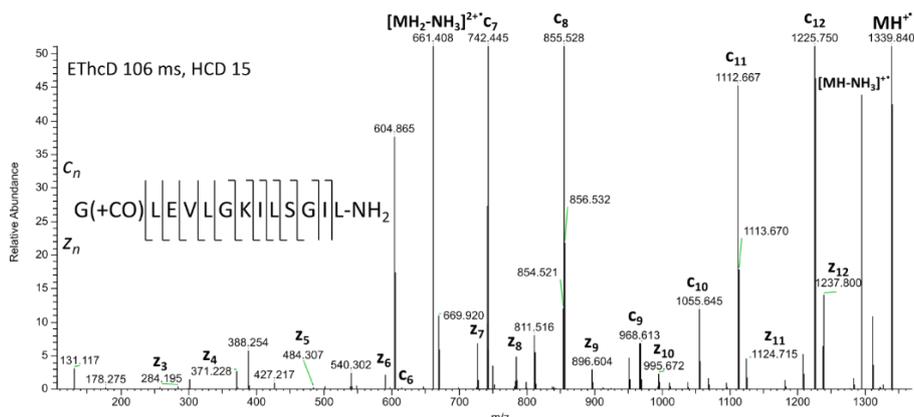


**Рисунок 6.** ДАСПЭ-ДАСПЭ спектр b<sub>3</sub>-иона (*m/z* 300.1558) темпорина AVa.

Присутствие в спектре на рис. 6 двух имминиевых ионов с *m/z* 102.0051 (точность измерения массы 7.8 ppm) и *m/z* 86.0966 (точность измерения массы 3.4 ppm) говорит о наличии в структуре иона b<sub>3</sub> Glu и Leu, соответственно. Пара b<sub>2</sub>/a<sub>2</sub> ионов с *m/z* 171.1132/143.1182 (точность измерения масс 2.3 ppm и 2.0 ppm соответственно), обладающая суммарной массой пары Gly-Leu, подтверждает потерю из иона b<sub>3</sub> остатка глутаминовой кислоты.

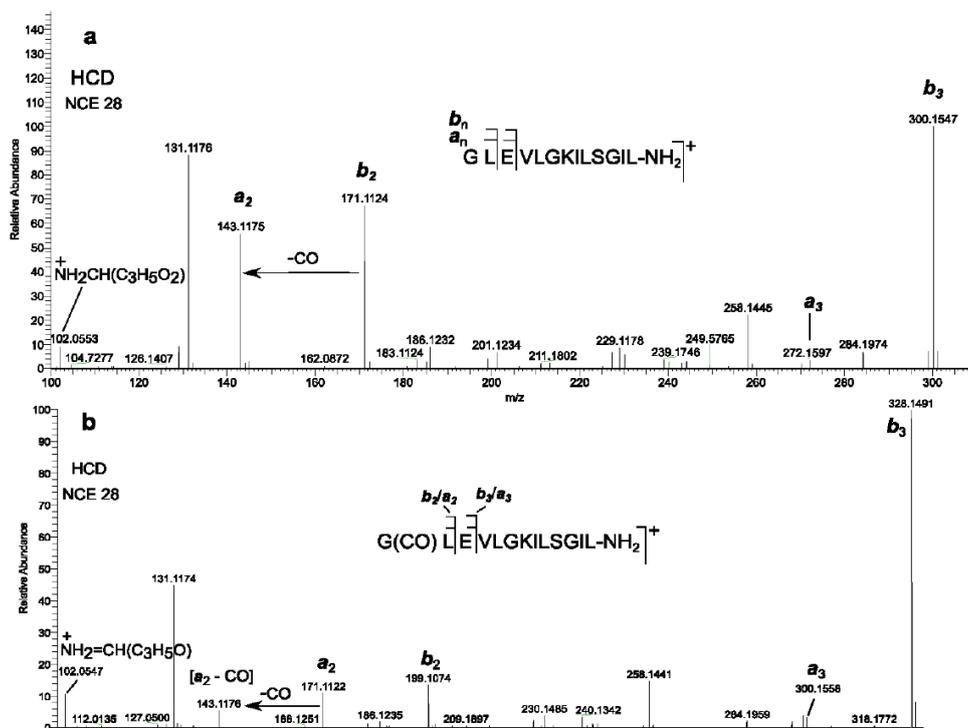
Темпорин AVa присутствовал в секрете словенских особей и в карбонилированной форме, свидетельствующей о вероятном карбонильном стрессе, в результате которого в

организме накапливаются продукты окисления свободными радикалами. Это могут быть кислоты, кетоны, но чаще альдегиды. Карбонильный стресс – часть окислительного стресса, являющегося маркером патогенеза большинства болезней человека.



**Рисунок 7.** EThtD спектр карбонилированного темпорина AVa, до экстракции: ДПЭ 106 мс; ДАСПЭ 15.

Анализ спектра EThtD показал, что карбонилированию подвергся *N*-концевой остаток Gly, поскольку дополнительная CO-группа теряется уже на стадии образования иона  $z_{12}$  с  $m/z$  1237.800 (рис. 7), идентичного  $z_{12}$  иону в спектре интактного темпорина AVa. На рисунке 8 показаны фрагменты спектров ДАСПЭ интактного и карбонилированного темпорина AVa, позволяющие точнее определить положение CO в глицине:



**Рисунок 8.** Фрагменты спектров ДАСПЭ 28 темпорина AVa до экстракции ионов: а – интактный; б – карбонилированный.

Ионы  $b_2$  в спектрах интактного и карбонилированного пептида различаются точно на массу CO, 27.995, (ионы с  $m/z$  199.107 и 171.112). Оба  $b_2$  иона в ДАСПЭ спектрах легко теряют молекулу CO, образуя соответствующие  $a_2$  ионы, сохраняя при этом ту же разницу 27.995 ( $m/z$  171.112 и 143.117). Хотя оба  $a_2$  иона все ещё содержат ещё один фрагмент CO, принадлежащий структуре самого глицина, мы не видим его потери у интактного темпорина AVa (рис. 8a). Этот факт говорит в пользу линейной структуры иона  $a_2$  интактного темпорина AVa, поскольку циклическая легко бы элиминировала молекулу CO. Напротив, ион  $a_2$  карбонилированного темпорина AVa теряет вторую молекулу CO (рис. 8b). Предполагая линейную структуру иона  $a_2$ , можно предложить структуру карбонилированного Gly как HCO-NH-CH<sub>2</sub>-... В этом случае потеря CO с N-конца пептида происходит легко и сопровождается миграцией водорода от CO к NH-фрагменту.

### **Сравнение результатов ручного и автоматического секвенирования интактных и модифицированных пептидов с помощью программного обеспечения PEAKS Studio**

Для автоматического секвенирования пептидов было выбрано программное обеспечение PEAKS Studio – один из самых популярных коммерческих продуктов для работы с белками и пептидами на сегодняшний день.

PEAKS Studio довольно уверенно секвенирует короткие темпорины, несмотря на отсутствие в некоторых из них основных аминокислот. Темпорины – небольшие по размерам пептиды, но не самые удобные для *de novo* секвенирования в силу интенсивной вторичной фрагментации у-ионов, образованных разрывом амидной связи между пролином, содержащимся в подавляющем большинстве последовательностей, и предыдущей аминокислотой. Тем не менее из 23-х темпоринов, обнаруженных нами в кожных секретах исследованных амфибий, программа PEAKS Studio правильно просеквенировала 10 из них. Аналогичные результаты программа демонстрирует для установления последовательностей мелиттин-родственных пептидов.

Однако результаты программы для секвенирования дисульфидсодержащих пептидов, ранатуеринов 2 и бревининов 1 и 2, оказываются скромнее. В таблице 2 объединены последовательности этих пептидов, установленные вручную, а также при помощи программы для интактных и модифицированных образцов. В случае интактных пептидов программа частично устанавливает последовательности линейных частей дисульфидсодержащих пептидов, делая основное число ошибок в циклической части молекулы. Программа приписывает пептиду последовательность, которую составляет из ионов вторичной фрагментации и шума. В случае анализа модифицированных образцов программа способна полностью установить последовательность пептида, однако последовательности 6 из 10 пептидов не были установлены. Эти молекулы были минорными компонентами пептидома,

или же модифицирование для них не прошло, что ещё раз говорит о неуниверсальности условий модификации дисульфидной связи.

**Таблица 2.** Сравнение результатов ручного и автоматического секвенирования дисульфидсодержащих пептидов.

Вид	Пептид	Секвенирование		
		Ручное Интактный пептид CID + HCD + EThcD	Автоматизированное	
			Интактный пептид CID + HCD + ETD + EThcD	Модифицированный DTT/IAA CID + HCD + ETD + EThcD
<i>Rana temporaria</i> , Архангельск	Бревинин 1Т	VNPIILGVLPKFV CLITKKC-OH	VDPLLLGVNPWWV GLLLHK(+CO)-NH <sub>2</sub>	VNPLLLGVLPKFV C(+57.02)LLTKKC(+57.02)
	Бревинин 1Та	FITLLLRKFICSITKKC-OH	FLTLLK(+CO)KFG TNFTEL-NH <sub>2</sub>	Не обнаружен (минорный компонент)
	Бревинин 1Тб	LVPLFLSKLICFITKKC-OH	LVPLFLSKWTPPYLPPP-NH <sub>2</sub>	LVPLFLSKLL C(+57.02)FLTCKC(+57.02)
	Бревинин 2Т	GLLSGLKKVKGKHAVAKNV AVSLMDSLKCKISGDC-OH	LGLSGLKKVKGKHAVAKNVA VSLMDSLKM <sub>ox</sub> EEEGE-OH	Не обнаружен модифицированный
	Бревинин 2Тд	GLWETIKNFGKKFTLNILH NLKCKIGGGC-OH	LGWETLKNFGKKFTLNLL HNL TSAEWLG-OH	Не обнаружен (минорный компонент)
<i>Rana arvalis</i> , Словения	Бревинин 1АVa	FLPLLAASFACTVTKKC-OH	FLPLLAASFANM <sub>2ox</sub> RLT-OH	FLPLLAASFAC(+57.02)TVTKKC(+57.02)
	Бревинин 1АVb	FVPLLVSCLVCVVTKKC-OH	FVPLLVSCLVACTQRVT-OH	(+57.02)FVPLLVSCLV C(+57.02)VVTKKC(+57.02)
	Бревинин 2АV	GLMSVLKKAGKHAVAKNV AVSLMDSLKCKISGGC-OH	LGMSVLKNAAKHAVAKQR VSLMDSLQLCMLW-OH	Не обнаружен (минорный компонент)
	Ранатуерин 2АVb	GLMDMVKGAAKNLFASA LDTLKCKITGC-OH	LGMDMVKM <sub>ox</sub> LVNEASA LLCLKRM <sub>ox</sub> WN-OH	Не обнаружен модифицированный
	Ранатуерин 2АVc	GLLDVVKGAAKNLLATAL DKLKCKVTGC-OH	LGLDVVKAQLELLATALD KLKH <sub>ox</sub> FW <sub>ox</sub> S-OH	Не обнаружен модифицированный

Таким образом, эта программа автоматического секвенирования может быть полезной, если ею будет пользоваться исследователь, хорошо представляющий, структурные особенности пептидов и пептидные семейства, присутствующие в секретах ранидных амфибий.

**Популяционное сравнение внутри двух видов амфибий: *Rana arvalis* и *Rana temporaria* с целью определения потенциальных биомаркеров видов и популяций**

Полученные исключительно методами тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения компонентные составы трёх пептидомов ранидных амфибий позволили провести сравнение двух популяций внутри вида *R. arvalis* и четырёх популяций внутри вида *R. temporaria* (данные по двум популяциям для сравнения были получены ранее). Новые

последовательности, установленные в данной работе, помечены в столбце таблицы 3 «Наименование пептида» как «<sup>new</sup>».

**Таблица 3.** Сравнение составов кожных пептидомов особей *Rana arvalis* из центральнословенской (A<sup>S</sup>) и Подмосковной (A<sup>M</sup>) популяций за исключением брадикининов.

№	Наименование пептида	Последовательность	A <sup>S</sup>	A <sup>M</sup>
1 #	Бревинин 1AVa	FLPLLAASFACTVTKKC-OH	+	+
2 #	Бревинин 1AVb	FVPLLVSKLVCVVTKKC-OH	+	+
3 *	<sup>new</sup> Бревинин 2AV	GLMSVLKKAGKHVAKNVAVSLMDSLKCKISGGC-OH	+	-
4 **	Ранатуерин 2AVa	GLLDVVKGAAKNLLASALDKLKCKVTGC-OH	-	+
5 #	Ранатуерин 2AVb	GLMDMVKGAAKNLFFASALDTLKCKITGC-OH	+	+
6 *	<sup>new</sup> Ранатуерин2AVc	GLLDVVKGAAKNLLATALDKLKCKVTGC-OH	+	-
7 #	FQ-22-1	FVGAALKVLANVLPVISWIKQ-NH <sub>2</sub>	+	+
8 *	<sup>new</sup> АК-23-1	ALGGVLKALAKGLPSVISWINQK-NH <sub>2</sub>	+	-
9 *	<sup>new</sup> Темпорин AV	LLPLVGNLLNDLL-NH <sub>2</sub>	+	-
10 *	<sup>new</sup> Темпорин AVa	GLEVLGKILSGIL-NH <sub>2</sub>	+	-

\* пептиды, встречающиеся только у особей из Словенской популяции

\*\*пептиды, встречающиеся только у особей из Подмосковной популяции

# пептиды, встречающиеся в обеих популяциях вида *R. arvalis*

Установленные в работе изомерные Leu/Ile выделены в таблице жирным шрифтом.

Пептидомы двух популяций очень близки и содержат одни и те же семейства пептидов: бревинины 1, ранатуерины 2, мелиттин-родственные пептиды и брадикинины. Появление в секрете двух у словенских особей новых семейств, бревинина 2AV и темпоринов, – явление нехарактерное для различных популяций одного вида ранидных лягушек. Это можно объяснить тем, что все три новых пептида (бревинин 2AV и темпорины AV и AVa) – минорные компоненты кожного секрета словенских лягушек. Их удалось зафиксировать в данной работе, благодаря приборным возможностям орбитальной ловушки, а также вдвое увеличенному времени хроматографирования. Кроме того, в настоящей работе был использован прием «динамического исключения» – временного программного удаления из списка для регистрации тандемных масс-спектров тех ионов, чьи спектры уже зарегистрированы. Это позволяет «уловить» минорные компоненты секрета.

Общим для обеих популяций является набор бревининов 1, в который входят бревинин 1AVa и бревинин 1AVb. Вместо ранатуерина 2AVa у словенских особей секретируется его структурный аналог ранатуерин 2AVc, имеющий единственную замену в последовательности: Ser<sup>16</sup>→Thr<sup>16</sup>. Мелиттин-родственный пептид FQ-22-1 также общий для обеих популяций остромордой лягушки.

Пептиды под знаком «\*» характерны лишь для словенских особей, тогда как пептиды под «\*\*» – для особей из подмосковной популяции. Общими для обеих популяций являются

те пептиды, которые помечены в таблице знаком «#» – их с осторожностью можно считать маркерами вида *Rana arvalis*.

Пять новых пептидов, чьи последовательности докладываются впервые, могут претендовать на роль биомаркеров Словенской популяции *Rana arvalis*: это бревинин 2 AV, ранатуерин 2 AVc, мелиттин-родственный пептид АК-23-1, темпорины AV и AVa\*. Три пептида могут претендовать на роль биомаркеров особей из Московской популяции *R. arvalis*: ранатуерин 2AVa, [Hyp<sup>3</sup>]RL-16 и [Glu<sup>5</sup>]RA-11, из них, несомненно, ранатуерин 2AVa – самый значимый претендент.

Все остальные брадикинин-родственные пептиды, обнаруженные в секретах Словенских и Подмосковных особей, являются протеолитическими фрагментами исходного препробрадикинина и лишь отражают путь синтеза брадикинина в организме амфибий.

В таблице 4 проведено сравнение четырёх популяций вида *R. temporaria*: столбец **A** – архангельская; **M** – Подмосковная; **S** – центральнословенская; **I** – итальянская. Данные по столбцу **M** получены ранее, а **I** – взяты из литературы.

Изменчивость антимикробных пептидов популяций внутри одного вида амфибий происходит в рамках естественного отбора и диктуется их бактериальным окружением и обитающими там хищниками. На примере четырёх популяций травяной лягушки мы можем проверить, как меняется их кожный пептидом в зависимости от места обитания. Популяции имеют следующие географические координаты: Архангельская (64°33' Сев.ш.; 40°32' Вост. д.); Подмосковная (Звенигородская) – (55°44' Сев. ш., 36°51' Вост. д.); Центральнословенская (Любляна) – (46°05' Сев. ш., 14°51' Вост. д.); Итальянская (коммуна Кьети) - 42°21' Сев. ш., 14°10' Вост. д.). Знаком «\*» в Таблице 4 помечены пептиды, встречающиеся у всех четырёх популяций: это бревинин 1Т, бревинин 1Та; бревинин 2Т; мелиттин-родственный пептид FQ-22; темпорины В, С, D, G, H, L и брадикинин. Их можно предположительно назвать биомаркерами вида травяной лягушки *Rana temporaria*. Знак «\*\*» присвоен пептидам, характерным для трёх популяций; «^»-только словенской популяции; «#»-только у особей из архангельской популяции; «°»-только у подмосковной популяции. Идентифицированные в работе Leu/Pe выделены жирным шрифтом.

Наиболее изменчивым семейством пептидов у лягушек *Rana temporaria* являются темпорины. Темпорины А, Е, F, К, N и M встречаются в секретах трёх популяций из четырёх (таблица 4). У архангельских особей в секрете присутствуют 15 темпоринов, 4 из которых уникальны: это темпорины U, V, W, X (биомаркеры популяции). В подмосковной популяции – 12 темпоринов, ни одного уникального. У словенских лягушек *Rana temporaria* 15 темпоринов, 5 уникальных (кандидаты на биомаркеры этой популяции), у итальянских – 10 темпоринов, ни одного уникального. Для особей из Подмосковной популяции характерно наличие в секрете протеолитических копий брадикинина с С-концевым и особенно с N-

концевыми расширениями. Напротив, у архангельских и словенских особей в секретах присутствуют протеолитические копии брадикинина исключительно с C-расширением. Причины этого следует искать в механизме действия протеаз, секретируемых совместно с секретом.

**Таблица 4.** Сравнение составов кожных пептидомов особей *Rana temporaria* из четырёх популяций за исключением брадикининов.

№	Пептид	Последовательность	A	M	S	I
1*	Бревинин 1Г	VNPIILGVLPKFVCLITKKC-OH	+	+	+	+
2*	Бревинин 1Га	FITLLLRKFICSITKKC-OH	+	+	+	+
3**	Бревинин 1Гб	LVPLFLSKLICFITKKC-OH	+	+	+	-
4^	Бревинин 1Гс	LVPMFLSKLICFITKKC-OH	-	-	+	-
5*	Бревинин 2Г	GLLSGLKKVGKHKVAKNVAVSLMDSLKCKISGDC-OH	+	+	+	+
6#	Бревинин 2Гд	GLWETIKNFGKKFTLNILHNLKCKIGGGC-OH	+	-	-	-
7	Бревинин 2Ге	GLLDGLKKVGKHKVAKNVAVSLMDSLKCKISGDC-OH	-	+	+	-
8°	Бревинин 2Гф	KKFTLNLFHQKCKIGGGC-OH	-	+	-	-
9*	MRP-1	FIGSALKVLAGVLPVISWVKQ-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
10**	Темпорин А	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	-	+	+	+
11*	Темпорин В	LLPIVGNLLKSLL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
12*	Темпорин С	LLPILGNLLNGLL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
13*	Темпорин D	LLPIVGNLLNSLL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
14**	Темпорин Е	VLPIIGNLLNSLL-NH <sub>2</sub>	-	+	+	+
15**	Темпорин F	FLPLIGKVLSGLL-NH <sub>2</sub>	+	+	-	+
16*	Темпорин G	FFPVIGRILNGIL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
17*	Темпорин H	LSPNLLKSLL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
18**	Темпорин К	LLPNLLKSLL-NH <sub>2</sub>	+	+	-	+
19*	Темпорин L	FVQWFSKFLGRIL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	+
20**	Темпорин М	FLPILGKVLRSVL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	-
21**	Темпорин N	FLGALGNALRSVL-NH <sub>2</sub>	+	+	+	-
22^	Темпорин O	FLGALVNALRGLL-NH <sub>2</sub>	-	-	+	-
23^	Темпорин P	LVPLLGNLLSGLL-NH <sub>2</sub>	-	-	+	-
24^	Темпорин Q	LVPFLGKTLGGLLARF-NH <sub>2</sub>	-	-	+	-
25^	Темпорин R	LVPFLGRTLGGLLARL-NH <sub>2</sub>	-	-	+	-
26^	Темпорин S	LVPFLGRTLGGLLARF-NH <sub>2</sub>	-	-	+	-
27	Темпорин Т	FXGALVNAXTRVX-NH <sub>2</sub>	+	-	+	-
28#	Темпорин U	FLGAVLHALTGIL-NH <sub>2</sub>	+	-	-	-
29#	Темпорин V	FLGALVHALTSLL-NH <sub>2</sub>	+	-	-	-
30#	Темпорин W	FIGALVNALRSVL-NH <sub>2</sub>	+	-	-	-
31#	Темпорин X	FLGALVGALRSVL-NH <sub>2</sub>	+	-	-	-

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод установления первичных структур пептидов в варианте «сверху вниз» без использования каких-либо химических модификаций, исключительно методами тандемной масс-спектрометрии, доступными на масс-спектрометрах с орбитальной ловушкой: ДАС, ДАСПЭ, ДПЭ и EThcD. Разработанный метод успешно апробирован на трёх кожных пептидомах амфибий семейства *Ranidae* из разных популяций.

2. Продемонстрирована максимальная информативность EThcD спектров при установлении кожных пептидомов новым методом «сверху вниз», включая длинные дисульфидсорежающие пептиды, новые и установленные ранее с помощью клонирования кДНК или дериватизации дисульфидной связи; и короткие, но сложные для секвенирования темпорины.

3. Предложена схема фрагментации пептидов с одной дисульфидной связью в условиях EThcD эксперимента с образованием *c*-катион-радикалов и чётноэлектронных *z*-ионов, содержащих тиоморфолиноновый фрагмент. Показано, что механизм реализуется для всех изученных семейств дисульфидсодержащих пептидов и сопровождается фрагментацией пептидных связей внутри *C*-концевого S-S цикла («Rana box»).

4. Показана применимость программы автосеквенирования PEAKS Studio для коротких пептидов семейства темпоринов и коротких бревининов 1 (до 24 а.к.). Программа позволяет частично секвенировать линейную часть интактных пептидов или установить полную последовательность модифицированных пептидов в случае их высокой концентрации.

## Основные результаты работы изложены в публикациях:

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

1. Samgina T.Yu., **Vasileva I.D.**, Kovalev S.V., Trebse P., Torkar G., Surin A.K., Zubarev R.A., Lebedev A.T. Differentiation of Central Slovenian and Moscow populations of *Rana temporaria* frogs using peptide biomarkers of temporins family // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2021. V 413, № 21, P 5333-5347. Impact factor (Web of Science) = 3.637

2. Lebedev Albert T., **Vasileva Irina D.**, Samgina Tatiana Y. FT-MS in the *de novo* top-down sequencing of natural nontryptic peptides // Mass Spectrometry Reviews. 2022. V 41, № 2, P 284-313. Impact factor (Web of Science) = 8.887

3. Samgina Tatiana Yu, **Vasileva Irina D.**, Trebse Polonca, Torkar Gregor, Surin Alexey K., Meng Zhaowei, Zubarev Roman A., Lebedev Albert T. Mass Spectrometry Differentiation between *Rana arvalis* Populations Based on Their Skin Peptidome Composition// Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2022. V. 33. №8. P. 1480-1491. Impact factor (Web of Science) = 3.262

### Дополнительные публикации:

4. **Vasileva I.D.** Peculiarities of the *de novo* mass spectrometry sequencing of bioactive peptides secreted by Slovenian *Rana temporaria* // Socratic Symposium 2021, Словения, 11-12 декабря 2020, с. 8-14

5. **Васильева И.Д.** Профилирование пептидов, содержащихся в кожном секрете словенской лягушки *Rana temporaria*, при помощи масс-спектрометра с орбитальной ловушкой ионов // XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021", МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 12-23 апреля 2021

6. **Васильева И.Д.**, Самгина Т.Ю., Лебедев А.Т. Анализ пептидома словенской травяной лягушки *Rana temporaria* // X съезд ВМСО, IX Всероссийская конференция с международным участием "Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы", Москва, Россия, 18-22 октября 2021, с. 121

7. **Vasileva Irina**, Samgina Tatyana, Zubarev Roman, Meng Zhaowei, Polonca Trebse, Gregor Torkar, Lebedev Albert. Slovenian *Rana arvalis* peptidome analysis // Chem2Change, Environmental Chemistry towards Global Change, Словения, 15-16 марта 2022, с. 35

8. **Васильева И.Д.** Масс-спектрометрическое секвенирование и сравнение пептидомов Подмосковной и Словенской популяций лягушек *Rana arvalis* // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 11-22 апреля 2022

9. **Irina Vasileva**, Tatyana Samgina, Roman Zubarev, Zhaowei Meng, Polonca Trebše, Gregor Torkar, Albert Lebedev. *Rana arvalis*: peptidomes comparison of central Slovenian and Moscow region populations // IMSC 2022, Маастрихт, Нидерланды, 27 августа – 2 сентября 2022

10. **I.D. Vasileva**, T.Y. Samgina, R.A. Zubarev, Z. Meng, A.Y. Kozhevnikov, A.T. Lebedev. *Rana temporaria*: *de novo* sequencing of Arkhangelsk population skin peptides and comparison of four populations // XII International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry Petromass, Крит, Греция, 16-23 октября 2022, с. 30

11. Vyatkina K.V., **Vasileva I.D.**, Samgina T.Yu, Lebedev A.T. *De novo* sequencing of *Rana arvalis* skin peptides with the Twister algorithm // XII International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry Petromass, Крит, Греция, 16-23 октября 2022, с. 38

### **Благодарности**

*Автор выражает глубочайшую признательность и благодарность к.х.н. Самгиной Т.Ю. за помощь в постановке задач, обсуждении результатов исследования и поддержку в ходе выполнения работы.*