

ПЕКОВ СТАНИСЛАВ ИГОРЕВИЧ

**ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ НОВЫХ МЕТОДОВ БЫСТРОГО
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОФОРМ БЕТА-АМИЛОИДА ЧЕЛОВЕКА
НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ И
ТАНДЕМНОЙ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.04 – физическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва, 2020

Работа прошла апробацию в департаменте молекулярной и биологической физики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)” (МФТИ)

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, доцент,
Попов Игорь Алексеевич

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита состоится 25 декабря 2020 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета ФЭФМ.02.00.04.001 на базе МФТИ по адресу: 141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке МФТИ и на сайте <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-khimicheskie-nauki.php>

Работа представлена 12 октября 2020 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)” для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, доктора наук в соответствии с п. 3.1 ст. 4 Федерального закона “О науке и государственной научно-технической политике”.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Физико-химические методы анализа в настоящее время играют ведущую роль в исследовании биологических систем. Многочисленные взаимосвязи между геномом, транскриптомом, протеомом, метаболомом и экспосомом, обуславливающие высокую сложность живых систем, а также развитие методов анализа данных и биоинформатики, повышают требования к аналитическим характеристикам инструментальных методов, применяемых для их исследования. В то же время, исследованиям, связанным с человеческим организмом, зачастую препятствует низкая доступность биоматериала – физиологические и этические ограничения во многих случаях позволяют получать лишь пробы ограниченного объема, содержащие малые количества аналита. Качественное и количественное определение исследуемых биомолекул в легкодоступных физиологических жидкостях также затрудняется присутствием других молекул, сходных как по химическому строению, так и по физиологической функции. По этим причинам на передний план выходят требования к чувствительности метода исследования и расширению его динамического диапазона для повышения селективности и специфичности. Улучшение этих характеристик требует оптимизации параметров физико-химического метода исследования для его адаптации к конкретному объекту. В свою очередь, выбор таких оптимизационных параметров может быть сделан только после изучения физико-химических процессов, происходящих с веществом в процессе исследования.

Биологическая интерпретация и валидация экспериментальных данных, а также последующее практическое применение результатов исследования в диагностических или терапевтических целях требуют анализировать значительный объем образцов, полученных от различных пациентов, либо собранных в динамике развития патологии. Таким образом, кроме аналитических характеристик физико-химического метода исследования, важными становятся и такие практические характеристики, как скорость и производительность анализа. Разработка быстрых инструментальных методов исследования вещества, сохраняющих высокие аналитические характеристики, ещё более требовательна к пониманию физико-химических процессов, сопровождающих весь процесс анализа.

Масс-спектрометрия является высокопроизводительным, чувствительным и надежным физико-химическим методом исследования, нашедшим свое применение практически во всех областях наук о жизни и являющимся наиболее универсальным и широко применяемым подходом в протеомике. Адаптация масс-спектрометрического

метода под конкретную задачу требует глубокой оптимизации его параметров как с целью повышения интенсивности сигналов целевых молекул, так и для выделения сигнала интересующих аналитов за счет повышения разрешения детектирования, либо подавления посторонних сигналов. В результате интегральные характеристики такого метода будут зависеть от комбинации множества параметров: методов и условий ионизации образца, условий осуществления фрагментации родительских ионов и особенностей применяемых масс-анализаторов. Различия в физико-химических свойствах аналитов будут влиять не только на процесс ионизации, но и на последующие превращения их ионов в процессе фрагментации, а также накладывать ограничения на применяемые методы детектирования ионов. Выбор параметров оптимизации, в свою очередь, требует изучения физико-химических процессов, происходящих на всех стадиях исследования, равно как и изучения влияния условий анализа на эти процессы и, таким образом, на интегральные аналитические характеристики физико-химического метода.

Разработка специализированных методов анализа важна для исследования, заблаговременной диагностики и терапии различных заболеваний, особенно социально значимых. Одним из таких заболеваний является болезнь Альцгеймера (БА) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, одна из наиболее распространенных форм деменции, приводящая к полной когнитивной дисфункции индивида. Ранняя диагностика БА затруднена ввиду возможного длительного бессимптомного протекания, а также частого игнорирования ранних симптомов, списываемых на индивидуальные и общевозрастные особенности. Объективные признаки БА, такие как амилоидоз и повышение уровня определенных биомаркеров в цереброспинальной жидкости, могут быть обнаружены одновременно с первыми симптомами, либо даже несколько ранее, но введение подобных тестов в широкий оборот затруднено их высокой стоимостью, сложностью, либо инвазивностью. Фундаментальное исследование молекулярных процессов, сопровождающих возникновение и развитие БА – важный шаг по направлению к разработке методов диагностики и терапии БА. Однако выполнение подобных исследований требует развития соответствующих физико-химических методов анализа, позволяющих быстро и эффективно исследовать на молекулярном уровне изменения, сопровождающие развитие БА.

К настоящему моменту установлено, что изменение относительных концентраций пептида бета-амилоида ($A\beta$) в плазме крови человека коррелирует с нарушением когнитивных функций и амилоидозом – объективным симптомом

развития БА, выражающимся в накоплении олигомеров Аβ в мозгу. Согласно одной из гипотез, нарушения метаболизма Аβ и накопление в организме его пост-трансляционных модификаций (ПТМ) – фосфорилированной по остатку серина в 8 положении, либо изомеризованной по остатку аспарагиновой кислоты в 7 положении играют ключевую роль в патогенезе БА. Развитие физико-химических подходов к анализу ПТМ Аβ представляет большой интерес в свете исследования их роли в развитии БА и может быть использовано в целях ранней диагностики, мониторинга состояния пациентов и поиска молекулярных мишеней для терапии БА.

Цели и задачи диссертационной работы. Целью работы является выявление физико-химических закономерностей ионизации и фрагментации молекул Аβ и его посттрансляционных модификаций для разработки и оценки аналитических характеристик методов относительного количественного определения ПТМ Аβ на примере фосфорилирования остатка серина в 8 положении и изомеризации аспарагиновой кислоты в 7 положении пептида на уровне концентраций, максимально приближенных к концентрациям исследуемых молекул в биологических пробах.

Основные задачи, которые решались в процессе выполнения работы:

- Создание масс-спектрометрического метода определения степени фосфорилирования Аβ, не требующего использования сложных методик анализа на основе аналитической хроматографии. Выявление особенностей ионизации и фрагментации фосфорилированного Аβ, влияющих на аналитические характеристики разрабатываемого метода, и определение преимуществ применения масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для создания новых высокопроизводительных методов определения степени фосфорилирования Аβ.
- Исследование механизмов фрагментации немодифицированного и изомеризованного Аβ в условиях тандемной времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией методом MALDI для выявления закономерностей, позволяющих создать быстрый и высокочувствительный физико-химический метод измерения степени изомеризации Аβ.
- Исследование процессов, сопровождающих сокристаллизацию Аβ с MALDI-матрицей и его ионизацию, с целью разработки метода относительного количественного определения уровня изомеризации Аβ с использованием MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрии. Валидация разработанного метода на модельных биологических объектах.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- Впервые продемонстрировано, что масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения позволяет анализировать уровень фосфорилирования Аβ без введения внутренних стандартов и предварительного разделения образца даже при малых относительных концентрациях фосфорилированного Аβ, что невозможно с использованием масс-спектрометрии низкого разрешения.
- Впервые исследованы закономерности фрагментации немодифицированного и изомерного Аβ в условиях высокоэнергетической столкновительной диссоциации и установлено влияние столкновительного газа на эффективность фрагментации Аβ. Выявленные зависимости позволили впервые разработать экспрессный метод анализа степени изомеризации Аβ с низким порогом обнаружения. Показана возможность применения анализа изотопных распределений стабильных изотопов биогенных химических элементов для повышения динамического диапазона измеряемого аналитического сигнала. На основании полученных данных были выбраны оптимальные параметры фрагментации, требуемые для создания экспрессного метода анализа степени изомеризации Аβ с низким порогом обнаружения.
- Показано, что относительная ошибка измерения степени изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в Аβ не зависит от абсолютного значения степени изомеризации и концентрации аналита при анализе с использованием метода MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии, что позволило разработать новый физико-химический метод, совмещающий иммунопреципитацию с тандемной времяпролетной масс-спектрометрией для высокочувствительного определения степени изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в Аβ в биологических образцах. Показано, что различные антитела к Аβ могут значительно различаться в селективности к изомеризации аспарагиновой кислоты, что приводит к значительным отклонениям в результатах количественного анализа нативного Аβ.

Теоретическая и практическая ценность работы. Показанные результаты работы обладают как практической, так и теоретической значимостью в области физической химии, биохимии, молекулярной биологии и аналитической химии. Исследованные физико-химические закономерности процессов ионизации и фрагментации различных форм и ПТМ Аβ позволили разработать методы, представляющие интерес с точки зрения их применения к исследованию патогенеза БА. Также эти закономерности могут быть обобщены с целью переноса разработанных

методик и на другие ПТМ различных белков и пептидов. Разработанный быстрый и чувствительный метод анализа с использованием тандемной времяпролетной масс-спектрометрии открывает возможность для создания медицинских диагностических систем, основанных на использовании степени изомеризации остатков аспарагиновой кислоты в пептидах как биомаркеров патологических состояний организма.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается воспроизводимостью и согласованностью экспериментальных данных между собой.

Апробация работы. Результаты работы представлялись в виде докладов на четырех международных конференциях: 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (4-8 июня 2017, Индианаполис, США); Protein Society 31st Annual Symposium (24-27 июля 2017, Монреаль, Канада); 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (3-7 июня 2018, Сан-Диего, США); Protein Society 32st Annual Symposium (9-12 июля 2018, Бостон, США).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах и тезисы 2 докладов в сборниках материалов международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 138 страниц, включая 18 рисунков, 4 таблицы и 16 приложений. В список литературы включено 226 наименования.

Личный вклад автора. Автор участвовал в постановке целей и задач исследования, проведении масс-спектрометрических экспериментов, обработке и интерпретации результатов. Автор самостоятельно анализировал литературу по теме работы, разрабатывал методику проведения экспериментов с использованием времяпролетного масс-спектрометра и анализировал полученные данные. Совместно с соавторами осуществлялась подготовка публикаций и представление полученных результатов на международных конференциях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** формулируются цель и задачи работы, обосновывается актуальность исследования, обсуждаются научная новизна и практическая значимость результатов работы.

В **главе 1** представлен обзор литературы по теме работы. Проанализирована взаимосвязь Аβ с патогенезом БА. Обобщена информация о роли фосфорилирования в

патогенезе БА. Рассмотрены подходы к исследованию фосфорилирования в белках и пептидах. Детально рассмотрены процесс изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в белках и пептидах и роль изомеризации Аβ в патогенезе БА. Обобщены подходы к исследованию изомерных белков и пептидов и рассмотрены особенности фрагментации пептидов, содержащих β-аспарагиновую кислоту, при помощи различных подходов тандемной масс-спектрометрии. Рассмотрен подход к расчету распределения интенсивностей пиков в изотопном кластере в масс-спектре биомолекул.

В главе 2 описывается разработка метода определения степени фосфорилирования (СФ) бета-амилоида с применением масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Для этого исследуются физико-химические закономерности в процессах, сопровождающих ионизацию и фрагментацию немодифицированного (нАβ) и фосфорилированного (фАβ) пептида в условиях электрораспыления и последующего анализа с применением масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Приводится исследование основных характеристик разработанного метода масс-спектрометрического определения степени фосфорилирования (СФ) Аβ, не требующего предварительного деления образца, и выделяются преимущества масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для анализа СФ Аβ в сравнении с применением масс-анализатора низкого разрешения.

Необходимость разработки экспрессного и чувствительного метода анализа СФ Аβ продиктована сложностью и высокой длительностью существующих подходов к анализу СФ пептидов. Так, хроматографические методы разделения немодифицированных и фосфорилированных пептидов требуют значительных затрат времени – от десятков минут до нескольких часов затрачивается на анализ индивидуального образца. Альтернативные подходы, основанные на изотопном мечении и иммуноферментном анализе, отличаются сложной пробоподготовкой, длящейся от нескольких часов до целых суток. Создание метода анализа СФ Аβ, отличающегося малым, измеряемым минутами временем анализа, осложняется, в свою очередь, несколькими факторами. Во-первых, отсутствие у фосфора стабильных изотопов, кроме ^{31}P , не позволяет доказать присутствие фосфогруппы в анализируемой молекуле методом анализа изотопного кластера в масс-спектре. Во-вторых, согласно литературным данным, существует высокая вероятность отрыва фосфогруппы от пептида в процессе ионизации и фрагментации. Таким образом, для разработки физико-химического метода анализа СФ Аβ необходимо исследование особенностей

поведения фАβ в процессе его ионизации и фрагментации с применением методов масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения и проведение сравнительного исследования возможностей масс-спектрометрии низкого и сверхвысокого разрешения в рамках задачи определения СФ Аβ.

Разработка физико-химического метода оценки СФ Аβ проводилась с использованием синтетических стандартов Аβ(1-16) в немодифицированной и фосфорилированной по остатку серина в 8 положении формах. Выбор данного фрагмента обуславливается тем фактом, что он является распространенной моделью для изучения свойств Аβ, поскольку полностью содержит металлсвязывающий домен пептида. Анализ смесей, содержащих различный процент фАβ, проводился с использованием масс-спектрометра ионного-циклотронного резонанса (ИЦР) с преобразованием Фурье LTQ FT Ultra (Thermo Electron Corp.), оснащенный сверхпроводящим магнитом с напряженностью магнитного поля 7Т и ионным источником IonMax. Для регистрации масс-спектров низкого и сверхвысокого разрешения анализируемые образцы непосредственно вводились в электрораспылительный источник и анализировались с использованием двух масс-анализаторов – линейной ионной ловушки (масс-анализатор низкого разрешения) и ИЦР-ячейки (масс-анализатор высокого разрешения).

Отрицательный заряд, характерный для остатка фосфорной кислоты в пептиде, снижает эффективность ионизации фАβ в режиме образования положительно заряженных ионов. Однако ионизация с образованием отрицательно заряженных ионов оказывается неприменимой к нАβ ввиду очень низкой эффективности его ионизации в подобных условиях. Анализ раствора, содержащего эквимольные концентрации нАβ и фАβ, показал, что отношение интенсивностей (ОИ) пиков положительно заряженных ионов превышает 3:1 (рисунок 1). В связи с тем, что динамический диапазон масс-анализаторов по концентрациям ограничен, в значительной мере снижается чувствительность метода, особенно в случае низкой СФ пептида в смеси. Однако сохраняется возможность разработать физико-химический метод определения СФ Аβ, основанный на построении калибровочной кривой зависимости ОИ от СФ.

Поскольку фосфорилирование остатка серина приводит к увеличению молекулярной массы пептида на 80 Да, появляется возможность различать немодифицированный и фосфорилированный пептиды даже с использованием масс-анализатора низкого разрешения. Однако возможное присутствие в масс-спектре катионизированных ионов $[нАβ+2K+(n-2)H]^{n+}$ будет создавать изобарные наложения к

многократно протонированному иону фАβ вида $[\text{фА}\beta + n\text{H}]^{n+}$ за счет пересечения их изотопных кластеров в спектре, поскольку разница масс соответствующих ионов (без учета заряда) составляет всего 0,2358 Да. Устранение изобарных наложений было бы возможно с применением методов тандемной масс-спектрометрии, однако в масс-спектре фрагментации фАβ наблюдается значительное число пиков соответствующих ионам фрагментов, идентичным фрагментам нАβ, поскольку помимо разрыва полипептидной цепочки молекулярного иона происходит и частичный отрыв фосфогруппы от фАβ. Таким образом, не представляется возможным доподлинно установить происхождение ионов в спектре фрагментации, поэтому для дифференциации ионов немодифицированного и фосфорилированного пептидов необходимо применять масс-спектрометрию сверхвысокого разрешения, что позволяет разрешить пики в изотопных кластерах различных катионизированного и фосфорилированного пептидов. Требуемое для этого разрешение пиков в масс-спектре составляет $R \geq 8700$ для Аβ(1-16), в то время как в условиях проделанных экспериментов было достигнуто разрешение $R = 58\,820$ для ионов Аβ с зарядовым числом $3+$, и $R = 78\,590$ для ионов с зарядовым числом $4+$.

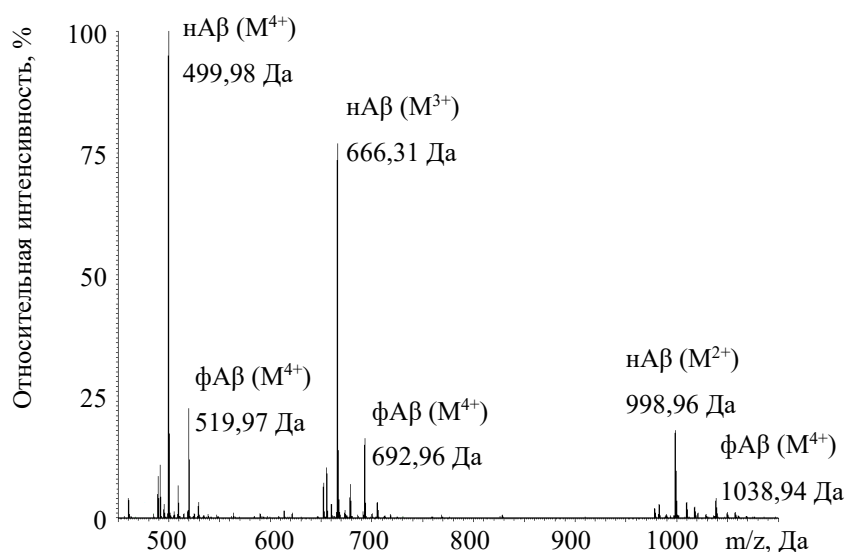


Рисунок 1. Масс-спектр эквимольной смеси нАβ и фАβ. Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с ионизацией электрораспылением.

Построение надежной калибровочной кривой требует анализа стандартных растворов с заранее известной СФ, приготовление которых, в свою очередь, требует подтверждения чистоты используемых синтетических стандартов. Наблюдаемые в масс-спектрах индивидуальных стандартов преимущественно трехкратно и четырехкратно протонированные ионы нАβ и фАβ обладают схожим распределением ОИ. Однако в спектре фАβ присутствуют пики, характерные для нАβ, что

свидетельствует о потере пептидом данной функциональной группы в процессе ионизации, поскольку чистота используемого стандарта дополнительно подтверждалась методом ВЭЖХ-МС. Для подтверждения структуры используемых синтетических пептидов использовался анализ их точной массы, а также их секвенирование при помощи тандемной масс-спектрометрии. Точная молекулярная масса пептидов, измеренная в масс-анализаторе сверхвысокого разрешения, совпала с теоретически рассчитанной с точностью до 2,3 ppm, что подтверждает брутто-формулу анализируемых молекул. В свою очередь, спектры столкновительной диссоциации нАβ и фАβ содержат набор характерных для данного механизма фрагментации, реализуемого в линейной ионной ловушке, а-, b- и y-фрагментов, в том числе образующихся при потере таких нейтральных молекул как вода, либо аммиак, что позволяет подтвердить первичную структуру анализируемых пептидов.

Для построения калибровочных кривых зависимости ОИ от СФ анализировались бинарные растворы, содержащие от 0 до 100% фАβ в диапазоне концентраций суммарного Аβ от 5 нМ до 4 мкМ. Хотя выбранный метод относительного количественного анализа фАβ в бинарной смеси не требует введения внутренних стандартов, они были использованы в двух из пяти проанализированных серий растворов для того, чтобы показать, что абсолютная концентрация пептида не влияет на характер зависимости ОИ от СФ. Причиной отказа от использования внутренних стандартов является снижение точности количественных измерений в случае различия концентрации аналитов и стандартов в смеси более, чем на один порядок, что связано с ограниченностью динамического диапазона по концентрациям у используемых масс-анализаторов. Это особенно важно при анализе смесей с концентрацией менее 50 нМ, приближающихся к пределу обнаружения разрабатываемого метода по концентрации.

Для построения калибровочных кривых использовались пики, соответствующие трехкратно и четырехкратно протонированным ионам нАβ и фАβ, поскольку их интенсивность в спектре в сравнении с другими зарядовыми состояниями являлась максимальной. Форма полученных калибровочных кривых подтверждает предположение, что эффективность ионизации различных форм Аβ постоянна в выбранном диапазоне абсолютных и относительных форм пептида. Сравнение полученных калибровочных кривых (рисунок 2) показывает, что использование масс-анализатора низкого разрешения не позволяет линейно аппроксимировать полученные данные в области низких (менее 30%) относительных концентраций фАβ, в отличие от калибровочных кривых, основанных на данных сверхвысокого разрешения. Это

явление объясняется значительным снижением уровня базовой линии при измерении масс-спектров с использованием ИЦР ПФ, что критически важно для анализа малых долей фАβ в смеси, поскольку наблюдаемая интенсивность соответствующего ему пика в спектрах низкого разрешения оказывается завышенной, нарушая линейность зависимости ОИ от СФ. Таким образом, применение масс-анализатора сверхвысокого разрешения позволяет понизить нижнюю границу применимости метода до уровня 5-10% фАβ в смеси, по сравнению с 25-30% фосфорилированного пептида для масс-спектрометрии низкого разрешения.

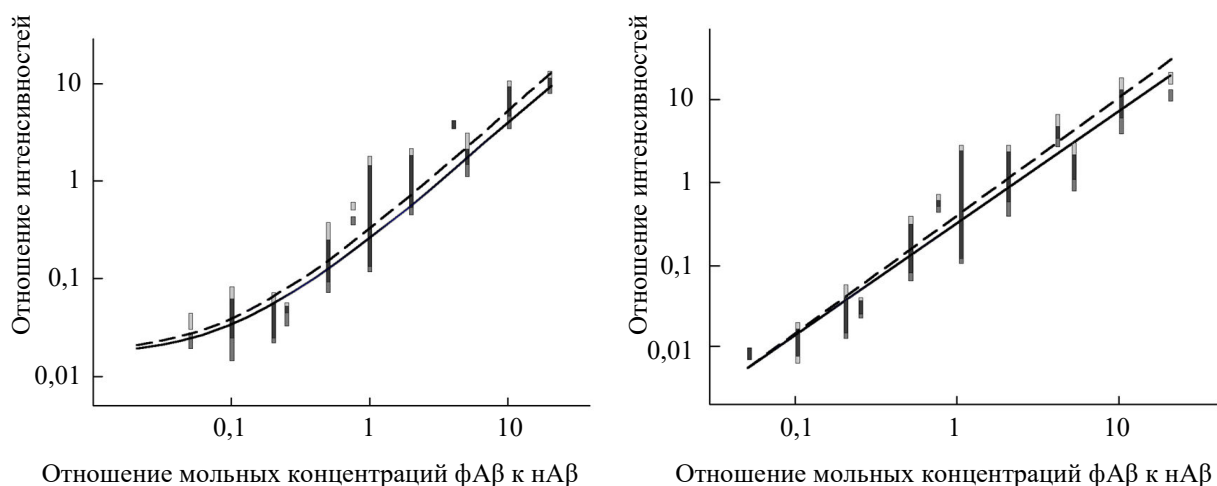


Рисунок 2. Калибровочные кривые для определения степени фосфорилирования Аβ, построенные по данным измерений в низком (*слева*) и сверхвысоком (*справа*) разрешении. Пунктирная и сплошная линии – калибровочные кривые для ионов M^{3+} и M^{4+} , соответственно.

Калибровочные кривые, полученные при анализе данных как низкого, так и высокого разрешения, демонстрируют схожую точность измерения, которая не зависит от абсолютной концентрации Аβ в растворе, что позволяет применить разрабатываемый метод к биологическим образцам, концентрация которых может варьироваться в широких пределах. Оценка предела обнаружения метода требует учитывать и разницу в эффективности ионизации различных форм Аβ. В случае высокой доли фАβ, превышающей 75%, чувствительность метода оказывается равной 10 нМ (общего Аβ) при измерении в низком разрешении и 30 нМ в случае использования сверхвысокого разрешения. При анализе растворов, содержащих менее 35% фАβ, минимальная суммарная концентрация пептидов в анализируемой смеси оказывается на уровне 100-150 нМ при использовании масс-анализатора сверхвысокого разрешения. На основе литературных данных ожидается, что при выделении Аβ из

образцов биологических жидкостей человека концентрация $A\beta(1-16)$ в пробе после проведения необходимой пробоподготовки будет превышать 200 нМ, что теоретически является достаточным уровнем для применения анализа степени фосфорилирования с использованием масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения.

Существенная дисперсия результатов измерения бинарных смесей, приводящая к снижению точности относительного количественного измерения $fA\beta$, обуславливается как необходимостью сканирования интенсивности ионов в широкополосном режиме без проведения изоляции и фрагментации, так и нестабильностью одновременной ионизации двух форм $A\beta$ в электроспрейном источнике. Абсолютная ошибка измерения СФ при помощи разработанного метода находится в диапазоне 10-20%, что делает метод пригодным лишь для оценки СФ, поскольку дает возможность обнаружить только значительные отклонения СФ между различными группами анализируемых образцов (пациентов). При этом точность определения СФ при малых ($<30\%$) значениях СФ достигает 10% при применении масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, в отличие от масс-спектрометрии низкого разрешения, для которой определение СФ в данной области не представляется возможным.

Полученные данные показывают, что эффективность ионизации $nA\beta$ и $fA\beta$, а также вероятность отрыва фосфогруппы от молекулы $fA\beta$, не зависят от абсолютного и относительного количества каждой из форм пептида в анализируемой пробе. Продемонстрировано, что использование тандемной масс-спектрометрии неэффективно для определения СФ $A\beta$ ввиду высокой лабильности фосфогруппы в процессе столкновительной диссоциации. Показано, что масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения позволяет проводить относительный количественный анализ без введения внутренних стандартов даже в условиях образования изобарных аддуктов $nA\beta$ и позволяет определять СФ $A\beta$ в области малых относительных концентраций $fA\beta$, что невозможно с использованием масс-спектрометрии низкого разрешения. Оценена чувствительность разработанного прототипа физико-химического метода определения СФ $A\beta$, которая является достаточной для его применения к биологическим образцам.

В главе 3 описывается исследование особенностей фрагментации бета-амилоида, содержащего остаток изоаспарагиновой кислоты, в условиях MALDI-TOF/TOF-MS. При этом исследуются физико-химические закономерности в процессах фрагментации $nA\beta$ и изомерного по остатку аспарагиновой кислоты в 7 положении

пептида (изоАβ) в условиях тандемной времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией методом MALDI. Рассматриваются особенности спектров фрагментации Аβ в условиях высокоэнергетической столкновительной диссоциации, исследуется влияние природы столкновительного газа на ОИ наблюдаемых в спектре фрагментации фрагментов, обсуждаются различные подходы к интерпретации результатов физико-химического эксперимента.

Адаптация существующих методов к анализу степени изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в 7 положении Аβ (СИ) осложняется низким содержанием аналита в биологических образцах. Методы, применяемые для анализа остатков изоаспарагиновой кислоты в белках и пептидах, отличаются высокой сложностью и длительностью анализа (измеряемой часами) индивидуального образца, либо требуют значительного (единицы и десятки пмоль) количества выделенного и сконцентрированного (десятки и сотни нМ) пептида для анализа. Применение тандемной MALDI-масс-спектрометрии позволяет проводить экспрессный анализ проб, содержащих малое количество аналита. Поскольку данный метод анализа ранее не применялся для решения задачи определения СИ Аβ, необходимо определить особенности фрагментации нАβ и изоАβ, а также исследовать параметры физико-химического эксперимента, влияющие на аналитические характеристики разрабатываемого метода.

Для оценки возможности применения MALDI-масс-спектрометрии к анализу СИ Аβ и исследования физико-химических закономерной фрагментации нАβ и изоАβ в выбранных условиях проводился анализ синтетических стандартов Аβ(1-16) и Аβ(1-42) немодифицированной и изомеризованной по остатку аспарагиновой кислоты в 7 положении форм. Чистота используемых стандартов подтверждалась методом ВЭЖХ-МС и секвенированием их аминокислотной последовательности. Анализ пептидных стандартов проводился с использованием тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtereme (Bruker Daltonik GmbH.), оснащенного Nd:YAG лазером Smartbeam II с длиной волны 355 нм.

MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрия основана на фрагментации при помощи высокоэнергетической столкновительной диссоциации (collision induced dissociation, CID), которая приводит к образованию типичного для CID набора пептидных фрагментов. В данных условиях не происходит типичного для неэргодических процессов разрыва С-С связи, то есть не образуются фрагменты, характерные для пептидов, содержащих остаток изоаспарагиновой кислоты, s_6+57 и z_n-57 (в случае

изоАβ). Однако образуется характерный для CID фрагмент $b_6 + H_2O$, который, в отличие от низкоэнергетической CID, не удастся использовать как уникальный для изоАβ фрагмент, поскольку аналогичный фрагмент обнаруживается и в спектре фрагментации нАβ, где он образуется за счет более высокой кинетической энергии родительских ионов в сравнении с низкоэнергетической CID. В то же время, несмотря на практически идентичную карту фрагментов, идентифицируемых для нАβ и изоАβ, можно заметить, что паттерны фрагментации (относительные интенсивности фрагментов в спектре) различны между этими формами, что позволяет выделить ионы, чьи относительные интенсивности в спектрах значительно отличаются для немодифицированной и изомеризованной форм пептида (рисунок 3).

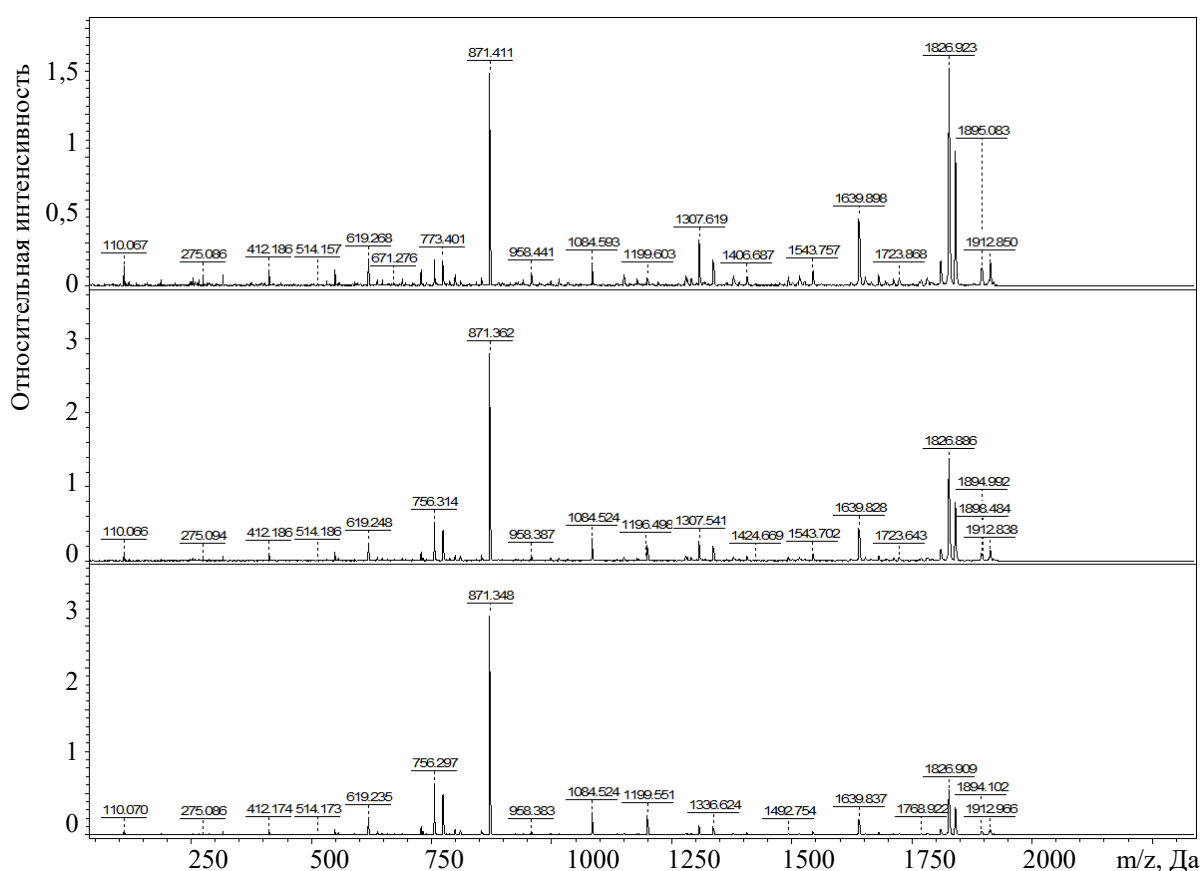


Рисунок 3. Масс-спектры фрагментации нАβ (*сверху*), изоАβ (*снизу*) и их эквимольной смеси (*посередине*). MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрия с использованием аргона в качестве столкновительного газа. Фрагмент Аβ(1-16).

Анализ характера зависимости относительных интенсивностей в спектрах фрагментации нАβ(1-16) и изоАβ(1-16) продемонстрировал, что природа газа, используемого в качестве столкновительного в процессе CID не оказывает влияния на качественную картину фрагментации Аβ. Однако эффективность фрагментации, оцениваемая как отношение сигнал/шум в спектрах, полученных при прочих

идентичных условиях, зависит, в первую очередь, от отношения массы молекулы к эффективной площади её сечения, поскольку эффективность фрагментации растет в ряду газов N₂, He, Ar (отношение массы к сечению которых составляет 888, 1333 и 2219 а.е.м./нм², соответственно). Вероятность столкновения, обуславливаемая только эффективной площадью сечения молекулы газа, оказывает существенно меньший эффект, поскольку эффективная площадь сечения увеличивается в ряду He, Ar, N₂ (0,003, 0,018 и 0,032 нм², соответственно).

Для построения калибровочных кривых, требующихся для определения СИ Аβ, необходимо установить закономерности в изменении ОИ ионов фрагментов в нАβ и изоАβ. Исходя из предположения, что вероятность разрыва связи, удаленной от изомеризованного остатка аспарагиновой кислоты, не отличается от таковой в немодифицированном пептиде, было определено, что ОИ ионов, формирующихся при разрыве окружающих остаток β-аспарагиновой кислоты связей, оказывается существенно выше, чем для аналогичных фрагментов, образующихся при разрыве связей вокруг α-аспарагиновой кислоты в немодифицированном пептиде (таблица 1). Возможной причиной данного явления является затруднение перераспределения энергии через находящуюся в основной цепочке полипептида С-С связь остатка изоаспарагиновой кислоты во время эргодического процесса фрагментации.

Таблица 1. Поведение ионов, наблюдаемых в спектрах фрагментации нАβ и изоАβ (фрагмент 1-16), образующихся при разрыве связи удаленной либо близкорасположенной к сайту изомеризации в пептиде. В скобках указана усредненная кратность изменения относительной интенсивности пика, полученная при нормировке спектра на интенсивность ионов у₃, b₁₁-NH₃ или b₁₅.

m/z, Да	Фрагмент пептида	Изменение относительной интенсивности пика с увеличением доли изоАβ в смеси от 0% до 100%		
		He	N ₂	Ar
316,1	b ₃	Незначительно увеличивается (1,1)	He изменяется	Незначительно увеличивается (1,2)
756,3	b ₆	Увеличивается (9,4)	Увеличивается (9,1)	Увеличивается (7,7)
871,4	b ₇	Увеличивается (5,1)	Увеличивается (5,0)	Увеличивается (5,0)
1199,5	y ₁₀	Увеличивается (6,2)	Увеличивается (8,0)	Увеличивается (7,6)

Особый интерес в анализе СИ Аβ представляет ион b_6+H_2O , в условиях низкоэнергетической CID образующийся исключительно при фрагментации изоАβ. В случае тандемной времяпролетной масс-спектрометрии данный фрагмент также образуется из нАβ, хотя и в меньшей степени, чем из изоАβ. Построение калибровочной кривой с участием фрагмента b_6+H_2O осложняется наложением на него изотопного кластера иона c_6 , который образуется в условиях высокоэнергетической CID (рисунок 4).

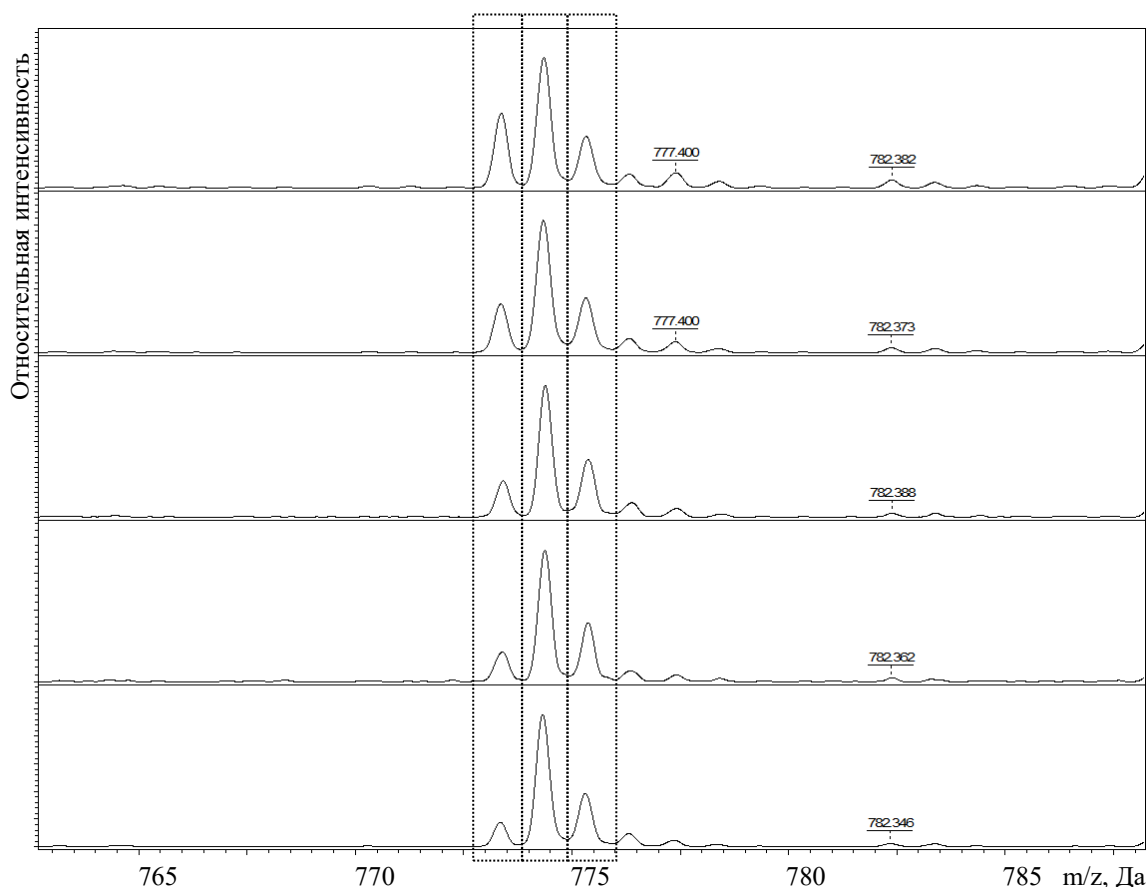


Рисунок 4. Масс-спектры фрагментации Аβ(1-16) с различной степенью изомеризации остатка аспарагиновой кислоты: 0%, 20%, 40%, 60%, 100% (последовательно сверху вниз). MALDI-TOF/TOF с использованием аргона в качестве столкновительного газа. Рамкой выделены пики m/z 773,4 Да, 774,4 Да и 775,4 Да, соответственно.

Для учета вклада изотопного кластера иона c_6 (m/z 773.37 Да) в наблюдаемый сигнал иона b_6+H_2O (m/z 774.33 Да) был применен основанный на расчете изотопных распределений стабильных изотопов метод определения вклада каждого из ионов в суммарную интенсивность наблюдаемого пика. Таким образом, истинная интенсивность сигнала иона b_6+H_2O была рассчитана по формуле:

$$I(b_6+H_2O) = I_{774.3} - 0.421 \cdot I_{773.4}$$

Проверка корректности подобных расчетов проводилась с использованием последующих ионов в изотопном кластере:

$$0,418 * I(b_6+H_2O) = I_{775.3} - 0.109 * I_{773.4}$$

Погрешность измерения не превысила 5%, что подтвердило возможность применения метода коррекции интенсивности сигнала на основе данных о распределении стабильных изотопов в анализируемых ионах. Было показано, что изменение интенсивности иона b_6+H_2O , нормированной на сигнал иона b_3 , при переходе от нАβ к изоАβ составило от 16.1 до 18.2, в зависимости от используемого столкновительного газа, что почти вдвое превышает аналогичное значение, полученное для ионов, анализ которых не требует внесения корректировок с применением расчетов изотопных распределений.

В результате проведенной работы было продемонстрировано, что в условиях физико-химического эксперимента с применением MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрии возможно выделение характеристических ионов, позволяющих реализовать простой и экспрессный метод анализа СИ Аβ. В рамках проведенного эксперимента были проанализированы образцы, содержащие всего 2,5 пмоль Аβ, а наблюдаемое в спектрах S/N для выбранных ионов оказалось достаточно велико – более 100, что означает потенциально низкий порог обнаружения у данного метода.

Особенности тандемной времяпролетной масс-спектрометрии позволяют эффективно фрагментировать только относительно короткие пептиды, поскольку высокоэнергетическая CID больших молекул приводит к образованию разнообразных фрагментов с большим разбросом ионов по энергии. Многократные наложения изотопных кластеров различных фрагментов друг на друга вкупе с постфрагментацией приводят к существенному повышению отношения сигнал/шум в спектре фрагментации. Поэтому оценка применимости MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрии к анализу полноразмерного Аβ требует проведения дополнительных исследований. Аналогично фрагменту Аβ(1-16) были выполнены эксперименты с полноразмерной формой Аβ(1-42), при этом в спектре фрагментации полноразмерной формы было идентифицировано значительно меньше фрагментов. Как и в случае с фрагментом Аβ(1-16), относительные интенсивности ионов b_7 и y_{35} , которые образуются при разрыве прилежащей к остатку β-аспарагиновой кислоты связи, растут при переходе от нАβ к изоАβ. Однако было обнаружено, что интенсивность фрагмента b_{23} при этом несколько уменьшается. Влияние природы газа, использованного в качестве столкновительного в процессе фрагментации, оказалось сходным с обнаруженным для

A β (1-16). Предполагаемая чувствительность метода анализа СИ A β (1-42) ожидается ниже, нежели чем для формы A β (1-16), поскольку отношение сигнал/шум в спектрах фрагментации для наиболее интенсивных пиков оказалось равным в среднем 40, при том, что анализировалось в каждом эксперименте 50 пмоль пептида.

Полученные результаты демонстрируют, что, несмотря на отсутствие фрагментов, характеризующих только одну изоформу A β , обнаруженные закономерности фрагментации нA β и изоA β позволяют выбрать такие пары ионов, чье поведение в спектрах фрагментации позволяет разработать физико-химический метод анализа СИ A β на основе MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрии. Продемонстрирована возможность достижения низких порогов обнаружения в сочетании с высокой экспрессностью и простотой реализации метода.

Глава 4 посвящена разработке метода определения степени изомеризации бета-амилоида с применением тандемной времяпролетной масс-спектрометрии. Для этого исследовались физико-химические процессы, сопровождающие кристаллизацию и ионизацию A β , которые могут влиять на точность и чувствительность метода относительного количественного определения уровня изомеризации A β с использованием MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрии. Описывается создание физико-химического метода определения СИ A β , оцениваются его аналитические характеристики и проводится валидация разработанного метода с помощью модельных биологических образцов.

Повышение чувствительности разрабатываемого метода исследования СИ A β требует оптимизации процесса нанесения анализируемой пробы на MALDI-мишень. Для этого было предложено совместить процесс нанесения образца на мишень с его концентрированием. При этом встает вопрос о влиянии процесса олигомеризации молекул A β в процессе их сокристаллизации с MALDI-матрицей на результаты проводимого анализа, поскольку возникающие олигомеры в смеси, содержащей одновременно нA β и изоA β , могут отличаться по своему составу в зависимости от СИ A β так же, как и эффективность ионизации кристаллов различного состава может, в свою очередь, различаться.

Для определения применимости метода к анализу биологических образцов необходимо провести модельные эксперименты, демонстрирующие возможности разрабатываемого физико-химического метода исследования. Для валидации возможностей метода необходимо применение двух типов моделей: синтетической — содержащей A β с известной СИ в модельном объекте, приближенном по свойствам к

биологическому образцу, и натуральной — представляющей собой биологический образец, содержащий нативный Аβ в естественной концентрации. В качестве синтетической модели была использована смесь, имитирующая цереброспинальную жидкость, в которую вносились добавки синтетического Аβ с известной СИ. В качестве натуральной модели использован мозг трансгенной мыши, продуцирующий человеческую форму Аβ.

Для создания методики определения степени изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в 7 положении полноразмерной формы Аβ(1-42), как и в случае описанного во второй главе определения степени фосфорилирования остатка серина, было предложено воспользоваться методом построения калибровочных кривых на основе анализа смесей синтетических пептидных стандартов. Для этого было проанализировано 4 серии растворов синтетических стандартов смесей нАβ и изоАβ, содержащих от 0 до 100% изомеризованной формы пептида; при этом диапазон абсолютных концентраций варьировался в диапазоне от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл. Для снижения порога обнаружения разрабатываемого метода дополнительно применялась концентрация аналита непосредственно в момент нанесения анализируемого раствора на MALDI-мишень. Для этого использовалась специальная мишень, покрытая гидрофобным составом, в котором были оставлены отверстия, образующие гидрофильные точки, диаметром 800 мкм, на которых в процессе испарения растворителя и происходила концентрация аналита. Дальнейший анализ проводился с использованием тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtereme (Bruker Daltonik GmbH.), оснащенного Nd:YAG лазером Smartbeam II с длиной волны 355 нм, на котором была выполнена предыдущая часть исследования.

Распространенным подходом в работе с Аβ является пробоподготовка в условиях высоких ($\text{pH} > 10$) либо низких ($\text{pH} < 4$) значений кислотности среды, что позволяет избежать олигомеризации отдельных молекул Аβ. Пробоподготовка для анализа пептидных смесей методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии, особенно в условиях дополнительного концентрирования образца на мишени, требует соблюдения pH раствора, близкого к нейтральному для обеспечения оптимальной сокристаллизации пептидов с MALDI-матрицей. Тем не менее, отсутствие каких-либо олигомеров в масс-спектрах полноразмерного Аβ во всем диапазоне исследуемых концентраций свидетельствует о том, что процесс олигомеризации не оказывает влияния на разрабатываемый физико-химический метод анализа. Олигомеры, вероятно образующиеся при кристаллизации Аβ на MALDI-мишени, разрушаются в процессе

анализа, что было подтверждено экспериментом с участием ионов цинка, вызывающих димеризацию и олигомеризацию Аβ.

На основании ранее выявленных закономерностей фрагментации нАβ и изоАβ была построена калибровочная кривая, основанная на отношении интенсивностей ионов b_7^+ и b_{23}^+ , обеспечивающая наибольший динамический диапазон по сравнению с другими комбинациями интенсивных ионов в спектре (рисунок 5). Полученная калибровочная кривая не может быть аппроксимирована линейным уравнением, поскольку она описывается отношением двух линейных функций, характеризующих вероятность образования каждого из фрагментов, где x – мольная доля изоформы Аβ в образце, коэффициенты A и a определяют зависимость интенсивности сигнала фрагмента b_7^+ в спектре фрагментации от мольной доли изоАβ в образце, а коэффициенты B и b определяют зависимость интенсивности сигнала фрагмента b_{23}^+ в спектре фрагментации от мольной доли изоАβ в образце:

$$I(b_7^+) / I(b_{23}^+) = (Ax + a) / (Bx + b)$$

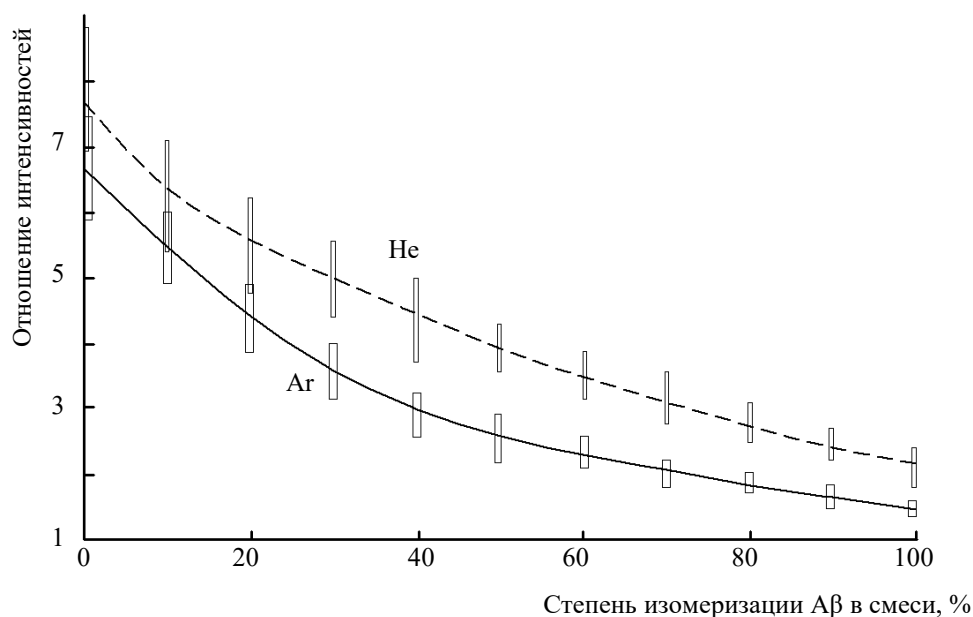


Рисунок 5. Калибровочные кривые для определения степени изомеризации полноразмерного Аβ(1-42), построенные по отношению интенсивности ионов b_7 к b_{23} .

Низкая эффективность фрагментации полноразмерного Аβ приводит к большой ошибке определения СИ Аβ, достигающей в результате $\pm 14\%$. Однако данная величина абсолютной ошибки характерна для всего диапазона как относительных, так и абсолютных концентраций форм пептида в образце. Таким образом, показано, что

накопление сигнала в процессе анализа за счет большого числа импульсов и изменения положения мишени во время анализа позволяет считать незначительными эффекты неравномерной сокристаллизации $\text{нА}\beta$ и $\text{изоА}\beta$ с матрицей, равно как и их неидентичной эффективности ионизации и фрагментации. Порог обнаружения метода оценивался по убыванию отношения сигнал-шум пиков, соответствующих фрагментам b_7 и b_{23} по отношению к абсолютному количеству пептида, нанесенному на мишень, и составил в результате 2 пмоль.

Возможность применения разработанного физико-химического метода к анализу биологических образцов проверялась путем анализа модельных объектов — искусственной цереброспинальной жидкости и образца ткани мозга трансгенной мыши. В образцы искусственной цереброспинальной жидкости вносился $\text{А}\beta$ в концентрации 10 нг/мл с известной СИ для каждого образца. Каждый образец подвергался иммунопреципитации с последующим физико-химическим анализом при помощи разработанного MALDI-TOF/TOF-MS метода. Результаты анализа $\text{А}\beta$, выделенного из искусственной цереброспинальной жидкости полностью соответствовали исходному соотношению концентраций $\text{нА}\beta$ и $\text{изоА}\beta$ в образце в пределах точности измерения метода. При этом было отмечено, что высокая специфичность антител 6E10 к $\text{нА}\beta$ не позволяет им выделять достаточное количество $\text{изоА}\beta$ из биологического образца, что приводит как к искажениям результатов исследования СИ $\text{А}\beta$, так и к недооценке общего содержания $\text{А}\beta$ в пробе. Эксперимент с мозгом трансгенной мыши, экспрессирующей человеческую форму белка предшественника амилоида и, соответственно, накапливающей человеческую форму $\text{А}\beta$ в мозгу, показал, что чувствительности разработанного IP-MALDI-TOF/TOF-MS метода достаточно для определения СИ $\text{А}\beta$ в биологических образцах.

В связи с низкой точностью определения СИ полноразмерного $\text{А}\beta$ было предложено применить аналогичный метод к более короткому фрагменту $\text{А}\beta(1-16)$, который может быть легко получен из полноразмерного пептида ферментативным гидролизом с использованием сериновой протеазы Lys-C. Поскольку выделение только одной формы бета-амилоида как, например $\text{А}\beta(1-42)$, из биологического образца затруднительно, комбинирование протеолиза с дальнейшим анализом методом MALDI-TOF/TOF позволит проводить измерение общей степени изомеризации всех форм $\text{А}\beta$ в образце. Аналогично анализу полноразмерного $\text{А}\beta$, для построения калибровочных кривых проводился анализ 5 серий растворов $\text{А}\beta(1-16)$, содержащих от 0% до 100% $\text{изоА}\beta$ с суммарной концентрацией пептида от 100 нг/мл до 100 мкг/мл.

На основании ранее определенных закономерностей фрагментации $A\beta(1-16)$ были выбраны пары ионов, позволяющие построить калибровочные кривые ОИ от СФ с наибольшим динамическим диапазоном (рисунок 6). Использование фрагмента b_6+H_2O , интенсивность которого была скорректирована с использованием метода, основанного на расчете изотопных соотношений в пиках фрагментов, оказалось неэффективным ввиду достаточной высокой (более 5% абс.) ошибки измерения, особенно при приближении к нижнему порогу определяемых абсолютных концентраций. Среди других рассматриваемых ионов пара ионов y_{10} и y_{11} демонстрирует наименьшую абсолютную погрешность измерения, равную $\pm 3.2\%$, и, хотя и уступает паре ионов b_6 и b_{11}^+ в динамическом диапазоне ОИ, обеспечивает вдвое большую абсолютную точность измерения. Для выбранной пары ионов было показано, что выбор газа для осуществления CID не оказывает влияния на форму калибровочной кривой и точность определения метода.

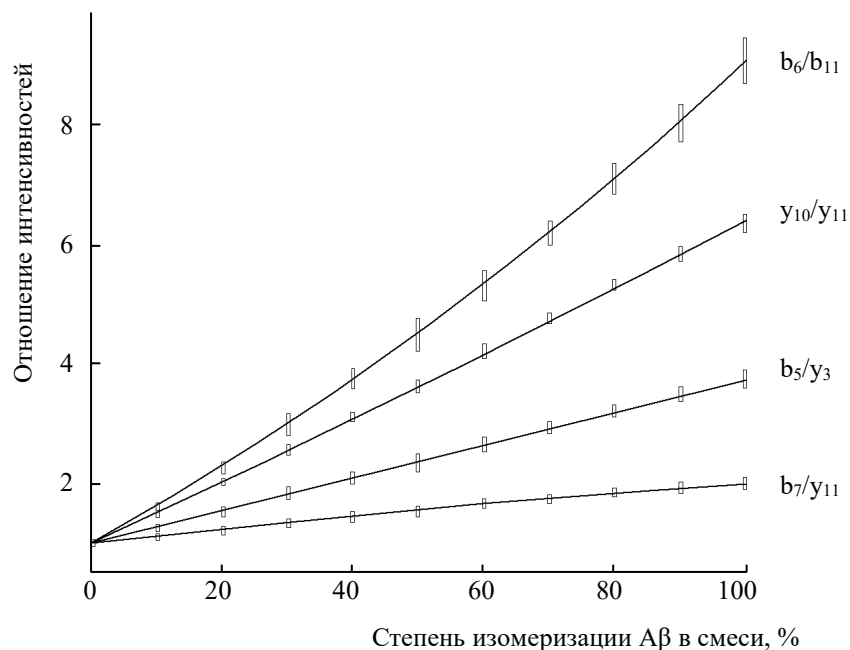


Рисунок 6. Калибровочные кривые для определения степени изомеризации фрагмента $A\beta(1-16)$. Фрагментация с использованием аргона в качестве столкновительного газа.

Кривые отнормированы на минимальные значения для удобства отображения.

Как и для полноразмерного $A\beta$, точность проведения измерений не зависит от абсолютной и относительной концентраций изоформ $A\beta$ в анализируемом образце. Порог обнаружения метода, также оцениваемый по соотношению сигнал-шум у использованных для анализа пиков, составил 50 фмоль $A\beta$. Данный метод оценки общей СИ $A\beta$ в образце проверялся путем анализа смесей полноразмерных $hA\beta$ и

изоАβ, подвергнутых протеолизу с использованием протеазы Lys-C. При этом, однако, было обнаружено снижение точности измерения, которая составила $\pm 7\%$ (абс.). Для дальнейшего повышения точности требуется оптимизация условий гидролиза, поскольку исходно выбранные условия его проведения могут способствовать протеканию реакции сукцинимидной перегруппировки, приводящей к нарушению исходного соотношения остатков α- и β-аспарагиновой кислоты.

Полученные данные демонстрируют, что различия в эффективности ионизации нАβ и изоАβ, равно как и возможность их неравномерной олигомеризации и сокристаллизации с матрицей, не влияют на точность разработанного физико-химического метода анализа во всем диапазоне исследованных концентраций, что позволяет применять данный метод к анализу СИ Аβ в биологических образцах. Разработанный физико-химический метода анализа, основанный на иммунопреципитации с последующим MALDI-TOF/TOF-MS анализом, проверен с использованием модельных объектов. При этом обнаружено, что антитела 6E10 отличаются высокой селективностью по отношению к немодифицированной форме Аβ, что значительным образом влияет на результаты количественного анализа Аβ в случае их использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Впервые показано, что за счет применения масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения без использования внутренних стандартов и предварительного разделения образца становится возможным более чем вдвое снизить порог определения уровня фосфорилирования A β в сравнении с анализом на основе масс-спектрометрии низкого разрешения.
- Впервые продемонстрирована возможность применения тандемной времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией MALDI для определения степени изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в A β . На основании изучения механизмов фрагментации A β предложен метод быстрого количественного определения степени изомеризации аспарагиновой кислоты в A β .
- Продemonстрировано, что использование различных газов для инициирования столкновительной диссоциации ионов A β не оказывает существенного влияния на точность и чувствительность метода. Показано, что в условиях высокоэнергетической столкновительной диссоциации ионов A β , помимо фрагментов, характерных для эргодических методов фрагментации, образуются и ионы, характерные для неэргодических методов фрагментации.
- Продemonстрировано, что применение расчетов на основе анализа изотопных распределений стабильных изотопов позволяет учитывать изобарные наложения различных ионов в условиях MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии.
- Показано, что относительная ошибка измерения степени изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в A β не зависит от абсолютного значения степени изомеризации и концентрации аналита при анализе с использованием метода MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии, что позволило совместить данный метод анализа с иммунопреципитацией A β для высокоселективного выделения A β из биологических образцов.
- При помощи разработанного комбинированного метода на основе иммунопреципитации и детектирования при помощи MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии показано, что различные антитела к A β могут значительно различаться в селективности к изомеризации аспарагиновой кислоты, и это приводит к значительным отклонениям в количественном определении A β в биологическом образце в присутствии изомеризованной формы пептида.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Popov, I. A.; Indeikina, M. I.; **Pekov, S. I.**; Starodubtseva, N. L.; Kononikhin, A. S.; Nikolaeva, M. I.; Kukaev, E. N.; Kostyukevich, Y. I.; Kozin, S. A.; Makarov, A. A.; Nikolaev E. N. Estimation of Phosphorylation Level of Amyloid-Beta Isolated from Human Blood Plasma: Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry // Mol. Biol. 2014. Vol. 48, № 4. P. 607–614.
2. **Pekov, S.**; Indeykina, M.; Popov, I.; Kononikhin, A.; Bocharov, K.; Kozin, S. A.; Makarov, A. A.; Nikolaev, E. Application of MALDI-TOF/TOF-MS for Relative Quantitation of α - and β -Asp7 Isoforms of Amyloid- β Peptide // Eur. J. Mass Spectrom. 2018. Vol. 24, № 1. P. 141–144.
3. **Pekov, S.**; Ivanov, D.; Bugrova, A.; Indeykina, M.; Zakharova, N.; Popov, I.; Kononikhin, A.; Kozin, S.; Makarov, A.; Nikolaev, E. Evaluation of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry approach for quantitative determination of aspartate residue isomerization in the amyloid- β peptide // J. Am. Soc. Mass Spec. 2019. Vol. 30, № 7. P. 1325–1329.
4. Popov, I.; **Pekov, S.**; Indeykina, M.; Kononikhin, A.; Levin, R.; Khaliullin, I.; Nikolaev, E. Improvement Relative Quantitation of the A- and - Aspartic Acid Isoform of Amyloid- β Peptide Using MALDI-CID-TOF/TOF MS // Protein Sci. 2017. Vol. 26, № S1. P. 208–209.
5. Popov, I.; Kugaevskaya, E.; Veselovsky, A.; Indeykina, M.; Solovyeva, N.; Zharkova, M.; **Pekov, S.**; Zubtsov, D.; Nikolaev, E.; Mantsyzov, A.; Makarov, A.; Kozin S. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Investigation of Specific Proteolysis of Amyloid-B Peptide by Angiotensin-Converting Enzyme and Its Role on Alzheimer's Disease Pathogenesis // Protein Sci. 2018. Vol. 27. P. 91–92.

ПЕКОВ СТАНИСЛАВ ИГОРЕВИЧ

ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ НОВЫХ МЕТОДОВ БЫСТРОГО
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОФОРМ БЕТА-АМИЛОИДА ЧЕЛОВЕКА
НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ И
ТАНДЕМНОЙ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Подписано в печать 22.10.2020. Формат 60х90 $\frac{1}{16}$. Усл. печ. л. 1.5. Тираж 50 экз. Заказ № 18059. Печать трафаретная. Типография «11-й ФОРМАТ». ИНН 7726330900. 115230, Москва, Варшавское ш., 36.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”

141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9.