

ФОТОДИССОЦИАЦИЯ ПЕПТИДОВ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МОДЕЛЬ МОБИЛЬНОГО ПРОТОНА

Е. М. Соловьева^{a*}, *А. Ю. Переверзев*^b, *М. В. Горшков*^a, *О. В. Бояркин*^b

^a *Институт энергетических проблем химической физики им. В. Л. Тальрозе
Федерального исследовательского центра химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук
119991, Москва, Россия*

^b *Laboratoire de Chimie Physique Moléculaire, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Station-6
1015, Lausanne, Switzerland*

Поступила в редакцию 2 сентября 2019 г.,
после переработки 24 октября 2019 г.
Принята к публикации 29 октября 2019 г.

Обсуждаются возможные механизмы фотодиссоциации ионов пептидов под воздействием лазерного излучения УФ-диапазона с длиной волны 193 нм, а также влияние протона, участвующего в ионизации, на получаемые масс-спектры. Показано, что замещение ионизирующего протона на катионы щелочного металла (натрия) приводит к значительному изменению спектров фотофрагментации пептидов. Полученные экспериментальные данные демонстрируют возможность качественного описания процесса фотодиссоциации пептидов ультрафиолетовым излучением в рамках обсуждаемой в литературе модели мобильного протона, используемой для объяснения процесса столкновительной диссоциации ионов пептидов. Полученные результаты могут использоваться для оптимизации условий анализа смесей пептидов методами тандемной масс-спектрометрии, а также предсказания спектров фрагментации пептидов с известными аминокислотными последовательностями в задачах идентификации белков.

DOI: 10.31857/S0044451020040185

1. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день значительное число биологических и медицинских исследований связано с изучением белков клеток живых организмов [1, 2]. Основным методом качественного и количественного анализа белков является тандемная масс-спектрометрия. В данном подходе белки сначала подвергаются ферментативному гидролизу для получения смеси пептидов (частей белков примерно до 30 аминокислотных остатков), затем происходит их разделение с использованием жидкостной хроматографии. После этого пептиды ионизируются и поступают в масс-спектрометр. Идентификация компонент смеси осуществляется на основе масс-спектров фрагментов их ионов [3, 4]. Поскольку количество потенциальных комбинаций двадцати природных аминокислот очень высоко, а массы резуль-

тирующих молекул могут совпадать, идентификация пептидов исключительно на основе точной массы исходного иона невозможна. Использование тандемной масс-спектрометрии позволяет восстановить точную аминокислотную последовательность изучаемой молекулы на основе масс ее фрагментов [5, 6].

Таким образом, диссоциация пептидов является критически важным этапом успешного анализа сложных биологических смесей. При этом понимание фундаментальных механизмов протекания реакции диссоциации позволяет не только оптимизировать экспериментальные условия проведения анализа [7, 8], но и решить проблему с предсказанием относительных интенсивностей фрагментов в масс-спектрах, что, в свою очередь, может быть использовано для повышения достоверности идентификации белков [9].

Существует несколько способов фрагментации, которые приводят к разрыву различных связей в пептидной цепи (рис. 1) [10, 11]. Наиболее распространенным методом является диссоциация, активи-

* E-mail: lisavetasol@gmail.com



Рис. 1. Номенклатура фрагментов, получающихся при разрыве полипептидной цепи

рованная соударением (ДАС), которая происходит при столкновении ионов с молекулами газа (аргона, гелия или азота) [12, 13]. В этом методе разрыв связи происходит преимущественно между карбонильной и амидной группами пептидной цепи с образованием так называемых *b*- и *y*-фрагментов [14]. Энергия, полученная молекулой при соударениях, достаточно быстро перераспределяется между колебательными степенями свободы, тем самым значительно понижая энергию, приходящуюся на ту или иную связь. Таким образом, необходима обратная передача энергии с так называемых активных степеней свободы, что в случае молекул с большим числом связей является статистически маловероятным процессом [15].

Для объяснения нехватки энергии для разрыва связей была предложена концепция так называемого «мобильного протона», которая заключается в непрерывной миграции протона, участвующего в ионизации молекулы, по цепи пептидных связей [16]. Наличие такого протона значительно понижает энергетический барьер разрыва связи за счет образования переходного комплекса с протонированным атомом азота амидной группы пептидной цепи [17]. Данная модель имеет множество как экспериментальных, так и теоретических подтверждений. Например, было показано, что наличие в последовательности основных аминокислотных остатков (гистидин, лизин, аргинин) приводит к повышению пороговой энергии фрагментации пептидов [18]. Кроме того, экспериментально продемонстрирован внутримолекулярный перенос дейтерия в процессе фрагментации пептида [19]. Также рассчитанные по теории Райса – Рамспергера – Касселя – Маркуса (РРKM) энергетические барьеры реакций переноса протона на азот и кислород пептидной связи оказываются значительно ниже пороговой энергии фрагментации, что подтверждает возможность миграции протона до разрыва связи [20].

Несмотря на широкую применимость метода ДАС, он обладает рядом недостатков. В первую очередь, это ограниченная информативность масс-спектров, поскольку в них доминируют

исключительно *b*- и *y*-фрагменты и, кроме того, потеря функциональных нековалентно связанных или слабосвязанных групп в процессе фрагментации, а также зависимость эффективности фрагментации от массы анализируемого соединения [7, 21]. Использование альтернативных комплементарных методов фрагментации позволяет решить многие из перечисленных выше проблем ДАС [22]. Одним из таких методов является активно развиваемая в последние годы фотодиссоциация пептидов УФ-излучением (ФДУФ) [23–28].

Основным преимуществом ФДУФ является получение широкого набора ионов фрагментов пептидов, включая фрагменты *a*-, *b*-, *c*-, *x*-, *y*- и *z*-серий, а также иммониевых и *v/w*-фрагментов, ассоциированных с разрывом связей в боковых цепях аминокислотных остатков (см. рис. 1) [26]. Получаемая при этом высокая информативность масс-спектров фрагментации позволяет достоверно различать изомерные аминокислотные остатки в последовательностях за счет появления специфических ионов фрагментов [26, 29, 30], а также устанавливать наличие упомянутых выше слабосвязанных химических групп [31]. Кроме того, было показано, что ФДУФ является эффективным методом диссоциации не только относительно небольших ионов пептидов, но и ионов целых белков, масса которых может достигать десятков тысяч дальтон [32–34].

Тем не менее, несмотря на перечисленные выше преимущества и достаточно широкое практическое применение, достоверный механизм ФДУФ на сегодняшний день не установлен. В общем случае поглощение фотона приводит к возбуждению молекулы и ее переходу в более высокое электронное состояние (в случае возбуждения пептидной группы наблюдается $\pi-\pi^*$ -переход [35]). Далее, как правило, рассматриваются два возможных механизма диссоциации — быстрый, т. е. прямое пересечение возбужденного терма с диссоциативным, и медленный, протекающий с передачей энергии из возбужденного электронного состояния на колебательные уровни основного электронного состояния с последующим разрывом связи за счет избытка энергии [36].

Для реализации медленного механизма также существуют два варианта — после релаксации системы в основное электронное состояние энергия может перераспределиться статистически по многим колебательным модам (intramolecular vibrational redistribution, IVR [37]) или же остаться в большей степени в колебательных модах возбужденных связей. В пользу первого механизма говорят скорости, рассчитанные ранее с использованием теории

РРКМ [38] и теории квазистационарного состояния [39–42]. Ряд авторов выступают в поддержку второго механизма, демонстрируя нарушение изотопного распределения в группах ионов α -фрагментов, тем самым подтверждая теорию радикального разрыва [43]. Кроме того, в экспериментах с пептидами, содержащими ароматические аминокислотные остатки, было показано, что разрыв связей по обе стороны от возбуждаемого хромофора является доминирующей реакцией [44]. Поскольку существуют доказательства в поддержку как одной теории, так и другой, было выдвинуто предположение, что фотофрагментация пептидов является комбинацией различных процессов [36].

Таким образом, в силу сложности процесса фотофрагментации макромолекул, строгий теоретический расчет скоростей реакции фрагментации практически не представляется возможным. Однако качественная зависимость интенсивностей спектров фрагментов от аминокислотной последовательности может в значительной степени помочь в вопросах подбора оптимальных условий и объяснения получаемых спектров. Модель мобильного протона является удобной для практического применения и повсеместно используется для объяснения экспериментально наблюдаемых спектров ДАС. Однако на сегодняшний день остается невыясненным вопрос о том, проходит ли реакция фотофрагментации через состояние промежуточного комплекса с переходом ионизирующего протона на атомы пептидной цепи (как это предполагается в модели мобильного протона) или же поглощенной энергии достаточно для разрыва связи без реорганизации молекулы.

В данной работе рассматривается механизм ФДУФ на примере модельного пептида и его комплексов с ионами натрия. Полученные экспериментальные данные демонстрируют необходимость наличия протона для прохождения реакции фрагментации и тем самым свидетельствуют в пользу применимости модели мобильного протона для объяснения масс-спектров ФДУФ пептидов. Более того, сравнение полученных спектров с литературными данными демонстрирует схожесть механизмов образования ионов фрагментов в методах ДАС и ФДУФ.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования зависимости спектров фотофрагментации от присутствия ионизирующего

протона был синтезирован модельный пептид с последовательностью PAATAAGSLGSLK. Далее, сухой пептид был растворен до концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л в равной смеси воды и ацетонитрила с добавлением 1% муравьиной кислоты. Для получения соединений пептидов с натрием в раствор добавлялся иодид натрия. Ионы пептидов образовывались методом электрораспыления (electrospray ionization, ESI) [45] при напряжении 2.5 кВ в источнике ионизации при атмосферном давлении. Исходные ионы пептидов изолировались квадрупольным масс-фильтром, после прохождения которого накапливались и удерживались в криогенной ионной ловушке, где происходило их охлаждение до колебательных температур порядка 10–15 К в результате столкновений с ультрахолодными атомами гелия (7 К).

После охлаждения ионы подвергались воздействию импульсного лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 193$ нм оптического параметрического осциллятора (ОРО, EKSPILA, Vilnius, Lithuania) с длительностью импульсов 5 нс, частотой их следования 10 Гц и энергией 0.5–5 мДж. После задержки 10–40 мс ион-предшественник и его фрагменты транспортировались в масс-анализатор высокого разрешения с орбитальной ловушкой типа Orbitrap (Exactive, Thermo Scientific, Bremen, Germany). Для каждого образца измерялось 25 масс-спектров с усреднением 40 микросканов на спектр; каждый микроскан соответствует ионам, накопленным в результате пяти последовательных лазерных импульсов. Более детальное описание экспериментальной установки было представлено ранее [46].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения роли мобильного протона в процессе ФДУФ ионов пептидов было проведено сравнение масс-спектров фрагментации протонированного модельного пептида и его комплексов с катионами натрия, в которых ион натрия замещает протон в качестве носителя заряда. Поскольку натрий обладает большей массой и радиусом, вероятность изменения его локализации в цепи аминокислотной последовательности заметно ниже по сравнению с протоном, что приводит к значительным различиям спектров фрагментации пептида с натрием и его протонированной версии. Ранее такое сравнение проводилось для масс-спектров фрагментации, полученных с использованием ДАС, и было показано, что замена протона на ион металла приво-

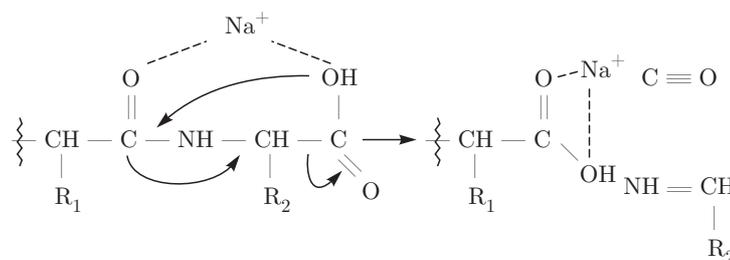


Рис. 2. Схема образования фрагмента $[b_{12} + \text{OH} + \text{Na}]^+$ пептида с катионом металла в процессе диссоциации, активированной соударениями. Ион натрия стабилизируется карбонильной группой пептидной связи и концевой С-гидроксигруппой, активируя последнюю для нуклеофильной атаки пептидной связи

дит к существенному преобладанию двух фрагментов $[b_n + \text{OH} + \text{Na}]^+$ и $[b_{n-1} + \text{OH} + \text{Na}]^+$ в спектрах, где n — количество аминокислотных остатков в пептиде [47, 48]. Данные ионы формируются через переходное состояние, в котором катион металла взаимодействует с кислородом ближайшей карбонильной группы пептидной связи и инициирует нуклеофильную атаку, приводящую к отрыву С-концевого остатка в виде CO и имина (рис. 2).

На рис. 3 показаны спектры фотофрагментации двухзарядного пептида $[\text{PAATAAGSLGSLK} + 2\text{H}]^{2+}$ и его аддуктов с натрием — $[\text{PAATAAGSLGSLK} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$ и $[\text{PAATAAGSLGSLK} + 2\text{Na}]^{2+}$. Как отмечалось ранее, спектры ФДУФ протонированных пептидов обычно содержат множество фрагментов разных типов: помимо полных серий b - и y -фрагментов также наблюдается значительное количество a/x - и некоторое количество c/z -фрагментов (рис. 3а). Кроме того, присутствуют фрагменты с потерями воды (индекс «#») и внутренние b -фрагменты (индекс «int»), являющиеся результатом вторичной фрагментации. При замене одного протона на натрий спектр фрагментации значительно упрощается (рис. 3б). Заметно возрастает интенсивность двухзарядных С-концевых фрагментов, таких как $y_{11/12}$ и $x_{11/12}$, которые практически отсутствовали в случае дважды протонированного пептида (красным цветом и индексом «*» обозначены двухзарядные ионы с натрием и протоном). Данный эффект связан с напряжением С-концевых связей из-за присутствия катиона металла и, как следствие, с понижением барьера реакции разрыва пептидной связи.

Помимо классических фрагментов также наблюдается интенсивный пик характерного двухзарядного иона $[b_{12} + \text{OH} + \text{Na}]^{2+}$, который в значитель-

ной степени подвергается последующей фрагментации с образованием внутренних y -фрагментов (отмечены синим цветом и индексом « \hat{c} » на рис. 3б). Поскольку ионизирующий протон изначально находится на N-конце аминокислотной последовательности пептида, в спектрах фрагментации наблюдаются только легкие (N-концевые) b -фрагменты, интенсивность которых в среднем в три раза ниже, чем в случае дважды протонированного пептида. В спектре полностью отсутствуют b/y -фрагменты, отвечающие разрыву связей в середине последовательности, однако есть несколько a -фрагментов, которые, как отмечалось выше, вероятно являются радикальными фрагментами, появляющимися в результате прямой диссоциации из возбужденного состояния.

Таким образом, замена одного из мобильных протонов на менее подвижный катион натрия оказывает значительное влияние на спектр ФДУФ, особенно на формирование b - и y -фрагментов, которые, по всей видимости, являются продуктами реакции диссоциации с наименьшим энергетическим барьером, и, как следствие, протекающей с наибольшей скоростью.

В случае замены обоих мобильных протонов на катионы натрия в спектре фрагментации присутствуют только два характерных иона фрагментов, $[b_{12} + \text{OH} + 2\text{Na}]^{2+}$ и $[b_{11} + \text{OH} + 2\text{Na}]^{2+}$ (рис. 3в). Поскольку все остальные каналы фрагментации являются энергетически недоступными из-за отсутствия мобильных протонов, интенсивность полученных фрагментов более чем на порядок превышает интенсивности фрагментов, соответствующих разрывам тех же связей (b_{11}/y_2 и b_{12}/y_1) в случае дважды протонированного пептида. Таким образом, наличие ионизирующего протона необходимо для эффективной ФДУФ пептидов. Данный факт согласуется с моделью мобильного протона, предложенной

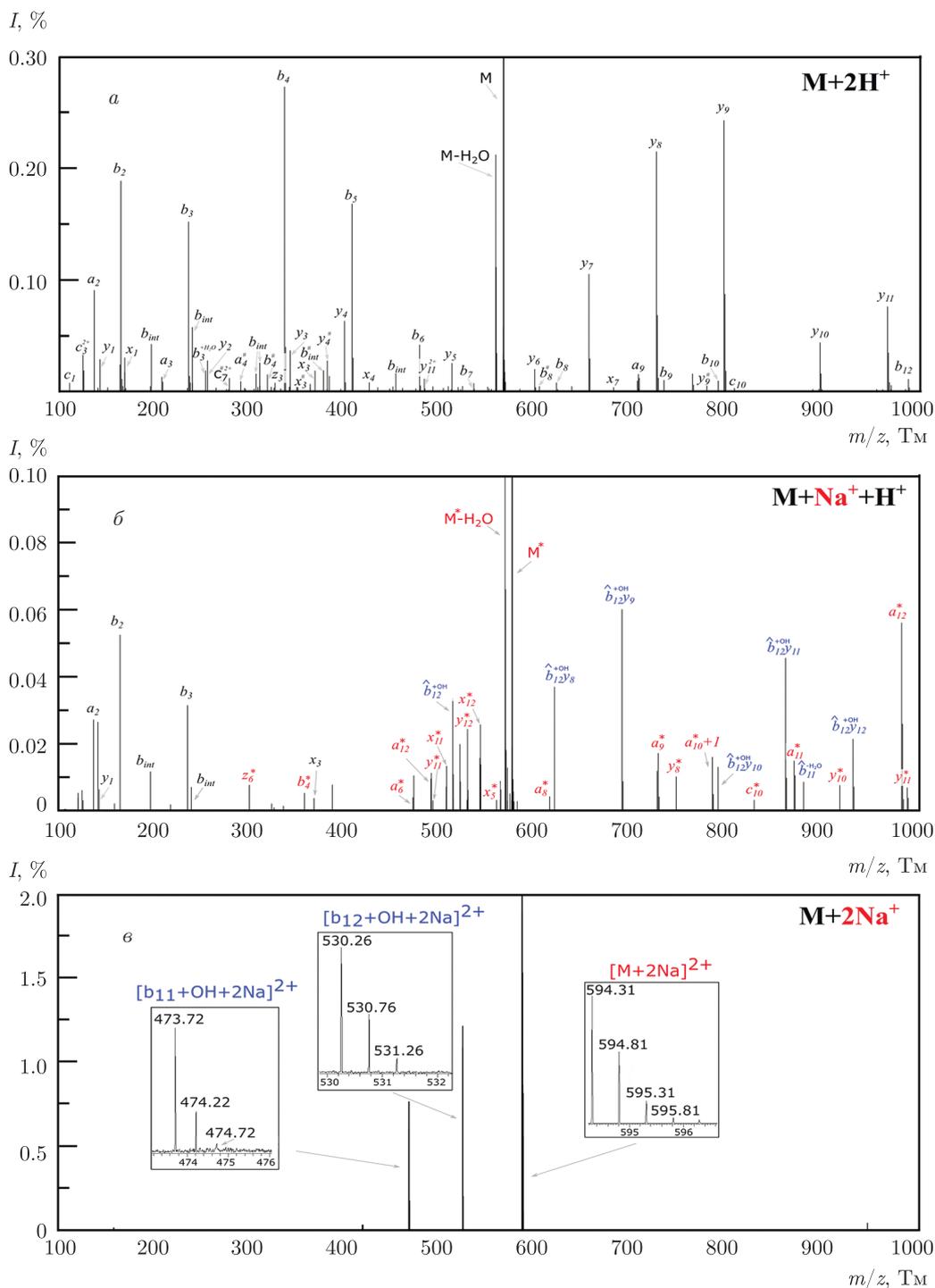


Рис. 3. (В цвете онлайн) Масс-спектры ФДУФ ($\lambda = 193$ нм) модельного двухзарядного пептида PAATAAGSLGSLK (M) с двумя протонами (а), протоном и катионом натрия (б) и двумя катионами натрия (в). Интенсивность нормирована на интенсивность максимального пика в масс-спектре, m и z — соответственно масса и заряд иона, m/z измеряется в единицах томсон, Тм (Thomson, Th). Фрагменты с потерями воды обозначены решеткой (#), внутренние b -фрагменты — индексом « int », двухзарядные ионы, несущие ион натрия и протон, — красным цветом и звездочкой (*), специфический фрагмент $[b_{12} + OH + Na]^{2+}$ и y -фрагменты, полученные из него в процессе вторичной фрагментации, — синим цветом и шляпкой (^)

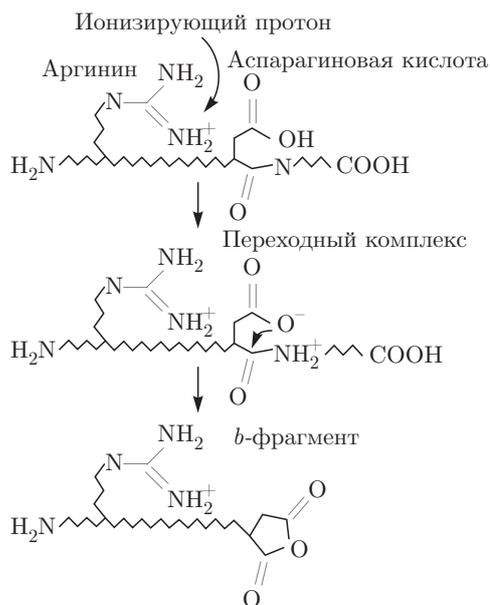


Рис. 4. Схема кислотного эффекта, который заключается в получении интенсивных *b*-фрагментов после остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот при наличии остатков аргинина в последовательности пептидов. Поскольку ионизирующий протон оказывается «запертым» на остатке аргинина, водород-карбоксильной группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот переходит на азот соседней пептидной связи с последующим образованием *b*-фрагмента

для ДАС, и доказывает, что ФДУФ также протекает через переходный комплекс, образованный с участием протона. Кроме того, получение характеристических фрагментов с ионами натрия и отсутствие разрывов всех остальных связей свидетельствуют в пользу медленного механизма протекания реакции ФДУФ.

Таким образом, несмотря на высокую энергию фотона с длиной волны 193 нм, которая превышает среднюю энергию пептидной связи, прямая диссоциация из электронно-возбужденного состояния является маловероятным процессом, а разрыв связи происходит из колебательно-возбужденного состояния основного электронного уровня молекулы через образование переходного комплекса с участием ионизирующего протона.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

С увеличением количества экспериментов по фрагментации биомолекул УФ-излучением возрастает необходимость предсказания получаемых

масс-спектров в зависимости от аминокислотной последовательности пептидов и экспериментальных условий. Так, несколько научных групп в последние годы предпринимали попытки объяснения механизма фотофрагментации белков и пептидов УФ-излучением, особенно в контексте теории мобильного протона. Например, в недавней работе [49] авторы изучали влияние основности первичных аминов на спектры ФДУФ и ДАС для шести различных белков. Поскольку группами с наибольшим сродством к протону в белках являются первичные амины, входящие в состав остатков аргинина и лизина, их наличие повышает энергию, необходимую для инициирования миграции ионизирующего протона по цепи пептидных связей. Другими словами, протон оказывается «запертым» на этих остатках, что приводит к возрастанию пороговой энергии фрагментации [16]. Понижение основности (т.е. сродства к протону) первичных аминов приводит к уменьшению энергии их связи с протоном, а следовательно, согласно уравнению Аррениуса, к повышению мобильности ионизирующего протона [50, 51].

Таким образом, с помощью химической модификации остатков лизина (например, карбамилирования) можно изучать влияние мобильности протона на спектры фрагментации. Данный подход и был продемонстрирован в работе [49], основной вывод которой заключается в незначительной роли мобильного протона в процессе ФДУФ, что расходится с экспериментальными данными, представленными в настоящей работе. Стоит отметить, что хотя экспериментальные условия в работах схожи (такие как длина волны и мощность УФ-излучения, концентрация изучаемых молекул и растворителя, метод ионизации и тип масс-анализатора), объекты исследования различаются по массам (8.5–32.5 кДа в работе [49] и 1.1 кДа в настоящей работе). Однако поскольку число поглощенных фотонов пропорционально количеству абсорбционных центров (т.е. в нашем случае количеству пептидных связей) [52, 53], энергии, приходящиеся на одну связь, остаются сравнимыми, и увеличение размера полипептидной цепи практически не влияет на механизм фотофрагментации.

Основное же различие в выводах связано с различными подходами к изменению мобильности ионизирующего протона. Замена протона на ион натрия позволяет исключить из системы мобильный протон как таковой, в то время как химическая модификация аминокислотных остатков приводит лишь к частичному увеличению его (протона) мо-

бильности. Кроме того, сродство к протону у аргинина выше, чем у лизина в среднем на 10 ккал/моль. Такое различие приводит к тому, что наличие остатков аргинина значительно влияет на спектр фрагментации пептидов, в то время как подобные эффекты не наблюдаются для остатков лизина [18, 54]. В частности, наличие аргинина способствует получению интенсивных *b*-фрагментов после остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (так называемый кислотный эффект). В этом случае, поскольку ионизирующий протон оказывается «запертым» на остатке аргинина, водород карбоксильной группы остатка аспарагиновой и глутаминовой кислот переходит на азот соседней пептидной связи с последующим образованием *b*-фрагмента (рис. 4) [55]. Наличие остатков лизина не влияет на интенсивность спектров обсуждаемых фрагментов [18]. Таким образом, хотя лизин и обладает высоким сродством к протону, мобильный протон оказывается незапертым, поэтому химическая модификация лизина может не иметь выраженного влияния на спектры фрагментации пептидов.

Кроме того, как описано в работе [49], изменения масс-спектров ДАС белков вследствие понижения основности остатков лизина заключаются в уменьшении количества наблюдаемых фрагментов. Однако согласно теории мобильного протона, при уменьшении энергии связи ионизирующего протона с молекулой и, как следствие, при повышении вероятности формирования переходного комплекса с переносом протона на пептидную связь, выход реакции диссоциации должен возрастать. Данное противоречие авторы работы [49] объясняют повышением вероятности вторичной фрагментации, поскольку из-за возрастания мобильности ионизирующего протона реакция диссоциации происходит быстрее. После разрыва пептидной связи у фрагментов есть возможность получения дополнительной энергии в столкновениях, что приводит к последующей фрагментации (время нахождения молекул в столкновительной ячейке в работе [49] не указано, но обычно составляет 10–50 мс). В случае ФДУФ время реакции диссоциации значительно превышает длительность импульса лазера (5 нс), таким образом, у фрагментов нет возможности получения дополнительной энергии (т. е. поглощения еще одного фотона) для дальнейшей диссоциации. Исходя из этого, вторичная фрагментация маловероятна вне зависимости от скорости реакции диссоциации, что может объяснить отсутствие изменения спектров ФДУФ при понижении основности белков.

Рассмотренные выше объяснения наблюдаемых в работе [49] зависимостей не противоречат модели мобильного протона, а вместе с представленными в настоящей работе данными подтверждают тот факт, что фотодиссоциация ионов пептидов под воздействием УФ-излучения происходит с участием мобильного протона. Стоит отметить, что поскольку энергия, получаемая молекулой в процессе ФДУФ, значительно превышает энергию, приобретаемую в столкновении с молекулами газа при ДАС, структуры переходных комплексов в этих процессах могут различаться, и установление наиболее вероятных путей реакции требует дальнейшего изучения.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью установления роли ионизирующего протона в процессе фотофрагментации биомолекул ультрафиолетовым излучением в работе были получены масс-спектры фотофрагментации двухзарядного модельного пептида и его аддуктов с катионами натрия. Показано, что замена хотя бы одного из протонов приводит к значительному подавлению диссоциации, при этом в спектре фрагментации пептида с двумя ионами натрия присутствуют только два фрагмента, отвечающие разрыву напряженных C-концевых связей. Отсутствие всех остальных фрагментов демонстрирует необходимость наличия ионизирующего протона для разрыва пептидной связи в случае фотодиссоциации УФ-излучением аналогично тому, как это происходит при диссоциации, активированной столкновениями. Кроме того, экспериментально наблюдаемые зависимости могут быть описаны в рамках теории мобильного протона: подавление диссоциации вследствие замены ионизирующего протона на ион натрия объясняется затруднением транспорта заряда по цепи пептидных связей и, как следствие, невозможности образования переходного состояния, необходимого для протекания реакции диссоциации. Данные, представленные как в настоящей работе, так и в литературе, демонстрируют, что теория мобильного протона, разработанная ранее для диссоциации, активированной соударениями, может быть использована для предсказания интенсивностей спектров фрагментов и подбора оптимальных условий экспериментов по фотофрагментации пептидов под воздействием УФ-излучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Aebersold and M. Mann, *Nature* **537**, 347 (2016).
2. P. E. Geyer, N. A. Kulak, G. Pichler et al., *Cell Syst.* **2**, 185 (2016).
3. L. C. Gillet, A. Leitner, and R. Aebersold, *Ann. Rev. Anal. Chem.* **9**, 449 (2016).
4. E. S. Baker, T. Liu, V. A. Petyuk et al., *Genome Med.* **4:63**, 1 (2012).
5. A. I. Nesvizhskii, O. Vitek, and R. Aebersold, *Nat. Methods* **4**, 787 (2007).
6. J. Seidler, N. Zinn, M. E. Boehm et al., *Proteomics* **10**, 634 (2010).
7. J. K. Diedrich, A. F. M. Pinto, and J. R. Yates, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1690 (2013).
8. Y. Zhang, S. B. Ficarro, S. Li et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1425 (2009).
9. A. S. C Silva, R. Bouwmeester, L. Martens et al., *Bioinformatics* (2019), in press.
10. G. Espadas, E. Borràs, C. Chiva et al., *Proteomics* **17**, 1 (2017).
11. B. Paizs and S. Suhai, *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 508 (2005).
12. L. Sleno and D. A. Volmer, *J. Mass Spectrom.* **39**, 1091 (2004).
13. J. V. Olsen, B. Macek, O. Lange et al., *Nat. Methods* **4**, 709 (2007).
14. P. Roepstorff and J. Fohlman, *Biol. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
15. E. M. Marzluff and J. L. Beauchamp, *Large Ions: Their Vaporization, Detection and Structural Analysis*, ed. by T. Baer, C. Y. Ng, and I. Powis, Wiley, New York (1996).
16. V. H. Wysocki, G. Tsaprailis, L. L. Smith et al., *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399 (2000).
17. B. L. Schwartz and M. M. Bursey, *Biol. Mass Spectrom.* **21**, 92 (1992).
18. C. Gu, Á. Somogyi, V. H. Wysocki et al., *Anal. Chim. Acta* **397**, 247 (1999).
19. R. S. Johnson, D. Krylov, and K. A. Walsh, *J. Mass Spectrom.* **30**, 386 (1995).
20. B. Paizs, I. P. Csonka, G. Lendvay et al., *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **15**, 637 (2001).
21. M. P. Jedrychowski, E. L. Huttlin, W. Haas et al., *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.009910 (2011).
22. M. L. Nielsen, M. M. Savitski, and R. A. Zubarev, *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 835 (2005).
23. J. A. Madsen, T. S. Kaoud, K. N. Dalby et al., *Proteomics* **11**, 1329 (2011).
24. R. Parthasarathi, Y. He, J. P. Reilly et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **132**, 1606 (2010).
25. T. Fellers, B. P. Early, P. M. Thomas et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **135**, 12646 (2014).
26. J. A. Madsen, D. R. Boutz, and J. S. Brodbelt, *J. Proteome Res.* **9**, 4205 (2010).
27. T. Ly and R. R. Julian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7130 (2009).
28. J. P. Reilly, *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 425 (2016).
29. L. Zhang and J. P. Reilly, *Anal. Chem.* **81**, 7829 (2009).
30. E. M. Solovyeva, V. N. Kopysov, A. Y. Pereverzev et al., *Anal. Chem.* **91**, 6709 (2019).
31. K. L. Fort, A. Dyachenko, C. M. Potel et al., *Anal. Chem.* **88**, 2303 (2016).
32. T. P. Cleland, C. J. Dehart, R. T. Fellers et al., *J. Proteome Res.* **16**, 2072 (2017).
33. X. Dang and N. L. Young, *Proteomics* **14**, 1128 (2014).
34. S. M. Greer and J. S. Brodbelt, *J. Proteome Res.* **17**, 1138 (2018).
35. M. B. Robin, *Higher Excited States of Polyatomic Molecules*, Acad. Press, New York (1974).
36. R. R. Julian, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1823 (2017).
37. P. R. Stannard and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem.* **85**, 3592 (1981).
38. Y. Hu, B. Hadas, M. Davidovitz et al., *J. Phys. Chem. A* **107**, 6507 (2003).
39. H. M. Rosenstock, M. B. Wallenstein, A. L. Wahrhaftig et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **38**, 667 (1952).
40. K. M. Choi, S. H. Yoon, M. Sun et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1643 (2006).
41. J. H. Moon, S. H. Yoon, Y. J. Bae et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1151 (2010).
42. J. H. Moon, S. H. Yoon, and M. S. Kim, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **19**, 3248 (2005).

43. W. Cui, M. S. Thompson, and J. P. Reilly, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1384 (2005).
44. J. Y. Oh, J. H. Moon, and M. S. Kim, *J. Mass Spectrom.* **40**, 899 (2005).
45. M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88**, 4451 (1984).
46. V. Kopysov, A. Makarov, and O. V. Boyarkin, *Anal. Chem.* **87**, 4607 (2015).
47. T. Lin, A. H. Payne, and G. L. Glish, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 497 (2001).
48. W. Yong, S. Gronert, K. A. Fletcher et al., **222**, 117 (2003).
49. S. M. Greer, D. D. Holden, R. Fellers et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1587 (2017).
50. Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре, *Курс химической кинетики*, Высшая школа, Москва (1974).
51. В. Штиллер, *Уравнение Аррениуса и неравновесная кинетика*, Мир, Москва (2000).
52. G. N. Beaven and E. R. Holiday, *Adv. Protein Chem.* **7**, 319 (1952).
53. А. П. Демченко, *Ультрафиолетовые спектры и структура белков*, Наук. думка, Киев (1981).
54. C. Bleiholder, S. Suhai, and B. Paizs, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1275 (2006).
55. G. Tsapralis, H. Nair, Á. Somogyi et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **121**, 5142 (1999).