

## СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.22

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКОЛОАТОМНОЙ СТРУКТУРЫ ОЛИГОМЕРНЫХ БЕЛКОВ *E. coli* БЕЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОЧИСТКИ

© 2021 г. Е. Б. Пичкур<sup>1,2</sup>, В. И. Микиртумов<sup>3</sup>, О. В. Тихонова<sup>4</sup>, Н. И. Деркачева<sup>5</sup>,  
Л. П. Курочкина<sup>6</sup>, О. С. Соколова<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ “Курчатовский институт”,  
Гатчина, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

<sup>5</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

<sup>6</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

\*E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 04.05.2020 г.

После доработки 04.05.2020 г.

Принята к публикации 29.05.2020 г.

С помощью криоэлектронной просвечивающей микроскопии изучен грубо очищенный экстракт белков *E. coli*, на основе 2D-классификации проекций выделены классовые суммы, содержащие проекции двух белков:  $\beta$ -галактозидазы и каталитического дигидролипоилтрансукцинилазного домена 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, идентифицированных в экстракте методом тандемной масс-спектрометрии. Решены их структуры с разрешением, близким к атомному. В результате моделирования структуры каталитического домена 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса *de novo* получена атомная модель, выявляющая различия в положении некоторых аминокислотных остатков активного центра по сравнению с ранее полученными кристаллическими структурами.

DOI: 10.31857/S0023476121050180

#### ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия структурные методы биологии претерпели бурное развитие, что выразилось в определении новых атомных структур различных белков. Криоэлектронная просвечивающая микроскопия (крио-ПЭМ) не так давно была признана в качестве одного из основных инструментов при изучении белковых структур с высоким разрешением наряду с рентгеноструктурным анализом и ядерно-магнитной спектроскопией (ЯМР) [1]. Использование этого метода резко возросло в связи с определенными технологическими достижениями. К ним относятся не только новые приборы, прямые детекторы электронов, фазовые пластинки, но и такие программные средства, как Relion [2], cryoSPARC [3], Chimera [4, 5] и Coot [6]. В результате удалось добиться впечатляющих результатов при изучении белков и их комплексов. Ярким примером преимущества крио-ПЭМ может служить полученная за месяц структура S-белка коронавируса 2019-nCoV [7]. Эти данные позволили выявить

принципиальные различия в структуре близкородственных вирусов, вызывающих инфекции SARS и COVID-19.

В настоящее время узким местом при получении данных с высоким разрешением остается биохимическая очистка белков. Этот этап трудно автоматизировать, поскольку он в значительной степени опирается на человеческий опыт. Сохраняется ряд проблем, связанных с трудностями выбора системы экспрессии белка, метода его очистки и концентрации функционального белка. Цель состоит в том, чтобы свести к минимуму количество шагов очистки, минимизировать их влияние на белок и получить достаточное количество гомогенного препарата для дальнейшего структурного анализа.

В представленной работе к решению этой проблемы подошли с технологической стороны. При осаждении рекомбинантного белка из экстракта продуцировавших его клеток *E. coli* сульфатом аммония получен препарат, содержащий наряду с целевыми некоторыми клеточными белками. Препарат

был изучен в крио-ПЭМ и решены структуры двух идентифицированных масс-спектрометрией белков *E. coli*:  $\beta$ -галактозидазы и каталитического дигидролипоилтрансукцинилазного домена 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (КД-ОДК) с разрешением, близким к атомному. В результате моделирования структуры КД-ОДК *de novo* построена атомная модель, выявляющая различия в положении некоторых аминокислотных остатков (а.о.) активного центра по сравнению с известными кристаллическими структурами [8, 9].

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

**Подготовка белков *E. coli*.** Выделение и осаждение белков *E. coli* проводили в соответствии с процедурой, описанной в [10]. Клетки BL21(DE3) *E. coli*, продуцирующие рекомбинантный шаперонин бактериофага ОВР, наращивали в большом объеме среды 2xTY при температуре 37°C до оптической плотности  $A_{600} = 0.7$ . Экспрессию белка индуцировали добавлением изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозида до конечной концентрации 1 мМ и растили клеточную культуру в течение 3.5 ч при 25°C. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7.5), подвергали ультразвуковой обработке с помощью дезинтегратора Virsonic 100 (Vertis, США) и центрифугировали (13000 g) для удаления клеточного дебриса. Нуклеиновые кислоты осаждали путем добавления в супернатант 1/10 объема 30% (w/v) раствора сульфата стрептомицина с последующим центрифугированием. Белки осаждали из супернатанта путем добавления насыщенного раствора сульфата аммония до конечной концентрации 30% (w/v). После центрифугирования осадок белка растворяли в 50 мМ Трис-HCl-буфере (pH 7.5), содержащем 100 мМ NaCl, и промывали 30 объемами буфера (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5 с добавлением 10 мМ  $MgCl_2$  и 100 мМ KCl) на фильтрах Amicon (Millipore, США). Состав белков анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии.

**Масс-спектрометрический анализ.** Гидролиз белка в растворе проводили с использованием трипсина (Sequencing Grade Modified, Promega, Madison, WI, USA), как описано в [12]. Анализ полученных при гидролизе пептидов осуществляли с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США), соединенной с масс-спектрометром Q Exactive<sup>TM</sup> HF (Thermo Scientific, США). Пептиды перед аналитическим разделением наносили на обогащающую колонку Acclaim  $\mu$ -Precolumn (0.5  $\times$  3 мм, 5 мкм размер частиц; Thermo Scientific) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин в изократическом режиме подвижной фазы Б (2% ацетонитрила, 0.1% муравьиной кислоты). Затем пептиды

разделяли на колонке Acclaim Pepmap C18 (75 мкм  $\times$  150 мм, 2 мкм размер частиц; Thermo Scientific) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижными фазами А (0.1% муравьиной кислоты) и Б (80% ацетонитрила, 0.1% муравьиной кислоты) при скорости потока 0.3 мкл/мин. Колонку промывали 2%-ной подвижной фазой Б в течение 5 мин, после чего концентрацию подвижной фазы Б линейно увеличивали до 35% в течение 40 мин, затем за 5 мин линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99%. После промывки колонки в течение 5 мин при 99% фазы Б концентрацию Б снижали до начальных условий – 2% фазы Б за 5 мин. Общая длительность анализа составила 60 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили в трех технических повторах на гибридном орбитальном масс-спектрометре Q Exactive<sup>TM</sup> HF (Thermo Scientific, США) в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Scientific, США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ, температура капилляра 240°C. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 до 1500 m/z, тандемное сканирование фрагментных ионов от нижней границы 100 m/z до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2000 m/z. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от  $z = 2+$  до  $z = 6+$  по зарядному состоянию. Максимальное число разрешенных для синхронной изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 20-ти. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило не более 50 мс, для фрагментных ионов – не более 110 мс.

Идентификацию белков по масс-спектрам проводили в поисковой системе MASCOT [13] с использованием базы данных аминокислотных последовательностей SwissProt с ограничением видовой принадлежности организма исследуемого образца *E. coli*. Для оценки FDR была сгенерирована база данных ложных последовательностей белков в виде обратных последовательностей аминокислот протеома *E. coli*. Параметры поиска установлены следующим образом: расщепляющий фермент – трипсин с возможностью пропуска одного сайта расщепления последовательности, точность определения масс-моноизотопных пиков пептидов  $\pm 5$  ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS  $\pm 0.01$  Да. В качестве обязательной и возможной модификации было учтено карбамидометилирование цистеина и окисление метионина соответственно. Для валидации сопоставлений спектров и пептидов PSM, идентификации пептидов и идентификации белков использовали величину FDR не более 1.0%. Белки рассматривали в качестве достоверно иденти-

фицированных, если для них было обнаружено по крайней мере два уникальных пептида, прошедших валидацию. Безметковая количественная оценка содержания белков проходила на основе эмпирического показателя  $emPAI$  [14].

**Криоэлектронная просвечивающая микроскопия.** Препарат белков *E. coli* (3.0 мкл) наносили на сетку с углеродной подложкой, имеющей регулярные отверстия диаметром 1.2 мкм и периодом 1.3 мкм (R1.2/1.3, Quantifoil). Сетки предварительно в течение 30 с обрабатывали тлеющим разрядом в установке для гидрофилизации PELCO easyGlow (Ted Pella, США) при давлении в камере 0.26 мБар и силе тока 25 мА. Сетки с нанесенным белком моментально замораживали в жидком этане в приборе Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) при 100%-ной влажности и температуре +4.5°C. Стеки микрографий по 38 кадров (4017 стеков) снимали в крио-микроскопе Titan Krios (Thermo Fisher Scientific) с прямым детектором электронов Falcon II в следующих условиях: ускоряющее напряжение – 300 кВ, увеличение – 75000×, размер пикселя – 0.86 Å, поток электронов ~100 э/Å<sup>2</sup>. Стеки были предварительно обработаны в программе Warp [11] для оценки параметров функции передачи контраста (CTF) и коррекции дрейфа на отдельных кадрах стека. Изображения белковых молекул были выбраны с помощью нейронной сети VoxNet и вырезаны из микрографий с помощью рамки 256 × 256 пикселей с получением набора из 470 117 частиц. Из них более 250 000 частиц представляли ОВР шаперонин [10]. 2D-классификацию проводили в программе CryoSPARC [3]. 2D-классы, соответствующие различным белкам, выбирали вручную с последующим генерированием модели *ab-initio* для каждого класса в отдельности. Затем выполнили 3D-уточнение структуры каждого класса с использованием предварительной модели без наложения симметрии. На следующем этапе полученные структуры были использованы в качестве ссылок для дальнейшей 3D-классификации исходного набора частиц. Финальные 3D-структуры белка реконструировали с наложенной симметрией: диэдральная D<sub>2</sub> для β-галактозидазы, октаэдрическая (O) для КД-ОДК. Окончательные реконструкции включали 99 246 частиц для β-галактозидазы и 13 770 частиц для КД-ОДК. Разрешение реконструкций оценивали в соответствии с критерием FSC = 0.143, оно составило 2.6 Å для β-галактозидазы и 3.2 Å для КД-ОДК.

**De novo моделирование структуры белка.** Моделирование проводили с помощью программ Coot [6] и Phenix [15]. Разрешение карты КД-ОДК, полученное в крио-ПЭМ, было достаточным для идентификации боковых цепей и однозначного определения последовательности данного белка. Уникальная часть карты КД-ОДК извлечена с помощью алгоритма *phenix.mapbox* и NCS-операто-

ров, полученных с помощью алгоритма *phenix.mapsymmetry* после задания симметрии группы точек “O”, атомная модель этой части построена автоматически с помощью алгоритма *phenix.maptomodel*. Полученную модель проверяли вручную в Coot, большие диапазоны остатков несоответствия и пустые зоны заполняли аланиновыми остатками; при необходимости формировали новые пептидные связи таким образом, чтобы модель состояла из одной цепи. После этого боковые цепи аланинов в модели были заменены на боковые цепи аминокислот, соответствующих последовательности C-концевой части белка КД-ОДК (174–405 а.о.). С помощью программы Coot провели ручную правку всех остатков для максимально точного соответствия карте электростатического потенциала при сохранении правильной геометрии остатков; для всех боковых цепей были выбраны ротамеры с их оптимальной ориентацией. Для отредактированной модели уникальной части структуры были применены операторы NCS, полученные с помощью алгоритма *phenix.mapsymmetry*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цель работы заключалась в том, чтобы показать, что крио-ПЭМ и обработка изображений позволяют получить 3D-структуры белковых молекул без тонкой очистки целевых белков. Для этого получили коктейль белков из клеток *E. coli*, гетерологично экспрессирующих вирусный шаперонин (ОВР) [10]. Рекомбинантный шаперонин осаждали из клеточного экстракта 30%-ным сульфатом аммония [16], при этом некоторое количество клеточных белков также оказалось в осадке. Идентификацию смеси осажденных белков *E. coli* проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Результаты представлены в табл. 1. Относительные количества совместно осажденных белков оценивали с помощью показателя  $emPAI$ , рассчитанного в программе MASCOT. Наибольшее соответствие последовательности (39%) получено для β-галактозидазы (P00722), остальные семь белков представлены несколькими пептидами каждый.

Смесь белков после осаждения и отмычки моментально заморозили в Vitrobot MARK IV (Thermo Fisher Scientific) и исследовали в крио-ПЭМ с использованием стандартного протокола (описан выше). Для идентификации различных белков провели два последовательных раунда 2D-классификации в CryoSPARC [3]. Первую классификацию использовали для исключения из набора “мусорных” классов, после второй (рис. 1) выделили 40 классов, разделенных визуально на три набора данных, каждый из которых представлял отдельный белок.

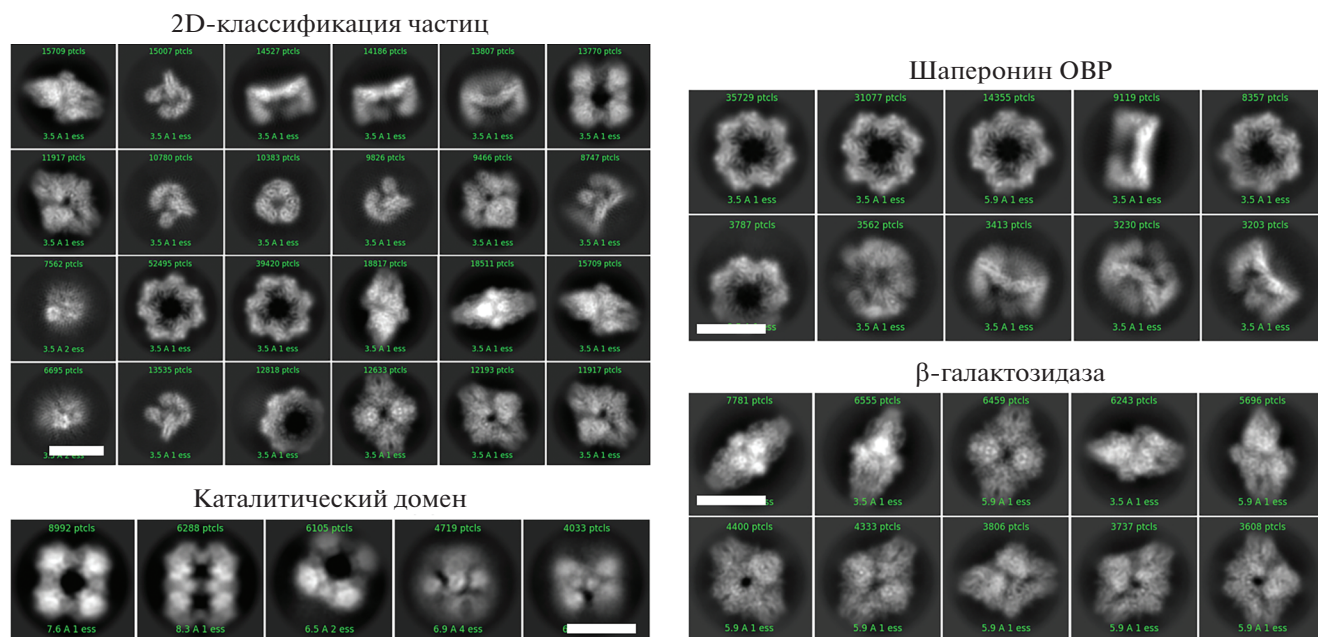
**Таблица 1.** Список достоверно идентифицированных белков *E. coli*

Uniprot ID	Белок	Score	MW, kDa	Sequence Coverage, %	emPAI
P00722	Beta-galactosidase (BGAL_ECOLI)	4240	117.35	39	3.06
P0A9L8	Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR_ECOLI)	395	28.36	21	1.18
P0A9P0	Dihydrolipoyl dehydrogenase (DLDH_ECOLI)	484	50.94	18	0.99
P05055	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (PNP_ECOLI)	394	77.11	14	0.65
P0A6F5	60 kDa chaperonin (CH60_ECOLI)	396	57.46	15	0.65
P0A9H3	Inducible lysine decarboxylase (LDCI_ECOLI)	275	81.61	7	0.54
P0AFG7	Succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODO2_ECOLI)	311	43.98	6	0.34
P0AES4	DNA gyrase subunit A (GYRA_ECOLI)	41	97.13	3	0.07

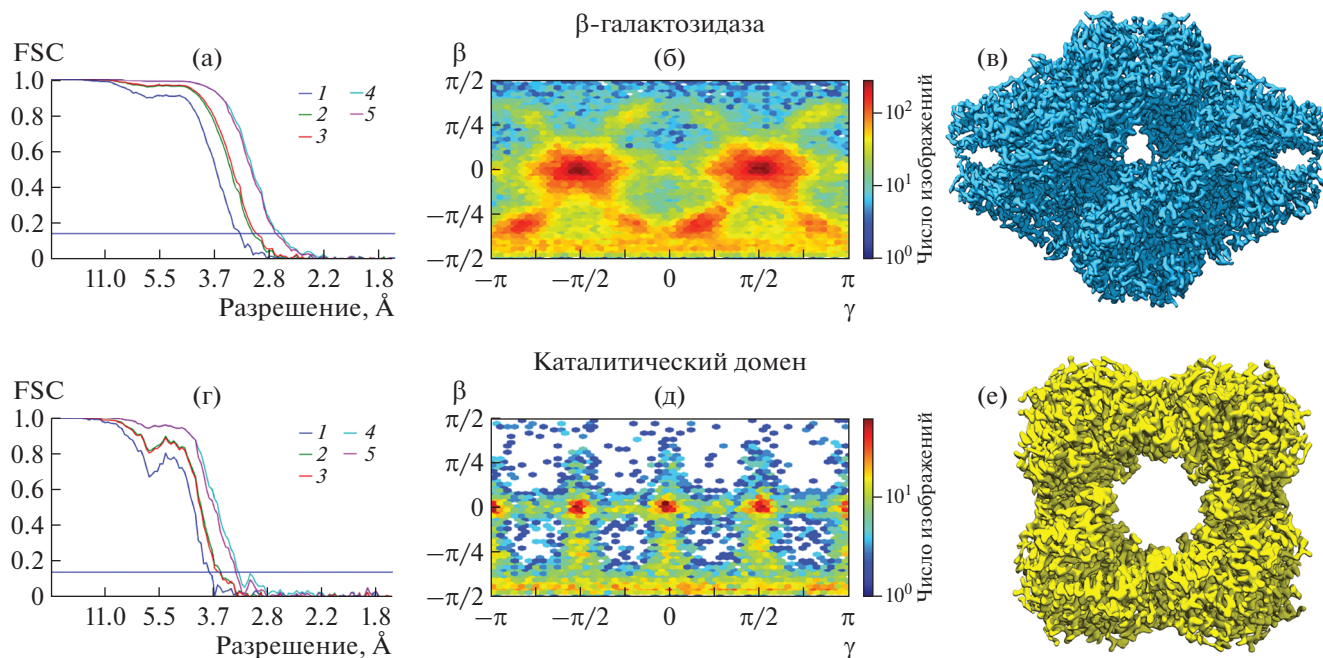
Три олигомерных белка: транзистентно экспрессируемый гептамерный шаперонин фага ОВР *P. fluorescens* [10] и два белка *E. coli* – тетрамерная  $\beta$ -галактозидаза и 24-мерный КД-ОДК, имеют частицы сопоставимого размера, 12–15 нм в поперечнике (рис. 1). Кроме этого, наблюдались классы, соответствующие более мелкому асимметричному белку неопределенной природы. Другие белки, пептиды которых были обнаружены при помощи масс-спектрометрии (табл. 1), не смогли идентифицировать на крио-ПЭМ-изображениях. Возможно, эти белки не образуют в используемых условиях стабильные олигомерные комплексы или их концентрации слишком малы для исследования методом крио-ПЭМ.

Наиболее распространенным белком *E. coli* в исследуемой пробе по данным тандемной масс-спектрометрии (табл. 1) и 2D-классификации (рис. 1) была  $\beta$ -галактозидаза (99246 частиц). Она кодируется геном *lacZ* и образует стабильный гомотетрамер с молекулярной массой ~464 кДа [17]. На крио-ПЭМ-изображениях он имеет хорошо узнаваемую форму и может быть легко отделен при помощи 2D-классификации (рис. 1). Стандартный подход к анализу изображений [18] позволил получить 3D-реконструкцию  $\beta$ -галактозидазы с симметрией D2 и разрешением 2.6 Å (рис. 2а–2в).

В состав 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса *E. coli* входят три различных фермента: Е1 (2-оксоглутаратдекарбоксилаза), Е2 (дигидроли-



**Рис. 1.** Крио-ПЭМ-анализ экстракта белков *E. coli*: 2D-классификация и выделенные классы отдельных белков. Масштабные отрезки – 10 нм.



**Рис. 2.** Построение трехмерных структур белков *E. coli*:  $\beta$ -галактозидазы (а–в) и КД-ОДК (г–е). Кривые функций корреляции (FSC) для соответствующих структур (а, г): 1 – без маски, 2 – сферическая маска, 3 – свободная маска, 4 – узкая маска, 5 – после коррекции; распределение проекций частиц относительно вертикальной оси  $z$  сферы Эйлера (б, д).  $\beta$  – угол между проекцией и осью  $z$ ;  $\gamma$  – угол поворота вокруг оси  $z$ ; изображения выполнены в сguoSPARC [3]. 3D-реконструкция  $\beta$ -галактозидазы (в); 3D-реконструкция КД-ОДК (е).

поилтрансукцинилаза) и E3 (дигидролипоилдегидрогеназа). Фермент E2 катализирует перенос сукциниловой группы из S-сукцинил-дигидролипоила на кофермент А (КоА) [19]. Его полно-размерный мономер длиной 405 а.о. имеет структуру, в которой можно выделить три домена: N-концевой липоилсвязывающий домен, E3-связывающий домен и C-концевой каталитический домен. Молекулярная масса всего белка  $\sim 44$  кДа.

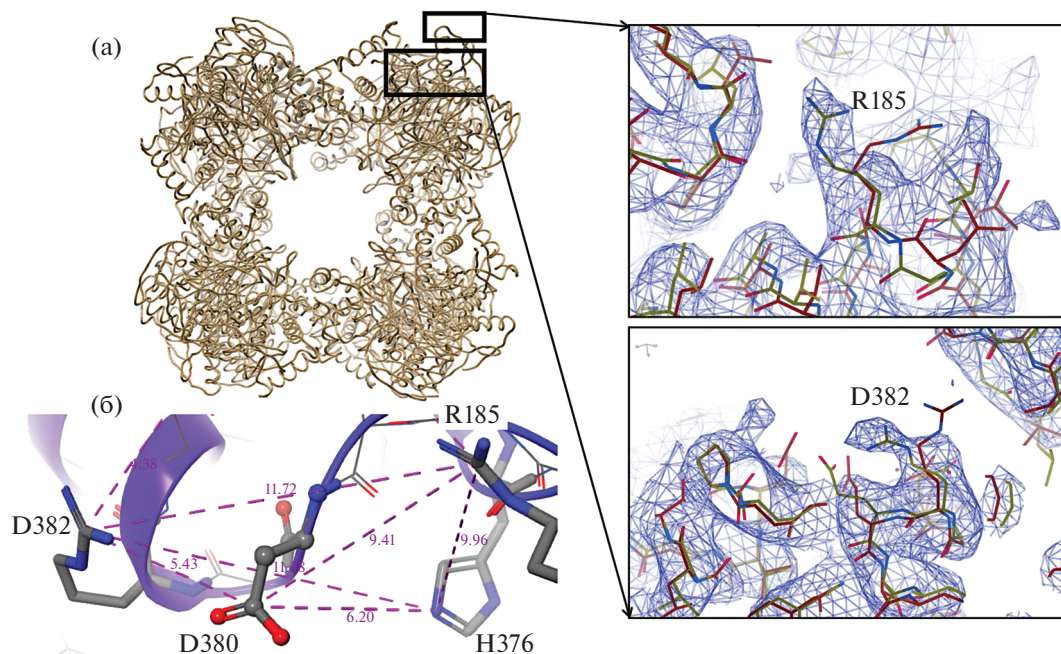
В полученном белковом коктейле *E. coli* с помощью тандемной масс-спектрометрии идентифицировано только два значимых пептида для фермента E2 (один из N-концевого липоилсвязывающего домена и один из C-концевого каталитического домена). Тем не менее на полученных крио-ПЭМ-изображениях C-концевой домен E2 (КД-ОДК) оказался вторым по численности белком после 2D-классификации (13770 частиц). 2D-классификация показала характерные частицы с октаэдрической симметрией (рис. 1). Линейные размеры 2D-классов схожи с размерами ранее определенных кристаллических структур КД-ОДК [8, 9]. При сопоставлении полученных данных с результатами [8, 20] оказалось, что в полученной криоэлектронной структуре отсутствует плотность для N-концевых E3-связывающих и липоилсвязывающих доменов, а также соединенных с ними линкеров. Ранее предполагалось, что эти домены могут быть удалены эндогенными

протеазами [9]. Структуры изолированных N-концевых доменов были решены с помощью ЯМР [21, 22].

Отметим, что кристаллы этого домена были ранее случайно получены при попытке кристаллизации рекомбинантной амидазы *Arabidopsis thaliana*, экспрессированной в гетерологичной системе *E. coli* [9]. Предполагалось, что остатки гистидина на поверхности каталитического домена могут способствовать связыванию его с никельсодержащей смолой [23], однако в данном исследовании мы не использовали Ni-аффинную хроматографию.

Реконструкция в сguoSPARC с октаэдрической симметрией КД-ОДК имеет разрешение 3.2 Å (рис. 2г–2е). Высокое разрешение позволило определить структуру каталитического домена *de novo*. Модель структуры создавали с помощью программы Coot [6] и трехмерных координат для каждого атома (рис. 3а).

Сравнение крио-ПЭМ-структуры с рентгеновской структурой (PDB ID 6rbg) показало, что существуют некоторые различия в ориентациях боковых цепей ключевых аминокислот в активном центре: D382 и D185 (рис. 3а, вставки). Основной, пока не решенный, вопрос относительно структуры КД-ОДК – это причины изменений ориентаций боковых цепей, происходящие в активном участке при связывании субстрата. Ранее



**Рис. 3.** Структура каталитического домена 2-оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса. Атомная модель КД-ОДК, выполненная *de novo*; рамкой отмечено положение активного центра, вставки – различия в позициях аргининов R185 и R382 активного центра. Показаны кристаллическая структура из [9] и структура из данного исследования. Карта электростатического потенциала показана на уровне  $2\sigma$  (а). Расстояния между ключевыми аминокислотами активного центра КД-ОДК (б).

было высказано предположение, что остаток H375 инициирует первую ступень катализа путем депротонирования тиоловой группы КоА, которая затем атакует карбонильный атом сукцинильного остатка, связанного с дигидролипамидом. Разрушение промежуточного соединения приводит к образованию сукцинил-КоА и протонированной дигидролипоиловой группы [8]. Также предполагалось, что при связывании КоА в активном центре аспарагин D380 образует солевые мостики с гистидином H376 и с одним из двух остатков аргинина: R185 или R382 [20]. Для этого D380 должен менять свою ориентацию в зависимости от субстрата. Полученная с помощью крио-ПЭМ структура позволила точно локализовать боковые цепи R185 и R382; эти боковые цепи были не упорядочены в раннем рентгеновском исследовании (PDB ID 1e2o) и выявлены позже (PDB ID 6prb). Сравнение модели PDB:6prb с полученной в данной работе (рис. 3а, вставки) показало, что в модели *de novo* остатки Arg повернуты. Измеренные расстояния между ключевыми а.о. в активном центре составили: D380-H376 = 6.2, D380-R382 = 5.4, D380-R185 = 9.4 Å (рис. 3б). Таким образом, аспарагин D380 располагается примерно посередине между гистидином H376 и аргинином R380 и его взаимодействия с этими остатками, по-видимому, носят ионный характер. С аргинином R185 аспарагин D380 согласно рассмотренной модели не взаимодействует. Для

более точного определения структуры активного центра фермента необходимо получить реконструкцию КД-ОДК с субстратом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Крио-ПЭМ становится незаменимым инструментом в структурных исследованиях биологических макромолекул. До сих пор для получения структур с высоким разрешением требовались высоко очищенные препараты белков. Однако 3D-классификация гетерогенных частиц, реализованная в программах Relion [2] и cryoSPARC [3] в сочетании с масс-спектрометрией, как показывает практика, позволяет обойтись без специальной очистки [24]. В настоящей работе использовали крио-ПЭМ и тандемную масс-спектрометрию для идентификации белковых молекул в грубо очищенной белковой пробе. С помощью анализа изображений удалось выделить две выборки частиц, соответствующие двум белкам *E. coli* и получить две 3D-структуры:  $\beta$ -галактозидазы и КД-ОДК. Оба белка находились в нативном состоянии и не имели рекомбинантных тегов, используемых для очистки. Разрешение, близкое к атомному, позволило выполнить *de novo*-моделирование атомной модели КД-ОДК. Сравнение полученной структуры с опубликованной кристаллической структурой этого же домена [9] показало, что активный сайт в растворе

находится в несколько иной конформации, чем в кристалле.

Авторы выражают благодарность В.Н. Новоселскому за помощь в подготовке рис. 3б.

Эксперименты проведены на оборудовании Уникальной научной установки “3D-ЕМС” МГУ (при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, уникальный идентификатор RFMEFI61919X0014). Получение крио-ПЭМ-данных с высоким разрешением проведено с использованием оборудования Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии “Нанозонд” НИЦ “Курчатовский институт”. Расчеты проведены с использованием вычислительных ресурсов Федерального центра коллективного пользования “Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса” НИЦ “Курчатовский институт” (<http://ckp.nrcki.ru/>). Масс-спектрометрические измерения проведены на оборудовании центра коллективного пользования “Протеом человека” ИБМХ.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология” в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500056-3.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколова О.С., Курпичников М.П., Шайтан К.В. и др. Современные методы изучения структуры и функций ионных каналов. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2020. 316 с.
2. Scheres S.H. // *Methods Enzymol.* 2016. V. 579. P. 125. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.012>
3. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J. et al. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 290. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
4. Yang Z., Lasker K., Schneidman-Duhovny D. et al. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 179. P. 269. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.006>
5. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C. et al. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1605. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
6. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al. // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 486. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
7. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S. et al. // *Science.* 2020. V. 367. P. 1260. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
8. Knapp J.E., Carroll D., Lawson J.E. et al. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 37. <https://doi.org/10.1110/ps.9.1.37>
9. Andi B., Soares A. S., Shi W. et al. // *Acta Cryst. F.* 2019. V. 75. P. 616. <https://doi.org/10.1107/S2053230X19011488>
10. Stanishneva-Konovalova T.B., Semenyuk P.I., Kurochkina L.P. et al. // *J. Struct. Biol.* 2020. V. 209. P. 107439. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.107439>
11. Tegunov D., Cramer P. // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. P. 1146. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y>
12. Anselm V., Novikova S., Zgoda V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18081763>
13. Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M. et al. // *Electrophoresis.* 1999. V. 20. P. 3551. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991201\)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2)
14. Ishihama Y., Oda, Y., Tabata T. et al. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2005. V. 4. P. 1265. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>
15. Afonine P.V., Poon B.K., Read R.J. et al. // *Acta Cryst. D.* 2018. V. 74. P. 531. <https://doi.org/10.1107/S2059798318006551>
16. Wingfield P. // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2001. Appendix 3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>
17. Jacobson R.H., Zhang X.J., DuBose R.F. et al. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 761. <https://doi.org/10.1038/369761a0>
18. Zivanov J., Nakane T., Forsberg B.O. et al. // *Elife.* 2018. P. e42166. <https://doi.org/10.7554/eLife.42166>
19. Perham R.N. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 8501. <https://doi.org/10.1021/bi00099a001>
20. Knapp J.E., Mitchell D.T., Yazdi M.A. et al. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 280. P. 655. <https://doi.org/10.1110/ps.9.1.37>
21. Riccaud P.M., Howard M.J., Roberts E.L. et al. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 264. P. 179. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0632>
22. Robien M.A., Clore G.M., Omichinski J.G. et al. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 3463. <https://doi.org/10.1021/bi00128a021>
23. Bolanos-Garcia V.M., Davies O.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1760. P. 1304. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>
24. Verbeke E.J., Mallam, A.L., Drew K. et al. // *Cell. Rep.* 2018. V. 24. P. 259. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.022>