

ПРОТЕОРОДОПСИНЫ *EXIGUOBACTERIA* – НОВЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА РЕТИНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Петровская Л.Е.¹, Крюкова Е.А.¹, Лукашев Е.П.², Долгих Д.А.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, ГСП-7, 117997, РФ; e-mail: lpetr65@yahoo.com

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. Микробные родопсины – интегральные мембранные белки, которые выполняют светозависимый транспорт протонов и других ионов или сенсорные функции. Они обнаруживаются у архей, бактерий и эукариотических водорослей и включают в себя семь трансмембранных сегментов и хромофор ретиналь. Гены, кодирующие потенциальные ретинальные белки, были выявлены в геномах Грамположительных бактерий *Exiguobacterium sibiricum*, выделенной из вечномёрзлого грунта возрастом 3 млн лет (ESR), термофильной *Exiguobacterium AT1b* из горячих источников Йеллоустонского Национального парка (ATER) и *Exiguobacterium 7-3*, также выделенной из многолетнемерзлого грунта (E7_3R). Ранее мы клонировали ген ESR и провели его структурно-функциональную характеристику. Аминокислотная последовательность E7_3R отличается от ESR в семи положениях, а ATER – в 39 положениях. Для сравнения свойств ретинальных белков, принадлежащих к близкородственным видам из разных мест обитания, мы экспрессировали ATER и E7_3R в клетках *E. coli* и исследовали их методом флеш-фотолиза при различных pH. Показано, что фотоцикл ATER и E7_3R отличается от ESR сдвигом рКа образования интермедиата М (депротонированного основания Шиффа) в щелочную область, а также пониженной скоростью его образования. Наблюдаемые различия обсуждаются во взаимосвязи с данными о трехмерной структуре ESR.

Ключевые слова: ретинальный белок, протеородопсин, *Exiguobacterium*, основание Шиффа, акцептор протонов, донор протонов, фотоцикл.

Микробные родопсины – интегральные мембранные белки, содержащие хромофор ретиналь и осуществляющие светозависимый транспорт протонов и других ионов, а также сенсорные функции. Ретиналь-содержащие белки, выполняющие функцию ионных насосов, создают мембранный градиент концентрации, который используется в качестве источника энергии каналами и другими транспортными белками для импорта питательных веществ, генерации электрических импульсов и других целей. Необходимо отметить, что, несмотря на многолетние исследования механизмов ионного транспорта, осуществляемого бактериородопсином и его аналогами, многие детали этого процесса остаются невыясненными. В связи с обнаружением новых представителей семейства, обладающих специфическими особенностями первичной и пространственной структуры, задача уточнения роли отдельных аминокислотных остатков в функционировании ретинальных белков приобретает особую актуальность.

Наиболее изученным в настоящее время ретинальным белком является бактериородопсин *Halobacterium salinarum* (BR), который был впервые обнаружен в начале 70-х гг. Д. Остерхельтом и В. Стокениусом [1]. Установлено, что BR обладает способностью к светозависимому переносу протонов через мембрану, сопровождаемому генерацией трансмембранного градиента pH и синтезом АТФ. BR состоит из белка-опсина и хромофора *all-trans*-ретиналя, связанного с остатком лизина-216 через основание Шиффа [2]. В результате поглощения света ретиналь осуществляет конформационный переход в *13-cis* конфигурацию с образованием промежуточного состояния (интермедиата) К. Последующее возвращение ретиналя в *all-trans* конфигурацию сопровождается конформационными перестройками белка, которые характеризуются образованием интермедиатов L, M, N и O, и освобождением протона на внешней поверхности белка с последующим поглощением с цитоплазматической поверхности [3]. Основными стадиями этого процесса являются протонирование и депротонирование Шиффова основания, изомеризация ретиналя и др., приводящие к существенным сдвигам в максимуме поглощения интермедиатов фотоцикла BR [4]. Исследование мутантных вариантов BR позволило установить, что важнейшее значение для функционирования белка имеет система водородных связей, объединяющая акцептор протона Asp85 и соседние остатки, которые определяют рКа акцептора [5].

За последнее время в ходе широкомасштабного геномного и метагеномного секвенирования обнаружено существование значительного количества аналогов BR у протеобактерий, актиномицетов, цианобактерий, грибов и других микроорганизмов [6, 7]. Многие протеобактерии, относящиеся к морскому планктонному сообществу, используют для генерации мембранного потенциала аналог BR – протеородопсин (PR) [8, 9]. В молекуле PR Asp97 и Glu108 выполняют функции акцептора и донора протона для Шиффова основания, соответственно, однако у него отсутствуют остатки, образующие группу освобождения протона в молекуле BR. PR проходит те же основные стадии фотоцикла, которые характерны и для BR, однако перенос протона от

донора (Glu108) на Шиффово основание происходит одновременно с поглощением протона с цитоплазматической стороны белка в процессе перехода $M \rightarrow N$.

Грамположительные бактерии рода *Exiguobacterium* обнаруживаются во многих экологических нишах, в том числе экстремальных, включая вечномёрзлые грунты и горячие источники, с температурным диапазоном от $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$. В частности, психротрофная бактерия *E. sibiricum* (штаммы 255-15 и 7-3) была выделена из вечномёрзлых отложений, а термофильная *Exiguobacterium* AT1b – из горячего источника в Йеллоустонском Национальном парке [10]. Такое разнообразие привлекает внимание к изучению адаптационных стратегий, направленных на выживание представителей данного рода в различных условиях. Геномы нескольких бактерий рода *Exiguobacterium* были отсеквенированы DOE Joint Genome Institute (США), что позволяет проводить изучение гомологичных белков, получая их в необходимых количествах при помощи гетерологичной экспрессии. Все описанные в настоящий момент виды *Exiguobacterium* содержат потенциальный ген протеородопсина, при этом аминокислотные последовательности соответствующих белков обладают высокой степенью гомологии, что облегчает поиск молекулярных основ наблюдаемых функциональных различий между ними.

Ранее нами был впервые клонирован ген протеородопсина *E. sibiricum* (ESR), сконструирован штамм *E. coli* – продуцент этого белка, и проведена его структурно-функциональная характеристика [11]. В результате измерения фотоиндуцированного изменения pH в суспензии ESR-содержащих липосом установлено, что при поглощении света ESR осуществляет выброс протонов в среду, обеспечивая ее закисление. Однако, в отличие от бактериородопсина *H. salinarum*, выброс протона происходит на поздних стадиях фотоцикла, после его захвата из внутриклеточной части белка. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что полученный белок является новым представителем семейства транспортных бактериородопсинов, выполняющих функцию протонных насосов.

Дальнейшие исследования показали, что зависимость максимума поглощения ESR от pH среды имеет комплексный характер и включает три перехода с pKa 2.3, 6.0 и 9.1. Соответствующая зависимость для мутанта H57M характеризуется более значительным сдвигом (около 50 нм), вызванным депротонированием Asp85, с pKa 6.3, что указывает на тесное взаимодействие остатков His57 и Asp85 в акцепторной части молекулы [12]. Благодаря этому взаимодействию акцептор протонов находится преимущественно в депротонированном состоянии уже при $\text{pH} > 2$ и может функционировать в широком диапазоне pH.

Изучение фотоцикла ряда мутантных вариантов ESR, содержащих замены остатка Lys96, показало, что такие мутации более чем в 100 раз замедляют распад интермедиата M (репротонирование основания Шиффа), особенно в области высоких значений pH [13]. При снижении pH наблюдается линейное ускорение распада M, однако даже при pH 7 он происходит медленнее, чем в природном белке. Добавление 20 мМ азида натрия, который является трансмембранным переносчиком протонов, при pH 8 вызывает примерно 10-кратное ускорение распада M в мутанте K96A [13]. Аналогичные данные получены при сравнении эффективности транспорта протонов в суспензии протеолипосом, содержащих мутант K96A и ESR дикого типа.

Измерение кинетики светоиндуцированных изменений концентрации протонов продемонстрировало, что в молекуле ESR поглощение протона из среды после образования M предшествует репротонированию основания Шиффа при переходе $M \rightarrow N$. Результаты проведенных экспериментов указывают на то, что остаток лизина в положении 96, а также, возможно, связанные с ним молекулы воды, выполняют функции донора протона для основания Шиффа. Таким образом, ESR является первым примером ретиналь-содержащего белка, для которого доказано наличие подобной роли у остатка лизина.

На основании полученных данных была предложена схема переноса протонов в фотоцикле ESR. Она содержит ряд существенных отличий от последовательности событий в фотоцикле BR, наиболее важным из которых является то, что донор протонов K96 в ESR находится преимущественно в депротонированном состоянии и приобретает протон только в течение короткого промежутка времени. Проведенные нами исследования внесли существенные коррективы в ранее сложившуюся концепцию, согласно которой наличие карбоксильных остатков в роли донора и акцептора протонов для Шиффова основания является необходимым условием функционирования транспортных бактериородопсинов и отличает их от сенсорных ретиналь-содержащих белков [13].

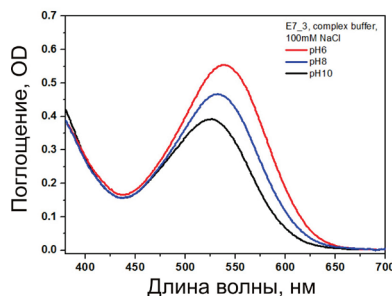


Рисунок 1. Спектры поглощения протеородопсина E7_3R при различных значениях pH

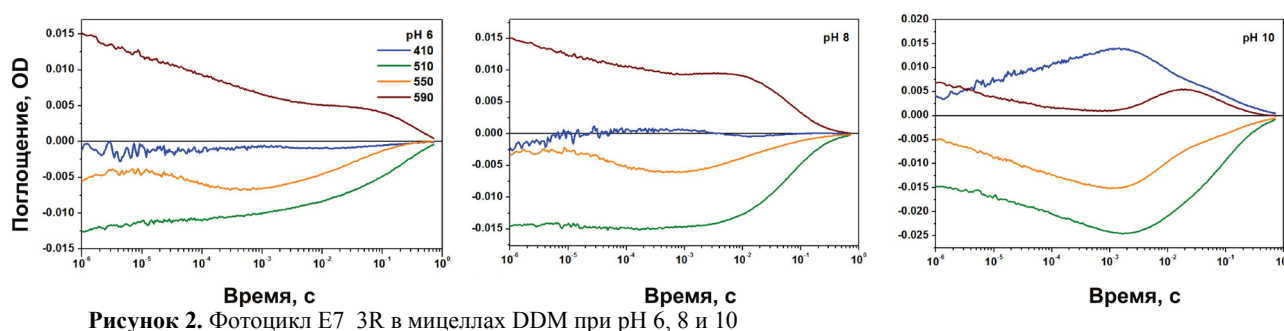


Рисунок 2. Фотоцикл E7_3R в мицеллах DDM при pH 6, 8 и 10

Пространственная структура ESR с разрешением 2.3 Å была впервые исследована группой ученых под руководством В. Горделия [14]. Установлено, что уникальными структурными особенностями ESR являются: 1) расположение донора протонов для Шиффова основания – остатка K96 – в гидрофобной полости близко к поверхности белка, которое может облегчать доступ протонов из цитоплазмы; 2) нарушение альфа-спиральной структуры в средней части спирали F благодаря наличию β_{10} и пи-спиральных элементов; 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85. В отличие от BR, остаток R82 в молекуле ESR удален от основания Шиффа и не образует водородной связи с акцептором протонов D85, соответственно не оказывая существенного воздействия на его свойства. С целью сравнительного исследования физико-химических свойств и фотоцикла ретинальных белков различных представителей рода *Exiguobacterium* нами проведена амплификация соответствующих генов на матрице геномной ДНК *Exiguobacterium* AT1b и *E. sibiricum* 7-3 и их клонирование в *E. coli*.

Выделение рекомбинантных белков проводили с помощью металлоаффинной хроматографии после экстракции из мембраны в присутствии неионного детергента *n*-додецил- β -D-мальтозида (DDM) в условиях, аналогичных описанным для ESR [11]. Максимумы поглощения ATER и E7_3R составили 533 нм при pH 8 и 537 нм при pH 6, что соответствует величинам, полученным ранее для ESR (рис. 1).

Исследование фотоцикла очищенных белков в мицеллах DDM проводили методом флэш-фотолиза при 4 длинах волн (410, 490, 550, 590 нм). Установлено, что при pH 6 и 8 в ответ на вспышку света E7_3R образует преимущественно интермедиаты, поглощающие в области длинных волн (K-, L- и N/O-подобные), а количество M-интермедиата, соответствующего депротонированному основанию Шиффа, с максимумом поглощения 410 нм крайне мало (рис. 2а, б). При увеличении pH выше 9 наблюдается быстрое появление интермедиата M, которое достигает максимума примерно за 2 мс после вспышки (рис. 2в). Аналогичные данные были получены ранее для ESR [12, 15], однако для данного белка рKa образования M сдвинут в щелочную область pH.

Для протерородопсина ATER установлено наличие аналогичной pH-зависимости фотоцикла (рис. 3а). В отличие от ESR, для ATER и E7_3R также характерно более медленное накоплением интермедиата M. В частности, быстрая микросекундная стадия в фотоцикле ATER составляет около 10-15 %, независимо от pH (рис. 3б).

Для установления причины возникновения наблюдаемых различий нами проведено сравнение аминокислотных последовательностей изученных белков с помощью программы ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (рис. 4). Обнаружено, что они обладают существенной степенью гомологии (93-94 сходства), при этом E7_3R отличается от ESR в семи позициях, а ATER – в 39. В частности, последовательность ATER содержит остаток валина в положении, которое в молекуле ESR занимает треонин (остаток T43). Согласно результатам исследования пространственной структуры ESR, этот остаток расположен поблизости от основания Шиффа [14]. Таким образом, вероятно, что данная замена обуславливает особенности кинетики фотоцикла ATER. Дальнейшие исследования с помощью сайт-направленного мутагенеза и изучения свойств мутантных белков позволят проверить это предположение.

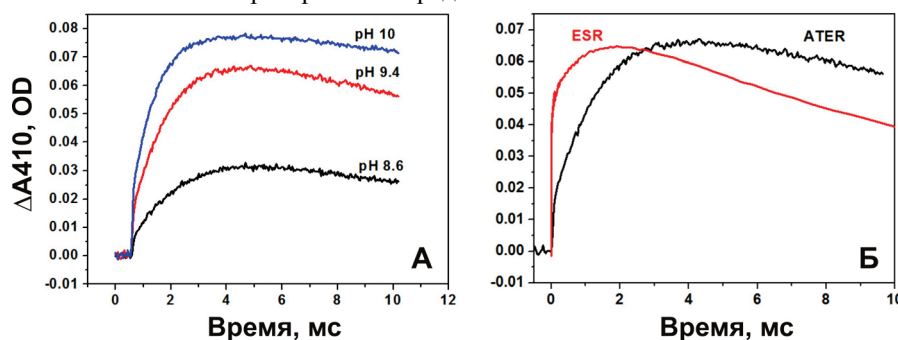


Рисунок 3. А) Кинетика изменений поглощения протерородопсина ATER при 410 нм, вызванных образованием и распадом M-интермедиата, при трех значениях pH. Б) Сравнение кинетики изменений поглощения ESR и ATER при 410 нм, pH 9

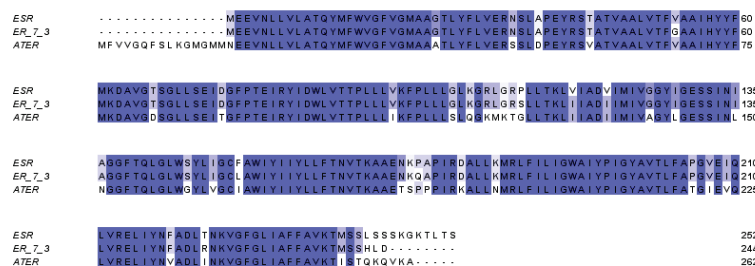


Рисунок 4. Выравнивание аминокислотной последовательности белков ESR, ATER и E7_3R с помощью программы ClustalW2

Работа проводится при финансовой поддержке грантов РФФИ №17-00-00165комфи и 16-04-01264а.

Список литературы / References:

- Oesterheld D., Stoerkenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1973, vol. 70, pp. 2853-2857.
- Lanyi J.K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.*, 2004, vol. 66, pp. 665-688.
- Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. Bacteriorhodopsin. *Principles of Bioenergetics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp. 139-156.
- Lanyi J.K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1757, pp. 1012-1018.
- Balashov S.P. Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2000, vol. 1460, pp. 75-94.
- Béjà O., Spudich E.N., Spudich J.L., Leclerc M., DeLong E.F. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 2001, vol. 411, pp. 786-789.
- Brown L.S., Jung K.H. Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, vol. 5, pp. 538-546.
- Bamann C., Bamberg E., Wachtveitl J., Glaubitz C. Proteorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2014, vol. 1837, pp. 614-625.
- Béjà O., Aravind L., Koonin E.V., Suzuki M.T., Hadd A., Nguyen L.P., Jovanovich S.B., Gates C.M., Feldman R.A., Spudich J.L., Spudich E.N., DeLong E.F. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 2000, vol. 289, pp. 1902-1906.
- Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F., Tiedje J.M. Characterization of Exiguobacterium isolates from the Siberian permafrost. *Description of Exiguobacterium sibiricum sp. nov., Extremobacterium*, 2006, vol. 10, pp. 285-294.
- Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.P. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, pp. 4193-4196.
- Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Aspartate-histidine interaction in the retinal schiff base counterion of the light-driven proton pump of *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, pp. 5748-5762.
- Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Breaking the carboxyl rule: lysine 96 facilitates reprotonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, pp. 21254-21265.
- Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A.N., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M., Gordeliy V. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, vol. 110, pp. 12631-12636.
- Petrovskaya L., Balashov S., Lukashev E., Imasheva E., Gushchin I.Y., Dioumaev A., Rubin A., Dolgikh D., Gordeliy V., Lanyi J. ESR – A retinal protein with unusual properties from *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, pp. 688-700.

**PROTEORHODOPSINS FROM *EXIGUOBACTERIA* – NEW MEMBERS
OF THE RETINAL PROTEINS FAMILY**

Petrovskaya L.E.¹, Kryukova E.A.¹, Lukashov E.P.², Dolgikh D.A.^{1,2}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya str., 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia; e-mail: lpetr65@yahoo.com

²M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Department
Leninskie gory, 1, bld. 12, Moscow, 119234, Russia

Abstract. Microbial rhodopsins are the integral membrane proteins, which perform light-dependent transport of protons and other ions or sensor functions. They are found in archaea, bacteria and eukaryotic algae and share common heptahelical fold with a retinal chromophore. Potential rhodopsin-encoding genes were identified in the genomes of Gram-positive bacteria *Exiguobacterium sibiricum*, isolated from 3-million year old permafrost (ESR), the thermophilic *Exiguobacterium* AT1b from the Yellowstone National Park hot spring (ATER) and *Exiguobacterium* 7-3, also isolated from permafrost soil (E7_3R). Previously, we have cloned the ESR gene and performed its structural and functional characterization. Amino acid sequence of E7_3R differs from ESR in seven positions, and ATER – in 39 positions. In order to compare the properties of retinal proteins belonging to closely related species from different environments, we have expressed ATER and E7_3R in *E. coli* cells and studied them by flash photolysis at different pH. We have shown that the photocycle of ATER and E7_3R differs from that of ESR by the shift of pKa of the M intermediate (the deprotonated Schiff base) formation to more alkaline pH and its reduced rate. The observed differences are discussed in relationship with the data about 3D structure of ESR.

Key words: retinal protein, proteorhodopsin, *Exiguobacterium*, Schiff base, proton acceptor, proton donor, photocycle.