

УДК 577.112+577.34

ESR – РЕТИНАЛЬНЫЙ БЕЛОК *Exiguobacterium sibiricum* С НЕОБЫЧНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Обзор

© 2015 Л.Е. Петровская^{1*}, С.П. Балашов², Е.П. Лукашев³, Е.С. Имашева²,
И.Ю. Гушин^{4,5,6,7,8}, А.К. Дюмаев², А.Б. Рубин³, Д.А. Долгих^{1,3},
В.И. Горделий^{4,5,6,7,8}, Я.К. Лани², М.П. Кирпичников^{1,3}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва; факс: +7(495)330-6983,
электронная почта: lpetr65@yahoo.com

² Department of Physiology and Biophysics, University of California,
Irvine, 92697, USA

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва

⁴ Institut de Biologie Structurale, Universite Grenoble Alpes,
38044 Grenoble, France

⁵ Institut de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche
Scientifique, 38044 Grenoble, France

⁶ Institut de Biologie Structurale, Direction des Sciences du Vivant,
Commissariat a l'Energie Atomique, 38044 Grenoble, France

⁷ Московский физико-технический институт, Лаборатория
перспективных исследований мембранных белков,
141700 Долгопрудный Московской обл.

⁸ Institute of Complex Systems (ICS), ICS-6: Structural Biochemistry,
Research Centre Julich, 52425 Julich, Germany

Поступила в редакцию 12.01.15

После доработки 10.03.15

Рассмотрены свойства ретинального белка (ESR) психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, представляющего собой светозависимую протонную помпу. Уникальной структурной особенностью ESR является наличие остатка лизина в положении, соответствующем внутрибелковому донору протонов для основания Шиффа. Мы показали, что Lys96 успешно выполняет в молекуле ESR функцию донора, облегчая доставку протонов с цитоплазматической поверхности белка к основанию Шиффа. Поскольку поглощение протонов предшествует репротонированию основания Шиффа, можно предположить, что в исходном состоянии этот остаток не заряжен и приобретает протон в течение короткого промежутка времени после депротонирования основания Шиффа и образования интермедиата М. Это отличает ESR от родственных ретинальных белков – бактериородопсина (BR), протерородопсина (PR) и ксантородопсина (XR), в которых функцию донора выполняют остатки с карбоксильной группой, протонированные в исходном состоянии. Как и другие протонные помпы эубактерий (PR и XR), ESR содержит остаток гистидина, взаимодействующий с акцептором протонов Asp85. Это взаимодействие приводит к сдвигу рКа акцептора в более кислую область по сравнению с PR, обеспечивая его способность к функционированию в широком диапазоне pH. Наличие сильной водородной связи между остатками Asp85 и His57, структура вероятных протонпереносящих путей с цитоплазматической поверхности к основанию Шиффа и к наружной поверхности и другие особенности ESR продемонстрированы благодаря расшифровке его пространственной структуры, которая выявляет ряд отличий от известных структур BR и XR. Структура ESR, схема фотоцикла и реакций переноса протонов обсуждаются в сравнении с гомологичными ретинальными белками.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретинальный белок, протерородопсин, *Exiguobacterium sibiricum*, основание Шиффа, акцептор протонов, донор протонов, фотоцикл.

Принятые сокращения: ESR – ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*; BR – бактериородопсин *Halobacterium salinarum*; PR – протерородопсин; XR – ксантородопсин *Salinibacter ruber*; GR – ксантородопсин *Gloeobacter violaceus*; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белками; ДДМ – n-додецил-β-D-мальтопиранозид; LPG – 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфо-1'-гас-глицерин.

* Адресат для корреспонденции.

В 2008 г. в BMC Genomics была опубликована статья, посвященная расшифровке генома *Exiguobacterium sibiricum* – микроорганизма, выделенного из вечномерзлого грунта возрастом ~3 млн лет. На основании аннотации кодирующих последовательностей в ней было высказано предположение о том, что эта психротрофная бактерия может продуцировать родопсин [1]. Экспрессия соответствующего гена в *E. coli* продемонстрировала функциональное сходство рекомбинантного родопсина с другими ретинальными белками – переносчиками протонов [2]. К этому моменту прошло уже около 40 лет после открытия первого протонного насоса такого рода – бактериородопсина (BR) пурпурных мембран галофильных архей *Halobacterium salinarum* [3]. За эти годы были опубликованы сотни работ, посвященных расшифровке механизма, с помощью которого энергия поглощенного кванта света преобразуется молекулой этого белка в электрохимический градиент протонов на мембране.

Важнейшими вехами на этом пути стали определение аминокислотной последовательности BR [4, 5], доказательство электрогенности переноса протонов [6, 7], определение пространственной структуры белка [8, 9], разработка системы мутагенеза в *H. salinarum* [10], получение данных рентгеноструктурного анализа высокого разрешения [11]. Было установлено, что каждая молекула BR состоит из двух компонентов: белка-опсина и хромофора – *all-trans*-ретиналя, связанного с остатком Lys216 через Шиффово основание [4]. После поглощения света происходит изомеризация ретиналя в *13-cis*-конфигурацию [12, 13] с образованием короткоживущего состояния (интермедиата) К [14, 15]. В результате последующих конформационных изменений хромофора, заканчивающихся его возвращением в *all-trans*-конфигурацию, и сопровождающих их структурных перестроек белка, которые характеризуются образованием интермедиатов L, M, N и O, происходит освобождение протона на внешней поверхности белка и его поглощение с цитоплазматической поверхности [16].

Ключевым событием в фотоцикле BR является перенос протона с основания Шиффа на акцептор – остаток Asp85 [17], сопровождаемый образованием интермедиата М (депротонированного основания Шиффа). Показано, что принципиальное значение для функционирования белка имеет система водородных связей, соединяющая акцептор протона Asp85 и соседние остатки (Arg82, Asp212 и другие) [11]. Репротонирование основания Шиффа осуществляется с участием внутрибелкового донора – остатка

Asp96 [18]. Продемонстрировано, что транспорт протона является результатом последовательных изменений рКа основания Шиффа и ключевых аминокислотных остатков в результате конформационных перестроек [19]. Пространственные структуры различных интермедиатов BR были исследованы с помощью метода рентгеновской кристаллографии при низких температурах [20–22]. В целом в настоящее время BR является одним из наиболее изученных мембранных белков.

В 2000 г. семейство ретиналь-содержащих белков пополнилось протеородопсином (PR), ген которого был открыт в результате секвенирования метагеномной библиотеки, полученной из морского микропланктона [23]. Оказалось, что «зеленый» (названный по положению максимумом поглощения) протеородопсин (GPR) проходит те же основные стадии фотоцикла, которые характерны и для BR, однако рКа первичного акцептора Asp97 в его молекуле существенно выше (7,5 против 2,5 у BR). Кроме того, выделение протона молекулой PR происходит во второй части фотоцикла, после его поглощения из цитоплазмы.

Впоследствии было обнаружено существование огромного количества структурных аналогов BR у протеобактерий, актиномицетов, цианобактерий, грибов и других микроорганизмов [24]. Аминокислотные последовательности всех этих белков обладают определенной степенью гомологии, при этом ключевые позиции в них занимают те же аминокислотные остатки, что и в BR, или гомологичные остатки с аналогичными функциональными группами. Так, акцептором протонов в молекулах всех транспортных родопсинов является аспарат, а функцию донора протонов выполняет аспарат или глутамат. Таким образом, обнаружение гена нового ретинального белка в 2008 г. уже не являлось сенсацией, и нужны были веские причины, чтобы начать работу по его получению и исследованию.

Таких причин оказалось две. Во-первых, интерес представляло наличие кодирующей последовательности ретинального белка (мы назвали его ESR от *Exiguobacterium sibiricum* rhodopsin) в геноме психротрофной почвенной бактерии [2]. Все ранее известные микробные родопсины принадлежали галофильным археям или морским микроорганизмам, а *E. sibiricum* была выделена из грунта, имеющего пресноводное происхождение. Во-вторых, сравнение аминокислотных последовательностей ESR, BR и PR выявило консервативный характер всех ключевых аминокислотных остатков, предположительно участвующих в транспорте протона, за исключением одного. В положении, соответствующем

донору протонов для основания Шиффа, вместо привычного карбоксильного остатка в молекуле ESR обнаруживается остаток лизина (Lys96) (рис. 1). Позднее этот остаток в соответствующем положении был обнаружен у протеородопсинов родственных видов, например, *Exiguobacterium* AT1b, обитающей в горячем источнике в Йеллоустонском парке [25], а также у потенциальных ретинальных белков океанских протеобактерий [26]. Наличие такой уникальной структурной особенности вызвало ряд вопросов, на которые отвечали в процессе исследования этого интереснейшего ретинального белка.

ОСОБЕННОСТИ ФОТОЦИКЛА ESR В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ И ЕГО СВЯЗЬ С ВЫДЕЛЕНИЕМ ПРОТОНА

Рекомбинантный ESR с гексагистидиновой последовательностью на C-конце был экспрессирован нами в *Escherichia coli*, экстрагирован из мембранной фракции клеток бактерий в присут-

ствии детергента п-додецил-β-D-мальтопиранозид (ДДМ) и очищен с помощью металлоаффинной хроматографии [2]. При pH 7 спектр поглощения полученного препарата демонстрировал максимум при 532 нм (рис. 2, а), короче, чем у BR и XR, и ближе к максимуму поглощения GPR. Для доказательства протон-транспортной активности ESR были изучены светоиндуцированные изменения pH в суспензии протеолипосом со встроенным белком или экспрессирующих его клеток *E. coli*. В ответ на освещение происходило закисление раствора, что соответствует переносу протонов наружу из клеток или протеолипосом, содержащих ESR (рис. 2, б). Работа протонной помпы наблюдалась в широком диапазоне pH – между 4,5 и 8,5. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что новый ретинальный белок является представителем семейства транспортных родопсинов, выполняющих функцию протонных насосов.

Фотоцикл ESR исследовали методом импульсной лазерной спектроскопии (флэш-фотолиза). Оказалось, что при нейтральных значе-

ESR/1-252	1	-----MEEVNL LVLAT-----QYMFVWVGFVGM AAG TLYFLVERN SLA-PE	39
PR/1-249	1	MKLLL ILG SVIALP TFAAGGGDL DAS DYTGV SFWL VTAALLAS TVFFF VERDRVS -AK	57
XR/1-273	1	-----MLQELP TL TPG-----QYSLVFNMFSF TVATMTAS FVFFVL ARNNVA -PK	44
BR/1-249	1	-----QAQ I TGRPE-----WIWLALG TALMGLG TLYFLV KGMGVS DPD	38
ESR/1-252	40	YRS TATVAALVTFVAAIHYYFMKDAVGTSGLLSEIDGFPT-----EIRYIDWLVTTTP	91
PR/1-249	58	WK TSLTVSGLVTGIAFWHYMYMR-----GVWIE TGDSPT-----VFRYIDWLLTVP	103
XR/1-273	45	YR ISMMVSALVVF IAGYHYFRITSSWEAAYALQNGMYQP TGELFNDA YRYVDWLLTVP	102
BR/1-249	39	AKKFYA ITTLVPAIAFTMYLSMLLG YGLTMVPFGGEQNP IY-----WARYADWLF TTP	91
ESR/1-252	92	LLLVKFP LLLGLKGR LGRPLLTKLVIADVIMIVGGYIGESS INIAGGF TQLGLWSYL I	149
PR/1-249	104	LLICEFY LILAAA TNVAGSLFKKLLVGS LVMVFGYMG EAG IMAA-----WPAFII I	154
XR/1-273	103	LLTYELV LVMGLPKNERGPLAAKLGFLAALMIVLGY PGEVSENAALFG TR -GLWGFLS	159
BR/1-249	92	LLLLDLALLVDADQG-----TILALV GADGIMIG TGLV GALT KVYSYR-----FVWVA I	140
ESR/1-252	150	GCFAWIYI IYLLFTNVT KAAENKPAP -IRDALLKMRLF ILIGWAIYPIGYAVTLFAPG	206
PR/1-249	155	GCLAWVYMIYELWAGEGKSACNTASPAVQSAYNTMMYI IIFGWAIYPVGYFTGYLMGD	212
XR/1-273	160	-TIPFVWILYILFTQLGDTIQRQSSR -VSTLLGNARLLLLATWGFYPIAYMIPMAFPE	215
BR/1-249	141	STAAML YILYVLFPGFT -SKAESMRPEVAS TFKVLRNVTVVLWS AYPV VWLIGSEGAG	197
ESR/1-252	207	V-----EIQLVRELIYNFADLTKVGFGLIAFFAVKTMS SLSSSKGKTLTS-----	252
PR/1-249	213	G-----GSALN LNIYNLADFVNKILFGLI IWNVAVKES SNA-----	249
XR/1-273	216	AFPSNTPGTIVALQVGYTIADVLA KAGYGVLIYNI AKAKSEEEGFNVSEMV EPATASA	273
BR/1-249	198	IVP-----LNIETLLFMVLDVSAK VGFGLI LLRSRAIFGEAEAPEPS AGDGA AATS D	249

Рис. 1. Сопоставление аминокислотных последовательностей ESR и гомологичных ретинальных белков с помощью программы CLUSTAL 2.1. Рамками выделены положения, соответствующие аминокислотным остаткам Asp85, Lys96, Lys225 в молекуле ESR

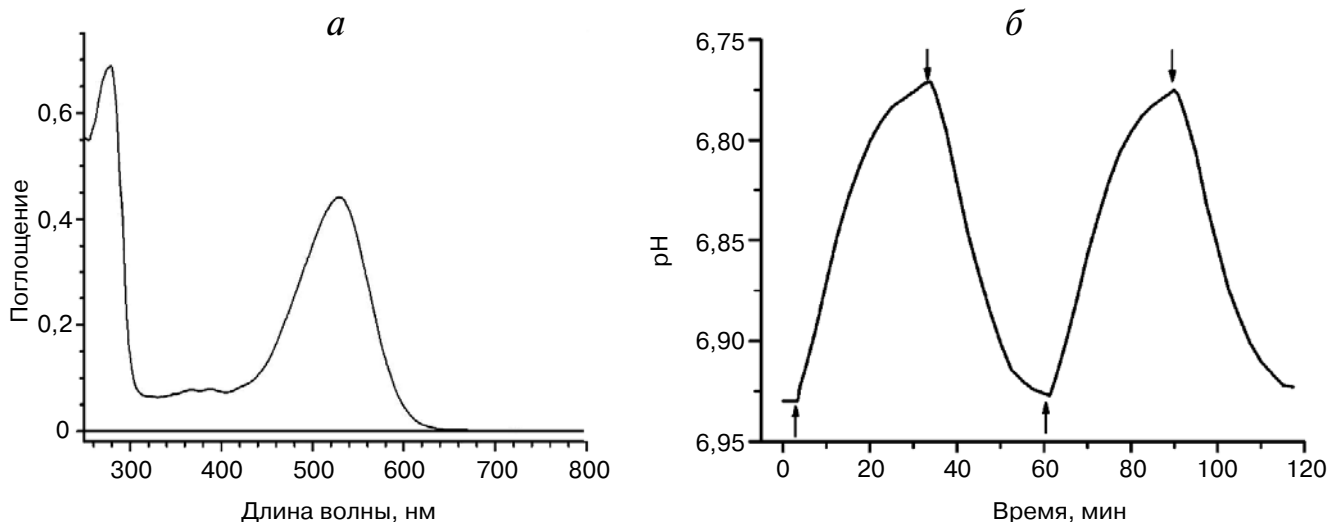


Рис. 2. Свойства рекомбинантного ESR. *a* – Спектр поглощения образца в буфере 50 мМ фосфат натрия, 100 мМ NaCl, 0,2%-ный ДДМ, pH 8,0; *б* – светоиндуцированный выброс протонов протеолипосомами, содержащими ESR. Стрелками указаны моменты включения и выключения света

ниях pH ESR в мицеллах ДДМ в ответ на вспышку света образует преимущественно поглощающие в области длинных волн интермедиаты (К-, L- и N/O-подобные), а количество M-интермедиата, соответствующего депротонированному основанию Шиффа, с максимумом поглощения 410 нм крайне мало (рис. 3, *a*). При увеличении pH выше 9 наблюдается быстрое появление интермедиата M, которое достигает максимума за ~4 мс после вспышки (рис. 3, *б*). рКа образования M в мицеллах ДДМ составляет ~8,8–9 [27].

После распада M в результате репротонирования основания Шиффа образуется состояние, аналогичное N- или O-интермедиату фотоцикла BR. Как впоследствии было показано с помощью метода инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием (FTIR), реизомеризация ретиналя является одной из самых медленных стадий и происходит в самом конце фотоцикла ESR, что приводит к преобладанию интермедиата N-типа с ретиналем в *13-cis*-конфигурации [28].

Исследования фотоцикла ESR в составе протеолипосом или липидо-подобного детергента LPG (16:0 Lyso PG) [29] обнаружили наличие тех же закономерностей, что и в белке, солюбилизованном в мицеллах ДДМ, однако интермедиат M в этих средах появлялся уже при нейтральных pH (рКа его образования составило ~6,5) и распадался значительно быстрее (рис. 3, *в*, *г*). Так же, как и в ДДМ, количество M-интермедиата при исследовании ESR в липидном ок-

ружении росло по мере увеличения pH. Таким образом, интересной особенностью ESR является существенная зависимость параметров фотоцикла от окружения.

С целью изучения временной последовательности событий в процессе транспорта протонов ESR были проведены эксперименты с использованием pH-чувствительного красителя пиранина (рКа ~7,2). Увеличение поглощения пиранина при 460 нм в ответ на вспышку соответствует поглощению протона из среды, а снижение – его выделению. Несмотря на небольшое количество интермедиата M в фотоцикле ESR в мицеллах ДДМ, при pH 7,2 наблюдается значительный сигнал пиранина, причем, в отличие от BR, в этом белке вначале происходит захват протона ($\tau \sim 12$ мс), а затем его выход наружу ($\tau \sim 120$ мс). Подобная последовательность событий типична для многих эубактериальных протонных насосов и объясняется отсутствием в их молекулах гомологов остатков Glu194 и Glu204, образующих группу освобождения протона в молекуле BR (обзоры [30, 31]).

Исследование препарата ESR, солюбилизованного в мицеллах LPG, благодаря наличию большого количества интермедиата M уже при pH 7,2 позволило детально сопоставить кинетику транспорта протона с фотоциклом белка. Захват протона в этих условиях происходит с $\tau \sim 0,9$ мс, что практически совпадает со временем распада интермедиата M и образования интермедиата N, т.е. репротонирования основания Шиффа. Высвобождение протона характеризу-

ется $\tau \sim 64$ мс и коррелирует с распадом длинноволнового интермедиата и возвращением исходного состояния (рис. 4).

Для того, чтобы понять, вовлекается ли в процесс переноса H^+ промежуточная донорно-акцепторная группа, необходимо было определить, предшествует ли захват протона репротонированию основания Шиффа, или наоборот. В этом нам помогла замена H_2O в образце ESR на D_2O [29]. Из работ, посвященных исследованию BR, было известно, что различные стадии фоточикла замедляются в тяжелой воде по-разному. Этот кинетический эффект проявился и в данном случае: скорость распада M-интермедиата снизилась в три раза ($\tau \sim 3$ мс), а скорость захва-

та протона — только в 2,3 раза ($\tau \sim 2$ мс). Следовательно, использование тяжелой воды позволило более четко разделить во времени процессы поглощения протона и репротонирования основания Шиффа и однозначно продемонстрировать, что первый предшествует второму. Вначале происходит захват протона определенной группой в молекуле белка, которая в исходном состоянии его не содержит, а затем, после небольшой задержки, протон передается на основание Шиффа. Таким образом, эта группа служит донором протонов для основания Шиффа в молекуле ESR. Данные о природе этой группы были получены в экспериментах с мутантами ESR.

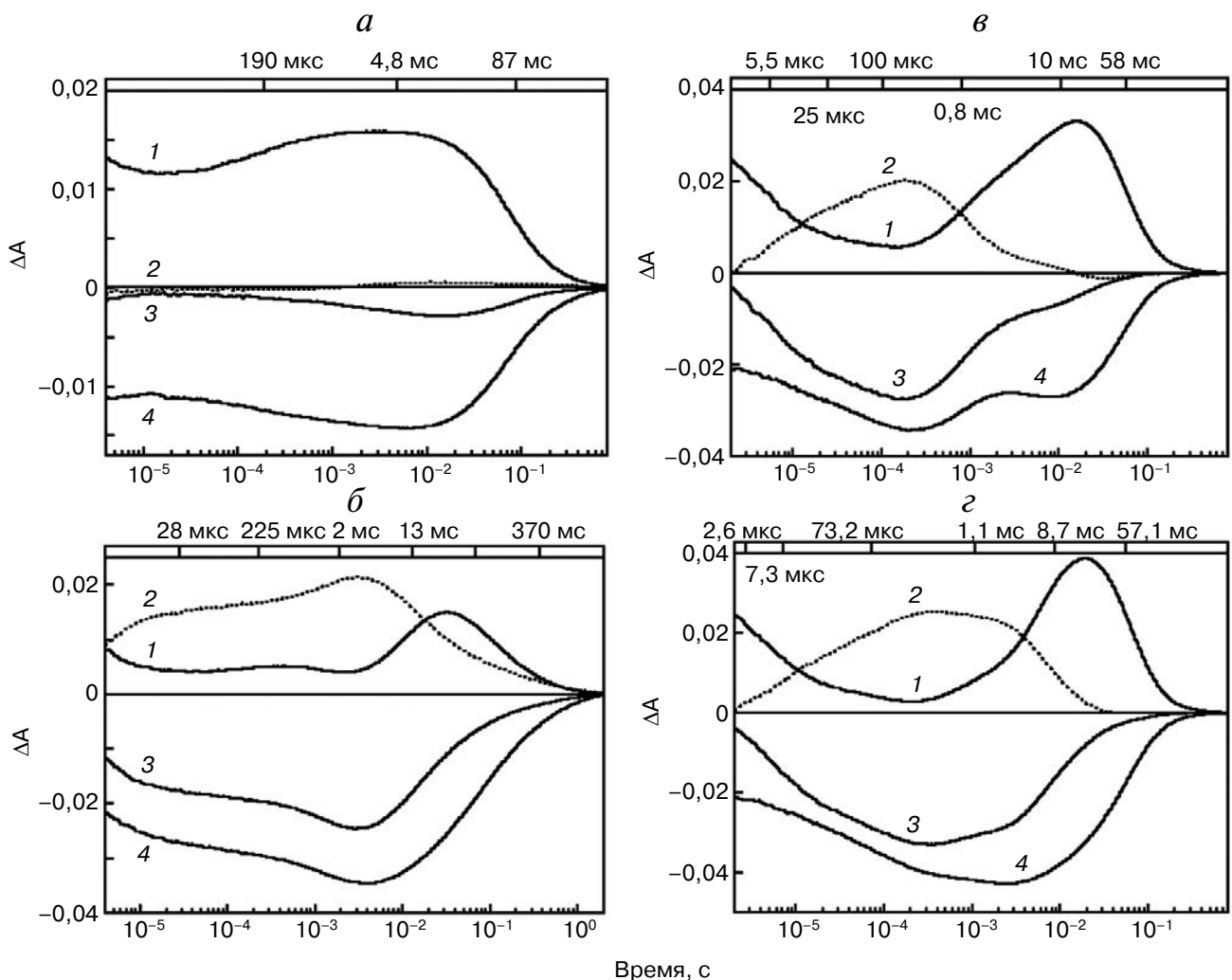


Рис. 3. Фоточикл ESR в мицеллах ДДМ (а, б) и LPG (в, з) при pH 7,6 (а), 9,1 (б), 7,1 (в), 8,7 (з). 1 — Изменения поглощения при 590 нм вследствие образования и распада К-, N- и O-интермедиатов, 2 — изменения поглощения при 410 нм, вызванные образованием и распадом M-интермедиата, 3 — изменения поглощения при 550 нм вследствие распада и возвращения M- и N-интермедиатов, 4 — изменения поглощения при 510 нм вследствие распада K и возврата O в исходное состояние. Цифры на верхней панели рисунка обозначают временные константы, определенные в результате кинетического анализа изменений поглощения. Адаптировано из [27] и [29] с разрешения American Chemical Society и American Society for Biochemistry and Molecular Biology

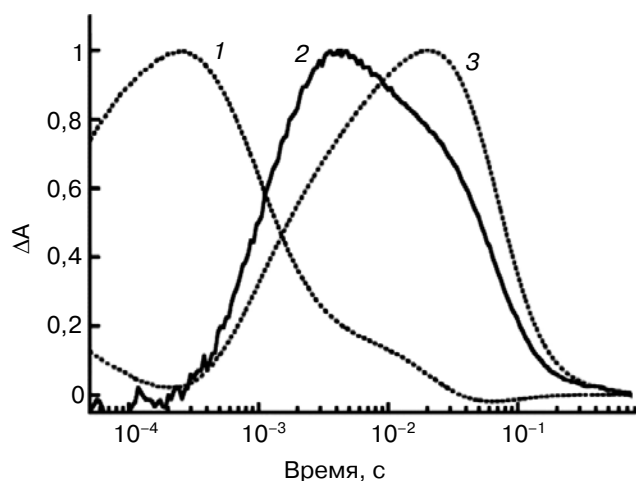


Рис. 4. Кинетика светоиндуцированного поглощения и выделения протонов ESR в сравнении с кинетикой интермедиатов фотоцикла при pH 7,2. 1 – Изменения поглощения при 410 нм, вызванные образованием М-интермедиата и его переходом в N, 2 – изменения поглощения пиранина при 455 нм вследствие поглощения и выделения протона, 3 – изменения поглощения при 590 нм вследствие образования N- и O-интермедиатов. Адаптировано из [29]

Присутствует ли интермедиат М в фотоцикле ESR при pH < pKa его образования? Данные, позволившие уточнить последовательность появления интермедиатов в фотоцикле ESR в различных условиях, были получены с помощью метода инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием (FTIR). Полоса, соответствующая депротонированному основанию Шиффа, обнаруживается в этих спектрах уже при pH ~5. Кроме того, в фотоцикле мутанта K96A в ДДМ благодаря низкой скорости распада интермедиата М даже при pH 7,6 наблюдается его медленное образование ($\tau \sim 12$ мс). Можно предположить, что отсутствие накопления М в фотоцикле дикого типа белка при нейтральных значениях pH объясняется кинетическими причинами, т.е. скорость распада этого интермедиата превышает скорость его образования.

РОЛЬ ОСТАТКА LYS96 В ПРОЦЕССЕ РЕПРОТОНИРОВАНИЯ ОСНОВАНИЯ ШИФФА

Как отмечалось выше, интригующей отличительной особенностью аминокислотной последовательности ESR является наличие остатка лизина в положении, соответствующем внутрибелковому донору протонов для основания Шиффа. Для функциональной характеристики его роли в процессе репротонирования мы по-

лучили и исследовали различные мутантные варианты белка, содержащие замены этого остатка [29]. Наиболее полно был изучен мутант K96A, свойства которого рассматриваются в этом разделе.

При pH 7,4 скорость образования М практически одинакова для K96A и белка дикого типа, полученный в мицеллах LPG, однако скорость его распада, т.е. репротонирования основания Шиффа в мутантном варианте более чем в 500 раз ниже (рис. 5, а). Это приводит к видимому отсутствию длинноволновых интермедиатов, следующих за М в фотоцикле ESR, а также к общему замедлению фотоцикла данного мутанта, лимитирующей стадией которого является репротонирование основания Шиффа. Поскольку в мутанте K96A репротонирование основания Шиффа происходит непосредственно из окружающей среды, увеличение pH в диапазоне от 7 до 9 сопровождается линейным замедлением скорости распада интермедиата М более, чем на порядок. Кроме того, мутантный вариант ESR, включенный в состав протеолипосом или экспрессированный в клеточной мембране *E. coli*, обладает пониженной способностью транспортировать протоны по сравнению с белком дикого типа (рис. 5, б).

Таким образом, можно утверждать, что этот остаток в молекуле ESR способствует репротонированию, т.е. выполняет функцию донора протонов для основания Шиффа. *ESR, следовательно, представляет собой первый пример протон-транспортного родопсина, в котором в этой роли выступает остаток, не имеющий карбоксильной группы.* Ранее наличие такой группы в положении, соответствующем донору протонов, считалось необходимым условием для осуществления протонного транспорта наряду с карбоксильным остатком в акцепторном положении ретинальных белков [32]. Благодаря обнаружению и исследованию ESR, это правило впервые было скорректировано [29].

Можно представить себе два варианта участия Lys96 в репротонировании основания Шиффа в молекуле ESR. Функцию донора может выполнять непосредственно ϵ -аминогруппа остатка лизина, которая временно приобретает протон после образования интермедиата М. Затем, после передачи протона на основание Шиффа, она возвращается в исходное непротонированное состояние. Известно, что pKa остатка лизина сильно зависит от окружения [33]. В исходном состоянии ESR Lys96 окружен преимущественно гидрофобными остатками, что может способствовать снижению его pKa. В момент образования интермедиата М предположительно происходит увеличение гидрофильной по-

лости в цитоплазматической части молекулы, обеспечивающее повышение рКа остатка лизина и захват им протона.

В настоящее время нельзя исключить и второй вариант с участием боковой цепи остатка лизина в системе водородных связей, включающих молекулы воды, которая также может служить источником протона. При этом степень протонирования самого Lys96 может и не изменяться.

Могут ли карбоксильные остатки выполнять функцию донора протонов в молекуле ESR? Для ответа на этот вопрос мы сконструировали мутанты ESR, содержащие замены остатка Lys96

на карбоксильные остатки (Asp или Glu) и планируем выяснить, будет ли репротонирование основания Шиффа в них происходить так же быстро, как и в белке дикого типа.

РОЛЬ ОСТАТКА HIS57 В ОПРЕДЕЛЕНИИ рКа АКЦЕПТОРА ПРОТОНОВ ASP85

Известно, что функция и положение максимума поглощения ретинальных белков зависят от протонирования остатка аспарагиновой кислоты (Asp85 в BR), представляющего собой акцептор протонов от основания Шиффа. При

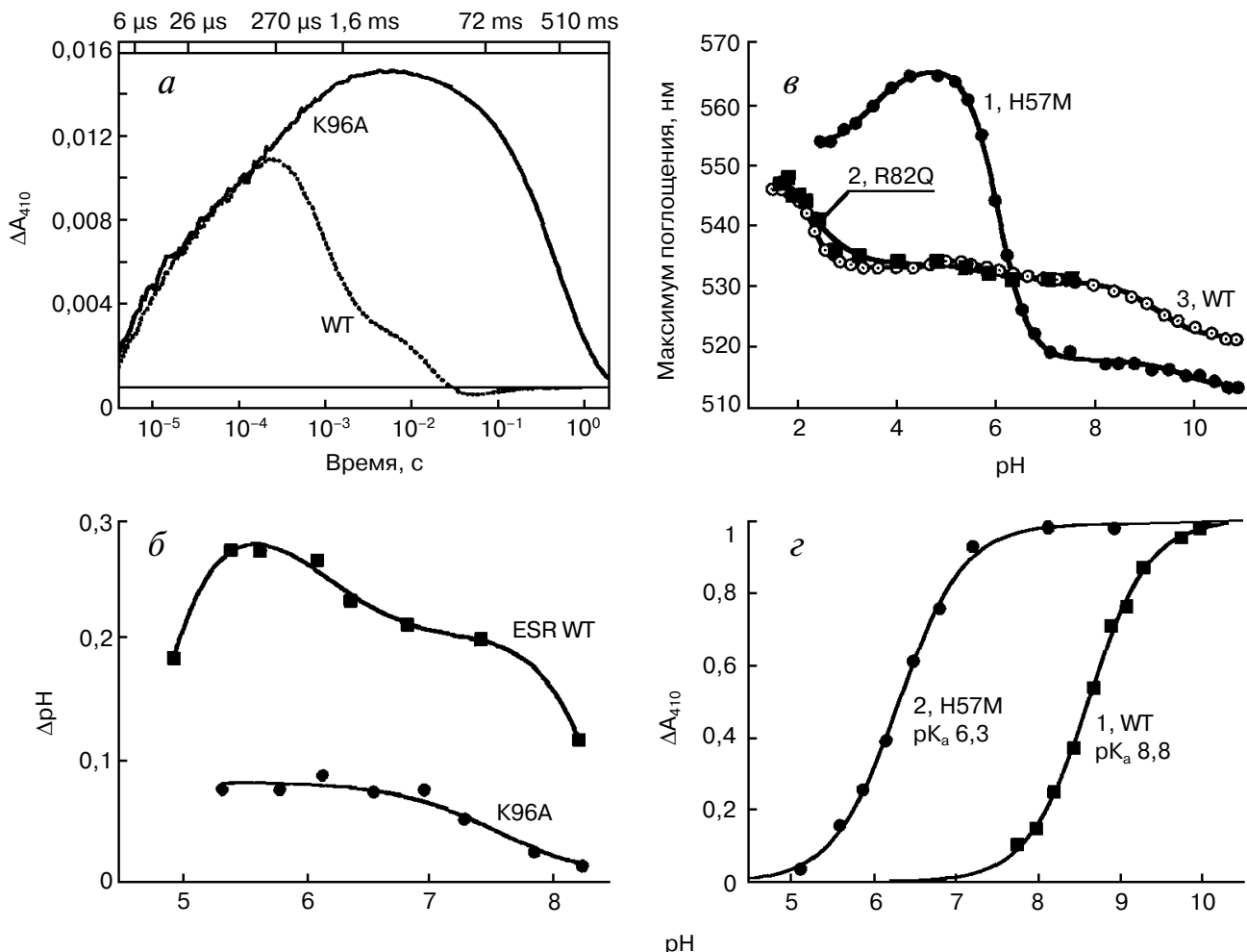


Рис. 5. Свойства мутантов ESR. *a* – Светоиндуцированные изменения поглощения при 410 нм ESR дикого типа в сравнении с K96A, демонстрирующие замедление репротонирования основания Шиффа в мутанте; *б* – светоиндуцированные изменения рН в суспензии клеток *E. coli*, экспрессирующих ESR дикого типа и мутант K96A; *в* – рН зависимость максимума поглощения H57M в сравнении с диким типом белка и с мутантом R82Q; *г* – рН зависимость интенсивности светоиндуцированных изменений поглощения при 410 нм (выхода интермедиата М) H57M в сравнении с диким типом белка. Адаптировано из [27] и [29]

увеличении рН до определенного значения происходит потеря протона боковой цепью этого остатка, в результате чего он приобретает способность выполнять акцепторную функцию, т.е. принимать протоны от основания Шиффа, и в исходном состоянии служить противоионом основания Шиффа. Депротонирование сопровождается сдвигом спектра поглощения в коротковолновую область. Поэтому изучение рН-зависимости максимума поглощения ретинальных белков обеспечивает исследователей важной информацией о механизме их функционирования в различных условиях и влияющих на него факторах. Так, кривая титрования максимума поглощения BR обнаруживает сложную зависимость с двумя рКа – 2,6 и 9,7 [34], отражающую взаимодействие акцептора протонов Asp85 с остатками, образующими группу освобождения протона, в первую очередь с Arg82, Glu204 и Glu194 [30]. Для PR характерен сдвиг максимума в диапазоне 543–520 нм, происходящий с рКа 7,1 и соответствующий депротонированию остатка Asp97 [35]. Максимум поглощения обоих этих белков при минимальных исследованных значениях рН практически совпадает с максимумом поглощения мутантных вариантов, содержащих замены остатка аспарагиновой кислоты на аспарагин, которые элиминируют отрицательный заряд противоиона.

Зависимость максимума поглощения ESR от рН среды имеет сложный характер и включает три перехода с рКа 2,3, 6,0 и 9,1. Общий сдвиг максимума составляет около 24 нм (от 545 до 521 нм) в диапазоне рН 2,0–10,5 (рис. 5, в). Мутантный вариант D85N, содержащий замену Asp85 на остаток аспарагина, демонстрирует максимум поглощения при 563 нм. Следовательно, при рН >3 большая часть молекул ESR содержит акцептор в депротонированном состоянии, позволяя данному белку транспортировать протоны в широком диапазоне рН. Для исследования причин комплексной зависимости спектральных характеристик ESR при титровании мы изучили свойства некоторых мутантных вариантов белка.

Оказалось, что рН-зависимость максимума поглощения мутанта R82Q практически совпадает с кривой, полученной для дикого типа ESR (рис. 5, в). Это позволяет предположить, что в молекуле ESR, в отличие от BR [36, 37], остаток Arg82 слабо связан с акцептором протонов от основания Шиффа. Аналогичная ситуация наблюдается в молекуле PR [38]. Напротив, замена остатка His57 остатком метионина в мутанте H57M сопровождается существенным изменением свойств акцепторного комплекса. При рН 5,0 максимум поглощения данного мутанта состав-

ляет 565 нм, что почти совпадает с максимумом поглощения мутанта D85N. Это означает, что в белке H57M при рН 5,0 акцептор протонов Asp85 находится в полностью протонированном состоянии. С увеличением рН до 8,5 наблюдается значительный (на 47 нм) сдвиг максимума поглощения мутанта до 517 нм с рКа 6,3, соответствующий рКа Asp85 в H57M (рис. 5, в).

Большое увеличение рКа акцептора протонов Asp85 в мутанте H57M по сравнению с диким типом белка позволяет утверждать, что в молекуле последнего остаток His57 тесно взаимодействует с остатком Asp85, понижая его рКа. Вследствие этого акцепторный остаток Asp85 оказывается в депротонированном состоянии в широком диапазоне рН. Именно это взаимодействие, по-видимому, определяет комплексный характер рН-зависимости максимума поглощения дикого типа ESR.

Присутствие остатка гистидина в положении, соответствующем His57 ESR, является характерной чертой эубактериальных транспортных родопсинов, включая PR [39], XR [40] и GR [41]. При этом XR, подобно ESR, демонстрирует лишь незначительный сдвиг максимума поглощения (на 3–5 нм) при увеличении рН от 4,0 до 10. Исследование пространственной структуры XR обнаружило, что остатки His62 и Asp96 находятся в его молекуле на расстоянии ~2,5 Å и образуют прочную водородную связь [40]. К сожалению, данные о свойствах мутантов XR, содержащих замены остатка His62, в настоящее время недоступны из-за отсутствия эффективной системы экспрессии данного белка в *E. coli*. Титрование PR в диапазоне рН 6,0–10 приводит к более значительному сдвигу его максимума поглощения (на 23 нм). В отличие от ESR, замены остатка His75 в этом белке приводят к сдвигу рН-зависимости максимума поглощения мутантов в более кислую область [39, 42]. Таким образом, можно утверждать, что структура акцепторного комплекса в этом белке, по-видимому, значительно отличается от ESR.

Исследование фотоцикла мутанта H57M при различных рН обнаружило, что появление интермедиата М (депротонированного основания Шиффа) происходит при более низких значениях рН, чем в белке дикого типа, с рКа 6,3 (рис. 5, г). Это значение соответствует рКа сдвига максимума поглощения мутанта H57M (см. выше), т.е. рКа депротонирования акцептора протонов Asp85 в исходном состоянии. Депротонирование основания Шиффа в H57M происходит гораздо быстрее, чем в белке дикого типа, что соответствует более высокому рКа акцептора (Asp85). В целом фотоцикл этого мутанта характеризуется более высокой скоростью, чем фото-

цикл ESR дикого типа, что характерно также для мутантов по остатку His75 PR [42].

Таким образом, полученные результаты дают основание предполагать, что в белке дикого типа при нейтральных и кислых значениях pH остаток His57 протонирован и тесно взаимодействует с Asp85, понижая рКа последнего. В процессе фотоцикла изомеризация ретиналя предположительно приводит к разрушению водородной связи между этими остатками и депротонированию His57 или изменению расположения His57 по отношению к Asp85, подобно тому, которое происходит с остатком Arg82 в BR [36, 43]. В результате этих событий рКа акцептора временно повышается, и он приобретает способность принимать протон от основания Шиффа.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ESR

Пространственная структура ESR была исследована методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,3 Å [44]. Согласно полученным данным, этот белок, как и BR, относится к структурному семейству мембранных белков, содержащих семь α -спиральных сегментов, которое включает все известные в настоящее

время ретинальные белки, в том числе зрительный родопсин [45], а также рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR) [46–48].

Подобно другим представителям семейства микробных транспортных родопсинов, ESR содержит остаток ретиналя в *all-trans*-конфигурации, ковалентно связанный с остатком Lys225. Протонированное основание Шиффа обращено в сторону внеклеточной части белка и связано водородными связями через молекулу воды W402 с карбоксильными остатками, образующими противоион – Asp85 и Asp221 (рис. 6, а). Эта конфигурация, стабилизирующая положительный заряд основания Шиффа, встречается в большинстве известных транспортных родопсинов, выполняющих функцию протонных насосов. Боковая цепь остатка Asp85 в молекуле ESR ориентирована так же, как и в BR, в отличие от XR, в котором она развернута по-другому [40]. Как и в молекуле BR, в непосредственной близости от ретиналя обнаруживается еще одна молекула воды W406, формирующая водородную связь с остатком Asp221. Если для BR в исходном состоянии характерно сопряжение Arg82 с акцептором протонов Asp85, то в молекуле ESR боковая цепь этого остатка направлена наружу от основания Шиффа, подобно его расположению в М-интерmediate BR, и связана водородной связью с остатком Glu130. Такая конфигу-

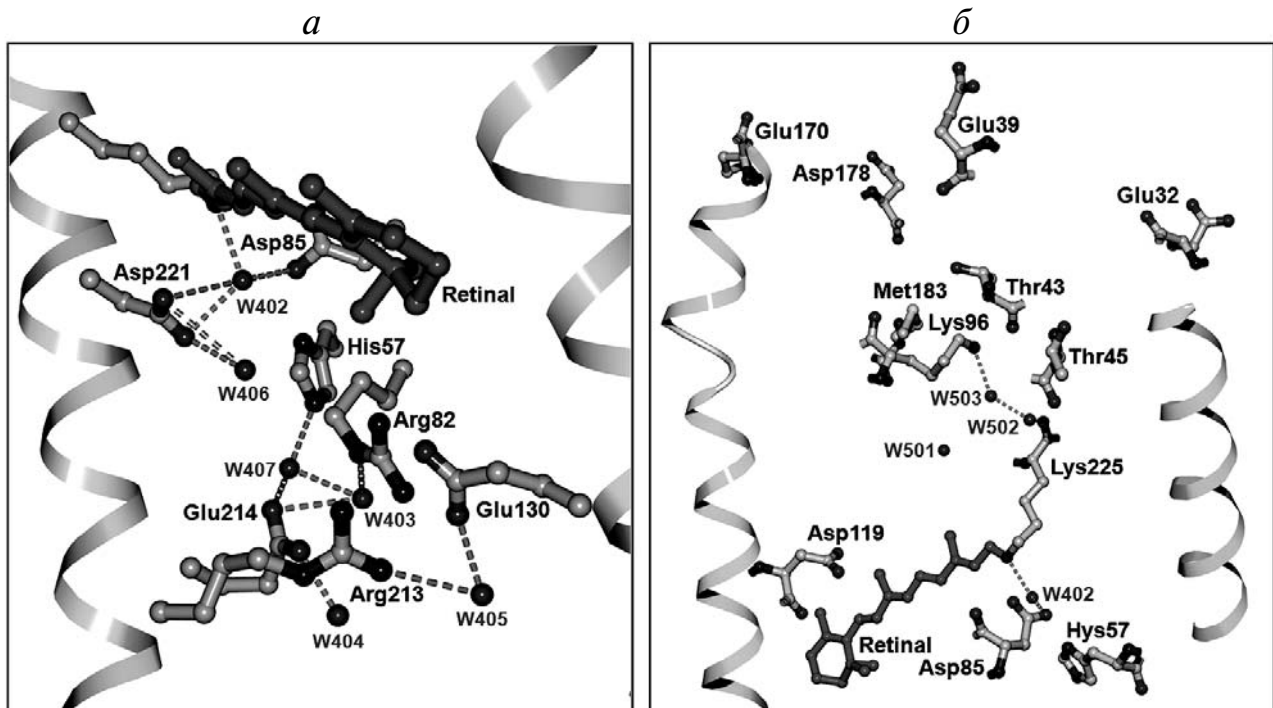


Рис. 6. Пространственная структура ESR. а – Наружная часть белка; б – цитоплазматическая часть белка

рация объясняет обсуждавшееся выше отсутствие влияния Arg82 на функциональное состояние (степень протонирования) акцептора протонов Asp85 в ESR [27]. От ранее исследованных транспортных родопсинов ESR отличается наличием изгиба α -спирали F в районе 185-го остатка. Соответствующий участок спирали стабилизируется благодаря водородным связям с боковыми цепями остатков Trp154 и Asp224, которые обнаруживаются в гомологичных положениях в молекулах всех протеородопсинов. Смысл этой универсальности до конца непонятен.

Обнаруженное нами влияние остатка His57 на свойства акцептора также нашло свое объяснение в пространственной структуре ESR. Расстояние между этими остатками очень короткое и составляет $\sim 2,4$ Å, что предполагает образование прочной водородной связи. Аналогичная связь обнаруживается в структуре XR [40], однако ее конфигурация существенно отличается. В молекуле ESR боковая цепь остатка гистидина развернута в направлении Arg82 и находится в гидрофильной полости, содержащей несколько молекул воды. В XR боковая цепь His62 развернута в противоположном направлении.

Как указывалось выше, в молекуле ESR отсутствуют непосредственные гомологи остатков Glu194 и Glu204, составляющих вместе с молекулами связанной воды группу высвобождения протона BR [49]. Предполагается, что это является причиной наблюдаемого нами обратного (по сравнению с BR) порядка реакций переноса протона: вначале происходит его поглощение на цитоплазматической стороне белка, а затем освобождение на противоположной стороне неизвестным остатком или группой остатков. Наличие гидрофильной полости, соединяющей внеклеточную часть ESR с акцепторным комплексом His57–Asp85, позволяет сделать предположение об их непосредственной роли в качестве источника протонов. Кроме того, в этой части белка обнаруживается большое количество полярных и заряженных остатков, соединенных водородными связями, которые также могут претендовать на роль источников протонов. В частности, привлекает внимание цепь водородных связей, соединяющих остаток His57 с Asp214 через молекулу воды W407.

Как уже обсуждалось, в отличие от других представителей семейства протон-транспортных родопсинов, в положении ESR, соответствующем донору протонов для основания Шиффа, содержится не карбоксильный остаток, а остаток лизина. Lys96 окружен преимущественно гидрофобными остатками, однако от гидрофильной полости его отделяет лишь полярная боковая цепь остатка Thr43 (рис. 6, б).

Такая близость донора протонов к среде отличает ESR от других протонных помп с известной структурой (BR, XR и HmBR [50]) и может определять быстрый доступ протонов из цитоплазмы в процессе репротонирования. Между основанием Шиффа и остатком Lys96 располагается боковая цепь остатка Leu93, а также по крайней мере две молекулы воды.

Таким образом, исследования пространственной структуры ESR обнаружили наличие в ней структурных элементов, как общих с другими представителями семейства эубактериальных протонных помп – XR [40] и BPR [51], так и уникальных особенностей данного белка, связанных с наличием остатка лизина в качестве донора протонов и сложной системы водородных связей на участке между основанием Шиффа и наружной поверхностью белка.

ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ СХЕМА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ESR КАК ПРОТОННОГО НАСОСА В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ ТРАНСПОРТНЫМИ РОДОПСИНАМИ

Последовательность событий, сопровождающих светозависимый транспорт протонов ESR, на основании результатов спектроскопических и структурных исследований может быть описана следующим образом. В исходном состоянии белка ретиналь находится в *all-trans*-конфигурации, основание Шиффа протонировано (заряжено положительно), акцептор протонов, Asp85, депротонирован (заряжен отрицательно), донор протонов находится в электронейтральном состоянии. Ионная пара, образованная основанием Шиффа и Asp85, стабилизируется молекулой воды W402 (рис. 6, а). Поглощение кванта света приводит к изомеризации ретиналя из *all-trans*- в *13-cis*-конфигурацию и дестабилизации этой ионной пары. Результатом этого является переход протона на акцепторный остаток Asp85, связанный водородной связью с His57 (стадия L-M1). Детально механизм быстрых (в фемтосекундно-микросекундном диапазоне) первичных процессов в ESR не исследован, однако можно ожидать, что он сходен с описанными для BR, PR и XR [52–55]. В процессе перехода M1–M2 происходит поглощение протона из среды донорным остатком Lys96, который на короткое время приобретает положительный заряд. Близость этого остатка к гидрофильной полости в цитоплазматической части белка ускоряет открытие «канала», приводящее к повышению рКа остатка лизина.

Распад M2 сопровождается переходом протона от донора на основание Шиффа на стадии N1. На завершающей стадии фотоцикла происходит депротонирование акцепторной группы, освобождение протона в среду с участием неидентифицированной группы X и реизомеризация ретиналя в *all-trans*-конфигурацию. Таким образом, белок возвращается в исходное состояние.

Основные отличия фотоцикла ESR от других протон-транспортных родопсинов (BR, XR и PR) определяются присутствием остатка лизина в положении ESR, соответствующем положению донора протонов Asp96 в BR, а также отсутствием остатков, образующих в BR группу выделения протона (Glu194 и Glu204). Как Lys96 ESR, так и Asp96 BR в исходном состоянии окружены гидрофобными остатками, что способствует поддержанию их электронейтральности. Однако если для остатка Asp96, имеющего исходный уровень рКа выше 11, это означает наличие на нем протона, в молекуле ESR донор Lys96 изначально не протонирован. На этой стадии его рКа предположительно составляет около 6, и лишь позднее повышается до ~8,5. В соответствии с этими различиями, в фотоцикле BR репротонирование основания Шиффа (распад интермедиата M) происходит в момент перехода M в N1 в результате переноса H⁺ с Asp96 до момента захвата протона этим остатком. В процессе этого захвата рКа Asp96 понижается до 7,5 [56, 57]. Аналогичным образом происходит репротонирование основания Шиффа в молекулах XR и PR, в которых функцию донора протонов выполняет остаток глутаминовой кислоты. Напротив, Lys96 ESR вначале получает протон из цитоплазмы, и только после этого передает его на основание Шиффа (рис. 7).

Важной отличительной особенностью ESR от BR является высвобождение протона на одной из последних стадий фотоцикла. В фотоцикле BR это событие происходит в момент перехода M1–M2, т.е. на более раннем этапе. Однако мутантные варианты BR, не содержащие остатков Glu194 и Glu204, подобно ESR демонстрируют так называемое «позднее» освобождение протона [58, 59]. Такая последовательность событий характерна также для XR и PR в силу отсутствия в их молекулах протон-выделяющей группы.

Обнаружение за последние 15 лет множества новых ретинальных белков [60] – протерородопсинов [61], ксантородопсинов [62], канальных родопсинов [63, 64], хлорных и натриевых помп [65, 66], а также значительный прогресс в определении их пространственной структуры [40, 50,

51, 67–69] возродили интерес к исследованиям механизмов светозависимого транспорта ионов, начатым более 40 лет назад работами Д. Остерхельта и В. Стокениуса [3]. Изучение новых представителей семейства позволяет дополнить представления о структурных основах такого транспорта [66] и способствует их использованию в биооптоэлектронике в качестве основы элементов молекулярной памяти и фотоактивной среды в динамической голографии [70–72], а также в новом направлении – оптогенетике [73] для регуляции активности нейронов [74–76]. Чувствительность кинетики реакции фотоцикла и флуоресценции протонных помп к электрохимическим потенциалам [77, 78] открыла возможность их применения в качестве сенсоров для детектирования внутрибелковых [79] и трансмембранных изменений потенциалов [80].

Проведенные нами исследования ESR – нового ретинального белка из *E. sibiricum* расширили представления о механизме репротонирования основания Шиффа и природе аминокислотных остатков, способных осуществлять функцию внутрибелкового донора протонов. На примере ESR впервые было показано, что оста-

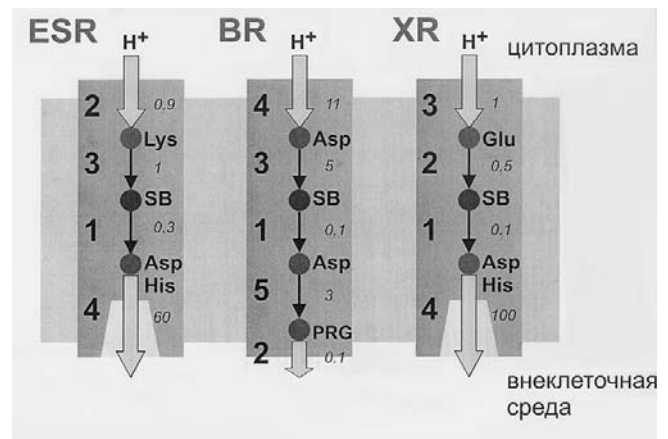


Рис. 7. Схема переноса протонов ESR, BR и XR. Цифрами обозначены стадии переноса протона, курсивом – характерные времена переноса протона, мс. Для ESR: 1 – Депротонирование основания Шиффа (образование интермедиата M), 2 – поглощение протона из цитоплазмы, 3 – репротонирование основания Шиффа (распад интермедиата M), 4 – депротонирование акцептора и освобождение протона. Для BR: 1 – депротонирование основания Шиффа (образование интермедиата M), 2 – освобождение протона PRG (группой выделения протона), 3 – репротонирование основания Шиффа (распад интермедиата M), 4 – поглощение протона из цитоплазмы, 5 – депротонирование акцептора и переход протона на PRG. Для XR: 1 – депротонирование основания Шиффа (образование интермедиата M), 2 – репротонирование основания Шиффа (распад интермедиата M), 3 – поглощение протона из цитоплазмы, 4 – депротонирование акцептора и освобождение протона

ток лизина может успешно выполнять донорную функцию, облегчая доставку протонов с цитоплазматической поверхности белка к основанию Шиффа. Обнаруженное нами взаимодействие остатков Asp85 и His57, приводящее к сдвигу рКа акцептора протонов ESR в кислую область, обеспечивает его способность к функционированию в широком диапазоне pH. Наличие водородной связи между этими остатками, а также других характерных особенностей, присущих семействам протейородопсинов и ксантородопсинов, было продемонстрировано благодаря расшифровке пространственной структуры ESR. Работы, посвященные изучению ESR, продолжаются и, несомненно, приведут к обнаружению новых интересных свойств этого белка. Предстоит определить, какие аминокислотные остатки отвечают за выделение протона в различных условиях, как меняется фотоцикл ESR в зависимости от липидного окружения, сопровождается ли транспорт протонов перемещением зарядов в молекуле. Возможно, эти исследования помогут также найти ответ на вопрос об эволюционных механизмах, благодаря которым светочувствительный ретиновый белок оказался закодирован в геноме психротрофной бактерии из вечномерзлого грунта Сибирской тундры.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам лаборатории криологии

почв ИФХиБПП РАН (руководитель Е.М. Ривкина) за предоставленную возможность работы с генетическим материалом микроорганизмов из вечной мерзлоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-00499а, НШ-1766.2014.4), Fulbright Visiting Scholar (Л.Е. Петровская) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология», а также грантов National Institutes of Health (GM29498) и Department of Energy (DEFG03-86ER13525) (Я.К. Лани и С.П. Балашов), США. Определение пространственной структуры ESR было проведено при финансовой поддержке специального соглашения 5.1 CEA(IBM) – HGF(FZJ) STC, BMBF (PhoNa – Photonic Nanomaterials), РФФИ (грант 13-04-91320), Федеральной целевой программы «Исследования и разработки» (контракт № 14.587.21.0004) и Программы Министерства науки и образования РФ «5топ100», с использованием платформы Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) при поддержке FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) и GRAL (ANR-10-LABX-49-01) в рамках Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Дифракционные эксперименты проводили на излучателях ID23-1 и ID29 в European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Гренобль, Франция.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rodrigues, D.F., Ivanova, N., He, Z., Huebner, M., Zhou, J., and Tiedje, J.M. (2008) Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: A genome and transcriptome approach, *BMC Genomics*, **9**, 547.
- 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., Gili-chinsky, D.A., Shuvalov, V.A., and Kirpichnikov, M.P. (2010) Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump, *FEBS Lett.*, **584**, 4193–4196.
- Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853–2857.
- Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V., and Lobanov, N.A. (1979) The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: An overview, *FEBS Lett.*, **100**, 219–224.
- Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K., and Biemann, K. (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5046–5050.
- Drachev, L.A., Jasaitis, A.A., Kaulen, A.D., Kondrashin, A.A., Liberman, E.A., Nemecek, I.B., Ostroumov, S.A., Semenov, A.Y., and Skulachev, V.P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324.
- Kaulen, A.D. (2000) Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 204–219.
- Henderson, R., and Unwin, P.N. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature*, **257**, 28–32.
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy, *J. Mol. Biol.*, **213**, 899–929.
- Ni, B., Chang, M., Duschl, A., Lanyi, J., and Needleman, R. (1990) An efficient system for the synthesis of bacteriorhodopsin in *Halobacterium halobium*, *Gene*, **90**, 169–172.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., and Lanyi, J.K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899–911.
- Tsuda, M., Glaccum, M., Nelson, B., and Ebrey, T.G. (1980) Light isomerizes the chromophore of bacteriorhodopsin, *Nature*, **287**, 351–353.
- Mathies, R.A., Lin, S.W., Ames, J.B., and Pollard, W.T. (1991) From femtoseconds to biology: Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump, *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **20**, 491–518.
- Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., and Stoekenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: A light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*, *Biophys. J.*, **15**, 955–963.

15. Litvin, F.F., Balashov, S.P., and Sineshchekov, V.A. (1975) The investigation of the primary photochemical conversions of bacteriorhodopsin in purple membranes and cells of *Halobacterium halobium* by the low temperature spectrophotometry method, *Bioorgan. Khim.*, **1**, 1767–1777.
16. Lozier, R.H., Niederberger, W., Bogomolni, R.A., Hwang, S., and Stoerkenius, W. (1976) Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, *Halobacterium halobium* cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 545–556.
17. Subramaniam, S., Greenhalgh, D.A., and Khorana, H.G. (1992) Aspartic acid 85 in bacteriorhodopsin functions both as proton acceptor and negative counterion to the Schiff base, *J. Biol. Chem.*, **267**, 25730–25733.
18. Otto, H., Marti, T., Holtz, M., Mogi, T., Lindau, M., Khorana, H.G., and Heyn, M.P. (1989) Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9228–9232.
19. Subramaniam, S., Hirai, T., and Henderson, R. (2002) From structure to mechanism: electron crystallographic studies of bacteriorhodopsin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, **360**, 859–874.
20. Luecke, H., and Lanyi, J.K. (2003) Structural clues to the mechanism of ion pumping in bacteriorhodopsin, *Adv. Protein Chem.*, **63**, 111–130.
21. Schobert, B., Brown, L.S., and Lanyi, J.K. (2003) Crystallographic structures of the M and N intermediates of bacteriorhodopsin: Assembly of a hydrogen-bonded chain of water molecules between Asp-96 and the retinal Schiff base, *J. Mol. Biol.*, **330**, 553–570.
22. Wickstrand, C., Dods, R., Royant, A., and Neutze, R. (2014) Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up? *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 536–553.
23. Beja, 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., and DeLong, E.F. (2000) Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea, *Science*, **289**, 1902–1906.
24. Brown, L.S., and Jung, K.-H. (2006) Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 538–546.
25. Vishnivetskaya, T.A., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Glavina del Rio, T., Dalin, E., Tice, H., Bruce, D.C., Goodwin, L.A., Pitluck, S., Saunders, E., Brettin, T., Detter, C., Han, C., Larimer, F., Land, M.L., Hauser, L.J., Kyrpides, N.C., Ovchinnikova, G., Kathariou, S., Ramaley, R.F., Rodrigues, D.F., Hendrix, C., Richardson, P., and Tiedje, J.M. (2011) Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Exiguobacterium* sp. AT1b, *J. Bacteriol.*, **193**, 2880–2881.
26. Iverson, V., Morris, R.M., Frazar, C.D., Berthiaume, C.T., Morales, R.L., and Armbrust, E.V. (2012) Untangling genomes from metagenomes: Revealing an uncultured class of marine *Euryarchaeota*, *Science*, **335**, 587–590.
27. 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., and Lanyi, J.K. (2012) Aspartate-histidine interaction in the retinal Schiff base counterion of the light-driven proton pump of *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochemistry*, **51**, 5748–5762.
28. Dioumaev, A.K., Petrovskaya, L.E., Wang, J.M., Balashov, S.P., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P., and Lanyi, J.K. (2013) Photocycle of *Exiguobacterium sibiricum* rhodopsin characterized by low-temperature trapping in the IR and time-resolved studies in the visible, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 7235–7253.
29. 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., and Lanyi, J.K. (2013) 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.*, **288**, 21254–21265.
30. Balashov, S.P. (2000) Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 75–94.
31. Gerwert, K., Freier, E., and Wolf, S. (2014) The role of protein-bound water molecules in microbial rhodopsins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 606–613.
32. Khorana, H.G. (1993) Two light-transducing membrane proteins: Bacteriorhodopsin and the mammalian rhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1166–1171.
33. Isom, D.G., Castaneda, C.A., Cannon, B.R., and Garcia-Moreno, B.E. (2011) Large shifts in pK_a values of lysine residues buried inside a protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5260–5265.
34. Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Govindjee, R., and Ebrey, T.G. (1996) Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: What it says about chromophore isomerization and proton release, *Biophys. J.*, **70**, 473–481.
35. Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Shih, J., Spudich, E.N., Spudich, J.L., and Lanyi, J.K. (2002) Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin, *Biochemistry*, **41**, 5348–5358.
36. Balashov, S.P., Govindjee, R., Kono, M., Imasheva, E., Lukashev, E., Ebrey, T.G., Crouch, R.K., Menick, D.R., and Feng, Y. (1993) Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle, *Biochemistry*, **32**, 10331–10343.
37. Brown, L.S., and Lanyi, J.K. (1996) Determination of the transiently lowered pK_a of the retinal Schiff base during the photocycle of bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1731–1734.
38. Partha, R., Krebs, R., Caterino, T.L., and Braiman, M.S. (2005) Weakened coupling of conserved arginine to the proteorhodopsin chromophore and its counterion implies structural differences from bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 6–12.
39. Bergo, V.B., Sineshchekov, O.A., Kralj, J.M., Partha, R., Spudich, E.N., Rothschild, K.J., and Spudich, J.L. (2009) His-75 in proteorhodopsin, a novel component in light-driven proton translocation by primary pumps, *J. Biol. Chem.*, **284**, 2836–2843.
40. Luecke, H., Schobert, B., Stagno, J., Imasheva, E.S., Wang, J.M., Balashov, S.P., and Lanyi, J.K. (2008) Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16561–16565.
41. Tsukamoto, T., Kikukawa, T., Kurata, T., Jung, K.H., Kamo, N., and Demura, M. (2013) Salt bridge in the conserved His-Asp cluster in Gloeobacter rhodopsin contributes to trimer formation, *FEBS Lett.*, **587**, 322–327.
42. Hempelmann, F., Holper, S., Verhoeven, M.K., Woerner, A.C., Kohler, T., Fiedler, S.A., Pflieger, N., Wachtveitl, J., and Glaubitz, C. (2011) His75-Asp97 cluster in green proteorhodopsin, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4645–4654.
43. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailier, J.-P., and Lanyi, J.K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Å resolution, *Science*, **286**, 255–260.
44. Gushchin, I., Chervakov, P., Kuzmichev, P., Popov, A.N., Round, E., Borshchevskiy, V., Ishchenko, A., Petrovskaya,

- L., Chupin, V., Dolgikh, D.A., Arseniev, A.A., Kirpichnikov, M., and Gordeliy, V. (2013) Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 12631–12636.
45. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science*, **289**, 739–745.
46. Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 639–650.
47. Kobilka, B.K. (2011) Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.*, **32**, 213–218.
48. Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E.E., Roth, B.L., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2014) Allosteric sodium in class A GPCR signaling, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 233–244.
49. Luecke, H., Schobert, B., Cartailler, J.-P., Richter, H.-T., Rosengarth, A., Needleman, R., and Lanyi, J.K. (2000) Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.*, **300**, 1237–1255.
50. Shevchenko, V., Gushchin, I., Polovinkin, V., Round, E., Borshchevskiy, V., Utrobin, P., Popov, A., Balandin, T., Buldt, G., and Gordeliy, V. (2014) Crystal structure of *Escherichia coli*-Expressed *Haloarcula marismortui* bacteriorhodopsin I in the trimeric form, *PLoS one*, **9**, e112873.
51. Ran, T., Ozorowski, G., Gao, Y., Sineshchekov, O.A., Wang, W., Spudich, J.L., and Luecke, H. (2013) Cross-protomer interaction with the photoactive site in oligomeric proteorhodopsin complexes, *Acta Crystallogr.*, **D69**, 1965–1980.
52. Mathies, R.A., Lin, S.W., Ames, J.B., and Pollard, W.T. (1991) From femtoseconds to biology: Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**, 491–518.
53. Lenz, M.O., Huber, R., Schmidt, B., Gilch, P., Kalmbach, R., Engelhard, M., and Wachtveitl, J. (2006) First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin, *Biophys. J.*, **91**, 255–262.
54. Lanyi, J.K. (2006) Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1012–1018.
55. Lanyi, J.K., and Balashov, S.P. (2011) Xanthorhodopsin. In *Halophiles and Hypersaline Environments* (Ventosa, A., Oren, A., and Ma, Y., eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 319–340.
56. Balashov, S.P., Lu, M., Imasheva, E.S., Govindjee, R., Ebrey, T.G., Othersen III, B., Crouch, R. K., and Menick, D.R. (1999) The proton release group in bacteriorhodopsin controls the rate of the final step of its photocycle at low pH, *Biophys. J.*, **76**, 147.
57. Zscherp, C., and Heberle, J. (1997) pH dependence of proton transfer reactions within bacteriorhodopsin: A time resolved ATR/FT-IR study, *Biophys. J.*, **72**, 206.
58. Brown, L.S., Varo, G., Needleman, R., and Lanyi, J.K. (1995) Functional significance of a protein conformation change at the cytoplasmic end of helix F during the bacteriorhodopsin photocycle, *Biophys. J.*, **69**, 2103–2111.
59. Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Ebrey, T.G., Chen, N., Menick, D.R., and Crouch, R.K. (1997) Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **36**, 8671–8676.
60. Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealon, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., and Smith, H.O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, **304**, 66–74.
61. Beja, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M., and DeLong, E.F. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature*, **411**, 786–789.
62. Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Boichenko, V.A., Anton, J., Wang, J.M., and Lanyi, J.K. (2005) Xanthorhodopsin: A proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna, *Science*, **309**, 2061–2064.
63. Sineshchekov, O.A., Jung, K.-H., and Spudich, J.L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689–8694.
64. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Mustl, A.M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395–2398.
65. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nature Commun.*, **4**, 1678.
66. Beja, O., and Lanyi, J.K. (2014) Nature's toolkit for microbial rhodopsin ion pumps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6538–6539.
67. Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Buldt, G., Savopol, T., Scheidig, A.J., Klare, J.P., and Engelhard, M. (2002) Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex, *Nature*, **419**, 484–487.
68. Moukhametzianov, R., Klare, J.P., Efremov, R., Baeken, C., Goppner, A., Labahn, J., Engelhard, M., Buldt, G., and Gordeliy, V.I. (2006) Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer, *Nature*, **440**, 115–119.
69. Gushchin, I., Reshetnyak, A., Borshchevskiy, V., Ishchenko, A., Round, E., Grudinin, S., Engelhard, M., Buldt, G., and Gordeliy, V. (2011) Active state of sensory rhodopsin II: structural determinants for signal transfer and proton pumping, *J. Mol. Biol.*, **412**, 591–600.
70. Hampp, N. (2000) Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories, *Chem. Rev.*, **100**, 1755–1776.
71. Vsevolodov, N. (1998) *Biomolecular Electronics. An Introduction via Photosensitive Proteins*, Birkhauser, Boston, Basel, Berlin.
72. Korchemskaya, E., Burykin, N., Bugaychuk, S., Maksymova, O., Ebrey, T., and Balashov, S. (2007) Dynamic holography in bacteriorhodopsin/gelatin films: Effects of light-dark adaptation at different humidity, *Photochem. Photobiol.*, **83**, 403–408.
73. Deisseroth, K. (2011) Optogenetics, *Nature Methods*, **8**, 26–29.
74. Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nature Neurosci.*, **8**, 1263–1268.
75. Deisseroth, K., Feng, G.P., Majewska, A.K., Miesenböck, G., Ting, A., and Schnitzer, M.J. (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits, *J. Neurosci.*, **26**, 10380–10386.
76. Chow, B.Y., Han, X., Dobry, A.S., Qian, X.F., Chuong, A.S., Li, M.J., Henninger, M.A., Belfort, G.M., Lin, Y.X., Monahan, P.E., and Boyden, E.S. (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps, *Nature*, **463**, 98–102.

77. Dubrovskii, V.T., Balashov, S.P., Sineshchekov, O.A., Chekulaeva, L.N., and Litvin, F.F. (1982) Photoinduced changes in the quantum yields of the photochemical cycle of conversions of bacteriorhodopsin and transmembrane transport of protons in *Halobacterium halobium* cells, *Biochemistry (Moscow)*, **47**, 1036–1046.
78. Kolodner, P., Lukashov, E.P., Ching, Y.C., and Rousseau, D.L. (1996) Electric-field-induced Schiff-base deprotonation in D85N mutant bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11618–11621.
79. Slouf, V., Balashov, S.P., Lanyi, J.K., Pullerits, T., and Polivka, T. (2011) Carotenoid response to retinal excitation and photoisomerization dynamics in xanthorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.*, **516**, 96–101.
80. Kralj, J.M., Douglass, A.D., Hochbaum, D.R., Maclaurin, D., and Cohen, A.E. (2012) Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin, *Nature Methods*, **90**, 90–95.

ESR – A RETINAL PROTEIN FROM *Exiguobacterium sibiricum* WITH UNUSUAL PROPERTIES

L. E. Petrovskaya^{1*}, S. P. Balashov², E. P. Lukashov³,
E. S. Imasheva², I. Yu. Gushchin^{4,5,6,7,8}, A. K. Dioumaev²,
A. B. Rubin³, D. A. Dolgikh^{1,3}, V. I. Gordeliy^{4,5,6,7,8},
J. K. Lanyi², M. P. Kirpichnikov^{1,3}

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya 16/10,
Moscow 117997, Russia

² University of California, Department of Physiology
and Biophysics, Irvine 92697, USA

³ M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,
Moscow 119991, Russia

⁴ Institut de Biologie Structurale, Universite Grenoble Alpes,
Grenoble, 38044 France

⁵ Institut de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche
Scientifique, Grenoble, 38044 France

⁶ Institut de Biologie Structurale, Direction des Sciences
du Vivant, Commissariat a l'Energie Atomique,
Grenoble, 38044 France

⁷ Laboratory for Advanced Studies of Membrane Proteins,
Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
Moscow region 141700 Russia

⁸ Institute of Complex Systems (ICS), ICS-6: Structural Biochemistry,
Research Center Julich, Julich, 52425 Germany

Received January 12, 2015

Revision Received March 10, 2015

This review covers the properties of a retinal protein (ESR) from the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium sibiricum* functioning as a light-driven proton pump. The presence of a lysine residue at the position corresponding to intramolecular proton donor for the Schiff base is the unique structural feature of ESR. We have shown that Lys96 successfully facilitates delivery of protons from the cytoplasmic surface to the Schiff base, thus acting as a proton donor in ESR. Since proton uptake during the photocycle precedes Schiff base reprotonation, we conclude that this residue is initially in an uncharged state and acquires a proton for the short time after Schiff base deprotonation and M intermediate formation. The involvement of Lys as a proton donor distinguishes ESR from the related retinal proteins – bacteriorhodopsin (BR), proteorhodopsin (PR), and xanthorhodopsin (XR), in which donor function is performed by residues with a carboxyl side chain. Like other eubacterial proton pumps (PR and XR), ESR contains a histidine residue interacting with proton acceptor Asp85. In contrast to PR, this interaction leads to the shift of the pK_a of the acceptor to more acidic pH, providing its ability to function in a wide pH range. The presence of a strong H-bond between Asp85 and His57, the structure of the proton-conducting pathways from cytoplasmic surface to the Schiff base and to extracellular surface, and other properties of ESR were demonstrated by solving its three-dimensional structure, which revealed several differences from known structures of BR and XR. The structure of ESR, its photocycle, and proton transfer reactions are discussed in comparison with homologous retinal proteins.

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