

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ В ESR, РЕТИНАЛЬНОМ БЕЛКЕ *Exiguobacterium sibiricum*

Обзор

© 2023 Л.Е. Петровская^{1*}, С.А. Силецкий², М.Д. Мамедов², Е.П. Лукашев³,
С.П. Балашов⁴, Д.А. Долгих^{1,3}, М.П. Кирпичников^{1,3}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: lpetr65@yahoo.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия

⁴ Университет Калифорнии, Отдел физиологии и биофизики, 92697 Ирвайн СА, США

Поступила в редакцию 15.06.2023

После доработки 11.07.2023

Принята к публикации 11.07.2023

Ретиналь-содержащие светочувствительные белки — родопсины — обнаружены у многих микроорганизмов. Интерес к ним во многом объясняется их ролью в запасании энергии света и фоторегуляции в микроорганизмах, а также перспективами использования в оптогенетике с целью контроля активности нейронов, в том числе для терапии различных заболеваний. Одним из представителей микробных родопсинов является ESR, ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*. От гомологичных белков ESR отличает наличие остатка лизина (Lys96) в качестве донора протонов для основания Шиффа. Эта особенность, наряду с водородной связью акцептора протонов Asp85 с остатком His57, определяет его функциональные характеристики как протонного насоса. В обзоре рассматриваются результаты исследований ESR, проведенных с использованием различных методов, включая метод прямой электрометрии. Сравнение полученных данных с результатами определения пространственной структуры и с другими ретинальными белками позволяет сделать выводы о механизмах транспорта ионов водорода в молекуле ESR и подобных ретинальных белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретинальный белок, протеродопсин, основание Шиффа, акцептор протонов, донор протонов, фотоцикл, прямой электрометрический метод.

DOI: 10.31857/S032097252310010X, EDN: OTMNUZ

ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины относятся к семейству ретиналь-содержащих белков, осуществляющих светозависимый транспорт ионов, сенсорные и другие функции [1–3]. Молекулы этих белков обладают схожей структурой, включающей семь или восемь (в случае ферментных родопсинов) трансмембранных альфа-спиральных сегментов и ретиналь, ковалентно связанный через основание Шиффа с остатком лизина [3, 4]. Поглощение кванта

света инициирует изомеризацию ретиналя из all-trans в конфигурацию 13-cis. Релаксация ретиналя в исходное состояние сопровождается рядом конформационных преобразований в молекуле белка, сопряженных с транспортом протона (для родопсинов, выполняющих функцию протонного насоса) [5, 6]. Детали этого процесса наиболее подробно изучены для бактериородопсина *Halobacterium salinarum* (BR), первого представителя семейства микробных родопсинов, который был открыт более 50 лет назад [7–9]. Установлено, что в процессе

Принятые сокращения: BR — бактериородопсин *Halobacterium salinarum*; ESR — ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*; PR — протеродопсин; PRG — протон-выделяющая группа.

* Адресат для корреспонденции.

фотоцикла происходит депротонирование основания Шиффа, образованного ретиналем и остатком лизина, и перенос протона на акцепторный остаток Asp85. Одновременно с этим осуществляется выделение протона на внеклеточной поверхности белка с участием остатков Glu194 и Glu204 (так называемой PRG – протон-выделяющей группы [10]). Затем основание Шиффа репротонируется при участии донорного остатка Asp96, который затем получает протон из цитоплазмы. В конце фотоцикла протон переносится от акцептора на остатки протон-выделяющей группы [7, 10]. Указанные молекулярные события соответствуют возникновению и распаду спектрально идентифицируемых промежуточных состояний (интермедиатов) фотоцикла $BR + h\nu \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M1 \leftrightarrow M2 \leftrightarrow N1 \leftrightarrow N2 \leftrightarrow O \rightarrow BR$ [7, 10]. Данные функциональных исследований BR хорошо согласуются с результатами определения его пространственной структуры в различных состояниях [11–13].

В дальнейшем в ходе различных геномных и метагеномных исследований было обнаружено множество новых белков, гомологичных BR и выполняющих сходные функции [3, 14, 15]. В частности, протеородопсины (PR) встречаются у многих представителей *Proteobacteria* и играют важную роль в выживании микроорганизмов в неблагоприятных условиях. Исследования PR позволили установить, что они, подобно BR, содержат акцепторный и донорный остатки (аспарат и глутамат соответственно), однако PRG в их молекулах отсутствует [16, 17]. Важной особенностью PR является водородная связь между акцепторным остатком (аспаратом) и боковой группой остатка гистидина, которая регулирует степень протонирования и функциональное состояние акцептора в зависимости от pH и участвует в выделении протона [18, 19].

ESR, ретиальный белок почвенной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, также относится к протеородопсинам, однако обнаруживает существенное структурное отличие от типичных представителей семейства. Аминокислотная последовательность ESR содержит остаток Lys96 в положении, соответствующем карбоксильным остаткам с функцией донора протонов для основания Шиффа в молекулах BR и PR (Asp96 и Glu108 соответственно) [20] (рис. 1). Эта особенность, наряду с другими, вызвала интерес к исследованиям структуры и механизма функционирования ESR, которые проводятся нами на протяжении более 10 лет. В 2015 году мы опубликовали обзор этих работ [21], однако за прошедшее

время был получен ряд важных новых результатов, во многом благодаря использованию метода прямой электрометрии, разработанного Л.А. Драчевым и его коллегами [22, 23].

Примененный нами вариант данного метода основан на использовании протеолипосом, содержащих исследуемый белок, и макроскопической плоской фосфолипидной мембраны, армированной для большей стабильности коллоидной пленкой. Перед измерением протеолипосомы адсорбируются на поверхности макроскопической мембраны, разделяющей отсеки измерительной ячейки [23]. В ответ на вспышку за счет трансмембранного переноса протонов, а также движения заряженных групп белка перпендикулярно плоскости мембраны генерируется разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) на мембране протеолипосом и пропорциональная ей $\Delta\Psi$ на макроскопической мембране, которая регистрируется с помощью электрометрической техники с высоким временным разрешением.

Одним из первых белков, для которого были проведены прямые электрометрические измерения, стал BR [22, 24]. Впоследствии метод широко использовался в исследованиях различных ретиальных белков [25–27], компонентов фотосистем I и II [28–30], цитохром-оксидазы [31–35] и других объектов. В данном обзоре обсуждаются недавние результаты, полученные нами в ходе исследований ESR и его мутантных вариантов, в том числе с использованием метода прямой электрометрии, и проводится их анализ в сравнении с ранее опубликованными для BR и других ретиальных белков.

ФОТОЦИКЛ ESR: СОПРЯЖЕНИЕ РЕАКЦИЙ С ПОГЛОЩЕНИЕМ И ВЫДЕЛЕНИЕМ ПРОТОНОВ

Изучение светоиндуцированных изменений поглощения в ESR методом флэш-фотолиза обнаружило в его фотоцикле наличие основных интермедиатов, характерных также для BR [36] и PR [37]. Вслед за распадом интермедиатов K и L наблюдается рост поглощения при 410 нм в микросекундной временной шкале, что соответствует образованию M-состояния (депротонированного основания Шиффа). Интересно отметить, что для ESR в мицеллах детергента DDM (n-додецил- β -D-мальтопиранозид) этот интермедиат детектируется только при pH выше 8, в то время как для белка в мицеллах липидоподобного детергента LPG (1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-

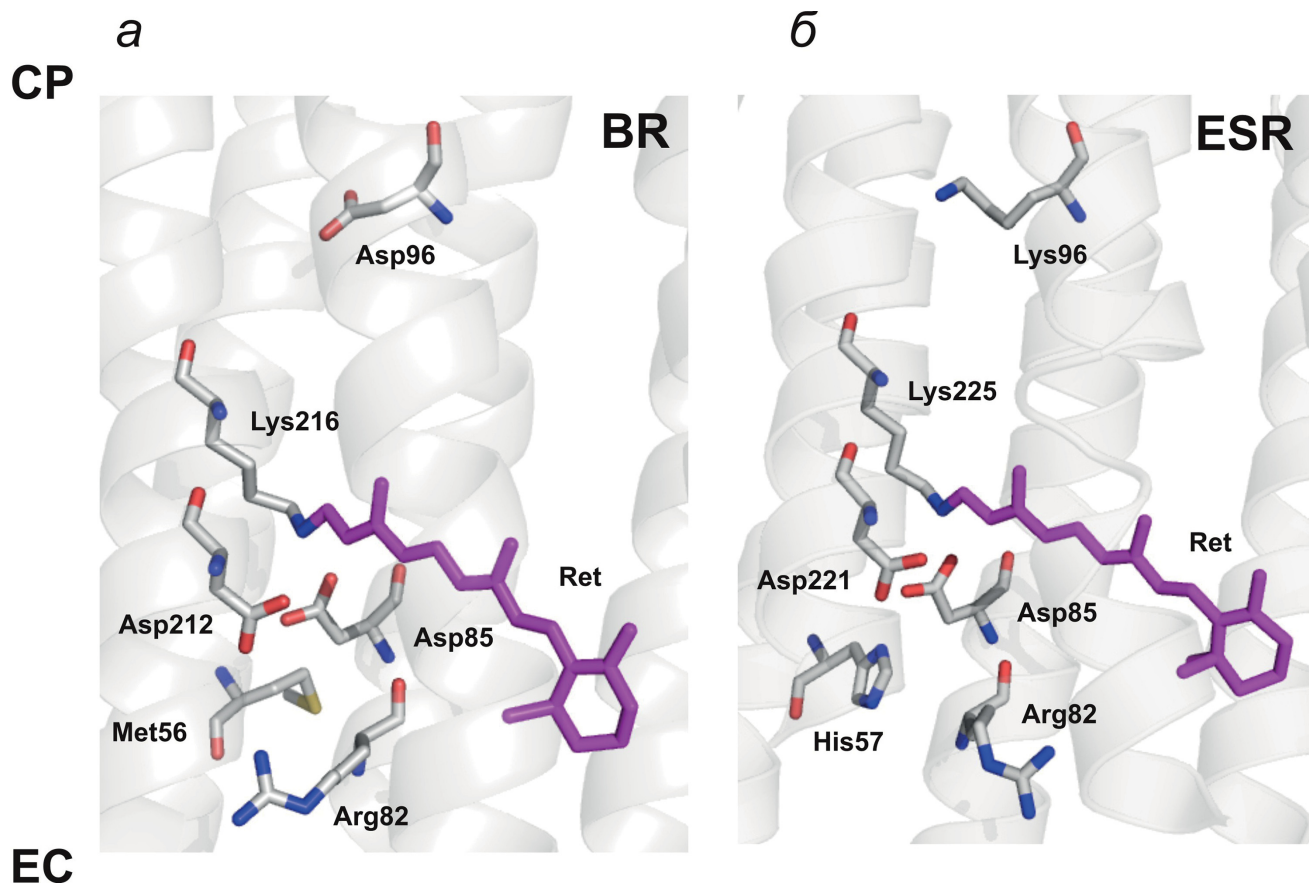


Рис. 1. Пространственная структура BR (а) и ESR (б). Показаны участки молекул, расположенные вблизи основания Шиффа. Рисунок подготовлен в программе PyMol с использованием координат 1C3W и 4HYJ соответственно. Ret — *all-trans* ретиналь; CP — цитоплазматическая поверхность белка; EC — внеклеточная поверхность белка

глицеро-3-фосфо-1'-гас-глицерин) или в протеолипосомах pK_a его образования составляет $\sim 6,5$ [38, 39]. Репротонирование основания Шиффа сопровождается снижением поглощения при 410 нм (отражающим распад состояния M) и возникновением интермедиатов N1 и N2, для которых характерен рост поглощения при 510 и 550 нм. В результате реизомеризации ретиналя образуется интермедиат O, который поглощает при 590 нм и распадается с возвращением в исходное состояние ESR. N-Интермедиат присутствует в фотоцикле ESR вплоть до его завершения [40], таким образом, схема фотоцикла включает следующие переходы: $ESR-h\nu \rightarrow K, L \rightarrow M1 \leftrightarrow M2 \leftrightarrow N1 \leftrightarrow N2/O \rightarrow ESR$ [39].

При освещении суспензии клеток *Escherichia coli*, экспрессирующих ESR, или ESR-содержащих протеолипосом наблюдается закисление суспензии, подтверждающее трансмембранный перенос протонов с участием данного белка [20, 38]. Добавление к клеткам протонатора CCCP устраняет этот эффект, что подтверждает протон-транспортную функцию ESR [38]. Установлено, что, в отличие

от BR, ESR осуществляет выделение протонов в конце фотоцикла, что коррелирует с отсутствием в его молекуле остатков, гомологичных PRG [20]. Измерения, проведенные в присутствии pH-чувствительного красителя пиранина, позволили уточнить временную связь этого события с распадом длинноволновых интермедиатов фотоцикла и восстановлением исходного состояния [41]. Сравнение кинетик поглощения протона и распада M-интермедиата в ESR дикого типа показало, что, в отличие от BR, поглощение протона в этом белке предшествует репротонированию основания Шиффа, что особенно заметно при проведении измерений в D_2O .

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ СТАДИИ ФОТОЦИКЛА ESR

Использование метода прямой электрометрии с временным разрешением обеспечивает возможность вычленения и изучения отдельных электрогенных (т.е. направленных перпендикулярно плоскости мембраны) стадий

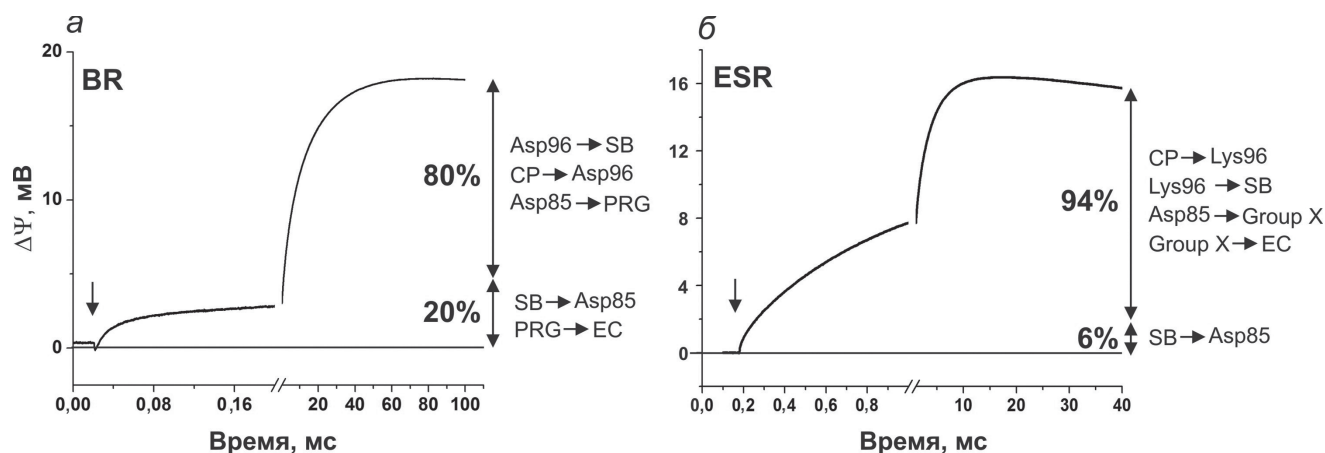


Рис. 2. Кинетика светоиндуцированного образования мембранного электрического потенциала ($\Delta\Psi$) протеолипосомами, содержащими BR (а) и ESR (б), при pH 7,5. Стрелкой обозначен момент лазерной вспышки. Приведены относительные амплитуды микросекундной и миллисекундной электрогенных фаз с указанием соответствующих стадий переноса протона. SB – основание Шиффа; PRG – протон-выделяющая группа; EC – внеклеточная поверхность белка; CP – цитоплазматическая поверхность белка; Group X – неидентифицированный остаток/группа остатков, осуществляющих выделение протонов на внеклеточной поверхности ESR. Для удобства фотоэлектрический ответ обоих белков приводится в одном направлении

перемещения зарядов внутри белка в ответ на одиночную вспышку, а параллельный анализ кинетики изменений поглощения позволяет связать их со стадиями фотоцикла в ретинальном белке. В отличие от метода с использованием красителя, такие измерения, во-первых, позволяют получать прямую уникальную информацию о перемещении протона внутри белка, а не только данные об исчезновении или появлении протона на его поверхности; во-вторых, не ограничены областью pH, близкой к pK_a красителя, что в целом открывает перспективы воссоздания полной картины функционирования протонной помпы при различных значениях pH.

Для ESR-содержащих протеолипосом измерения проводили при pH 5,1–9,5 [39]. Общая амплитуда фотоэлектрического ответа при нейтральных значениях pH достигала 50 мВ, что сопоставимо с максимальной величиной ответа BR [22]. Однако направление ответа у этих белков было противоположным вследствие различной ориентации их молекул в протеолипосомах (ESR встраивается в том же направлении, что и в клетках, N-концом наружу [20, 38], а BR – в противоположном [42]). Соответственно, ESR переносит протоны из протеолипосом наружу, а для BR наблюдается транспорт протонов внутрь протеолипосом вследствие обратной по сравнению с клетками ориентации.

Ранее было показано, что фотоэлектрический ответ BR включает три основных электрогенных процесса, причем наиболее быстрый (<1 мкс) имеет отрицательный знак и соответ-

ствует стадиям BR → K → L (фотоиндуцированной изомеризации ретиналя и последующей релаксации соседних остатков). Вторая стадия (30–50 мкс) отражает перемещение протона от основания Шиффа на акцептор Asp85 и одновременное освобождение протона во внешнюю среду протон-выделяющей группой. Амплитуда последней фазы (5–20 мс) составляет до 80% всего ответа и соответствует переносу протона от внутреннего донора Asp96 на основание Шиффа и последующее репротонирование донора, а также перенос протона от Asp85 к PRG [43] (рис. 2, а).

Кинетика образования мембранного потенциала ESR существенно отличается от вышеописанной для BR. В частности, в фотоэлектрическом ответе ESR не наблюдается быстрая негативная фаза, характерная для BR (рис. 2, б). Детальный анализ кинетических кривых при pH 5,1 позволил, однако, обнаружить ее наличие, «замаскированное» положительными сигналами электрогенных фаз, совпадающих с ней во времени. Относительная суммарная амплитуда микросекундных электрогенных фаз ESR (3, 24 и 100 мкс при pH 7,5) оказалась примерно в три раза меньше, чем у BR, что может быть связано с отсутствием раннего выделения протонов в молекуле ESR. Распад интермедиата М включает две электрогенные фазы, 0,6 и 3,4 мс, с общим вкладом 75%, предположительно, отражающие переход $M \leftrightarrow N1 \leftrightarrow N2/O$. Последняя электрогенная фаза ESR (~18,4 мс) ассоциирована с возвращением к исходному состоянию ($N2/O \rightarrow ESR$) и отражает депротонирование

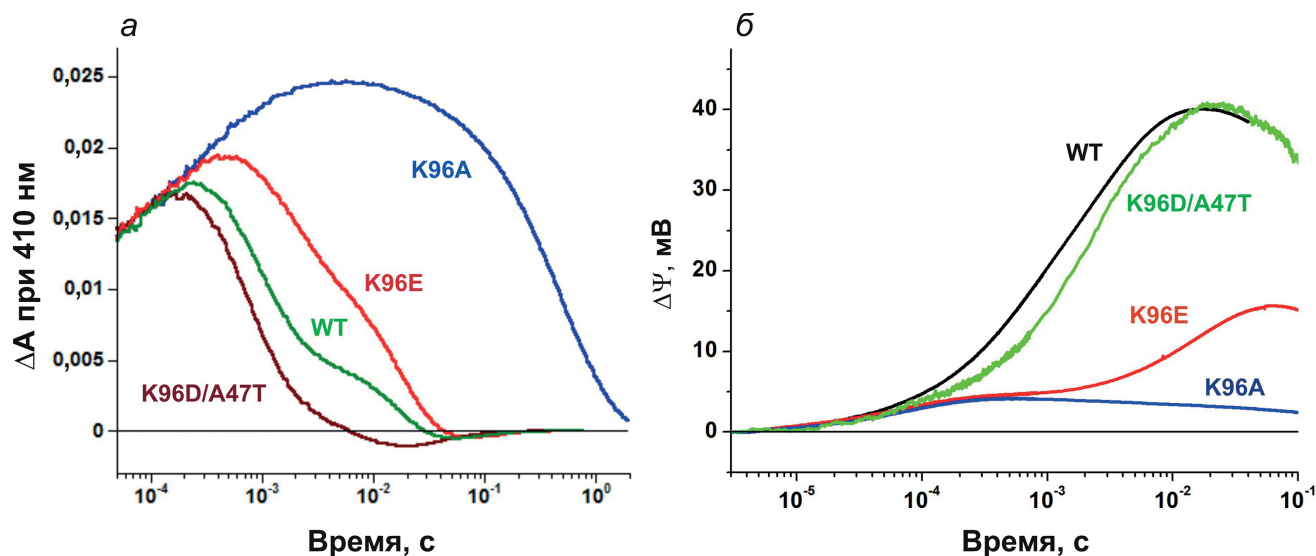


Рис. 3. Свойства мутантных вариантов ESR, содержащих замены остатка Lys96. *a* – Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при 410 нм ESR дикого типа (WT) и его мутантных вариантов в 0,06%-ном липидоподобном детергенте LPG, 100 mM NaCl, pH 7,5; *б* – кинетика образования трансмембранной разницы потенциалов ($\Delta\Psi$) протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа и его мутантные варианты, при pH 7,5. Из [46], с изменениями

акцептора Asp85 и высвобождение протона молекулой белка во внешнюю водную среду [39].

Следует отметить, что в фотоэлектрическом ответе ESR-содержащих протеолипосом при pH 8,4 наблюдается 10-кратное (по сравнению с pH 6,5) замедление электрогенных стадий, соответствующих распаду М-интермедиата, в результате изменения относительного вклада кинетических составляющих в пользу более медленной компоненты. При этом дополнительно выделяется отдельная электрогенная фаза с $\tau \sim 0,25$ мс, соответствующая протонированию исходно нейтрального Lys96 [39]. Эти данные свидетельствуют о том, что в ESR Lys96 и/или взаимодействующая с ним молекула воды приобретает протон после образования М-состояния и вскоре после этого передает его на основание Шиффа. Таким образом, подтверждается ранее сделанное заключение, что остаток Lys96 не протонирован в исходном состоянии при нейтральном pH и временно протонируется в М-состоянии с $pK_a \sim 8,5$ [41]. В молекуле ESR Lys96 окружен преимущественно гидрофобными остатками [44], что предположительно способствует поддержанию состояния со сниженным pK_a . Сходная ситуация наблюдается для остатка Asp96 в BR, который нейтрален и имеет очень высокий pK_a в исходном состоянии ($\sim 11,4$) и, соответственно, протонирован благодаря гидрофобному окружению [45].

Понижение pH до 5,1 сопровождается практически полным подавлением фотоэлектрического ответа ESR и возникновением заметных отрицательных по направлению фаз, предположительно в результате протонирования ак-

цептора Asp85 и/или связанного с ним остатка His57 в исходном состоянии.

Lys96 – ЭФФЕКТИВНЫЙ ДОНОР ПРОТОНОВ ДЛЯ ОСНОВАНИЯ ШИФФА В ESR

Для определения функциональной роли остатка Lys96 мы использовали классический подход, включающий получение и исследование мутантных вариантов ESR [41, 46]. На первом этапе был сконструирован мутант K96A, характерными чертами фотоцикла которого явились значительное (более чем в 100 раз) замедление распада интермедиата М (рис. 3, *a*) и зависимость скорости этого процесса от pH [41]. Клетки *E. coli*, экспрессирующие этот мутант, демонстрировали значительное снижение протонного транспорта по сравнению с клетками, содержащими белок дикого типа. Таким образом, было показано, что наличие остатка Lys96 ускоряет репротонирование основания Шиффа в молекуле ESR.

В результате измерений фотоэлектрического ответа протеолипосом, содержащих K96A, было установлено, что данная мутация сопровождается практически полным исчезновением миллисекундной электрогенной фазы, которая связана с репротонированием основания Шиффа (распадом интермедиата М) [47] (рис. 3, *б*). Как показали расчеты, замедление этого процесса, характерное для мутанта K96A, само по себе не должно было привести к такому результату.

Аппроксимация экспериментальной кривой суммой кинетических компонент выявило наличие в миллисекундной части кинетики нескольких электрогенных фаз, имеющих отрицательное направление. Отрицательное значение амплитуд миллисекундных фаз, соответствующих быстрому распаду М-интермедиата в мутантном белке, указывает на то, что репротонирование основания Шиффа происходит в необычном направлении — со стороны внеклеточной поверхности белка. Об этом же свидетельствует и незначительная амплитуда положительной компоненты электрогенного ответа, которая, по-видимому, включает в себя как диффузию протона с цитоплазматической поверхности белка, так и его движение в противоположном направлении. При низких рН преобладает первый из указанных механизмов, в то время как при рН 8,5 начинает доминировать второй. Добавление азида к данному мутанту приводило к ускорению доставки протонов с цитоплазматической стороны белка и к увеличению амплитуды положительных компонентов электрогенного ответа [47].

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что пониженная эффективность транспорта протонов в мутанте K96A объясняется не только замедлением фотоцикла, но и уменьшением прямого транспорта и повышением вклада обратных реакций, предположительно, со стороны акцепторного участка His57–Asp85. Следует отметить, что в BR мутации по донорному остатку (D96N и D96A) сопровождаются замедлением фотоэлектрического ответа в миллисекундной области, но не его исчезновением, что является следствием различной конфигурации протон-акцепторного участка BR и ESR (рис. 1) и указывает на отличия в механизме протонного транспорта в этих белках [48, 49]. Дополнительные аргументы в пользу роли остатка His57 в возникновении обратных реакций были получены в ходе исследования мутантов по этому остатку (см. ниже).

КАРБОКСИЛЬНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ НА МЕСТЕ Lys96 В ESR

«Могут ли карбоксильные остатки выполнять функцию донора протонов в молекуле ESR?» — такой вопрос мы задавали в предыдущем обзоре [21]. Сейчас можно уверенно ответить на него: «В целом да, но есть отличия по сравнению с тем, как они работают в BR». Мы исследовали кинетику фотоцикла, переноса

протонов и электрогенности мутантов ESR K96E и K96D/A47T [46]. В отличие от мутанта K96A, скорости поглощения протона и его переноса на основание Шиффа в этих белках сопоставимы с таковыми в белке дикого типа. В K96E распад М происходит несколько медленнее, чем в диком типе — с большей долей медленного компонента, а в K96D/A47T — даже быстрее, чем в диком типе (временная константа быстрого компонента составляет ~ 0,7 мс против 1 мс у дикого типа) (рис. 3, а). Репротонирование основания Шиффа и поглощение протонов из среды у этих мутантов происходят почти одновременно во время перехода М в N (как в ESR дикого типа при нейтральном рН), тогда как у BR эти две стадии хорошо разделены и совпадают во времени с переходами М в N и N в О соответственно [48, 50]. Это отражает различный механизм участия донора в репротонировании основания Шиффа в BR и ESR. Интересно отметить, что у мутантов K96D/A47T и K96E образование состояния М сопровождается частичным высвобождением протона, предположительно на цитоплазматической поверхности белка (т.е. перемещением в обратном направлении). Причины этого явления будут рассмотрены ниже.

Фотоэлектрический ответ мутантов K96D/A47T и K96E содержит электрогенные миллисекундные фазы, связанные с репротонированием основания Шиффа, которые аналогичны таковым у дикого типа, но отсутствуют у мутанта K96A. Основным отличием в электрогенной кинетике мутанта K96E является гораздо более медленный основной миллисекундный компонент генерации $\Delta\Psi$ (рис. 3, б). В протеолипосомах, содержащих K96D/A47T, генерация $\Delta\Psi$ происходит в основном во время распада интермедиата М, в то время как у мутанта K96E — во время распада N. Это является независимым доказательством того, что карбоксильные остатки функционируют как доноры протонов в ESR с эффективностью, сравнимой с эффективностью лизина в случае двойного мутанта и несколько меньшей — в K96E.

Следует отметить, что японские ученые опубликовали исследование мутантных вариантов PR, в котором остаток аспартата заменили на лизин и глутамин (E108K и E108Q), а также ESR с заменами K96D, K96Q и K96E [51]. Мутант K96D демонстрировал быструю скорость распада М, сравнимую с диким типом, в то время как мутация K96E демонстрировала более медленную скорость распада М. Было показано также, что Lys может заменять нативный Glu в донорном участке PR [51].

Отсутствие существенной задержки между поглощением протонов и репротонированием основания Шиффа у мутантов K96D/A47T и K96E, а также раннее освобождение протона с обратной стороны мембраны свидетельствуют о том, что у мутантов ESR карбоксильные остатки в положении 96 протонированы (не заряжены) в исходном состоянии, аналогично BR. Предположительно, после образования промежуточного продукта М они попадают в более гидрофильное окружение по сравнению с исходным состоянием, в результате чего происходит снижение их pK_a до 6,5–8,5. Это приводит к частичному депротонированию донорных остатков и освобождению протона в среду, за которыми следуют репротонирование основания Шиффа и почти одновременное поглощение протона. Следовательно, донорные остатки в ESR способны быстро переключаться от равновесия со средой на равновесие с основанием Шиффа во время перехода от М к N, что согласуется с данными структурных исследований. Боковая цепь Lys96 обладает определенной подвижностью, а полость вокруг этого остатка находится очень близко к поверхности белка и отделена от водной среды только полярной боковой цепью Thr43, что отличает ESR от более скрытого положения протонных донорных групп в BR и XR [44]. Аналогичный вывод был сделан Sasaki et al. [51], которые предположили, что конформационные изменения белка, связанные с репротонированием основания Шиффа, меньше у мутантов ESR, чем у BR, и могут включать движения боковой цепи донорного остатка, соединяя его со средой или с основанием Шиффа.

ЗАМЕНА His57 ОБЕСПЕЧИВАЕТ ТРАНСПОРТ ПРОТОНОВ ESR В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ pH

Наличие остатка гистидина, связанного водородной связью с акцепторным остатком аспартата, является отличительной чертой белков, относящихся к семейству протеородопсинов, включая ESR, а также ксантородопсинов (XR) [38, 52, 53]. Взаимодействие между боковой цепью гистидина и остатками соседней субъединицы играет важную роль в олигомеризации PR и родопсина *Gloeobacter* (GR) [54–56]. Тесное взаимодействие His57 и Asp85 в молекуле ESR было выявлено как в результате функциональных исследований мутантов по этому остатку [38], так и благодаря определению пространственной структуры белка [44] (рис. 1). Установлено,

что замена His57 оказывает радикальное воздействие на различные свойства ESR, включая pH-зависимость максимума поглощения и pK_a образования интермедиата М [38]. В отличие от ESR дикого типа, максимум поглощения которого слабо зависит от pH в диапазоне 3–10, для мутанта H57M характерен значительный (на 47 нм) сдвиг максимума при повышении pH от 5 до 8,5. При pH 5 максимум поглощения H57M составляет 565 нм, что соответствует максимуму поглощения мутанта D85N. Таким образом, связь с His57 определяет степень протонирования остатка Asp85, т.е. его способность функционировать в качестве акцептора протонов от основания Шиффа. С целью уточнения функциональной роли данного взаимодействия мы продолжили изучение свойств ESR с заменой H57N и двойного мутанта H57N/K96A с помощью метода прямой электрометрии.

В результате измерений фотоцикла протеолипосом, содержащих данный мутант, установлено, что замена H57N приводит к ускорению образования интермедиата М благодаря отсутствию в этом процессе медленной фазы спектральных изменений, ранее обнаруженной в фотоцикле ESR и мутанта K96A (рис. 4, а). Аналогичная компонента отсутствует также и в фотоэлектрическом ответе, что указывает на связь медленной фазы генерации М в ESR с остатком His57 (возможное объяснение этой связи приводится в следующем разделе). По сравнению с диким типом ESR, распад М в мутанте H57N также происходит быстрее и включает единственную стадию, поскольку не сопровождается накоплением состояния N1.

Интересно, что в двойном мутанте H57N/K96A распад интермедиата М происходит в 1000 раз медленнее, чем в диком типе и в мутанте H57N, и в 10 раз медленнее, чем в K96A (рис. 4, а). Это явление можно объяснить устранением обратного перемещения протонов на основание Шиффа в результате замены H57N. Предположительно, замена остатка His57 в окружении акцептора протонов Asp85 приводит к изменениям заряда или других свойств среды, в результате чего создается кинетический барьер для такого перемещения.

Ранее при исследовании pH-зависимости транспорта протонов клетками *E. coli*, экспрессирующими ESR, было установлено, что при pH ниже 5 эффективность работы белка дикого типа как протонной помпы существенно снижена [38]. Оказалось, что в тех же условиях мутанты H57N и H57N/K96A демонстрируют высокую эффективность транспорта [57].

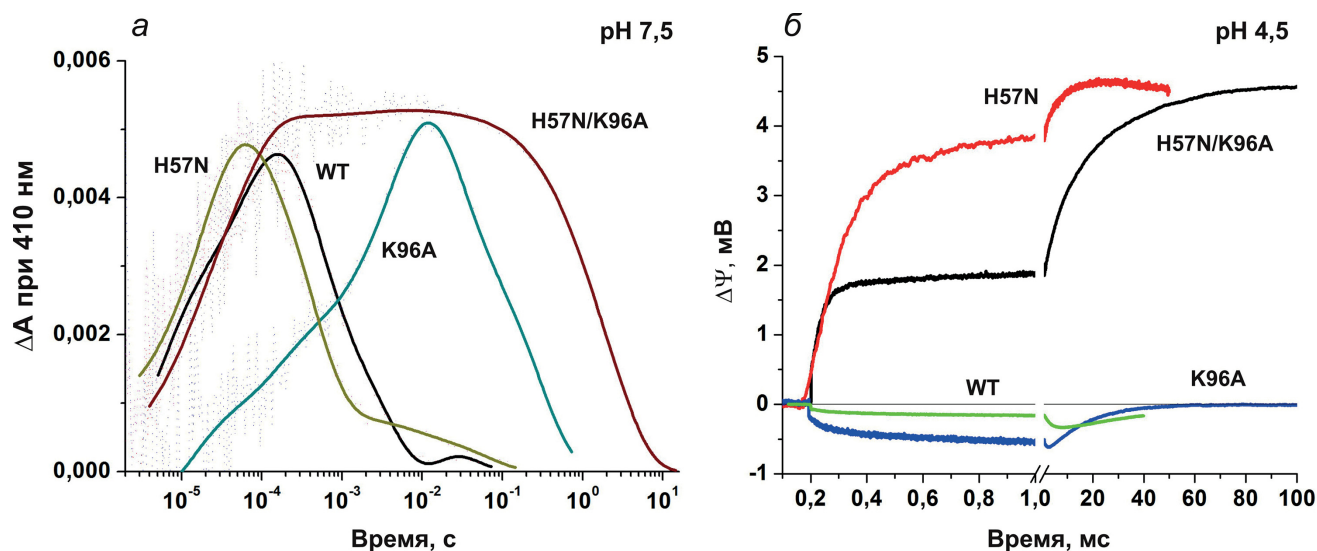


Рис. 4. Свойства мутантных вариантов ESR, содержащих замены остатка His57. *а* — Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при 410 нм протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа (WT) и его мутантные варианты, при pH 7,5; *б* — кинетика образования трансмембранной разницы потенциалов ($\Delta \Psi$) протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа и его мутантные варианты, при pH 4,5. Из [57], с изменениями

В соответствии с этими данными, при pH 4,5 мутанты с заменой H57N сохраняют амплитуду и направление фотоэлектрического ответа, в отличие от дикого типа и мутанта с одиночной заменой K96A (рис. 4, б). Таким образом, взаимодействие His57 и Asp85 ограничивает транспорт протонов при низких pH для дикого типа ESR. В мутанте H57N при pH 4,5 остаток Lys96, предположительно, протонирован уже в исходном состоянии. Благодаря этому репротонирование основания Шиффа в процессе распада интермедиата М происходит с высокой скоростью, после чего донор получает протон из среды, подобно тому, как это происходит при нейтральных pH в BR, где донор Asp96 исходно протонирован. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что Lys96 может эффективно выполнять функцию донора и при низких значениях pH.

Как указывалось выше, на основании pH-зависимости максимума поглощения от pH ранее был сделан вывод о том, что при pH < 6 акцептор протонов от основания Шиффа Asp85 в мутанте H57N должен находиться в протонированном состоянии в детергенте DDM. Однако последующие эксперименты продемонстрировали эффективную работу этого мутанта как протонной помпы при pH ниже 5 в мембранах липосом. Можно предположить, что pK_a Asp85 в H57N понижается в более гидрофобном окружении липосом и после изомеризации ретиналя в конфигурацию 13-*cis*, открывая возможность для перехода протона на основание Шиффа в процессе распада интермедиата L.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ESR КАК ПРОТОННОГО НАСОСА

На основании полученных результатов мы предложили схемы функционирования ESR и его мутантных вариантов в различных условиях [21, 39, 46, 47, 57]. Ранее опубликованная последовательность реакций переноса протона для дикого типа ESR включала в себя: 1) перенос протона от основания Шиффа на акцептор Asp85 в процессе образования интермедиата М; 2) протонирование донора Lys96 с цитоплазматической поверхности белка; 3) репротонирование основания Шиффа с участием Lys96 и 4) депротонирование Asp85 и освобождение протона на внеклеточной поверхности белка с участием неуставленной группы остатков [41]. Основные этапы этой схемы были прямо подтверждены и охарактеризованы при измерении с временным разрешением электрогенных событий перемещения протона в ходе фотоцикла ESR. Кроме того, схема была дополнена с учетом данных, полученных в результате измерений прямым электрометрическим методом. В частности, было уточнено происхождение медленных стадий образования интермедиата М, которые наблюдаются в ESR при нейтральных значениях pH. Поскольку в мутанте H57N этот процесс ускорен и не включает медленные компоненты, так же как и в белке дикого типа в щелочных условиях, был сделан вывод об их связи с наличием положительного заряда на остатке гистидина, который препятствует переносу протона от основания Шиффа на акцептор Asp85.

Наличие остатка His57 и его взаимодействие с Asp85 объясняет также и некоторые другие особенности протонного транспорта в ESR, включая пониженную эффективность транспорта при низких значениях pH и повышенную роль обратных реакций в мутанте K96A по сравнению с аналогичными мутантами BR. Обратные реакции, т.е. возвращение протона от акцептора Asp85 на основание Шиффа, могут определяться пониженным значением pK_a акцептора ESR (Asp85–His57) в М-состоянии по сравнению с BR или меньшим барьером для обратного переноса от Asp85 на основание Шиффа. Высокое значение pK Asp85 в BR на этой стадии (~11) связано с удалением положительно заряженного остатка аргинина от Asp85, повышением гидрофобности окружения Asp85 и ранним выделением протона с участием PRG [10, 58]. В молекуле ESR выделение протона происходит в конце фотоцикла [20, 38], вследствие чего внеклеточная часть белка может сохранять положительный заряд достаточно длительное время. Это, предположительно, приводит к увеличению вероятности обратного переноса протона от акцептора на основание Шиффа [47]. В ESR дикого типа благодаря присутствию донора Lys96 и быстрому репротонированию основания Шиффа обратные реакции играют незначительную роль, однако в мутанте K96A их влияние оказывается драматическим, приводя к существенному снижению эффективности транспорта протонов [41, 47].

Таким образом, важной функцией Lys96 в молекуле ESR является, помимо непосредственно репротонирования основания Шиффа, еще и предотвращение обратных реакций, снижающих эффективность работы помпы. В отличие от BR и PR, в которых функцию донора протонов выполняют исходно протонированные карбоксильные остатки, остаток лизина в молекуле ESR приобретает протон непосредственно перед передачей его на основание Шиффа. Такая последовательность событий ранее была установлена в экспериментах с использованием pH-чувствительного красителя [41] и затем подтверждена с помощью метода прямой электрометрии [39]. Обнаружение отдельной электрогенной стадии, соответствующей протонированию донора в процессе перехода $M1 \leftrightarrow M2$ в результате повышения pH до 8,4 и соответствующего замедления репротонирования основания Шиффа, дополнительно продемонстрировало возможности данного метода, поскольку в оптических измерениях эта стадия никак не проявлялась. Описанные закономерности могут иметь

значение для понимания механизма функционирования открытых позднее ретинальных белков, также содержащих остаток лизина в качестве донора протонов для основания Шиффа [59, 60].

Как было отмечено выше, отсутствие протон-выделяющей группы и раннего выделения протонов является важным отличием ESR от BR. Однако в ходе исследования мутантных вариантов белка были обнаружены данные, свидетельствующие о частичном освобождении протона на более ранних стадиях фотоцикла – в момент образования интермедиата М. Так, относительная амплитуда соответствующей электрогенной фазы у мутанта H57N оказалась существенно больше, чем у ESR дикого типа (28% и 5% соответственно). Предположительно, у мутанта она включает в себя также освобождение протона на внеклеточной стороне белка, подобно тому, как это происходит у BR [56]. Раннее выделение протона было также зафиксировано у мутантов, содержащих замены лизина на карбоксильные остатки, K96D/A47T и K96E. В этом случае, по-видимому, оно происходит на цитоплазматической поверхности белка и является результатом увеличения гидратированности полости, содержащей донорные остатки, в процессе образования интермедиата М [46]. Для уточнения механизмов этих процессов в дальнейшем будут проведены дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные работы последних лет, посвященные ретинальным белкам, продемонстрировали их впечатляющее природное разнообразие, а также широкое распространение среди микроорганизмов, населяющих различные экологические ниши. Так, установлено, что более половины представителей микробных сообществ Мирового океана содержат гены родопсинов, которые вносят существенный вклад в усвоение солнечной энергии микроорганизмами [61, 62]. Общее устройство молекулы и основные механизмы функционирования этих белков являются универсальными для всего семейства, однако эволюционная адаптация к конкретным условиям существования приводит к возникновению тонких настроек этих механизмов [5]. На примере ESR, ретинального белка почвенной бактерии, мы показали, каким образом изменения первичной структуры находят отражение в особенностях протонного транспорта в его молекуле. Неоценимую роль в этих исследованиях играют методы, позво-

ляющие с высоким временным разрешением наблюдать за процессами, происходящими в молекуле белка в ответ на поглощение кванта света. В этой связи метод прямой электрометрии занимает особую нишу, обеспечивая получение уникальной информации о перемещении протона внутри молекул протонных помп. Изучение деталей пространственной структуры и функциональных особенностей микробных родопсинов способствует более полному пониманию принципов их устройства, а также открывает возможность разработки подходов для направленного изменения их свойств, например, с целью создания новых инструментов для оптогенетики [6, 63–65].

Вклад авторов. Л.Е. Петровская, С.А. Силецкий, С.П. Балашов, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников – концепция и руководство работой, редактирование текста статьи; Л.Е. Петровская, С.А. Силецкий, М.Д. Мамедов, Е.П. Лукашев, С.П. Балашов – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00104).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Engelhard, M. (2022) Molecular Biology of Microbial Rhodopsins, in *Rhodopsin: Methods and Protocols* (Gordeliy, V., ed) Springer US, New York, NY, pp. 53-69, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_2.
- Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 845-872, doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233.
- Rozenberg, A., Inoue, K., Kandori, H., and Bèjà, O. (2021) Microbial rhodopsins: the last two decades, *Annu. Rev. Microbiol.*, **75**, 427-447, doi: 10.1146/annurev-micro-031721-020452.
- Gushchin, I., and Gordeliy, V. (2018) Microbial Rhodopsins, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (Harris, J. R., and Boekema, E. J., eds) Springer Singapore, Singapore. pp 19-56, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_2.
- Brown, L. S. (2022) Light-driven proton transfers and proton transport by microbial rhodopsins – A biophysical perspective, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **1864**, 183867, doi: 10.1016/j.bbamem.2022.183867.
- Kandori, H. (2020) Biophysics of rhodopsins and optogenetics, *Biophys. Rev.*, **12**, 355-361, doi: 10.1007/s12551-020-00645-0.
- Lanyi, J. K. (2006) Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1012-1018, doi: 10.1016/j.bbabi.2005.11.003.
- Skulachev, V. P., Bogachev, A. V., and Kasparinsky, F. O. (2013) Bacteriorhodopsin, in *Principles of Bioenergetics*, Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, pp. 139-156, doi: 10.1007/978-3-642-33430-6_6.
- Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halo-bacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Balashov, S. P. (2000) Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1460**, 75-94, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00131-6.
- Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J., and Landau, E. M. (2002) Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **1565**, 144-167, doi: 10.1016/S0005-2736(02)00566-7.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., and Lanyi, J. K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution, *Science*, **286**, 255-260, doi: 10.1126/science.286.5438.255.
- Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., et al. (2016) A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin, *Science*, **354**, 1552-1557, doi: 10.1126/science.aah3497.
- Pushkarev, A., and Bèjà, O. (2016) Functional metagenomic screen reveals new and diverse microbial rhodopsins, *ISME J.*, **10**, 2331-2335, doi: 10.1038/ismej.2016.7.
- Inoue, K. (2021) Diversity, Mechanism, and Optogenetic Application of Light-Driven Ion Pump Rhodopsins, in *Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond* (Yawo, H., Kandori, H., Koizumi, A., and Kageyama, R., eds) Springer Singapore, Singapore, pp. 89-126, doi: 10.1007/978-981-15-8763-4_6.
- Bamann, C., Bamberg, E., Wachtveitl, J., and Glaubit, C. (2014) Proteorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 614-625, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.010.

17. Brown, L. S. (2014) Eubacterial rhodopsins – unique photosensors and diverse ion pumps, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 553-561, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.05.006.
18. 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, doi: 10.1074/jbc.M803792200.
19. Hempelmann, F., Holper, S., Verhoefen, 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, doi: 10.1021/Ja111116a.
20. 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., and Kirpichnikov, M. P. (2010) Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump, *FEBS Lett.*, **584**, 4193-4196, doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.005.
21. Petrovskaya, L., Balashov, S., Lukashev, E., Imasheva, E., Gushchin, I. Y., Dioumaev, A., Rubin, A., Dolgikh, D., Gordeliy, V., Lanyi, J., and Kirpichnikov, M. (2015) ESR – A retinal protein with unusual properties from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 688-700, doi: 10.1134/S000629791506005X.
22. 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, doi: 10.1038/249321a0.
23. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Y., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250-262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.
24. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
25. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., and Petrovskaya, L. E. (2022) Application of direct electrometry in studies of microbial rhodopsins reconstituted in proteoliposomes, *Biophys. Rev.*, **14**, 771-778, doi: 10.1007/s12551-022-00986-y.
26. Kovalev, K., Volkov, D., Astashkin, R., Alekseev, A., Gushchin, I., Haro-Moreno, J. M., Chizhov, I., Siletsky, S., Mamedov, M., and Rogachev, A. (2020) High-resolution structural insights into the heliorhodopsin family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 4131-4141, doi: 10.1073/pnas.1915888117.
27. Rokitskaya, T. I., Maliar, N. L., Siletsky, S. A., Gordeliy, V., and Antonenko, Y. N. (2022) Electrophysiological Characterization of Microbial Rhodopsin Transport Properties: Electrometric and ΔpH Measurements Using Planar Lipid Bilayer, Collodion Film, and Fluorescent Probe Approaches, in *Rhodopsin: Methods and Protocols* (Gordeliy, V. ed) Springer US, New York, NY, pp. 259-275, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_12.
28. Mamedov, M. D., Beshta, O. E., Samuilov, V. D., and Semenov, A. Y. (1994) Electrogenicity at the secondary quinone acceptor site of cyanobacterial photosystem II, *FEBS Lett.*, **350**, 96-98, doi: 10.1016/0014-5793(94)00742-X.
29. Mamedov, M., Gadzhieva, R., Gourovskaya, K., Drachev, L., and Semenov, A. Y. (1996) Electrogenicity at the donor/acceptor sides of cyanobacterial photosystem I, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 517-522, doi: 10.1007/BF02110441.
30. Mamedov, M. D., Tyunyatkina, A. A., Siletsky, S. A., and Semenov, A. Y. (2006) Voltage changes involving photosystem II quinone–iron complex turnover, *Eur. Biophys. J.*, **35**, 647-654, doi: 10.1007/s00249-006-0069-3.
31. Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome c oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.08.003.
32. Siletsky, S. A., Soulimane, T., Belevich, I., Gennis, R. B., and Wikström, M. (2021) Specific inhibition of proton pumping by the T315V mutation in the K channel of cytochrome *ba₃* from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148450, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148450.
33. Siletsky, S. A., and Gennis, R. B. (2021) Time-resolved electrometric study of the F→O transition in cytochrome c oxidase. The effect of Zn²⁺ ions on the positive side of the membrane, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 105-122, doi: 10.1134/S0006297921010107.
34. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Wikström, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by *ba₃* cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and O_H states, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1858**, 915-926, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.007.
35. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2011) Time-resolved single-turnover of *caa₃* oxidase from *Thermus thermophilus*. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1807**, 1162-1169, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.006.

36. Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., and Stoerkenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: A light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*, *Biophys. J.*, **15**, 955-963, doi: 10.1016/S0006-3495(75)85875-9.
37. 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, doi: 10.1021/bi025563x.
38. 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, doi: 10.1021/bi300409m.
39. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1857**, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.08.004.
40. 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, doi: 10.1021/jp402430w.
41. 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, doi: 10.1074/jbc.M113.465138.
42. Huang, K.-S., Bayley, H., and Khorana, H. G. (1980) Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 323-327, doi: 10.1073/pnas.77.1.323.
43. Kaulen, A. D. (2000) Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1460**, 204-219, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00140-7.
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. S., 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, doi: 10.1073/pnas.1221629110.
45. Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterhelt, D., and Heberle, J. (1999) *In situ* determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5498-5503, doi: 10.1073/pnas.96.10.5498.
46. Petrovskaya, L. E., Lukashev, E. P., Siletsky, S. A., Imasheva, E. S., Wang, J. M., Mamedov, M. D., Kryukova, E. A., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., Balashov, S. P., and Lanyi, J. K. (2022) Proton transfer reactions in donor site mutants of ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **234**, 112529, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112529.
47. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1860**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.09.365.
48. 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, doi: 10.1073/pnas.86.23.9228.
49. Holz, M., Drachev, L. A., Mogi, T., Otto, H., Kaulen, A. D., Heyn, M. P., Skulachev, V. P., and Khorana, H. G. (1989) Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2167-2171, doi: 10.1073/pnas.86.7.2167.
50. Dioumaev, A. K., Brown, L. S., Needleman, R., and Lanyi, J. K. (2001) Coupling of the reisomerization of the retinal, proton uptake, and reprotonation of Asp-96 in the N photointermediate of bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **40**, 11308-11317, doi: 10.1021/bi011027d.
51. Sasaki, S., Tamogami, J., Nishiya, K., Demura, M., and Kikukawa, T. (2021) Replaceability of Schiff base proton donors in light-driven proton pump rhodopsins, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101013, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101013.
52. Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Boichenko, V. A., Antón, J., Wang, J. M., and Lanyi, J. K. (2005) Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna, *Science*, **309**, 2061-2064, doi: 10.1126/science.1118046.
53. 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, doi: 10.1073/pnas.0807162105.
54. 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 Cryst.*, **D69**, 1965–1980, doi: 10.1107/S0907444913017575.
55. Maciejko, J., Kaur, J., Becker-Baldus, J., and Glaubitz, C. (2019) Photocycle-dependent conformational changes in the proteorhodopsin cross-protomer Asp–His–Trp triad revealed by DNP-enhanced MAS-NMR, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **116**, 8342–8349, doi: 10.1073/pnas.1817665116.
 56. Morizumi, T., Ou, W.-L., Van Eps, N., Inoue, K., Kandori, H., Brown, L. S., and Ernst, O. P. (2019) X-ray crystallographic structure and oligomerization of *Gloeobacter* rhodopsin, *Sci. Rep.*, **9**, 1–14, doi: 10.1038/s41598-019-47445-5.
 57. Siletsky, S. A., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Borisov, V. B., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2021) His57 controls the efficiency of ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum* at low and high pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148328, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148328.
 58. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailier, J.-P., and Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899–911, doi: 10.1006/jmbi.1999.3027.
 59. 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, doi: 10.1126/science.1212665.
 60. Martin-Cuadrado, A. B., Garcia-Heredia, I., Molto, A. G., Lopez-Ubeda, R., Kimes, N., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., and Rodriguez-Valera, F. (2015) A new class of marine Euryarchaeota group II from the Mediterranean deep chlorophyll maximum, *ISME J.*, **9**, 1619–1634, doi: 10.1038/ismej.2014.249.
 61. Finkel, O. M., Béjà, O., and Belkin, S. (2013) Global abundance of microbial rhodopsins, *ISME J.*, **7**, 448–451, doi: 10.1038/ismej.2012.112.
 62. Gómez-Consarnau, L., Raven, J. A., Levine, N. M., Cutter, L. S., Wang, D., Seegers, B., Arístegui, J., Fuhrman, J. A., Gasol, J. M., and Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2019) Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea, *Sci. Adv.*, **5**, eaaw8855, doi: 10.1126/sciadv.aaw8855.
 63. Kojima, K., Shibukawa, A., and Sudo, Y. (2020) The unlimited potential of microbial rhodopsins as optical tools, *Biochemistry*, **59**, 218–229, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00768.
 64. De Grip, W. J., and Ganapathy, S. (2022) Rhodopsins: an excitingly versatile protein species for research, development and creative engineering, *Front. Chem.*, **10**, 879609, doi: 10.3389/fchem.2022.879609.
 65. Emiliani, V., Entcheva, E., Hedrich, R., Hegemann, P., Konrad, K. R., Lüscher, C., Mahn, M., Pan, Z.-H., Sims, R. R., Vierock, J., and Yizhar, O. (2022) Optogenetics for light control of biological systems, *Nat. Rev. Meth. Primers*, **2**, 55, doi: 10.1038/s43586-022-00136-4.

FEATURES OF PROTON TRANSPORT MECHANISM IN ESR, A RETINAL PROTEIN FROM *Exiguobacterium sibiricum*

Review

L. E. Petrovskaya^{1*}, S. A. Siletsky², M. D. Mamedov², E. P. Lukashev³, S. P. Balashov⁴,
D. A. Dolgikh^{1,3}, and M. P. Kirpichnikov^{1,3}

¹ Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: lpetr65@yahoo.com

² Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine 92697, USA

Retinal-containing photosensitive proteins, rhodopsins, have been detected in many microorganisms. The interest in them is largely explained by their role in storing light energy and photoregulation in microorganisms and the prospects for use in optogenetics in order to control the activity of neurons, including for the treatment of various diseases. One of the representatives of microbial rhodopsins is ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. The presence of a lysine residue (Lys96) as a proton donor for the Schiff base distinguishes ESR from homologous proteins. This feature, along with the hydrogen bonding of the proton acceptor Asp85 with the His57 residue, determines its functional characteristics as a proton pump. The review examines the results of ESR studies conducted using various methods, including the method of direct electrometry. Comparison of the obtained data with the results of spatial structure determination and with other retinal proteins allows drawing conclusions about the mechanisms of transport of hydrogen ions in the ESR molecule and similar retinal proteins.

Keywords: retinal protein, proteorhodopsin, Schiff base, proton acceptor, proton donor, photocycle, direct electrometric method