

УДК 577.344.2

## НОВЫЙ pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МИКРОБНЫЙ РОДОПСИН ИЗ *SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS*

© 2020 г. Н. Маляр<sup>1,\*</sup>, И. С. Охрименко<sup>1,\*</sup>, Л. Е. Петровская<sup>2,\*</sup>, А. А. Алексеев<sup>1,4,5,6</sup>,  
К. В. Ковалев<sup>1,3,4,5,6</sup>, Д. В. Соловьев<sup>1,7,8</sup>, П. А. Попов<sup>9,1</sup>, Т. И. Рокицкая<sup>10</sup>, Ю. Н. Антоненко<sup>10</sup>,  
Д. В. Забельский<sup>1,4,5</sup>, Д. А. Долгих<sup>2,11</sup>, академик РАН М. П. Кирпичников<sup>2,11</sup>, В. И. Горделий<sup>1,3,4,5,\*\*</sup>

Поступило 03.09.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принято к публикации 07.09.2020 г.

В данной работе впервые охарактеризован родопсин SpaR из *Sphingomonas paucimobilis*, аэробной бактерии, вызывающей оппортунистические инфекции. Анализ аминокислотной последовательности SpaR выявил, что этот белок обладает необычным мотивом DTS, не встречающимся ранее в родопсинах из протеобактерий. Мы показали, что родопсин SpaR функционирует как протонная помпа при низких pH, однако транспорт протонов почти полностью отсутствует в нейтральной и щелочной среде. Скорость фотоцикла белка в мицеллах детергента уменьшается с ростом pH за счет замедления репротонирования Шиффова основания. Наши результаты показывают, что новый микробный ионный транспортер SpaR интересен как для фундаментальных исследований мембранных белков, так и в качестве инструмента для оптогенетики.

**Ключевые слова:** микробный родопсин, светочувствительный ионный транспортер, светочувствительная протонная помпа, оптогенетика

**DOI:** 10.31857/S2686738920060256

### ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины – наиболее распространенные светочувствительные белки, встреча-

ющиеся в микроскопических организмах всех доменов жизни, включая вирусы [1]. Развитие оптогенетики привело к быстрому росту количества структурно-функциональных исследований микробных родопсинов с целью получения оптогенетических инструментов с новыми свойствами [2]. Для поиска новых родопсинов зачастую применяют метагеномный анализ, методы молекулярной филогенетики; при выборе новых объектов исследования особое внимание обращают на необычный мотив консервативных аминокислотных остатков. Наиболее изученная светочувствительная протонная помпа бактериородопсин *H. salinarum* (bR) обладает DTD мотивом (D85, T89 и D96 – аминокислотные остатки, ключевые для переноса протона) [3].

Ген, кодирующий опсин SpaR, был обнаружен нами в ходе биоинформатического поиска по открытым базам метагеномных данных [4]. Он содержится в геноме строго аэробной бактерии *S. paucimobilis* NBRC 13935 [5], выделенной из больничной вентиляции, обнаруженной также в клинических образцах и имеющей ряд других водных и грунтовых ареалов обитания [6, 7]. Анализ аминокислотной последовательности SpaR выявил наличие мотива DTS. Родопсины из протеобактерий с таким мотивом не были охарактеризованы ранее. Обнаруженный нами белок наиболее близок к недавно описанной филогенетической группе родопсинов с DTG-мотивом, в

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Гренобль, Франция

<sup>4</sup> Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich GmbH, Юлих, Германия

<sup>5</sup> JuStruct: Jülich Center for Structural Biology, Forschungszentrum Jülich GmbH, Юлих, Германия

<sup>6</sup> Institute of Crystallography, University of Aachen (RWTH), Ахен, Германия

<sup>7</sup> Институт проблем безопасности атомных электростанций НАН Украины, Киев, Украина

<sup>8</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>9</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>10</sup> НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени Ломоносова, Москва, Россия

<sup>11</sup> Московский государственный университет имени Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

\* Авторы сделали равный вклад в исследование

\*\* e-mail: valentin.gordeliy@ibs.fr

частности, содержит характерный для этой группы консервативный остаток гистидина H37 [8]. Авторы работы [8] описали родопсины из бактерий *Pseudomonas putida* (PspR) и *Pantoea ananatis* (PaR), в которых в положении, соответствующем остатку D96 бактериородопсина, являющегося карбоксильным донором протона для Шиффова основания (ШО), размещен G84. Кроме того, остаток T46 бактериородопсина, с которым D96 связан водородной связью, заменен гистидином H37, консервативным во всей филогенетической группе белков с мотивом DTG. В работе была показана способность PspR и PaR к активному транспорту протонов и высказано предположение, что именно H37 участвует в формировании комплекса, обеспечивающего репротонирование ШО.

В данной работе мы охарактеризовали родопсин SpaR спектроскопическими методами и провели эксперименты по определению его ионной селективности в клетках и в липидных везикулах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

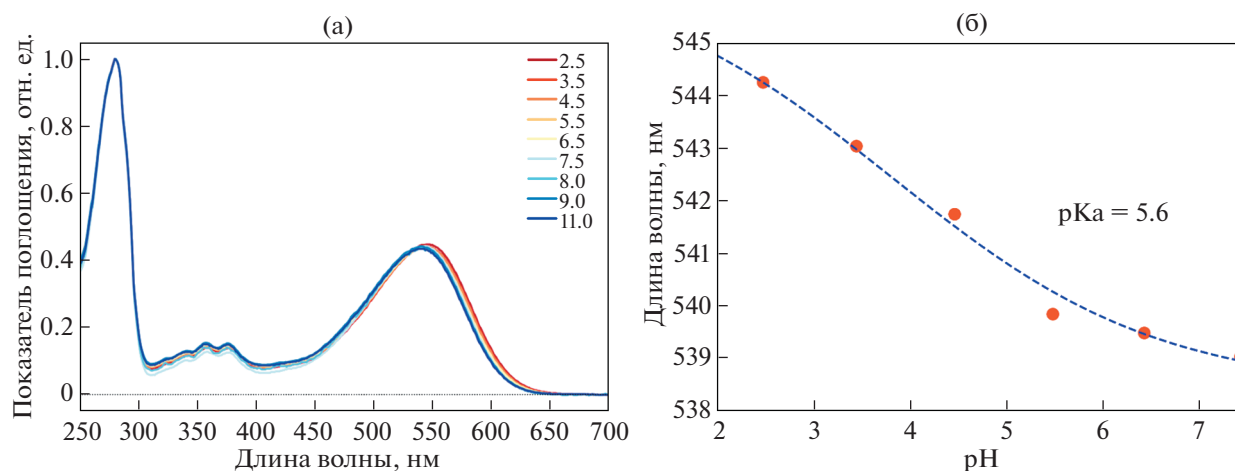
Последовательность нуклеотидов, кодирующая SpaR (UniProt ID: A0A0C9NB29), была оптимизирована для экспрессии в *Escherichia coli* с использованием Codon Optimization tool (Integrated DNA Technologies). Нуклеотидная последовательность на 5'-конце была оптимизирована с помощью RNA WebServer (Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna) с целью уменьшения вероятности образования шпилек РНК в области включающей сайты связывания рибосомы. Ген был получен сборкой из 14 перекрывающихся олигонуклеотидов (синтезированных "Евроген") методом ПЦР в две стадии [9] и клонирован в экспрессионный вектор pET32b ("Novagen") по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Таким образом был присоединен ген, кодирующий полигистидиновый таг на 3'-конце с сохранением рамки считывания. Экспрессию в клетках *E. coli* штамма C41(DE3) и очистку белка SpaR проводили по протоколу, описанному ранее [10]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader ("BioTek Instruments"). Установка для импульсного фотолиза аналогична описанной ранее [11] и включает в себя лазер Brilliant B Nd:YAG laser ("Quantel", Франция), генерирующий импульсы с энергией около 2 мДж длительностью 4 нс на длине волны 500 нм, монохроматоры MSH-150 ("LOT", Германия), источник света Xe-arc lamp, 75W ("Hamamatsu", Япония), детектор PMT detector (R12829, "Hamamatsu"), два цифровых осциллографа (Keysight DSO-X 4022A). Регистрацию изменений поглощения начинали спустя 700 нс после лазерного импульса до окончания фотоцикла; на длинах волн от 330 до 730 нм с шагом

10 нм. Мы проанализировали полученные данные, используя глобальное фитирование с помощью программы MEXFIT [12]. Для регистрации изменения pH суспензии клеток *E. coli* или липидных везикул в ответ на освещение использовали pH-метр (S20 SevenEasy™, "Mettler Toledo"). Образец (3 мл) помещали в стеклянную колбу с тефлоновым магнитным мешальником внутри. Все измерения проводили при температуре образца 0°C. Клетки и липидные везикулы освещали в течение 5 и 10 мин соответственно рефлекторной лампой холодного света (Olympus KL2500-LCD, 250 Вт). Измерения повторяли в тех же условиях после добавления 30 мМ протонофора СССР (карбонил цианид *m*-хлорфенил гидразон, Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone, СССР).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Положение максимума поглощения белка SpaR в мицеллах ДДМ (додecilмальтозид; *n*-dodecyl- $\beta$ -Dmaltoside; DDM, ДДМ) составляет 541 нм при pH 7.5 и практически не зависит от pH в диапазоне от 2.5 до 11.0 (рис. 1а). Максимум поглощения сдвигается при изменении pH от 2.5 до 7.5, что соответствует протонированию противоиона ШО D73, а pKa акцептора протона составляет 5.6 (рис. 1б).

Фотоцикл SpaR был охарактеризован методом импульсного фотолиза. Мы показали, что длительность фотоцикла SpaR значительно зависит от pH (рис. 2). Схематическое изображение фотоциклов и временные константы, полученные в результате глобального фитирования 7-ю экспонентами кинетики фотоцикла при pH 5.2 и 8.0, представлены на рис. 2а. На рис. 2б представлена pH-зависимость кинетики фотоцикла SpaR в мицеллах ДДМ (додecilмальтозид; *n*-dodecyl- $\beta$ -Dmaltoside; DDM, ДДМ), измеренная на трех характерных длинах волн 400 нм, 570 нм и 630 нм. Установлено, что при возрастании pH длительность  $\tau$  фотоцикла SpaR увеличивается более, чем в 30 раз: от  $\tau = 90$  мс при pH 5.2 до  $\tau = 3$  с при pH 8.0. На основе модели фотоцикла bR [12], мы заключаем, что в фотоцикле SpaR присутствуют аналоги интермедиатов K, M<sub>1</sub> (M<sub>400</sub>), M<sub>2</sub> (M<sub>410</sub>), N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, а также N<sub>3</sub> при низком pH. В отличие от bR, не наблюдается промежуточных состояний, подобных L- и O-состояниям. При pH 5.2 интермедиат K распадается на смесь K и M<sub>410</sub> (K/M<sub>1</sub>) в течение 6 мкс, затем через 27 мкс K/M<sub>1</sub> распадается с накоплением M<sub>1</sub>, а спустя 280 мкс происходит накопление M<sub>2</sub>. M<sub>2</sub>-состояние распадается до основного состояния через смесь M<sub>2</sub> и трех спектрально неразличимых N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> и N<sub>3</sub>-состояний. Весь фотоцикл занимает около 90 мс (рис. 2а). При pH 8.0 фотоцикл гораздо более длинный (3 с).



**Рис. 1.** (а) Спектры поглощения SpaR в мицеллах ДДМ при различных значениях pH в смеси 6 буферов (10 мМ цитрата, 10 мМ MES, 10 мМ HEPES, 10 мМ MOPS, 10 мМ CHES и 10 мМ CAPS), включающих 100 мМ NaCl; (б) pH-зависимость положения максимума поглощения SpaR в мицеллах ДДМ (красные кружки), фитированная сигмоидной кривой (синим пунктиром). pKa акцептора протона получен путем определения точки перегиба сигмоиды.

Распад  $M_1$  занимает примерно такое же время, как при pH 5.2, но затем кинетика фотоцикла существенно замедляется. К тому же, в отличие от pH 5.2, фаза  $M_2/N_3$  отсутствует.

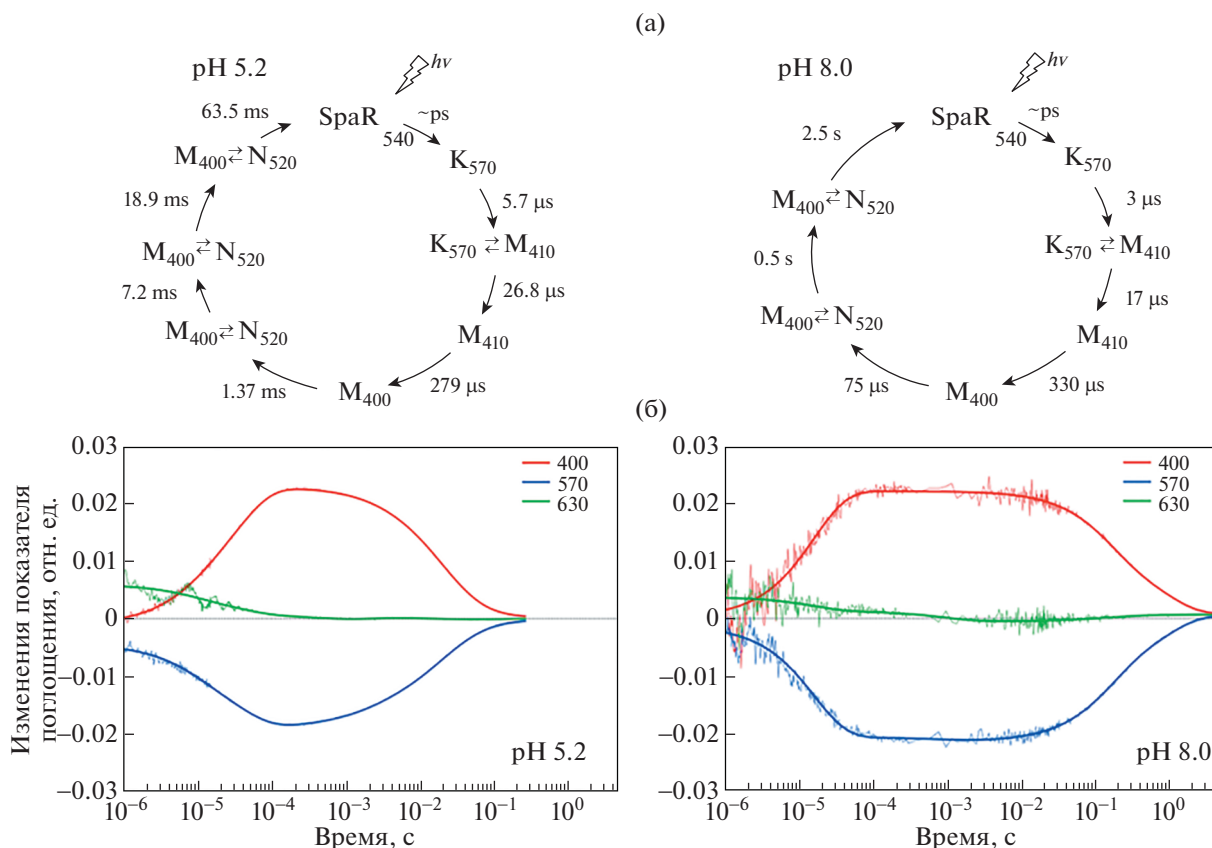
Интересно, что в работе Nagis и соавторов [8] для белка PspR также показано замедление фотоцикла за счет удлиненного распада M-состояния. Это позволяет предположить, что SpaR и PspR могут иметь похожие функции и использовать аналогичные механизмы переноса протона.

С помощью метода регистрации светоиндуцированного изменения pH мы наблюдали эффект закисления суспензии клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих SpaR, в 100 мМ NaCl (pH 6.2, буфер отсутствует) при освещении. Наблюдаемый эффект существенно уменьшается в присутствии протонофора СССР (карбонил цианид m-хлорфенил гидразон, Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, СССР), что указывает на транспорт протонов из клетки наружу (рис. 3а). Такое поведение характерно для протонных помп, в том числе бактериородопсина (bR) и протородопсина (pR) [13]. Для анализа зависимости эффекта от pH мы провели аналогичные эксперименты со SpaR, встроенным в одиночные липидные везикулы. При pH 6.0 наблюдалось защелачивание среды (рис. 3б), аналогично результатам подобных экспериментов с bR и pR, поскольку они ориентируются в везикулах C-концом наружу и закисляют внутреннее пространство везикул под действием света. Мы наблюдали значительное изменение pH под действием света только при pH 6.0, а при pH 7.5 оно было сравнимо с контролем (липидные везикулы без SpaR). Проведенные эксперименты еще раз подтверждают выраженную pH-зависимость активного транспорта протонов родопсином SpaR.

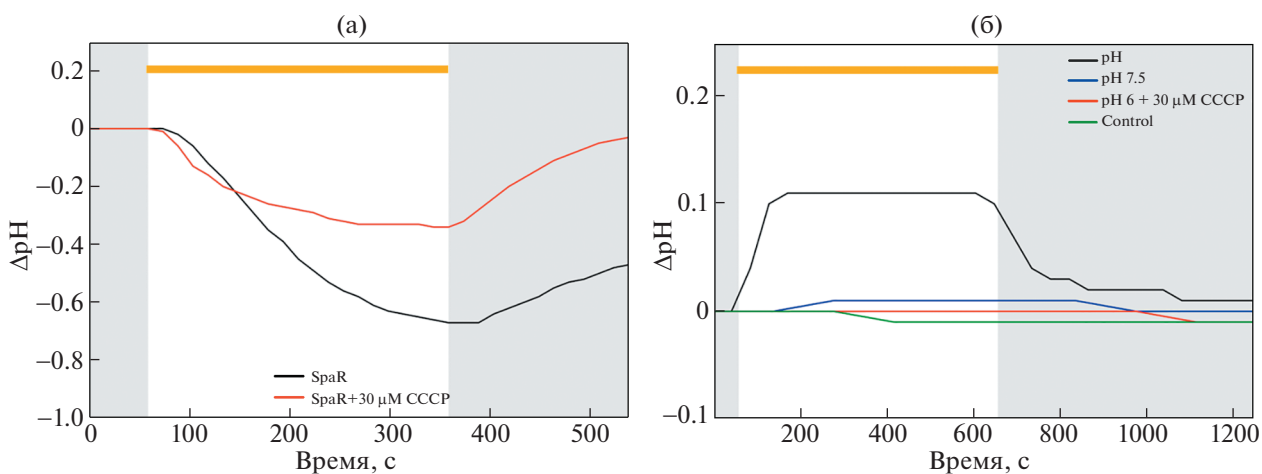
Таким образом, в нашей работе описан новый родопсин SpaR, недавно найденный в геноме строго аэробной оппортунистической бактерии *S. paucimobilis NBRC 13935*. Проведенная функциональная и структурная характеристика выявила следующие особенности: при pH менее 7.0 SpaR функционирует как светочувствительная протонная помпа, переносящая протоны наружу из клетки, как в одиночных липидных везикулах, так и в клетках *E. coli*. Скорость фотоцикла замедляется с ростом pH. Замедление фотоцикла вероятно происходит за счет замедления распада  $M_2$ -состояния, и следовательно, более длительного репротонирования Шиффова основания.

При защелачивании среды в липидных везикулах или во внеклеточном растворе, помповая активность SpaR практически исчезает. Следовательно, функция белка, возможно, не ограничена pH-зависимым транспортом протонов через мембрану. Не понятна также роль SpaR в жизнедеятельности организма-хозяина, бактерии *S. paucimobilis NBRC 13935*. Эта бактерия может вызывать опасные оппортунистические инфекции у человека, поэтому не исключено, что установление роли родопсина в ее метаболизме может помочь в разработке нового типа антибактериальных средств [14]. Интересно, что нами был обнаружен родопсин, на 99% идентичный SpaR, в алкалофильной бактерии *Sphingomonas sp. S17* [15]. Это может означать, что родопсин SpaR, как и его аналог, адаптирован алкалофильной бактерией для предотвращения закисления цитоплазмы при попадании бактерии в кислую среду, но для окончательного ответа необходимо дальнейшее изучение.

Анализ аминокислотной последовательности SpaR и полученные нами результаты позволяют



**Рис. 2.** (а) Предлагаемые модели фотоцикла SpaR в мицеллах ДДМ в буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> при pH 5.2 и 8.0 (слева направо); (б) изменение поглощения SpaR в мицеллах ДДМ на 400 нм (красным), 570 нм (синим), 630 нм (зеленым), регистрируемое в течение фотоцикла, при pH 5.2 и 8.0 (слева направо).



**Рис. 3.** (а) Изменение pH суспензии клеток *E. coli*, экспрессирующих SpaR под действием освещения с и без добавления CCCP (100 мМ NaCl, pH 6.2). Период освещения обозначен оранжевой линией; (б) изменение pH под действием света в одиночных липидных везикулах со встроенным SpaR при различных pH с/без добавления CCCP. Период освещения обозначен оранжевой линией. Для уравнивания везикул в нужном pH проводили диализ против 200 мл раствора 100 мМ NaCl, доведенного до нужного значения pH при 4°C (четыре смены). В качестве контроля использовались одиночные везикулы без белка.

предположить, что SpaR может иметь функциональную схожесть с родопсинами с DTG-мотивом, механизмы функционирования которых и физиологическая роль тоже не до конца ясны [8].

Таким образом, требуется поиск и дальнейшая структурная и функциональная характеристика большой группы родопсинов как с DTG, так и с DTS-мотивом.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, проект № 17-00-00167К (КОМФИ 17-00-00164, 17-00-00165, 17-00-00166).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gushchin I., Gordeliy V. Microbial rhodopsins // Sub-cellular Biochemistry. 2018. V. 87. P. 19–56.
2. Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A. Оптогенетика и зрение // Вестник Российской Академии наук. 2019. Т. 89. № 2. С. 125–130.
3. Luecke H., Schobert B., Richter H.T., et al. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution // J. Mol. Biol. 1999. V. 291. № 4. С. 899–911.
4. Ushakov A., Grudin S., Okhrimenko I., et al. Knowledge-based prediction model for characterization of microbial rhodopsins for optogenetics // FEBS J. 2016. V. 283. September. С. P-03.03.2-014.
5. Pan L., Zhou H., Li J., et al. Draft genome sequence of *Sphingomonas paucimobilis* strain LCT-SP1 isolated from the Shenzhou X spacecraft of China // Stand. Genomic Sci. Standards in Genomic Sciences. 2016. V. 11. № 1. P. 18.
6. Hardjo Lugito N.P., Cucunawangsih, Kurniawan A. A Lethal Case of *Sphingomonas paucimobilis* Bacteremia in an Immunocompromised Patient // Case Rep. Infect. Dis. 2016. V. 2016. P. 1–4.
7. Maragakis L.L., Chaiwarith R., Srinivasan A., et al. *Sphingomonas paucimobilis* Bloodstream Infections Associated with Contaminated Intravenous Fentanyl // Emerg. Infect. Dis. 2009. V. 15. № 1. P. 12–18.
8. Harris A., Ljumovic M., Bondar A.N., et al. A new group of eubacterial light-driven retinal-binding proton pumps with an unusual cytoplasmic proton donor // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. Elsevier B.V. 2015. V. 1847. № 12. P. 1518–1529.
9. Stemmer W.P.C., Cramer A., Ha K.D., et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides // Gene. 1995. V. 164. № 1. P. 49–53.
10. Shevchenko V., Mager T., Kovalev K., et al. Inward H<sup>+</sup> pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach // Sci. Adv. 2017. V. 3. № 9. P. e1603187.
11. Bratanov D., Kovalev K., Machtens J., et al. Unique structure and function of viral rhodopsins // Nat. Commun. Springer US, 2019. V. 10. № 1. P. 4939.
12. Chizhov I., Chernavskii D.S., Engelhard M., et al. Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle // Biophys. J. Elsevier, 1996. V. 71. № 5. P. 2329–2345.
13. Yoshizawa S., Kumagai Y., Kim H., et al. Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. V. 111. № 18. P. 6732–6737.
14. Gushchin I., Melnikov I., Polovinkin V., et al. Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases // Science. V. 356. Iss. 6342. eaah6345.
15. Farias M.E., Revale S., Mancini E., et al. Genome Sequence of *Sphingomonas* sp. S17, Isolated from an Alkaline, Hyperarsenic, and Hypersaline Volcano-Associated Lake at High Altitude in the Argentinean Puna // J. Bacteriol. 2011. V. 193. № 14. P. 3686–3687.

## NOVEL PH-SENSITIVE MICROBIAL RHODOPSIN FROM *Sphingomonas paucimobilis*

N. Maliar<sup>a,#</sup>, I. S. Okhrimenko<sup>a,#</sup>, L. E. Petrovskaya<sup>b,#</sup>, A. A. Alekseev<sup>a,d,e,f</sup>, K. V. Kovalev<sup>a,c,d,e,f</sup>,  
D. V. Soloviov<sup>a,g,h</sup>, P. A. Popov<sup>i,a</sup>, T. I. Rokitskaya<sup>j</sup>, Y. N. Antonenko<sup>j</sup>, D. V. Zabelskii<sup>a,d,e</sup>, D. A. Dolgikh<sup>b,k</sup>,  
Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov<sup>b,k</sup>, and V. I. Gordeliy<sup>a,c,d,e,#</sup>

<sup>a</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

<sup>b</sup> Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>c</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Grenoble, France

<sup>d</sup> Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany

<sup>e</sup> JuStruct: Jülich Center for Structural Biology, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany

<sup>f</sup> Institute of Crystallography, University of Aachen (RWTH), Aachen, Germany

<sup>g</sup> Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>h</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

<sup>i</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

<sup>j</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>k</sup> Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russia

<sup>#</sup> These authors contributed equally to the work

<sup>##</sup> e-mail: valentin.gordeliy@ibs.fr

This work provides the first characteristics of the rhodopsin SpaR from *Sphingomonas paucimobilis*, aerobic bacteria associated with opportunistic infections. The sequence analysis of SpaR has shown that this protein has unusual DTS motif which has never reported in rhodopsins from proteobacteria. We report that SpaR operates as an outward proton pump at lower pH, however proton pumping is almost absent at neutral and alkaline pH. The photocycle of this rhodopsin in detergent slows down with the increase of pH because of longer Schiff base reprotonation. Our results show that the novel microbial ion transporter SpaR is both an interesting object for basic membrane proteins research and a perspective optogenetic tool.

**Keywords:** microbial rhodopsin, light-activated ion transporter, light-driven proton pump, optogenetics