



УДК 577.34+579.258

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПРОТЕОРОДОПСИН *Exiguobacterium sibiricum*

© 2024 г. Л. Е. Петровская*, **, #, Е. А. Крюкова*, ***, В. А. Большаков****,
Е. П. Лукашев****, С. А. Силецкий****, М. Д. Мамедов****, Р. В. Судаков****,
Д. А. Долгих*, ***, ****, М. П. Кирпичников*, ****

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

*** Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4

**** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/11

***** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1/40

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Сконструированы гены гибридных белков, включающих протеородопсин *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) и различные *N*-концевые растворимые домены. Эффективный синтез в клетках *Escherichia coli* наблюдался только в случае гибридов с шапероном Caf1M и мальтозосвязывающим белком MBP, экспрессируемых в виде предшественников с собственными сигнальными последовательностями. Изучение выделенного белка MBP-ESR в составе мицелл и протеолипосом продемонстрировало формирование и распад основных интермедиатов фотоцикла при pH > 8. Фотоэлектрический ответ гибридных белков Caf-ESR и MBP-ESR сопоставим по амплитуде с ответом ESR дикого типа, что указывает на их гомогенную ориентацию в мембране протеолипосом. Полученные конструкции могут быть использованы для создания систем бактериальной экспрессии различных ретинальных белков, обеспечивающих их единообразное встраивание в протеолипосомы.

Ключевые слова: протеородопсин, гибридный белок, экспрессия в *Escherichia coli*, фотоцикл, прямой электрометрический метод

DOI: 10.31857/S0132342324030099, EDN: NZАНХН

ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины – мембранные светочувствительные белки, содержащие хромофор ретиналя, который связан через основание Шиффа с остатком лизина [1–3]. В результате поглощения кванта света в их молекулах происходит ряд молекулярных событий, включающих изомеризацию ретиналя и его возвращение в исходное состояние, изменение степени протонирования основания Шиффа и ключевых аминокислотных остатков, трансмембранный перенос протонов или других

ионов в случае ион-транспортных родопсинов [4, 5]. Наиболее известный и хорошо изученный представитель семейства – бактериородопсин (BR), обнаруженный в пурпурных мембранах *Halobacterium salinarum* [6, 7]. Значительный вклад в исследования этого белка внесли Ю.А. Овчинников и его сотрудники [8, 9].

Родопсины выполняют в клетках микроорганизмов разнообразные функции, однако можно утверждать, что наиболее распространенная функция этих белков – энергетическая. В результате трансмембранного переноса протонов BR соз-

Сокращения: ESR – ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*; BR – бактериородопсин; Caf1M – шаперон капсульного антигена F1; DDM – *n*-додецил- β -D-мальтопиранозид; MBP – мальтозосвязывающий белок; PR – протеородопсин; wt ESR – ESR дикого типа.

Автор для связи: (эл. почта: lpetr65@yahoo.com).

дает электрохимический градиент (протон-движущую силу), которая используется клетками для синтеза АТФ при участии АТФ-синтазы. Такой способ генерации энергии, основанный на протон-транспортной активности BR, позволяет галобактериям выживать при понижении концентрации кислорода в среде [10]. Позднее у различных морских зубактерий были открыты протеородопсины (PR), которые вносят значительный вклад в утилизацию солнечной энергии и адаптацию микроорганизмов к существованию в олиготрофных условиях [11, 12].

Исследование транспортной активности микробных родопсинов предполагает их встраивание в замкнутый липидный бислой, например, в составе протеолипосом. Эти сферические частицы размером от 100 нм до 1 мкм, образованные липидами различного состава, являются удобной моделью природных мембран и позволяют подобрать подходящие условия для правильного фолдинга и эффективного функционирования мембранных белков [13, 14]. Уже на ранних этапах изучения BR было успешно продемонстрировано его встраивание в протеолипосомы, содержащие АТФ-синтазу различного происхождения, которое сопровождалось светозависимым синтезом АТФ [15–17]. Впоследствии были получены искусственные органеллы большего размера, содержащие PR и использующие накопленную энергию для белкового синтеза или полимеризации актина [18, 19].

Для достижения максимальной эффективности подобных систем большинство молекул светочувствительного белка должно быть ориентировано в одном направлении [20, 21]. Ориентация белков в мембране определяется различными факторами, прежде всего конфигурацией молекулы, размером частиц и свойствами входящих в ее состав липидов [20, 22, 23]. Например, BR преимущественно встраивается С-концом наружу, вследствие чего транспорт протонов осуществляется внутрь протеолипосом [24]. Для PR характерна обратная ориентация, поэтому в ответ на вспышку света происходит закисление среды [25]. В ряде случаев отдельные молекулы белка встраиваются в искусственный бислой в противоположных направлениях, в результате чего снижается эффективность транспорта и усложняется интерпретация полученных данных [21, 26].

Известно несколько подходов, обеспечивающих получение протеолипосом с одинаковой ориентацией молекул ретинального белка. Одним из первых было предложено разделение BR-содержащих протеолипосом с помощью гель-фильтрации [27]. Использование для формирования липосом липидов, содержащих заряженные груп-

пировки, позволяет регулировать встраивание в бислой белков, которые имеют различный заряд на N- и С-концах, включая PR [28]. Более универсальным представляется способ, основанный на увеличении размера одного из концов молекулы, например, за счет присоединения частиц никельсодержащей смолы к гексагистидиновой последовательности рекомбинантных белков [29]. Такой довесок препятствует проникновению соответствующего конца белка во внутреннюю полость липосом, что способствует единообразному встраиванию в липидный бислой. Аналогичный механизм обеспечивает однородную ориентацию природных мембранных белков, содержащих крупные растворимые домены [30]. Получение гибридов PR с различными растворимыми белками-партнерами способствовало его направленному встраиванию в протеолипосомы [31].

Объект наших исследований – ESR – ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*, относящийся к семейству протеородопсинов [32–34]. От других представителей семейства ESR отличается наличием остатка лизина в положении, соответствующем донору протонов для основания Шиффа [35, 36]. Для изучения его транспортной активности в составе протеолипосом нами было получено несколько вариантов гибридных белков, содержащих ESR и различные растворимые домены. Установлено, что N-концевой гибрид Caf-ESR обеспечивает эффективное встраивание молекул белка в бислой в одном направлении, в то время как С-концевые гибриды склонны к разнонаправленному встраиванию, что приводит к уменьшению наблюдаемого переноса зарядов [37]. Цель данной работы – конструирование и экспрессия генов различных N-концевых гибридов для повышения уровня синтеза ESR в *Escherichia coli* и направленного включения белка в протеолипосомы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование и экспрессия гибридных генов. Для получения гибридных полипептидов, включающих ESR и N-концевые растворимые домены, мы провели клонирование генов нескольких белков-партнеров, ранее использованных для повышения уровня продукции и растворимости мембранных белков в клетках бактерий и бесклеточных системах экспрессии. Известно большое число работ, в которых с этой целью применяли тиоредоксин и мальтозосвязывающий белок (MBP) *E. coli*, а также белок Mystic *Bacillus subtilis* [38–41]. В частности, MBP обладает способностью не только существенно повышать выход рекомбинантных белков, но и облегчает их сворачивание [42, 43]. Описано успеш-

ное получение гибридных белков, включающих MBP и рецепторы, сопряженные с G-белком [44, 45], а также бактериородопсин [40]. В некоторых работах были использованы конструкции, кодирующие зрелый MBP [40, 46], в других – кодирующие белок-предшественник, содержащий природный сигнальный пептид [44, 45].

Флуоресцентный белок mCherry на N-конце гибридного белка обеспечивал направленное встраивание PR в протеолипосомы [31]. Ранее нами было показано, что гибридный белок, содержащий периплазматический шаперон *Yersinia pestis* Caf1M, эффективно экспрессируется в клетках бактерий и способствуя единообразному встраиванию ESR в искусственный липидный бислой [37]. Таким образом, использованный нами набор включал пять белков-партнеров (рис. 1), причем три из них содержали сигнальные последовательности, обеспечивающие секрецию в периплазму. Соответствующие гены были объединены с последовательностью, кодирующей ESR, в составе единой рамки считывания. Для независимого фолдинга между доменами был размещен гибкий пептидный линкер, включающий 10 а.о. (GGGGSGGGGS). Схема клонирования обеспечивала добавление к C-концевой части гибридных белков гексагистидиновой последовательности для их очистки с помощью никель-аффинной хроматографии.

Экспрессию полученных гибридных генов проводили в одинаковых условиях, индукцию транскрипции осуществляли добавлением ИПТГ.

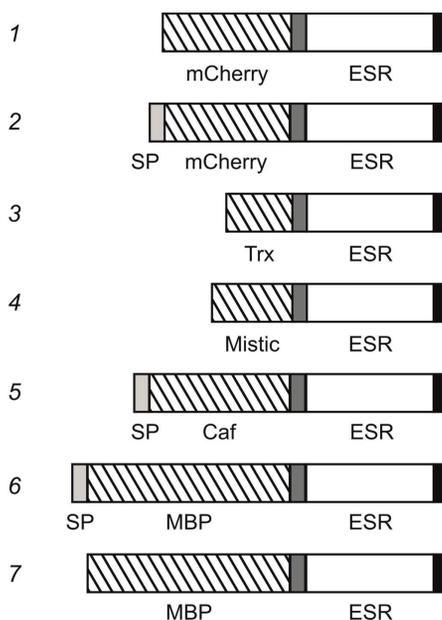


Рис. 1. Схемы строения гибридных белков. SP – сигнальная последовательность. Темно-серым цветом обозначен глицин-сериновый линкер, черным – гексагистидиновая последовательность.

В результате выделения и анализа мембранной фракции культур клеток, продуцирующих соответствующие полипептиды, был обнаружен эффективный синтез двух гибридных белков – Caf-ESR, который содержал Caf1M в качестве N-концевого домена, и MBP-ESR, экспрессируемых в виде предшественников с собственными сигнальными последовательностями (рис. 2, дорожки 5, 6).

Локализация в мембране, а также обнаружение единственной формы белков с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга позволяют предположить, что в процессе секреции происходит отщепление сигнальных последовательностей у предшественников Caf-ESR и MBP-ESR, в результате чего их N-концевые растворимые домены располагаются в периплазматическом пространстве. Следует отметить, что экспрессия гибридного белка MBP-ESR, лишённого сигнальной последовательности, в данных условиях не была обнаружена. Также не удалось детектировать экспрессию N-концевых гибридов с mCherry (включая вариант с сигнальной последовательностью PelB), тиоредоксином и белком Mistic.

Ранее мы показали, что гибридные белки, содержащие mCherry или тиоредоксин на C-конце ESR, успешно экспрессируются в клетках бактерий [37]. Такое расположение растворимых белков-партнеров совместимо со свойственной ESR и другим микробным родопсинам ориентацией в мембране (N-конец в периплазматическом пространстве, C-конец в цитоплазме). Можно предположить, что N-концевые гибриды ESR с секреторируемыми белками Caf1M и MBP ориентированы таким же образом. Расположение mCherry, зрелого MBP или тиоредоксина на N-конце ESR детерминирует противоположную ориентацию ретинального белка в клеточной мембране (N-конец в цитоплазме), что, вероятно, нарушает процесс его фолдинга. Известно, что накопление неправильно свернутых мембранных белков инициирует в клетках развитие стрессового ответа, который в числе прочих механизмов включает повышенный синтез протеолитических ферментов [47–49], что, вероятно, объясняет отсутствие экспрессии соответствующих гибридов.

Свойства гибридного белка MBP-ESR в составе мицелл. Характеристика гибридного белка Caf-ESR была проведена нами ранее [37]. Для оценки влияния N-концевого домена MBP-ESR на свойства входящего в его состав ретинального белка он был выделен из мембранной фракции клеток штамма-производителя в результате солюбилизации в *n*-додецил-β-D-мальтопиранозиде (DDM) и последующей никель-аффинной хроматографии. Необходимо отметить, что эффектив-

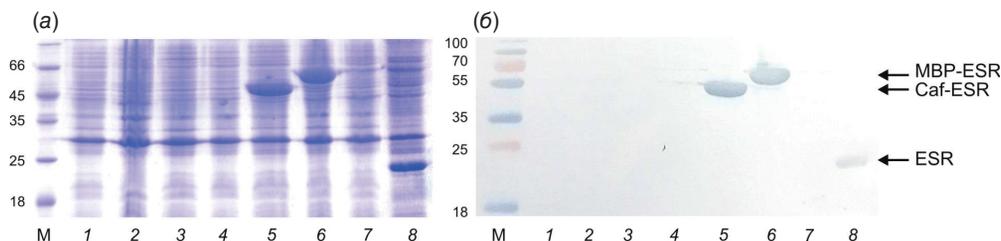


Рис. 2. Экспрессия гибридных белков, содержащих ESR, в клетках *E. coli*. Белковый электрофорез в 13%-ном SDS-ПААГ (а) и вестерн-блот-анализ (б) с анти-His-конъюгатом образцов мембранной фракции клеток *E. coli* C43(DE3), экспрессирующих гибридные белки (дорожки 1–7) и ESR дикого типа (дорожка 8). Номера дорожек 1–7 соответствуют нумерации конструкций на рис. 1. М – маркеры молекулярного веса белков (кДа).

ность сольubilизации данного гибрида оказалась существенно выше, чем у Caf-ESR (~80% против 25%), что можно объяснить его более высокой растворимостью благодаря использованию MBP в качестве белка-партнера. Значения максимума поглощения для MBP-ESR составили 525 нм при pH 7 и 523 нм при pH 9, что соответствует небольшому “синему” сдвигу по сравнению с диким типом ESR (528 нм при pH 7).

Кинетику светоиндуцированных изменений поглощения MBP-ESR при четырех длинах волн измеряли при двух значениях pH, при этом, как и в случае дикого типа ESR [50], было обнаружено отсутствие интермедиата М (депротонированного основания Шиффа) при pH 7 (рис. 3а). Интермедиаты с максимумом поглощения 590 нм доминируют на протяжении всего фотоцикла. В течение первых 10 мкс после вспышки первый из них частично распадается с появлением других длинноволновых интермедиатов, распад которых с $\tau \sim 84$ мс завершает фотоцикл (рис. 3а).

При pH 9 в результате распада интермедиатов К и L, сопровождающегося снижением поглощения при 550 и 590 нм, наблюдается рост поглощения при 410 нм (образование интермедиата М) с характерными временными константами $\tau \sim 8$ и 220 мкс,

2.7 мс. Распад М включает два компонента (11.5 и 386 мс) и приводит к возникновению интермедиата N2/O в результате первой компоненты распада М. Распад интермедиата N2/O с $\tau \sim 85$ и 386 мс завершает фотоцикл и возвращает белок в исходное состояние (рис. 3б). В целом константы указанных преобразований близки к константам, характерным для ESR дикого типа и гибрида Caf-ESR ([37], табл. 1), что указывает на сходные функциональные свойства белков. Небольшое замедление процессов, связанных с медленными стадиями образования и распада интермедиата М (увеличение характерных времен τ_2 , τ_6) может быть обусловлено влиянием крупного растворимого белка-партнера.

Свойства гибридного белка MBP-ESR в составе протеолипосом. Для изучения ориентации гибридного белка MBP-ESR мы получили протеолипосомы на основе азолектина, содержащие данный гибрид, и исследовали их фотоэлектрический ответ и фотоцикл при различных значениях pH. Метод прямой электротрии основывается на слиянии протеолипосом, содержащих транспортный белок, в данном случае ESR, с искусственной макроскопической мембраной (коллоидная пленка, пропитанная раствором фосфолипидов в *n*-декане). В результате переноса

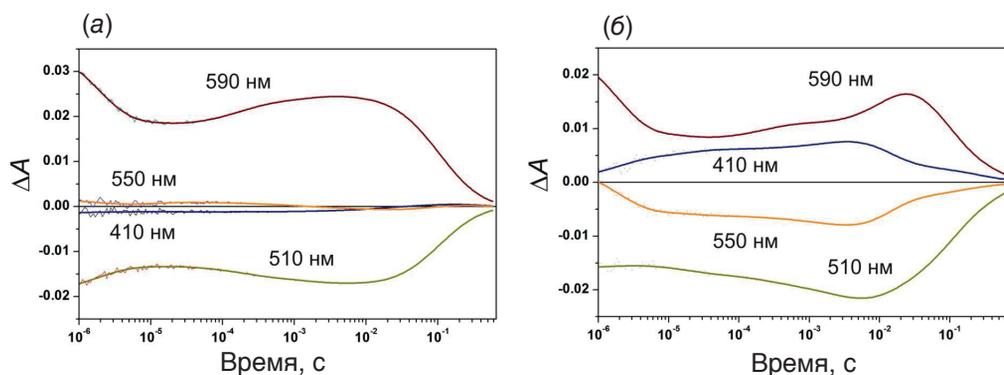


Рис. 3. Фотоцикл MBP-ESR в мицеллах DDM при pH 7 (а) и pH 9 (б).

Таблица 1. Константы фотоцикла (мс) ESR дикого типа и гибридных белков MBP-ESR и Caf-ESR в мицеллах DDM при pH 9.0

Белок	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5	τ_6
Wt ESR*	0.0044 ± 0.0002	0.130 ± 0.008	2.24 ± 0.13	12.10 ± 0.38	82.6 ± 3.6	310 ± 14
MBP-ESR	0.0080 ± 0.0006	0.220 ± 0.018	2.70 ± 0.18	11.50 ± 0.52	85.2 ± 4.5	386 ± 22
Caf-ESR*	0.0040 ± 0.0003	0.080 ± 0.010	2.23 ± 0.11	14.20 ± 0.66	60.0 ± 3.9	322 ± 29

* Используются данные из статьи Petrovskaya et al. [37].

протонов под действием света происходит генерация разности потенциалов между ячейками по обе стороны мембраны. Анализ полученных кинетических кривых наряду с результатами изучения фотоцикла позволяет сделать выводы о механизме транспорта протонов через мембрану и об ориентации белка в мембране протеолипосом [51, 52].

Ранее нами было показано, что фотоэлектрический ответ ESR включает микро- и миллисекундные фазы, в основном соответствующие депротонированию основания Шиффа, переносу протона на акцептор Asp85 и его репротонированию от донора Lys96 и высвобождению протона на внеклеточной стороне мембраны [34, 51, 53]. Фотоэлектрический ответ гибридных белков, содержащих ESR на N-конце (ESR-Cherry и ESR-Trx), сопровождается существенным уменьшением общей амплитуды ответа, в особенности, электрогенных стадий в миллисекундном временном диапазоне [37] (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о значительной доле неправильно ориентированных молекул ретинального белка в мембране протеолипосом. Напротив, гибридные белки Caf-ESR [37] и MBP-ESR продемонстрировали фотоэлектрический ответ, сопоставимый по амплитуде с ответом ESR дикого типа (рис. 4), что указывает на их гомогенную ориентацию в протеолипосомах. Характерная особенность гибридов Caf-ESR и MBP-ESR – более медленная кинетика микросекундных электрогенных стадий, связанных с образованием интермедиата М. Кроме того, фотоэлектрический ответ MBP-ESR обнаруживает ускоренный спад потенциала в миллисекундной области, предположительно связанный с влиянием крупного растворимого домена. Эти особенности электрогенных реакций гибридного белка требуют более детального кинетического анализа, который будет проведен в последующей работе.

В кинетике светоиндуцированных изменений поглощения гибридного белка MBP-ESR в составе протеолипосом при pH 7.5 образование интермедиата М (увеличение поглощения при

410 нм) не наблюдается (рис. 5а), что также было характерно для других гибридных белков, включающих ESR [37]. При pH 8.5 в течение первых 10 мкс обнаруживается снижение поглощения при 590 нм, что соответствует распаду интермедиатов К и L (рис. 5б). После этого детектируется накопление состояния М ($\tau \sim 5$ и 32 мкс), которое переходит в интермедиат N2/O с характерным временем 2.6 мс. Его распад и возвращение в исходное состояние ESR происходит с константами ~ 12 и 58 мс. Следует отметить, что протеолипосомы, содержащие ESR дикого типа, демонстрируют выраженное образование интермедиата М при pH 7.5 [50]. Его видимое отсутствие в фотоцикле протеолипосом, содержащих гибридные белки, может быть связано с влиянием растворимых доменов на физико-химические свойства мембранного окружения и, следовательно, на pK_a образования интермедиата М в этих белках [37].

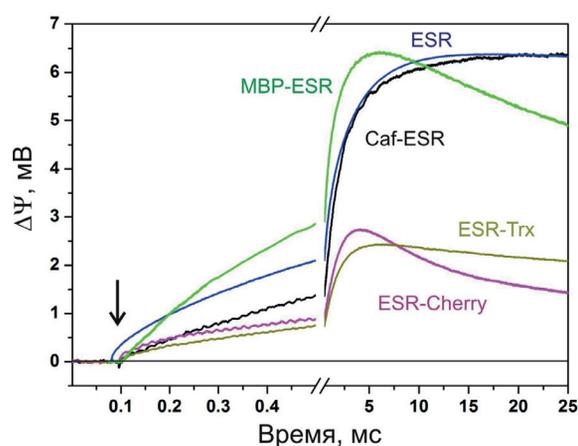


Рис. 4. Кинетика образования трансмембранной разности потенциалов ($\Delta\Psi$) протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа и гибридные белки, при pH 7.5. Стрелкой отмечен момент лазерной вспышки. Данные для ESR, Caf-ESR, ESR-Cherry и ESR-Trx взяты из статьи Petrovskaya et al. [37].

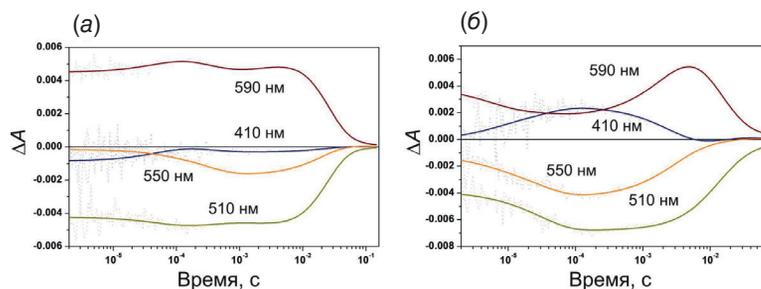


Рис. 5. Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при характерных длинах волн протеолипосомами, содержащими MBP-ESR, при pH 7.5 (а) и 8.5 (б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Merck (США), Panreac (Испания), Sigma (США), нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США), компоненты сред для культивирования бактерий (Amresco, США), наборы для выделения ДНК (Thermo Fisher Scientific, США), органические растворители производства Химмед (Россия). Растворы готовили на деионизированной воде Milli-Q.

Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США). Использовали ферменты производства Thermo Fisher Scientific (США). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой Евроген (Россия).

Конструирование гибридных генов. Конструирование генов секретируемых гибридных белков mCherry-ESR (с сигнальной последовательностью PelB) и Caf-ESR (с собственной сигнальной последовательностью) подробно описано ранее [37]. Для получения гибридного гена *mCherry-ESR*, не содержащего сигнальной последовательности, ген *ESR* амплифицировали из плазмиды pET-ESR [32] с использованием праймеров Bam_ESR и ESR_Xho (табл. 2) и после обработки рестриктазами BamHI и XhoI клонировали в плазмиду pChFn3 [54], обра-

ботанную этими же рестриктазами. Плазмиду, кодирующую гибридный белок Trx-ESR, получали клонированием этого же ПЦР-фрагмента в вектор pET32 (Novagen, США). Для объединения с геном *Mistic* фрагмент плазмиды pET-ESR, полученный обработкой рестриктазами NdeI и XhoI, клонировали в плазмиду pMT32H10 [38]. Ген *MBP* (с сигнальной последовательностью и без) амплифицировали из клеток *E. coli* штамма XL1-Blue с использованием праймеров Nde_MBП или Nde_MBП2 соответственно и MBP_Bam (табл. 2), обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI и клонировали в вектор, полученный обработкой ДНК pCaf-ESR [37] этими же рестриктазами. Последовательность вставки в полученных плаزمиде подтверждали секвенированием с использованием стандартных праймеров T7prom и T7term (Евроген, Россия).

Выделение мембранной фракции. Культуру штамма *E. coli* C43(DE3), трансформированную одной из полученных плазмид, выращивали в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C до значения OD₅₆₀ 0.5–0.7, индуцировали добавлением 0.2 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG), после чего добавляли 7.5 мкМ all-trans-ретиаль (Sigma, США) и продолжали культивирование в течение 16 ч при 25°C. Клетки осаждали при 7000 g и 5°C в течение 10 мин, затем осадок ресуспендировали

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность (5'–3')
Bam_ESR	ATAAGGATCCGGTGGAGGTGGCTCTGAAGAAGTCAATTTACTCGTTC
ESR_Xho	ACATCTCGAGGGACGTCAGCGTTTTTCSTT
Nde_MBП	ATTATCATATGAAAATAAAAACAGGTGCACG
Nde_MBП2	ATTATCATATGAAAATCGAAGAAGGTAACCTGG
MBP_Bam	ATTATGGATCCGCCTCCACCCTTGGTGATACGAGTCTGCG

Примечание: подчеркнуты сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 5 мМ EDTA, 20% сахарозы, лизоцим (0.2 мг/мл), и разрушали ультразвуком. Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000 g. Полученный супернатант центрифугировали 1 ч при 100 000 g, осадок мембранной фракции суспендировали в 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0.

Вестерн-блот-анализ. Белки, разделенные гелеэлектрофорезом в 13%-ном SDS-ПААГ по методу Лэммли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с помощью прибора для полусухого переноса. После инкубации в растворе 1%-ного BSA в TBS (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8.0) в течение 1 ч при 37°C мембрану выдерживали 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгата моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой (1 мкг/мл; Invitrogen, США) в 1%-ном BSA в TBS. После трехкратной промывки TBS с добавлением 0.1% Tween-20 проводили окрашивание мембраны с использованием преципитирующего 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Clinical Science Products, США).

Выделение гибридного белка MBP-ESR. Мембраны из клеток *E. coli* C43(DE3), экспрессирующих MBP-ESR, получали, как описано выше, и солубилизовали добавлением 1% DDM (Anatrace, США). Рекомбинантные белки очищали на колонке с Ni-сефарозой, как описано ранее [32], затем тщательно отмывали с помощью центрифужных фильтрующих устройств Ultracel YM-30 (Merck Millipore, США) и переводили в комплексный буфер (по 5 мМ цитрата натрия, MES, MOPS и CHES, 100 мМ NaCl, pH 7.4), содержащий 0.05% DDM.

Исследование спектральных и фотоэлектрических характеристик MBP-ESR. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV1700 (Shimadzu, Япония). Кинетику светиндуцированных изменений поглощения измеряли, как описано ранее [35]. При 410 нм регистрировали изменения поглощения, вызванные образованием и распадом M-интермедиата; при 590 нм – изменения поглощения вследствие образования и распада N- и O-интермедиатов; при 550 нм – вследствие возвращения в исходное состояние, а также образования и распада K-, M- и N-интермедиатов; при 510 нм – изменения, отражающие в основном превращения L-интермедиата. Для активации фотоцикла использовали вторую гармонику Nd-YAG-лазера (532 нм, 7 нс, 10 мДж).

Встраивание в протеолипосомы на основе азолектина, измерения фотоиндуцированных изменений поглощения в суспензии липосом и фотоэлектрические измерения прямым электро-

метрическим методом протеолипосом, адсорбированных на армированной коллоидной пленкой макроскопической фосфолипидной мембране, проводили, как описано ранее [36, 53, 55]. Использовали сконструированную для измерений прямым электрометрическим методом установку с временным разрешением до 100 нс в сочетании с импульсным Nd-YAG-лазером (532 нм, 12 нс, 40 мДж). Кинетику образования ΔΨ на макроскопической мембране в ответ на лазерную вспышку, пропорционального генерируемого ESR ΔΨ на мембране протеолипосом, измеряли электродами Ag/AgCl, расположенными по разные стороны макроскопической мембраны.

Данные оптических измерений с временным разрешением были сведены к сумме отдельных компонент с использованием программного обеспечения Mathematica (Wolfram, США), Origin (OriginLab Corporation, США) и MATLAB (The Mathworks, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурно-функциональные исследования мембранных белков требуют разработки эффективных методов их продукции в гетерологичных системах, позволяющих нарабатывать миллиграммовые количества препаратов в правильно свернутом, функционально активном состоянии. Конструирование гибридных белков способствует успешному решению этих задач, а также обеспечивает условия для гомогенного встраивания в мембрану, что может иметь решающее значение для корректной оценки функциональной активности целевых биомолекул.

В результате анализа экспрессии полученных в данной работе гибридных белковых конструкций, содержащих протеородопсин ESR и различные белки-партнеры, установлено, что высокий уровень синтеза в клетках бактерий достигается только при использовании в качестве N-концевых партнеров природных секретлируемых белков, включающих собственный сигнальный пептид (Caf-ESR и MBP-ESR). Изучение свойств выделенных гибридных белков в составе мицелл и протеолипосом показало, что они демонстрируют спектрально-временные параметры фотоцикла и кинетику генерации мембранного потенциала, характерные в общих чертах для исходного белка ESR.

Полученные конструкции могут быть использованы для создания систем бактериальной экспрессии различных мембранных белков в составе гибридов, обеспечивающих их единообразное встраивание в протеолипосомы.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-795, уникальный идентификатор проекта RF-190220X0027).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Li H., Spudich J.L.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 845–872.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-101910-144233>
2. *Gushchin I., Gordeliy V.* // In: *Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Subcellular Biochemistry. V. 87* / Eds. Harris J., Boekema E. Singapore: Springer Singapore, 2018. P. 19–56.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_2
3. *Kandori H.* // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 355–361.
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00645-0>
4. *Brown L.S.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2022. V. 1864. P. 183867.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183867>
5. *Lanyi J.K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1757. P. 1012–1018.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.11.003>
6. *Oesterhelt D., Stoekenius W.* // *Nature.* 1971. V. 233. P. 149–152.
<https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>
7. *Lanyi J.K., Luecke H.* // *Curr. Opin. Str. Biol.* 2001. V. 11. P. 415–419.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00226-8)
8. *Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V., Lobanov N.A.* // *FEBS Lett.* 1979. V. 100. P. 219–224.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80338-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80338-5)
9. *Ovchinnikov Y.A.* // *Photochem. Photobiol.* 1987. V. 45. P. 909–914.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb07902.x>
10. *Oesterhelt D., Stoekenius W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973. V. 70. P. 2853–2857.
<https://doi.org/10.1073/pnas.70.10.2853>
11. *Gómez-Consarnau L., Raven J.A., Levine N.M., Cutter L.S., Wang D., Seegers B., Aristegui J., Fuhrman J.A., Gasol J.M., Sañudo-Wilhelmy S.A.* // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. P. eaaw8855.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw8855>
12. *DeLong E.F., Beja O.* // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. e1000359.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000359>
13. *Lyukmanova E., Shenkarev Z., Khabibullina N., Kopeina G., Shulepko M., Paramonov A., Mineev K., Tikhonov R., Shingarova L., Petrovskaya L., Dolgikh D., Arseniev A., Kirpichnikov M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. P. 349–358.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.020>
14. *Amati A.M., Graf S., Deutschmann S., Dolder N., von Ballmoos C.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. V. 48. P. 1473–1492.
<https://doi.org/10.1042/bst20190966>
15. *Racker E., Stoekenius W.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 662–663.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43080-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43080-9)
16. *Deisinger B., Nawroth T., Zwicker K., Matuschka S., John G., Zimmer G., Freisleben H.-J.* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. P. 377–383.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18387.x>
17. *Pitard B., Richard P., Duñarach M., Girault G., Rigaud J.-L.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 235. P. 769–778.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00769.x>
18. *Lee K.Y., Park S.-J., Lee K.A., Kim S.-H., Kim H., Meroz Y., Mahadevan L., Jung K.-H., Ahn T.K., Parker K.K.* // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 530–535.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4140>
19. *Choi H.-J., Montemagno C.D.* // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 2538–2542.
<https://doi.org/10.1021/nl051896e>
20. *Rigaud J.-L., Pitard B., Levy D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1231. P. 223–246.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-v](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-v)
21. *Shen H. H., Lithgow T., Martin L.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 1589–1607.
<https://doi.org/10.3390/ijms14011589>
22. *Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 1475–1488.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.007>
23. *Cymer F., Von Heijne G., White S.H.* // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. P. 999–1022.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.014>
24. *Huang K.-S., Bayley H., Khorana H.G.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 323–327.
<https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.323>
25. *Dioumaev A.K., Wang J.M., Bálint Z., Váró G., Lanyi J.K.* // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 6582–6587.
<https://doi.org/10.1021/bi034253r>

26. Seigneuret M., Rigaud J.-L. // FEBS Lett. 1985. V. 188. P. 101–106. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80883-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80883-8)
27. Seigneuret M., Rigaud J.-L. // FEBS Lett. 1988. V. 228. P. 79–84. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80589-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80589-1)
28. Tunuguntla R., Bangar M., Kim K., Stroeve P., Ajo-Franklin C.M., Noy A. // Biophys. J. 2013. V. 105. P. 1388–1396. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.043>
29. Pflieger N., Wörner A.C., Yang J., Shastri S., Hellmich U.A., Aslimovska L., Maier M.S., Glaubitz C. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1787. P. 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.022>
30. Lee H., Kim H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 453. P. 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.111>
31. Ritzmann N., Thoma J., Hirschi S., Kalbermatter D., Fotiadis D., Muller D.J. // Biophys. J. 2017. V. 113. P. 1181–1186. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.022>
32. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.P. // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 4193–4196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.005>
33. Петровская Л.Е., Балашов С.П., Лукашев Е.П., Имашева Э.С., Гуцин И.Ю., Дюмаев А.К., Рубин А.Б., Долгих Д.А., Горделий В.И., Лани Я.К., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 814–828. [Petrovskaya L., Balashov S., Lukashev E., Imasheva E., Gushchin I.Y., Dioumaev A., Rubin A., Dolgikh D., Gordeliy V., Lanyi J., Kirpichnikov M. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 688–700]. <https://doi.org/10.1134/S000629791506005X>
34. Петровская Л.Е., Силецкий С.А., Лукашев Е.П., Балашов С.П., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 1867–1879. [Petrovskaya L.E., Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Biochemistry (Moscow). 2023. V. 88. P. 1544–1554]. <https://doi.org/10.1134/s0006297923100103>
35. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 21254–21265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465138>
36. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2019. V. 1860. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.09.365>
37. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Kryukova E.A., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Siletsky S.A. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 7369. <https://doi.org/10.3390/ijms24087369>
38. Петровская Л.Е., Шульга А.А., Бочарова О.В., Ермолюк Я.С., Крюкова Е.А., Чупин В.В., Бломмерс М.Ж.Ж., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1001–1013. [Petrovskaya L., Shulga A., Bocharova O., Ermolyuk Y.S., Kryukova E., Chupin V., Blommers M., Arseniev A., Kirpichnikov M. // Biochemistry (Moscow). 2010. V. 75. P. 881–891]. <https://doi.org/10.1134/S0006297910070102>
39. Ishihara G., Goto M., Saeki M., Ito K., Hori T., Kigawa T., Shirouzu M., Yokoyama S. // Prot. Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.013>
40. Chen G.Q., Gouaux J.E. // Prot. Sci. 1996. V. 5. P. 456–467. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050307>
41. Lyukmanova E., Shenkarev Z., Khabibullina N., Kulbatskiy D., Shulepko M., Petrovskaya L., Arseniev A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // Act. Nat. 2012. V. 4. P. 58–64. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-4-58-64>
42. Raran-Kurussi S., Waugh D.S. // PLoS One. 2012. V. 7. e49589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049589>
43. Kapust R.B., Waugh D.S. // Prot. Sci. 1999. V. 8. P. 1668–1674. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1668>
44. Yeliseev A., Zoubak L., Gawrisch K. // Prot. Expr. Purif. 2007. V. 53. P. 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.12.003>
45. Weiß H.M., Grisshammer R. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 82–92. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02618.x>
46. Hu J., Qin H., Gao F.P., Cross T.A. // Prot. Expr. Purif. 2011. V. 80. P. 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.001>
47. Gubellini F., Verdon G., Karpowich N.K., Luff J.D., Boel G., Gauthier N., Handelman S.K., Ades S.E., Hunt J.F. // Mol. Cell. Proteom. 2011. V. 10. P. 930. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.007930>
48. Xu L.Y., Link A.J. // Biotechnol. Lett. 2009. V. 31. P. 1775–1782. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0075-5>
49. Petrovskaya L.E., Ziganshin R.H., Kryukova E.A., Zlobinov A.V., Gapizov S.S., Shingarova L.N., Mironov V.A., Lomakina G.Y., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2021. V. 193. P. 3672–3703. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03634-5>

50. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 5748–5762.
<https://doi.org/10.1021/bi300409m>
51. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Petrovskaya L.E. // *Biophys. Rev.* 2022. V. 14. P. 771–778.
<https://doi.org/10.1007/s12551-022-00986-y>
52. Drachev L.A., Jasaitis A.A., Kaulen A.D., Kondrashin A.A., Liberman E.A., Nemecek I.B., Ostroumov S.A., Semenov A.Y., Skulachev V.P. // *Nature*. 1974. V. 249. P. 321–324.
<https://doi.org/10.1038/249321a0>
53. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1857. P. 1741–1750.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.08.004>
54. Petrovskaya L., Gapizov S. S., Shingarova L., Kryukova E., Boldyreva E., Yakimov S., Svirschevskaya E., Lukashev E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40. P. 375–382.
<https://doi.org/10.1134/S1068162014030121>
55. Siletsky S.A., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Borisov V.B., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2021. V. 1862. P. 148328.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148328>

Hybrid Proteins Containing Proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*

L. E. Petrovskaya*, **, #, E. A. Kryukova*, ***, V. A. Bolshakov****, E. P. Lukashev****, S. A. Siletsky****, M. D. Mamedov****, R. V. Sudakov****, D. A. Dolgikh*, ***, ****, and M. P. Kirpichnikov*, ****

E-mail: lpetr65@yahoo.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho–Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

*** Emanuel Institute of Biochemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**** Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/11, Moscow, 119234 Russia

***** Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1/40, Moscow, 119992 Russia

The genes of hybrid proteins including *Exiguobacterium sibiricum* proteorhodopsin (ESR) and various N-terminal soluble domains have been constructed. Effective synthesis in *Escherichia coli* cells was observed only in the case of hybrids with chaperone Caf1M and maltose-binding protein MBP expressed as precursors with their own signal sequences. The study of the isolated MBP-ESR protein in micelles and proteoliposomes demonstrated formation and decay of the main photocycle intermediates at pH > 8. The photoelectric response of the hybrid proteins Caf-ESR and MBP-ESR is comparable in amplitude to the wild-type ESR response, indicating their homogeneous orientation in the membrane. The obtained constructions can be used to create bacterial expression systems for various retinal proteins, ensuring their uniform incorporation into proteoliposomes.

Keywords: proteorhodopsin, hybrid protein, expression in *Escherichia coli*, photocycle, direct electrometric method