

## РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩАЯ АНИОННАЯ ПОМПА ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *Tolypothrix campylonemoides*

© 2023 Т.И. Рокицкая<sup>1\*</sup>, А.А. Алексеев<sup>2</sup>, Ф.М. Цыбров<sup>2</sup>, С.М. Бухалович<sup>2</sup>,  
Ю.Н. Антоненко<sup>1\*</sup>, В.И. Горделий<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: rokietskaya@belozersky.msu.ru; antonenko@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>3</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS,  
Grenoble, France; электронная почта: valentin.gordeliy@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2023

После доработки 15.09.2023

Принята к публикации 15.09.2023

В данной работе получена функциональная характеристика родопсина TsaR из цианобактерии *Tolypothrix campylonemoides*. Анализ аминокислотной последовательности TsaR выявил, что этот белок обладает мотивом TSD, который отличается лишь одной аминокислотой от мотива известной хлорной помпы галородопсина TSA. Белок TsaR был экспрессирован в *Escherichia coli*, очищен и реконструирован в протеолипосомы и нанодиски. Функциональная активность измерялась по генерации электрического тока через плоские бислоиные липидные мембраны с адсорбированными на одной поверхности мембраны протеолипосомами, а также по флуоресценции с использованием потенциал-зависимого красителя оксонола VI. Мы показали, что родопсин TsaR функционирует как мощная анионная помпа. Наши результаты показывают, что новый микробный анионный транспортер TsaR заслуживает более глубокого изучения и может быть интересен как для фундаментальных исследований мембранных белков, так и в качестве инструмента для оптогенетики.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** микробный родопсин, светочувствительная ионная помпа, оптогенетика, протеолипосомы, бислоиная липидная мембрана.

DOI: 10.31857/S0320972523100123, EDN: OTRGBH

### ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины составляют большое семейство светочувствительных  $\alpha$ -спиральных белков, несущих ковалентно-присоединенный ретиналь в качестве кофактора. Такие белки встречаются в микроскопических организмах всех доменов жизни, включая вирусы [1]. Одной из главных функций этих белков является способность осуществлять свето-индуцированный транспорт протонов, катионов или анионов. Ретиналь-содержащие белки участвуют в запасании энергии океанических микроорганизмов, причем, по грубым оценкам, вклад родопсинового фотосинтеза в общую энергетику биосферы сравним или

даже превосходит вклад хлорофильного фотосинтеза [2]. Однако известны и другие функции данного семейства белков, а именно: сенсорная функция, способность формировать светоиндуцированные ионные каналы в мембране [3] и даже регуляция ферментативной активности [4]. Структурно-функциональные исследования новых микробных родопсинов очень важны для получения новых оптогенетических инструментов [5]. Для поиска новых родопсинов часто применяют метагеномный анализ, и при выборе новых объектов исследования особое внимание обращают на необычный мотив консервативных аминокислотных остатков. Наиболее изученная светочувствительная протонная помпа, бактериородопсин *Halobacterium salinarum*, обладает мотивом DTD (D85, T89 и D96 – аминокислотные остатки, ключевые для переноса протона) [6].

Ген, кодирующий опсин TsaR, был обнаружен нами в ходе биоинформатического

Принятые сокращения: БЛМ – плоская бислоиная липидная мембрана, ПЛ – протеолипосомы, ХКФ – карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона.

\* Адресат для корреспонденции.

поиска по открытым базам метагеномных данных [7]. Он содержится в геноме цианобактерии *Tolypothrix campylonemoides* VB511288, выделенной из зеленой биопленки, которая была обнаружена на фасаде здания в городе Сант-никетан на востоке Индии. Анализ аминокислотной последовательности TsaR выявил наличие мотива TSD. Родопсины из цианобактерий с таким мотивом были охарактеризованы ранее [8–10], они обладают способностью закачивать анионы в клетки бактерий в ответ на освещение. Мотив TSD отличается лишь одной аминокислотой от мотива известной хлорной помпы галородопсина – TSA [11].

В данной работе мы представляем данные функциональных исследований родопсина TsaR электрофизиологическими [12, 13] и оптическими методами, включая эксперименты по определению его ионной селективности в липидных везикулах и нанодисках. Используемый нами электрофизиологический подход был разработан в работах Л.А. Драчева и А.Д. Каулена и далее стал широко применяться в исследованиях по изучению родопсинов в варианте, предложенном Bamberg et al. [14–16]. В основе метода лежит измерение электрических фотоответов от макроскопической плоской бислойной липидной мембраны (БЛМ), на которой были адсорбированы протеолипосомы с ретиналь-содержащим белком. Такой способ измерения получил широкое применение благодаря тому, что он обладает высокой чувствительностью и, наряду с оптическими методами, позволяет измерять быстрые переходные процессы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich», США (если не указано особо).

**Протеолипосомы с родопсином TsaR.** Последовательность нуклеотидов, кодирующая TsaR (GenBank accession no. JXC B00 000 000), была оптимизирована для экспрессии в клетках *Escherichia coli* с использованием GeneArt («ThermoFischer», США). Нуклеотидная последовательность на 5'-конце была оптимизирована с помощью RNA WebServer (Институт теоретической химии, Венский Университет) с целью уменьшения вероятности образования шпиклек РНК в области, включающей сайты связывания рибосомы. Ген был коммерчески синтезирован («Eurofins», Люксембург) и клонирован в экспрессионный вектор pET15b («Novagen», США) по сайтам рестрикции XbaI

и XhoI. Таким образом, ген был поставлен непосредственно перед последовательностью LЕNNNNN (полигистидиновая последовательность, использовавшаяся впоследствии для никель-хелатной хроматографии). Экспрессию в клетках *E. coli* штамма С41(DE3) и очистку белка TsaR проводили по протоколу, описанному ранее [17].

Для приготовления протеолипосом в стеклянную колбу добавляли 1% (w/v) раствор азолектина из соевых бобов в хлороформе («Sigma», США). От хлороформа избавлялись с помощью роторного испарителя и вакуумного насоса. Полученную тонкую липидную пленку, образовавшуюся на стенках колбы, ресуспендировали в растворе, содержащем 0,1 М NaCl («Applichem», ФРГ), 2% (w/v) холата натрия с конечной концентрацией азолектина 1% (w/v). Суспензию липидов обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин при 4 °С, после чего быстро добавляли солюбилизованный родопсин до конечной концентрации 0,7 мг/мл и детергент-абсорбирующие частицы Bio-Beads SM-2 («Bio-Rad», США). Получившуюся смесь перемешивали на орбитальной мешалке 2 ч при минимальном освещении, а затем сменяли частицы (так проводилось минимум 4 смены частиц).

**Нанодиски с TsaR.** Сборку нанодисков и встраивание TsaR осуществляли по стандартным методикам, описанным ранее в литературе [18]. Димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) («Avanti Polar Lipids», США) использовался в качестве липида. Мы использовали удлиненный вариант белка apolipoprotein-1 под названием MSP1E3D1. Молярное соотношение DMPC/MSP1E3D1/TsaR = 100/2/3. Сухую липидную пленку, полученную путём растворения порошка DMPC в хлороформе с последующим упариванием на роторном испарителе («Heidolph», ФРГ), регидратировали раствором детергента 100 мМ CHAPS так, чтобы соотношение липид/детергент составило 1 : 2. Далее, к раствору солюбилизованного в мицеллах целевого белка TsaR добавляли формирующий нанодиск белок MSP1E3D1. Полученную смесь инкубировали в течение часа при комнатной температуре, после чего добавляли сорбент BioBeads™ («Bio-Rad») для удаления детергентов в расчёте 1 г сорбента на 40 мг детергента. Удаление детергента проводили в течение 3 ч.

**Плоская бислойная липидная мембрана** формировалась из раствора в декане, который содержал 2% дифитаноилфосфатидилхолина и 0,04% (w/v) димиристоилэтилфосфатидилхолина («Avanti Polar Lipids»), на отверстиях

в перегородке, разделяющей на два отсека тefлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [19]. Диаметр отверстия составлял 0,8 мм. Состав буферного раствора варьировался и указан в подписях к рисункам. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (23–25 °С).

Электрический ток регистрировался в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавалась на хлорсеребряные электроды, помещенные через агаровые мосты в тefлоновую ячейку с двух сторон мембраны. Ток измерялся с помощью пэтч-клэмп усилителя ОЕС-2 («ОПУС», Россия), оцифровывался с помощью NI-DAQmx («National Instruments», США) и анализировался с использованием компьютерной программы WinWSP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (Университет Стратклайда, Великобритания).

Для освещения БЛМ использовали галогенную лампу Novaflex («World Precision Instruments», США), плотность мощности которой составляет 0,77 Вт/см<sup>2</sup>. Лампа освещала ячейку с передней (*cis*) стороны, протеолипосомы добавляли к БЛМ с *cis*-стороны.

Протеолипосомы (ПЛ) со встроенным ретиналь-содержащим белком TsaR добавлялись с *cis*-стороны ячейки, более близкой к осветителю. Высокоомный электрод находился в противоположном отсеке ячейки с *trans*-стороны. После добавления к БЛМ 25–50 мкл TsaR-протеолипосом и инкубации в течение 60 мин в буферном растворе, содержащем 10 мМ Mes и 10 мМ Tris (рН ≈ 7), липидную мембрану освещали светом видимого диапазона. БЛМ формировали из смеси липидов дифитаноил-фосфатидилхолина и катионного липида димиристоилэтилфосфохолина, которая хорошо зарекомендовала себя как благоприятствующая адсорбции отрицательно-заряженных липосом.

Для выявления достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

**Измерение генерации потенциала в суспензии протеолипосом**, содержащих TsaR, проводили с помощью измерения флуоресценции потенциал-зависимого красителя оксонола VI (конечная концентрация 2 мкМ) в водном буфере, содержащем 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 1 М NaCl (рН 7,2), как это описано ранее [19]. Измерения проводились на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия) при возбуждении на 590 нм и испускании на 620 нм (щели были 5 нм) при температуре 15 °С. После установления заданной температуры в кювету добавляли 10–20 мкл протео-

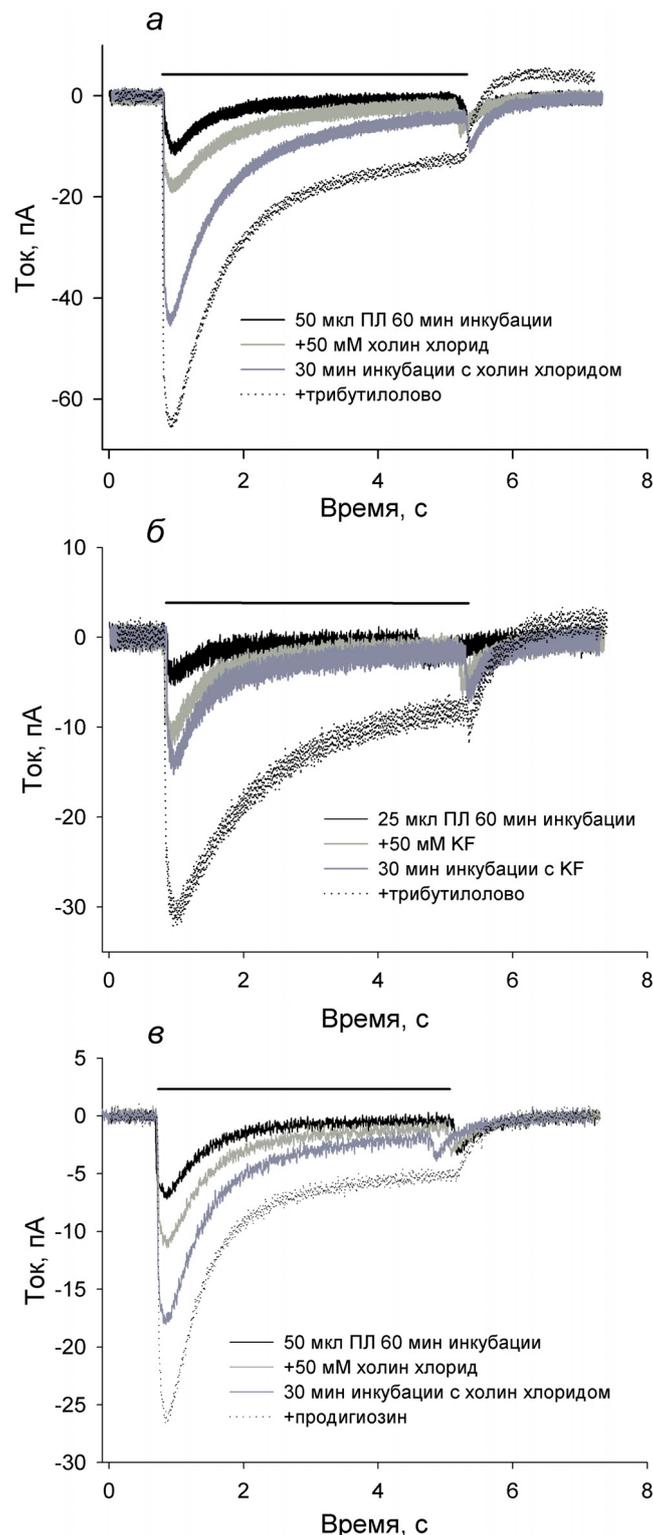
липосом, которые далее освещали зеленым лазерным модулем, имеющим мощность 1 мВт. Для измерения генерации градиента рН на липосомах использовалась флуоресценция рН-зависимого красителя 9-аминоакридина (возбуждение – 425 нм, регистрация – 455 нм).

**Измерение спектров поглощения TsaR** проводили с помощью спектрофотометра Sperscord 50 («Analytik», Германия).

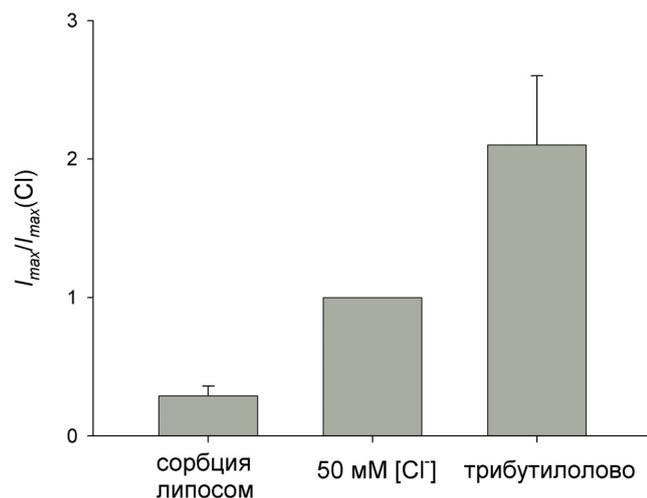
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Помповая активность ретиналь-содержащих белков, по литературным данным, регистрируется обычно простым способом по изменению рН в суспензии липосом рН-электродом, однако такой способ обладает низкой чувствительностью и требует больших количеств белка. Существенно большей чувствительностью обладает более сложный метод, в котором протеолипосомы налипают на поверхность плоской бислоидной липидной мембраны, но не сливаются с ней и остаются интактными на поверхности БЛМ. Было показано, что в такой системе освещение приводит к генерации переходных электрических потенциалов [12, 13] и переходных токов через БЛМ [14–16], которые можно регистрировать обычными макроскопическими электродами. Добавление протонофоров в такой системе обычно приводит к появлению стационарных фототоков через БЛМ, поскольку увеличивается электрическая доступность внутренней водной фазы протеолипосом [16, 20].

После начала освещения регистрировалось небольшое быстрое изменение тока БЛМ к отрицательным значениям (черная кривая на рис. 1, *a* и *b*), после которого значение тока в секундной шкале возвращалось к первоначальным величинам. Дальнейшее добавление солей холин хлорида (рис. 1, *a*) или фторида калия (KF) (рис. 1, *b*) приводило к моментальному увеличению переходного тока на включение света (светло-серые кривые), а также к продолжающемуся со временем росту (темно-серые кривые, запись через 30 мин). Знак наблюдаемого переходного тока для ПЛ с TsaR соответствует таковому для ПЛ с бактериородопсином и указывает на несколько возможных путей функционирования белка: помпирование протонов или одновалентных катионов внутрь липосом, помпирование одновалентных анионов наружу липосом или другие варианты. Последующее добавление с двух сторон мембраны трибутилолова, который является переносчиком моновалентных



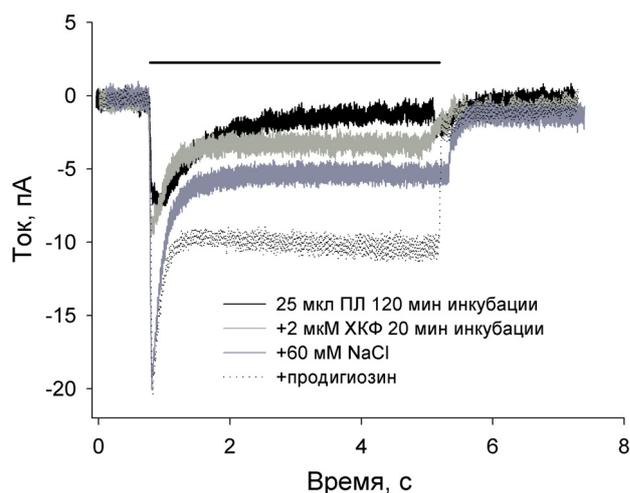
**Рис. 1.** Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами с TsaR при потенциале на БЛМ 0 мВ. Период освещения мембраны белым светом показан сплошной черной линией. *а* – Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (50 мкл) в течение 60 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока сразу после добавления 50 мМ холин хлорида. Темно-серая кривая – после 30 мин инкубации с холин хлоридом. Пунктирная кривая – после добавления 1 мкг/мл трибутилолова. *б* – Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (25 мкл) в течение 60 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока сразу после добавления 50 мМ КФ. Темно-серая кривая – после 30 мин инкубации с КФ. Пунктирная кривая – после добавления 1 мкг/мл трибутилолова. *в* – Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (25 мкл) в течение 60 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока сразу после добавления 50 мМ холин хлорида. Темно-серая кривая – после 30 мин инкубации с холин хлоридом. Пунктирная кривая – после добавления 150 нМ продигозина. Буферный раствор содержал 10 мМ Mes и 10 мМ Tris (pH 7,0)



**Рис. 2.** Суммированные результаты четырех экспериментов с TsaR-протеолипосомами по влиянию добавления 50 мМ ионов хлора и последующего добавления 1 мкг/мл трибутилолова на амплитуду начального фототока БЛМ. За единицу принят начальный фототок в условиях 50 мМ солей хлорид-аниона

анионов [21, 22], приводило к значительному увеличению не только начального, но и стационарного тока в ответ на освещение (пунктирные кривые). При добавлении вместо трибутилолова в аналогичном эксперименте другого известного переносчика анионов, продигиозина [23], также происходило увеличение начального переходного и стационарного фототоков БЛМ (рис. 1, в). На рис. 2 представлены результаты экспериментов с адсорбированными ПЛ по влиянию добавления 50 мМ ионов хлора и последующего добавления 1 мкг/мл трибутилолова на амплитуду начального фототока БЛМ (4 эксперимента). За единицу принят начальный фототок в условиях 50 мМ солей хлорид-аниона. Видно, что соли хлорида вызывают увеличение начального тока ( $p < 0,0003$ ), последующее добавление анионных переносчиков приводит к росту тока ( $p < 0,006$ ).

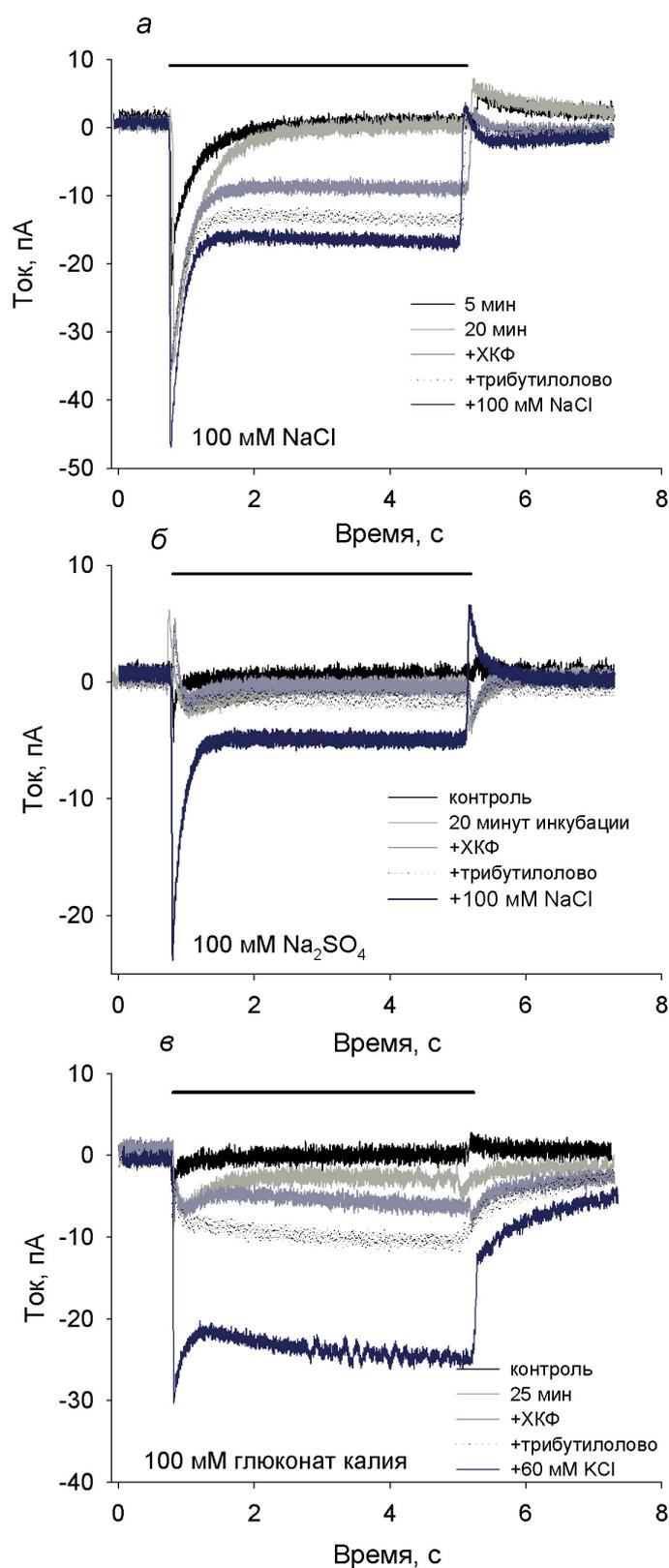
При проведении эксперимента в среде с сульфат-анионом в качестве основного аниона в электролите (состав среды: 10 мМ Mes, 10 мМ Tris и 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7,0)) длительная инкубация липосом с БЛМ также приводила к их адсорбции на поверхности плоской липидной мембраны, что проявлялось в появлении переходного тока при освещении (рис. 3, черная кривая). Однако в этом случае величина амплитуды переходного тока была меньше по сравнению с той, что наблюдалась в присутствии хлорид-аниона. Протонофор карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон (ХКФ) увеличивал стационарный ток при освещении (светло-серая кривая), а последую-



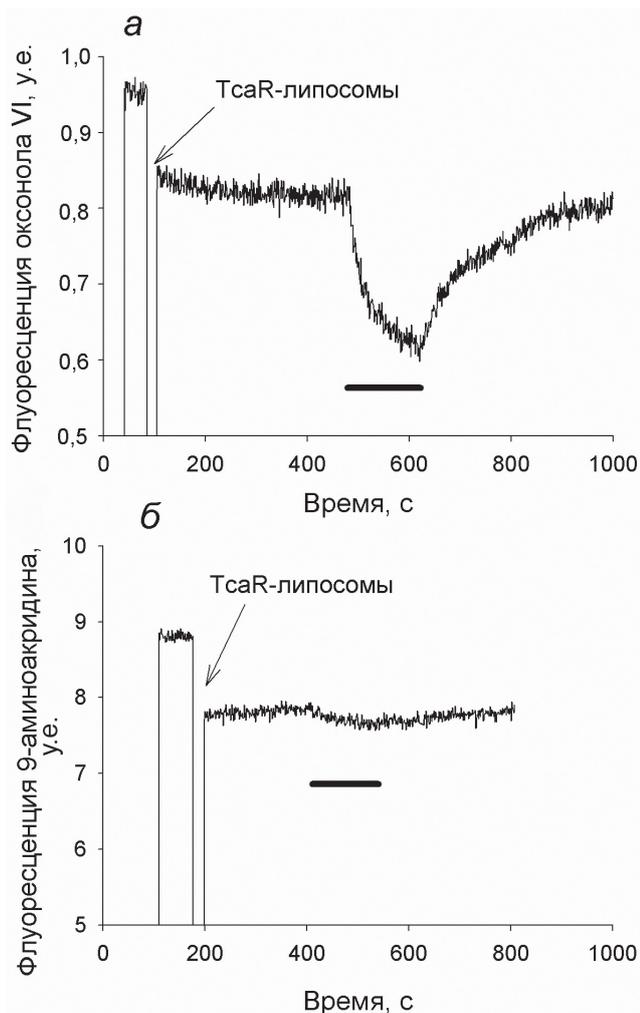
**Рис. 3.** Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами с TsaR в среде с 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Период освещения мембраны белым светом показан сплошной черной линией. Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (25 мкл) в течение 120 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока после добавления 2 мкМ ХКФ. Темно-серая кривая – после добавления 60 мМ NaCl. Пунктирная кривая – после добавления 150 нМ продигиозина. Буферный раствор содержал 10 мМ Mes, 10 мМ Tris и 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7,0)

щее добавление 60 мМ хлорида натрия (темно-серая кривая) приводило к значительному увеличению начального тока в ответ на включение освещения. Продигиозин, добавленный в конце эксперимента, значительно увеличил стационарный фототок БЛМ (рис. 3, пунктирная кривая).

Во всех экспериментах с адсорбцией протеолипосом на БЛМ добавление хлорида калия, хлорида натрия, хлорида холина или фторида калия, а также переносчиков моновалентных анионов (трибутилолова и продигиозина) приводило к большому росту переходного фототока. Однако небольшие переходные фототоки наблюдались после налипания липосом на плоскую липидную мембрану и при отсутствии моновалентных анионов. Возможно, это связано с наличием ионов хлора в липосомах или его вытеканием из агарных мостов к электродам. Мы приготовили мембранные нанодиски со встроенным белком TsaR и измерили фототоки в их присутствии на БЛМ в разных средах. Нанодиски не имеют внутреннего водного объема, поэтому эквивалентная электрическая схема в этом случае может отличаться от опытов с липосомами. На рис. 4 представлены результаты по измерению фототоков БЛМ в буфере со 100 мМ NaCl (панель а), 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (панель б) и 100 мМ глюконата калия (панель в) при добавлении 10 мкл нанодисков с *cis*-стороны БЛМ. Нанодиски быстро адсорбировались на БЛМ, и уже через 20 мин



**Рис. 4.** Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными нанодисками с TsaR при потенциале на БЛМ 0 мВ. Период освещения мембраны белым светом показан сплошной черной линией. *а* – Записи тока БЛМ при инкубации с нанодисками (10 мкл) в течение 5 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – после 20 мин инкубации с нанодисками. Средне-серая кривая – после добавления 2 мкМ ХКФ. Пунктирная кривая – после добавления 1 мкг/мл трибутилолова. Темно-серая кривая – после добавления NaCl (до концентрации 200 мМ). Буферный раствор содержал 10 мМ Mes, 10 мМ Tris и 100 мМ NaCl (pH 7,0). *б* – Аналогичные записи тока в буферном растворе 10 мМ Mes, 10 мМ Tris, 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7,0). *в* – Аналогичные записи тока в буферном растворе 10 мМ Mes, 10 мМ Tris, 100 мМ глюконат калия (pH 7,0)



**Рис. 5.** Измерение ион-транспортирующих свойств TsaR в суспензии протеолипосом по изменению флуоресценции 2 мкМ оксонола VI (а) и 4 мкМ 9-аминоакридина (б). 10 мкл протеолипосом были суспендированы в 1 мл среды, содержащей 1 М NaCl и 100 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2). Период освещения мембраны светом зеленого светодиода показан сплошной черной линией

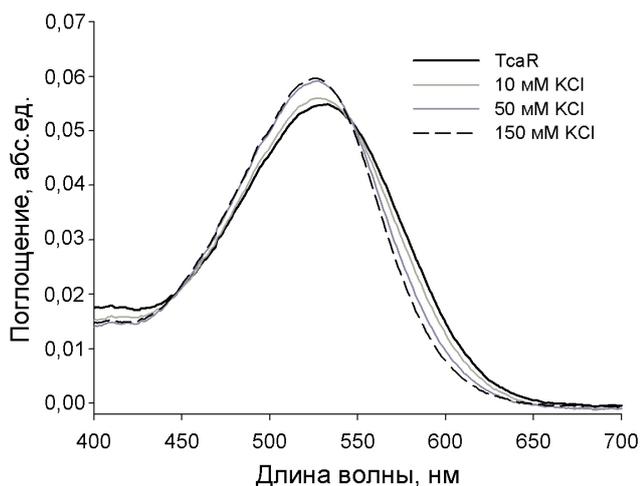
наблюдались токи через БЛМ в ответ на включение света. Хорошо видно, что значительные переходные токи были только в случае среды с хлоридом натрия (рис. 4, а; светло-серая кривая). В присутствии сульфата натрия или глюконата калия фототоки были значительно меньше (светло-серые кривые на рис. 4, б и в). Более того, в случае 100 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (рис. 4, б) первоначальный быстрый ответ имел даже противоположный знак. Добавление хлорида натрия в конце каждой пробы приводило либо к появлению большого мгновенного изменения тока в ответ на включение света (рис. 4, б и в; темно-серые кривые), либо к дальнейшему увеличению начального тока (рис. 4, а). Этот результат дает основание утверждать, что ионы натрия, калия, сульфата и глюконата не переносятся помпой. В присутствии протонофора

ХКФ и анионного переносчика трибутилолова стационарный фототок БЛМ значительно возрастал (средне-серые и пунктирные кривые на рис. 5). В целом эти опыты говорят о способности ретиналь-содержащего белка TsaR транспортировать анионы хлора через мембрану в ответ на освещение.

Данные, представленные на рис. 1, б, говорят о способности этого белка транспортировать анионы фтора. Также мы не исключаем переноса гидроксил-аниона. Ранее было показано, что мембранные фрагменты с галородопсином, имеющим близкую последовательность важных аминокислот в белке TSA, приводят к генерации фототока в присутствии  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{I}^-$ , но не в присутствии  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$  и  $\text{NO}_3^-$  [24]. Однако в зависимости от условий освещения галородопсин может выступать как светочувствительная хлорная помпа или протонная помпа [25]. Согласно нашим результатам, перенос анионов под действием света белком TsaR осуществляется изнутри липосом наружу (эквивалентно переносу в цитоплазму в клетках). Таким образом, направление активного транспорта анионов белком TsaR и галородопсином совпадает.

Ранее было показано, что для измерения активности родопсиновых белков в суспензии протеолипосом можно использовать флуоресцентные методы в присутствии потенциалчувствительного красителя оксонола VI или  $\Delta\text{pH}$ -чувствительного красителя 9-аминоакридина (9-АА) [19, 26]. На рис 5, а показан типичный ответ оксонола VI, добавленного к суспензии протеолипосом с TsaR. При освещении зеленым светом наблюдается значительное уменьшение сигнала флуоресценции, что свидетельствует о генерации мембранного потенциала на липосомах. Оксонол VI – это анионный краситель и падение его флуоресценции свидетельствует о генерации потенциала со знаком плюс внутри липосом, что соответствует той же полярности, что и в аналогичных экспериментах с бактериородопсином [26]. Следует сказать, что данный метод по своей чувствительности существенно уступает методу измерения фототока на БЛМ [19], и образование больших ответов в суспензии протеолипосом с TsaR (рис. 5, а) свидетельствует о большой эффективности помпы TsaR. Аналогичные опыты с использованием красителя 9-АА показали, что генерация градиента pH в такой системе практически не происходит (рис. 5, б).

На рис. 6 приведена серия спектров поглощения TsaR при отсутствии анионов хлора (черная кривая) и в присутствии нарастающих



**Рис. 6.** Спектры поглощения TsaR в нанодисках при различных концентрациях хлорида калия. Среда измерения содержала 10 мМ Mes и 10 мМ Tris (pH 6,5). Концентрация хлорида калия составляла 0 мМ (черная линия), 10 мМ (светло-серая линия), 50 мМ (темно-серая линия) и 150 мМ (пунктирная линия)

концентраций хлорид-аниона (серые и штриховые линии). Положение максимума спектра поглощения белка TsaR в нанодисках составляет 531 нм, и при добавлении 50–150 мМ ионов хлора происходит сдвиг максимума спектра поглощения в коротковолновую область на 5 нм. Кроме того, происходит повышение оптической плотности в максимуме поглощения. Эти данные хорошо соответствуют влиянию анионов хлора на спектры поглощения галородопсинов, исследованных ранее [8, 9, 27], и подтверждают представление о том, что TsaR является хлорной помпой.

Анализ аминокислотной последовательности TsaR и полученные нами результаты позволяют предположить, что TsaR имеет функциональную схожесть с галородопсином. Галородопсин принимает участие в поддержании солевого баланса бактерий, и можно пред-

положить, что физиологическая роль TsaR в цианобактериях сходна. Поскольку галородопсин используется в оптогенетике, можно предположить, что TsaR также может найти свою нишу в палитре используемых оптогенетических инструментов. Представляется, что белок TsaR заслуживает более глубокого и всестороннего исследования, включая изучение особенностей его фотоцикла, а также его структуры.

**Вклад авторов.** В.И. Горделий – концепция работы; А.А. Алексеев, Т.И. Рокицкая, Ю.Н. Антоненко, С.М. Бухалович, Ф.М. Цыборов – проведение экспериментов; Ю.Н. Антоненко, В.И. Горделий, Т.И. Рокицкая – написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00038, электрофизиологические измерения), а также при поддержке Министерства образования и науки РФ (задача «Исследование механизмов преобразования энергии в мембранных системах, связанных с циклическим переносом ионов водорода и натрия ферментами электрон-транспортных цепей, механизмов продукции активных форм кислорода и их роли в физиологии клетки», проект АААА-А19-119031390114-5, спектрофотометрические измерения). Работы по экспрессии и очистке белка были выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00018).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gushchin, I., and Gordeliy, V. (2018) Microbial rhodopsins, *Subcell Biochem.*, **87**, 19–56, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_2.
- Gomez-Consarnau, L., Raven, J. A., Levine, N. M., Cutter, L. S., Wang, D., Seegers, B., Aristegui, J., Fuhrman, J. A., Gasol, J. M., and Sanudo-Wilhelmy, S. A. (2019) Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea, *Sci. Adv.*, **8**, eaaw8855, doi: 10.1126/sciadv.aaw8855.
- Spudich, J. L., Sineshchekov, O. A., and Govorunova, E. G. (2014) Mechanism divergence in microbial rhodopsins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 546–552, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.06.006.
- Mukherjee, S., Hegemann, P., and Broser, M. (2019) Enzymerhodopsins: novel photoregulated catalysts for optogenetics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **57**, 118–126, doi: 10.1016/j.sbi.2019.02.003.
- Кирпичников М. П., Островский М. А. (2019) Оптогенетика и зрение, *Вестник Российской Академии Наук*, **89**, 125–130, doi: 10.31857/S0869-5873892125-130.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P., and Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacterio-

- rhodopsin at 1.55 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899–911, doi: 10.1006/jmbi.1999.3027.
7. Das, S., Singh, D., Madduluri, M., Chandrababunaidu, M. M., Gupta, A., Adhikary, S. P., and Tripathy, S. (2015) Draft genome sequence of bioactive-compound-producing cyanobacterium *Tolypothrix cam-pylonemoides* strain VB511288, *Genome Announc.*, **3**, e00226–15, doi: 10.1128/genomeA.00226–15.
  8. Hasemi, T., Kikukawa, T., Watanabe, Y., Aizawa, T., Miyauchi, S., Kamo, N., and Demura, M. (2019) Photochemical study of a cyanobacterial chloride-ion pumping rhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 136–146, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.12.001.
  9. Yun, J. H., Park, J. H., Jin, Z., Ohki, M., Wang, Y., Lupala, C. S., Liu, H., Park, S. Y., and Lee, W. (2020) Structure-based functional modification study of a cyanobacterial chloride pump for transporting multiple anions, *J. Mol. Biol.*, **432**, 5273–5286, doi: 10.3390/ma13143061.
  10. Astashkin, R., Kovalev, K., Bukhdruker, S., Vaganova, S., Kuzmin, A., Alekseev, A., Balandin, T., Zabelskii, D., Gushchin, I., Royant, A., Volkov, D., Bourenkov, G., Koonin, E., Engelhard, M., Bamberg, E., and Gordeliy, V. (2022) Structural insights into light-driven anion pumping in cyanobacteria, *Nat. Commun.*, **13**, 6460, doi: 10.1038/s41467-022-34019-9.
  11. Oesterhelt, D., Tittor, J., and Bamberg, E. (1992) A unifying concept for ion translocation by retinal proteins, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 181–191, doi: 10.1007/BF00762676.
  12. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H<sup>+</sup>-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324, doi: 10.1038/249321a0.
  13. Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., Plakunova, V. G., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059–7065.
  14. Bamberg, E., Apell, H. J., Dencher, N. A., Sperling, W., Stieve, H., and Lauger, P. (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes, *Biophys. Struct. Mech.*, **5**, 277–292, doi: 10.1007/BF02426663.
  15. Bamberg, E., Butt, H. J., Eisenrauch, A., and Fendler, K. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q. Rev. Biophys.*, **26**, 1–25, doi: 10.1017/s0033583500003942.
  16. Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M., and Bamberg, E. (2002) Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality, *J. Mol. Biol.*, **321**, 821–838, doi: 10.1016/s0022-2836(02)00696-4.
  17. Shevchenko, V., Mager, T., Kovalev, K., Polovinkin, V., Alekseev, A., Juettner, J., Chizhov, I., Bamann, C., Vavourakis, C., Ghai, R., Gushchin, I., Borshchevskiy, V., Rogachev, A., Melnikov, I., Popov, A., Balandin, T., Rodriguez-Valera, F., Manstein, D. J., Bueldt, G., Bamberg, E., and Gordeliy, V. (2017) Inward H<sup>+</sup> pump xenorhodopsin: mechanism and alternative optogenetic approach, *Sci. Adv.*, **3**, e1603187, doi: 10.1126/sciadv.1603187.
  18. Schuler, M. A., Denisov, I. G., and Sligar, S. G. (2013) Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, **974**, 415–433, doi: 10.1007/978-1-62703-275-9\_18.
  19. 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 DpH measurements using planar lipid bilayer, colloidion film, and fluorescent probe approaches, *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 259–275, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9\_12.
  20. Rokitskaya, T. I., Maliar, N., Kovalev, K. V., Volkov, O., Gordeliy, V. I., and Antonenko, Y. N. (2021) Rhodopsin channel activity can be evaluated by measuring the photocurrent voltage dependence in planar bilayer lipid membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 409–419, doi: 10.1134/S0006297921040039.
  21. Selwyn, M. J., Dawson, A. P., Stockdale, M., and Gains, N. (1970) Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 120–126, doi: 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00268.x.
  22. Antonenko, Y. N. (1990) Electrically silent anion transport through bilayer lipid membrane induced by tributyltin and triethyllead, *J. Membr. Biol.*, **113**, 109–113, doi: 10.1007/BF01872884.
  23. Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H. H., and Ohkuma, S. (1998) Prodigiosins as a new group of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporters that uncouple proton translocators, *J. Biol. Chem.*, **273**, 21455–21462, doi: 10.1074/jbc.273.34.21455.
  24. Bamberg, E., Hegemann, P., and Oesterhelt, D. (1984) Reconstitution of the light-driven electrogenic ion-pump halorhodopsin in black lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 53–60, doi: 10.1016/0005-2736(84)90549-2.
  25. Bamberg, E., Tittor, J., and Oesterhelt, D. (1993) Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 639–643, doi: 10.1073/pnas.90.2.639.
  26. Antonenko, Y. N., Denisov, S. S., Silachev, D. N., Khailova, L. S., Jankauskas, S. S., Rokitskaya, T. I., Danilina, T. I., Kotova, E. A., Korshunova, G. A.,

- Plotnikov, E. Y., and Zorov, D. B. (2016) A long-linker conjugate of fluorescein and triphenylphosphonium as mitochondria-targeted uncoupler and fluorescent neuro- and nephroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 2463-2473, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.014.
27. Steiner, M., Oesterhelt, D., Arika, M., and Lanyi, J. K. (1984) Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. I. Effects on the chromophore, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2179-2184, doi: 10.1016/S0021-9258(17)43334-5.

## RETINAL-BASED ANION PUMP FROM THE CYANOBACTERIUM *Tolypothrix campylonemoides*

T. I. Rokitskaya<sup>1\*</sup>, A. A. Alekseev<sup>2</sup>, F. M. Tsybrov<sup>2</sup>, S. M. Bukhalovich<sup>2</sup>,  
Y. N. Antonenko<sup>1\*</sup>, and V. I. Gordeliy<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: rokitskaya@belozersky.msu.ru; antonen@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

<sup>3</sup> *Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Grenoble, France; e-mail: valentin.gordeliy@gmail.com*

In this work, a functional characterization of TcaR rhodopsin from the cyanobacterium *Tolypothrix campylonemoides* was obtained. Analysis of the amino acid sequence of TcaR revealed that this protein possesses a TSD motif that differs by only one amino acid from the motif of the known halorhodopsin chloride pump TSA. The TcaR protein was expressed in *E. coli*, purified and incorporated into proteoliposomes and nanodiscs. Functional activity was measured by electric current generation through the planar bilayer lipid membranes (BLMs) with proteoliposomes adsorbed on one membrane surface, as well as by fluorescence using voltage-dependent dye oxonol VI. We have shown that TcaR rhodopsin functions as a powerful anion pump. Our results show that the novel microbial anion transporter TcaR deserves deeper study and may be of interest both for fundamental studies of membrane proteins and as a tool for optogenetics.

*Keywords:* microbial rhodopsin, photosensitive ion pump, optogenetics, proteoliposomes, bilayer lipid membrane