

**Исследование Na<sup>+</sup>-зависимого родопсина из флавобактерии *Dokdonia* sp. PRO95**

**Мамедов Адалят Махир оглы**

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: adalyat95@gmail.com*

Преобразование энергии солнечного света играет ключевую роль в земной биосфере. На настоящий момент у живых организмов известны два принципиально разных способа запасания энергии квантов света - это различные типы хлорофилл-содержащих реакционных центров (фотосистем) и разные ретиналь-содержащие белки (бактериородопсин, галородопсин). Недавно был обнаружен новый тип родопсина из флавобактерий, способный транслоцировать Na<sup>+</sup> (NaR) (1-4). Анализ аминокислотных последовательностей NaR из разных организмов показал, что они формируют отдельную филогенетическую группу среди ретиналь-содержащих белков (5).

В настоящей работе нами был исследован фотоцикл NaR из флавобактерий *Dokdonia* sp. PRO95 и идентифицированы электрогенные и Na<sup>+</sup>-зависимые стадии этого цикла. Механизм генерации трансмембранной разности электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) изучался с помощью прямого электрометрического метода на протеолипосомах, содержащих ассиметрично локализованный NaR при однократном срабатывании фермента с разрешением 200 нс. Было показано, что фотоцикл NaR включает в себя по крайней мере четыре стадии: NaR<sub>519</sub> + hv  $\rightarrow$  K<sub>585</sub>  $\rightarrow$  (L<sub>450</sub>  $\rightarrow$  M<sub>495</sub>)  $\rightarrow$  O<sub>585</sub>  $\rightarrow$  NaR<sub>519</sub>. При этом только третья стадия зависела от концентрации натрия, что указывает на то, что именно она сопряжена со связыванием Na<sup>+</sup> в белке. Для стадий 2, 3 и 4, значения констант скорости оказались равны  $4 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$ ,  $4.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , и  $150 \text{ c}^{-1}$ , соответственно. Вклад этих стадий в генерацию суммарного  $\Delta\psi$  ( $\sim 200 \text{ мВ}$ ) в ответ на единичную вспышку света составил 15%, 15% и 70%, соответственно. На основе этих результатов был предложен механизм функционирования NaR.

В дальнейшем нам представлялось интересным получить мутант из вышеупомянутого дикого типа NaR, который был бы способен переносить протоны, подобно бактериородопсину. Для этого с помощью сайт-направленного мутагенеза был получен Q123D мутант (замена в 123-й позиции остатка глутамина на остаток аспарагиновой кислоты). Функциональная активность полученного фермента была изучена путем измерения  $\Delta\text{pH}$  в отсутствие и присутствии роданида и разобщителя.

Также был исследован механизм образования фотоэлектрического ответа выделенного и встроенного в протеолипосомы Q123D мутанта NaR, для выявления электрогенных событий, обусловленных транспортом протона в ответ на лазерную вспышку света.

Полученные в работе данные могут расширить знания в области мембранной биоэнергетики в условиях, когда протонный цикл не является эффективным (высокое значение pH или высокая мембранная проводимость H<sup>+</sup>).

### **Источники и литература**

- 1) Luoto, H. H., Nordbo, E., Baykov, A. A., Lahti, R. & Malinen, A. M. Membrane Na<sup>+</sup>-pyrophosphatases can transport protons at low sodium concentrations. *J. Biol. Chem.* 288, 35489–35499 (2013).

- 2) Yoshizawa, S. et al. Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 6732–6737 (2014).
- 3) Balashov, S. P. et al. Light-driven Na<sup>+</sup> pump from *Gillisia limnaea*: a high-affinity Na<sup>+</sup> binding site is formed transiently in the photocycle. *Biochemistry* 53, 7549–7561 (2014).
- 4) Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V. & Skulachev, V. P. Proteorhodopsin from *Dokdonia* sp. PRO95 is a light-driven Na<sup>+</sup>-pump. *Biochemistry (Moscow)*, 80, 449–454 (2015).
- 5) Kwon, S. K. et al. Genomic makeup of the marine flavobacterium *Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis* and identification of a novel class of rhodopsins. *Genome Biol. Evol.* 5, 187–199 (2013).