

УДК 577.354.25

## ПРОТЕОРОДОПСИН ИЗ *Dokdonia* sp. PRO95 – СВЕТОЗАВИСИМАЯ Na<sup>+</sup>-ПОМПА\*

© 2015 Ю.В. Берцова, А.В. Богачев, В.П. Скулачев\*\*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва;  
факс: +7(495)939-0338, электронная почта: skulach@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.11.14

Ген, кодирующий протеородопсин из *Dokdonia* sp. PRO95 (AEX55013), клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Освещение протеородопсин-продуцирующих клеток *E. coli* в Na<sup>+</sup>-содержащих средах вызывало защелачивание среды измерения, которое ускорялось в присутствии протонофора СССР и ингибировалось проникающим анионом SCN<sup>-</sup>. Освещение клеток в безнатриевой среде (при замене Na<sup>+</sup> на K<sup>+</sup>) сопровождалось SCN<sup>-</sup>-стимулируемым и СССР-чувствительным закислением среды. Освещение протеородопсин-содержащих клеток *E. coli* приводило к СССР-устойчивому трансмембранному транспорту ионов натрия из этих клеток. Таким образом, установлено, что протеородопсин из морской флавобактерии *Dokdonia* sp. PRO95 является первичной светозависимой натриевой помпой. Высокий уровень гетерологической продукции этого белка в клетках *E. coli*, а также стабильность и чистота выделяемых препаратов делают данный протеородопсин удобной моделью для изучения механизма активной трансмембранной транслокации ионов натрия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** Na<sup>+</sup>-транслоцирующий протеородопсин, трансмембранный транспорт натрия, флавобактерии.

Большинство бактерий используют  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  в качестве энергетической валюты при преобразовании энергии. Каталитическая активность различных комплексов дыхательных и фотосинтетических цепей, а также некоторых других энергопреобразующих мембранных ферментов сопряжена с трансмембранной транслокацией ионов H<sup>+</sup>. Образованный таким образом  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  далее используется для совершения различных видов работ.

Оказалось, что активность некоторых бактериальных белков сопряжена с трансмембранным переносом Na<sup>+</sup>, а не протона. Впервые это было показано в 1980 г. П. Димротом, который описал Na<sup>+</sup>-транслоцирующую декарбоксилазу оксалоацетата из энтеробактерии *Klebsiella aerogenes* [1]. Впоследствии было установлено, что

все мембранные бактериальные декарбоксилазы, декарбоксилирующие различные карбоновые кислоты, используют только Na<sup>+</sup> в качестве сопрягающего иона [2]. В дальнейшем были открыты и другие первичные натриевые помпы прокариот – Na<sup>+</sup>-транслоцирующая NADH:хинон-оксидоредуктаза [3, 4] и гомологичная ей Na<sup>+</sup>-транслоцирующая NADH:ферредоксин-оксидоредуктаза [5, 6], Na<sup>+</sup>-транспортирующие метилтрансферазный комплекс [7] и формилметанофуран-дегидрогеназа [8], Na<sup>+</sup>-транслоцирующие АТРАЗы (АТРсинтазы) [9, 10] и Na<sup>+</sup>-транспортирующие пирофосфатазы [11]. Образованный с помощью этих ферментов  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  может быть далее использован для совершения основных видов работ – химической [10], осмотической [12] и механической [13], формируя, таким образом, натриевый цикл преобразования энергии [14].

При анализе геномов прокариот было обнаружено, что описанные выше Na<sup>+</sup>-транспортирующие ферменты широко распространены среди бактерий и архей [15], особенно часто они встречаются у морских, патогенных и метаногенных микроорганизмов. Остается открытым вопрос, в чем состоит причина замены сопрягающего иона с H<sup>+</sup> на Na<sup>+</sup> у этих организмов? Высказывалось предположение о преимуществах натриевого цикла при росте бактерий при щелочных значениях рН, а также в других усло-

Принятые сокращения: ДСН-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; СССР – *m*-хлоркарбонилцианид фенилгидразон; DDM – *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтозид; R-*E. coli* – индуцированные в присутствии ретинала клетки *E. coli* BL21/pRhod\_10.1;  $\Delta\text{pH}$  – трансмембранная разница значений рН;  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  – трансмембранная разница электрохимических потенциалов ионов Na<sup>+</sup>;  $\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}^+}$  – трансмембранная разница электрохимических потенциалов ионов Na<sup>+</sup>;  $\Delta\psi$  – трансмембранная разница электрического потенциала.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-316, 15.02.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

виях, сопровождающихся пониженным уровнем  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  [14]. Другим объяснением широкого распространения  $\text{Na}^+$ -транслоцирующих ферментов может быть представление о первичности использования натриевого цикла в ходе возникновения и эволюции мембранных энергопреобразующих белков живых организмов [15].

Совсем недавно семейство первичных натриевых помп пополнилось еще одним представителем. Ранее считалось, что различные бактериородопсины могут функционировать в качестве светозависимых переносчиков ионов  $\text{H}^+$  или  $\text{Cl}^-$ , а также служить рецепторами света [16]. Однако недавно было установлено, что один из протеородопсинов морской флавобактерии *Krokinobacter eikastus* способен к светозависимому переносу ионов  $\text{Na}^+$  из цитоплазмы во внешнюю среду [17]. В отсутствие ионов натрия этот белок переносит протоны в том же направлении, хотя и со значительно более низкой скоростью протекания фотоцикла [17]. По способности к переносу как иона натрия, так и протона, этот белок сходен с некоторыми  $\text{Na}^+$ -транслоцирующими АТРазами и пиродифосфатазами [18]. Впоследствии  $\text{Na}^+$ -протеородопсин был описан и у другой морской флавобактерии — у *Nonlabens marinus* [19]. Анализ аминокислотных последовательностей  $\text{Na}^+$ -протеородопсинов показывает, что они формируют обособленную филогенетическую группу среди всех известных ретиналь-связывающих белков [20].

Исследование  $\text{Na}^+$ -транслоцирующих ферментов имеет ряд преимуществ по сравнению с протонными помпами. Прежде всего, при изучении  $\text{Na}^+$ -помп можно свободно манипулировать концентрацией сопрягающего иона без существенного влияния на стабильность белка, что невозможно в случае  $\text{H}^+$ -транслоцирующих ферментов. В частности, можно исследовать каталитический цикл натрий-зависимого фермента при лимитировании его скорости низкими концентрациями  $\text{Na}^+$  и выявить в нем стадии, специфически ускоряющиеся этими ионами. Поэтому исследование  $\text{Na}^+$ -помпирующих протеородопсинов важно не только для детализации натриевого цикла, но также способно привести и к существенному прогрессу в понимании механизма функционирования ретиналь-содержащих энергопреобразующих ферментов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Бактериальные штаммы и условия выращивания.** Культура *Dokdonia* sp. PRO95 была получена из коллекции микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница (DSMZ). Клетки

выращивали при 25° в среде ММ как описано в [21]. Клетки *Escherichia coli* растили при 37° в средах LB или TB. При необходимости в эти среды вносили ампициллин до конечной концентрации 125 мкг/мл.

**Конструирование экспрессионного вектора, несущего ген, кодирующий протеородопсин AEX55013 из *Dokdonia* sp. PRO95 с C-терминальной гексагистидиновой последовательностью.** Нуклеотидная последовательность, кодирующая протеородопсин AEX55013, была амплифицирована методом ПЦР с использованием высокоточной полимеразы «Tersus» («Евроген», Россия) и пары праймеров **rhod\_dir** (5'-GCCATGGCACAAGAACTAGGA) и **rhod\_rev** (5'-CGAGCTCCTATTGCTTCGACTAG), а также геномной ДНК *Dokdonia* sp. PRO95 в качестве матрицы. Амплифицированный 849 п.н. фрагмент был клонирован в вектор pBAD-ТОРО™ («Invitrogen», США) с получением плазмиды pТоро\_Rhod\_10. Для удаления N-концевой лидерной последовательности, добавляемой к клонированному гену экспрессионным вектором pBAD-ТОРО, в соответствии с инструкцией производителя конструкция pТоро\_Rhod\_10 была обработана эндонуклеазой *NcoI* и после этого зашита с получением плазмиды pRhod\_10.1. Правильность клонированной вставки была проверена секвенированием. Полученная конструкция (pRhod\_10.1) была трансформирована в клетки *E. coli* штамма BL21.

**Выделение рекомбинантного протеородопсина.** Для индукции синтеза протеородопсина клетки *E. coli*/pRhod\_10.1 сначала выращивали в среде TB до поздней логарифмической фазы роста ( $A_{600} \sim 1,5$ ) при 37°, после чего в ростовую среду добавляли 1,5 г/л L-арабинозы и 1,5 мг/л *полностью-транс*-ретиналя. Клетки далее выращивали при 15° в течение 16 ч [22], далее осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин) и дважды промывали средой, содержащей 300 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl и 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 8,0. Клеточный осадок суспендировали в среде А, содержащей 300 мМ KCl, 20 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 5 мМ имидазол, pH 8,0. Полученную суспензию пропускали дважды через пресс Френча (16 000 psi). Неразрушенные клетки удаляли осаждением при 22 500 g (10 мин), супернатант центрифугировали при 200 000 g (75 мин). Полученный осадок мембран суспендировали в среде А, солиubilизировали его в присутствии 1,5%-ного DDM и центрифугировали при 200 000 g (60 мин). Протеородопсин выделяли из полученного супернатанта с помощью аффинной хроматографии. Для этого супернатант наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA, уравновешенным со средой Б, содержащей 300 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl,

0,05%-ный DDM и 10 мМ имидазол, pH 8,0. Колонку промывали дважды, сначала средой Б, а далее этой же средой, содержащей 100 мМ имидазол. Сорбированный протеородопсин смывали с колонки средой Б, содержащей 250 мМ имидазол. Полученный белок концентрировали и хранили при  $-80^{\circ}$ . Содержание белка определяли бицинониновым методом [23], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

**Светозависимый трансмембранный транспорт протонов в клетках *E. coli*.** Индуцированные клетки *E. coli*/pRhod\_10.1 (*R-E. coli*) осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин), дважды промывали средой, содержащей 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (или K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 10 мМ Tris-HCl и 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 8,0, суспендировали в этой же среде и инкубировали анаэробно при 4° в течение 16 ч. Эта процедура приводила к истощению клеток по эндогенным субстратам и их загрузке нужным катионом (Na<sup>+</sup> или K<sup>+</sup>). Истощенные клетки дважды промывали 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (или K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и суспендировали в этом же растворе до концентрации клеточного белка 2 мг/мл. Полученную суспензию помещали в ячейку объемом 1,4 мл, оснащенную рН электродом. рН суспензии доводили до 7,0 добавлением раствора NaOH (или KOH). Ячейку с клетками инкубировали в темноте, после чего освещали галогенной лампой мощностью 100 Вт в течение 3 мин. Ответы рН электрода калибровали добавлением насыщенного аргоном раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Измерение светозависимого трансмембранного транспорта ионов Na<sup>+</sup> в клетках R-*E. coli*.** Нагруженные Na<sup>+</sup> клетки после темновой инкубации и освещения (как описано выше) осаждали на нитроцеллюлозном фильтре (45 мкм) («Millipore», США) и промывали 5 мл 0,5 М раствора маннитола [24]. Содержание натрия на фильтре определяли с помощью пламенной фотометрии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

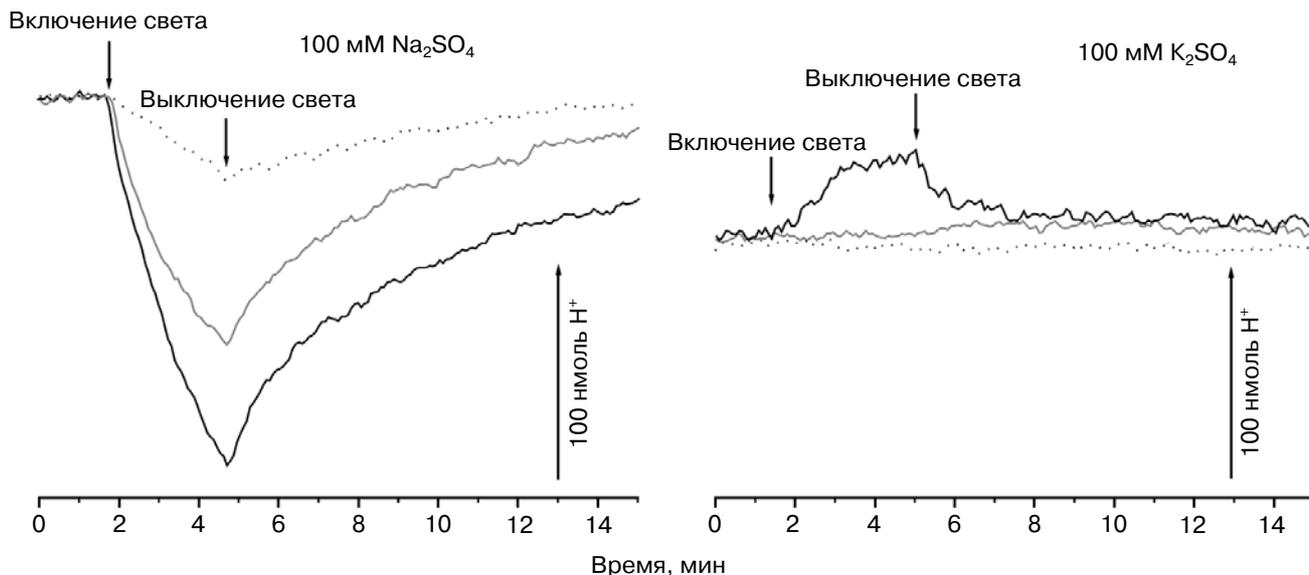
В качестве модельного объекта для изучения Na<sup>+</sup>-транслоцирующего протеородопсина нами был выбран белок «putative xanthorhodopsin» из морской флавобактерии *Dokdonia* sp. PR095 (код доступа в GenBank — AEX55013). Этот белок обладает высоким уровнем идентичности первичной структуры по отношению к двум известным на сегодняшний день представителям семейства Na<sup>+</sup>-помпирующих бактериородопсинов из *K. eikastus* (98% идентичности) и *N. marinus* (84% идентичности). Так же как и у этих светозависимых Na<sup>+</sup>-помп, аминокислотная последовательность протеородопсина из *Dokdonia* со-

держит характерные замены консервативных остатков глутамата, играющих ключевую роль в трансмембранном транспорте протона у H<sup>+</sup>-помпирующих бактериородопсинов, — Glu85Asn и Glu96Gln (нумерация остатков приведена в соответствии с первичной структурой бактериородопсина из *Halobacterium salinarium*), т.е. т.н. NQ-мотив [20]. Таким образом, анализ первичной структуры протеородопсина из *Dokdonia* указывает на то, что этот белок, по-видимому, также является первичной светозависимой натриевой помпой. Это, наряду с культивируемостью *Dokdonia* sp. PR095 и наличием полной последовательности генома данной бактерии [21], делает данный белок привлекательным объектом для изучения механизма светозависимого трансмембранного транспорта ионов натрия.

Для изучения протеородопсина из *Dokdonia* ген этого белка был клонирован в экспрессионный вектор pBAD-ТОРО™. Полученную конструкцию трансформировали в клетки *E. coli* BL21. Гетерологическая экспрессия данной конструкции в присутствии *полностью-транс*-ретиналя приводила к появлению у клеток *E. coli*/pRhod\_10.1 пурпурной окраски, не характерной для клеток кишечной палочки дикого типа, что указывало на высокий уровень продукции ретиналь-содержащего белка.

Ион-транслоцирующие свойства продуцированного белка были исследованы регистрацией светоиндуцированного трансмембранного транспорта протонов. Ранее, при изучении Na<sup>+</sup>-транслоцирующей NADH:хинон оксидоредуктазы из *Vibrio alginolyticus* было показано, что добавление O<sub>2</sub> к клеточной суспензии этой бактерии в присутствии протонофора приводит к защелачиванию среды измерения [25]. Этот эффект обусловлен тем, что при генерации трансмембранного электрического потенциала за счет переноса иона натрия, а не протона, внесение протонофора в среду измерения приводит к возникновению потока H<sup>+</sup>, направленного по градиенту Δψ внутрь клетки. Впоследствии этот метод был успешно применен для изучения многих ион-транслоцирующих ферментов, в том числе и различных родопсинов [17, 19, 26–27].

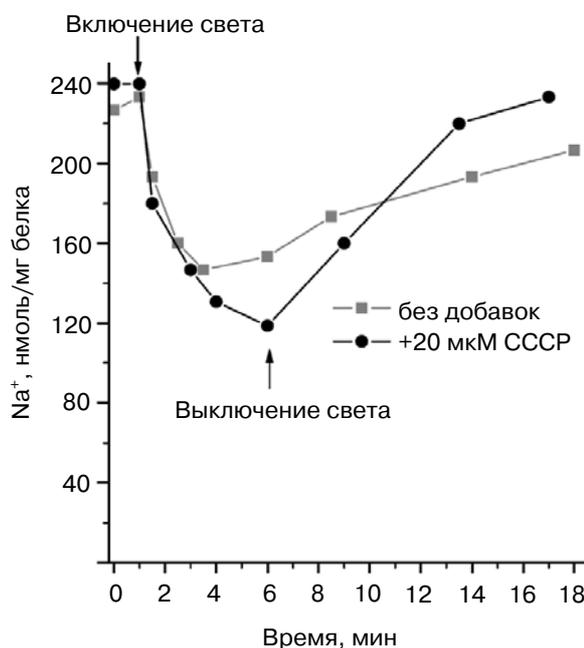
Как показано на рис. 1, а (серая линия), трехминутное освещение анаэробной суспензии клеток R-*E. coli* в растворе Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> приводило к развивающемуся во времени защелачиванию среды, которое спадало до исходных значений рН при выключении света. Освещение контрольных клеток *E. coli*, не содержащих плазмиду pRhod\_10.1, не приводило к каким-либо изменениям значений рН (данные не представлены). Как скорость изменения рН, так и амплитуда



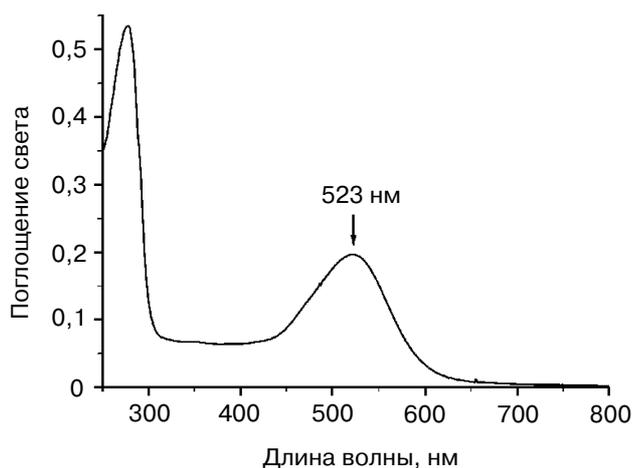
**Рис. 1.** Светозависимое образование  $\Delta\text{pH}$  клетками *E. coli*, продуцирующими протеородопсин из *Dokdonia* sp. PRO95. Анаэробную суспензию клеток *E. coli*/pRhod\_10.1 (2 мг клеточного белка на мл) в 100 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (а) или 100 мМ  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (б) освещали в течение 3 мин с использованием галогенной лампы мощностью 100 Вт. а – Серая линия – светозависимая генерация  $\Delta\text{pH}$  в отсутствие добавок, черная линия – в присутствии 20 мкМ СССР, пунктирная линия – в присутствии 20 мкМ СССР и 25 мМ KSCN; б – серая линия – светозависимая генерация  $\Delta\text{pH}$  в отсутствие добавок, черная линия – в присутствии 25 мМ KSCN, пунктирная линия – в присутствии 25 мМ KSCN и 20 мкМ СССР

ответа в случае протеородопсин-содержащих клеток существенно увеличивались в присутствии протонофора СССР (рис. 1, а, черная линия). Добавление проникающего аниона  $\text{SCN}^-$  приводило к практически полному подавлению светоиндуцируемого защелачивания (рис. 1, а, пунктирная линия), что указывает на то, что оно вызвано пассивным потоком протонов, направленным по градиенту  $\Delta\psi$ . Таким образом, полученные данные показали способность протеородопсина из *Dokdonia* sp. PRO95 к транслокации какого-то другого, отличного от  $\text{H}^+$  иона.

В то же время освещение анаэробной суспензии клеток R-*E. coli* в безнатриевой среде (в растворе  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) не сопровождалось изменением pH среды измерения (рис. 1, б). Добавление проникающего аниона  $\text{SCN}^-$  приводило к появлению небольшого закисления этой среды в ответ на освещение клеточной суспензии. Такое закисление полностью предотвращалось в присутствии протонофора СССР. Так как состав используемых сред отличался лишь используемым катионом ( $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ ), можно считать, что в натрий-содержащих средах протеородопсин из *Dokdonia* sp. PRO95 транспортирует  $\text{Na}^+$ , таким образом, этот белок является первичной натриевой помпой. В отсутствие ионов натрия этот протеородопсин способен использовать протон в качестве помпируемого иона.  $\text{H}^+$ -транслоци-



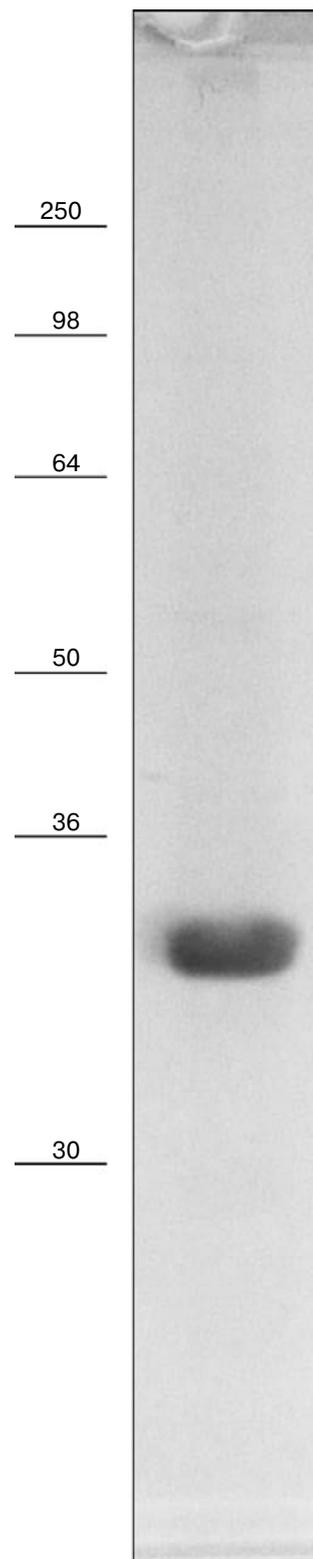
**Рис. 2.** Светозависимый транспорт ионов  $\text{Na}^+$  клетками *E. coli*, продуцирующими протеородопсин из *Dokdonia* sp. PRO95. Суспензию  $\text{Na}^+$ -нагруженных клеток *E. coli*/pRhod\_10.1 в 100 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 мМ Tris-HCl и 5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , pH 8,0, освещали с использованием галогенной лампы мощностью 100 Вт в отсутствие (квадраты) или в присутствии (кружки) 20 мкМ СССР



**Рис. 3.** Оптический спектр выделенного рекомбинантного протеородопсина из *Dokdonia* sp. PRO95. Спектр определяли в среде, содержащей 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 0,05%-ный DDM

рующая активность белка из *Dokdonia* sp. PRO95 намного менее выражена по сравнению с Na<sup>+</sup>-транслоцирующим протеородопсином из *K. eikastus* [17], и по этому показателю изучаемый белок ближе к своему аналогу из *N. marinus* [19].

Для проверки заключения о функционировании протеородопсина из *Dokdonia* sp. PRO95 в качестве первичной натриевой помпы был измерен светоиндуцированный транспорт Na<sup>+</sup> клетками R-*E. coli*. Как показано на рис. 2, освещение клеточной суспензии данного штамма приводило к уменьшению цитоплазматической концентрации ионов натрия. Данный процесс слегка ускорялся в присутствии СССР или, по крайней мере, был устойчив к действию этого протонифора. Таким образом, наблюдаемый транспорт нельзя объяснить за счет протекания каких-либо вторичных процессов, например, за счет работы Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера. Важно отметить, что как защелачивание среды в присутствии СССР (рис. 1, а), так и Na<sup>+</sup>-транспорт (рис. 2) развивались во времени со сходными кинетиками. Более того, в обоих процессах наблюдались сходные амплитуды ответов за первые 3 мин освещения (~90 нмоль H<sup>+</sup> мг белка<sup>-1</sup> и ~110 нмоль Na<sup>+</sup> мг белка<sup>-1</sup> соответственно). Это подтверждает заключение о том, что светозависимое и СССР-активируемое защелачивание внешней среды суспензии клеток R-*E. coli* вызвано именно активным трансмембранным переносом ионов натрия. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что протеородопсин из *Dokdonia* sp. PRO95 действительно функционирует в качестве первичной натриевой помпы.



**Рис. 4.** ДСН-ПААГ электрофореграмма рекомбинантного протеородопсина из *Dokdonia* sp. PRO95, выделенного из клеток *E. coli*. Гель, окрашенный с помощью красителя Coomassie brilliant blue, линии с номерами слева от геля показывают положение и молекулярные массы белковых маркеров (в кДа)

Na<sup>+</sup>-транслоцирующий протеородопсин из *Dokdonia* sp. PRO95 был выделен из клеток R-*E. coli* с помощью аффинной хроматографии в одну стадию очистки с выходом около 3 мг очищенного белка с одного литра клеточной культуры. Как показано на рис. 3, оптический спектр полученного препарата имеет два основных пика поглощения — при 279 и 523 нм. Коротковолновый пик соответствует поглощению света ароматическими аминокислотными остатками, а длинноволновый — поглощению света ретиналем. Положение максимума при 523 нм хорошо соответствует спектральным свойствам двух других известных Na<sup>+</sup>-транслоцирующих протеородопсинов [17, 19]. Относительно небольшое соотношение амплитуд двух пиков спектра ( $A_{279\text{ нм}}/A_{523\text{ нм}} = 2,7$ ) указывает на высокую степень очистки изучаемого белка [22]. Важно также отметить отсутствие каких-либо дополнительных полос поглощения в спектре Na<sup>+</sup>-транслоцирующего протеородопсина, в том числе и в области  $\gamma$ -пиков цитохромов (400–450 нм). Это означает отсутствие в полученном препарате оксидазы *bo*-типа, являющейся основным примесным белком при выделении на никелевых носителях гексагистидин-со-

держащих белков из мембранной фракции *E. coli*. Заключение о чистоте полученного препарата подтвердилось результатами его анализа с помощью ДСН-ПААГ. Как видно из рис. 4, электрофореграмма выделенного белка содержит лишь одну основную белковую полосу с кажущейся мол. массой ~33 кДа (теоретическая  $M_r$  для Na<sup>+</sup>-транслоцирующего протеородопсина из *Dokdonia* sp. PRO95 вместе с полигистидиновым хвостом составляет 34,8 кДа). Полученные данные демонстрируют чистоту полученного препарата (как по спектральным свойствам, так и по белковому составу), достаточную для его дальнейшего исследования.

Таким образом, можно заключить, что протеородопсин из морской флавобактерии *Dokdonia* sp. PRO95 (АЕХ55013) является первичной светозависимой натриевой помпой. Высокий уровень гетерологической продукции этого белка в клетках *E. coli*, а также стабильность и чистота выделяемых препаратов делают этот протеородопсин удобной моделью для изучения механизма активной трансмембранной транслокации ионов натрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 14-14-00128).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dimroth, P. (1980) A new sodium-transport system energized by the decarboxylation of oxaloacetate, *FEBS Lett.*, **122**, 234–236.
- Dimroth, P., Jockel, P., and Schmid, M. (2001) Coupling mechanism of the oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 1–14.
- Unemoto, T., and Hayashi, M. (1979) NADH:quinone oxidoreductase as a site of Na<sup>+</sup>-dependent activation in the respiratory chain of marine *Vibrio alginolyticus*, *J. Biochem.*, **85**, 1461–1467.
- Verkhovsky, M.I., and Bogachev, A.V. (2010) Sodium-translocating NADH:quinone oxidoreductase as a redox-driven ion pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 738–746.
- Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., Marxer, M., Oelze, J., and Klipp, W. (1993) Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase, *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 602–615.
- Muller, V., Imkamp, F., Biegel, E., Schmidt, S., and Dilling, S. (2008) Discovery of a ferredoxin: NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*. A novel potential coupling site in acetogens, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1125**, 137–146.
- Gottschalk, G., and Thauer, R.K. (2001) The Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 28–36.
- Kaesler, B., and Schönheit, P. (1989) The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> and 2H<sub>2</sub> in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na<sup>+</sup> translocation at a stoichiometry of 2–3 Na<sup>+</sup>/CO<sub>2</sub>, *Eur. J. Biochem.*, **184**, 223–232.
- Heefner, D.L., and Harold, F.M. (1982) ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2798–2802.
- Kluge, C., Laubinger, W., and Dimroth, P. (1992) The Na<sup>+</sup>-translocating ATPase of *Propionigenium modestum*, *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 572–577.
- Malinen, A.M., Belogurov, G.A., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2007) Na<sup>+</sup>-pyrophosphatase: a novel primary sodium pump, *Biochemistry*, **46**, 8872–8878.
- Kakinuma, Y., and Unemoto, T. (1985) Sucrose uptake is driven by the Na<sup>+</sup> electrochemical potential in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*, *J. Bacteriol.*, **163**, 1293–1295.
- Dibrov, P.A., Kostyrko, V.A., Lazarova, R.L., Skulachev, V.P., and Smirnova, I.A. (1986) The sodium cycle. I. Na<sup>+</sup>-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 449–457.
- Skulachev, V.P. (1989) The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **21**, 635–647.
- Mulkidjanian, A.Y., Dibrov, P., and Galperin, M.Y. (2008) The past and present of the sodium energetics: May the sodium-motive force be with you, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 985–992.
- Grote, M., Engelhard, M., and Hegemann, P. (2014) Of ion pumps, sensors and channels — perspectives on microbial rhodopsins between science and history, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 533–545.
- Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nature Commun.*, **4**, 1678.

18. Luoto, H.H., Nordbo, E., Baykov, A.A., Lahti, R., and Malinen, A.M. (2013) Membrane Na<sup>+</sup>-pyrophosphatases can transport protons at low sodium concentrations, *J. Biol. Chem.*, **288**, 35489–35499.
19. Yoshizawa, S., Kumagai, Y., Kim, H., Ogura, Y., Hayashi, T., Iwasaki, W., DeLong, E.F., and Kogure, K. (2014) Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6732–6737.
20. Kwon, S.K., Kim, B.K., Song, J.Y., Kwak, M.J., Lee, C.H., Yoon, J.H., Oh, T.K., and Kim, J.F. (2013) Genomic makeup of the marine flavobacterium *Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis* and identification of a novel class of rhodopsins, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 187–199.
21. Riedel, T., Gomez-Consarnau, L., Tomasch, J., Martin, M., Jarek, M., Gonzalez, J.M., Spring, S., Rohlf, M., Brinkhoff, T., Cypionka, H., Goker, M., Fiebig, A., Klein, J., Goesmann, A., Fuhrman, J.A., and Wagner-Dobler, I. (2013) Genomics and physiology of a marine flavobacterium encoding a proteorhodopsin and a xanthorhodopsin-like protein, *PLoS One*, **8**, e57487.
22. Gourdon, P., Alfredsson, A., Pedersen, A., Malmerberg, E., Nyblom, M., Widell, M., Berntsson, R., Pinhassi, J., Braiman, M., Hansson, O., Bonander, N., Karlsson, G., and Neutze, R. (2008) Optimized *in vitro* and *in vivo* expression of proteorhodopsin: a seven-transmembrane proton pump, *Protein Express Purif.*, **58**, 103–113.
23. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76–85.
24. Verkhovskaya, M.L., Verkhovsky, M.I., and Wikstrom, M. (1996) The respiration-driven active sodium transport system in *E. coli* does not function with lithium, *FEBS Lett.*, **388**, 217–218.
25. Tokuda, H., and Unemoto, T. (1982) Characterization of the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10007–10014.
26. Bogachev, A.V., Murtasina, R.A., and Skulachev, V.P. (1997) The Na<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of the Na<sup>+</sup>-motive NADH:quinone oxidoreductase in *Vibrio alginolyticus*, *FEBS Lett.*, **409**, 475–477.
27. Avetisyan, A.V., Kaulen, A.D., Skulachev, V.P., and Feniouk, B.A. (1998) Photophosphorylation in alkaliphilic halobacterial cells containing halorhodopsin: chloride-ion cycle? *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 625–628.

## PROTEORHODOPSIN FROM *Dokdonia* sp. PRO95 IS A LIGHT-DRIVEN Na<sup>+</sup>-PUMP

Y. V. Bertsova, A. V. Bogachev, V. P. Skulachev\*

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,  
M. V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow,  
Russia; fax: +7(495)939-0338, E-mail: skulach@belozersky.msu.ru

Received November 23, 2014

The gene encoding proteorhodopsin AEX55013 from *Dokdonia* sp. PRO95 was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells. Illumination of the proteorhodopsin-producing *E. coli* cells in Na<sup>+</sup>-containing media resulted in alkalization of the media. This response was accelerated by the uncoupler CCCP and inhibited by penetrating anion SCN<sup>-</sup>. Illumination of the cells in sodium-free medium (made by substituting Na<sup>+</sup> with K<sup>+</sup>) resulted in SCN<sup>-</sup>-stimulated and CCCP-sensitive acidification of the medium. Illumination of the proteorhodopsin-containing *E. coli* cells caused CCCP-resistant transmembrane sodium export from these cells. We conclude that the proteorhodopsin from the marine flavobacterium *Dokdonia* sp. PRO95 is a primary light-driven Na<sup>+</sup>-pump. A high level of the heterologous production in *E. coli* cells as well as stability and purity of the isolated protein makes this proteorhodopsin an attractive model to study mechanism of active sodium transmembrane translocation.

**Key words:** Na<sup>+</sup>-translocating proteorhodopsin, transmembrane sodium transport, flavobacteria